



Technische Universität München

Fakultät für Chemie



Biosystemchemie

**Herstellung und funktionelle Charakterisierung von neuen
Biokatalysatoren für die Verwendung in der Naturstoffsynthese**

Françoise Schaefers

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Hubert A. Gasteiger

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. Tobias A.M. Gulder

2. Univ.-Prof. Dr. Stephan A. Sieber

Die Dissertation wurde am 24.10.2016 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 24.11.2016 angenommen.

*Für meine Eltern,
Für meine Schwestern*

La vie n'est facile pour aucun de nous. Mais quoi, il faut avoir de la persévérance, et surtout de la confiance en soi. Il faut croire que l'on est doué pour quelque chose, et que cette chose il faut l'atteindre coûte que coûte.

Marie Curie

Danksagung

Prof. Dr. Tobias A.M. Gulder möchte ich zunächst dafür danken, dass er mir das Vertrauen geschenkt hat die Doktorarbeit in seinem Arbeitskreis durchzuführen und mir die sehr spannenden und interessanten Themen zugewiesen hat. Vor allem möchte ich mich aber für die gute Betreuung mit den vielen Ratschlägen und Hilfestellungen zu den Laborarbeiten sowie die gemeinschaftlichen Ausflüge, Grillabende und Feste bedanken. Viel durfte ich lernen und ich konnte auf die Unterstützung von allen Seiten zählen. Ich habe mich in dieser Arbeitsgruppe sehr wohlfühlt und daher fällt es mir auch nicht ganz so leicht diesen Lebensabschnitt nun hinter mir zu lassen.

In diesem Zusammenhang möchte ich mich bei zwei Personen dieses Arbeitskreises ganz besonders bedanken. Hülya, mein Traum, und René haben mich vom Beginn meiner Promotion bis jetzt, zum Ende, begleitet. Ich durfte nicht nur sehr viel von euch lernen, ihr habt stets meine tausend Fragen beantwortet und falls ich nicht mehr weiterwusste, habt ihr mir mit neuen Ideen und Anregungen geholfen. Aber nicht nur im Laboralltag, sondern vor allem außerhalb der Laborwände habt ihr mich begleitet. Viele tolle Sachen haben wir gemeinsam bestritten, ihr bringt mich in den unlustigsten Momenten zum Lachen und ich bin sehr dankbar euch kennengelernt zu haben und als Freunde bezeichnen zu dürfen. Danke euch für all dies.

Anna S. (Schluggi), Anna G. (Kind), Jana (jagt die Jana), Hanna (Hanamo) und Paul (Bratwurstschnecke) möchte ich auch gerne hervorheben, da diese „Kollegen“ mir auch sehr ans Herz gewachsen sind, im Labor, auch beim Singen, und vor allem bei unseren Naturaktivitäten. Ihr habt mir das Doktorandenleben in Bonn und vor allem an der Eliteuni verschönert.

Bei Prof. Dr. Stephan Sieber bedanke ich mich für die Übernahme des zweiten Gutachtens der Arbeit sowie bei Prof. Dr. Hubert A. Gasteiger für die Übernahme des Vorsitzes der Prüfungskommission.

Dr. Sabine Schneider und Sabrina (TUM) möchte ich mich für die Zusammenarbeit bei den Kristallisationsansätzen bedanken. Der Masseabteilung der Universität Bonn, vor allem Frau Peters-Pflaumbaum, danke ich für die LC-MS Messungen. Sowie Herr Andreas Schneider für die Isolierung meiner Substanzen.

Dr. Christoph Kohlhaas, Dr. Christoph Patzelt, Anna Glöckle, tausend Dank für das Korrekturlesen meiner Arbeit. Das war bestimmt kein Spaß und ihr habt euch nie beschwert. Weiterhin haben auch René Richarz, Dr. Paul D'Agostino, Dr. Brandon Morinaka, Dr. Hülya Aldemir, Dr. Christian Drerup, Philipp, Daniel und Marko meine Arbeit teils korrigiert, auch euch vielen lieben Dank dafür.

Aus der Zeit meiner Promotion an der Universität Bonn möchte ich einigen Leuten aus dem AK. Piel und Umfeld danken, dass sie nicht nur fachliche Anregungen und Ratschläge für mich hatten, sondern auch dafür gesorgt haben, dass ich mich nie in meiner „Freizeit“ gelangweilt habe: Mike F., Brandon, Max, Kathrin, Cristian, Annette, Ursula, Petra, Peter, Sarah, Moritz, Stefan, Frank, Lisa und Maria. Nicht zu vergessen ebenso Christoph, der mich außerdem nicht nur zur Naturstoffchemie gebracht hat und mir dadurch den Weg in den Arbeitskreis von Prof. Dr. T.A.M. Gulder gezeigt hat, sondern mir auch bei vielen Fragen und beim Zusammenschreiben gerne geholfen hat. Außerdem hat er meist dafür gesorgt, dass ich mir die Bayern nie alleine anschauen musste.

In München konnte ich mich auch auf einige (Elite-☺)Leute verlassen, die, wenn es nötig war, für Ablenkung sorgten. Danke an Jenny, Stephan, Mihi (Monchichi) und Oli (Lurchi), sowie Marko (Sranje), Max, Marie und Susanne, die Chipmunks: Daniel, Philipp, Martin und Fabi. Alle Therapiestunden, ob über Baseballschlägereien reden, beim Kleistern, bei verrückten Einladungen schreiben, Karten spielen, Schnappstesten oder einfach Zeitungen lesen, waren ihre Zeit und ihr Geld immer wert.

Weiterhin möchte ich mich bei Personen bedanken, die mich im Studium sowie während der Doktorarbeit immer unterstützt haben und mir zur Seite standen wann immer ich Hilfe brauchte, sogar ohne danach zu fragen. Sandra, Danke, dass du mich immer verstehst und die richtigen Worte für mich findest. Du warst und bist mir eine riesige Stütze, vielen Dank für unsere Abenteuer die wir zusammen erleben durften und weiterhin erleben werden. Christian, mein Ehemann, nie lässt du mich im Stich und dein Ohr ist immer offen, Danke. Christoph P. du hast mich mehr als einmal gerettet, wenn ich nicht mehr konnte. Ich bin sehr froh, dass sich unsere Wege gekreuzt haben, auch wenn wir dazu beide vom Rheinland nach Bayern umziehen mussten. Bianca, Fläusch, oui dech wär ech wahrscheinlech guer net do wou ech lo sin. Merci vir déi bescht Mattbewunnerin an virun allem vir déi Frenschafft déi mir lo schons laaang hun an sou wärtvoll as. Kathi, du warst für mich unglaublich wertvoll in München, vor allem am Anfang. Danke dass du mich bei der Hand genommen hast und wir so

tolle Momente zusammen hatten (und hoffentlich weiterhin haben werden), die mich dazu gebracht haben, das (Nacht)-Leben in München zu schätzen und zu geniessen.

Vor allem aber Danke an meine Schwestern, Christine, Stink 1, und Diane, Stink 2, Schaefers. Dir sidd déi bescht Schwesternen déi een sech wenschen kann. Dir hudd mir emmer d'Gefill gin op der richteger Spuer ze sin an wart emmer vir mech do. Weekender hudd dir ierch fräigemach nemmen well den Stink 3 seet et kennt zu Besuch. Zäit as emmer knapp bei ierch, mee wann et muss sin dann hat der emmer Minutten, Stonnen an Deeg vir mech. Ech soen ierch villmols merci vir alles waat dir vir mech gemaach hudd an dass dir sou sidd, wéi dir sidd! Dir sidd mir immens wichteg an virun allem är Ennerstetzung huet mech op desen Punkt bruecht. Merci as keen Ausdrock, mee dir wesst ewéi Léif ech ierch hun!!

Jetzt fehlt noch der größte Dank an meine Eltern, Lydie Urbé und Aloyse Schaefers. Sie haben mir nicht nur das Studium und die Doktorarbeit ermöglicht, sondern haben mich auch so gut unterstützt wie sie nur konnten. Merci dass dir emmer un mech gegleewt hudd an mir d'Gefill gin hudd daat richtegt ze man, och wann der mech dofir vläit vir d'Éischt un Zweifelen huet missen brengen. Ech sin ierch immens dankbar vir alles waat dir mir erméiglecht hudd. Ech duerft meng Studien genéissen an mir goug et emmer gudd. Ech hat emmer een Doheem an Elteren déi mech matt hieren groussen Hierzer empfangen hun. Ech sin immens frou matt ierch. Merci dass dir do sidd an mir, ewéi och mengen Schwesternen, esouvill Léift schenkt.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Nicht-ribosomale-Peptide	6
1.1.1	Nicht-ribosomale-Peptidsynthetasen	6
1.2	Polyketide	11
1.2.1	Polyketidsynthasen	11
1.2.2	PKS-Klassen.....	13
1.3	PKS/NRPS-Hybride	19
1.4	Die Biarylbindung.....	20
2	Hintergrund und Zielsetzung	22
2.1	Hintergrund zu den Brabantamiden (42a-c)	22
2.1.1	Biosynthese der Brabantamide (42a-c).....	23
2.2	Zielsetzung des Brabantamid-Projekts	29
2.3	Hintergrund zu den Arylomycinen (60a-l).....	31
2.3.1	Biosynthese der Arylomycine.....	32
2.4	Zielsetzung des Arylomycin-Projekts.....	35
2.5	Hintergrund zu Ikarugamycin (66).....	37
2.6	Zielsetzung des Ikarugamycin-Projekts	39
3	Ergebnisse und Diskussion	40
3.1	Arbeiten zur Aufklärung der Brabantamid-Biosynthese	40
3.1.1	Heterologe Expression der Proteine zur Aufklärung der Brabantamid-Biosynthese	40
3.1.2	Synthese der Brabantamid-Vorstufen 57a-c , 58a-b und 59	44
3.1.3	Enzymatische Reaktionen zur Aufklärung der Funktion der TE-Domäne und von BraC in der Brabantamid-Biosynthese	68
3.2	Chemo-enzymatische Totalsynthese der Arylomycine (60a-e).....	85
3.2.1	Heterologe Expression der Proteine zur chemoenzymatischen Totalsynthese der Arylomycine (60a-e).....	85
3.2.2	UV-Spektroskopische Analyse von AryC	94
3.2.3	Enzymatische Umsetzungen zur chemo-enzymatischen Totalsynthese der Arylomycine (60a-l)	95
3.2.4	Laccasen als Katalysatoren zur Knüpfung von Biarylbindungen.....	106
3.3	Aufklärung der Biosynthese von Ikarugamycin	110

Inhaltsverzeichnis

3.3.1	Klonierung von <i>ikaA</i> , <i>ikaAB</i> und <i>ikaABC</i>	110
3.4	Synthese von 6-Chlorotryptophan zur Aufklärung der Biosynthese von JBIR-35 (135).....	113
3.5	Zusammenfassung	116
3.6	Abstract.....	121
4	Experimenteller Teil	126
4.1	Verwendete Apparaturen und Messgeräte	126
4.2	Vektoren, Organismen und Primer.....	129
4.2.1	Vektoren	129
4.2.2	Organismen	129
4.2.3	Primer	130
4.3	Medien und Puffer.....	134
4.3.1	Nährmedien.....	134
4.3.2	Puffer	138
4.4	Antibiotika und Zusätze	146
4.5	Mikro- und molekularbiologische Techniken	147
4.5.1	Kultivierung von Bakterien	147
4.5.2	Stockkulturen	147
4.5.3	Isolierung von Plasmiden	148
4.5.4	Bestimmung der Zelldichte in Flüssigkulturen	148
4.5.5	Herstellung chemisch kompetenter Zellen	148
4.5.6	Herstellung elektrisch kompetenter Zellen.....	149
4.5.7	Herstellung von Protoplasten aus <i>Streptomyces lividans</i>	149
4.5.8	Polymerasenkettenreaktion (PCR).....	150
4.5.9	Screening-PCR	152
4.5.10	Single-Overlap-Extension-PCR.....	153
4.5.11	Two-step-PCR	154
4.5.12	PCR-Produkt-Aufreinigung	155
4.5.13	Agarose-Gelelektrophorese	155
4.5.14	Agarosegel-Aufreinigung.....	156
4.5.15	Restriktionspaltung von DNA	157
4.5.16	Dephosphorylierung der Vektoren	158
4.5.17	Ligation	159
4.5.18	Transformation.....	159

Inhaltsverzeichnis

4.5.19	Sequenzierung.....	160
4.6	Proteinexpression und Proteinaufreinigung	161
4.6.1	Allgemeine Bedingungen zur Proteinexpression in <i>E. coli</i>	161
4.6.2	Zellaufschluss	161
4.6.3	Aufreinigung von His-Tag-Fusionsproteinen.....	162
4.6.4	Entsalzung und Aufkonzentration der Proteine.....	162
4.6.1	His-Tag-Abspaltung	163
4.6.2	Rekonstitution von AryC.....	163
4.6.3	Aufreinigung mittels FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography)	164
4.6.4	Proteinkonzentrationsbestimmung	164
4.6.5	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	165
4.6.6	Horizontale Konjugation in Streptomyceten	167
4.6.7	Protoplastentransformation	167
4.7	Biotechnologische Produktion der Bicyclen 119a-c und 59	168
4.7.1	Allgemeine Expressionsbedingungen.....	168
4.7.2	Extraktion der Produkte	168
4.8	Enzymatische Assays im Rahmen des Brabantamid-Projekts.....	170
4.8.1	PCP-Beladungsassays mit dem CoA-Derivat 57c	170
4.8.2	Thioesterase Assays mit vereinfachten Substraten 57a,b und 83	170
4.8.3	BraC Assays mit vereinfachten Substraten	172
4.8.4	Gekoppelte Assays von Thioesterase und BraC mit vereinfachten Substraten	173
4.8.5	BraC-Assays mit dem Bicyclus 59	174
4.9	Enzymatische Assays im Rahmen des Arylomycin-Projekts.....	175
4.9.1	CO-Bindeassays von AryC.....	175
4.9.2	PCP-Beladungsassays	175
4.9.3	Biarylkupplungsassays.....	176
4.9.4	Laccase-Assay	176
4.10	Kristallisation von AryC.....	178
4.10.1	Prä-Kristallisationstest.....	178
4.10.2	Thermostabilitätsassay.....	178
4.10.3	Kristallisation	179
4.11	Chromatographische Methoden	180
4.12	Allgemeine Arbeitsvorschriften.....	183

Inhaltsverzeichnis

4.12.1	Präparatives Arbeiten.....	183
4.12.2	Lösungsmittel	183
4.13	Synthesen der vereinfachten Substrate 57a-c	185
4.13.1	<i>N</i> -Lauryl-L-Ser-OMe (70).....	185
4.13.2	<i>N</i> -Lauryl-L-Ser-L-Pro-OMe (76)	186
4.13.3	<i>N</i> -Lauryl-L-Ser-L-Pro (69).....	187
4.13.4	<i>N</i> -Lauryl-L-Ser-L-Pro-SNAc (57b).....	188
4.13.5	<i>N</i> -Lauryl- <i>O</i> - <i>tert</i> -butyl-L-Ser-OMe (78)	189
4.13.6	<i>N</i> -Lauryl- <i>O</i> - <i>tert</i> -butyl-L-Ser (79)	190
4.13.7	<i>N</i> -Lauryl- <i>O</i> - <i>tert</i> -butyl-L-Ser-L-Pro-OMe (80).....	191
4.13.8	<i>N</i> -Lauryl- <i>O</i> - <i>tert</i> -butyl-L-Ser-L-Pro (81)	192
4.13.9	<i>N</i> -Lauryl- <i>O</i> - <i>tert</i> -butyl-L-Ser-L-Pro-SNAc (83)	193
4.13.10	<i>N</i> -Lauryl-L-Ser-L-Pro-SNAc (57b).....	195
4.13.11	<i>N</i> -Lauryl- <i>O</i> - <i>tert</i> -butyl-L-Ser-L-Pro-Thiophenol (82)	196
4.13.12	<i>N</i> -Lauryl-L-Ser-L-Pro-Thiophenol (57a).....	197
4.13.13	<i>N</i> -Lauryl-L-Ser-L-Pro-Coenzym A (57c)	198
4.14	Synthese der Dehydroalanin-Analoga	200
4.14.1	<i>N</i> -Lauryl-L-Ser-Gly-OMe (97)	200
4.14.2	Methyl (2-undecyl-4,5-dihydrooxazol-4-carbonyl)-Gly-OMe (99).....	201
4.14.3	<i>N</i> -Bz-L-Ser-Gly-OMe (100)	202
4.14.4	1-Benzylaziridin-2-carbonyl-glycinmethylester (101)	203
4.14.5	<i>N</i> -Boc-L-Ser (148).....	204
4.14.6	<i>N</i> -Boc-L-Ser-Gly-OMe (102)	205
4.14.7	<i>N</i> -Boc-Acrylmethylester (104).....	206
4.15	Synthese der Zwischenstufe 59	207
4.15.1	<i>tert</i> -Butyl-2-(methoxy(methyl)carbanoyl)pyrrolidin-1-carboxylat (111).....	207
4.15.2	<i>N</i> -Boc-2-Acetylpyrrolidin (112)	208
4.15.3	<i>tert</i> -Butyl-2(1-((triethylsilyl)oxy)vinyl)pyrrolidin-1-carboxylat (117).....	209
4.15.4	Ethyl- <i>E</i> -2-(benzylimino)acetat (116)	210
4.15.5	<i>tert</i> -Butyl-2-(3-(benzylamino)-4-ethoxy-4-oxobutanoyl)pyrrolidin-1-carboxylate (118).....	211
4.16	Synthese von 6-Chlorotryptophan (139).....	213
4.16.1	<i>N</i> -Acetyl-6-chlorotryptophan (144).....	213
4.16.2	6-Chlorotryptophan (139)	214

Inhaltsverzeichnis

5	Literaturverzeichnis	216
6	Abkürzungsverzeichnis	225
7	Anhang.....	230

1 Einleitung

Seit jeher spielen die Natur und ihre Produkte eine enorm wichtige Rolle für die menschliche Entwicklung. So sind Nahrungsmittel, Kleidung, Werkzeuge oder Heilmittel direkt aus der Natur bezogen worden. Durch technische und wissenschaftliche Entwicklungen sind wir heute nicht mehr primär auf die Natur angewiesen. Trotzdem ist sie nach wie vor die wichtigste Quelle der Inspiration, beispielsweise für die Entwicklung neuer Materialien und Wirkstoffe. Ein prominentes Beispiel ist der Lotus-Effekt, welcher schon mindestens seit 2000 Jahren in Asien bekannt ist,^[1] dessen Funktionsprinzip aber erst Mitte der 90er Jahre von Barthlott und Neinhuis aufgeklärt werden konnte.^[2] Mittlerweile wird dieses Phänomen biomimetisch im großtechnischen Maßstab ausgenutzt, um die Eigenschaften von Oberflächenmaterialien zu verbessern. Vor allem aber im Bereich der Medizin wurden schon vor mehreren tausend Jahren Naturstoffextrakte als Arzneimittel zur Heilung von Krankheiten und zur Linderung von Schmerzen eingesetzt.^[3] ‚Die Natur ist die beste Apotheke‘ stellte Sebastian Kneipp schon im 19. Jahrhundert treffend fest. Seit dem 20. Jahrhundert ist es vor allem die Antibiotikaforschung, für die Naturstoffe unerlässlich sind. Bei der Betrachtung der heutzutage eingesetzten Verbindungsklassen zeigt sich, dass es nur drei Strukturtypen gibt, deren Ursprung rein präparativ ist.^[4] Der erste und wohl bekannteste Naturstoff, der seit 1940 in der antibakteriellen Therapie eingesetzt wird, ist Penicillin G (**1**) (Abbildung 1).^[5] Mit Alexander Flemmings Entdeckung und der vorherigen Einführung synthetisch zugänglicher Sulfonamide im Jahr 1935 sank die Mortalitätsrate bei bakteriellen Infektionen drastisch^[6] und es begann das sogenannte ‚goldene Zeitalter‘ der antibakteriellen Entdeckungen.^[7] 1949 wurde beispielsweise das erste Polyketid, Tetracyclin (**2**), eingeführt, 1952 das Makrolid Erythromycin A (**3**), 1958 das Glycopeptid Vancomycin (**4**) und 1962 Pristinamycin IA und IIA (**5**), die zu der Klasse der Streptogramine gehören.^[8] Nach der Entdeckung und Entwicklung von zahlreichen erfolgreichen Antibiotika bestand kaum Interesse an der weiteren kostspieligen Erforschung neuer antibakterieller Wirkstoffe. Erst 40 Jahre später bestand aufgrund neuer Herausforderungen, wie der Resistenzbildung, wieder gesteigertes Interesse an der Neuentwicklung hochwirksamer und potenter Antibiotika. So wurde 2001 das nächste Antibiotikum Linezolid (**6**), ein synthetisch hergestelltes Oxazolidon, und 2003 der Naturstoff Daptomycin (**7**), das erste Lipopeptid auf den Markt gebracht.^[8]

Einleitung

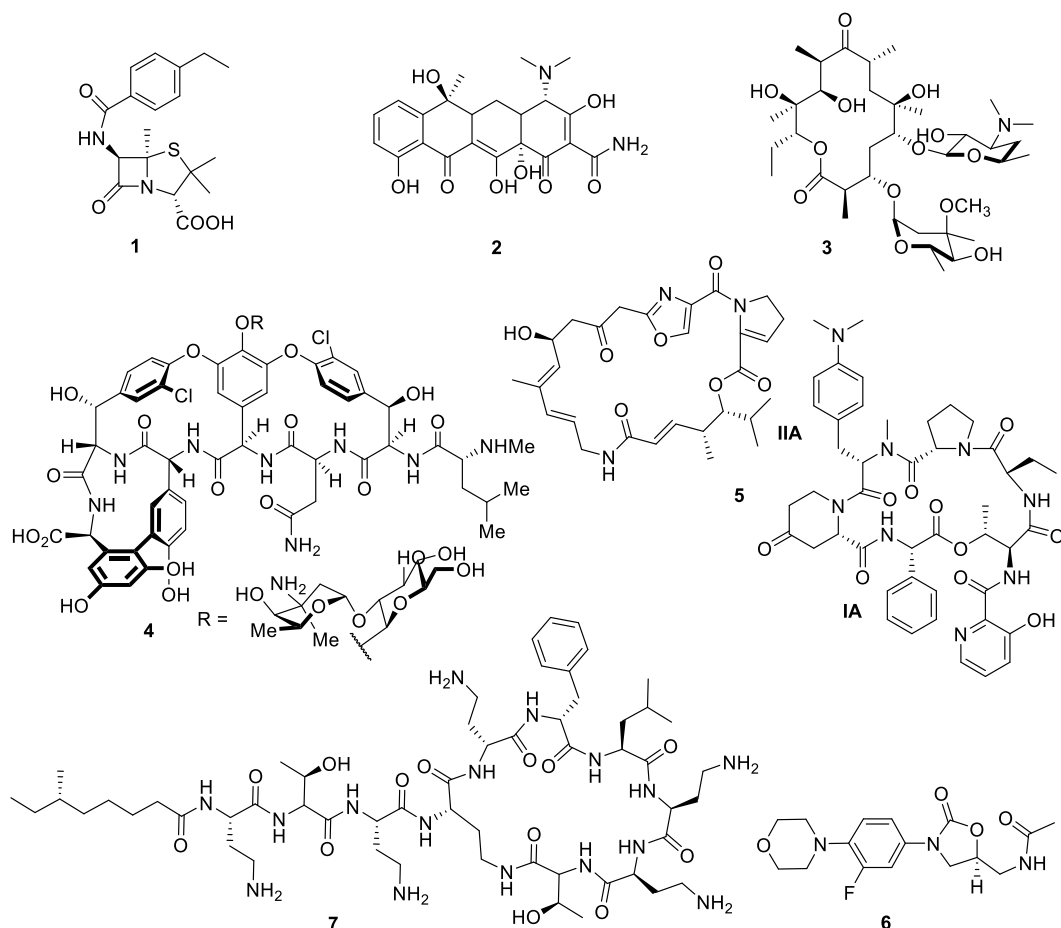


Abbildung 1. Strukturen verschiedener Antibiotika, die von 1940-2003 als Therapeutika zugelassen wurden: Penicillin G (1), Tetracyclin (2), Erythromycin A (3), Vancomycin (4), Pristinamycin IA und II A (5), Linezolid (6) und Daptomycin (7).

Da noch im Jahre 2004 Infektionskrankheiten die zweithäufigste Todesursache weltweit und die dritthäufigste Todesursache in Industrieländern waren, zeigt sich die Dringlichkeit ihrer effektiven Behandlung.^[9] Eine Vielzahl dieser Infektionskrankheiten hatte einen bakteriellen Ursprung. Auch nach der Entdeckung des Penicillins und der darauffolgenden Einführungen mehrerer, hocheffizienter Antibiotika, stellen bakterielle Infektionen eine der größten Herausforderungen in der heutigen und zukünftigen Gesundheitsversorgung dar. Es breiten sich Pathogene aus, die gegen mehrere Antibiotika resistent sind und ehemalige Reserveantibiotika, wie beispielsweise Vancomycin (4), müssen mittlerweile in der Ersttherapie eingesetzt werden.^[10] Die Schwierigkeit der Neuentwicklung von Antibiotika zeigt sich in der großen Zeitspanne zwischen dem „goldenen Zeitalter“ der Antibiotikaentdeckungen und der aktuellen Dringlichkeit neuer Präparate. Zudem ist für die chemische Industrie die Entwicklung von Antibiotika unökonomisch, da Patienten mit diesen üblicherweise nur kurzfristig behandelt werden. Somit sind mit solchen Medikamenten

Einleitung

momentan noch immer nur relativ geringe Gewinne zu erzielen. Im Gegensatz dazu werden Arzneimittel gegen chronische Erkrankungen, beispielsweise Bluthochdruck oder Diabetes, als Langzeittherapeutika eingesetzt. Auch im Bereich von Krebsmedikamenten sind sehr viel höhere Gewinnspannen zu erzielen.

Die Synthese hochfunktionalisierter, komplexer Naturstoffe wie in Abbildung 1, ist nicht nur technisch schwierig, sondern auch mit einem enormen Kostenaufwand verbunden. Während der Synthese müssen oft teure und umweltschädliche Chemikalien und Katalysatoren benutzt werden, vor allem um Regio- und Stereoselektivitäten in Reaktionen zu ermöglichen. Weiterhin werden häufig extreme Reaktionsbedingungen benötigt und es entstehen unerwünschte und oft toxische Nebenprodukte. Aus diesem Grund werden auch heute noch viele Naturstoff-abgeleitete Medikamente fermentativ oder semi-synthetisch hergestellt. Ein weiterer, vielversprechender Ansatz, um die Nachteile einer klassisch-chemischen Synthese zu umgehen, ist in der chemo-enzymatischen Synthese zu sehen. Enzyme sind molekulare Katalysatoren, die im Gegensatz zu den typischen Organo- oder Metall-basierten Katalysatoren Reaktionen unter sehr milden Bedingungen erlauben. Charakteristisch für die Reaktionen sind gute Ausbeuten und sehr gute Regio- und Stereoselektivitäten. Bereits seit Beginn der industriellen Antibiotikaproduktion in den 1940er Jahren wurde daher die Natur mit ihren biosynthetischen Prozessen als Vorbild genommen um pharmakologisch aktive Substanzen enzymkatalytisch herzustellen. Ein Beispiel ist die industrielle Herstellung von semisynthetischen Antibiotika, welche sich von der Struktur des Antibiotikums **1** ableiten, mit Hilfe von Acylasen (Abbildung 2a).^[11] Dies leitete die erste Welle der Nutzung von Biokatalysatoren ein. Neben den aufgezeigten Vorteilen, die enzymatische Reaktionen mit sich bringen, weisen Enzyme auch einige Nachteile auf. Dazu gehören ihre oftmals geringe Stabilität in nicht-wässriger Umgebung, das Benötigen von Cofaktor-Regenerationssystemen und ihre hohe Substratspezifität. Dies sind im Hinblick auf ihren potentiellen großtechnischen Einsatz limitierende Faktoren. Zu Beginn der Forschung der Biokatalyse waren somit noch viele Optimierungen nötig.

In den 1980er und 1990er Jahren begann die sogenannte zweite Welle der Biokatalysatoren.^[12] Durch ‚protein engineering‘, meist auf struktureller Ebene der Proteine, konnte die Substratspezifität der Enzyme erweitert und die Synthese neuartiger Moleküle eröffnet werden. Die Synthese von (S)-3-Phenoxy-benzaldehyd (**12**), einer Vorstufe für

Einleitung

mehrere Insektizide, darunter Deltamethrin (**13**), wurde durch die Katalyse einer Hydroxynitril-Lyase revolutioniert (Abbildung 2b).^[13] Die Vorstufe des Insektizids **12** wurde mit einer Produktivität von 100 g/L und mit einem Enantionmerenüberschuss (ee, engl. enantiomeric excess) von > 98.5% hergestellt.

Seit den späten 1990er Jahren wurde die dritte Welle der Biokatalysatoren angebrochen, die sogenannte *in-vitro*-Version der Darwin'schen Evolution.^[14] Die zufällige Mutagenese der Proteine mit anschließendem ‚library screening‘ führte zu einer extremen Verbesserung der Stabilität, Substratspezifität und Enantioselektivität von Enzymen. Mittlerweile werden auch gezielt mit Hilfe von Computern und rationalem Design einzelne Aminosäuren ausgetauscht um die enzymatischen Eigenschaften der Enzyme in mehreren Bereichen zu steigern. Das neu erlangte Wissen über Struktur-Funktions-Beziehungen von Enzymen mit ihren Substraten erleichtert deren *de novo* Design mit teils neuen und vor allem verbesserten Eigenschaften. Dies eröffnet den Zugang zu einem weiten Repertoire an ‚grünen Katalysatoren‘.^[15-16]

Das enorme Potential der Biokatalyse lässt sich durch einen Vergleich der chemischen und enzymatischen Syntheserouten zu Sitagliptin (**15**) eindrucksvoll aufzeigen (Abbildung 2c).^[17] Die chemische Synthese des Arzneistoffes **15** beinhaltet eine Hydrierung eines Enamins mit Hilfe eines Rhodium-basierten Katalysators. Durch den Gebrauch des Metallkatalysators werden Aufreinigungsprozesse nötig, welche vor allem die Ausbeute verringern. Durch die funktionelle Optimierung einer Transaminase konnte die Umsetzung von Prositagliptin (**14**) zu Sitagliptin (**15**) so verbessert werden, dass die Ausbeute um 16% und die Enantioselektivität um 0.45% gegenüber der metallkatalytischen gesteigert werden konnte. Es existieren heutzutage zahlreiche biokatalytische Prozesse, die in der Pharmaindustrie Anwendung finden.^[14] Dies zeigt, dass die ‚grünen Katalysatoren‘ nicht nur attraktive Alternativen zu chemischen Prozessen darstellen, sondern sie teilweise in Ausbeute, Regiospezifität und vor allem in Effizienz und ökologischer Hinsicht übertreffen.

Einleitung

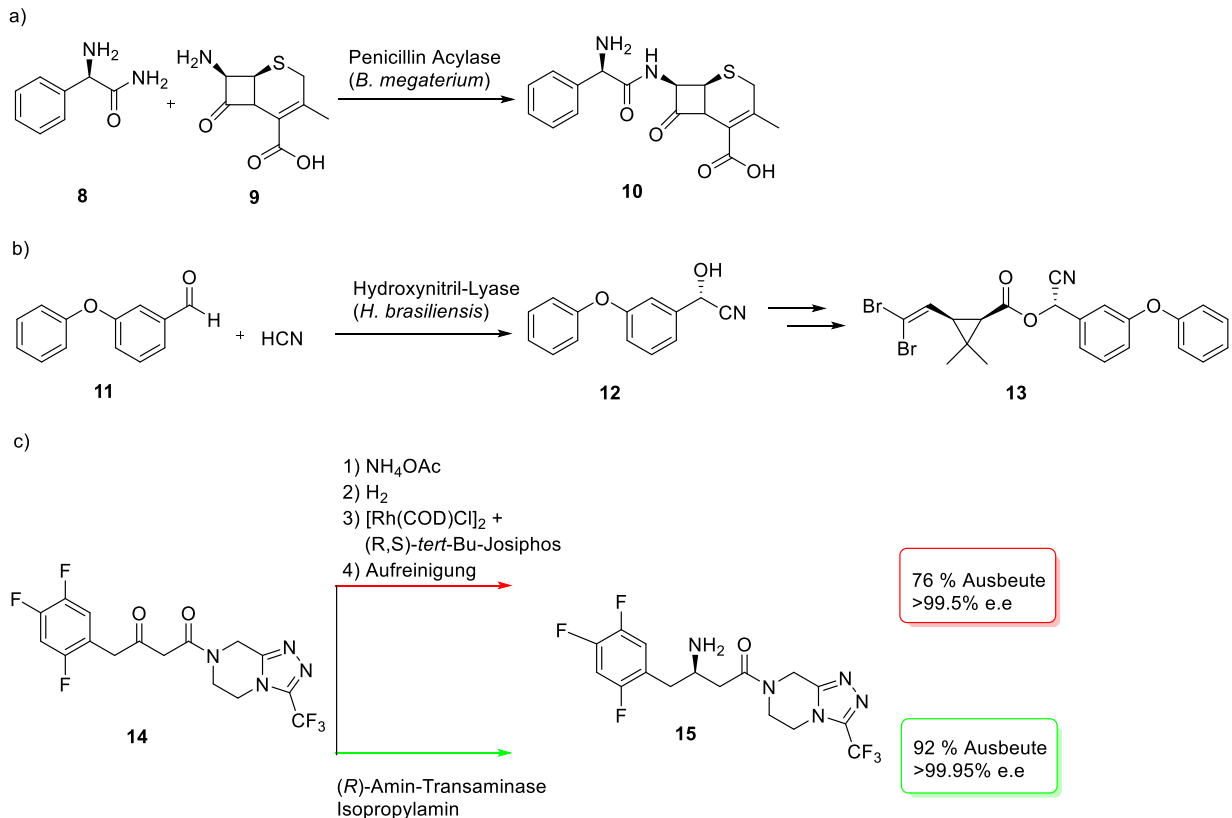


Abbildung 2. Chemo-enzymatische Synthese von a) Cephalexin (10), b) Deltamethrin (13) und c) Sitagliptin (15).

Alle Naturstoffe aus Abbildung 1 werden von Pilzen und Bakterien als Sekundärmetabolite produziert. Anders als Primärmetabolite werden sie nicht explizit für das Überleben ihrer herstellenden Organismen gebraucht. Vielmehr werden sie als Verteidigungs- oder Kommunikationssysteme gegenüber anderen Organismen benötigt.^[18] Sekundärmetabolite zeichnen sich vor allem durch ihre große Strukturvielfalt und ihre teilweise komplexen Molekülgerüste aus. Sie werden beispielsweise durch nicht-ribosomale-Peptidsynthetasen (NRPS), wie die Antibiotika **4**, **5** und **7**, oder Polyketidsynthetasen (PKS), wie **2** und **3** hergestellt (Abbildung 1). Diese Naturstoffe weisen nicht nur vielversprechende Bioaktivitäten auf, sie können auch durch beeindruckende enzymkatalytische Reaktionen biosynthetisch hergestellt werden. Die dabei genutzten Enzymsysteme sind auch für den industriellen Gebrauch von großem Interesse. Die Aufklärung der Biosynthesewege von Naturstoffen und die Erforschung des Anwendungspotentials der beteiligten Enzyme als Biokatalysatoren stellt aus diesem Grund ein lohnendes Ziel dar.

Nicht-ribosomale-Peptide

1.1 Nicht-ribosomale-Peptide

Nicht ribosomale Peptide (NRP) werden von Bakterien oder Pilzen als Sekundärmetabolite produziert und weisen unter anderem antibakterielle (Saframycin A (**16**))^[19], immunsuppressive (Complestatin (**17**))^[20] und toxische Wirksamkeit gegenüber eukaryotischen Zellen auf (Abbildung 3).^[21] Die Diversität ihrer biologischen Aktivitäten ist auf ihre große strukturelle Vielfalt zurückzuführen. Im Gegensatz zu ribosomalen Peptiden können nicht nur L-Aminosäuren, sondern auch D- und nicht-proteinogene Aminosäuren als Bausteine verwendet werden. Zudem können sie beispielsweise weiter alkyliert, glykosiliert, oxidiert oder reduziert sein. Es sind innerhalb dieser Verbindungsklasse sowohl lineare als auch cyclische und verzweigt-cyclische Vertreter, wie beispielsweise makrozyklische Lactame und Lactone (Abbildung 1, **4**, **5** und **7**), bekannt.

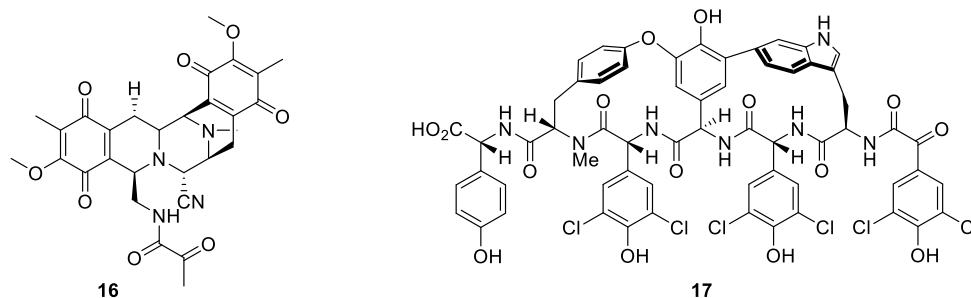


Abbildung 3. Strukturformeln des antibakteriellen Wirkstoffes Saframycin A (**16**)^[19] und des antiinfektiven Wirkstoffes Complestatin (**17**).

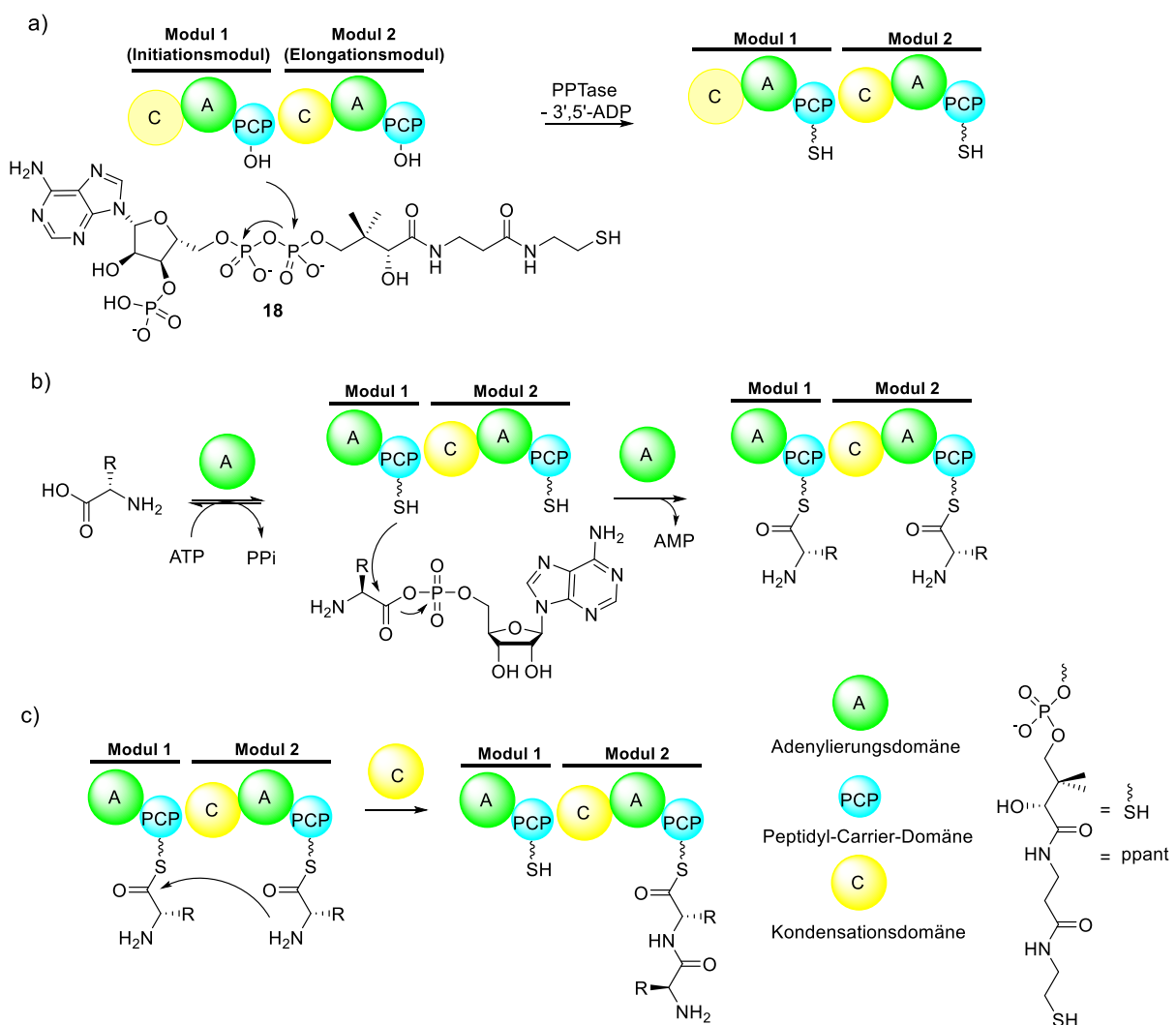
1.1.1 Nicht-ribosomale-Peptidsynthetasen

Die strukturelle Diversität von NRPs kann durch ihre Biosynthese erklärt werden. Die nicht-ribosomale-Peptidsynthetasen (NRPS) sind aus multifunktionalen Enzymkomplexen aufgebaut, die dem Multienzym-Thioemplat-Mechanismus folgen. An diesem Komplex werden einzelne Aminosäuren schrittweise via Peptidbindungsknüpfung zum fertigen Peptid prozessiert, während sie als Thioester am Multienzym gebunden sind.^[22-23] Die Enzymkomplexe bestehen aus einzelnen Modulen, welche für die Selektion und den Einbau

Nicht-ribosomale-Peptide

verschiedener Aminosäuren zuständig sind. Diese Module sind wiederum in katalytische Domänen eingeteilt, die spezifische Reaktionen in der Biosynthese katalysieren.^[24]

Das erste Modul einer NRPS besteht üblicherweise aus einer Adenylierungs-Domäne (A-Domäne) und einem Peptidyl-Carrier-Protein (PCP-Domäne) und wird als Initiationsmodul bezeichnet. Der Multienzymkomplex kann jedoch auch mit einer Kondensationsdomäne (C-Domäne) beginnen, die zum Beispiel das Anbinden von Fettsäuren an den freien Stickstoff der ersten Aminosäure katalysiert. Die folgenden Module, auch Elongationsmodule genannt, besitzen in den einfachsten Fällen die Domänenstruktur C-A-PCP (Schema 1).



Schema 1. a) Aktivierung der PCP Domäne durch Coenzym A (**18**) und einer Phosphopantetheinyl-Transferase, b) Auswahl und Aktivierung einer Aminosäure mit ATP durch die A-Domäne, c) Peptidbindungsknüpfung katalysiert durch die C-Domäne.

Mit Hilfe einer Phosphopantetheinyl-Transferase (PPTase) und Coenzym A (CoA) (**18**) wird die PCP-Domäne vor Beginn der Peptidsynthese von ihrer inaktiven *apo*-Form in ihre aktive

Nicht-ribosomale-Peptide

holo-Form umgewandelt (Schema 1a).^[25] Die Phosphopantetheinylgruppe (ppant) des Coenzym A (**18**) wird auf die Hydroxygruppe eines konservierten Serinrestes im aktiven Zentrum der PCP-Domäne übertragen und bildet damit den nukleophilen Anker für die Anbindung der Aminosäuren während der Peptidsynthese.

Die A-Domäne wählt spezifisch eine bestimmte Aminosäure für den Einbau in das wachsende Peptid, wodurch dessen Primärstruktur bestimmt wird. Die Carbonylgruppe der Aminosäure wird dabei durch ATP als AMP-Ester aktiviert und durch einen nukleophilen Angriff des ppant-Rests unter Ausbildung eines Thioesters auf die aktivierte *holo*-PCP-Domäne transferiert (Schema 1 b).^[24] Ab diesem Schritt beginnt die ‚Fließbandarbeit‘ der NRPS. Die C-Domäne katalysiert die Peptidbindungsknüpfung zwischen dem freien Stickstoff der Aminosäure, die an der nachfolgenden PCP-Domäne befestigt ist, und dem Thioester der Aminosäure an der vorherigen PCP-Domäne (Schema 1c). Alternativ zu Standard-C-Domänen gibt es Cyclisierungs-Domänen, die nach der Peptidbindung eine Heterocyclisierung mit anschließender Dehydratisierung durchführen.^[26] Dabei entstehen fünfgliedrige Heterocyclen, die auch häufig in nicht-ribosomalen-Peptiden vertreten sind. Durch die Peptidknüpfungen wächst das Peptid entlang der NRPS bis es am Ende des Komplexes angelangt. Dort befindet sich standardmäßig eine Thioesterase-Domäne (TE-Domäne), welche für die Freisetzung des Peptids verantwortlich ist. Die TE-Domänen besitzen ein konserviertes, katalytisches Zentrum, das aus den drei Aminosäuren Ser, His und Asp aufgebaut ist. Die Hydroxyfunktion von Ser greift nukleophil am Carbonylkohlenstoff des an die PCP-Domäne gebundenen Peptids an. Das durch Wasserstoffbrücken mit Asparagin stabilisierte Histidin katalysiert die Reaktion indem es als Protonenakzeptor fungiert (Schema 2). Daraufhin kann die Abspaltung von der TE-Domäne durch einen nukleophilen Angriff von Wasser eingeleitet werden, wodurch ein lineares Peptid, beispielsweise ACV (**19**), erhalten wird (Schema 2, Weg A). Alternativ erfolgt die Abspaltung durch einen intramolekularen Angriff einer Amino- oder Hydroxygruppe des Peptids, wobei ein Makrozyklus, beispielsweise Tyrocidin A (**20**), freigesetzt wird (Schema 2, Weg B).^[27-28]

Die Peptide können auch durch eine Reduktionsdomäne (R) am Ende der NRPS abgespalten werden, wodurch Alkohole, Halbaminale oder Aldehyde zugänglich sind. Ein Beispiel ist die Biosynthese des Antibiotikums Saframycin (**16**), in der ein Aldehyd vom Thiotemplat durch eine R-Domäne abgespalten wird.^[29-30]

Nicht-ribosomale-Peptide

Eine weitere wichtige Gruppe von Enzymen, die in *trans* wirken können, sind Oxygenasen. Zu dieser Gruppe von Enzymen gehören z.B. die P450-Cytochrome (CYP450). Diese sind zum Beispiel für Aryl-Aryl-Kreuzkupplungen verantwortlich, die für die pharmakologische Aktivität vieler Peptide essentiell sind.^[32] In Vancomycin (**4**) oder in Complestatin (**17**), einem Hemmstoff des humanen alternativen Komplementsystems^[33] und mit antiviraler Wirksamkeit gegenüber dem humanen Immundefizienz Virus (HIV),^[34] sind mehrere dieser Biarylbindungen zu finden, die von CYP450 geknüpft werden (Kapitel 1.4).

Ein weiteres Beispiel für ein Mitglied der Gruppe der *trans*-wirkenden Enzyme sind Monooxygenasen, eine Klasse von Enzymen, die ein Sauerstoffatom in ein Molekül einbringen. Heutzutage existieren bereits eine Vielzahl an charakterisierten Monooxygenasen, die in verschiedene Klassen und Gruppen eingeteilt werden können, wie z.B. die *Baeyer-Villiger*-Monooxygenasen (BVMO). BVMOs sind Flavin-abhängige Enzyme, die als Kofaktoren NADPH für die Regenerierung von Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) und molekularen Sauerstoff als Oxidationsmittel benötigen.^[35] Mithramycin (**21**) wird bereits unter dem Markennamen Plicamycin® in der Krebstherapie eingesetzt (Abbildung 4).^[36] Die BVMO, MtmOIV, ist für mehrere Schlüsselschritte in der Biosynthese des Wirkstoffs **21** verantwortlich.^[37] Das hohe Interesse an diesen Enzymen ist auf deren Fähigkeit zurückzuführen *Baeyer-Villiger*-Reaktionen in hohen Regio- und Stereoselektivitäten durchführen zu können. Weiterhin entsteht ausschließlich Wasser als Nebenprodukt und die Monooxygenasen benötigen im Gegensatz zum rein chemischen Ansatz keine Peroxide für die Oxidationen.^[38] Durch ‚protein engineering‘ wird derzeit versucht, die Stabilität und Substratspezifitäten der BVMOs so zu verbessern, dass sie in der organischen Synthese^[39] und in industriellen Prozessen^[40-41] weitreichende Anwendung finden können.

1.2 Polyketide

Wie auch NRPs, sind Polyketide (PK) Naturstoffe mit vielfältigen Molekülgerüsten. Eine Vielzahl an unterschiedlichen Wirkstoffen zählen zur Verbindungsklasse der PKs. Dazu gehören beispielsweise das anticancerogene und Kalzium senkende Mittel Mithramycin (**21**)^[37] und das antibiotische, immunsuppressive, antiparasitische sowie cholesterinsenkende Lovastatin (**22**)^[42] (Abbildung 4). Das breite Wirkungsspektrum, welches Polyketide abdecken, ist auf ihre hohe strukturelle Vielfalt zurückzuführen, welche in Anbetracht der nur zwei verwendeten Hauptbausteine, Acetat und Malonat bemerkenswert ist.

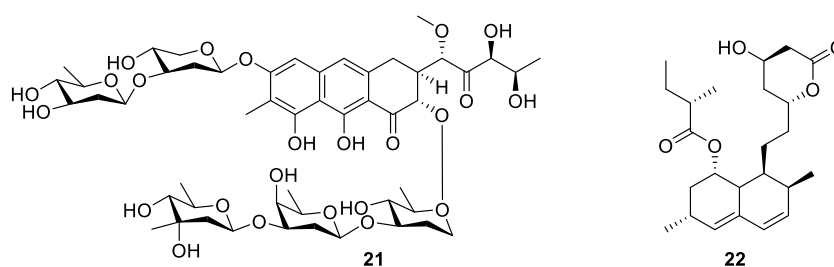


Abbildung 4. Strukturformeln des anticancerogenen Mithramycin (**21**) und des cholesterinsenkende Mittels Lovastatin (**22**).

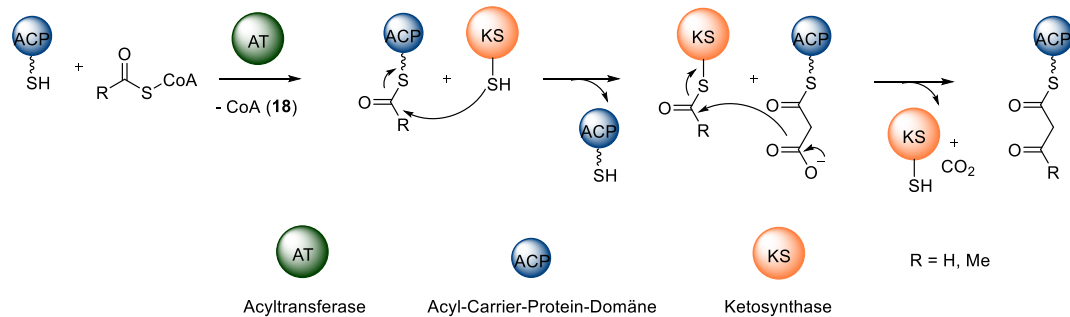
1.2.1 Polyketidsynthesen

Die Polyketidsynthesen (PKS) folgen wie NRPSs einem Multienzym-Thiotemplat-Mechanismus (Kapitel 1.1.1).^[43] Der Mechanismus des Aufbaus von PKs ist eng mit dem der Fettsäuren durch Fettsäuresynthetasen (FAS, engl. Fatty Acid Synthase) verwandt.^[44] In beiden Systemen werden aufeinanderfolgende decarboxylierende *Claisen*-Thioester-Kondensationsreaktionen durchlaufen, wobei Acyl-CoA oder Malonyl-CoA als Startereinheit und Malonyl-CoA oder dessen Derivate als Elongationseinheiten genutzt werden. Die Aktivierung der Acyl- und Malonyl-CoA-Einheiten erfolgt analog der Aktivierung der Aminosäuren in der NRPS (Schema 1b). Im Gegensatz zur FAS, die ausschließlich Acetyl- und Malonyl-CoA als Substrate prozessiert, hat die PKS eine höhere Substratakzeptanz und toleriert auch Derivate dieser Einheiten.^[45]

Zu den verschiedenen katalytischen Domänen, die für den Kettenaufbau verantwortlich sind, gehört zum einen die (Malonyl-)Acyltransferase (MAT/AT), die das Pendant zur A-Domäne in NRPS-Systemen ist und das Start- und Elongationssubstrat auswählt. Weiterhin gibt es analog

Polyketide

zu der PCP-Domäne ein Acyl-Carrier-Protein (ACP), an der das Substrat während der gesamten Biosynthese gebunden ist und die als Transporteinheit dient.



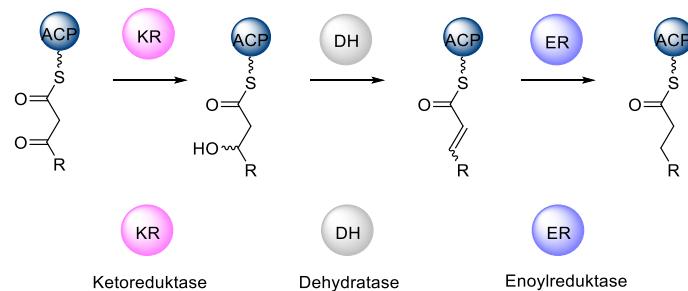
Schema 3. Claisen-artige Kondensationsreaktionen der PKS. Die erste ACP überträgt eine Startereinheit auf die KS, die die Kondensationsreaktion des beladenen Substrats mit einer Elongationseinheit katalysiert.

Die ACP-Domäne muss ebenso wie ihr NRPS-Pendant vor Beginn der Biosynthese von ihrer *apo*-Form zu ihrer *holo*-Form aktiviert werden. Die Übertragung des ppant-Restes wird wiederum von einer PPTase katalysiert (Schema 1a). Die Ketosynthase (KS) ist analog der C-Domäne für die Bindungsknüpfung zuständig, die hier *Claisen*-artig verläuft (Schema 3).^[46] Zunächst überträgt eine Acyltransferase sowohl die Starter- als auch die Elongationseinheit auf die *holo*-ACP-Domänen unter Freisetzung von CoA (18). Der erste Schritt der Kettenverlängerung beginnt mit der Übertragung eines Bausteins von der ACP-Domäne zur KS-Domäne. Die KS-Domäne katalysiert unter Decarboxylierung die *Claisen*-artige Kondensationsreaktion des beladenen Substrates mit einer Elongationseinheit, welche an der nächsten ACP-Domäne gebunden ist. Die um zwei Kohlenstoffe längere Elongationseinheit wird nun von der zweiten ACP-Domäne auf die folgende KS-Domäne übertragen und ein weiterer Verlängerungsprozess analog dem oben beschriebenen Mechanismus beginnt. Nach jeder Kettenverlängerung können weitere Enzyme die Struktur der wachsenden Kette beeinflussen.

Die PKS verfügt über Domänen, die für die verschiedenen Reduktionsgrade der PKS verantwortlich sind. Eine Ketoreduktase (KR) reduziert die β -Ketogruppe nach Elongation selektiv zu den entsprechenden (*S*)- oder (*R*)-Alkoholen. Eine Dehydratase (DH) eliminiert die entstehende Hydroxygruppe unter Ausbildung eines (*E*-) oder (*Z*-)Olefins und eine Enoylreduktase (ER) überführt dieses Alken zum gesättigten Alkan (Schema 4). In den unterschiedlichen Reduktionsstufen der Einheiten liegt der größte Unterschied zwischen den PKS und der FAS. Bei der FAS wird der vollständige reduktive Zyklus nach jeder Verlängerung

Polyketide

durchlaufen, sodass nur gesättigte Alkane produziert werden. Bei der PKS sind alle Reduktionsschritte optional und der Prozess kann auf jeder Stufe gestoppt werden. Auf diese Weise können variable Bausteine und komplexe Endprodukte gebildet werden. Am Ende der PKS befindet sich analog zur NRPS eine TE-Domäne, die für die Freisetzung des Peptids verantwortlich ist. Die Abspaltung des Thioesters kann analog der NRPS auf verschiedenen Wegen erfolgen (vgl. Schema 2). Auch bei der PKS gibt es sogenannte ‚tailoring Enzyme‘, welche die Strukturvielfalt der PKs durch Methylierungen, Oxidationen oder Glykosylierungen noch vergrößern.^[47]



Schema 4. Reduktionsschritte der PKS und der FAS.

1.2.2 PKS-Klassen

Anhand ihres genauen Aufbaus und ihres katalytischen Mechanismus können PKS grob in drei verschiedene Typen mit weiteren Unterklassen eingeteilt werden (Abbildung 5).^[48] Typ I-PKS können entweder modular oder iterativ aufgebaut sein und werden in Bakterien und Pilzen gefunden. Typ II-PKS sind ausschließlich in Bakterien vorhanden und arbeiten iterativ, genau wie die PKS vom Typ III, die hauptsächlich in Pflanzen auftreten, aber auch in einigen Bakterien oder Pilzen zu finden sind.^[49]

Polyketide

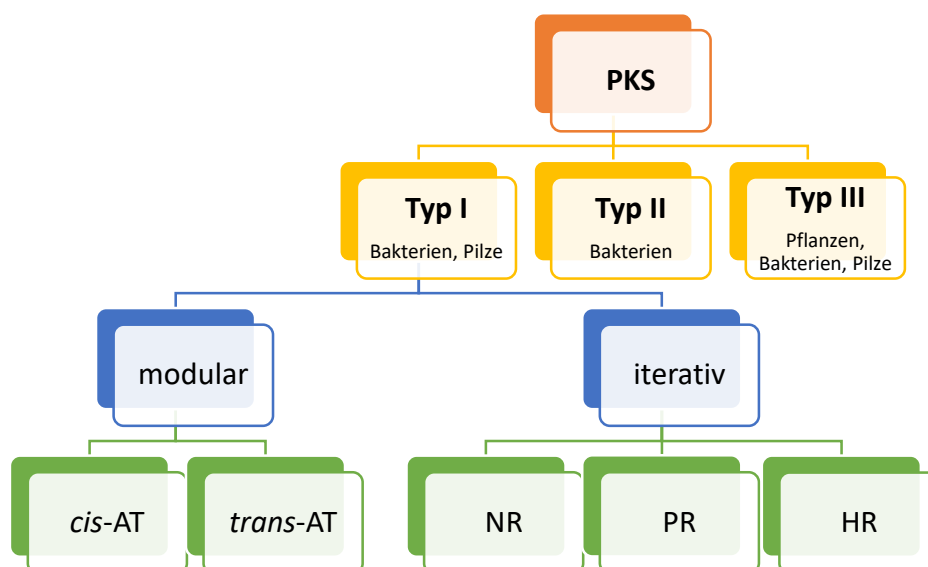


Abbildung 5. Klassifizierung der PKS.

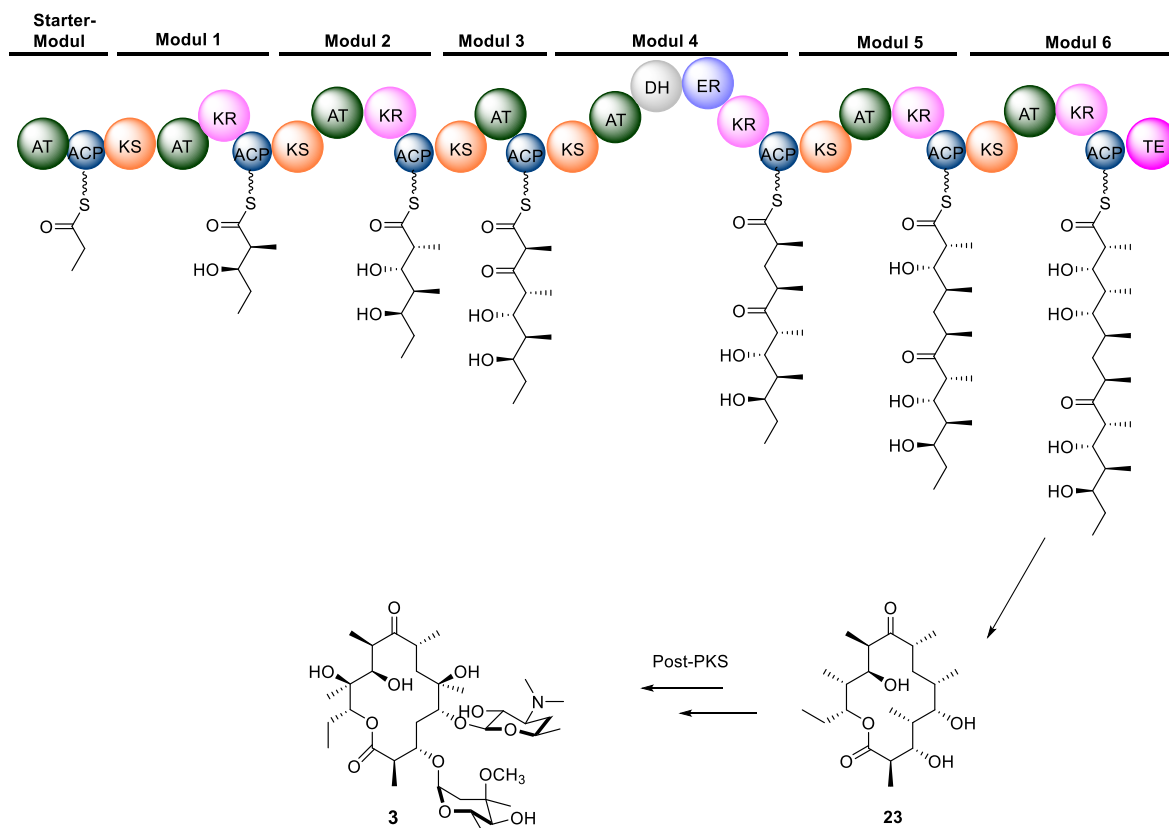
1.2.2.1 Typ I-Polyketidsynthesen

Typ I-PKS können in zwei Gruppen unterteilt werden: die iterative- (*i*PKS) und die modulare-PKS. Die *i*PKS sind bis auf wenige Ausnahmen vorrangig in Pilzen zu finden.^[50-51] Je nach Reduktionsgrad der gebildeten β -Ketoester-Intermediate werden sie als nicht-reduzierend (NR), partial-reduzierend (PR) und hoch-reduzierend (HR) eingeteilt.^[52] Obwohl die Module für die Kettenverlängerung iterativ verwendet werden, kann sich der Reduktionsgrad nach jedem Durchlauf unterscheiden.^{[44],[48]} Die Wahl der verschiedenen Domänen KR, DH, ER oder MT ist für jede Kettenverlängerung individuell. Welche Faktoren für den optionalen Einsatz der Domänen verantwortlich sind, konnte noch nicht generell aufgeklärt werden. Ein Beispiel für eine *i*PKS ist in der Biosynthese des Lovastatins (**22**) zu finden.

In Bakterien sind Typ-I-PKS primär modular aufgebaut. Sie bestehen aus einzelnen Domänen die zu multimodularen Megaenzymen verknüpft sind. Diese riesigen Komplexe sind hauptsächlich in Prokaryoten zu finden. Die Biosynthese von 6-Deoxyerythronolid B (6-dEB, **23**), der Vorstufe des Antibiotikums Erythromycin A (**3**), ist wahrscheinlich die am Besten untersuchte innerhalb der nicht-iterativen Typ-I PKS (Schema 5). Das Minimalmodul der modularen PKS besteht aus einer KS-, einer AT-, und einer ACP-Domäne. Optional sind die KR-, DH-, ER und MT-Domänen. Im Modul 4 der 6-dEB-Biosynthese sind beispielsweise drei optionale Domänen vorhanden, die DH-, ER- und die KR-Domäne. Dadurch wird in dem

Polyketide

eingebauten Baustein eine Reduktion vom Keton zum Alkan durchgeführt. In den folgenden zwei Modulen, Modul 5 und 6, ist jeweils eine Ketroreduktase Domäne vorzufinden, die das Keton zum Alkohol reduziert. Die Abspaltung der Vorstufe erfolgt auch hier durch eine TE-Domäne. Das Colinearitätsprinzip wird eingehalten, da ein Modul für eine Kettenverlängerung verantwortlich ist.^[53] Dieses ermöglicht die genaue Vorhersage der Struktur des Naturstoffes anhand der Anordnung der Module im Enzym und umgekehrt, wodurch genetische Manipulationen leicht durchführbar scheinen.^[54]



Schema 5. Biosynthese von Erythromycin A (**3**).

Mittlerweile wurden zudem Naturstoffe isoliert und biosynthetisch untersucht, die zwar durch PKS aus der Klasse der modularen-Typ I-PKS kodiert werden, in welchen die AT-Domänen jedoch nicht in den Modulen integriert sind. Diesen Systemen wurde der Term *trans*-AT-PKS zugeordnet, da sie die Beladung durch die ACPs in *trans* vornehmen.^[55] Das Gencluster das die Biosynthese von Pederin (**24**) kodiert, war das erste, welches den *trans*-PKS zugeordnet werden konnte.^[56] Ein weiteres Beispiel ist die PKS für die Biosynthese von Misakinolid A (**25**) (Abbildung 6).^[57]

Polyketide

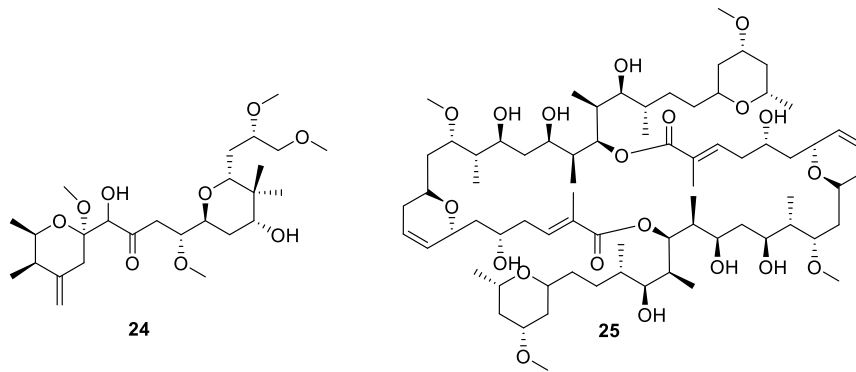


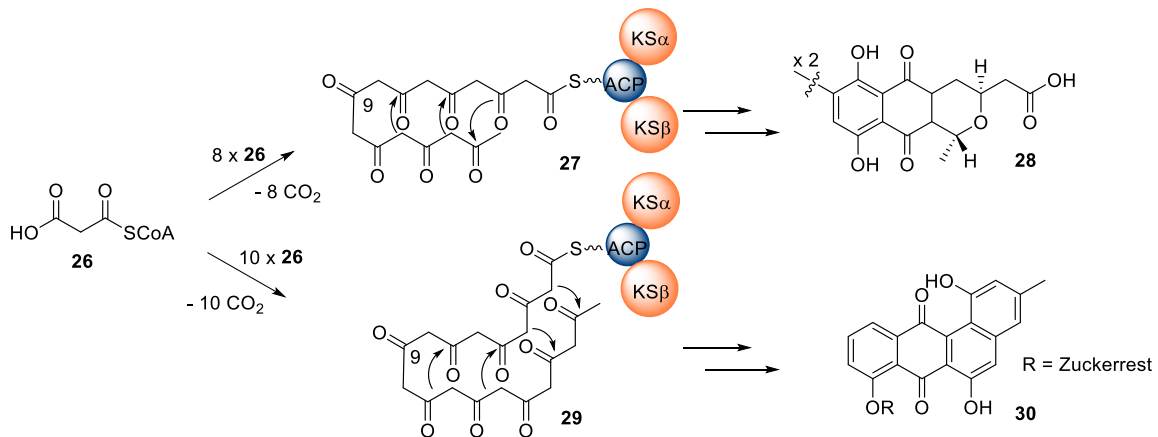
Abbildung 6. *trans*-AT-Polyketide: Pederin (**24**) und Misakinolid (**25**).

1.2.2.2 Typ II-Polyketidsynthasen

Sekundärmetabolite, die von Typ II-PKS produziert werden, wurden bisher ausschließlich in Bakterien gefunden.^[44] Unter ihnen sind viele pharmazeutisch wirksame, aromatische Naturstoffe wie Actinorhodin (**28**) und Landomycin (**30**).^[49] Das iterative PKS II-System besteht aus individuellen Enzymen, die jeweils durch ein unterschiedliches Gen kodiert werden. Die sogenannte ‚minimale PKS‘ besteht aus einem KS α KS β -Heterodimer und einer ACP-Domäne an die die wachsende Peptidkette gebunden ist. Dabei katalysiert die KS α die decarboxylierende Kettenverlängerung von Malonyl-CoA (**26**) (Schema 6). Der KS β fehlt das Cystein in der aktiven Tasche und es spielt somit keine Rolle während der Kettenverlängerung. Sie gilt vielmehr als Ketteninitiator und ist an der Regulierung der Gesamtkettenlänge des zu synthetisierenden Polyketids beteiligt. Die KS β wird daher auch ‚chain length factor‘ (CLF) genannt.

Die durch diese PKS synthetisierten Polyketidvorstufen bestehen meistens aus acht, zehn oder zwölf C₂-Einheiten, die sich so anordnen, dass ihre finale Struktur mittels Aldolkondensation erreichbar ist.^[49] Das typische 1,3-Oxidationsmuster ist ein Merkmal der Typ II-PKS. Cyclasen (CyC), Aromatasen (ARO) und Ketoreduktasen (KR) bestimmen das Faltungsmuster der Vorstufen, wobei die KR fast ausschliesslich an der C9-Position Reduktionen vornimmt (Schema 6).

Polyketide



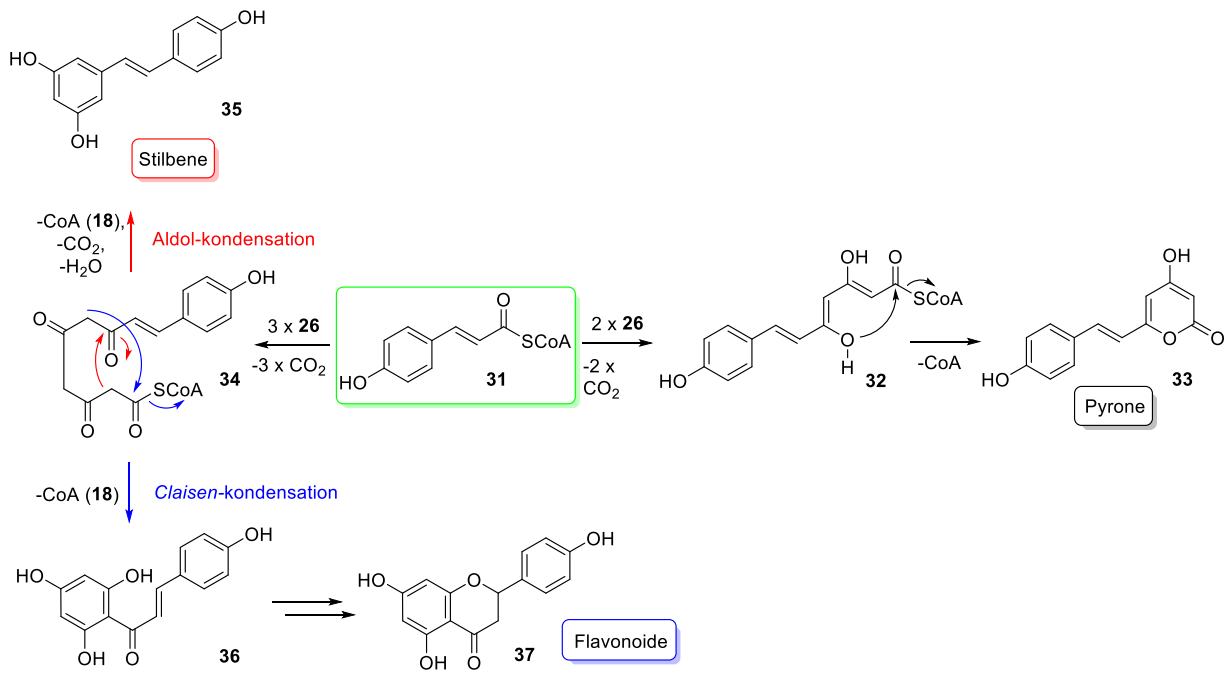
Schema 6. Schematische Darstellung der Biosynthese von Actinorhodin (**28**) und Landomycin (**30**), R = Zuckerrest.

1.2.2.3 Typ III-Polyketidsynthasen

Typ III PKS sind iterativ und Proteine die Homodimere ausbilden, welche zwei katalytische Zentren aufweisen. Nachdem eine Startereinheit ausgewählt wurde, wird sie durch decarboxylative Kondensationen mit mehreren Malonyl-CoA-Einheiten (**26**) zum Produkt verknüpft. Die Länge der Kette, die Auswahl der Startereinheit, sowie das Abspalten des Produkts bestimmen die verschiedenen Strukturen der Polyketide, die typischerweise aromatisch, sowie mono- oder bicyclisch sind.

Die vielleicht bekanntesten und am besten untersuchten Vertreter dieser Gruppe finden sich in der Biosynthese der Phenylpropanoide in Pflanzen wieder. Pyrone (**33**), Stilbene (**35**) und Flavonoide (**37**) gehören allesamt zur Gruppe der Phenylpropanoide.^[49] Alle Vertreter werden ausgehend von der zentralen Vorstufe *p*-Coumaroyl-CoA (**31**) biosynthetisch hergestellt (Schema 7). Die Anzahl an Malonyleinheiten und die Art der Ringverknüpfungen dirigieren die Synthese zu den verschiedenen Produkten. Ausgehend von CoA-Derivat **31** können beispielsweise zwei Malonyl-CoA-Einheiten (**26**) eingebaut werden um zum Zwischenprodukt **32** zu gelangen. Durch anschließende Lactonisierung wird das Pyron **33** erhalten. Im Gegensatz dazu können auch drei Einheiten des CoA-Esters **25** eingebaut werden. Das so erhaltene Polyketid **34** kann zum einen über eine Aldol-Kondensation und Decarboxylierung zu Stilben **35** reagieren (roter Weg, Schema 7). Zum anderen besteht die Möglichkeit über eine *Claisen*-Kondensation das Flavonoid **37** zu erhalten (blauer Weg).

Polyketide



Schema 7. Typ III-PKS illustriert an den Synthesen zu den Pyronen (33), Stilbenen (35) und Flavonoide (37).

1.3 PKS/NRPS-Hybride

Typ I-PKS und NRPS sind sich im Aufbau und ihrer Funktionsweise sehr ähnlich. Daher ist es nicht verwunderlich, dass sich im Laufe der biosynthetischen Evolution auch PKS/NRPS-Hybride ausgebildet haben. Ein Beispiel eines Naturstoffes der von einem PKS/NRPS-Hybridsystem hergestellt wird, ist Bleomycin (**38**). Das Glykopeptid **38** wird bereits als Antibiotikum eingesetzt.^[58] Es wird von zehn NRPS-Modulen und einem PKS-Modul aufgebaut. Letzteres integriert ein Derivat von **26**. Ein weiteres Beispiel ist das Siderophor Yersiniabactin (**39**), das aus *Yersinia pestis* isoliert werden kann.^[59] Das Hybridsystem das Naturstoffe **39** kodiert besteht aus zwei Proteinen. Das erste enthält zwei NRPS-Module gefolgt von einem PKS-Modul, die das Hydroxyphenylbithiazolyl-Intermediat aufbauen. Die zweite Einheit kodiert für ein PKS- und ein NRPS-Modul, das Yersiniabactin (**39**) mittels Thioesterase vom Multienzymkomplex abspaltet.

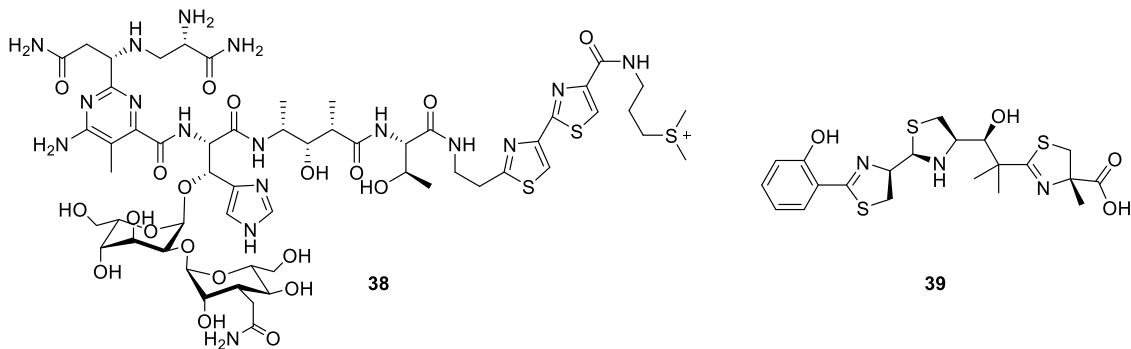


Abbildung 7. Durch PKS/NRPS-Hybride hergestellte Naturstoffe, Bleomycin (**38**) und Yersiniabactin (**39**).

1.4 Die Biarylbindung

In Abschnitt 1.1.1 wurden Cytochrom P450-Enzyme (CYP450) als modifizierende Katalysatoren in der NRPS vorgestellt. Diese Enzyme sind unter anderem in der Lage, Biaryl- und Biaryletherbindungen zu knüpfen. Dadurch entstehen cyclische Peptide, die aufgrund ihrer definierten und starren Struktur zahlreiche antibakterielle und antivirale Eigenschaften aufweisen.^[60]

Vancomycin (**4**) und Complestatin (**17**) wurden schon als Beispiele von biaryl-haltigen Peptiden genannt. Zu weiteren Vertreter dieser Gruppe gehören beispielsweise Teicoplanin (**40**) und Biphenomycin A (**41**). Teicoplanin (**40**), isoliert aus *Actinoplanes teichomyceticus*, ist strukturell dem Vancomycin (**4**) sehr ähnlich. Wegen seiner pharmakologischen Wirkung wird der Naturstoff **40** als Breitbandantibiotikum eingesetzt.^[61] Drei Biarylether- (orange markiert in Abbildung 8) und eine Biarylbindung (blau) sind für das starre Ringgerüst und den damit verbundenen Inhibitoreigenschaften in der Zellwandbiosynthese verantwortlich. Biphenomycine, allen voran Biphenomycin A (**41**), stellen eine weitere Klasse potenter Antibiotika dar. Isoliert wurden sie aus *Streptomyces griseorubiginosus*. Sie zeigen hohe Wirksamkeit gegen Gram-positive Bakterien, wobei **41** zudem sehr potent gegenüber *Staphylococcus aureus* ist.^[62] Strukturell besitzen die Biphenomycine eine Biarylbindung (blau markiert in Abbildung 8).

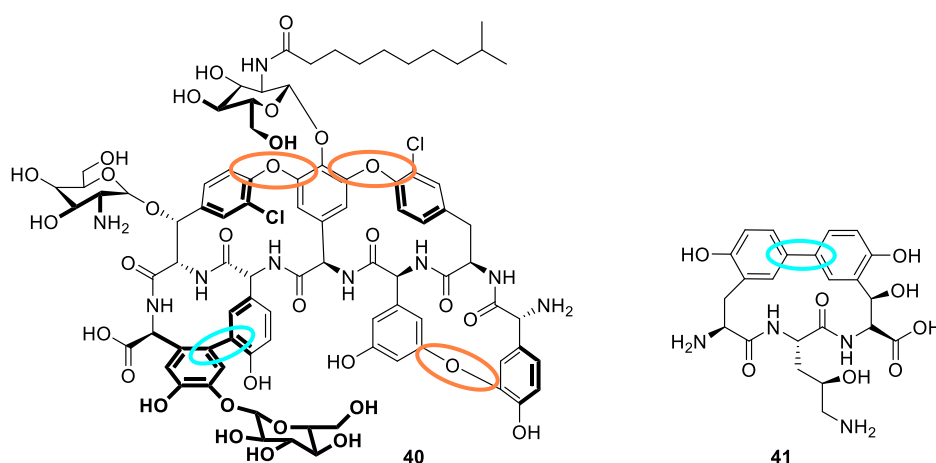
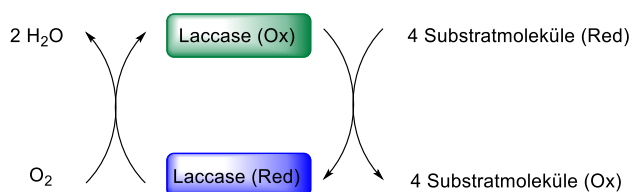


Abbildung 8. Strukturen der Biaryl-Naturstoffe Teicoplanin (**40**) und Biphenomycin (**41**), Biaryl- und Biaryletherbindungen sind farblich markiert.

Die Biarylbindung

Alle Biaryl- und Biaryletherbindungen der vorgestellten Naturstoffe werden von CYP450 eingeführt. Zur Knüpfung von Biaryl- oder Biaryletherbindungen kommen neben diesen Oxygenasen jedoch auch Laccasen vor. Sie werden nicht nur in chemischen Synthesen, sondern auch in industriellen Prozessen bereits als Oxidationskatalysatoren eingesetzt.^[63] Laccasen können von Pflanzen,^[64] Pilzen,^[64] Insekten^[65] und Bakterien^[65] synthetisiert werden, wobei sie in Pflanzen für die Ligninbiosynthese und in Pilzen zum Ligninabbau verwendet werden. Sie gehören der Gruppe der ‚blauen Oxidoreduktasen‘ an, wobei der farblich angelehnte Name daher rührt, dass es sich um kupferhaltige Enzyme handelt. Sie enthalten vier Kupferatome in unterschiedlichen Oxidationsstufen mit verschiedenen Funktionen.^[66] Unter Verwendung von Sauerstoff katalysieren sie die monoelektronische Oxidation von vier Substratmolekülen und setzen dabei Wasser frei. Die generierten Radikale sind hochreaktiv und reagieren in der Regel zu Dimeren, Oligomeren oder Polymeren weiter (Schema 8).^[67]



Schema 8. Katalysezyklus der Laccasen.^[67]

2 Hintergrund und Zielsetzung

2.1 Hintergrund zu den Brabantamiden (42a-c)

Bakterielle Lipopeptide (LP) bestehen aus einem cyclischen oder linearen peptidischen Kopf und einem hydrophoben Fettsäurerest.^[68] Sie werden hauptsächlich aus Bodenbakterien wie Actinomyceten oder Pseudomonaden als Sekundärmetabolite isoliert und werden vermeintlich zur Verteidigung der Bakterien produziert. Es wurden schon zahlreiche LPs isoliert, die starke antibakterielle Eigenschaften besitzen, allen voran Daptomycin (7), das unter anderem unter dem Handelsnamen Cubicin® kommerziell erhältlich ist.

Ein kleiner, hochfunktionalisierter und antibakteriell wirksamer Naturstoff ist Brabantamid A (42a, auch bekannt als SB253514) sowie die Derivate Brabantamid B (42b) und C (42c) (Abbildung 9).^[68]

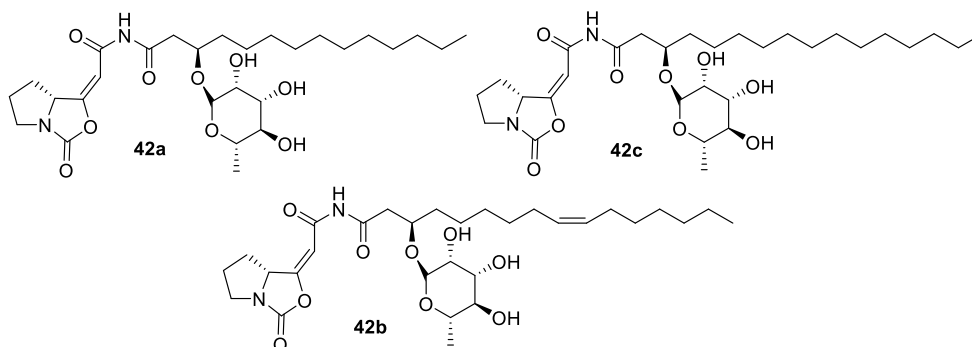


Abbildung 9. Strukturformeln der Brabantamide; Brabantamid A (42a), Brabantamid B (42b) und Brabantamid C (42c).

Die Brabantamide (42a-c) setzen sich aus einer Carbamat-Einheit und einer glykosylierten β -Hydroxy-Fettsäure zusammen. Das ungewöhnliche Carbamat-Gerüst entsteht durch Cyclisierung eines Peptid-Intermediats.^[69] Des Weiteren sind die Brabantamide die einzigen von *Pseudomonas* produzierten LPs, die eine glykosylierte Fettsäure aufweisen.

Brabantamid A (42a) wurde im Jahre 2000 erstmals von der Fa. *SmithKline Beecham Pharmaceuticals* aus *Pseudomonas fluorescens* DSM 11579 isoliert.^[70] Es wurde nach Inhibitoren für Lipoprotein-assoziierte Phospholipasen A₂ (Lp-PLA₂) gesucht, die mit ‚low density‘ Lipoproteinen im Plasma verknüpft sind. Lp-PLA₂ hydrolisieren sowohl den

Hintergrund zu den Brabantamiden (42a-c)

plättchenaktivierenden Faktor als auch oxidierte Phospholipide.^[71] Daraus resultieren entzündungserregende Lysophosphatidylcholone und oxidierte, freie Fettsäuren. Beide Hydrolyseprodukte sind Chemotaxis-hervorrufende Moleküle für Monozyten.^[72] Eine Zunahme an Lysophosphatidylcholinen ruft eine Akkumulation an Makrophagen sowie eine endothiale Störung hervor. Diese beiden Symptome werden mit Artherosklerose in Verbindung gebracht.^[73] Daher wird davon ausgegangen, dass Lp-PLA₂-Inhibitoren dazu fähig sind, die vermehrte Plättchenbildung zu minimieren und dadurch ein attraktives Medikament gegen Artherosklerose darstellen. Weiterhin wurde gezeigt, dass eine Erhöhung der Aktivität der Lp-PLA₂ eng mit einem erhöhten Risiko koronarer Herzkrankheiten, Schlaganfällen und vaskulär bedingten Todesfällen verknüpft ist.^[70]

Andersson et al. isolierten Brabantamid A (**42a**) aus *Pseudomonas brassicacearum* im Jahr 2011 und zeigten, dass **42a** neben der Fähigkeit als Inhibitor für Lp-PLA₂ zu wirken auch gute antifungale und antibakterielle Aktivitäten gegen Gram-positive und Gram-negative Bakterien aufweist.^[74]

2.1.1 Biosynthese der Brabantamide (42a-c)

Das Gencluster dieser Carbamate besteht aus 5 Genen, *braA/B/C/D/E*, wobei die Biosynthese noch nicht vollständig aufgeklärt werden konnte. Bioinformatische Analysen sowie Gen-Knock-outs haben bewiesen, dass die Gene *braA/B/C* für die Biosynthese der Brabantamide essentiell sind (Tabelle 1).^[75]

BraA kodiert dabei für eine Glykosyltransferase, die für den Einbau des Rhamnose-Zuckers zuständig ist. Zu welchem Zeitpunkt die Glykosylierung in der Biosynthese erfolgt, ist noch nicht sicher bestimmt. Es wird vermutet, dass dieser Schritt am Anfang der Biosynthese erfolgt, da die isolierten Derivate alle glykosyliert sind.^[75] Alternativ ist auch eine Glykosylierung am Ende der Biosynthese möglich, nachdem das Molekül von der NRPS abgespalten wurde. *BraD*, der putative LuxR-Regulator, steuert die Expression des Biosyntheseclusters und *BraE*, das Efflux-System, liefert einen Mechanismus zur Selbstresistenz des Produzenten gegenüber der Brabantamide **42a-c**.

Hintergrund zu den Brabantamiden (42a-c)

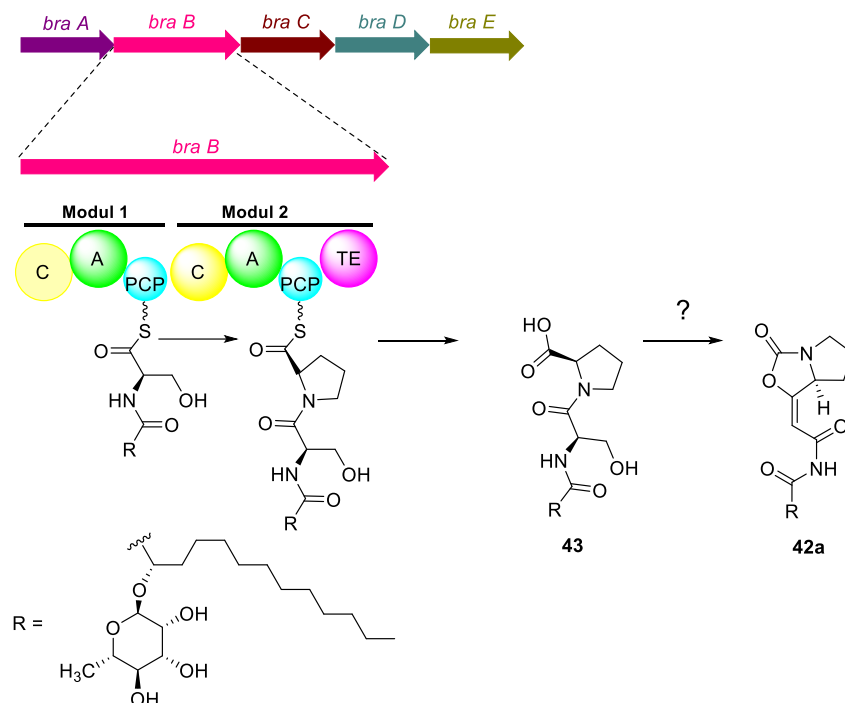
Tabelle 1. Putative Funktionen der Proteine des Brabantamid Gencluster und deren Homologie zu anderen Proteinen.^[75]

Enzym	Zugangsnummer des nächsten Homologen	Identität	Putative Funktion
BraA	YP_006617434.1 (<i>Burkholderia cepacia</i> GG4)	54 %	Glykosyltransferase
BraB	ZP_10712971.1 (<i>Pseudomonas sp.</i> GM17)	65 %	NRPS
BraC	ZP_10712971.1 (<i>Pseudomonas sp.</i> GM17)	73 %	Oxidoreduktase
BraD	YP_235684.1 (<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> B728a)	70 %	LuxR-Typ transkriptionaler Regulator
BraE	EGH55426.1 (<i>P. syringae</i> Cit 7)	81 %	RND-Typ Efflux System

Weiterhin befindet sich eine Monooxygenase *braC* im Gencluster der Brabantamid-Biosynthese. BraC zeigt hohe Sequenzhomologien zu sogenannten FAD-abhängigen Baeyer-Villiger-Monooxygenasen auf (Kapitel 1.1.1). Eine genaue Untersuchung der Sequenz dieses Enzyms zeigt, dass es den Fingerprintbereich einer Rossmann-Faltung sowie eine Pyrophosphat- und Riboflavinbindestelle besitzt. Das typische Motiv für BVMOs des Typs 1^[76] wurde nicht in der Sequenz von BraC gefunden. Die nächsten Homologen sind atypische BVMOs aus Streptomyceten, die in der Biosynthese von Polyketiden wie Mithramycin (**20**)^[37] und Urdamycin^[77] vorzufinden sind. *BraB* kodiert für eine NRPS, die aus zwei Modulen mit jeweils drei Domänen in der Reihenfolge C-A-PCP besteht. Bioinformatische Analysen sagen voraus, dass L-Serin und L-Prolin von den A-Domänen selektiv eingebaut werden und dass die N-terminale C-Domäne für die Acylierung von Serin zuständig ist. Am Ende des Komplexes befindet sich eine Thioesterase-Domäne, die das Produkt von der NRPS abspaltet (Schema 9). Ausgehend von den bioinformatischen Analysen würde die bimodulare NRPS den Naturstoff **43** von der NRPS abspalten (Schema 9). Wird die Struktur des vorhergesagten Produktes **43** mit der tatsächlichen Struktur des Brabantamids A (**42a**) verglichen, so weichen sie stark voneinander ab. Demzufolge wird eine Serie biokatalytischer Reaktionen benötigt, die ausgehend vom NRPS-Produkt **43** den isolierten Naturstoff **42a** synthetisieren. Außer der Monooxygenase BraC sind im Brabantamid-Gencluster keine weiteren Enzyme vorhanden, die an der Synthese der Naturstoffe **42a-c** teilnehmen könnten. Dementsprechend wird davon ausgegangen, dass BraC hauptsächlich für diese biokatalytischen Prozesse verantwortlich ist.

Hintergrund zu den Brabantamiden (42a-c)

Neben der Monooxygenase ist es vorstellbar, dass die TE-Domäne der NRPS das Zwischenprodukt nicht einfach hydrolytisch, sondern durch eine ungewöhnliche Cyclisierung von dem Multienzymkomplex abspaltet.

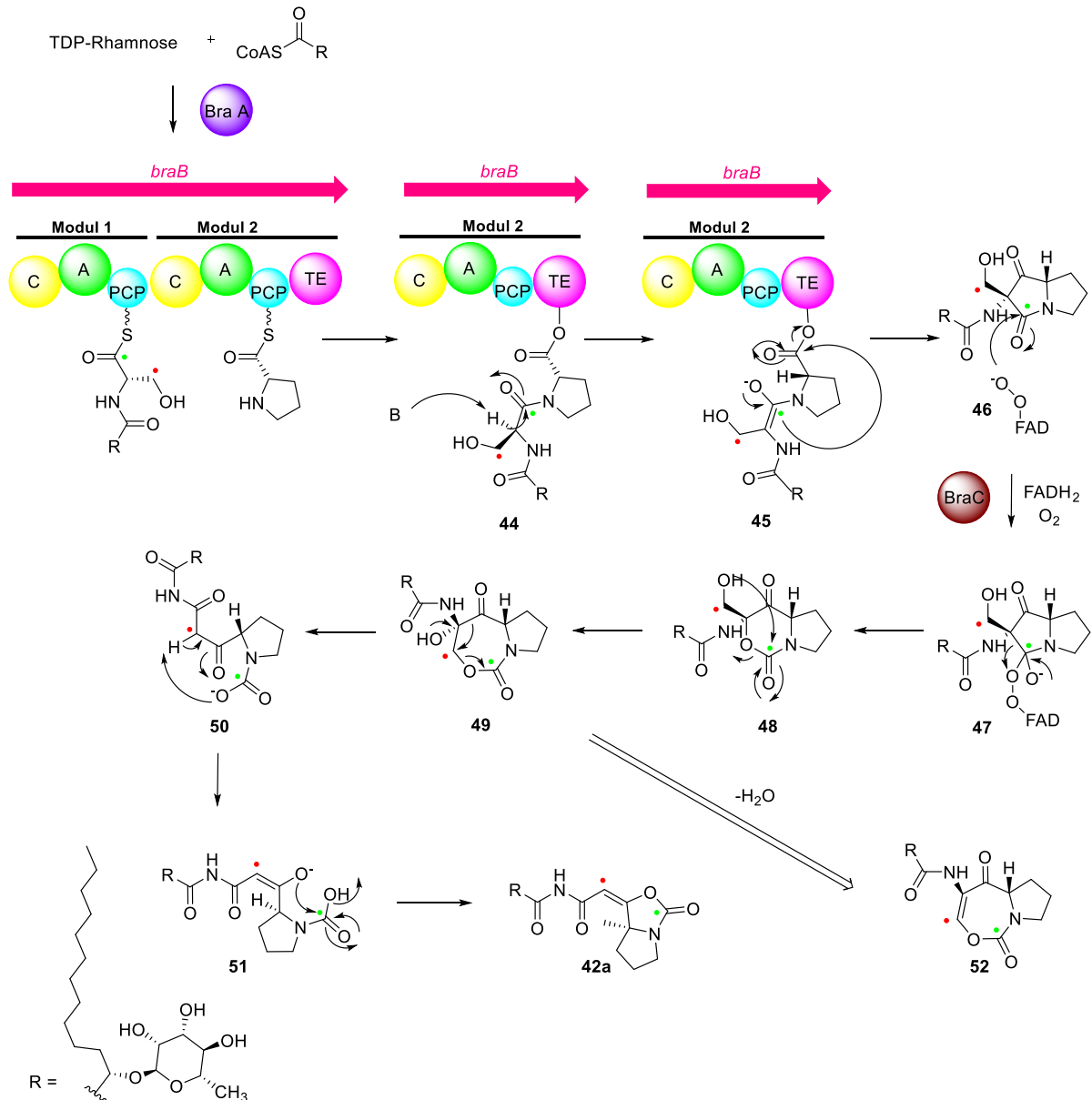


Schema 9. Schematische Darstellung des Genclusters der Brabantamide (**42a-c**) und modulare Struktur der NRPS des Brabantamid-Clusters sowie die aus bioinformatischen Analysen des Clusters zu erwartende Struktur **43**.

Durch die Erkenntnisse aus Knock-out-Studien und Genanalysen wurde in unserem Labor zusammen mit der Gruppe von Prof. H. Gross (Universität Tübingen) zunächst eine Biosynthese postuliert, die durch Fütterungsstudien mit ^{13}C -markiertem Serin unterstützt wurde (Schema 10). Die putative Biosynthese beginnt mit der durch BraA katalysierten Glykosylierung der Fettsäure. Die CoA-gebundene Fettsäure, die durch den Primärmetabolismus zugänglich ist,^[78] wird durch die Kondensationsdomäne auf die PCP-Domäne des ersten Moduls der NRPS überführt. Durch eine weitere Kondensationsreaktion wird das acylierte L-Serin mit L-Prolin verknüpft und **44** erhalten. Nachdem das Dipeptid **44** auf die Thioesterase überführt wurde, wird unter Basenkatalyse das α -Proton des Serins abgespalten und so Enolat **45** erhalten. Im Folgenden wird die Vorstufe unter katalytischem Einfluss der Thioesterase durch einen nukleophilen Angriff des Enolats an das Prolin-Carbonyl von der NRPS zu **46** abgespalten. Molekularer Sauerstoff wird durch Flavin-Adenin-Dinukleotid (FADH_2) aktiviert und bildet mit dem Bicyclus **46** das Crigee-

Hintergrund zu den Brabantamiden (42a-c)

Intermediat **47**. Dieses wird durch eine Baeyer-Villiger Oxidation zunächst in **48** überführt, bevor ein erneuter intramolekularer nukleophiler Angriff, diesmal ausgehend von der Hydroxyfunktion des Serins, eingeleitet wird. Die geringe Stabilität des Siebenrings in **49** führt zu einem 1,2-Acylshift, induziert durch die Hydroxylfunktion des Halbaminals, wobei zunächst das *N*-Carboxylat **50** entsteht, das durch intramolekulare Umprotonierung zum Enolat **51** überführt wird. Dieses kondensiert unter Abspaltung von Wasser zu Brabantamid A (**42a**).



Schema 10. Putative Biosynthese von Brabantamid A (**42a**).^[79]

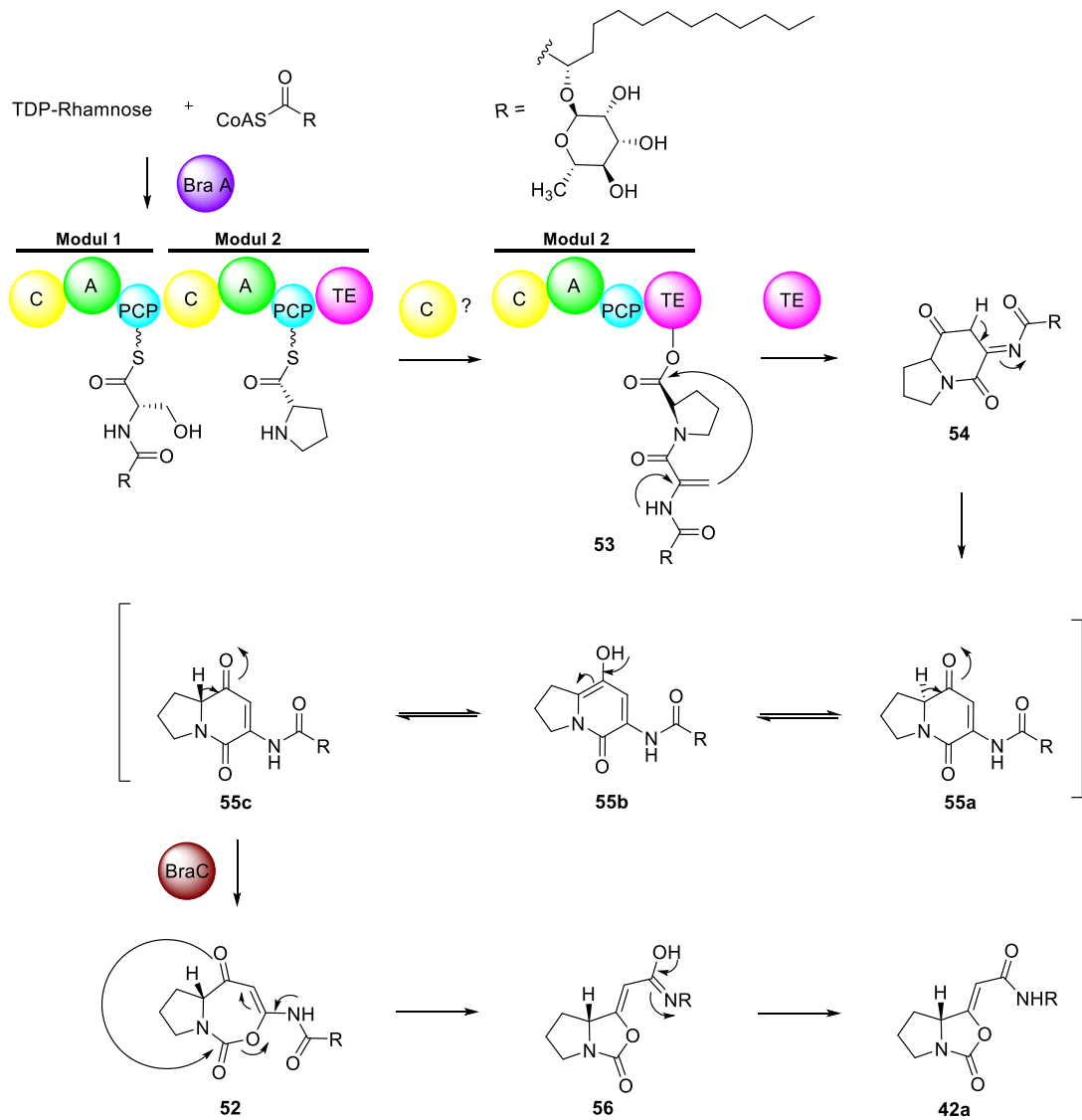
Das ¹³C-markierte Serin (Markierung durch einen grünen und einem roten Punkt in Schema **10**) gibt einen Hinweis auf die Plausibilität dieses Mechanismus. Die postulierten Reaktionen und Umlagerungen erklären, warum die beiden markierten Kohlenstoffatome am Anfang der

Hintergrund zu den Brabantamiden (42a-c)

Biosynthese nur durch das α -Kohlenstoffatom des Serins getrennt sind, jedoch im Produkt **42a** einen Abstand von zwei Kohlenstoffen haben. Der postulierte Biosyntheseweg wird zusätzlich durch das gebildete Nebenprodukt **52** unterstützt, welches mehrfach aus den Extrakten von *Pseudomonas fluorescens* neben **42a-c** isoliert werden konnte.^{[70],[75],[80]} Während der Biosynthese könnte es aus dem Zwischenprodukt **49** durch Wasserabspaltung entstehen und würde ebenfalls das erwartete Kohlenstoffmuster des ehemaligen Serins aufweisen.

2013 wurde von *Margarvey et al.*^[81] eine alternative Biosynthese postuliert, die von *Schmidt et al.*^[75] unterstützt wurde. Bei genauerer Betrachtung der einzelnen katalytischen Domänen wurde festgestellt, dass die C-Domäne des zweiten Moduls Homologien zu einer aminosäurenveränderten-C-Domäne aus dem Cluster von Microcystin (AAF00960.1, Mcy-A 31 % Identität) aufweist. Es wird angenommen, dass dieses Enzym nicht nur an der Kettenverlängerung, sondern auch an einer Dehydratisierung des Serin-Bausteines zu Dehydroalanin beteiligt ist.^[82] In Schema 11 ist diese zweite, postulierte Biosynthese dargestellt. Hierbei entsteht möglicherweise durch die außergewöhnliche C-Domäne das Zwischenprodukt **53**. Die Abspaltung von der NRPS erfolgt über eine Cyclisierung, eingeleitet von der terminalen Thioesterase-Domäne. Durch nukleophilen Angriff der Enamin-Einheit des Dehydroalanins an den Carbonylkohlenstoff wird Intermediat **54** von der NRPS abgespalten. Dieser Mechanismus wäre analog dem der Bildung der Terraquinone, bei welchem die TE-Domäne den nukleophilen Angriff eines β -Kohlenstoff-Enolat-Carbanions an die Enzymgebundene Carbonylgruppe katalysiert.^[83] Das Intermediat **55a** kann durch Keto-Enol-Tautomerisierung **55b** bilden, wodurch die Stereochemie des Prolins im Endprodukt **42a** erklärt werden könnte. Anschließend wird der Bicyclus **55c** durch die BVMO BraC zu dem isolierten Nebenprodukt **52** oxidiert.^{[70],[75],[80]} Es erfolgt eine Umlagerungsreaktion, die schließlich zu **42a** führt. Auch dieser Biosyntheseweg würde das Markierungsmuster des Serins aus den bereits gezeigten ¹³C-Fütterungsexperimenten unterstützen.

Hintergrund zu den Brabantamiden (42a-c)



Schema 11. Putative Biosynthese von Brabantamid A (42a) postuliert von Magarvey et al. 2013^[84].

2.2 Zielsetzung des Brabantamid-Projekts

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Biosynthese der Brabantamide **42a-c** aufzuklären. Fütterungsexperimente und die Isolierung von **52** als Nebenprodukt sind Hinweise darauf, dass beide putativen Biosynthesen (Kapitel 2.1.1) möglich wären. Weiterhin sollten die beteiligten Enzyme in der chemo-enzymatischen Totalsynthese der Brabantamide eingesetzt werden.

Die postulierten Biosynthesen gehen davon aus, dass die Thioesterase sowie BraC ungewöhnliche Reaktionskaskaden einleiten. Dementsprechend sollten sie in großen Mengen als lösliche Proteine heterolog exprimiert werden. In Vorarbeiten^[79] wurden die TE-Domäne und die TE-PCP-Domäne bereits aus dem Gencluster von *Pseudomonas* sp. SH-C52^[85-86] kloniert und anschließend in *Escherichia Coli* (*E. coli*) überexprimiert. Die Expression an löslichem Protein, vor allem für die TE-Domäne, soll hier optimiert werden. Zu Beginn der Vorarbeiten lag bereits ein Plasmid mit dem *braC*-Gen vor. Es konnte auch nach diversen Expressionsversuchen nicht genügend lösliches Protein erhalten werden. Daher soll *braC* aus der gDNA von *Pseudomonas* sp. SH-C52 neu kloniert und die Überexpression an löslichem Protein gesteigert werden.

Um zu bestimmen, welche Reaktionen die Monooxygenase BraC und die TE-Domäne während der Synthese von **42a-c** katalysieren, sollen *in-vitro* Assays durchgeführt werden. Dafür sollen zunächst vereinfachte Substrate, angelehnt an die biosynthetischen Zwischenstufen **45**, **53** und **55a-c**, (Schema 10 und Schema 11) synthetisiert werden. Es wird davon ausgegangen, dass der Zuckerrest an der Fettsäurekette kein essentielles Strukturelement für die enzymatischen Umsetzungen ist. Dementsprechend sollte auf die Glykosylierung der Fettsäurekette in den vereinfachten Substraten verzichtet werden können. Die vereinfachten Substrate, angelehnt an die Zwischenstufen **45** und **53** sollten als *N*-Acetylcysteamin-Thioester (SNAc) **57b** und **58b** und als Thiophenol-Derivate **57a** und **58a** synthetisiert werden (Abbildung 10). SNAc dient als Mimetikum für den ppant-Rest der PCP-Domäne (Kapitel 1.1.1). Dadurch wird das vereinfachte Substrat möglicherweise besser durch die Enzyme erkannt und umgesetzt. Die Thiophenol-Derivate **57a** und **58a** sollten einerseits ebenso als Substrate für enzymatische Umsetzungen eingesetzt werden, sowie andererseits als Edukte dienen, um CoA (**18**) an die Substrate zu binden. Mit den CoA-Derivaten **57c** und **58c** sollte das Substrat an die

Zielsetzung des Brabantamid-Projekts

PCP-Domäne transferriert werden. Die so gewonnenen Substrate **57a-c** und **58a-c** sollten insbesondere zur Aufklärung der Rolle der TE-Domäne dienen. Zur Aufklärung des Mechanismus der durch BraC katalysierten Reaktion sollte ferner das späte Biosyntheseintermediat **59** zugänglich gemacht werden.

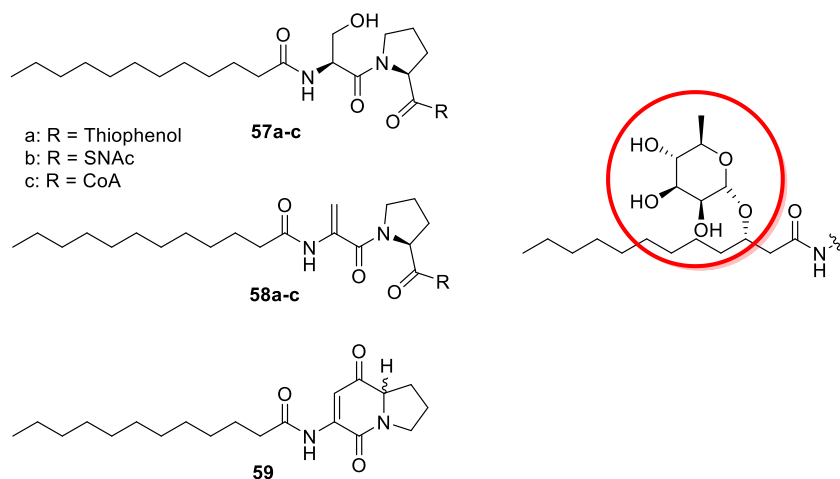


Abbildung 10. Links: die zu synthetisierenden vereinfachten Substrate **57a-c**, **58a-c** und **59**; rechts: glykosylierter Teil der Fettsäurekette der Brabantamide **42a-c**, der zur Vereinfachung der chemischen Synthesen nicht beachtet wurde (rot umkreist).

2.3 Hintergrund zu den Arylomycinen (60a-l)

Höltzel *et al.* isolierten aus *Streptomyces* Tü 6075 im Jahr 2002 die ersten Lipoglykopeptide, die Arylomycine (**60a-l**), welche über eine Biarylbindung verfügen.^[87] Arylomycine (**60a-l**) werden in zwei Serien aufgeteilt, wobei die Serie A farblose Feststoffe sind, die sich aus den folgenden sechs Aminosäuren zusammensetzen: *N*-methyliertes *D*-Serin, *D*-Alanin, Glycin, *N*-methyliertes *L*-Hydroxyphenylglycin (HPG), *L*-Alanin und *L*-Tyrosin (Abbildung 11). Am *N*-Terminus befinden sich verschiedene gesättigte C₁₁-C₁₅, *η*, *iso*- oder *antiiso*-Fettsäuren (**60a-e**).^[88] Die B-Serie unterscheidet sich von der A-Serie nur durch eine Nitrogruppe am HPG, die für die gelbe Farbe der Arylomycine der B-Serie (**60f-l**) verantwortlich ist. Das Merkmal von **60a-l** ist die Biarylbindung zwischen dem HPG (**62**) und Tyrosin die zu der Bildung eines 14-gliedrigen *meta-meta* Cyclophans führt. Aufgrund dieser nur schwach rotationsgehinderten Biarylbindung liegen die Arylomycine (**60a-l**) bei Raumtemperatur als Atropisomere vor.

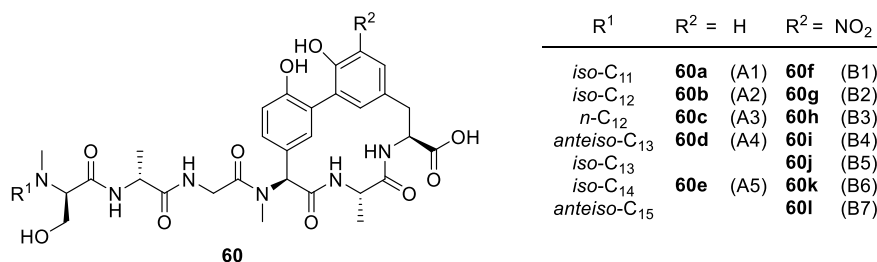


Abbildung 11. Strukturen der Arylomycine (**60**).

Analog zu anderen Biaryl-haltigen Naturstoffen ist die Biarylbrücke und das damit verbundene Molekülgerüst für die antibiotische Wirksamkeit dieser Naturstoffe verantwortlich. Arylomycine der B-Serie zeigen dabei höhere Aktivitäten gegen Gram-positive Bakterien als die Arylomycine der A-Serie.^[87] Beide Klassen und deren Derivate zeigen Inhibitoreigenschaften gegen die Serin-Protease I, SPase I.^[89] Die Rolle der SPase I in der Zelle ist es, das *N*-terminale Signalpeptid von frisch synthetisierten Proteinen an der Außenseite der Zellmembran abzuspalten um so funktionelle Proteine freizusetzen. Die Inhibierung der SPase I führt zum Zellwachstumsstopp, beziehungsweise zum Zelltod der Bakterien.^[90] Neben dieser Tatsache macht auch die Lokalisation an der periplasmischen Oberfläche der

Hintergrund zu den Arylomycinen (60a-I)

cytoplasmischen Membran die SPase I zum interessanten Target, da Antibiotika, die dieses Target angreifen, die Zellmembran nicht durchdringen müssen.^[89]

In Bakterien besitzen Serin-proteasen als katalytische Einheit Serin und Lysin. Im Gegensatz dazu haben SPasen in Prokaryoten eine Aminosäuretriade aus Serin, Histidin und Asparginsäure.^[91] Arylomycine (**60**) inhibieren selektiv nur SPasen in Bakterien und heben sich so von Standardinhibitoren ab.^[92] *Pätzel et al.* haben eine Kristallstruktur von Arylomycin A₂ (**60b**) im Komplex mit der SPase I von *E. coli* publiziert.^[93] Das C-terminale Carboxylat von **60b** bildet Wasserstoffbrückenbindungen mit den beiden Aminosäuren des katalytischen Zentrums aus. Der Rest des Moleküls faltet sich auf eine bestimmte Weise, so dass es mehrere Wasserstoffbrückenbindungen und Wechselwirkungen im Komplex mit dem Enzym eingehen kann. Des Weiteren wurde gezeigt, dass nur das *P*-Atropisomer an die *E. coli* SPase I binden kann. Wahrscheinlich ist diese Selektivität damit zu begründen, dass das *P*-Atropisomer besser in die Geometrie der Bindetasche passt.

Chemische Totalsynthesen zu der Naturstofffamilie der Arylomycine (**60a-I**) wurden von *Romesberg et al.*^[94] und *Zhu et al.*^[90] durchgeführt. Diese Synthesen beinhalten ausgereifte orthogonale Schutzgruppenstrategien um die synthetische Herausforderung der Biarylbindungsbildung zu meistern. Letztere wurde von *Romesberg et al.* und *Zhu et al.* durch eine *Suzuki-Miyaura*-Kupplung synthetisiert.^[95] Biarylbindungsreaktionen verlaufen nicht nur in geringen Ausbeuten, sondern benötigen auch eine gezielte Vorfunktionalisierungen der Aromaten. Dazu müssen die zu verknüpfenden Positionen aktiviert sowie Schutzgruppen integriert werden, wodurch die Synthese der Biaryl-Naturstoffe **60** verlängert wird und demfolgend geringe Gesamtausbeuten erhalten werden. Die Gesamtausbeute für die Totalsynthese von *Romesberg et al.* beträgt 0.4%, die von *Zhu et al.* 2.5%. Diese Zahlen unterstreichen, dass die chemische Totalsynthese von Naturstoffen mit Biaryleinheit eine Herausforderung darstellt. Daher kann ein etabliertes Verständnis des biosynthetischen Mechanismus der Knüpfung von Biarylbindungen helfen, die Synthese solcher Verbindungen durch chemo-enzymatische Totalsynthese effizienter zu gestalten.

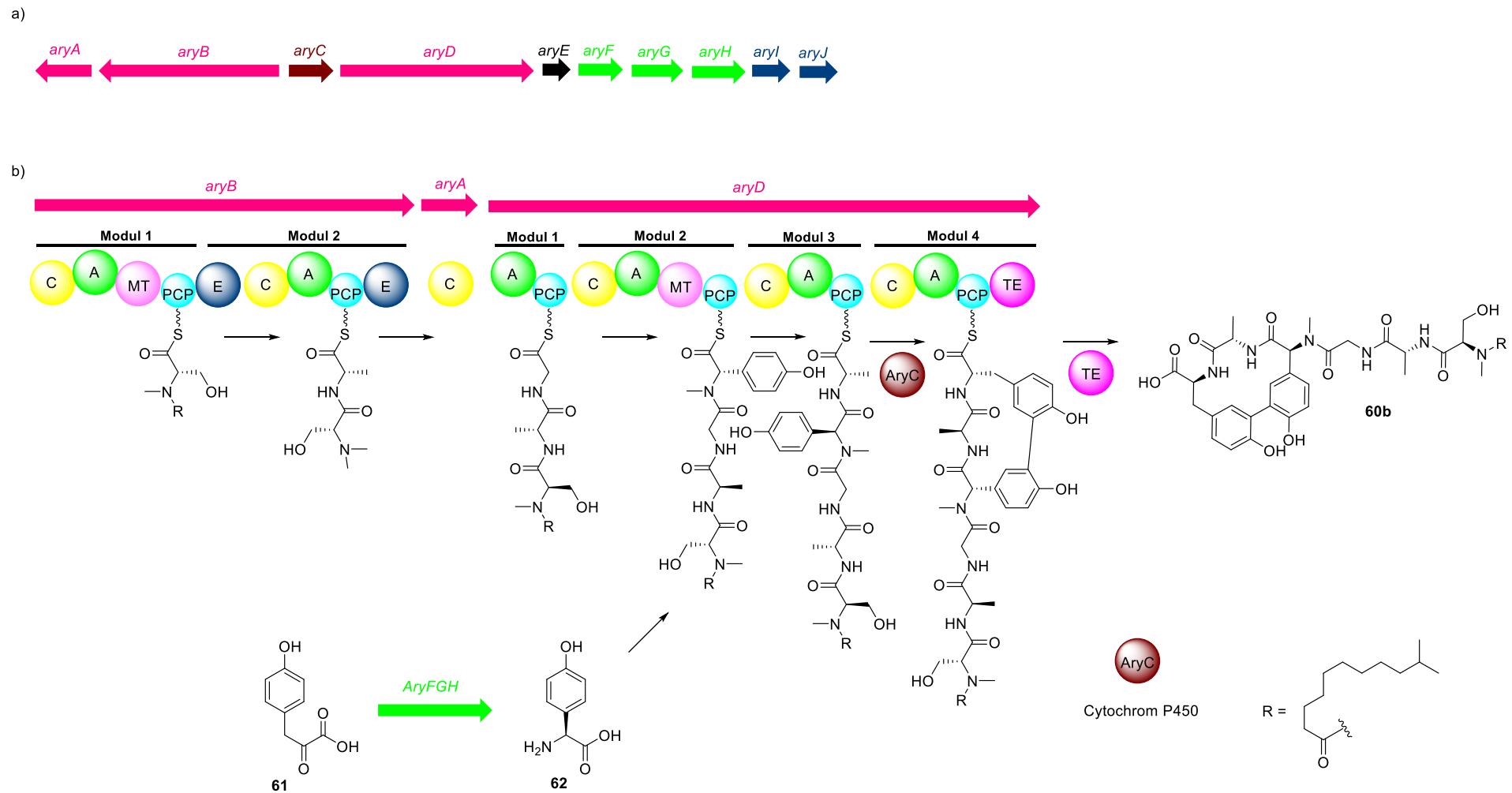
Hintergrund zu den Arylomycinen (60a-I)

2.3.1 Biosynthese der Arylomycine

Das Gencluster der Arylomycine (**60**) enthält 10 Gene, *aryA/B/D* kodieren für eine NRPS, *aryC* für ein CYP450, *aryE/I/J* für Transporter-Gene und *aryF/G/H* für die Synthese des Bausteins HPG (**62**) (Schema 12).^[96] Die NRPS besteht aus sechs Modulen mit einer *N*-terminalen Kondensationsdomäne, die für die Acylierung der ersten Aminosäure mit einer Fettsäureeinheit zuständig ist. Die A-Domänen aktivieren die erwarteten Aminosäuren Serin, Alanin/Glycin, Glycin, Hydroxyphenylglycin (**62**), Alanin/Glycin und Tyrosin. Weiterhin befinden sich zwei Epimerisierungsdomänen in der NRPS, die die entsprechenden *L*-Aminosäuren Serin und Alanin in ihre *D*-Form epimerisieren. Ebenso sind zwei Methyltransferasen vorhanden, die Serin und HPG (**62**) am Stickstoff methylieren. Analog zu dem Biosynthesecluster des Vancomycins (**4**)^[97], befinden sich auch hier Gene (*aryE/F/G*), die wahrscheinlich für die Synthese von **62** ausgehend von *p*-Hydroxyphenylpyruvat (**61**) verantwortlich sind.

Für die Kreuzkupplung der Aryle ist das Cytochrom P450 zuständig. Dieses befindet sich am Ende der NRPS und weist Homologien (49 %) zu der Oxygenase OxyC aus dem Vancomycin-Cluster auf, die die einzige Biarylbindungsbildung in **4** katalysiert.^[97] Es wird davon ausgegangen, dass AryC in Analogie zu OxyC die Bindungsknüpfung vornimmt, während das Molekül noch an die NRPS bindet.^[98] Am Ende der NRPS befindet sich eine Thioesterase, die das Produkt hydrolytisch abspaltet.

Hintergrund zu den Arylomycinen (60a-l)



Schema 12.a) Gencluster der Arylomycine (60a-l), b) putative Biosynthese von Arylomycin A2 (60b).

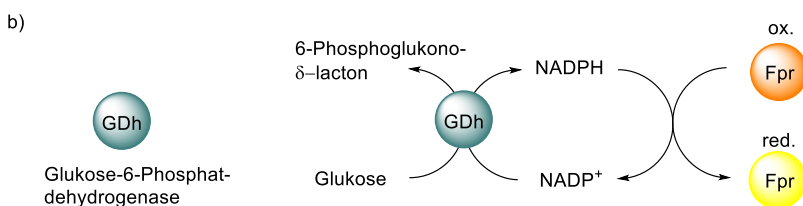
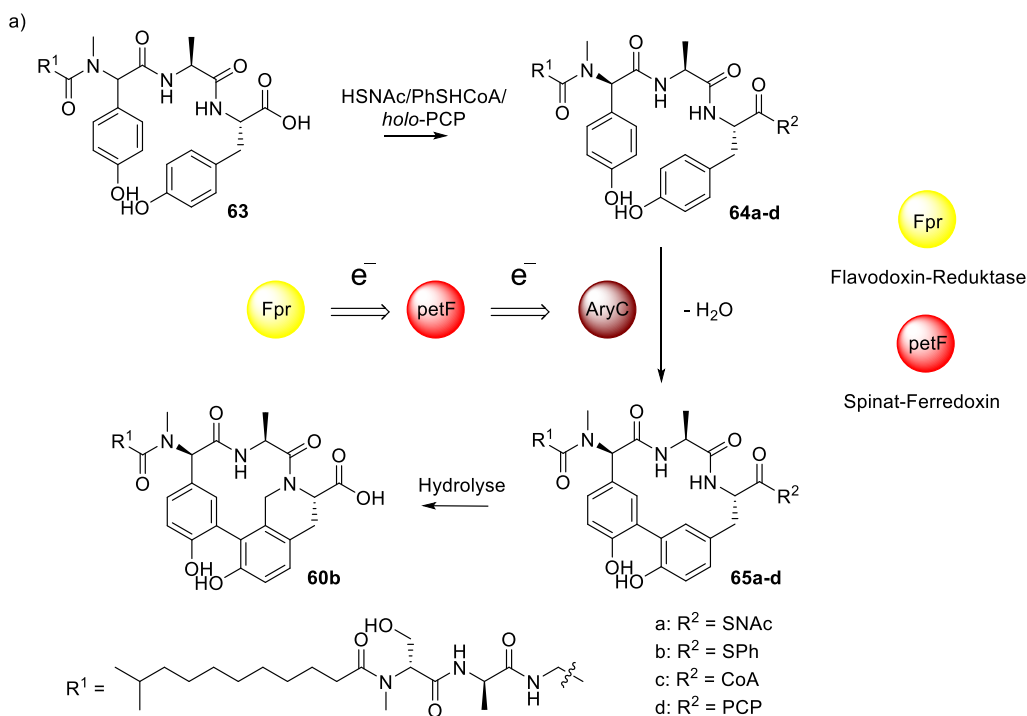
2.4 Zielsetzung des Arylomycin-Projekts

In dieser Arbeit soll eine chemo-enzymatische Totalsynthese von Arylomycin A₂ (**60b**) und für verschiedene Derivate entwickelt werden. Dafür sollte von Frau Dr. Hong und Frau Dr. Aldemir zunächst eine lineare Vorstufe hergestellt werden, die daraufhin mit Hilfe der CYP450 quervernetzt wird. Die terminale PCP-Domäne dient neben CoA, SNAc und Thiophenol als Anker für die Vorstufe während der biosynthetischen Kupplung (Schema 13).

Neben der Oxygenase AryC wird ein Elektronendonatorensystem benötigt, welches sich aus Spinat-Ferredoxin, Flavodoxin-Reductase und NADPH zusammensetzt. Durch das Ferredoxin werden Elektronen auf das Cytochrom übertragen, wobei das Eisenzentrum von Fe(III) zu Fe(II) reduziert wird. Das oxidierte Ferredoxin wird daraufhin selbst von der Flavodoxin-Reduktase reduziert, um im nächsten Katalysezyklus wieder als Elektronendonator wirken zu können (Schema 13a). Die oxidierte Reduktase wird ihrerseits von zugegebenem NADPH regeneriert. Um die Effizienz zu erhöhen und eine stabile Konzentration von NADPH während der gesamten Reaktionskaskade sicherzustellen, wird Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase zugegeben, das in der Lage ist unter Verbrauch von Glukose NADP⁺ wieder zu NADPH zu aktivieren (Schema 13b).

Die Enzyme PCP-Domäne, AryC, Flavodoxin-Reduktase und Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase wurden in Vorarbeiten^[79] oder von Mitarbeitern des Arbeitskreises bereits kloniert und als lösliche Proteine exprimiert. Das Spinat-Ferredoxin wurde mittels single-overlap-extension PCR bereits während meiner Diplomarbeit synthetisiert.^[79] Im Rahmen dieser Arbeit soll neben der Überexpression des Spinat-Ferredoxins vor allem ein Konzept für die biochemische Biarylkupplung der linearen Vorstufen **63**, **64a-c** zu Arylomycin A₂ (**60b**) und dessen Derivate erarbeitet werden. Weiterhin sollen *in-vitro*-Assays zeigen, dass AryC mit Hilfe des Elektronensystems für die Biarylkupplung während der Biosynthese der Arylomycine (**60a-l**) zuständig ist. Insgesamt soll so eine chemo-enzymatische Totalsynthese der Arylomycinen (**60a-l**) etabliert werden.

Zielsetzung des Arylomycin-Projekts



Schema 13. a) Synthese der Thiotemplatvorstufen **64a-d** und die enzymatische Biarylkupplung von Arylomycin A2 (**60b**), b) Kofaktor Regenerierungszyklus.

Desweiteren soll AryC kristallisiert werden um Einblicke in den Mechanismus der Oxygenase zu erhalten. Ausserdem soll der Komplex aus der Oxygenase mit dem Substrat kokristallisiert werden um den genauen Bindungsmodus des Substrats an AryC zu ermitteln. Die Kristallisationen werden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Frau Dr. Schneider durchgeführt.

2.5 Hintergrund zu Ikarugamycin (66)

Polycyclische Tetransäure-haltige Macrolactame (PTMs) sind Naturstoffe, die aufgrund ihres vielfältigen Strukturgerüsts weitreichende pharmakologische Aktivitäten aufweisen. Dazu zählen beispielsweise antibakterielle, antifungale, antitrypanosomale und zytotoxische Eigenschaften.^[99-103] Der erste Vertreter dieser Familie, der aus *Streptomyces phaeochromogenes* isoliert werden konnte, war Ikarugamycin (66) (Abbildung 12).^[100] Aus unterschiedlichsten Quellen wurden nachfolgend weitere PTMs isoliert, darunter auch der unter dem Namen „Heat-Stable Antifungal Factor“ (HSAF) (67) bekannten Wirkstoffs aus *Lysobacter enzymogenes*.^[104]

Ein auffälliges Strukturmerkmal der PTMs ist die Tetransäureeinheit. Diese ist in einen Makrolactamring inkorporiert, der seinerseits an ein carbacyclisches System anliert. Die verschiedenen Vertreter dieser Klasse unterscheiden sich vor allem im Aufbau des carbacyclischen Gerüsts. Die Anzahl der Cyclen sowie das Cyclisierungsmuster können variieren. Ikarugamycin (66) besitzt beispielsweise ein 5-6-5-Ringsystem, wohingegen HSAF (67) ein 5-5-6-Ringsystem aufweist.

Obwohl die PTMs pharmakologisch wertvoll sind, konnte die Biosynthese dieser Naturstofffamilie noch nicht aufgeklärt werden. Wird die Grundstruktur der PTMs betrachtet, so fällt die Ähnlichkeit zu der Struktur der Spinosyne auf, wie beispielsweise Spinosyn-A-Aglycon (68). Dieser Naturstoff enthält ebenfalls ein tricyclisches Ringsystem, weist jedoch einen Makrolactonring auf.^[105] Biosynthetisch werden die Spinosyne durch eine modulare Typ-I-PKS synthetisiert (Kapitel 1.2.2.1). Dabei wird ein lineares Vorläufermolekül durch den modularen Multienzymkomplex aufgebaut, der mittels Thioesterase in ein Makrolacton überführt wird.

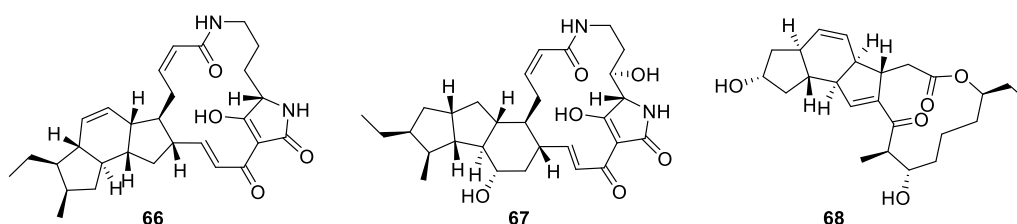


Abbildung 12. Strukturformeln von Ikarugamycin (66), HSAF (67) und Spinosyn-A-Aglycon (68).

Hintergrund zu Ikarugamycin (66)

Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zwischen den PTMs und den Spinosynen wird vermutet, dass ihre Biosynthesewege eng verwandt sind. Zunächst wurde daher davon ausgegangen, dass die PTMs durch ein modulares PKS/NRPS-Hybridsystem hergestellt werden. Im Jahre 2007 wurde von *Du et al.* in dem putativen HSAF-Gencluster aus *Lysobacter enzymogenes* ein bimodulares PKS/NRPS-System gefunden. Nach Deletion dieses Gens wurde der Naturstoff **67** nicht mehr produziert, was darauf schliessen ließ, dass das PKS/NRPS-Hybrid essentiell für die Bildung von HSAF (**67**) ist.^[104] 2010 entdeckten *Clardy et al.* das komplette Biosynthesecluster der Frontalamide, die ebenfalls Vertreter der PTMs sind.^[106] Basierend auf ihren Arbeiten vermuteten sie ebenfalls, dass ein bimodulares PKS/NRPS-System an der Biosynthese der PTMs beteiligt ist. Folglich würde diese Naturstoffklasse über ein für Bakterien höchst ungewöhnliches iteratives PKS/NRPS-Hybridsystem gebildet werden. Ausserdem konnten *Clardy et al.* durch bioinformatische Analysen und Screenings von Bodenproben mit degenerierten Primer feststellen, dass PTM-artige Biosynthesecluster weit verbreitet zu sein scheinen.^[106-107] In Nachbarschaft zu dem *i*PKS/NRPS-Hybridsystem befinden sich im Gencluster häufig putative Alkoholdehydrogenasen, FAD-abhängige Oxidoreduktasen, Cytochrom P450-Enzyme und teilweise Sterol-Desaturasen (Abbildung 13). *Du et al.* identifizierten 2011 schließlich auch das komplette HSAF-Gencluster und konnten weiterhin beweisen, dass die TE-Domäne die Bildung der Tetransäureeinheit katalysiert.^[108-109] Zum Mechanismus der Bildung des komplexen, carbacyclischen Ringsystems der PTMs war jedoch noch nichts bekannt.

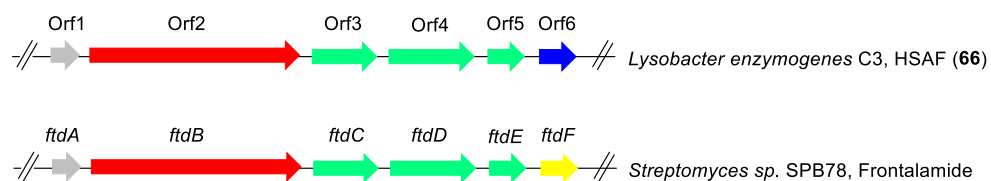


Abbildung 13. Auswahl der PTM-Biosynthesecluster von HSAF (**67**) und den Frontalamiden und schematischer Aufbau der wichtigsten Elemente für die PTM-Biosynthese: Rot: *i*PKS-NRPS, grün: FAD-Oxidoreduktase, blau: Alkoholdehydrogenase, gelb: Cytochrom P450-Enzym, grau: Sterol-Desaturase.

2.6 Zielsetzung des Ikarugamycin-Projekts

Die PTMs sind eine strukturell äußerst vielseitige Verbindungsklasse mit diversen biologischen Aktivitäten, was sie zu biomedizinischen interessanten Naturstoffen macht. Obwohl sie weit verbreitet scheinen, konnte bislang ihre Biosynthese noch nicht aufgeklärt werden. Weiterhin konnten bislang einzig die Gencluster der Frontalamide und von HSAF (**67**) identifiziert werden.

In der vorliegenden Arbeit sollte daher zusammen mit Frau Dr. Antosch das Gencluster eines weiteren Vertreters der PTM-Familie, des Ikarugamycins (**66**), identifiziert und anschließend dessen Biosynthese aufgeklärt werden. Mittels degenerierten Primer soll das Gencluster von Ikarugamycin (**66**) zunächst in *Streptomyces* TÜ6239 identifiziert und durch heterologe Expression charakterisiert werden.^[110] Erste Einblicke in die Funktion der beteiligten Enzyme sollen durch Knock-out-Studien und chemischer Analyse der Mutanten gewonnen werden.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Arbeiten zur Aufklärung der Brabantamid-Biosynthese

3.1.1 Heterologe Expression der Proteine zur Aufklärung der Brabantamid-Biosynthese

Brabantamide (**42a-c**) werden von Pseudomonaden durch eine NRPS synthetisiert (Kapitel 2.1.1). Bislang wurde die genaue Brabantamid-Biosynthese noch nicht aufgeklärt. Es wird jedoch vermutet, dass zwei Enzyme des Genclusters dieser Lipocyclocarbamide, die NRPS-terminale TE-Domäne sowie eine putative *Baeyer-Villiger*-Monooxygenase BraC, für ungewöhnliche Cyclisierungs-, Umlagerungs- und Oxidationsreaktionen verantwortlich sind. Zur Untersuchung der katalytischen Fähigkeiten der TE-Domäne und von BraC sollten diese zunächst heterolog exprimiert werden.

3.1.1.1 Klonierung und heterologe Expression der Monooxygenase BraC

Im Rahmen meiner Diplomarbeit wurden die bereits vorhandenen Plasmide pHis8::braC und pGS21a::braC in *E. coli* BL21(DE3) transformiert und das Protein überexprimiert.^[79] Allerdings wurde unter verschiedenen Expressionstemperaturen BraC nur als unlösliches Protein erhalten. Zur Verbesserung der Löslichkeit wurden die Standardmethoden wie, Zugabe von Lysozym oder des Detergenzes Tween 20® zum Zellpellet, sowie die Coexpression von Chaperonen angewendet. Lysozym ist in der Lage glycosidische Bindungen in der Bakterienzellwand zu hydrolysieren, wodurch sich die Löslichkeit von BraC jedoch nicht verbesserte. Die Zugabe des Detergenzes Tween 20® führte dazu, dass die Monooxygenase in geringen Mengen als lösliches Protein erhalten wurde. Da sich Detergenzien jedoch negativ auf die Funktion von Proteinen auswirken können und sich das Expressionslevel des Proteins durch die Verwendung von Tween 20® nicht maßgeblich gesteigert hatte, wurde diese Methode nicht weiter verfolgt. Von Chaperonen ist bekannt, dass sie durch die Beschleunigung der korrekten Faltung, sowie der Inhibierung der Proteinaggregation die

Arbeiten zur Aufklärung der Brabantamid-Biosynthese

Löslichkeit von Proteinen verbessern.^[111-112] Durch die Coexpression von Chaperonen mit BraC, konnte die Monooxygenase als lösliches Protein erhalten werden.

In der vorliegenden Arbeit sollte zunächst ein neuer Ansatz zur Expression von BraC verfolgt werden. Da Brabantamide (**42a-c**) wie in Kapitel 2.1 beschrieben von Pseudomonaden hergestellt werden, die einen anderen Codongebrauch aufweisen als *E. coli*, wurde parallel zur Coexpression mit Chaperonen ein codon-optimierter Ansatz verfolgt. Die codon-optimierte Sequenz von *braC* wurde aus dem erhaltenen Vektor isoliert und in zwei verschiedene Expressionsvektoren pHis8 und pGS21a kloniert. Die Ligation der Konstrukte wurde chemisch in *E. coli* DH5 α -Zellen transformiert. Eine Screening-PCR sowie eine Sequenzierung frisch isolierter Plasmide bestätigte die erfolgreiche Klonierung des codon-optimierten Gens in beide Vektoren.

Die Konstrukte wurden chemisch in den Expressionsstamm *E. coli* BL21(DE3) transformiert und das Protein nach der Standardmethode überexprimiert (Kapitel 4.6). Nach der Aufreinigung über Ni-NTA (Nickel-Nitrilotriessigsäure), Entsalzung der Proteine und Konzentrierung, wurde das gelbliche Protein in Ausbeuten von $c_{\text{pHis8}} = 0.3-0.6$ mM und $c_{\text{pGS21a}} = 0.1-0.2$ mM aus zwei Liter Kulturvolumen erhalten. Eine Optimierung der Expression kann oftmals durch Autoinduktion erreicht werden. Die Testexpressionen zeigten, dass zwar mehr Protein überproduziert wurde, aber der Großteil dennoch im Pellet zurückblieb und daher die Isolierung an exprimiertem Protein nicht gesteigert wurde. Expressionen in anderen Zellen, wie beispielsweise *E. coli* SoluBL21, bei einer Temperatur von 25 °C oder *E. coli* Arctic Express bei 16 °C zeigten keine signifikante Erhöhung der Konzentration an BraC.

Eine weitere Möglichkeit die Löslichkeit an BraC zu steigern, ist die Expression in Streptomyceten. Hierbei gibt es zwei Möglichkeiten den gewünschten Vektor in die Actinobakterien zu transformieren: die Transformation mittels Protoplasten oder die horizontale Konjugation.^[113] Für beide Methoden wurde *braC* zunächst aus dem pHis8-Konstrukt ausgeschnitten und erfolgreich in den Shuttlevektor pXY200oriT ligiert. Für die Konjugation wurde das Konstrukt mittels Elektroporation in *E. coli* ET12567 pUZ8002 transformiert. Dieser *E. coli* Stamm ist in der Lage einen Pilus aufzubauen, der es ermöglicht, einen Shuttlevektor in Streptomyceten einzubringen. Nachdem der Shuttlevektor in die Streptomyceten überführt wurde (Kapitel 4.6.6), wurden die potentiellen Exkonjugate nach drei Tagen von der MS (Mannit, Soja)-Platte auf eine GYM (Glukose, Yeast, Malt-Medium)-

Arbeiten zur Aufklärung der Brabantamid-Biosynthese

Platte mit Apramycin (50 µg/mL) übertragen und bei 30 °C inkubiert. Nach mehreren Tagen wurde kein Wachstum von Streptomyceten festgestellt. Die Konjugation konnte somit nicht erfolgreich durchgeführt werden. Daher sollte die Transformation mittels Protoplasten angewendet werden.

Wie in Kapitel 4.6.7 beschrieben wurde die Protoplastentransformation mit *braC* im pXY200oriT-Vektor durchgeführt. Nach drei Tagen wuchsen pinke Kolonien auf den R5-Agar-Platten, die daraufhin auf eine GYM-Platte mit Apramycin (50 µg/mL) überführt wurden. Ein weiteres Wachstum der Klone auf der GYM-Platte blieb aus. Daher wurde davon ausgegangen, dass es sich bei der Bildung der pinken Kolonien um eine Kontamination handelte. Nach mehreren gescheiterten Klonierungsversuchen stellte sich heraus, dass sich im Shuttle-Vektor pXY200oriT in der Apramycin-Resistenzkassette ein Frame-Shift befand. Dieser ist putativ verantwortlich dafür, dass die horizontale Konjugation sowie eine Protoplastentransformation mit diesem Konstrukt nicht möglich waren. Mittlerweile wurde der Frame-Shift behoben, so dass in zukünftigen Versuchen die Transformation des Plasmids in Streptomyceten mit beiden Methoden nochmals durchgeführt werden kann.

Da die getesteten Methoden nicht in einer signifikanten Erhöhung des Expressionslevels resultieren, wurde sich im weiteren Verlauf auf die Expression von pHis8::*braC* nach der Standardmethode mit größeren Kulturvolumina konzentriert (Abbildung 14).

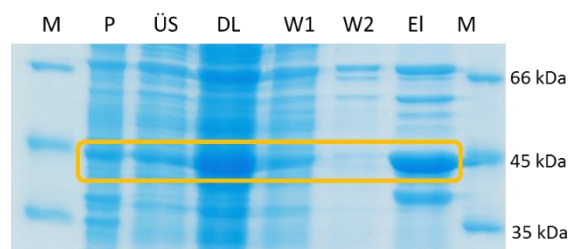


Abbildung 14. SDS-Page-Gel (12%) der Proteinexpression von pHis8::BraC (1 L TB) in *E. coli* BL21(DE3); M = Marker, P = Pellet, ÜS = Überstand, W1 = Waschfraktion 1, W2 = Waschfraktion 2, El = Elutionsfraktion; Größe des Proteins: 45133.24 Da.

BraC gehört zu den FAD-abhängigen BVMOs. Dementsprechend handelt es sich um ein gelbliches Protein (Kapitel 2.1.1). Die Gelbfärbung resultiert aus einer Komplexierung des Enzyms mit der prostetischen Gruppe FAD. Während der Aufreinigung an der Ni-NTA-Säule wurde jedoch beobachtet, dass sich die gelbliche Färbung des Proteins nach jedem Waschgang verringerte. Wahrscheinlich löst sich der Cofaktor während der Isolierung aus dem

Arbeiten zur Aufklärung der Brabantamid-Biosynthese

Enzymkomplex. Daher wurde für die Verwendung von aktivem Protein in enzymatischen Umsetzungen stets FAD zugegeben (Kapitel 3.1.3).

3.1.1.2 Klonierung und heterologe Expression der Thioesterase und der PCP-Domäne

Im Rahmen meiner Diplomarbeit wurde die *braB*_PCP-TE-Domäne erfolgreich in den pHis8-Vektor kloniert und in *E. coli* BL21(DE3) als gut lösliches Protein überproduziert (Abbildung 15a).^[79] In der vorliegenden Arbeit sollte zur näheren Untersuchung der Funktion der Thioesterase, diese auch als einzelne Domäne exprimiert werden. Die zweite PCP-Domäne der NRPS *braB* der Brabantamide (42a-c) sollte ebenfalls als einzelnes Protein produziert werden. Für die Thioesterase wurde eine PCR mit der *PfuX*-Polymerase und den Primern 3 und 4 (Tabelle 17) durchgeführt, wobei das PCP-TE-Konstrukt als Templat diente. Nach Restriktion wurde das PCR-Produkt in die Expressionsvektoren pHis8 und pGS21a ligiert und die Konstrukte chemisch in *E. coli* DH5 α transformiert. Die Sequenzierung des Konstruktes pGS21a::BraB_TE war mutationsfrei und es wurde daher für die Proteinexpression verwendet. Erste Versuche der Überproduktion nach der Standardmethode in *E. coli* BL21(DE3)-Zellen brachten kein zufriedenstellendes Ergebnis. Es wurde lösliches Protein erhalten, aber in geringen Konzentrationen im Bereich von 0.08-0.20 mM aus zwei Liter Kulturvolumen. Daher wurden Optimierungsmethoden getestet, um die Produktion an löslichem Protein zu erhöhen. Eine Coexpression mit den Chaperonen *cpn10* und *cpn60* in *E. coli* Arctic Express oder eine Überproduktion in *E. coli* SoluBL21-Zellen bei 25 °C über Nacht führten zu keiner signifikanten Erhöhung der Konzentration an Protein. Ebenfalls wurde das Gen in den pXY200oriT-Vektor kloniert, um den Vektor in Streptomyceten zu transformieren und das Protein in diesen Bakterien überzuexprimieren. Die Transformationsversuche mittels horizontaler Konjugation oder Protoplastentransformation waren, analog zu BraC, nicht erfolgreich, da der fehlerhafte pXY200oriT-Shuttle-Vektor benutzt wurde. Ebenso kann die Thioesterase zukünftig in den fehlerfreien pXY200oriT-Shuttle-Vektor kloniert werden und die Transformation in die Streptomyceten wiederholt werden. Die Überexpressionen des Proteins zur Verwendung in enzymatischen Reaktionen wurden analog des Standardprotokolls (Kapitel 4.6) in großen Kulturvolumina angesetzt (Abbildung 15b).

Die Amplifikation der terminalen PCP-Domäne der Brabantamid-NRPS *braB* erfolgte aus der gDNA von *Pseudomonas sp.* SH-C52, wobei das eigentliche Gen mit zwölf Aminosäuren

Arbeiten zur Aufklärung der Brabantamid-Biosynthese

N-terminal und zwei Aminosäuren *C*-terminal verlängert wurde.^[114] Eine Klonierung von *braB_PCP2* in den pHis8TEV-Vektor und eine Überexpression in *E. coli* ergab unter Standardbedingungen das lösliche Protein in ausreichender Menge mit $c = 10$ mM aus 1 L Kulturvolumina (Abbildung 15c). Der pHis8_TEV-Vektor unterscheidet sich vom pHis8-Vektor bezüglich eines Austauschs der Enterokinase-Schnittstelle gegen eine TEV-Protease Schnittstelle.

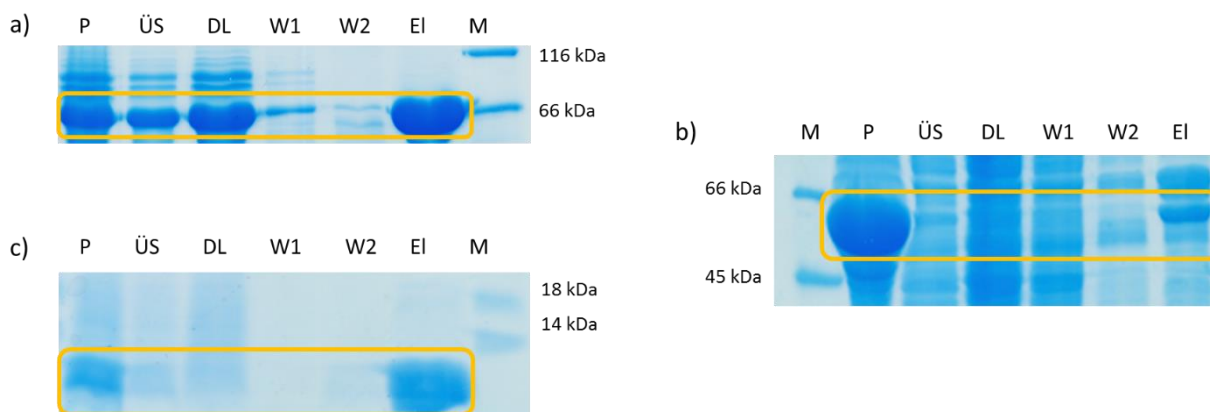


Abbildung 15. a) SDS-Page-Gel (12%) pGS21a::BraB_TEPCP (1 L TB) in *E. coli* BL21(DE3); Größe des Proteins: 66422 Da, b) SDS-Page-Gel (12%) pGS21a::BraB_TE (1 L TB) in *E. coli* BL21(DE3); Größe des Proteins: 61873 Da, c) SDS-Page-Gel (15%) der Proteinexpression von pHis8_TEV::BraB_PCP2 (1 L TB) in *E. coli* BL21(DE3); Größe des Proteins: 11363 Da; P = Pellet, ÜS = Überstand, M = Marker, W1 = Waschfraktion 1, W2 = Waschfraktion 2, EI = Elution.

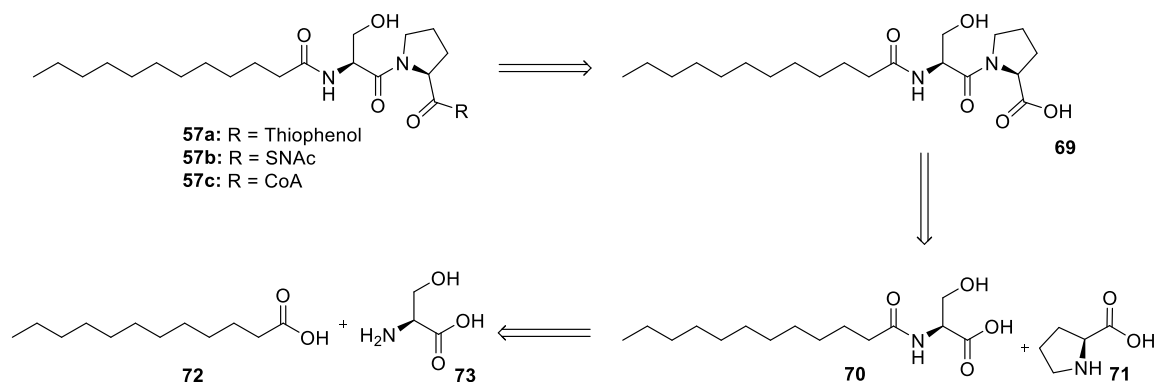
3.1.2 Synthese der Brabantamid-Vorstufen 57a-c, 58a-b und 59

3.1.2.1 Synthese der Thioester 57a-c

In der ersten postulierten Biosynthese der Brabantamide (**42a-c**) (Kapitel 2.1.1, Schema 10) wird angenommen, dass die zugrundeliegende NRPS die Vorstufe **43** synthetisiert. Eine Kombination aus der TE-Domäne und der Monooxygenase BraC katalysiert putativ die Abspaltung, Oxidation und Umlagerungsreaktionen, die das Peptid **43** in das Brabantamid **42a** überführen. Für die *in-vitro* Verifizierung der postulierten Biosynthese wurden die vereinfachten Substrate **57a-c** synthetisiert. Zunächst sollte die Säure **69** mittels Flüssigphasenpeptidsynthese hergestellt und anschließend in die Thioester **57a-c** überführt werden. Diese Thioester **57a-c** stellen Mimetika des natürlichen Biosyntheseintermediats dar.

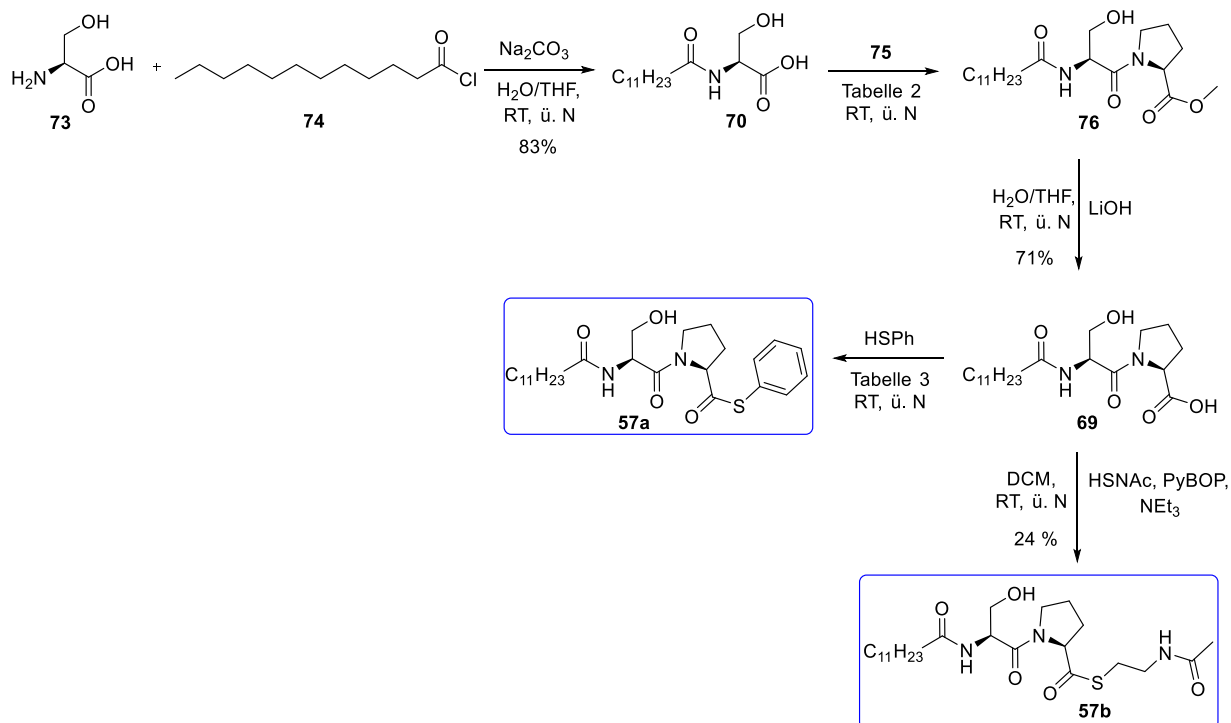
Arbeiten zur Aufklärung der Brabantamid-Biosynthese

Die in Schema 14 dargestellte Retrosynthese zeigt, dass sich die Säure **69** aus den beiden Aminosäuren L-Serin (**73**) und L-Prolin (**71**) sowie Laurinsäure (**72**) aufbaut.



Schema 14. Retrosynthese der Thioester **57a-c**.

Ausgehend von L-Serin (**73**) wurde in einer *Schotten-Baumann*-Reaktion mit Laurinsäurechlorid (**74**) das Amid **70** in einer guten Ausbeute von 83 % erhalten (Schema 15).^[115] Das acylierte L-Serin **70** wurde im folgenden Schritt über Nacht bei Raumtemperatur mit L-Prolinmethylester (**75**) zum Dipeptid **76** überführt.

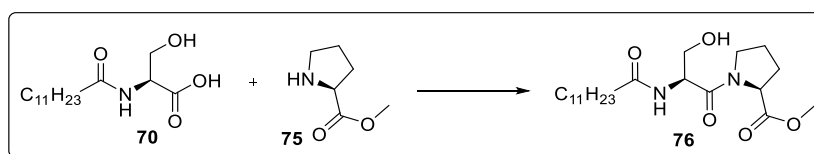


Schema 15. Syntheseweg zu den Thioestern **57a,b**; RT = Raumtemperatur, ü.N. = über Nacht, THF = Tetrahydrofuran, DCM = Dichlormethan, NEt_3 = Triethylamin, HSPH = Thiophenol, HSNac = N-Acetylcysteamin, PyBOP = Benzotriazol-1-yl-oxypyrrolidinophosphonium Hexafluorophosphat.

Arbeiten zur Aufklärung der Brabantamid-Biosynthese

Es wurden mehrere Kupplungsreagenzien, sowie verschiedenen Basen zur Peptidkupplung getestet (Tabelle 2). Als Lösungsmittel wurden Dimethylformamid (DMF) und Dichlormethan (DCM) getestet, wobei sich herausstellte, dass die Reaktionen in DCM in besseren Ausbeuten verliefen als jene in DMF (Tabelle 2). Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphonium Hexafluorophosphat (PyBOP) mit Triethylamin als Base ergaben das Produkt **76** in einer Rohausbeute von 59% (Eintrag 4). Das Produkt **76** wurde unter Verwendung von EDC-HCl und 1-Hydroxy-7-azabenzotriazol (HOAT) mit Natriumcarbonat mit einer Ausbeute von 54% erhalten (Eintrag 6). 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid-Hydrochlorid (EDC-HCl) als Kupplungsreagenz zusammen mit dem Hilfsreagenz 1-Hydroxybenzotriazol (HOBT) lieferten das Produkt **76** unter der Verwendung der Basen *N*-Methylmorpholin (NMM) und 4-Dimethylaminopyridin (DMAP) mit vergleichbaren Ausbeuten von 54% beziehungsweise 59% (Eintrag 2 und 3). Mit Natriumcarbonat als Base wurden diese Ausbeuten nicht erreicht.

Tabelle 2. Getestete Reaktionsbedingungen der Peptidkupplung zwischen der Säure **70** und dem Amin **75**.



	Kupplungsreagenzien	Base	Lösungsmittel	Ausbeute
1	EDC-HCl, HOBT	NMM	DMF	-
2	EDC-HCl, HOBT	NMM	DCM	54%
3	EDC-HCl, HOBT	DMAP	DCM	59%
4	PyBOP	NEt ₃	DCM	59%*
5	EDC-HCl, HOBT	NaHCO ₃	DMF	43%
6	EDC-HCl, HOAT	NaHCO ₃	DCM	54%
7	EDC-HCl, HOAT	NaHCO ₃	DMF	-

* Rohprodukt

Die größte Herausforderung bei dieser Reaktion stellte die Aufreinigung des Produktes dar. Mittels Säulenchromatographie an Silikagel wurde die gewünschte Reinheit nicht erreicht, da eine Co-Elution des Produktes mit Verunreinigungen auftrat. Durch die Verwendung der Mitteldrucksäulenchromatographie (MPLC, engl. Medium Pressure Liquid Chromatography, Reveleris C18) konnte reines Produkt **76** erhalten werden. Zur Entschützung des

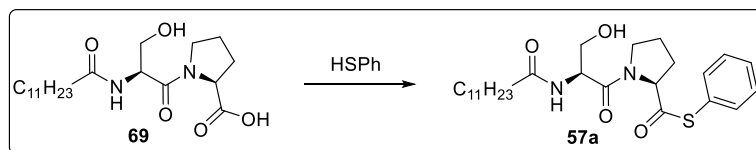
Arbeiten zur Aufklärung der Brabantamid-Biosynthese

Methylesters **76** zur Säure **69** wurden mehrere Bedingungen getestet. Eine Verseifung mittels Schweineleberesterase (PLE, engl. Pig Liver Esterase), sowie die Verwendung von 2 Äq. einer 0.1 M oder einer 0.5 M Lithiumhydroxid-Lösung in Methanol, THF oder Ethanol war nicht erfolgreich. Ebenso konnte die Säure durch die Verwendung einer Natriumhydroxidlösung nicht erhalten werden. Die Hydrolyse mit 3.0 Äq. festem Lithiumhydroxid, das portionsweise zu einer Lösung des Dipeptids **76** in einem THF-Wasser-Gemisch gegeben wurde,^[116] konnte das Produkt **69** mit einer literaturüblichen Ausbeute von 71% liefern.

Der letzte Schritt der Synthese bestand in der Veresterung der Säure **69** zum Thiophenol-Substrat **57a** sowie zum SNAc-Substrat **57b**. Ausgehend von der Säure **69** und HSNAC wurde der Thioester **57b** mit PyBOP als Kupplungsreagenz in Gegenwart von Triethylamin synthetisiert. Nach Aufreinigung wurde das Produkt **57b** mit 24% Ausbeute erhalten. Ebenso gelang die Synthese mit der Kombination aus EDC-HCl und HOBT sowie DMAP in Dichlormethan, jedoch in signifikant schlechterer Ausbeute von 15%. In vier Syntheseschritten wurde der SNAc-Thioester **57b** in einer Gesamtausbeute von 8% erhalten. Die Veresterung des acylierten Dipeptids **69** mit Thiophenol erwies sich als schwieriger im Vergleich zur Veresterung mit HSNAC. Es wurden mehrere Bedingungen getestet, wobei das Rohprodukt in einigen Fällen in mäßigen Ausbeuten erhalten wurde (Eintrag 1, 4 und 5, Tabelle 3). Jedoch war es nicht möglich, den Thioester **57a** sauber zu isolieren. Auch mehrfache Säulenchromatographie an Silikagel oder die Verwendung der MPLC führten nicht zu dem gewünschten sauberen Produkt **57a**. Die Vermutung lag nahe, dass sich der Thioester **57a** bei der Veresterung erst gar nicht bildete, da nach der Säulenchromatographie an Kieselgel hauptsächlich freie Säure **69** und freies Thiophenol vorlag. Thiophenol besitzt die Eigenschaft leicht Disulfidbindungen zu bilden. Daher wurde das Reagenz vor Gebrauch frisch destilliert und die Reaktion unter Schutzgas durchgeführt. Trotzdem konnte das Thiophenol-Substrat **57a** nicht als sauberes Produkt erhalten werden.

Arbeiten zur Aufklärung der Brabantamid-Biosynthese

Tabelle 3. Getestete Reaktionsbedingungen der Kupplungsreaktion des acylierten Dipeptids **69** und Thiophenol zu dem Thioester **57a**.



	Kupplungsreagenzien	Base	Lösungsmittel	Ausbeute
1	EDC-HCl, HOBT	NMM	DCM	64%*
2	EDC-HCl, HOBT	NEt ₃	DCM	-
3	EDC-HCl, HOAT	NaHCO ₃	DCM	-
4	PyBOP	NEt ₃	DCM	53%*
5	EDC-HCl, HOBT	DMAP	DMF	10%**
6	EDC-HCl, HOBT	DMAP	DCM	-
7	DCC	-	EtOAc	-

* Rohprodukt, **Ausbeute nach Säulenchromatographie an Kieselgel

Bei den Peptidkupplungsreaktionen und den Thioesterbildungen aus Schema 15 scheint die freie Hydroxylgruppe des Serins störend auf die Produktbildungen auszuwirken. Die Polarität der Moleküle wird durch diese Gruppe gesteigert und sie ist fähig Wasserstoffbrückenbindungen auszubilden, wodurch die Reaktionen und die Aufreinigung der Produkte stark beeinträchtigt werden. Aus diesen Gründen wurde ebenfalls eine Synthese zu den Thioestern **57a,b** ausgehend von einem Serin-Derivat **77** mit geschützter OH-Gruppe durchgeführt (Schema 16).

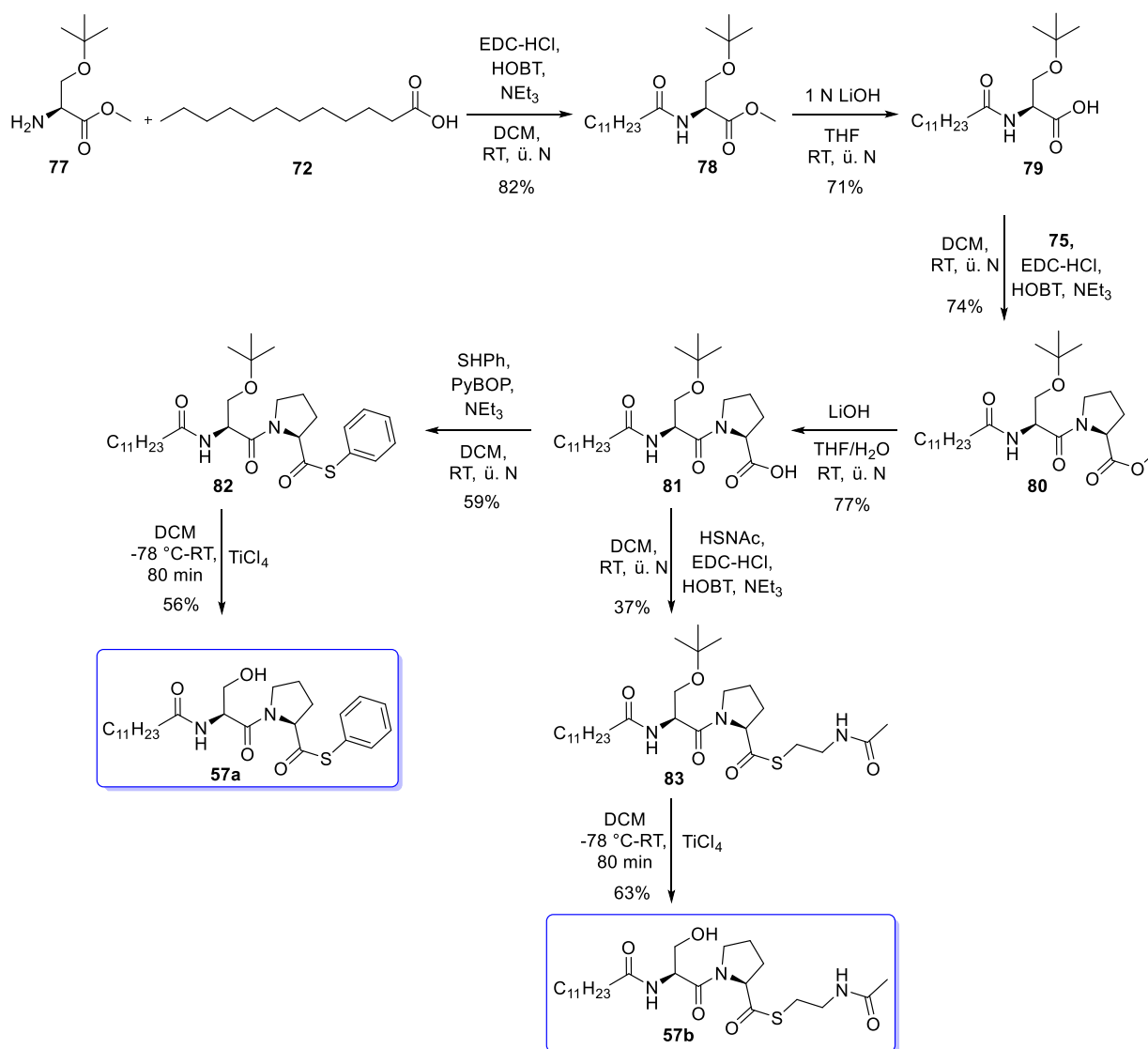
Die Acylierung des *O-tert*-Butyl-L-Serinmethylesters (**77**) erfolgte durch eine Peptidkupplungsreaktion mit EDC-HCl, HOBT und Triethylamin als Base in Dichlormethan mit einer guten Ausbeute von 82%. Die *Schotten-Baumann*-Reaktion die bei der vorherigen Synthesesequenz benutzt wurde, führte auch hier zum Amid **78**, jedoch mit 69% in geringerer Ausbeute. Der Methylester **78** wurde im nächsten Schritt zur Säure **79** mit einer Ausbeute von 71% verseift. Die Peptidkupplung zum Dipeptid **80** erfolgte mit den Standard-Kupplungsreagenzien EDC-HCl und HOBT. Im Vergleich zur Synthese mit dem ungeschützten Dipeptid **76** (Schema 15) erfolgte die Aufreinigung des acylierten Dipeptids **80** mittels Säulenchromatographie an Silikagel problemlos und lieferte das Produkt **80** mit einer Ausbeute von 74%. Die Verseifung zur Säure **81** durch portionsweise Zugabe von

Arbeiten zur Aufklärung der Brabantamid-Biosynthese

Lithiumhydroxid verlief ebenfalls in guten Ausbeuten von 77%. Die Kupplung zwischen dem Peptid **81** und HSNac wurde zunächst analog zur Synthese des ungeschützten Serins **57b** durchgeführt (Schema 15). Nach der Aufreinigung des Rohproduktes mittels semi-präparativer HPLC wurden lediglich 27% des Thioesters **83** erhalten. Daher wurden weitere Bedingungen für die Veresterung getestet, und es zeigte sich, dass die besten Ergebnisse mit der Kombination aus EDC-HCl, HOBT und Triethylamin in Dichlormethan erhalten wurden. Nach Aufreinigung mittels semi-präparativer HPLC wurde das Produkt **83** in einer Ausbeute von 37% erhalten. Der finale Schritt der Synthese des SNAc-Derivates **57b** bestand in der Entschützung der Hydroxylgruppe des Serin-Bausteins. Da Thioester unter sauren Bedingungen zur Spaltung neigen, konnten die allgemein üblichen Verfahren zur *tert*-Butyl-Entschützung unter wässrigen, sauren Bedingungen nicht durchgeführt werden.^[117-119] Die Entschützung der Hydroxylgruppe zum Peptid **57b** wurde somit mittels Titanatetrachlorid-Katalyse unter Schutzgasatmosphäre in 63% Ausbeute realisiert.^[120] Der finale Thioester **57b** wurde analog zur Synthese ausgehend von dem freien Serin (**73**) als sauberes Endprodukt erhalten. Die Gesamtausbeute über sechs Reaktionen betrug analog zur Reaktionssequenz mit der freien Hydroxyl-Gruppe am Serin (**73**) 8%.

Die Ausbildung des Thioesters der Säure **81** zum Produkt **82** wurde zunächst mit den Standard-Kupplungsreagenzien EDC-HCl und HOBT getestet. Bei der Verwendung von Triethylamin als Base wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung an Kieselgel das Produkt **82** bereits in einer Ausbeute von 47% erhalten. Diese wurde durch Verwendung von PyBOP als Kupplungsreagenz mit Triethylamin unter Schutzgasatmosphäre weiter verbessert. Nach der säulenchromatographischen Aufreinigung an Silikagel wurde der Thioester **82** mit einer Ausbeute von 59% erhalten. Die Entschützung der Hydroxylgruppe des Serin-Bausteins erfolgte analog zur Synthese des SNAc-Derivat **83** mittels Titanatetrachlorid. Dabei wurde das Produkt **57a** mit einer Ausbeute von 58% erhalten. Insgesamt wurde eine Gesamtausbeute von 11% über sechs Schritte erreicht. Im Vergleich zu der vorher beschriebenen Synthese ohne Schutzgruppe an der Hydroxyfunktion des Serins (**73**) wurde der SNAc-Thioester **57b** in einer ähnlichen Gesamtausbeute von 8% erhalten. Die Synthese des Thiophenolderivats **57a**, welches in hoher Reinheit mit einer Ausbeute von 11% erhalten wurde, konnte unter der Verwendung der Schutzgruppe am Serin jedoch signifikant gesteigert werden.

Arbeiten zur Aufklärung der Brabantamid-Biosynthese

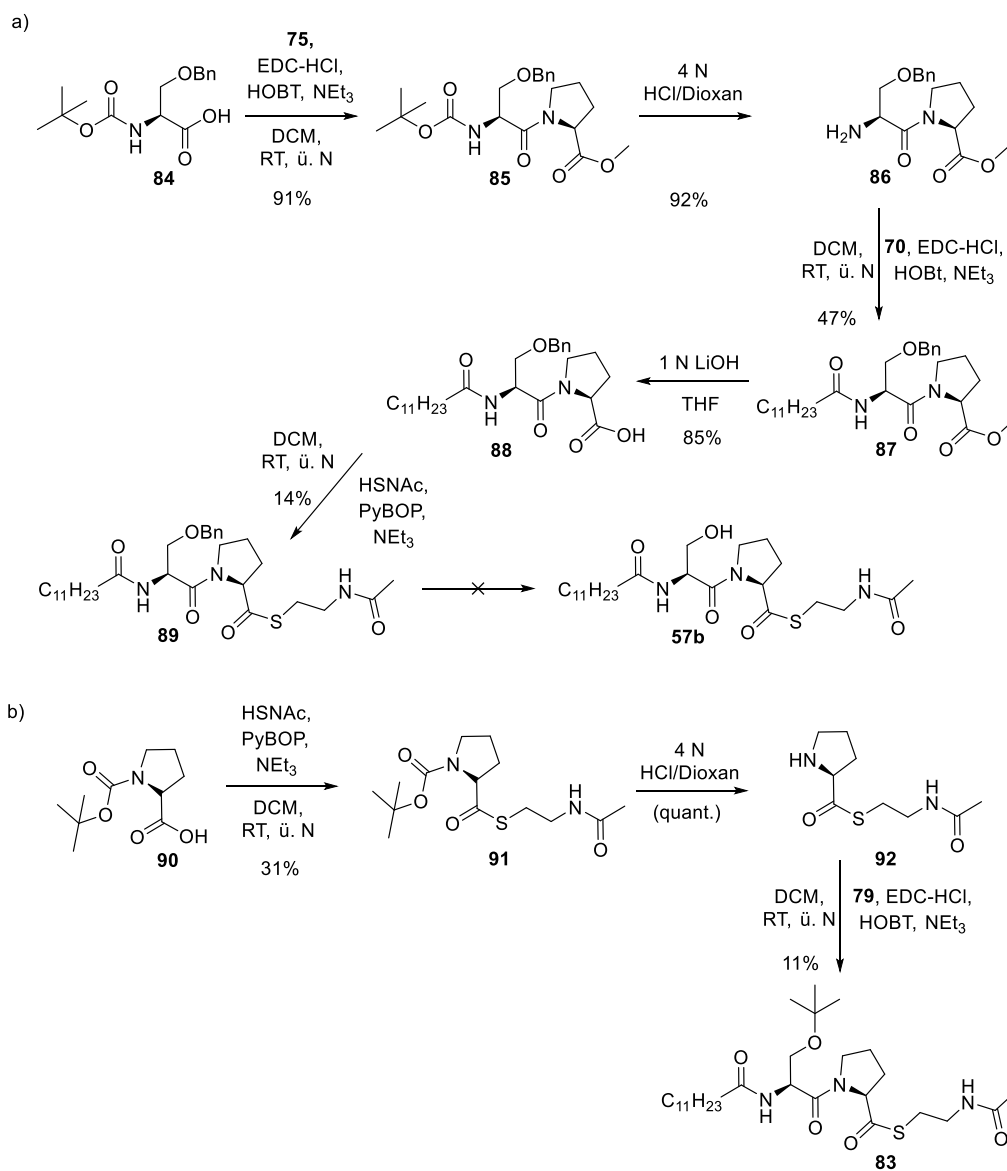


Schema 16. Syntheseweg zu den Thioestern **57a** und **57b** ausgehend von *tert*-Butyl-geschütztem L-Serin **77**.

Parallel zur *tert*-Butyl-Strategie (Schema 16) wurde ein Ansatz mit einem Benzyl-geschützten Serin **84** verfolgt (Schema 17a). Die Peptidkupplung zwischen L-Prolinmethylester (**75**) und *N*-Boc-*O*-Benzyl-L-Serin (**84**) verlief in sehr guten Ausbeuten von 91% unter Standardbedingungen. Die folgende Acylierung mit der Fettsäure **72** ergab den Methylester **87**, unter Verwendung von Standardkupplungsreagenzien, mit einer Ausbeute von 47%. Der Methylester **87** wurde anschließend mit einer wässrigen Lithiumhydroxidlösung zur Säure **88** mit einer Ausbeute von 85%, verseift. Die Veresterung der Säure **88** mit HSNac gelang nur in sehr geringer Ausbeute von 14%. Alle Versuche zur Entfernung der Benzylgruppe unter Palladium katalysierter Hydrierung schlugen fehl. Die Thioesterbindung stellt wahrscheinlich das Problem dar, da der Katalysator durch das Schwefelatom vergiftet und dadurch inaktiviert wird.^[121] Aufgrund der bislang nicht realisierten Entfernung der

Arbeiten zur Aufklärung der Brabantamid-Biosynthese

Benzylschutzgruppe in Kombination mit teilweise sehr schlechten Ausbeuten wurde diese Reaktionssequenz als ineffizient betrachtet und nicht weiterverfolgt. Außerdem konnten die Synthesen der Thioester **57a,b** unter Verwendung der *tert*-Butyl Schutzgruppe sowie ohne Schutzgruppe bereits erreicht werden.



Schema 17. a) Weitere Synthese zum Thioester **57b**, ausgehend von *O*-Benzylserin (**84**); b) Konvergente Synthese zum Thioester **83**, b) Synthese zum Thioester **83** ausgehend von *tert*-Butyl-Prolin (**90**); Bn = Benzyl, quant. = quantitativ.

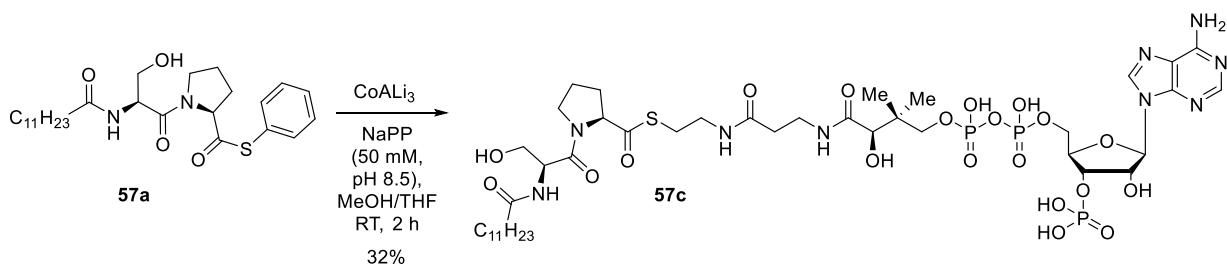
Neben der sequenziellen Synthese des Thioesters **57b** wurde ein konvergenter Ansatz zur Darstellung des Zielprodukts **57b** verfolgt (Schema 17b). Ausgehend von *N*-Boc-L-Prolin (**90**) wurde zunächst die Kupplungsreaktion mit HSNAc zu dem Thioester **91** durchgeführt. Diese Veresterung mit PyBOP und NEt₃ in DCM lieferte das Produkt **91** in einer geringen Ausbeute von 31%. Es wurden weitere Kupplungsreagenzien, wie EDC-HCl mit HOBT sowie HOAT und

Arbeiten zur Aufklärung der Brabantamid-Biosynthese

COMU mit der Verwendung verschiedener Basen getestet, jedoch konnte keine Steigerung der Ausbeute erzielt werden. Anschließend wurde die Schutzgruppe säurekatalysiert abgespalten und das Amin **92** wurde in quantitativer Ausbeute erhalten. Parallel zu der Synthese des Thioesters **92** wurde analog zu der Synthese aus Schema 16 die Säure **79** hergestellt. Die Peptidknüpfung zwischen beiden Edukten **79** und **92** verlief in sehr geringen Ausbeuten von 11%. Aufgrund der schlechten Ausbeuten der Kupplungsreaktion zu **83** und der Veresterung der Säure **90** zu dem Thioester **91** wurde diese Synthesesequenz nicht mehr verfolgt.

Zusammenfassend wurden zur Darstellung der beiden Thioester **57a,b** mehrere Synthesewege getestet. Dabei stellte sich heraus, dass die sequenziellen Synthesen ausgehend von L-Serin (**73**) oder dem *tert*-Butyl-geschützten L-Serin **77** die effektivsten waren. Die Verwendung der Benzylschutzgruppe lieferte in den einzelnen Kupplungsreaktionen geringere Ausbeuten. Zudem konnte die Benzylgruppe hydrolytisch nicht abgespalten werden. Der Vorteil der schnelleren, konvergenten Synthese konnte in diesem Falle durch die geringen Ausbeuten der Peptidkupplungsreaktionen nicht ausgenutzt werden, so dass die Synthese aus Schema 15 zur Darstellung der HSNAC-Vorstufe **57b** und die in Schema 16 gezeigte Synthese zur Herstellung der Thiophenol-Vorstufe **57a** verwendet wurden.

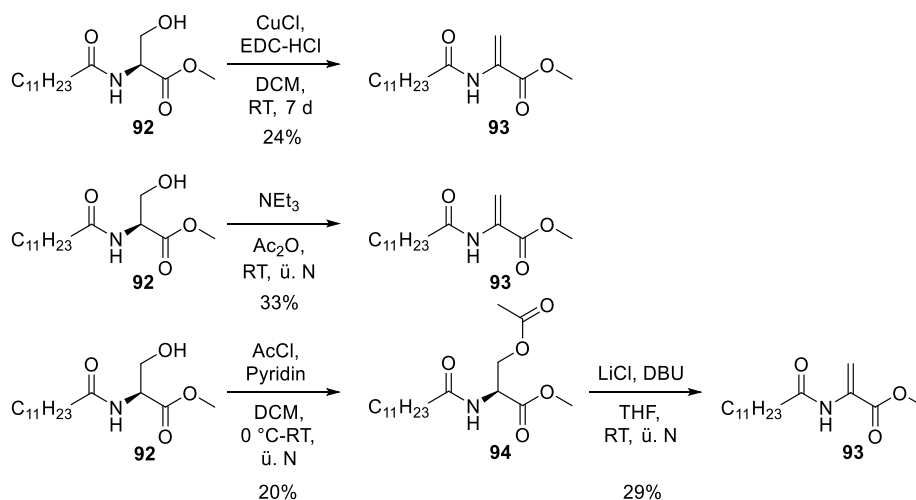
Ausgehend von dem Thiophenol-Derivat **57a** konnte der CoA-Ester **57c** synthetisiert werden. In unserer Arbeitsgruppe wurden von Dr. Hülya Aldemir bereits mehrere Bedingungen für die Überführung eines Peptids in ein CoA-Derivat getestet. Ausgehend von ihren Ergebnissen wurde die in Schema 18 gezeigte Synthese gewählt. Der Thioester **57a** wurde in MeOH, THF und Natriumphosphatpuffer (NAPP) gelöst und zu dem Trilithiumsalz von CoA (**18**), gelöst in NAPP gegeben. Nach 2 h wurde das Rohprodukt über semi-präparative HPLC aufgereinigt und das Produkt **56c** in einer zufriedenstellenden Ausbeute von 32% erhalten.



Schema 18. Synthese des CoA-Derivates **57c** ausgehend vom Thioester **57a**; NAPP = Natriumphosphatpuffer.

3.1.2.2 Synthese der Dehydroalanin-Vorstufen **58a,b**

In der von *Magarvey et al.* postulierten Brabantamid-Biosynthese wird die Dehydroalanin-Zwischenstufe **53** durch Eliminierung von Wasser aus dem L-Serin-Baustein gebildet (Kapitel 2.1.1, Schema 11).^[84] Das Substrat **53** wird von der TE-Domäne am Ende der NRPS unter Cyclisierung zu der Vorstufe **54** abgespalten. Im Rahmen dieser Arbeit sollten die Modellsubstrate **58a,b** synthetisiert werden, um mit deren Hilfe diese postulierte enzymatische Reaktivität *in-vitro* zu verifizieren. Erste Vorarbeiten zur Synthese des Dehydroalaninderivates **93** wurden von Frau Sib im Rahmen ihrer Bachelorarbeit in unserer Arbeitsgruppe vorgenommen.^[122] Sie entwickelte mehrere verschiedene Strategien ausgehend von *N*-Lauryl-L-Serinmethylester (**92**) die einen synthetischen Zugang zum gewünschten *N*-Lauryl-Dehydroalaninmethylester (**93**) ermöglichen. Drei der erfolgreichsten Synthesen sind in Schema 19 abgebildet. Aufbauend auf diesen Ergebnissen von Frau Sib wurde zunächst versucht die Eliminierungsreaktionen mit *N*-Lauryl-L-Serin-Prolinmethylester (**76**), *N*-Lauryl-L-Serin-L-Prolin (**68**) sowie den Thioestern **57a, b** durchzuführen.



Schema 19. Ausgewählte Reaktionen zu dem Dehydroalaninderivat **92**, die von Frau Sib im Rahmen ihrer Bachelorarbeit durchgeführt wurden; d = Tage, Ac₂O = Essigsäureanhydrid, AcCl = Acetylchlorid, DBU = 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en.

Neben den Synthesestrategien aus Schema 19 wurden weitere Reaktionsbedingungen getestet (Tabelle 4). Die Reaktionsbedingungen zur Synthese ausgehend vom Edukt **92**, die sich bei Frau Sibs Studien am Besten erwiesen, ergaben für das Dipeptid **76** kein Eliminierungsprodukt (Eintrag 1-3). Bei den vermeintlich erfolgreichen Reaktionen (Eintrag 4, 5, 7 und 10) wurde kein aussagekräftiges ¹H-NMR-Spektrum erhalten. Hinweise für die Bildung

Arbeiten zur Aufklärung der Brabantamid-Biosynthese

der gewünschten Eliminierungsprodukte **58a**, **94** und **95** ergaben sich ausschließlich in der massenspektrometrischen Analyse der Reaktionslösung.

Tabelle 4. Getestete Eliminierungsreaktionen mit verschiedenen Edukten **57a,b**, **69** und **76**.



	Edukt	Reagenzien	Lösungsmittel	Reaktionsbedingungen	Produktbildung
1	76	EDC-HCl, CuCl	DCM	RT, 1 Woche	-
2	76	NEt ₃ ,	Ac ₂ O	RT, ü.N	-
3	76	AcCl, Pyridin	DCM	0 °C-RT, ü.N	-
4	69	MeSOCl ₂ , NEt ₃	DCM	0 °C-RT, 1 h	95*
5	76	EDC-HCl, CuCl	ACN	40 °C, 24 h	96*
6	76	MeSOCl ₂ , NEt ₃	DCM	0 °C-RT, 1 h	-
7	57a	MeSOCl ₂ , NEt ₃	DCM	0 °C-RT, 1 h	58a*
8	57b	MeSOCl ₂ , NEt ₃	DCM	0 °C-RT, 1 h	-
9	57a	EDC-HCl, CuCl	ACN	40 °C, 24 h	-
10	76	PPh ₃ , DIAD	THF	0°C-RT, ü.N	96*
11	57a	PPh ₃ , DIAD	THF	0°C-RT, ü.N	-

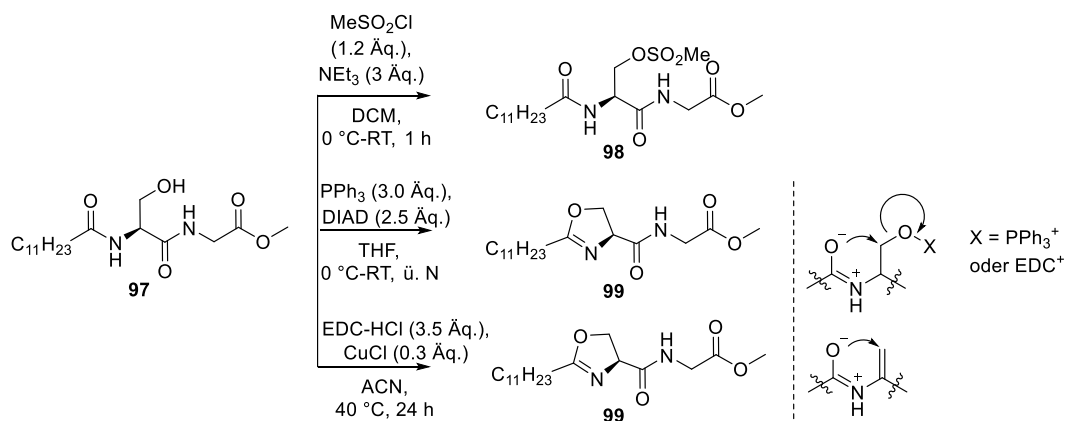
* nur massenspektrometrisch nachgewiesen

Da die Darstellung des Dehydroalanin-Derivats aus *N*-Acyl-Serin in den Vorarbeiten von Frau Sib möglich war, dies mit Prolin-haltigen Dipeptiden jedoch nicht gelang, sollte der Einfluss des Prolins auf die Reaktion getestet werden. Daher wurde zur Vereinfachung des Dipeptids das Derivat **97** hergestellt, in dem L-Prolin durch Glycin ersetzt wurde. Es wurden drei verschiedene Reaktionsbedingungen getestet (Schema 20). Bei der ersten Reaktion wurde das Edukt **97** mit Methansulfonylchlorid und Triethylamin umgesetzt.^[123] Nach Aktivierung der Hydroxygruppe unter basischen Bedingungen mit Methansulfonylchlorid, wurde mittels

Arbeiten zur Aufklärung der Brabantamid-Biosynthese

baseninduzierter Eliminierung versucht das Dehydroderivat zu erhalten. Trotz der sehr guten Abgangsgruppe wurde jedoch unter den getesteten Bedingungen nur das Additionsaddukt **98** gebildet.

Ein weiterer Versuch wurde durch Verwendung von Triphenylphosphan und Azodicarbonsäure-diisopropylester (DIAD, engl. Diisopropyl-Azodicarboxylate) in einer *Mitsunobu*-Reaktion durchgeführt.^[124] Nach der Aufreinigung mittels Säulenchromatographie an Kieselgel wurde das Cyclisierungsprodukt **99** isoliert (Schema 20). Nach der Bildung des Phosphonats kam es hier folglich nicht zur Eliminierungsreaktion, sondern zum intramolekularen, nukleophilen Angriff des Amid-Sauerstoffes an dem β -Kohlenstoff des Serins in **97**, wobei der Heterocyclus **99** in 53% gebildet wurde. Die Nukleophilie des Sauerstoffs wird durch die mesomere Grenzformel der Amid-Bindung erhöht, wodurch die nukleophile Substitution favorisiert wird. Es ist nicht sicher, ob die Eliminierungsreaktion zuerst erfolgt und anschließend der nukleophile Angriff stattfindet, oder ob ein konzertierter Mechanismus der nukleophilen Substitution vorliegt. Dass es sich um eine zweistufige Reaktionssequenz handeln könnte, wird durch die massenspektrometrischen Untersuchungen gestützt, da die Masse des Dehydroalaninproduktes intermediär nachgewiesen konnte.



Schema 20. Unterschiedliche Reaktionsbedingungen für die Eliminierung von Wasser im Serin-Baustein vom Derivat **97**; MeSO₂Cl = Methansulfonylchlorid, PPh₃ = Triphenylphosphan, DIAD = Azodicarbonsäure-diisopropylester.

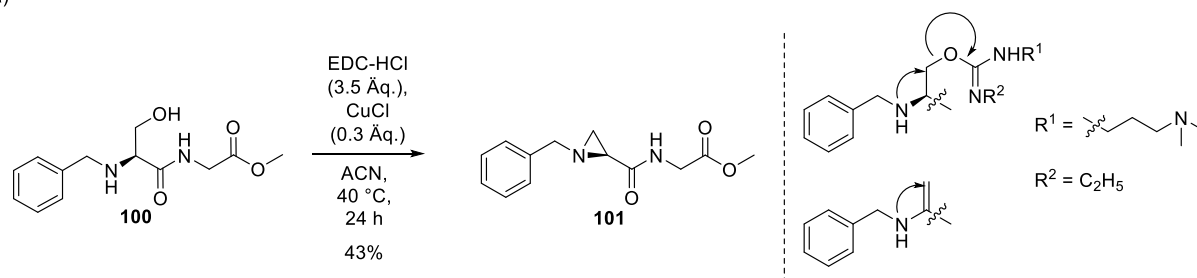
Das selbe Produkt **99** wurde mit einer Ausbeute von 68% auch bei der Verwendung von CuCl und EDC-HCl erhalten.^[125] Auch hier wird wahrscheinlich zunächst die Hydroxyfunktion des Serins durch Ausbildung eines Isoharnstoffes mit dem Carbodiimid gebildet, der entweder eliminiert oder durch nukleophile Substitution abgespalten wird. Da mittels

Arbeiten zur Aufklärung der Brabantamid-Biosynthese

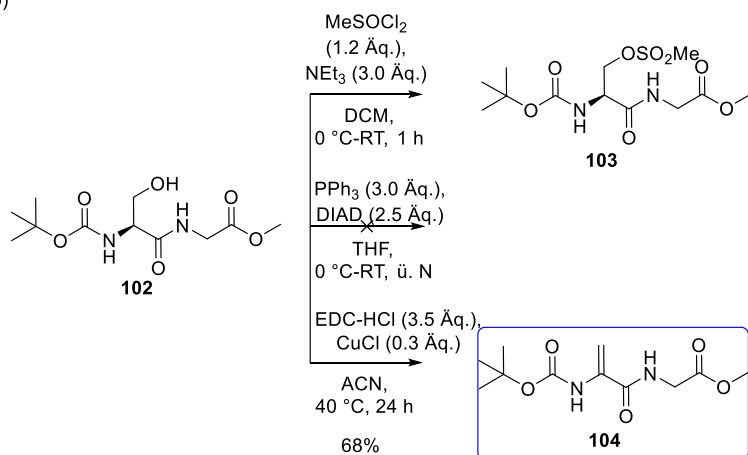
massenspektrometrischen Untersuchungen das Eliminierungsprodukt nachgewiesen wurde, wird hier ebenso von einer zweistufigen Reaktion ausgegangen.

Im Folgenden wurde die Acyl-Gruppe durch eine Schutzgruppe substituiert, um die Bildung einer nukleophilen Zwischenstufe und somit eine Cyclisierung zu vermeiden. Zunächst wurde das *N*-Benzyl-geschützte Dipeptid **100** mit CuCl und EDC-HCl umgesetzt (Schema 21a). Dabei zeigte sich, dass die Benzylgruppe die Nukleophilie des Stickstoffs erhöht, so dass dieser nukleophil am β -Kohlenstoff des Serins unter Ausbildung eines Aziridin-Rings angreift. Das Cyclisierungsprodukt **101** entstand mit einer Ausbeute von 43%. Ob diese Reaktion einstufig in einer S_N2-artigen oder zweistufig in einer S_N1-artigen Reaktion abläuft, wurde nicht aufgeklärt.

a)



b)



Schema 21. Umsetzung des a) Benzyl- **100** und b) Boc-geschützten Edukts **102** unter verschiedenen Reaktionsbedingungen.

Ein weiterer Ansatz stellte die Substitution der Acyl-Gruppe durch eine *tert*-Butyloxycarbonyl (Boc)-Schutzgruppe dar. Im Gegensatz zu der Benzyl-Schutzgruppe hat die Boc-Gruppe keine ausgeprägten elektronenschiebenden Eigenschaften, die die Bildung des Aziridin-Rings einleiten. Mit dem Boc-geschützten Edukt **102** wurden drei verschiedene Bedingungen getestet (Schema 21b). Bei der Verwendung von Methansulfonsäurechlorid und Triethylamin

wurde, analog der Reaktion mit dem acylierten Serin **97**, lediglich das Additionsprodukt **103** erhalten. Bei der Verwendung von Triphenylphosphphan und DIAD in einer *Mitsunobu*-Reaktion konnte lediglich das Edukt **102** reisoliert werden. Die Verwendung von CuCl und EDC-HCl hingegen führte zum gewünschten Dehydroalanin-Produkt **102** mit einer Ausbeute von 68%.

Diese Ergebnisse zeigten, dass für die Synthese von **58a,b** der *N*-Terminus des L-Serins zunächst bis zur Eliminierungsreaktion mit der Boc-Gruppe geschützt werden muss. Im Anschluss muss das Amin sauer entschützt und mit der Laurylsäure **72** acyliert werden. Im letzten Schritt zur Synthese der Thioester **58a,b** muss die SNAc-, beziehungsweise die Thiophenol-Gruppe, unter Standardbedingungen eingeführt werden. Allerdings wurde in der Literatur bereits die Instabilität des Dehydroalanins diskutiert.^[126] Bei längerer Lagerung der Aminosäure wurde eine mit Licht-induzierte Homopolymerisation beschrieben. Da zu erwarten war, dass sich die Doppelbindung unter den Reaktionsbedingungen der Entschützung oder Veresterung durch Homopolymerisation oder nukleophilen Angriff zersetzt, wurde die Synthese nicht weiter verfolgt.

Stattdessen wurde sich auf die Synthese der bicyclischen Zwischenstufe **59** konzentriert, die laut *Magarvey et al.* das Edukt für die *Baeyer-Villiger* Monooxygenase darstellt.^[81]

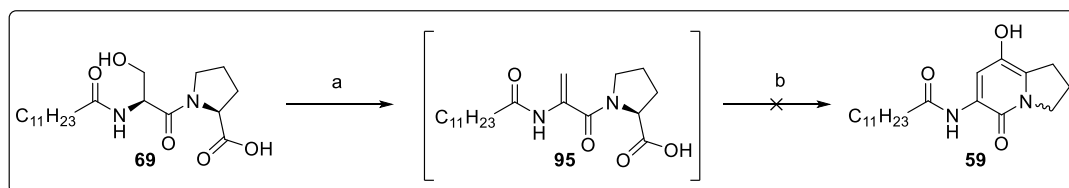
3.1.2.3 Synthese des Bicyclus **59**

Da es wie in Kapitel 3.1.2.2 beschrieben nicht möglich war, die Dehydroalanine **95**, **96** und **58a,b** durch Eliminierungsreaktionen zu synthetisieren, wurde versucht, diese *in situ* herzustellen und direkt zu dem Bicyclus **59** zu cyclisieren. Ausgehend von der Säure **69** wurden verschiedene Kombinationen zur Etablierung einer Reaktionskaskadete zum Bicyclus **59** getestet (Tabelle 5).

Zunächst wurden die Äquivalente an Methansulfonylchlorid verdoppelt, um eine vollständige Aktivierung der Hydroxyfunktion und der Carboxylgruppe zu erreichen. Durch die zweifache Zugabe der Reagenzien sollte die Cyclisierungsreaktion favorisiert werden. Das Eliminierungsprodukt **95** sowie der Bicyclus **59** wurden jedoch nicht gebildet. Daher sollte eine Temperaturerhöhung auf 40 °C die Cyclisierung einleiten. Auch hier blieb die Bildung des gewünschten Produkts jedoch aus.

Arbeiten zur Aufklärung der Brabantamid-Biosynthese

Tabelle 5. Reaktionsbedingungen für die direkte Cyclisierungsreaktion zu **59**.

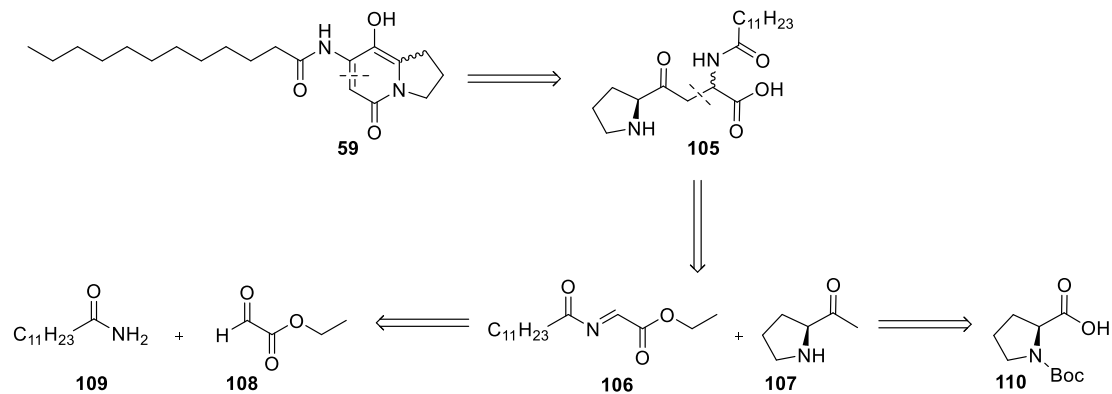


	Reaktionsbedingungen a	Reaktionsbedingungen b
1	MeSO ₂ Cl (1.2 Äq.), NEt ₃ (3.0 Äq.) 0 °C-RT, 1 h	MeSO ₂ Cl (1.2 Äq.), NEt ₃ (3.0 Äq.) 0 °C-RT, ü. N
2	MeSO ₂ Cl (1.2 Äq.), NEt ₃ (3.0 Äq.) 0 °C-RT, 1 h	MeSO ₂ Cl (1.2 Äq.), NEt ₃ (3.0 Äq.) RT-40 °C, 3 h
3	EDC-HCl (4.0 Äq.), CuCl (2.0 Äq.) 40 °C, 16 h	-

Die Verwendung von EDC-HCl und CuCl schien die bessere Wahl zu sein, da davon ausgegangen wurde, dass das Carbodiimid nicht nur die Bildung des Dehydroalanin-Derivates **95** einleitet, sondern ebenfalls die Säuregruppe des Prolins aktivieren könnte. Daher wurden analog zur Reaktion mit Methansulfonsäurechlorid und Triethylamin die Reagenzien in erhöhter Menge eingesetzt. Nachdem für 16 h bei 40 °C gerührt wurde, konnte auch hier keine Bildung des Bicyclus **59** nachgewiesen werden. Zur besseren Aktivierung der Säuregruppe des Prolins sollten *N*-Hydroxysuccinimid (*N*-HSI) und Pentafluorphenol (PFP) als Aktivierungsreagenzien eingesetzt werden. Die Aktivester wie beispielsweise das *N*-HSI-Addukt sollten isoliert werden. Daraufhin sollte in einem zweiten Schritt die Eliminierungsreaktion eingeleitet werden und das Dehydroalaninprodukt **95** durch das Vorhandensein des Aktivesters spontan zum Bicyclus **58** cyclisieren. Es wurden mehrere Reaktionsbedingungen für die Aktivierung der Säure **69** mit *N*-HSI getestet. Als Kupplungsreagenzien wurden DCC^[127-129] EDC-HCl mit HOBT und DMAP sowie HATU mit NMM verwendet. Keiner der durchgeführten Reaktionen führte zum gewünschten Aktivester. Daher wurde ebenfalls versucht PFP an die Säure **69** zu kuppeln, da sich die Aktivierung eines Peptids mit diesem Reagenz bereits in der Arbeitsgruppe als erfolgreich erwies.^[130] Bei dieser Reaktion mit EDC-HCl und HOBT als Kupplungsreagenzien wurde nur das Edukt **69** reisoliert. Alternativ sollte die Aktivierung *in-situ* durchgeführt werden. Nach Aktivierung der Säuregruppe **69** mit PFP wurde die Cyclisierung mittels EDC-HCl und CuCl eingeleitet. Jedoch führte diese Eintopfreaktion ebenfalls nicht zum Bicyclus **58**.

Arbeiten zur Aufklärung der Brabantamid-Biosynthese

Da es nicht möglich war, über das Dehydroalaninderivat **95**, beziehungsweise über die Säure **69**, den Bicyclus **58** zu generieren, wurde eine neue Synthese entwickelt, die zu dem gewünschten Produkt **58** führen sollte (Schema 22).



Schema 22. Retrosynthese zum Bicyclus **59**.

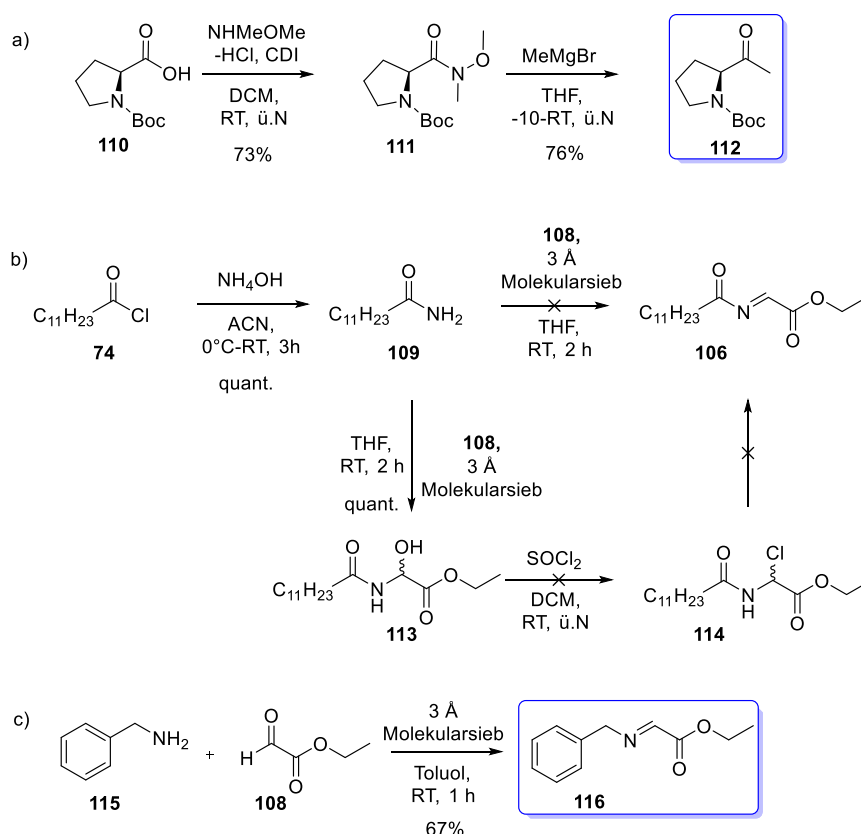
Der Schlüsselschritt der Synthese ist eine *Mannich*-Reaktion zwischen dem Imin **106** und dem Keton **107**. Das Pyrrolidin-Keton **107** wurde ausgehend von kommerziell erhältlichem Boc-L-Prolin (**110**) in einer zweistufigen Synthese hergestellt. Zunächst wurde das Weinreb-Amid **111** mit Isobutylchloroformat und NEt_3 in DCM hergestellt und nach säulenchromatographischer Aufreinigung in einer Ausbeute von 28% erhalten.^[131] Da diese Ausbeute nicht zufriedenstellend war, wurde eine Alternativsynthese gesucht.

Es wurde eine Synthese nach *Kong et al.* durchgeführt, die 1,1'-Carbodiimidazol (CDI) als Kupplungsreagenz verwendeten (Schema 23a).^[132] Bei Raumtemperatur wurde die Säure **110** als Isoharnstoff aktiviert. Nach Beendigung der Gasentwicklung, wurde *N,O*-Dimethylhydroxylamin-Hydrochlorid (NHMeOMe-HCl) zugegeben. Mittels säulenchromatographischer Aufreinigung an Kieselgel, wurde das Weinreb-Amid **111** in 73% Ausbeute erhalten. In der zweiten Stufe wurde eine *Grignard*-Reaktion mit Methylmagnesiumbromid (MeMgBr) durchgeführt.^[131] Nach säulenchromatographischer Aufreinigung an Kieselgel wurde das Keton **112** mit einer guten Ausbeute von 76% erhalten. Alternativ wurde das Produkt **112** durch die Reaktion des Edukts **111** mit Methylmagnesiumbromid in Et_2O durchgeführt.^[132] Nachdem die Reaktion für eine Stunde rührte, wurde die Reaktion aufgereinigt und das Keton **112** säulenchromatographisch an Kieselgel aufgereinigt. Das Pyrrolidin-Derivat **112** wurde unter diesen Reaktionsbedingungen

Arbeiten zur Aufklärung der Brabantamid-Biosynthese

in einer geringen Ausbeute von 46% erhalten. Die Synthese des Ketons **112** erwies sich somit in THF als effizienter und wurde daher fortan verwendet.

Zur Herstellung des Imins **106** wurde zunächst Laurylsäurechlorid (**74**) mit Ammoniumhydroxid umgesetzt um das Amid **109** in quantitativer Ausbeute zu erhalten (Schema 23b).^[133]



Schema 23. Synthese der Vorstufen für die Synthese des Bicyclus **59**; NHMeOMe-HCl = *N,O*-Dimethylhydroxylamin-Hydrochlorid.

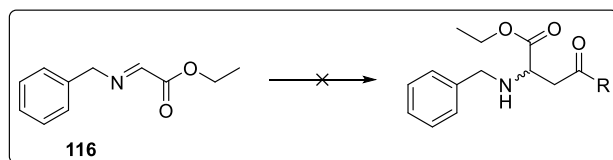
Glyoxal säureethylester (**108**) wurde in THF gelöst, Molekularsieb (3 Å) und das Amid **109** wurden zugegeben. Das Imin **106** wurde nicht gebildet, stattdessen wurde das Aminoal **113** erhalten. Um zu dem Imin **106** zu gelangen, sollte die Hydroxygruppe des Aminoal **113** mit SOCl_2 durch ein Chloratom substituiert werden. Eine Eliminierungsreaktion aus dem Chlorid **114** zum Imin **106** wäre leichter durchführbar als die aus dem Hydroxid **113**, da Chlorid eine bessere Abgangsgruppe ist. Die Chlorierung des Aminoal **113** war jedoch ebenso erfolglos, wie der Versuch das Aminoal **113** zu dehydrieren. Möglicherweise wurde das Imin **106** während der Reaktion gebildet, reagierte jedoch bei der Aufarbeitung aufgrund seiner hohen Reaktivität wieder in die Additionsprodukte **113** und **114** zurück. Um die Reaktivität des Imins **106** zu

Arbeiten zur Aufklärung der Brabantamid-Biosynthese

verringern wurde alternativ die Fettsäurekette durch die elektronenreiche Benzylgruppe substituiert (Schema 23c). Das Benzylimin **116** wurde mit einer Ausbeute von 67% ausgehend von den kommerziell erhältlichen Edukten Glyoxalsäureethylester (**108**) und Benzylamin (**116**) hergestellt.^[134]

Die *Mannich*-Reaktion zwischen dem Benzylimin **116** und dem Keton **112** ist die Schlüsselreaktion dieser Reaktionssequenz. Zur Evaluierung der optimalen Reaktionsbedingungen für die *Mannich*-Reaktion wurden zunächst käuflich erhältliche, sterisch nicht anspruchsvolle Ketone anstatt des Pyrrolidin-Derivates **112** als Edukte verwendet (Tabelle 6). 2,4-Dihydroxyacetophenon, Butanon und Aceton wurden mit L-Prolin (**71**) und dem Imin **116** in EtOH umgesetzt.^[134] Die Aminosäure (**71**) sollte nicht nur als Base, sondern auch als Katalysator für die enantioselektive *Mannich*-Reaktion wirken. Da die Stereoselektivität bei dieser Reaktion unerheblich war wurde KHMDS als Base ebenfalls eingesetzt. Keine der eingesetzten Basen konnte eine Reaktion zwischen den Edukten einleiten. Das Keton **112** sowie die Zerfallsprodukte des Imins **116** wurden bei jeder getesteten Reaktion zurückgewonnen.

Tabelle 6. Reaktionsbedingungen für die *Mannich*-Reaktion.



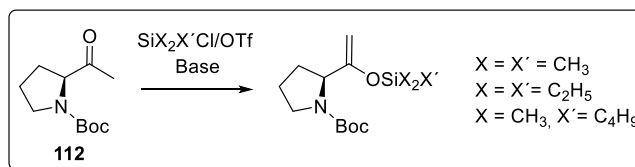
	Edukt	Reagenzien	Lösungsmittel
1	2,4-Dihydroxyacetophenon	L-Prolin	EtOH
2	Butanon	L-Prolin	EtOH
3	Aceton	L-Prolin	EtOH
4	Aceton	KHMDS	EtOH
5	112	Piperidin	EtOH
6	112	Piperidin	DMF
7	112	Piperidin	DCM
8	112	L-Prolin	DCM

Arbeiten zur Aufklärung der Brabantamid-Biosynthese

Obwohl die vereinfachten Reaktionen zu keinem *Mannich*-Produkt führten, wurden mehrere Reaktionsbedingungen unter Verwendung des Ketons **112** getestet (Tabelle 6). Neben L-Prolin (**70**) wurde auch Piperidin als Base eingesetzt, sowie verschiedene Lösungsmittel. Eine erfolgreiche Reaktion zu dem Produkt blieb jedoch aus. Es wurde angenommen, dass die Nukleophilie des Ketons gesteigert werden müsste, um die *Mannich*-Reaktion einleiten zu können. In Analogie zu *Mukalyama*-Aldolreaktionen^[135] sollte daher zunächst das Keton **112** in einen Silylenolether überführt werden.

In Tabelle 7 sind die Silicium-haltigen-Ausgangsverbindungen, die verwendeten Basen und Lösungsmittel der Reaktionen zur Herstellung des Silylenolethers aufgelistet. Die Synthese eines Trimethylsilylenolethers konnte nicht erfolgreich durchgeführt werden; es wurde lediglich das Edukt reisoliert. Der *tert*-Butyldimethylsilylenolether wurde mit einer Ausbeute von 39% erhalten. Die Verwendung von Triethylsilanchlorid (TESCI) mit Lithiumdiisopropylamid (LDA) in THF ergab das Produkt **117** mit einer Ausbeute von 73% (Eintrag 3, Tabelle 7). Dieser Triethylsilylenolether **117** wurde als neue Ausgangsverbindung in der *Mannich*-Reaktion verwendet.

Tabelle 7. Verwendete Silylausgangsverbindungen zur Herstellung eines Silylenolethers ausgehend vom Keton **112**.



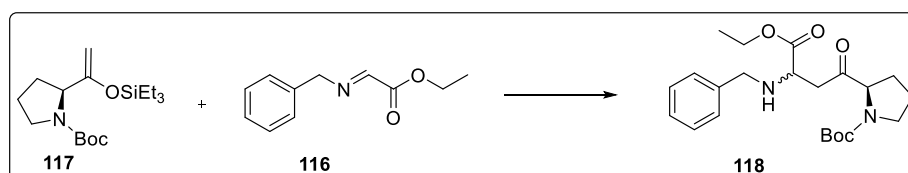
	Silylverbindung	Base	Lösungsmittel	Ausbeute
1	TMSOTf	KHMDS	THF	-
2	TESCI	KHMDS	THF	-
3	TESCI	LDA	THF	73%
4	TBDMSCl	KHMDS	DCM	-
5	TBDMSCl	LDA	THF	-
6	TBDMSOTf	NEt ₃	DCM	39%
7	TBDMSCl	NEt ₃	DCM	-

Analog zu den vorherigen Testreaktionen wurde der Silylenolether **117** mit dem Imin **116** in Gegenwart von Piperidin umgesetzt (Eintrag 1, Tabelle 8). Es wurde keine Produktbildung bei

Arbeiten zur Aufklärung der Brabantamid-Biosynthese

Verwendung dieser nicht-nukleophilen Base beobachtet. Dasselbe Ergebnis wurde erhalten, wenn kein weiterer Zusatz in DMF oder THF zugefügt wurde. Auch eine Aktivierung des Benzylimin **116** mit Pyridinium *p*-Toluolsulfonat (PPTS) führte nicht zum Additionsprodukt **118**. Daraufhin wurde versucht, die Silylschutzgruppe *In-situ* abzuspalten indem Lewis-Säuren, wie TiCl_4 oder AlCl_3 der Reaktion zugesetzt wurden. Die Zugabe von 1.2 Äq. TiCl_4 zu 1.0 Äq. Imin **116** und 1.2 Äq. des Silylenolethers **117** in Toluol (Eintrag 7, Tabelle 8) führte zu dem *Mannich*-Produkt **118**. Nach Aufreinigung mittels Säulenchromatographie an Kieselgel und anschließender semi-präparativer HPLC, wurde das Produkt **118** mit einer Ausbeute von 14% erhalten.

Tabelle 8. Reagenzien und Lösungsmittel für die Reaktion des Imins **116** und des Silylenolether **117** zu dem *Mannich*-Produkt **118**.



	Reagenzien	Lösungsmittel	Reaktionsbedingungen	Ausbeute
1	Piperidin	DMF	RT, 2 h	-
2	-	THF	RT, 2 h	-
3	-	DMF	RT, 2 h	-
4	PPTS	THF	RT, 6h	-
5	TiCl_4	THF	-78 °C-RT, 2.5 h	14%
6	TiCl_4 (10 Mol%)	THF	-78 °C-RT, 2.5 h	-
7	TiCl_4	Toluol	-78 °C-RT, 2.5 h	11%
8	TiCl_4	DCM	-78 °C-RT, 2.5 h	10%
9	TiCl_4	DMF	-78 °C-RT, 2.5 h	-
10	AlCl_3	THF	-40 °C-RT, 4 h	30%*
11	AlCl_3	DCM	-40 °C-RT, 4 h	25%*
12	AlCl_3	Toluol	-40 °C-RT, 4 h	25%*
13	HBF_4	MeOH	-40 °C-RT, 3.5 h	-
14	TsOH	<i>i</i> -Prop	-40 °C-RT, 3.5 h	-

* Rohprodukt

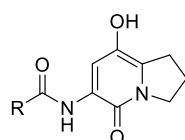
Arbeiten zur Aufklärung der Brabantamid-Biosynthese

Weder der Einsatz katalytischer Mengen verschiedener Lewis-Säuren noch die Verwendung unterschiedlicher Lösungsmittel resultierten in einer verbesserten Ausbeute (Tabelle 8). Der Austausch der Lewis-Säure gegen Brønsted-Säuren, wie beispielsweise Tetrafluorborsäure oder Toluolsulfonsäure (TsOH) führten nicht zur Bildung des Produkts **118**.^[136]

Aufgrund der geringen Ausbeuten des gewünschten *Mannich*-Produkts **118** von maximal 14% wurde nach alternativen Zugängen zum benötigten bicyclischen Substrat, wie **59**, von BraC gesucht. Die Lösung des Problems ergab sich schließlich durch einen biotechnologischen Ansatz.

3.1.2.4 Isolierung des Bicyclus **59**

Bode et al. postulierten 2015 eine Biosynthese von Derivaten der bakteriellen Pyrrolizidin Alkaloide (PA), die Ähnlichkeit zur putativen Brabantamid-Biosynthese aufweist.^{[137],[84]} Das Gencluster dieser Naturstoffe besitzt ebenfalls eine bimodulare NRPS, die L-Serin (**73**) sowie L-Prolin (**71**) aktiviert, sowie eine putativen *Baeyer-Villiger* Monooxygenase. Die Oxidoreduktase scheint für die Oxidation der Vorstufen **119a-c** zu den PAs verantwortlich zu sein. Dieser Bicyclus **119a-c** (Abbildung 16) unterscheidet sich von der Zwischenstufe **55** (Kapitel 2.1.1, Schema 11) der Brabantamid-Biosynthese nur in der Kettenlänge der Fettsäure sowie in der Glykosylierung. *Bode et al.* konstruierten eine Knock-Out-Mutante, die nur das NRPS-Gen der PAs beinhaltet (pCX2_pxa). Durch heterologe Expression dieser Mutante in *E. coli* wurden die Vorstufen **119a-c** erhalten, die sich voneinander nur in der Länge der Fettsäuren unterscheiden. pCX2_pxa wurde unserer Arbeitsgruppe in *E. coli* DH10B::*mtaA* zur Verfügung gestellt. Die heterologe Expression wurde analog zur Literatur^[137] durchgeführt und mittels LC-MS Analyse wurde die Expression der Zwischenprodukte **119a-c** in geringen Mengen beobachtet.



- 119a:** R = C₅H₁₁
119b: R = C₆H₁₃
119c: R = C₇H₁₅
59: R = C₁₁H₂₃

Abbildung 16. Strukturen der isolierten Produkte **119a-c** und **59** durch heterologe Expression von pCX2_pxa in *E. coli* DH10B::*mtaA*.

Arbeiten zur Aufklärung der Brabantamid-Biosynthese

Um die Expressionen zu verbessern und präparativ sinnvolle Mengen der erwünschten Substrate zu erhalten, wurde eine Zellwachstumskurve in Terrific broth (TB)-Medium und Luria Bertani (LB)-Medium aufgenommen, um den besten Zeitpunkt der Induktion und der Zellernte zu bestimmen. Aus dieser Kurve ist ersichtlich, dass die Zellen im TB-Medium bis zu einer höheren OD_{600} (1.0 im Gegensatz zu 0.5 im LB-Medium) anwachsen und sie in beiden Medien über mehrere Tage in der stationären Phase verweilen (Abbildung 17). Mit Hilfe der Wachstumskurve wurde ein neues Protokoll zur heterologen Produktion der Zwischenstufen **119a-c** erstellt. Die Expressionen wurden nun in TB-Medium anstatt in LB-Medium durchgeführt und die Induktion wurde 19 h nach Animpfung der Hauptkultur bei einer OD_{600} von 5.0 vorgenommen. Dem Kulturmedium wurden Amberlite zugefügt, da diese in der Lage sind, die vom Produktionsstamm gebildeten Verbindungen effizient aus dem Medium zu absorbieren und dadurch die Isolierung der Produkte vereinfacht wird. Die Zellen wurden für 24 h bei 28 °C und 200 rpm inkubiert, bevor die Extraktion der Amberlite durchgeführt wurde.

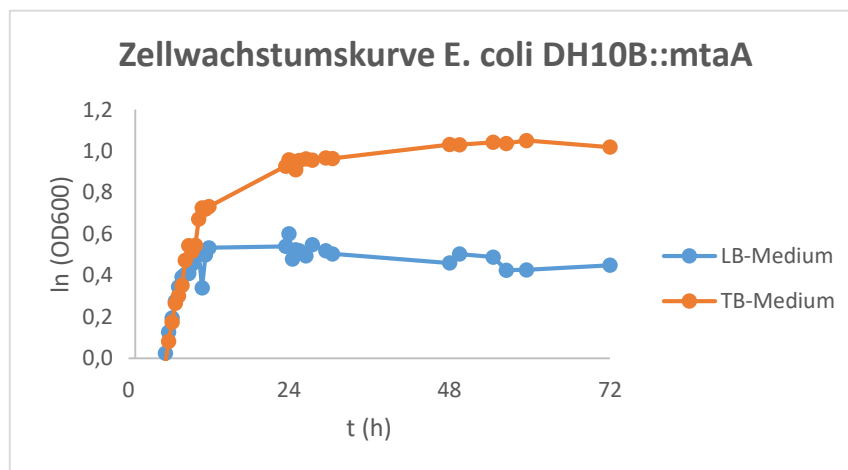


Abbildung 17. Kinetikmessung von *E. coli* DH10B::mtaA in LB- und in TB-Medium.

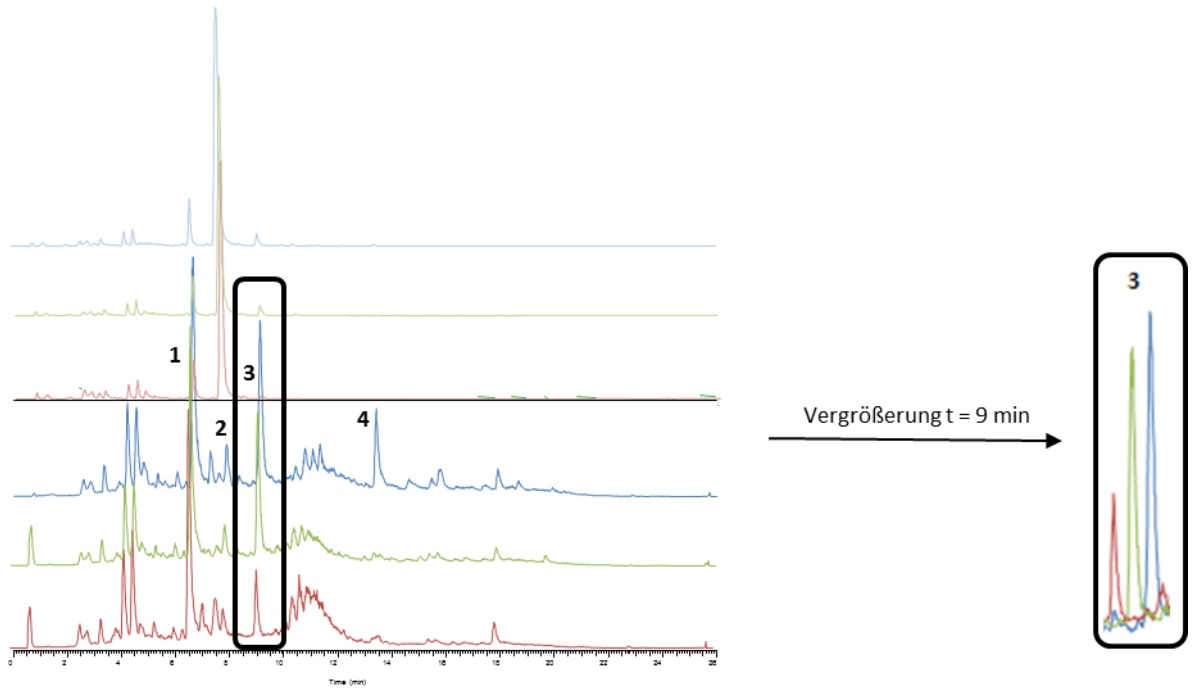
Darüber hinaus wurden zur weiteren Steigerung der Produktionsmenge die Aminosäuren L-Serin (**73**), L-Prolin (**71**) sowie Octansäure oder Laurinsäure (**72**) bei Induktion zugefüttert. Durch den Einbau von Octansäure, würde das Substrat **119c** und durch den Einbau von Laurinsäure (**72**) das Derivat **59** gebildet werden. In Abbildung 18 sind die LC-MS-Ergebnisse der heterologen Expression aus drei 250 mL Hauptkulturen nach dem veränderten Protokoll dargestellt. Die Zufütterung von Octansäure, L-Serin (**73**) und L-Prolin (**71**) resultierte in einer signifikant erhöhten Produktion der Vorstufe **119c** im Vergleich zur Kultur ohne Zufütterung (Abbildung 18, grüne und rote Spur). Die massenspektrometrische Messung bestätigt, dass es

sich bei diesem Signal um den Bicyclus **119c** handelt. Die Expressionen von **119a,b** wurden durch das Zufüttern hingegen nicht beeinträchtigt. Das Zufüttern von Laurinsäure (**72**) resultierte neben der Erhöhung der Titer der Vorstufe **119c** auch in der Produktion einer neuen Substanz mit einer Retentionszeit von $t = 13$ min (Abbildung 18a, blaue Spur). Die Substanzmenge, die nach semi-präparativer HPLC erhalten wurde, war sowohl für massenspektroskopische, als auch NMR-spektroskopische Untersuchungen ausreichend. Diese bestätigten die Vermutung, dass es sich bei der isolierten Substanz um das Laurinsäurederivat **59** handelte.

Obwohl kein synthetischer Zugang zu dem Substrat **59** für die enzymatischen Untersuchungen von BraC realisiert werden konnte, wurde auf diesem Weg der Bicyclus **59** sowie die kurzkettigen Analoga **119a-c** mittels heterologer Expression in ausreichenden Mengen für *in-vitro* Experimente erhalten.

Arbeiten zur Aufklärung der Brabantamid-Biosynthese

a)



b)

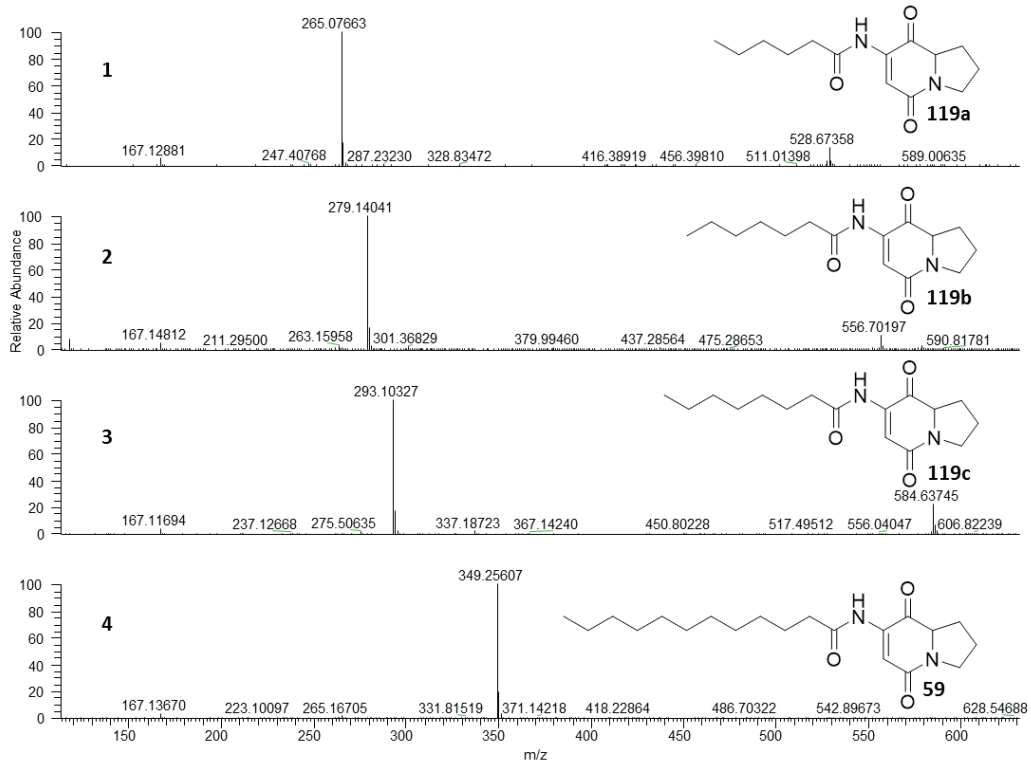


Abbildung 18. a) UV-Chromatogramm (oben) und Massespur (unten) von den Extrakten ohne Fütterung (rot), mit Zugabe von L-Serin (**73**), L-Prolin (**70**) und Octansäure (grün) und mit Zugabe von L-Serin (**73**), L-Prolin (**70**) und Laurinsäure (**72**) (blau) und Vergrößerung der Massespur bei t = 9 min c) Massenspektrogramm von den vier Signalen, die den Bicyclen **119a-c**, sowie **59** entsprechen.

3.1.3 Enzymatische Reaktionen zur Aufklärung der Funktion der TE-Domäne und von BraC in der Brabantamid-Biosynthese

3.1.3.1 Substratstabilitätstests

Die verschiedenen enzymatischen Umsetzungen wurden in wässrigen Puffersystemen durchgeführt. Als problematisch erwies sich die geringe Löslichkeit der Substrate **57a,b** in wässrigen Systemen. Daher wurden die Stabilität der Thioester **57a,b** in verschiedenen Puffersystemen mit unterschiedlichen Cosolventien im Vorfeld getestet. Zunächst wurden die Edukte **57a,b** in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst bevor der ausgewählte Puffer zugegeben wurde. Die Endkonzentration an DMSO in der Pufferlösung betrug zwischen 5-50%.

Tabelle 9. Zusammensetzung der Puffer, die für die Stabilitätstests von dem Thioester **57b** verwendet wurden.

	Puffersubstanz	Konzentration	Pufferzusatz	pH-Wert	Stabilität
1	Tris-HCl	50 mM	-	6.0	nein
2	Tris-HCl	50 mM	-	7.0	ja
3	Tris-HCl	50 mM	-	7.5	ja
4	Tris-HCl	50 mM	-	8.0	nein
5	Tris-HCl	50 mM	-	8.5	nein
6	Tris-HCl	50 mM	-	9.0	nein
7	Tris-HCl	100 mM	-	8.0	nein
8	Kaliumphosphat	100 mM	-	7.0	Ja
9	Kaliumphosphat	100 mM	-	7.6	Nein
10	Kaliumphosphat	100 mM	-	8.0	nein
11	HEPES	25 mM	NaCl (50 mM)	6.0	Ja
12	HEPES	25 mM	NaCl (50 mM)	7.0	Nein
13	HEPES	25 mM	NaCl (50 mM)	7.5	Nein
14	MOPS	25 mM	-	7.0	nein

Für diese Substratstabilitätstests wurden jeweils 1 mg des SNAc-Thioester **57b** in 50-500 µL DMSO gelöst und anschließend mit dem entsprechenden Puffer bis zu 1 mL aufgefüllt (Tabelle

9). Die Stabilität des SNAc-Derivates **57b** wurde nach einer Stunde Inkubation bei 37 °C mittels HPLC überprüft. Ebenso wurde die pH-Abhängigkeit der Substratstabilität in Puffersystemen untersucht (Abbildung 19). Die HPLC-Analysen zeigten, dass das Substrat **57b** im Beobachtungszeitraum von 24 h stabil unter neutralen Bedingungen ist. Im basischen Milieu (pH = 9) wurde eine Zersetzung des Thioesters **57b** beobachtet (Abbildung 19). Im sauren Pufferbereich (pH = 6) fiel nach Substratzugabe ein Feststoff aus, der aufgrund der schlechten Löslichkeit nicht per HPLC analysiert werden konnte.

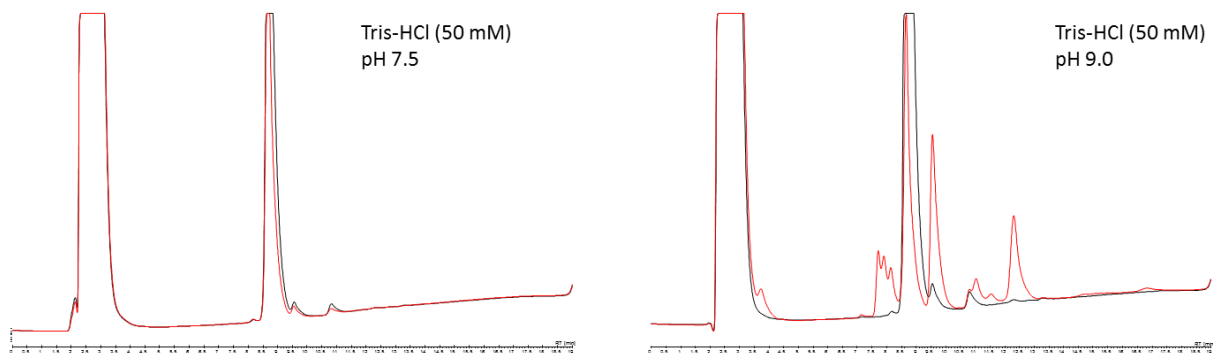


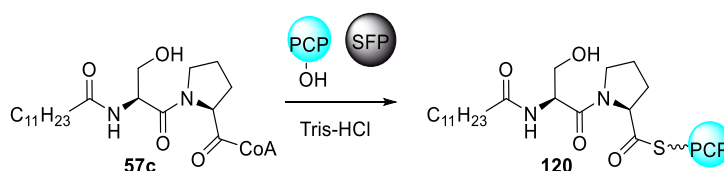
Abbildung 19. Vergleich der HPLC-Chromatogramme nach 1 h (schwarze Spur) und nach 24 h (rote Spur) des Thioesters **57b** in dem Puffer Tris-HCl; Links: pH = 7.5, Rechts: pH = 9.

Zusammenfassend ergaben die Substratstabilitätstest, dass der pH-Wert, sowie die Pufferkomponenten einen erheblichen Einfluss auf die Stabilität des Thioesters **57b** haben. Das Substrat **57b** war bei pH = 7 und pH = 7.5 im Tris-HCl-Puffers stabil (Tabelle 9 Eintrag 2 und 3). Bei einem pH-Wert über 8 wurden nach 24 h mehrere Signale in den Chromatogrammen beobachtet, die auf eine Zersetzung des Thioesters **57b** hindeuten. Auch eine Erhöhung der Konzentration an Tris-Puffer resultierte in der Zersetzung des Substrats **57b**. Bei der Verwendung des Kaliumphosphatpuffers (KPP) wurden ähnliche Ergebnisse erhalten. Bei einem neutralen pH-Wert war der Thioester **57b** über 24 h stabil. Eine Erhöhung des pH-Werts auf über 7.5 resultierte in der Zersetzung des Substrats **57b**. Im HEPES-Puffer war das SNAc-Derivat **57b** nur bei einem pH-Wert von 6 stabil und im MOPS-Puffer wurde bei pH = 7 die Zersetzung des Substrats **57b** beobachtet. Im Allgemeinen ist bekannt, dass Thioester im wässrigen, sauren sowie im wässrigen, basischen Milieu leicht zur Säure hydrolysieren. Diese Hydrolyse konnte auch bei dem SNAc-Derivat **57b** beobachtet werden. Daher sollten die enzymatischen Umsetzungen bei pH-neutralen Bedingungen durchgeführt werden.

Arbeiten zur Aufklärung der Brabantamid-Biosynthese

3.1.3.2 PCP-Beladungsexperimente

Während der Biosynthese von NRPS-Naturstoffen ist das Substrat bis zur Abspaltung vom Multienzymkomplex durch die TE-Domäne an eine PCP-Domäne gebunden (Kapitel 1.1.1). Zur Aufklärung der Funktion der Thioesterase während der Brabantamid-Biosynthese sollte der vereinfachte CoA-Thioester **57c** auf die Bra_PCP2-Domäne übertragen werden.^[138] Die exprimierte *apo*-PCP-Domäne muss vor der Substratbeladung zu ihrer *holo*-Form aktiviert werden (Kapitel 1.1.1, Schema 1). Durch die Verwendung des CoA-Derivates **57c** als Substrat für die Beladung der PCP-Domäne konnte die Aktivierung und die Beladung in einem Schritt mittel SFP-Katalyse durchgeführt werden (Schema 24).



Schema 24. Beladung des CoA-Thioesters **57c** auf die PCP-Domäne; SFP = Phosphopantetheinyltransferase.

Die frisch aufgereinigte, zweite *apo*-PCP-Domäne der NRPS des Brabantamid Genclusters sollte zunächst in einem Tris-HCl-Puffer für ppant-Assays gelöst werden (Kapitel 4.3.2.14, Tabelle 42). Dieser enthält zusätzlich MgCl₂ um die Aktivität der Phosphopantetheinyl-Transferase Sfp zu erhöhen.^[139] Da die PCP-Domäne in diesem Puffer unlöslich war, wurde auf den Standard-Tris-HCl-Puffer zurückgegriffen. Zu der PCP-Domäne wurden Sfp und das CoA-Substrat **57c** gegeben und für zwei Stunden bei 30 °C inkubiert. Da vermutet wurde, dass die Aktivität des Sfps durch das Fehlen von MgCl₂ herabgesetzt ist, wurde die Inkubationszeit um eine Stunde verlängert, um eine vollständige Beladung zu ermöglichen. Überprüft wurde die Beladung der Domäne im Vergleich zu einer Negativkontrolle mittels LC-MS. Es wurden die mehrfach geladenen Ionenpeaks der beladenen und unbeladenen Spezies detektiert, da die molare Masse der einfach geladenen Proteine für eine direkte Detektion mit dem vorhandenen Massenspektrometer zu groß ist (gemessener Massenbereich m/z = 50 - 2000). Die Massenspektren der Umsetzung zeigten die erwarteten Ionenpeaks für das Produkt **120** (Abbildung 20 und Tabelle 10). In der Negativkontrolle sind die erwarteten Massen der unbeladenen PCP-Domäne zu finden. Diese liegt nach der Inkubation bei 30 °C in ihrer *apo*- und *holo*-Form (Abbildung 20a) vor.

Arbeiten zur Aufklärung der Brabantamid-Biosynthese

Tabelle 10. Berechnete Massen m/z der mehrfach geladenen Ionen von BraB_PCP2 und, Bra_PCP2 + ppant und **120**.

	$[M+H]^{7+}$	$[M+H]^{8+}$	$[M+H]^{9+}$	$[M+H]^{10+}$	$[M+H]^{11+}$
m/z apo-Bra_PCP2	1624.37	1421.45	1263.63	1137.36	1034.96
m/z holo-Bra_PCP2	1672.85	1463.87	1301.32	1171.29	1064.91
m/z 120	1725.22	1509.69	1342.06	1207.9	1098.22

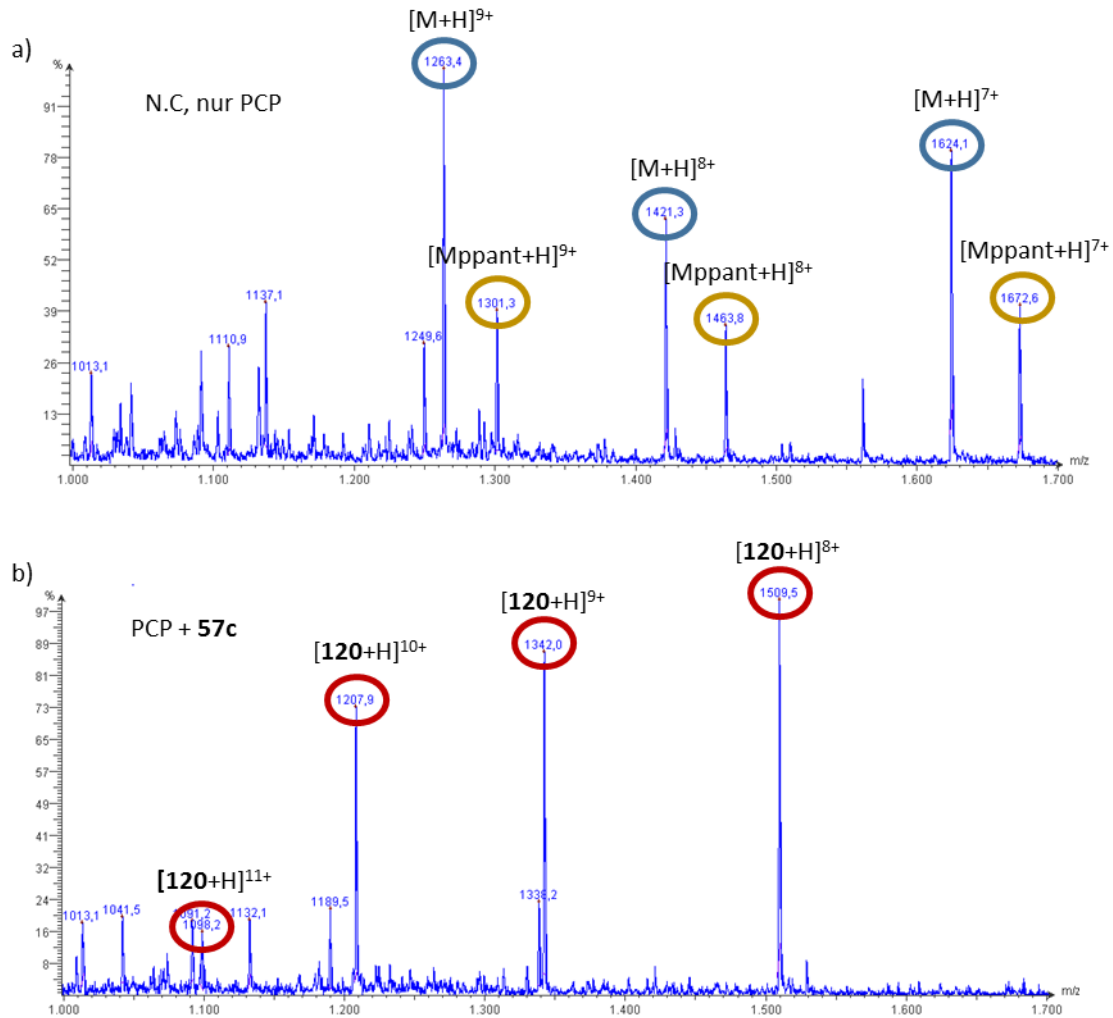


Abbildung 20. Massenspektren von a) Negativ-Kontrolle, Bra_PCP2, $M = 11363.63$ g/mol; b) Beladungsassay mit **57c**, $M = 12069.51$ g/mol. Die detektierten Ionenpeaks entsprechen m/z von mehrfach positiv geladenen Molekülen. Blau umrandet: Massen von apo-Bra_PCP2, Orange umrandet: Massen von holo-Bra_PCP2; Rot umrandet: Massen von **120**.

Arbeiten zur Aufklärung der Brabantamid-Biosynthese

3.1.3.3 Enzymatische Experimente mit den Substraten **57a,b** und **120** sowie der TE- oder der TE-PCP-Didomäne

Zur Untersuchung der Funktion der TE-Domäne und zur Aufklärung der Brabantamid-Biosynthese sollte zunächst die enzymatische Umsetzung durchgeführt werden, die laut der postulierten Biosynthese (Kapitel 2.1.1, Schema 10) durch die TE-Domäne katalysiert wird. Als Edukte für die enzymatischen Umsetzungen dienten zunächst die vereinfachten Thioester **57a,b**.

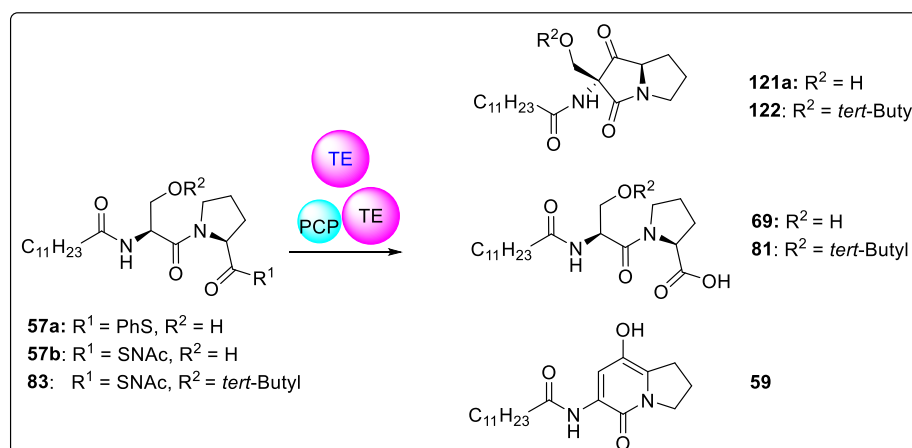
Enzymatische Umsetzungen PCP-gebundener Substrate, beziehungsweise vereinfachter Thioester, mit TE-Domänen wurden bereits intensiv, insbesondere von *Marahiel et al.* untersucht.^[140-143] Unter Berücksichtigung der Ergebnisse der Stabilitätstests des HSNAC-Derivates **57b** (Tabelle 9) wurden die enzymatisch katalysierten Reaktionen in unterschiedlichen Puffern durchgeführt. Aufgrund der erhaltenen Ergebnisse aus dem Stabilitätstest wurde standardmäßig der Tris-HCl-Puffer bei einem pH = 7.5 verwendet. Neben den Thioestern **57a,b** wurde auch der *tert*-Butylester **83** eingesetzt. Außerdem wurde neben der TE-Domäne ebenfalls die TE-PCP-Didomäne als Katalysator für die Reaktionen getestet (Kapitel 4.8.2, Tabelle 69).

In Tabelle 11 sind die Zusammensetzungen ausgewählter Beispiele der enzymatischen Umsetzungen zusammengefasst. Die Assays wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert und mittels HPLC sowie LC-MS analysiert. Überwiegend wurden die Substrate zuvor in DMSO oder in ACN gelöst, da die Thioester **57a,b** schlecht oder unlöslich und bei Lagerung auch instabil in wässrigen Puffern sind (Kapitel 3.1.3.1).

Nach *Hoyer et al.*^[141] wurde zunächst der SNAc **57b** mit der PCP-TE-Didomäne in HEPES-Puffer bei pH = 7.5 umgesetzt (Eintrag 1, Tabelle 11). Mittels HPLC wurde ein neues, breites Signal detektiert, das nicht in der Negativkontrolle vorhanden war (Ergebnisse nicht abgebildet). Weitere Massenanalysen zeigten jedoch, dass es sich bei dem Peak vermutlich um ein Enzym handelt, da kein Massensignal mit den Produkten **59**, **69**, **121** oder dem Edukt **57b** übereinstimmt. Es wurde nochmals versucht, das Substrat **57b** im Tris-HCl-Puffer zu lösen, da organische Lösungsmittel bekannt dafür sind, die Reaktivität von Enzymen herabsetzen zu können (Eintrag 2).^[144-145] Jedoch wurde bei dem Vergleich der Enzymreaktion mit der Negativkontrolle mittels Massenspektrometrie festgestellt, dass das Edukt **57b** nicht ausreichend stabil unter diesen Bedingungen war (Ergebnisse nicht abgebildet).

Arbeiten zur Aufklärung der Brabantamid-Biosynthese

Tabelle 11. Zusammensetzungen der enzymatischen Umsetzungen der Substrate **57a,b** und **83** mit der TE-Domäne oder der TE-PCP-Didomäne.



	Substrat	Substrat gelöst in:	Enzym	Puffer
1 ^[141]	57b , 0.4 mM	DMSO (5%)	TE-PCP, 531 μM	HEPES, pH 7.5, NaCl (50 mM)
2	57b , 1.2 mM	TrisHCl, pH 7.5	TE-PCP, 12 μM	Tris-HCl (50 mM), pH 7.5
3 ^[146]	57b , 52.0 μM	DMSO (5%)	TEPCP, 0.5 μM	MOPS, pH 7.0
4	57b , 1.0 mM	ACN (1 mg/mL)	TE, 2.5 μM	Tris-HCl (50 mM), pH 7.5, NaCl (200 mM), 10 % Glycerol
5	57a , 1.0 mM	ACN (1 mg/mL)	TEPCP, 20 μM	Tris-HCl (50 mM), pH 7.5, NaCl (200 mM), 10 % Glycerol
6	83 , 0.5 μM	DMSO (5%)	TEPCP, 5 μM	Tris-HCl (50 mM), pH 7.5
7	83 , 0.5 mM	DMSO (5%)	TE, 5 μM	Tris-HCl (50 mM), pH 7.5
8	57a , 1.0 mM	ACN (1 mg/mL)	TE, 2.5 μM	Tris-HCl (50 mM), pH 7.5, NaCl (200 mM), 10 % Glycerol
9	57b , 1.0 mM	ACN (1 mg/mL)	TE-PCP, 20 μM	Tris-HCl (50 mM), pH 7.5, NaCl (200 mM), 10 % Glycerol

In Abbildung 21 sind die HPLC-Chromatogramme nach der Umsetzung des Thioesters **57a** (a) und **57b** (b) mit der TE-Domäne sowie der TE-PCP-Didomäne im Tris-HCl-Puffer bei pH = 7.5

Arbeiten zur Aufklärung der Brabantamid-Biosynthese

(Eintrag 4, 5, 8 und 9) exemplarisch dargestellt. Bei der Umsetzung des Thiophenolderivates **57a** ist im Vergleich zur Negativkontrolle deutlich ein neuer, breiter Peak sichtbar. Dieses Signal wurde mittels Massenspektrometrie untersucht, wobei sich herausstellte, dass es sich nicht um eines der erwarteten Produkte handelt. Es waren hauptsächlich die Masse des Edukts **57a** ($[M+H]^+ = 477.7$) sowie kleine Molekülmassen sichtbar, die nicht zuzuordnen waren. Bei der Umsetzung des SNAc-Substrats **57b** (Abbildung 21b) ist ebenfalls ein Auftreten eines sehr breiten Signals kurz vor dem Substratpeak bei einer Retentionszeit von 17.5 min zu erkennen. Dieser entspricht ebenso wie bei der Umsetzung mit dem Thioester **57a**, hauptsächlich der Masse des Edukts. Eine mögliche Erklärung für die Bildung dieses Signals wäre, dass die Substrate **57a,b** teilweise an dem Enzym gebunden sind und sich dadurch die Elutionszeit der Substrate **57a,b** ändern. Die Breite des Signals würde eine solche Theorie auch unterstützen, da viele Enzyme dieser Größe auf einer C18-Säule breit eluieren. Weiterhin ist ein Auftreten eines definierten, neuen Signals mit einer Retentionszeit von 23.9 min im Vergleich zur Negativkontrolle sichtbar. Massenspektrometrische Untersuchungen des Signals zeigten nur Massen größer $m/z = 700$, die nicht einem der Produkte **59, 69, 81, 121, 122** oder dem Edukt **57a** zugeordnet werden konnten. Auch mögliche Di- oder Trimere stimmen nicht mit den detektierten Massen überein. Aufgrund der sehr geringen Produktmengen war eine eingehende Charakterisierung dieser Substanz nicht möglich.

Zusätzlich wurde das geschützte Serinderivat **83** in Tris-HCl-Puffer mit beiden Enzymen umgesetzt (Eintrag 6 und 7). Bei diesen Untersuchungen wurde festgestellt, dass das Edukt **83** unter den getesteten Bedingungen, auch ohne Zugabe eines Enzyms, hydrolysiert, so dass von weiteren enzymatischen Untersuchungen mit diesem Thioester **83** abgesehen wurde.

Bei der Verwendung des CoA-Derivates **57c** als Edukt in den enzymatischen Umsetzungen wurde zunächst die PCP-Domäne mit dem Thioester **57c** beladen (Kapitel 3.1.3.2). Nachdem die Beladung der Bra_PCP2-Domäne durch LC-MS validiert wurde, wurde die TE-Domäne (5 μ M) zum Edukt **120** gegeben und für 3 h, sowie über Nacht bei 30 °C in Tris-HCl-Puffer pH = 7.5 inkubiert. Zur Analyse der Proben wurden die Assays mit EtOAc extrahiert und die organische, sowie die wässrige Phase mittels LC-MS untersucht. In dem Extrakt der organischen Phase wurden in der Probe sowie in der Negativkontrolle nach 3 h und über Nacht zwei Signale gefunden (Ergebnisse nicht gezeigt). Die identifizierten Massen entsprachen nicht den zu erwartenden der möglichen Produkte **59, 69** oder **121**. Weiterhin unterschieden sich

Arbeiten zur Aufklärung der Brabantamid-Biosynthese

die Chromatogramme des Assays nicht von denen der Negativkontrolle. Zudem wurden auch die wässrigen Phasen untersucht. In allen Assays wurde die Masse des hydrolysierten Produkts **69** detektiert. Da sich **69** jedoch auch in vergleichbaren Mengen in der Negativkontrolle fand, wurde davon ausgegangen, dass die Säure **69** ohne Einwirkung der TE von der PCP-Domäne abgespalten wird.

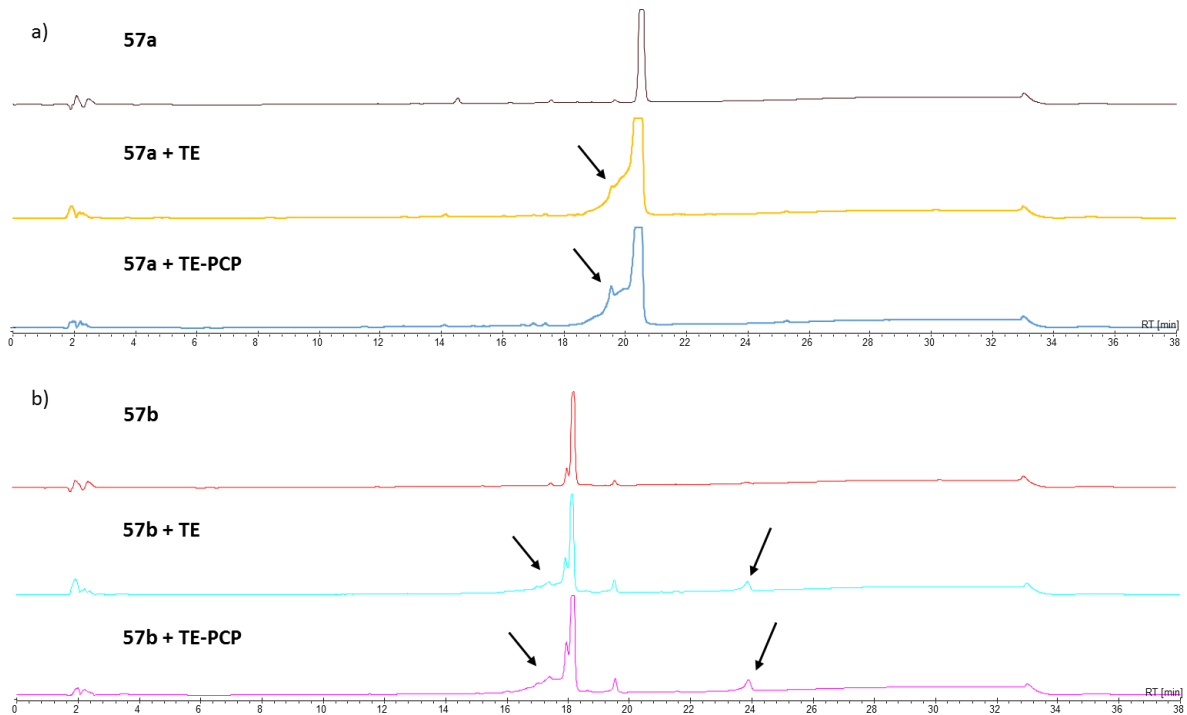


Abbildung 21. HPLC-Chromatogramme der Umsetzung von a) **57a** und b) **57b** mit der mit der TE- und der TE-PCP-Domäne, schwarze Pfeile weisen auf neu entstandene Signale hin.

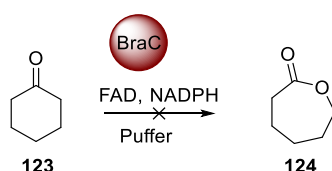
Die durchgeführten enzymatischen Umsetzungen mit den verschiedenen Thioestern **57a-c** konnten die putative katalytische Eigenschaften der TE-Domäne, beziehungsweise der TE-PCP-Domäne nicht aufklären. In den Umsetzungen mit den Edukten **57a,b** wurde mittels LC-MS die Entstehung neuer Signale beobachtet. Es konnte jedoch trotz eines breit angelegten Screenings unterschiedlicher Reaktionsbedingungen keine Bildung eines der erwarteten Produkte oder eines alternativen Reaktionsproduktes im entsprechenden Massenbereich festgestellt werden. Ein Grund dafür, insbesondere bei der Untersuchung des PCP-gebundenen Substrats **120**, könnte die relativ geringe Stabilität der Substrate unter den Assay-Bedingungen sein. Zudem wäre es denkbar, dass die Vereinfachung der Substrate durch Verzicht auf die Zuckereinheit in der Seitenkette von der zu untersuchten TE-Domäne nicht mehr erkannt oder hinreichend effektiv umgesetzt werden kann.

Arbeiten zur Aufklärung der Brabantamid-Biosynthese

3.1.3.4 BraC-Test-Experimente zur Umsetzung von Cyclohexanon (**123**) zu ϵ -Caprolacton (**124**)

Parallel zu den enzymatischen Umsetzungen mit der TE-Domäne, wurde versucht die katalytische Funktion der *Baeyer-Villiger*-Monooxygenase BraC zu bestimmen.

Die Phenylacetone-Monooxygenase (PAMO), sowie die Cyclohexanon-Monooxygenase (CHMO) sind die derzeit am besten charakterisierten *Baeyer-Villiger*-Monooxygenasen.^[38] CHMO ist besonders für die Biotechnologie interessant, da sie Cyclohexanon (**123**) zu ϵ -Caprolacton (**124**) oxidieren kann, und das Lacton **124** ein vielseitiges Edukt in der Polymerindustrie ist beispielsweise zur Herstellung von Nylon.^[147] Die enzymatische *Baeyer-Villiger*-Oxidation wurde von mehreren Arbeitsgruppen, auch mit verschiedenen Monooxygenasen, bereits in einer Eintopf-Reaktion erfolgreich durchgeführt.^[40-148] Daher sollte getestet werden, ob BraC diese Reaktion auch katalysiert (Schema 25).



Schema 25. Versuch der biokatalytischen Umsetzung von Cyclohexanon (**123**) zu ϵ -Caprolacton (**124**).

Es wurden Reaktionen mit dem aufgereinigten Protein sowie mit lebenden Zellen des Überexpressionsstamms von BraC durchgeführt.^[40] Als Erstes wurde *in vitro* die Umsetzung mit dem aufgereinigten Protein getestet. Es wurden Cyclohexanon (**123**) (2.0 mM) in Tris-HCl-Puffer gelöst und NADPH (0.1 mM) als Elektronendonator, BraC (3.0 μ M) sowie FAD (10.0 μ M) zugegeben und bei 25 ° inkubiert. Die Proben wurden mittels LC-MS analysiert. Es zeigte sich, dass keine Umsetzung von Cyclohexanon (**123**) zum Oxidationsprodukt **124** stattfand.

Für die enzymatischen Umsetzungen in lebenden Zellen wurde zum einen eine aktiv wachsende, zum anderen eine ruhende Zellkultur benutzt. Für die Durchführung mit der wachsenden Zellkultur wurde TB-Medium mit einer Vorkultur des heterologen Produzenten von BraC versetzt und 3 h bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Anschließend wurden IPTG-Lösung (10 μ M) und Cyclohexanon (**123**) (2 mM) in ACN zugegeben und weiter inkubiert. Nach zwei, vier, sechs und 24 h wurden Proben entnommen und mittels LC-MS analysiert. Jedoch wurde auch hier nur das Edukt **123** detektiert. Für den zweiten Assay wurde TB-Medium mit einer Vorkultur von BraC versetzt und wie in Kapitel 4.6.1 beschrieben bis zur Pelletierung der Zellen

verfahren. Anschließend wurde das Pellet in einer Lösung aus Tris-HCl-Puffer, Cyclohexanon (**123**) (2 mM), Glukose (20 mM) und 1% Kanamycin resuspendiert und inkubiert. Auch bei diesem Versuch wurde keine Oxidation zum ϵ -Caprolacton (**124**) beobachtet. Daher wurde davon ausgegangen, dass BraC nicht in der Lage ist, die *Baeyer-Villiger*-Oxidation von Cyclohexanon (**123**) zu ϵ -Caprolacton (**124**) zu katalysieren. Obwohl verschiedene *Baeyer-Villiger*-Monooxygenasen, wie beispielsweise die Phenylacetone Monooxygenase (PAMO)^[40], diese biotechnisch interessante Oxidation durchführen können, ist es nicht sonderlich überraschend, dass BraC diese Reaktion nicht katalysieren kann. Das putative Edukt von BraC unterscheidet sich strukturell erheblich von Cyclohexanon im Gegensatz zum Edukt von PAMO, dem Phenylacetone.

3.1.3.5 Enzymatische Reaktionen der Substrate **57a,b** und **120** mit BraC

Nachdem die enzymatischen Umsetzungen mit der TE-Domäne, sowie mit der TE-PCP-Domäne fehlschlugen, sollte getestet werden, ob die Thiester **57a, b** und die geladene PCP-Domäne **120** durch die *Baeyer-Villiger*-Monooxygenase BraC umgesetzt wird.

In der Literatur werden mehrere enzymatische Umsetzungen mit *Baeyer-Villiger*-Monooxygenasen beschrieben.^[149-151] Im Hinblick auf die vorangegangenen Umsetzungen (Kapitel 3.1.3.3) und die Substratstabilitätstests (Kapitel 3.1.3.1) wurden alle Assays in Tris-HCl-Puffer bei pH = 7.5 oder pH = 8.0 durchgeführt. Die enzymatischen Umsetzungen von **57a, b**, gelöst in ACN (Kapitel 4.8.3, Tabelle 70, Eintrag 3 und 4), mit BraC sind beispielsweise in Abbildung 22 aufgeführt. Bei allen anderen getesteten Umsetzungen wurden ähnliche Ergebnisse erhalten. Zu dem jeweiligen Substrat im Puffer wurden BraC (10 μ M), FAD (10 μ M) und NADPH (100 mM) zugegeben und über Nacht inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Proben mittels LC-MS analysiert.

Bei der Umsetzung mit dem Thiophenolester **57a** entstand, analog zu der Umsetzung mit den TE-Domänen, ein breites Signal unmittelbar vor dem Substratsignal bei einer Retentionszeit von 19.5 min. Dieser Peak tritt in der Negativkontrolle nicht auf. Das Massenspektrum dieses Signals zeigte neben den Massen des Edukts, nicht identifizierbare Massenpeaks. Durch die massenspektrometrische Untersuchung konnte die Entstehung der möglichen Produkte **58a** oder **59** ausgeschlossen werden. Das ausschließliche Auftreten dieses Signals in der Assay-

Arbeiten zur Aufklärung der Brabantamid-Biosynthese

Probe läßt darauf schliessen, das es sich dabei wahrscheinlich um das Substrat **57a** handelt. Dieses könnte beispielsweise durch Wechselwirkungen mit den eingesetzten Enzymen früher eluieren.

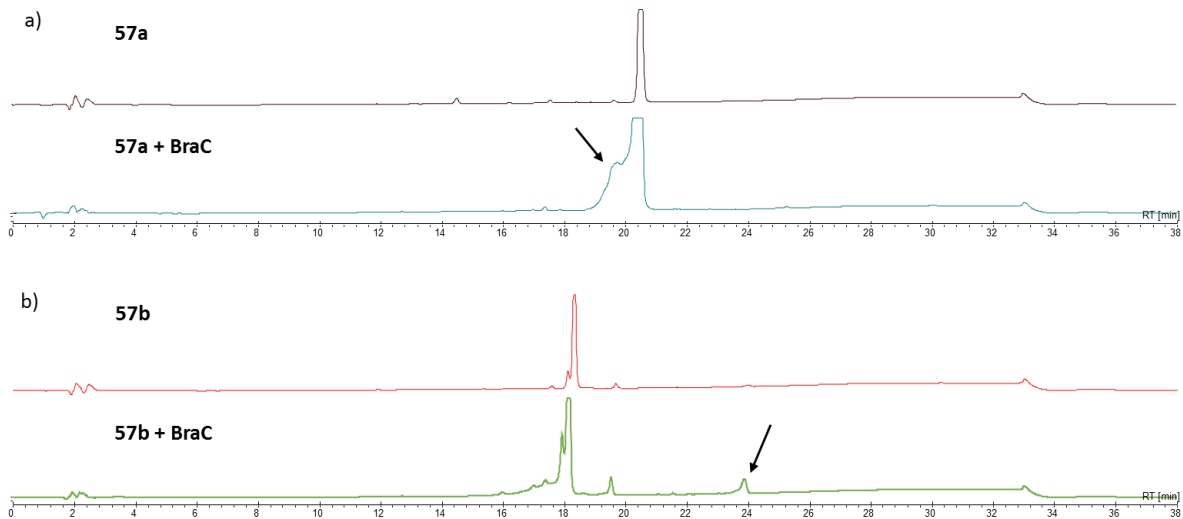


Abbildung 22. HPLC-Chromatogramme der Umsetzungen der Thioester a) **57a** und b) **57b** mit BraC, FAD und NADPH im Tris-HCl-Puffer bei pH = 7.5.; schwarze Pfeile zeigen die neu entstandenen Signale.

Die Umsetzung des SNAc-Edukts **57b** mit der Monoxygenase ergab die selben Ergebnisse wie bei der Verwendung der Thioesterasen (Abbildung 22b). Bei einer Retentionszeit von 23.9 min bildete sich in der Assaylösung ein neues Signal. Dieses konnte durch massenspektroskopische Untersuchungen nicht identifiziert werden, entspricht aber wahrscheinlich auch dem Signal dieser Retentionszeit aus den vorangegangenen Untersuchungen (Kapitel 3.1.3.3, Abbildung **21**). Zudem ist ein breites Signal kurz vor dem Substratpeak bei einer Retentionszeit von 17.5 min zu sehen, welches die Massen des Edukts aufweist und auch bei der Umsetzung mit den Thioesterasen sowie mit dem Edukt **57a** zu erkennen war. Auch hier wäre es möglich, dass der SNAc-Thioester **57b** mit dem Enzym wechselwirkt und sich dadurch die Retentionszeiten verschieben.

Weiterhin wurden Reaktionen durchgeführt in denen die beladene PCP-Domäne **120** als Edukt eingesetzt wurde. Die Reaktion wurde im Tris-HCl-Puffer bei pH = 7.5 bei 30 °C durchgeführt. BraC (100 µM), FAD (100 mM), NADPH (1 mM), GDh (20 µM) und Glukose (1 mM) wurden zum Edukt **120** gegeben und nach 3 h oder nach Inkubation über Nacht mit EtOAc extrahiert und mittels LC-MS analysiert. Da in den organischen Phasen kein Signal auftauchte, wurden auch die wässrigen Phasen analysiert. Es fiel auf, dass sich die UV-Chromatogramme sowie die

Massenspektren in der Assay-Probe und der Negativkontrolle kaum unterschieden. In beiden Proben wurde die Masse des hydrolysierten Substrats **69** identifiziert. Analog zu den Umsetzungen mit der Thioesterase wurde das Edukt ohne enzymatische Einwirkung von der PCP-Domäne hydrolytisch abgespalten. Es wurde kein Massensignal identifiziert, das dem Bicyclus **59** entsprechen würde. Weiterhin konnte eine Eliminierung von Wasser aus dem Substrat **120** festgestellt werden. Es wurde daher ausgeschlossen, dass BraC unter den angewandten Bedingungen in der Lage war, das PCP-geladene Substrat umzusetzen.

Weder die Thioester **57a,b** noch das Substrat **120** konnten von BraC in die postulierten Produkte umgewandelt werden. Möglicherweise konnten trotz intensiver Suche bei den Umsetzungen mit der Monooxygenase keine passenden Reaktionsbedingungen definiert werden, die eine enzymatisch-katalysierte Reaktion ermöglicht hätten. Es besteht ferner analog zu den durchgeführten Assays mit der TE-Domäne die Möglichkeit, dass die Edukte nicht von der Monooxygenase erkannt werden konnten, da das Fehlen des Zuckers an der Fettsäure dies verhindert.

*3.1.3.6 Gekoppelte enzymatische Reaktionen der Substrate **57a,b** und **120** mit BraC und den TE-Domänen*

Alle Versuche, die vereinfachten Vorstufen **57a,b** mit der TE-Domäne, der TE-PCP-Domäne oder der Monooxygenase BraC umzusetzen, ergab keine Produktbildung. Daher wurde versucht beide Enzyme gemeinsam mit den Edukten **57a,b** umzusetzen (Kapitel 4.8.4, Tabelle **71**). Die Reaktionen wurden ebenfalls bei 37 °C und 200 rpm über Nacht inkubiert. Die Ergebnisse dieser Ansätze ähnelten denen der Reaktionen mit den einzelnen Enzymen (Abbildung 23). Es wurden im Vergleich zu Kontrollreaktionen neue Signale in den Ansätzen mit den Enzymen, festgestellt. Die neu entstehenden Peaks entstehen analog zu den vorangegangenen enzymatischen Umsetzungen (Kapitel 3.1.3.3, Abbildung 21 und Kapitel 3.1.3.5, Abbildung **22**). Zum einen entsteht ein breites Signal kurz vor der Elution der Substrate und zum anderen wird bei der Verwendung des SNAc-Edukts **57b** erneut das Signal bei der Retentionszeit von 23.9 min beobachtet. Dementsprechend wurde hier ebenfalls davon ausgegangen, dass keine Umsetzungen der Edukte **57a,b** stattfanden.

Arbeiten zur Aufklärung der Brabantamid-Biosynthese

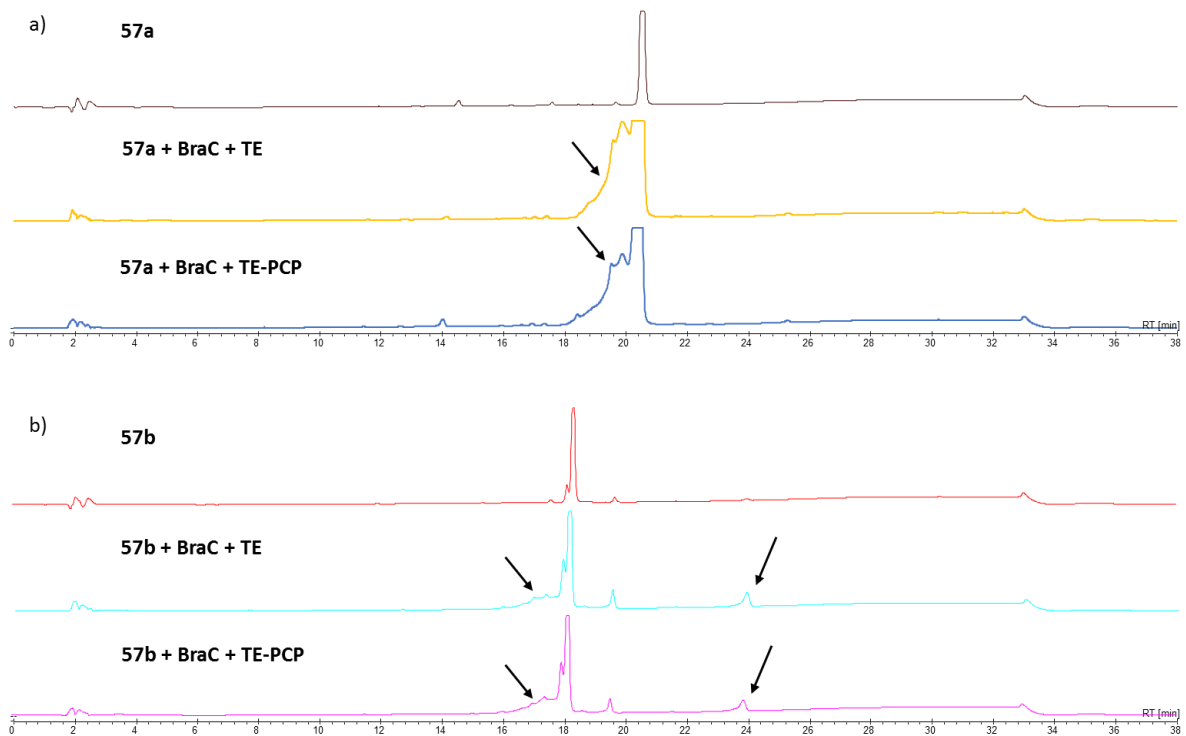


Abbildung 23. HPLC-Chromatogramme der Umsetzung der Thioester a) **57a** und b) **57b** mit der Monooxygenase BraC und der TE- beziehungsweise der TE-PCP-Domäne; schwarze Pfeile zeigen auf die neu entstandenen Signale.

Zum Edukt **120** in Tris-HCl-Puffer (pH = 7.5) wurden die TE-Domäne (5 μ M), BraC (100 μ M), FAD (100 mM), NADPH (1 mM), GDh (20 μ M) und Glukose (1 mM) zugegeben. Nachdem über Nacht bei 30 °C und 800 rpm inkubiert wurde, wurden die Proben mit EtOAc extrahiert und die organische, sowie die wässrige Phase mittels LC-MS analysiert. Während in der extrahierten Probe keine Signale im UV-Chromatogramm sichtbar waren, unterschieden sich die UV-Chromatogramme der wässrigen Phasen der Probe und der Negativkontrolle (Abbildung 24). Durch Massenspektrometrie konnte festgestellt werden, dass die Masse des Hydrolyseprodukts **69** in beiden Proben vorhanden war. Jedoch war das Signal bei der Negativkontrolle wesentlich geringer. Neben der Masse des hydrolysierten Startmaterials **69** konnten jedoch keine weiteren Molekülmassen zugeordnet werden. Lediglich die Detektion der genutzten Enzyme in den Chromatogrammen war möglich. Weder Edukt **120**, noch das erwartete Produkt **59** waren nachzuweisen.

Arbeiten zur Aufklärung der Brabantamid-Biosynthese

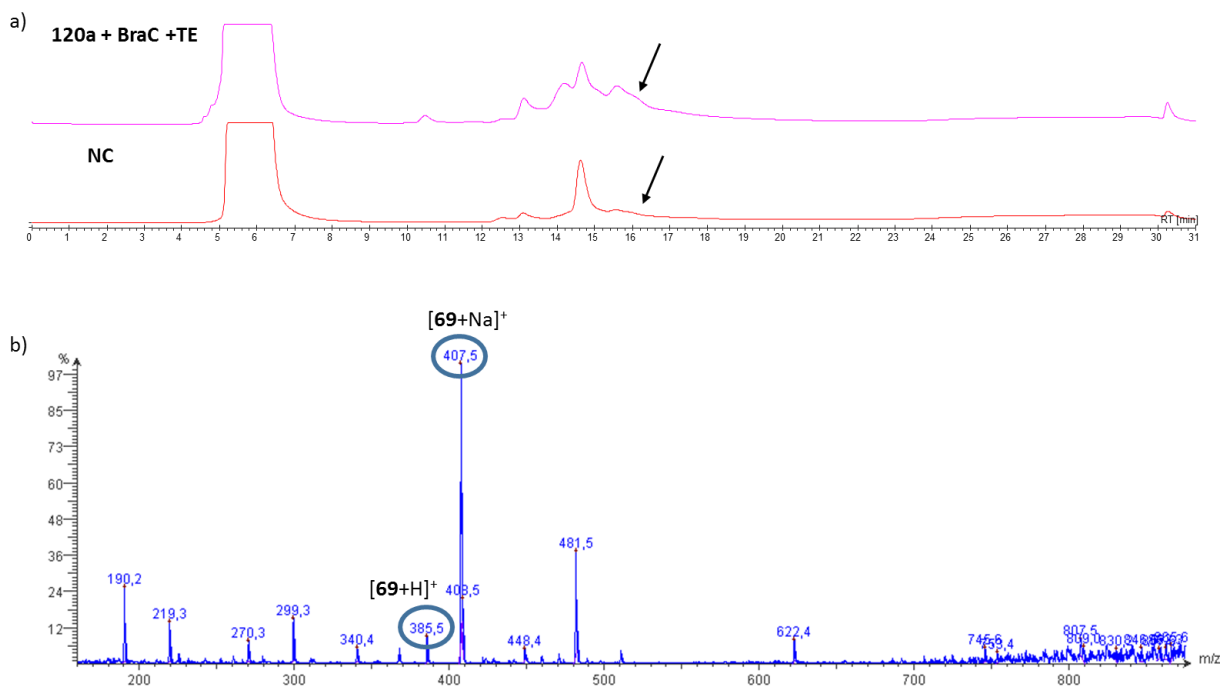


Abbildung 24. a) UV-Chromatogramme der enzymatischen Umsetzung von **120** mit BraC und der TE-Domäne (oben) sowie der Negativkontrolle ohne BraC und TE-Domäne (unten), b) Massenspektrum des Signals, das im UV-Chromatogramm durch den schwarzen Pfeil gekennzeichnet ist; Masse des hydrolysierten Startmaterials **69**: $m/z = 384.5$.

Die von uns postulierte Biosynthese (Kapitel 2.1.1, Schema 10) konnte durch die gezeigten chemo-enzymatischen Assays leider nicht validiert werden. Ebenso konnten die enzymatischen Aktivitäten der eingesetzten Enzyme nicht definiert werden. Es gibt mehrere mögliche Gründe für das Ausbleiben der erwarteten Reaktionen. Aufgrund der geringen Löslichkeit der eingesetzten Substrate in wässriger Lösung mussten diese unter Verwendung eines organischen Lösungsmittels, DMSO oder ACN, gelöst werden. Auch wenn beide Lösungsmittel nur in sehr geringen Konzentration eingesetzt wurden, ist bekannt, dass organische Lösungsmittel die Aktivitäten von Enzymen negativ beeinflussen können.^[144-145] Nicht nur die Aktivität, sondern auch die Stabilität von Monooxygenasen kann in Gegenwart organischer Lösungsmittel verringert werden.^[152] Ebenso ist der pH-Wert bei enzymatischen Umsetzungen von großer Relevanz. *Leisch et al.*^[148] berichteten, dass die Aktivität ihrer untersuchten *Baeyer-Villiger*-Monooxygenase am höchsten ist, wenn der eingesetzte Puffer einen pH-Wert zwischen $\text{pH} = 8$ und $\text{pH} = 9.5$ besitzt. Zu diesem Ergebnis kamen beispielsweise auch die Gruppen von *Rohr*^[153] oder *Huang*^[154] mit den von ihnen untersuchten BVMOs. Die meisten Assays im Rahmen dieser Arbeit mussten jedoch mit einem niedrigeren pH-Wert durchgeführt werden, da Vorversuche zeigten, dass die Thioester **57a,b** im basischen Milieu instabil sind. Weiterhin kann eine fehlende Aktivität bei der Monooxygenase darauf

zurückzuführen sein, dass die prosthetische Gruppe FAD bei der Aufreinigung teilweise ausgewaschen wurde (Kapitel 3.1.1.1). Obwohl FAD in den Assays zugegeben wurde, ist es möglich, dass dieses nicht an der Monooxygenase bindet, was einen Aktivitätsverlust des Enzyms erklären würde. Zudem besteht die Möglichkeit, dass die β -Glykosylierung an der Fettsäurekette unerlässlich für die Erkennung des Substrats durch die Enzymbindungstasche ist. Weiterhin könnten die vereinfachten Substrate **57a,b**, aufgrund des Fehlens eines Carrier-Protein-Tethers nicht als Substrate von den jeweiligen Enzymen erkannt und prozessiert worden sein. Jedoch wurde auch die beladene PCP-Domäne **120** nicht umgesetzt.

Da im Rahmen dieser Arbeit jedoch eine sehr große Anzahl verschiedener Enzymassays durchgeführt (Variation von Substraten und verwendeten Enzymen) und dabei eine Vielzahl unterschiedlichster Reaktionsbedingungen getestet wurden, ist es überraschend, dass niemals auch nur Spuren der erwarteten Produkte nachweisbar waren. Selbst bei nicht optimal gewählten Substratstrukturen oder/und Assaybedingungen wäre die Detektion einer zumindest minimalen Aktivität durch empfindliche MS-Analyse durchaus zu erwarten. Daher liegt die Vermutung nahe, dass die von uns initial postulierte Biosynthese nicht zutrifft. Laut *Magarvey et al.*^[84] würden die verwendeten Thioester **57a,b** beziehungsweise **120** zunächst durch die C-Domäne in das Dehydroalanin-derivat **53** prozessiert werden und erst dieses Eliminierungsprodukt das Substrat für die Abspaltung von der NRPS darstellen (Kapitel 2.1.1, Schema 11). In einem solchen Szenario würden die bislang von uns getesteten Substrate von der TE-Domäne in der Tat nicht umgesetzt werden können. Um diese Hypothese zu prüfen, wurde im Folgenden die chemo-enzymatische Umsetzung von BraC mit dem Bicyclus **59** getestet, das putative Substrat für die *Baeyer-Villiger*-Oxidation.

3.1.3.7 Enzymatische Umsetzung des Bicyclus **59** mit BraC

Durch die heterologe Expression der Mutante pCX2_pxa, die uns von Prof. Bode zur Verfügung gestellt wurde, konnte der Bicyclus mit verschiedenen Fettsäuren erhalten werden (Kapitel 3.1.2.4). *Bode et al.* konnten weiterhin in *in-vivo*-Experimenten feststellen, dass die Coexpression dieser Mutante mit ihrer Monooxygenase PxaB sowie mit BraC in der Produktion der Pyrrolizinenamide endete.^[155] Dementsprechend sollten in der vorliegenden Arbeit *in-vitro*-Reaktionen zwischen den Bicyclen **119c** sowie **59** und BraC untersucht werden.

Arbeiten zur Aufklärung der Brabantamid-Biosynthese

Zunächst wurde die enzymatische Umsetzung mit dem bicyclischen Derivat **119c** durchgeführt. Es wurden zwei verschiedene Cofaktor Systeme, nach *Huang et al.*^[154] und *Gibson et al.*,^[37] eingesetzt (Kapitel 4.8.5). Aufgrund der schlechten Wasserlöslichkeit des Edukts **119c**, wurde dieses in Methanol gelöst, bevor es zur Reaktionslösung zugefügt wurde. Die Reaktionen wurden in Tris-HCl-Puffer bei pH = 8.25 bei 30 °C und 800 rpm über Nacht inkubiert. Die Proben wurden mit EtOAc extrahiert und mittels LC-MS analysiert. Dabei stellte sich heraus, dass das Substrat in beiden Fällen nicht durch die Enzyme umgesetzt wurde, sondern durch nicht-enzymatische Addition von Methanol zu **125** reagierte (Abbildung 25).

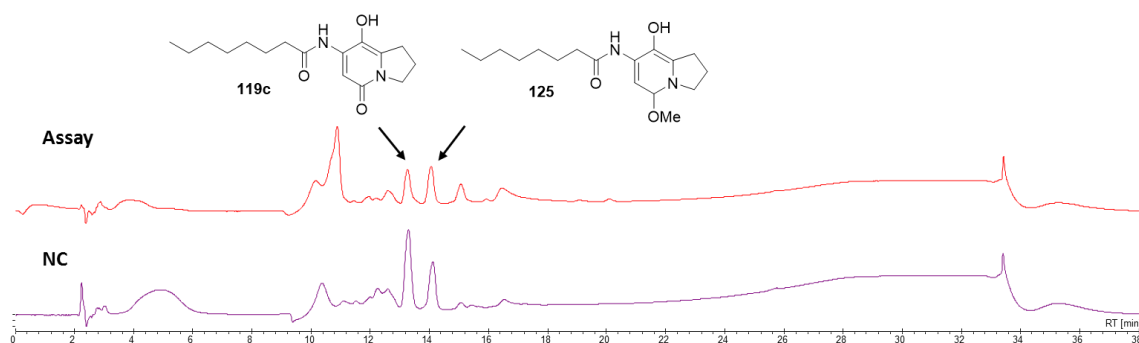


Abbildung 25. UV-Chromatogramm (220 nm) der Umsetzung von **119c** mit BraC nach *Huang et al.*^[154]

Aus diesem Grund wurde zu folgenden Experimenten **59** als Edukt nicht mehr in Methanol, sondern in ACN oder DMSO vorgelöst. Bei der Zugabe der gelösten Substratlösung zu der Pufferlösung mit den entsprechenden Enzymen bildete sich jedoch ein farbloser Niederschlag. Die Reaktionslösung wurde dennoch über Nacht inkubiert und am folgenden Tag mit EtOAc extrahiert. Die LC-MS Analyse zeigte, dass das Substrat nicht umgesetzt wurde. Die UV-Chromatogramme sowie die zugehörigen Massenspektren der Reaktionen und der Negativkontrolle waren identisch (Abbildung 26). Diese Ergebnisse lassen sich dadurch erklären, dass das Substrat **59** im Puffer präzipitierte. Dies entzog Verbindung **59** der Reaktionslösung und verhinderte so eine enzymatische Transformation.

In auf diesen Erkenntnissen aufbauende Versuchen sollte daher in Zukunft getestet werden, unter welchen Bedingungen das Substrat **59** in der verwendeten Pufferlösung löslich ist. Es könnten beispielsweise andere organische Lösungsmittel zur Solubilisierung getestet werden. Möglicherweise ist es notwendig, einen anderen Reaktionspuffer zu verwenden, sowie den pH-Wert anzupassen. Weiterhin sollen die Monooxygenase aus dem Gencluster der PAs, PxaB, ebenfalls in *in-vitro* Experimenten verwendet werden. Da die Substrate **119a-c** die natürlichen

Arbeiten zur Aufklärung der Brabantamid-Biosynthese

Edukte dieses Enzyms darstellen, könnten die besten Reaktionsbedingungen für die *Baeyer-Villiger*-Oxidation, katalysiert durch PxaB, definiert werden. Die Ergebnisse dieser Umsetzungen könnte demfolgend in den entsprechenden enzymatischen Umsetzungen mit BraC angewendet werden.

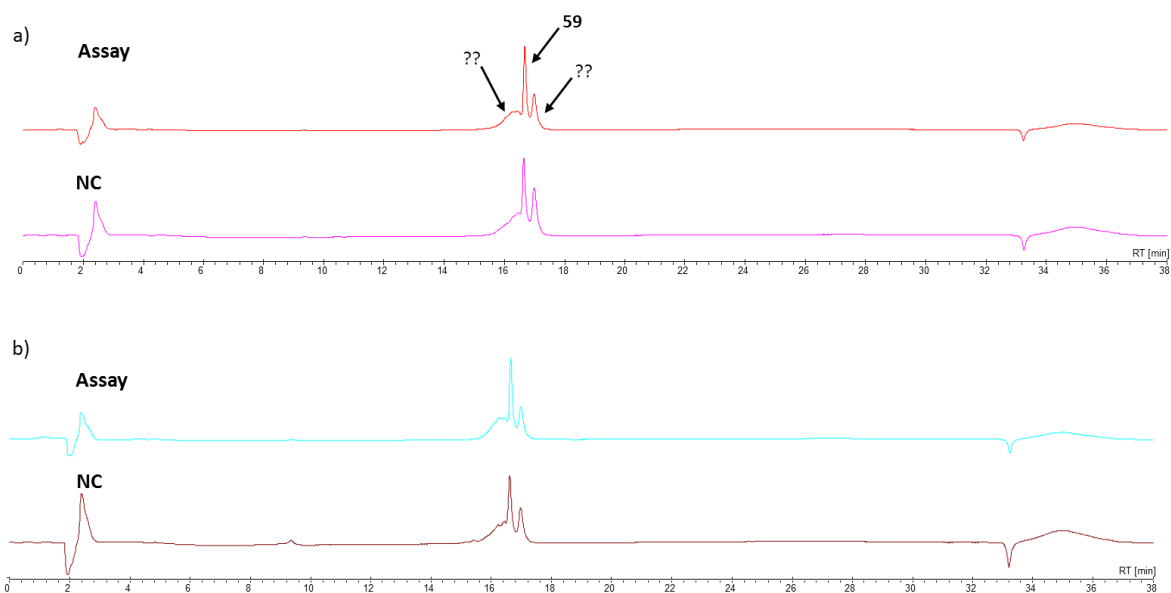


Abbildung 26. UV-Chromatogramme (340 nm) für die enzymatischen Umsetzungen des Bicyclus **59** nach 1) *Huang et al.*^[154] und b) *Gibson et al.*^[149]

3.2 Chemo-enzymatische Totalsynthese der Arylomycine (60a-e)

3.2.1 Heterologe Expression der Proteine zur chemoenzymatischen Totalsynthese der Arylomycine (60a-e)

In der chemo-enzymatischen Totalsynthese der Arylomycine (**60a-e**) sollte zunächst eine lineare Vorstufe durch chemische Synthese von Frau Dr. Hong und Frau Dr. Aldemir hergestellt werden. Analog zur Biosynthese dieser Biaryl-naturstoffe **60a-e** sollte die P450-Oxygenase AryC eine Biarylbindungs-knüpfung in der linearen Kette katalysieren (Kapitel 2.3.1, Schema **12**). Wie in Kapitel 2.4 beschrieben, benötigt AryC für diese Reaktion mehrere Coenzyme. Neben dem komplexen, enzymatischen Elektronenshuttlesystem, bestehend aus Spinat-Ferredoxin, Flavodoxin-Reduktase und Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase, sollte ebenfalls die AryD_TE-Domäne und einer der PCP-Domänen, aryD_PCP4 (Kapitel 3.2.1.1), als Substratanker für die Umsetzungen heterolog exprimiert werden.

3.2.1.1 Klonierung und Expression der PCP-Domänen des Arylomycin-Genclusters

Im Arylomycin-Gencluster befinden sich insgesamt sechs PCP-Domänen. Zwei dieser Domänen werden von der bimodularen NRPS *aryB* kodiert und vier von der zweiten NRPS, *aryD*. Die PCP4-Domäne in *aryD* ist die letzte Carrier-Domäne des Arylomycin Genclusters, an der das Substrat vor der Abspaltung des Multienzymkomplexes durch die TE-Domäne gebunden ist (Kapitel 2.3.1, Schema 12). Die Biarylkupplung, katalysiert durch die P450-Oxygenase AryC erfolgt am Ende der Biosynthese, vermutlich während das Peptid noch an der NRPS befestigt ist. Daher wurde zunächst die letzte PCP-Domäne der zweiten NRPS des Arylomycin-Genclusters kloniert und exprimiert. Anschließend wurden die weiteren fünf PCP-Domänen ebenfalls kloniert und testexprimiert. In späteren Experimenten sollte getestet werden, ob alle PCP-Domänen des Arylomycin-Genclusters in der Lage sind, mit der Arylomycin-Vorstufe beladen und als funktionaler Substratanker verwendet zu werden.

Mittels der Software „PKS/NRPS-Analysis“ wurden die Gensequenzen aller im Cluster befindlichen PCP-Domänen vorausgesagt. In Anlehnung an *Cryle et al.*^[114] wurden die Klonierungsprimer so gewählt, dass die Konstrukte jeweils Überhänge von zwölf Aminosäuren

Chemo-enzymatische Totalsynthese der Arylomycine (60a-e)

N-terminal und zwei Aminosäuren C-terminal im Vergleich zu der vorausgesagten Aminosäuresequenz besitzen (Kapitel 4.2.3, Tabelle 17). Alle vier PCP-Domänen aus *aryD* wurden amplifiziert und in die Vektoren pGS21a und pHis8_TEV kloniert. Die Expression der pHis8_TEV-Konstrukte wurden in *E. coli* BL21(DE3) durchgeführt und lieferte in allen Fällen lösliches Protein. Zudem wurde im pGS21a-Konstrukt gute Expressionen aller PCP-Domänen erreicht. Für die PCP-Beladungsassays wurde die *aryD_PCP4*-Domäne ebenfalls als lösliches Protein im pHis8_TEV-Vektor überexprimiert (Abbildung 27).

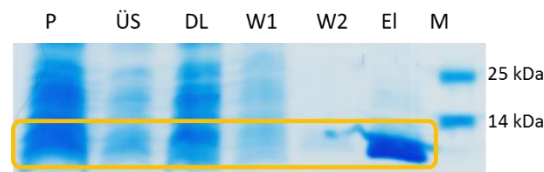


Abbildung 27. SDS-Page-Gel (12%) der Proteinexpression von pHis8_TEV::AryD_PCP4 in *E. coli* BL21(DE3); P = Pellet, ÜS = Überstand, DL = Durchlauf, W1 = Waschfraktion 1, W2 = Waschfraktion 2, EI = Elutionsfraktion; M = Marker; Größe des Proteins 10774 Da.

Neben den Expressionen der AryD_PCP-Domänen in *E. coli* BL21(DE3), wurden diese ebenfalls in *E. coli* BAP1 exprimiert. Da dieser Stamm eine chromosomale Sfp-Kopie enthält, werden die PCPs hier bereits während der Expression posttranslational von der *apo*- in die *holo*-Form transferriert (Kapitel 1.1.1 und Kapitel 3.2.3.1).^[156-157]

Die Klonierung der zwei PCP-Domänen aus *aryB* war durch PCR-Amplifikation, Restriktionsverdau und Ligation nicht möglich. Nach mehreren gescheiterten Versuchen der Klonierung wurden beide Gene mittels „Single-Overlap-Extension-PCR“ synthetisiert (Abbildung 28). Hierzu wurden jeweils vier verschiedene, überlappende Primer konstruiert mit denen eine DNA-Sequenz generiert wurde, die der jeweiligen PCP-Domäne entspricht. Zunächst wurden parallel zwei PCRs mit den Primer 19+21 und 20+22 sowie 23+25 und 24+26 (Kapitel 4.2, Tabelle 17) durchgeführt, wobei jeweils zwei Amplikons erhalten wurden. Diese wurden in einer zweiten PCR mit den Primer 19+22, sowie 23+26 amplifiziert, so dass die Gene inklusive Überhänge mit Restriktionsstellen erhalten wurden. Diese wurden in den pHis8_TEV-Vektor kloniert und nach Expression in *E. coli* BL21(DE3) ebenfalls als lösliche Proteine erhalten. Zusammenfassend konnten alle sechs PCP-Domänen aus dem Arylomycin-Gencluster kloniert und als lösliche Proteine in *E. coli* überexprimiert werden.

Chemo-enzymatische Totalsynthese der Arylomycine (60a-e)

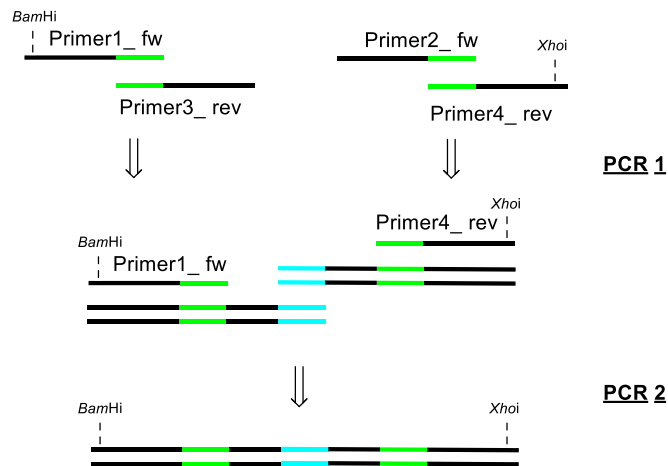


Abbildung 28. Schematische Darstellung der „Single-Overlap-Extension-PCR“.

3.2.1.2 Klonierung und Expression der AryD_TE-Domäne

Nachdem die Biarylkupplung in der Arylomycin-Biosynthese erfolgt ist, wird das Produkt hydrolytisch von der NRPS abgespalten. Für Studien zur Funktionsweise der Thioesterase sollte diese ebenfalls aus *aryD* kloniert und exprimiert werden. Aus der gDNA von *S. roseosporus* NRRL 15998 wurde die Gensequenz der *aryD*_TE-Domäne amplifiziert und in den pGS21a-Vektor kloniert. Nach Transformation in den Standard-Proteinexpressionsstamm *E. coli* BL21(DE3) wurde die terminale Domäne der NRPS als lösliches Protein erhalten (Abbildung 29).

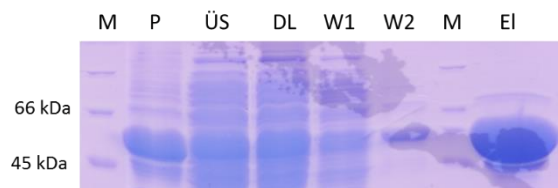


Abbildung 29. SDS-Page-Gel (12%) der Proteinexpression von pGS21a::AryD_TE in *E. coli* BL21(DE3); P = Pellet, ÜS = Überstand, DL = Durchlauf, W1 = Waschfraktion 1, W2 = Waschfraktion 2, EI = Elutionsfraktion 4; M = Marker; Größe des Proteins: 56552 Da.

3.2.1.3 Klonierung und Expression der P450-Oxygenase AryC

Auf Basis der Vorhersage des Arylomycin-Gencluster von *Liu et al.* wurde die Oxygenase im Rahmen der Diplomarbeit aus der gDNA von *Streptomyces roseosporus* NRRL 15998 amplifiziert und in den pGS21a-Vektor kloniert.^{[79],[96]} Die Überexpression des

Chemo-enzymatische Totalsynthese der Arylomycine (60a-e)

P450-Cytochroms erfolgte nach Standard-Expressionsmethode (Kapitel 4.6) mit der Abweichung, dass bei einer OD_{600} von 0.5 δ -Aminolävulinsäure (0.05 mM) zugefügt wurde.^[158]

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit wurde das Genom von *S. roseosporus* durch Herrn René Richarz mit „Glimmer plug in“ von „Geneious“ erneut annotiert. Es wurde eine Diskrepanz zwischen dem Ende der Sequenz des Arylomycin-Genclusters, bestimmt durch *Liu et al.*, und demjenigen bestimmt durch Herrn René Richarz gefunden. Die neu annotierte, 60 Basenpaare (bp) kürzere Sequenz, von *aryC* wurde daraufhin ebenfalls aus der gDNA amplifiziert und in den pHis8-Vektor kloniert. Durch die heterologe Überexpression der Oxygenase in *E. coli* BL21(DE3)-Zellen wurde lösliches Protein erhalten. Um die Konzentration an AryC zu erhöhen, wurden zwei weitere Expressionsstämme getestet. Durch die Expression in *E. coli Arctic Express*-Zellen, der die beiden Chaperone *cpn 10* und *cpn 60* coexprimiert, wurde das Enzym in keinen signifikant höheren Konzentrationen erhalten. Basierend darauf, dass es nicht ausgeschlossen ist, dass Chaperone die enzymatische Umsetzung inhibieren könnten, wurde die Expression in *E. coli Arctic Express*-Zellen nicht weiter verfolgt. Eine weitere Alternative war die Expression in *E. coli* SoluBL21-Zellen bei 25 °C über Nacht, wobei jedoch keine Überproduktion an AryC erhalten wurde.

Aufgrund geplanter Kristallisationsversuche mit dem Protein wurden $AryC_{lang}$, von *Liu et al.*^[159] postuliert, sowie $AryC_{kurz}$, bestimmt durch Herr René Richarz, in den pHis8-TEV-Vektor kloniert (Kapitel 3.2.1.4). Nach erfolgreicher Klonierung wurden beide Proteine unter Verwendung der Standard-Expressionsmethode in *E. coli* BL21(DE3)-Zellen überexprimiert. Dabei wurde $AryC_{lang}$ in höherer Konzentration erhalten als das kürzere Konstrukt $AryC_{kurz}$ (Abbildung 30).

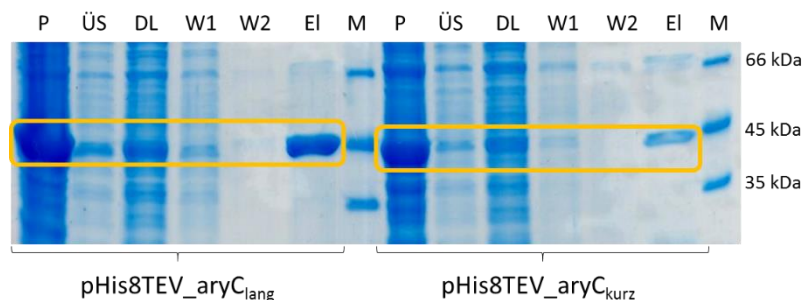


Abbildung 30. SDS-Page-Gel (12%) der Proteinexpression von pHis8-TEV:: $AryC_{lang}$ (links) und pHis8-TEV:: $AryC_{kurz}$ (rechts) in *E. coli* BL21(DE3); P = Pellet, ÜS = Überstand, W1 = Waschfraktion 1, W2 = Waschfraktion 2, EI = Elutionsfraktion; M = Marker; Größe $aryC_{lang}$ = 47859 Da, $aryC_{kurz}$ = 46735 Da.

Chemo-enzymatische Totalsynthese der Arylomycine (60a-e)

Die Menge an löslichem AryC_{kurz} konnte nicht durch eine Expression in *E. coli Arctic Express*-Zellen verbessert werden. Die bessere Expression der langen Varianten der P450-Oxygenase führte dazu, dass überwiegend diese für die enzymatischen Umsetzungen, sowie für erste Kristallisationsversuche benutzt wurde.

3.2.1.4 Kristallisation von AryC

Zur Strukturanalyse der P450-Oxygenase des Arylomycin-Genclusters sollte diese zunächst alleine und anschließend mit dem Substrat als Enzymkomplex kristallisiert werden. Hierzu sollte das Protein unter Standardbedingungen exprimiert und aufgereinigt werden. Da der GST-Tag, sowie der His₈-Tag, die durch die Expression von AryC im pGS21a-Vektor *N*-terminal an das Protein gebunden sind, eine Kristallisation des Proteins beeinflussen können, sollten beide Tags zuvor abgespalten werden.

In der Gensequenz des Vektorrückgrats befindet sich zwischen dem GST-Tag und der MCS eine Enterokinase-Schnittstelle. Dementsprechend wurden die Tags mittels der kommerziell verfügbaren Enterokinase abgespalten. Mittels Restriktionstestverdau sollte die Zeit und die benötigte Enterokinasekonzentration für die Tagabspaltung bestimmt werden. Es zeigte sich, dass eine hohe Konzentration an Enterokinase zu einer vollständigeren Abspaltung der Tags führt, wobei die Zeit eine untergeordnete Rolle spielte (Abbildung 31a). Neben der Expression von AryC im pGS21a-Vektor wurde die Expression im pHis8_TEV-Vektor durchgeführt. Dieser Vektor enthält eine Erkennungssequenz für die TEV-Protease, die es erlaubt den *N*-terminalen His₈-Tag vom eigentlichen Protein abzuspalten. Die Abspaltung des Tags erfolgte ebenfalls mit einer hohen Konzentration an Protease in guten Ausbeuten (Abbildung 31b). Dem Arbeitskreis wurde von Dr. Sabine Schneider ein Konstrukt zur heterologen Produktion der TEV-Protease zur Verfügung gestellt. Fortan wurde daher für alle Kristallisationsversuche AryC im pHis8_TEV-Vektor exprimiert, sodass der His₈-Tag mittels TEV-Protease abgespalten werden konnte.

Chemo-enzymatische Totalsynthese der Arylomycine (60a-e)

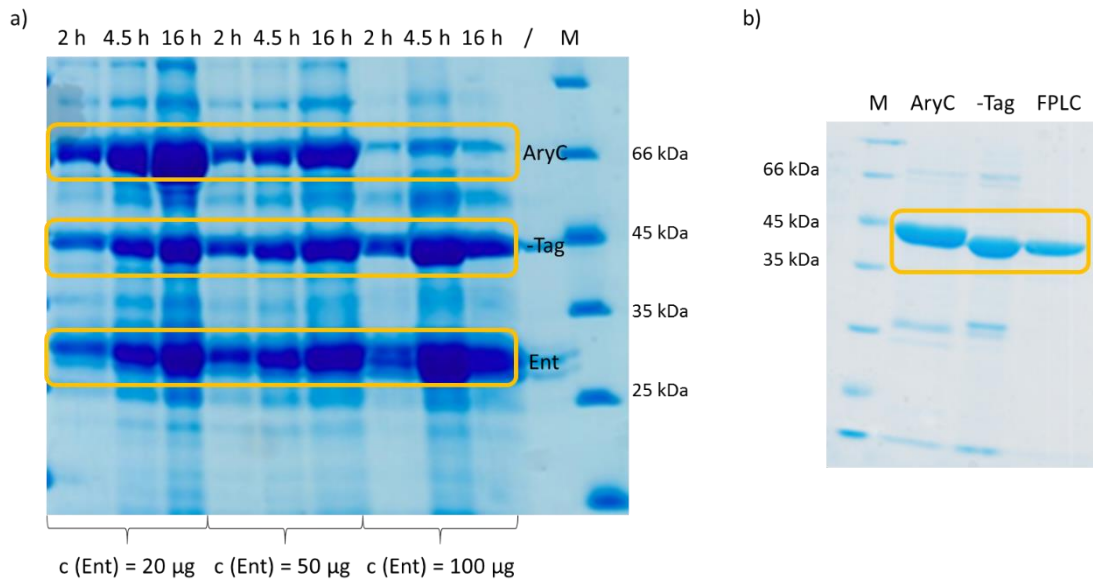


Abbildung 31. SDS-Page-Gel (12%) a) der Tag-Abspaltung von pGS21a::AryC_{lang}, Ent = Enterokinase, c = Konzentration; Größe AryC_{lang} = 47859 Da; aryC_{lang} - Tag = 45536 Da; Ent = Enterokinase, FPLC = Fast Protein Liquid Chromatography; -Tag = AryC nach Abspaltung des GST- und/oder His-Tag mittels Protease.

Da es sich bei der P450-Oxygenase um ein Häm-Enzym handelt, wurde dieses nach der Tag-Abspaltung rekonstituiert. Die Zugabe von Häminchlorid führt zu einer Absättigung der entsprechenden Bindestellen im Protein und erhöht somit die Enzymaktivität. Zur Rekonstitution wurde Haeminchlorid zum Protein gegeben und auf Eis inkubiert (Kapitel 4.6.2). Über eine PD10-Säule wurde das überschüssige Haeminchlorid von der Proteinlösung abgetrennt, und durch Konzentration wurde das gesättigte, rote Protein erhalten. An der veränderten Rotfärbung der Proteinlösung vor und nach der Rekonstitution wurde die Sättigung des Hämproteins mit Eisen beobachtet (Abbildung 32a und b).

Das rekonstituierte Protein wurde anschließend mittels „Fast Protein Liquid Chromatography“ (FPLC) aufgereinigt (Abbildung 31b Abbildung 32c). Dadurch wurde das Protein von noch enthaltenen Verunreinigungen befreit, die mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie nicht entfernt werden konnten. AryC wurde mit dem Standard-Tris-HCl-Puffer eluiert. Nach den ersten fehlgeschlagenen Kristallisationsversuchen wurde entschieden, das Glycerol (10%) aus dem Puffer zu entfernen. Glycerol stabilisiert das Protein in der Pufferlösung, kann aber auch die Kristallisation des Proteins inhibieren.

Chemo-enzymatische Totalsynthese der Arylomycine (60a-e)

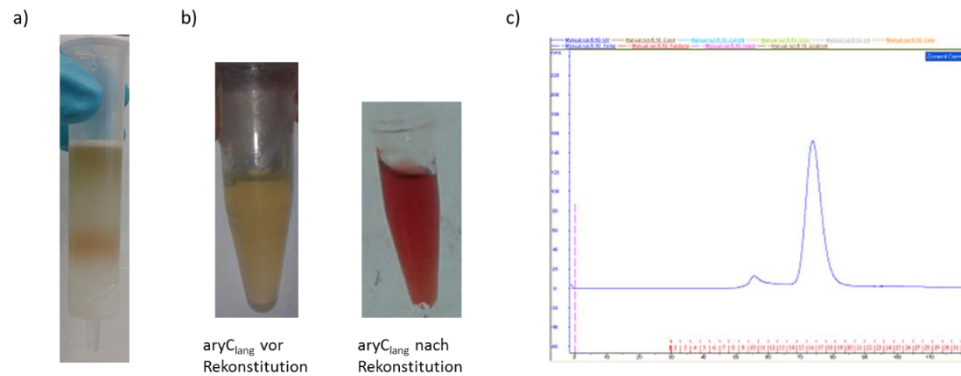


Abbildung 32. a) PD10-Säulendurchfluss zur Abtrennung des überschüssigen Haeminchlorids vom rekonstituiertem AryC; b) links: Proteinlösung von AryC vor Rekonstitution mit Haeminchlorid, rechts: Proteinlösung nach Rekonstitution, Abtrennung des überschüssigen Haeminchlorids und Aufkonzentration c) FPLC-Chromatogramm von AryC.

Verschiedene Kristallisationsansätze wurden getestet, die sich in der Zusammenstellung der jeweilig verwendeten Pufferlösung unterscheiden. Die Platten pHClear Suite, Classic II Suite, PEG Suite, AmSO₄ Suite, JCSG+ Suite und MPD Suite der Fa. *Quiagen* wurden verwendet (siehe Anhang). Über mehrere Wochen wurden Platten bei 4 °C sowie bei 20 °C über inkubiert, dennoch wurde zu keinem Zeitpunkt eine Kristallformation beobachtet.

Um die Bedingungen für die Kristallisation von AryC zu verbessern, sollte getestet werden, unter welchen Pufferbedingungen die Oxygenase am stabilsten ist. Zunächst wurde ein „Thermofluor-Assay“ durchgeführt, der die Stabilität des Proteins bei verschiedenen pH-Werten, Salzkonzentrationen, Puffertypen und Pufferkonzentrationen testen sollte (siehe Anhang). Der Hintergrund dieses Assays besteht darin, dass sich der fluoreszierende, nicht-spezifisch proteinbindende Farbstoff SYPRO Orange an hydrophobe Regionen von Proteinen bindet und dadurch fluoresziert. Bei steigender Temperatur beginnt das Protein zu denaturieren und legt somit seine hydrophoben Regionen frei, so dass durch Anbindung des Farbstoffes Fluoreszenz entsteht, die gemessen wird. Die stärkste Fluoreszenz ist daher sichtbar, wenn sich das Protein komplett entfaltet ist. Die Proteinlösung wird mit dem Farbstoff zu verschiedenen Puffern gegeben, die Temperatur langsam erhöht und die Fluoreszenz aufgenommen.

Basierend auf den Ergebnissen des „Thermofluor-Assays“ konnte bestimmt werden, dass AryC bei pH-Werten zwischen 6.5-8.2 am stabilsten ist. Weiterhin lieferte der Test die Erkenntnis, dass sich sowohl der Tris-HCl Puffer (50 mM und 100 mM, pH = 8) als auch NaCl im Puffer stabilisierend auf die Oxygenase auswirken. Neben dem Tris-HCl-Puffer würden sich HEPES-Puffer (10 mM-100 mM, pH = 7.5), sowie Natriumphosphatpuffer (50 mM oder 200 mM,

Chemo-enzymatische Totalsynthese der Arylomycine (60a-e)

pH = 7.5) ebenfalls für Kristallisationsversuche eignen. Dasselbe Prinzip wurde verwendet um die Stabilität des Proteins in Gegenwart verschiedener Additive, wie Oxidationsmittel, Metallsalze, Reduktionsmittel oder Polymere, in den Puffern zu testen. Aus den Ergebnissen wurde ersichtlich, dass ein Zusatz von Harnstoff eher destabilisierend für das Cytochrom-P450 ist. Weiterhin stellte sich heraus, dass keines der anderen getesteten Additive einen größeren Effekt auf die Stabilisierung oder Destabilisierung von AryC ausübt. Daher unterstützen diese Ergebnisse weiterhin, dass die Pufferbedingungen, die für die anfänglichen Kristallisationsversuche verwendet wurden, bereits sehr gut waren. Eine Kristallisation von AryC konnte dennoch nicht erreicht werden. Eine Möglichkeit zur Verbesserung der Erfolgsaussichten in den Kristallisationsansätzen wäre es, mit Hilfe bioinformatischer Analysen N-terminale Aminosäure-Reste aufzufinden, die eine Kristallisation des Proteins möglicherweise stören könnten. Nach diesen Untersuchungen könnte eine kristallisationsfähige Gensequenz kloniert, exprimiert und die Kristallisation von AryC erneut versucht werden.

3.2.1.5 Heterologe Expressions der benötigten Elektrontransfer-Proteine

Das Spinat-Ferredoxin (PetF) wurde in vorangegangenen Arbeiten bereits mittels „Single-Overlap-Extension-PCR“ amplifiziert und in den pHis8-Vektor kloniert.^[79] Die Proteinexpression wurde in *E. coli* BL21(DE3)-Zellen mit dem Zusatzplasmid pRKISC^[160] bei 22 °C über Nacht durchgeführt und der Hauptkultur wurde bei der Animpfung Eisen-(II)-sulfat sterilfiltriert zugegeben. Das Plasmid pRKISC besitzt ein Eisen-Schwefel-Cluster-Locus (*isc*-Locus, engl. Iron-Sulfur-Cluster) aus *E. coli*, der die Bildung von Eisen-Schwefel-Clustern in Proteinen, hier PetF, fördert.

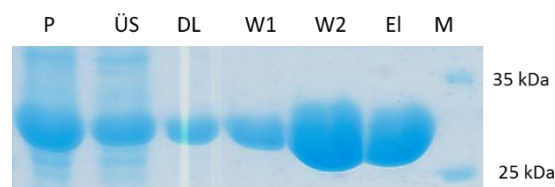


Abbildung 33 SDS-Page-Gel (12%) Aufreinigung von pHis8::PetF, Größe = 12901 Da; P = Pellet, ÜS = Überstand, DL = Durchlauf, W1 = Waschfraktion 1, W2 = Waschfraktion 2, EI = Elutionsfraktion und M = Marker.

Chemo-enzymatische Totalsynthese der Arylomycine (60a-e)

Unter diesen Expressionsbedingungen wurde lösliches, dunkelrotes PetF erhalten. Nach SDS-Gelchromatographie wurde durch Massenanalyse bestimmt, dass Spinat-Ferredoxin PetF als Dimer isoliert wird (Abbildung 33).

Das Vektor-Konstrukt der Flavin-Reduktase (Fpr) wurde von Herrn René Richarz angefertigt. Die Proteinexpression der Reduktase wurde ebenfalls bei 22 °C durchgeführt und es wurde bei der Animpfung der Hauptkultur Riboflavin (1 mM) sterilfiltriert zugegeben. Die Überexpressionen lieferten lösliches, gelbes Protein.

Von beiden Enzymen wurden zur Analytik UV-Spektren aufgenommen, die die Absorptionsmaxima der farbigen Proteine zeigten. Diese entsprechen denen, die in der Literatur beschrieben sind.^{[138],[161]} Das Spinat-Ferredoxin besitzt Maxima bei 273, 328, 420 und 465 nm, die Reduktase bei 400, 456 und 483 nm (Abbildung 34).

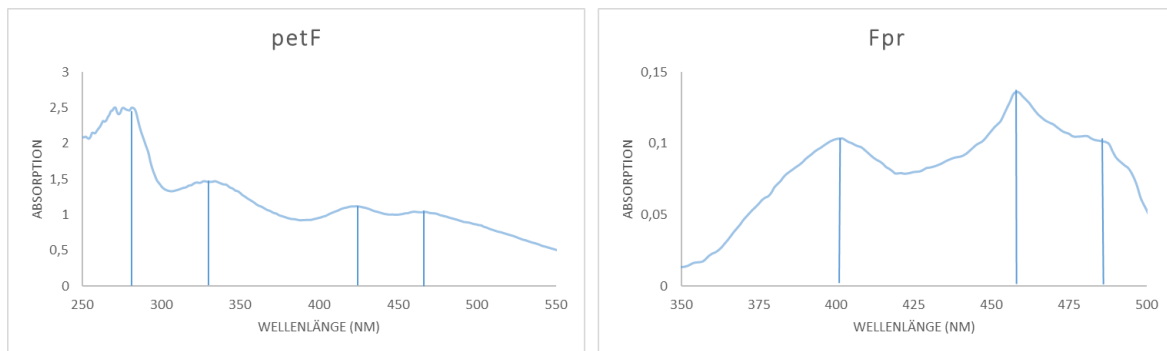


Abbildung 34. UV-Diagramme von Spinat Ferredoxin (links) und Flavin-Reduktase (rechts) mit ihren jeweiligen Absorptionsmaxima markiert mit vertikalen Linien; Absorptionsmaxima für PetF: 273, 328, 420 und 465 nm und für Fpr: 400, 456 und 483 nm.

Zur Regeneration von NADP⁺ zu NADPH während des Elektronenzyklus wurde ein weiteres Enzym Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (GdH) benötigt. Dieses wurde von Herrn René Richarz in den pHis8-Vektor kloniert und in den Expressionsstamm *E. coli* BL21(DE3) transformiert. Die Proteinexpression dieses Enzyms erfolgte unter den Standardbedingungen. Die Phosphopantheteinyltransferase Sfp, wurde ebenfalls in unserer Arbeitsgruppe in den pHis8-Vektor kloniert und konnte als lösliches Protein in *E. coli* BL21(DE3) heterolog exprimiert werden.

Chemo-enzymatische Totalsynthese der Arylomycine (60a-e)

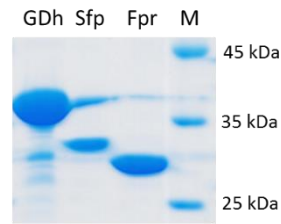


Abbildung 35. SDS-Page-Gel (12%) der Elutionsfraktionen von GDh, Sfp und Fpr; Größe der Proteine GDh = 30575 Da, Sfp = 27200 Da und Fpr = 30169 Da.

3.2.2 UV-Spektroskopische Analyse von AryC

In typischen UV-Spektren von freien P450-Hämproteinen sind drei lokale Absorptionsmaxima vorhanden. Das erste und höchste Maximum wird Soret-Peak genannt und findet sich im Bereich von 415-417 nm, was einer typischen Absorption von Eisen-(III)-Proteine in der Low-Spin-Konfiguration entspricht (Abbildung 36a).^[162] Weitere UV-Maxima befinden sich bei 537 nm und 571 nm und werden als β -, beziehungsweise α -Peaks bezeichnet (Abbildung 36b).^[158] Eine chemische Reduktion des P450-Proteins ruft einen bathochromen Effekt hervor. Durch anschließende Zugabe von Kohlenstoffmonoxid, wird eine Verschiebung des Soret-Peaks zu 450 nm beobachtet. Kohlenstoffmonoxid bindet irreversibel an das Eisenzentrum und verdrängt das schwach komplexierte Wasser. Dadurch kommt es zur Verschiebung des Absorptionsmaximums, der für die Namensgebung der P450-Cytochrome verantwortlich ist. Die Messung der lokalen Absorptionsmaxima nach Reduktion und Zugabe von Kohlenstoffmonoxid wird verwendet um zum einen das P450-Enzym als solches zu charakterisieren und zum anderen um die Aktivität des Proteins zu bestimmen.^[158]

Dieser Aktivitätstest wurde mit AryC_{lang} durchgeführt. Das Enzym zeigte das für Häm-Proteine typische UV-Absorptionsspektrum mit den erwarteten Maxima (Abbildung 36). Durch eine Reduzierung des Cytochroms mit Natriumdithionit wurde ein bathochromer Effekt beobachtet (Abbildung 36a und b). Nach der Zugabe von Kohlenstoffmonoxid verschob sich der Soret-Peak von AryC_{lang} zu der erwarteten Wellenlänge von 450 nm (Abbildung 36c). Diese Ergebnisse bestätigten, dass es sich bei AryC_{lang} um ein P450-Cytochrom handelt, die Eisenzentren im Kern des Enzyms reduzierbar sind und somit das Enzym aktiv ist.

Chemo-enzymatische Totalsynthese der Arylomycine (60a-e)

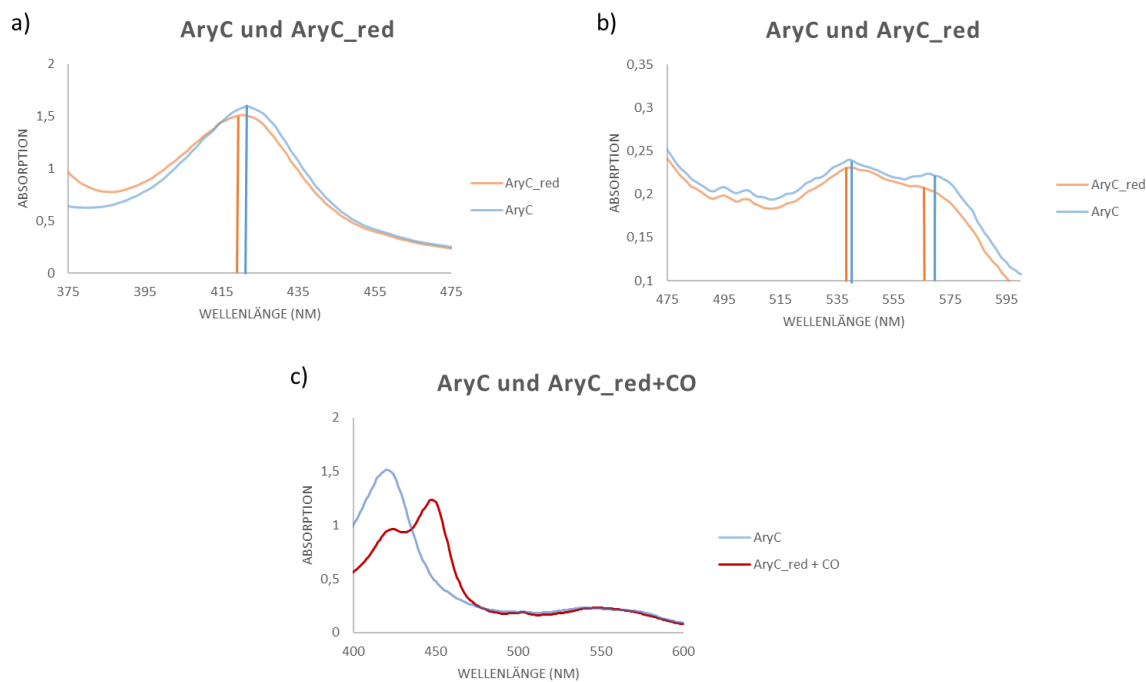


Abbildung 36. UV-Vis-Diagramme von AryC a) im Bereich von 375-475 nm und b) im Bereich von 475-595 nm, c) AryC gegen AryC_red mit CO im Bereich von 400-600 nm.

3.2.3 Enzymatische Umsetzungen zur chemo-enzymatischen Totalsynthese der Arylomycine (60a-l)

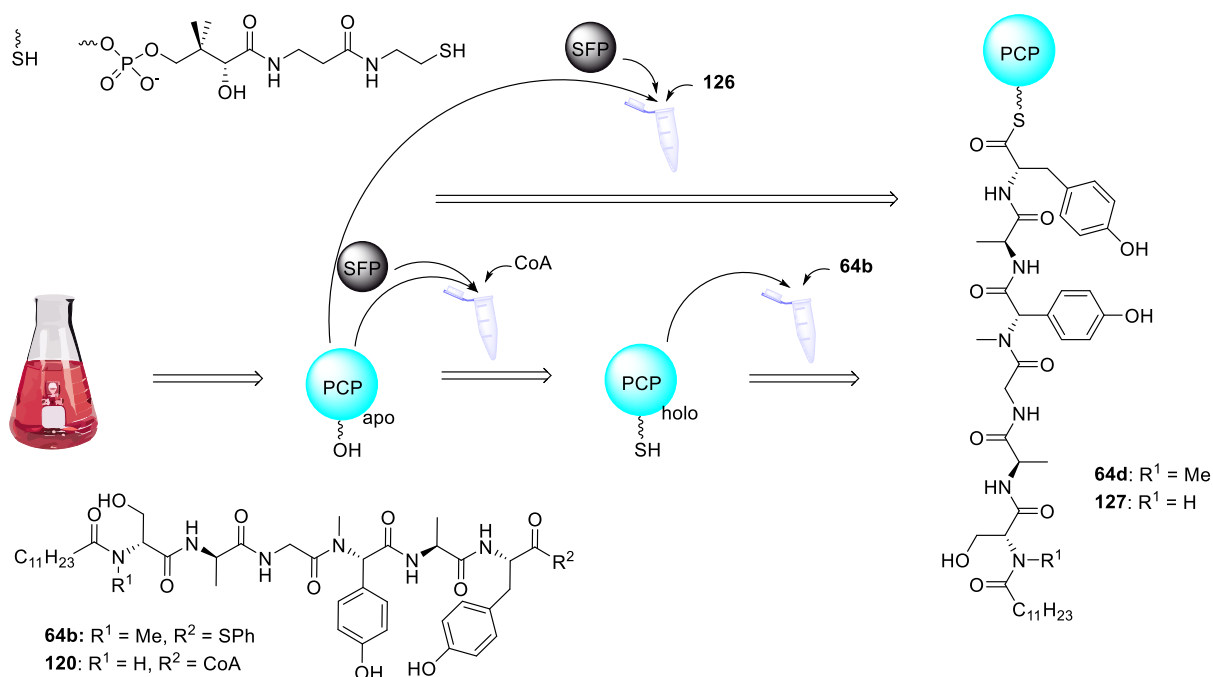
3.2.3.1 PCP-Beladungsassays

Wie in Kapitel 2.4 beschrieben, sollten für die chemo-enzymatische Totalsynthese von Arylomycin zunächst die Thioester **64a-c** von Dr. Hong und Dr. Aldemir synthetisiert werden, die dann als Edukt für die Biarylknüpfung durch die Oxygenase eingesetzt werden sollten. *Robinson et al.* haben enzymatische Reaktionen mit der P450-Oxygenase OxyB des Vancomycin-Genclusters durchgeführt, die die Biaryl-Ether-Bindung in der Vancomycin-Biosynthese katalysiert. Sie konnten zeigen, dass das Cytochrom nur die Bindungsknüpfung initiiert, wenn das Substrat an einer PCP-Domäne gebunden ist.^[163] Dies wurde in folgenden Arbeiten durch *Cryle et al.* am Vancomycin-System bestätigt.^[164-165] Daher sollten in der vorliegenden Arbeit nicht nur die Thioester **64a-c** eingesetzt werden, sondern auch das PCP-gebundene Substrat **64d**.

Chemo-enzymatische Totalsynthese der Arylomycine (60a-e)

Um ein Substrat an eine PCP-Domäne binden zu können, muss diese in ihrer aktiven *holo*-Form vorliegen (Kapitel 1.1.1). Bei der heterologen Expression von PCP-Domänen in *E. coli* BAP1 wird das Carrier-Protein bereits während der Überproduktion aktiviert (Kapitel 3.2.1.1). Jedoch wurde durch die heterologe Expression von AryD_PCP4 in *E. coli* BAP1 ein Gemisch aus *apo*- und *holo*-PCP-Domäne erhalten, die Aktivierung *in-vivo* war also nicht vollständig.

Dies führte zu dem Entschluss, die PCP-Domäne *in-vitro* zu aktivieren. Die Beladung der Arylomycin-Vorstufe an die in *E. coli* BL21(DE3) heterolog exprimierte AryD_PCP4-Domäne wurde ausgehend von zwei verschiedenen Substraten **64b** und **126** durchgeführt. Im Gegensatz zum Thiophenol **64b**, war das hier verwendete CoA-Substrat **126** kein Thioester der linearen Arylomycin A2-Vorstufe. Zur Vereinfachung der Synthese des CoA-Esters **126** wurde L-Serin (**73**) anstatt *N*-Methyl-L-Serin eingesetzt, da davon ausgegangen wurde, dass die *N*-Methylgruppe keine oder nur eine untergeordnete Rolle in der enzymatischen Biarylkupplung spielen würde. Bei der Verwendung des Thiophenol-Derivates **64b**, musste die Beladung zu **64d** in zwei Schritten erfolgen (Schema 26). Zunächst wurde die *apo*-PCP-Domäne mittels CoA und SFP zur *holo*-Form aktiviert. Erst nach erfolgter Aktivierung wurde das Thiophenol-Substrat **64b** zugegeben.



Schema 26. Schematische Darstellung der PCP-Beladung durch Sfp und den Thiophenol-Ester **64b** oder den CoA-Ester **126**.

Chemo-enzymatische Totalsynthese der Arylomycine (60a-e)

Tabelle 12. Berechnete Massen m/z der mehrfach geladenen Ionen von *apo*-AryD_PCP4, *holo*-AryD_PCP4 **64c**.

	$[M+H]^{6+}$	$[M+H]^{7+}$	$[M+H]^{8+}$	$[M+H]^{9+}$	$[M+H]^{10+}$	$[M+H]^{11+}$
m/z <i>apo</i> -AryD_PCP4	1796.68	1540.16	1247.76	1198.13	1078.41	980.47
m/z <i>holo</i> AryD_PCP4	1853.24	1588.64	1390.18	1235.83	1112.34	1011.31
m/z 64d	1988.15	1704.27	1491.36	1325.76	1193.28	1084.89
m/z 126	1985.31	1701.83	1489.23	1323.87	1191.58	1083.25

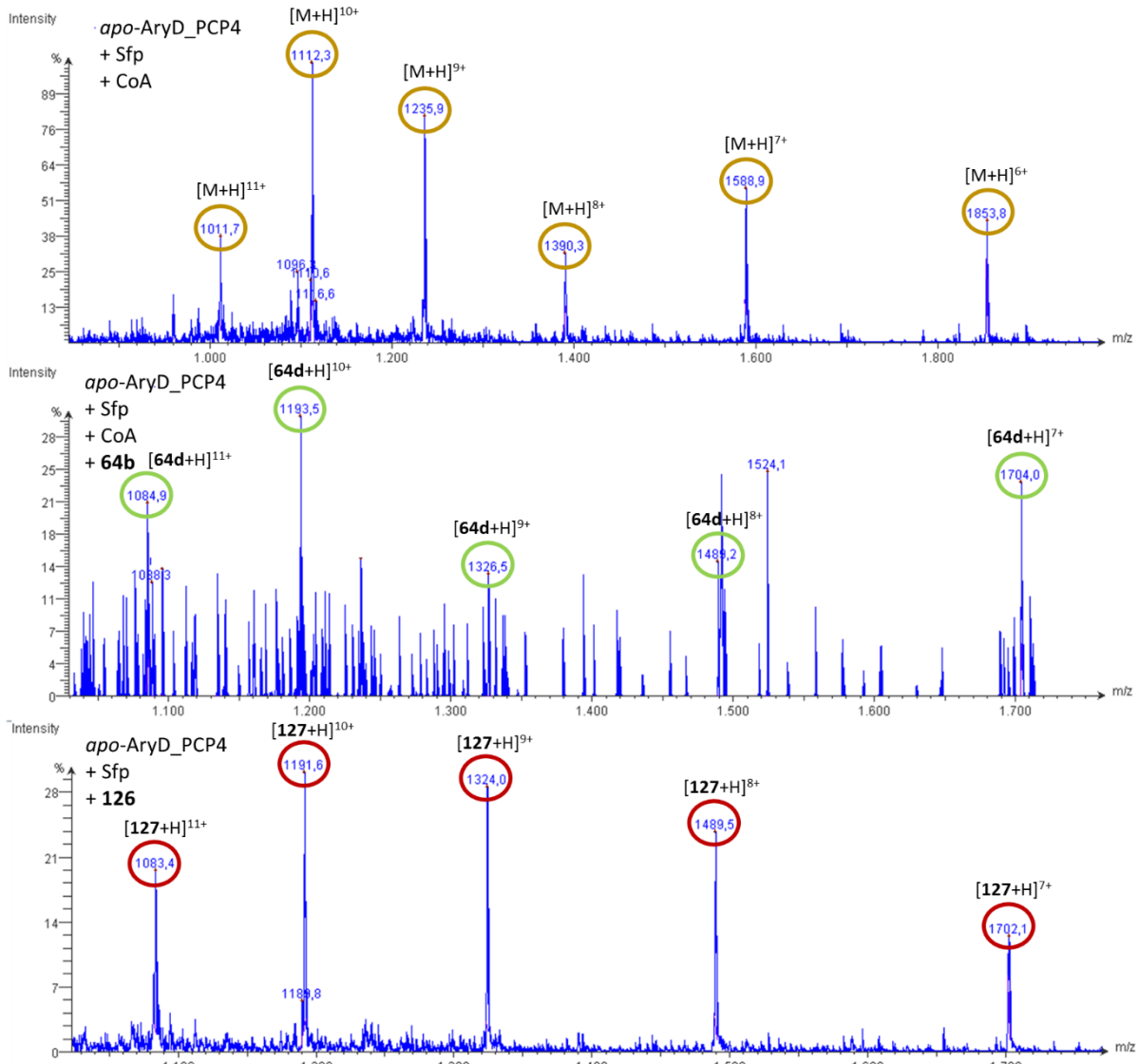


Abbildung 37. Massespektrometrische Analyse von *holo*-AryD_PCP4 (oben), von der Beladung der *holo*-AryD_PCP4 mit **64b** (Mitte), von der Beladung der *holo*-AryD_PCP4 mit **126** (unten); die Ionenpeaks geben m/z von mehrfach geladenen Ionen an; orange umrandet sind die Massen von *holo*-AryD_PCP4; grün umrandet sind die Massen von **64d**, rot umrandet sind die Massen von **127**.

Die LC-MS-Daten bestätigten die Beladung des Substrats auf die AryD_PCP4-Domäne (Abbildung 37). Es wurden die mehrfach geladenen Ionenpeaks der beladenen und

unbeladenen PCP-Domänen detektiert, da die molare Masse der Proteine für eine direkte Detektion mit dem vorhandenen Massenspektrometer zu groß sind.

Wurde das CoA-Substrat **126** eingesetzt, konnte die Beladung zu **127a** in einem Schritt stattfinden (Schema 26).^[138] Hierzu wurde die frisch aufgereinigte apo-PCP-Domäne mit dem Thioester **126** und Sfp inkubiert. Dadurch, dass die Vorstufe direkt an CoA gebunden ist, erfolgte die Aktivierung der PCP-Domäne und die Beladung simultan. Analog zur Beladung mit dem Thiophenol **64b**, wurde die erfolgreiche Beladung mittels LC-MS detektiert (Abbildung **37**).

Beim Vergleich beider Methoden wurde festgestellt, dass die PCP-Beladung mittels CoA-gebundenen Substrats **126** die bessere Alternative darstellt. Die Beladung des CoA-Thioesters **126** verlief quantitativ und es wurde ein sauberes Massenspektrum erhalten. Das Thiophenol-Derivat **64b** musste zudem im Überschuss zur aktivierten PCP-Domäne zugegeben werden, da es sich hierbei um eine Thioesteraustauschreaktion handelte. Dadurch verblieb restliches Edukt **64b** in der Reaktionslösung, das die anschließenden enzymatischen Umsetzungen negativ beeinflussen könnte (Kapitel 3.2.3.2).

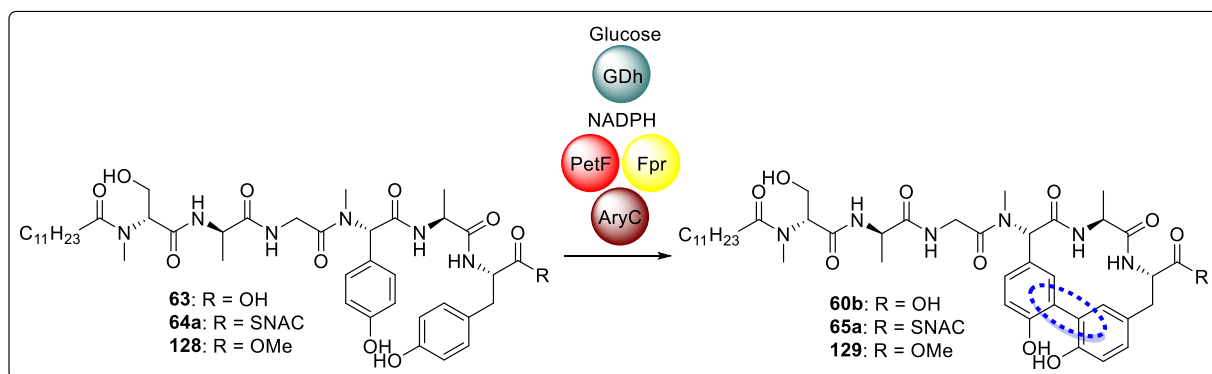
3.2.3.2 Enzymatische Umsetzungen mit AryC

Zu Beginn der Arbeiten wurden erste Versuche zur enzymatisch-katalysierten Biarylkupplung mit der Säure **63**, dem Methylester **128** und dem SNAc-Derivat **64a** durchgeführt. Die Reaktionsbedingungen wurden in Anlehnung an die Biarylkupplungsexperimente von *Woithe et al.* gewählt (Tabelle 13).^[138]

Das NADP⁺-Regenerationssystem, bestehend aus GDh und Glukose, wurde anfangs noch nicht verwendet. Daher wurde bei den Reaktionen ein zehnfacher Überschuss an NADPH eingesetzt, damit eine ausreichende Elektronenversorgung bis zum Ende der Umsetzung sichergestellt wurde. Zudem wurde versucht, das NADPH in zwei Portionen zuzugeben, wobei zu Beginn der Reaktion und nach 4 h 10 mM NADPH zugegeben wurde. Diese ersten Versuche der Biarylkupplung wurden als Testreaktionen durchgeführt und sollten die Vorlage für spätere Umsetzungen sein.

Chemo-enzymatische Totalsynthese der Arylomycine (60a-e)

Tabelle 13. Zusammensetzung der enzymatischen Umsetzungen der Edukte **63**, **128** und **64a** mit AryC und dem Elektronendonatorensystem.



	1	2	3	4	5	6
Substrat (80 µM)	63 in MeOH	63 in MeOH	128 in MeOH	128 in DMSO	64a in DMSO	64a in DMSO
AryC_{lang} (8 µM)	✓	✓	✓	✓✓	✓	-
AryC_{kurz} (8 µM)	-	-	-	-	-	✓
PetF (20 µM)	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Fpr (10 µM)	✓	✓	✓	✓	✓	✓
GDh (20 µM)	-	-	-	-	-	✓
Glukose (1 mM)	-	-	-	-	-	✓
NADPH	10 mM	10 mM + 10 mM	10 mM	10 mM + 10 mM	10 mM + 10 mM	1 mM
Puffer	HEPES pH 7.0	HEPES pH 7.0	HEPES pH 7.0	Tris-HCl pH 7.5	HEPES pH 7.0	KPB pH 7.0

Nach Inkubation der Enzyme mit dem Substrat **63** wurde keine Veränderung im aufgenommenen UV-Spektrum im Vergleich zur Negativkontrolle festgestellt. Auch die zweifache Zugabe an NADPH zeigte keine Veränderung der Reaktionsprodukte. Die notwendige Zugabe von Methanol zum Lösen des Edukts **63** im Assay-Puffer war möglicherweise ein Grund für das Ausbleiben einer Reaktion, da Methanol die Aktivität der Enzyme einschränken kann. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde davon ausgegangen, dass sich die freie Säure der Arylomycin-Vorstufe **63** nicht für enzymatische Umsetzungen mit der P450-Oxygenase eignet. Der Methyl ester **128** wurde daraufhin als Edukt für die Biarylkupplung verwendet. Zum Lösen der Vorstufe **128** musste, wegen der schlechten Wasserlöslichkeit, das organische Lösungsmittel DMSO verwendet werden. Es wurde jeweils so viel DMSO verwendet, wie zur

Chemo-enzymatische Totalsynthese der Arylomycine (60a-e)

homogenen Lösung des Edukts **128** nötig war, ohne eine Endkonzentration an DMSO in der Reaktionslösung von maximal 5 Vol% zu überschreiten. Analog zu den enzymatischen Reaktionen mit der Säure **63** wurde bei Verwendung des Esters **128** im HEPES-Puffer sowie im Tris-HCl-Puffer keine Veränderung im UV-Spektrum beobachtet. Das SNAc-Derivat **64a** musste ebenfalls in DMSO vorgelöst werden, bevor es zum Puffer gegeben wurde. Die Endkonzentration an DMSO in der Reaktionslösung betrug zwischen 5-8 Vol% und es wurden zwei verschiedene Puffer verwendet. In beiden Puffern, HEPES-Puffer und Kaliumphosphat-Puffer (KPP), wurde das gleiche Ergebnis erhalten. Es wurde keine intramolekulare Biarylkupplung in Edukt **64a** beobachtet. Der SNAc **64a** sollte ein Mimetikum für die PCP-Domäne darstellen. Dies wurde in biokatalytischen Reaktionen mit PCP-abhängigen Enzymen *in-vivo* bereits häufig erfolgreich genutzt.^{[138],[163],[98]} Trotzdem schien AryC_Iang das Substrat **64a** nicht zu erkennen und umzusetzen.

Basierend auf den Ergebnissen wurde angenommen, dass es nur zur enzymatischen Biarylkupplung kommen kann, wenn das Substrat an die terminale PCP-Domäne aus der Arylomycin-Biosynthese gebunden ist. Dies wurde bereits bei biarylhaltigen Peptiden des Vancomycin-Typs durch *Robinson et al.* und *Cryle et al.* beobachtet.^[98],164] Wie bereits in Kapitel 3.2.3.1 beschrieben, wurde die Beladung der PCP-Domäne mit den beiden Substraten **64a** und **126** erfolgreich durchgeführt. Bevor die Biarylkupplungsreaktionen mit der beladenen PCP-Domäne **64d** und **127** durchgeführt werden konnte, sollte eine verlässliche Methode zur Abspaltung des Produkts von der PCP-Domäne etabliert werden. Die Abspaltung von der PCP-Domäne musste durchgeführt werden, da der Massenunterschied zwischen dem Edukt und dem gekuppelten Produkt nur $m/z = 2$ beträgt. Da aufgrund des großen Molekulargewichts der Protein-gebundenen Moleküle lediglich mehrfach geladene Ionen gemessen werden können (beispielsweise 6+ bis 11+, vergleiche z.B. Tabelle 12), wird der zu detektierende Massenunterschied zwischen Substrat und Produkt noch weiter signifikant verkleinert. Die naheliegendste Lösung für die Abspaltung des Substrats **64d** oder **127** war es die selbe Vorgehensweise zu nutzen, die auch in der Biosynthese angewendet wird. Daher wurde die Thioesterase-Domäne der NRPS des Arylomycin-Genclusters frisch exprimiert. Daneben wurde Methylhydrazin als literaturbekanntes Reagenz zur Abspaltung von Peptiden von PCP-Domänen benutzt (Schema 27).^{[138],[164],[166]} Bei der Durchführung der Testversuche wurde ausschließlich der Thiophenol-Ester **64b** verwendet.

Chemo-enzymatische Totalsynthese der Arylomycine (**60a-e**)

PCP-Domäne vor der Biarylkupplung und der folgenden Abspaltung gereinigt werden, um das die Analytik störende, freie Substrat **64b** und andere Nebenprodukte abzutrennen.

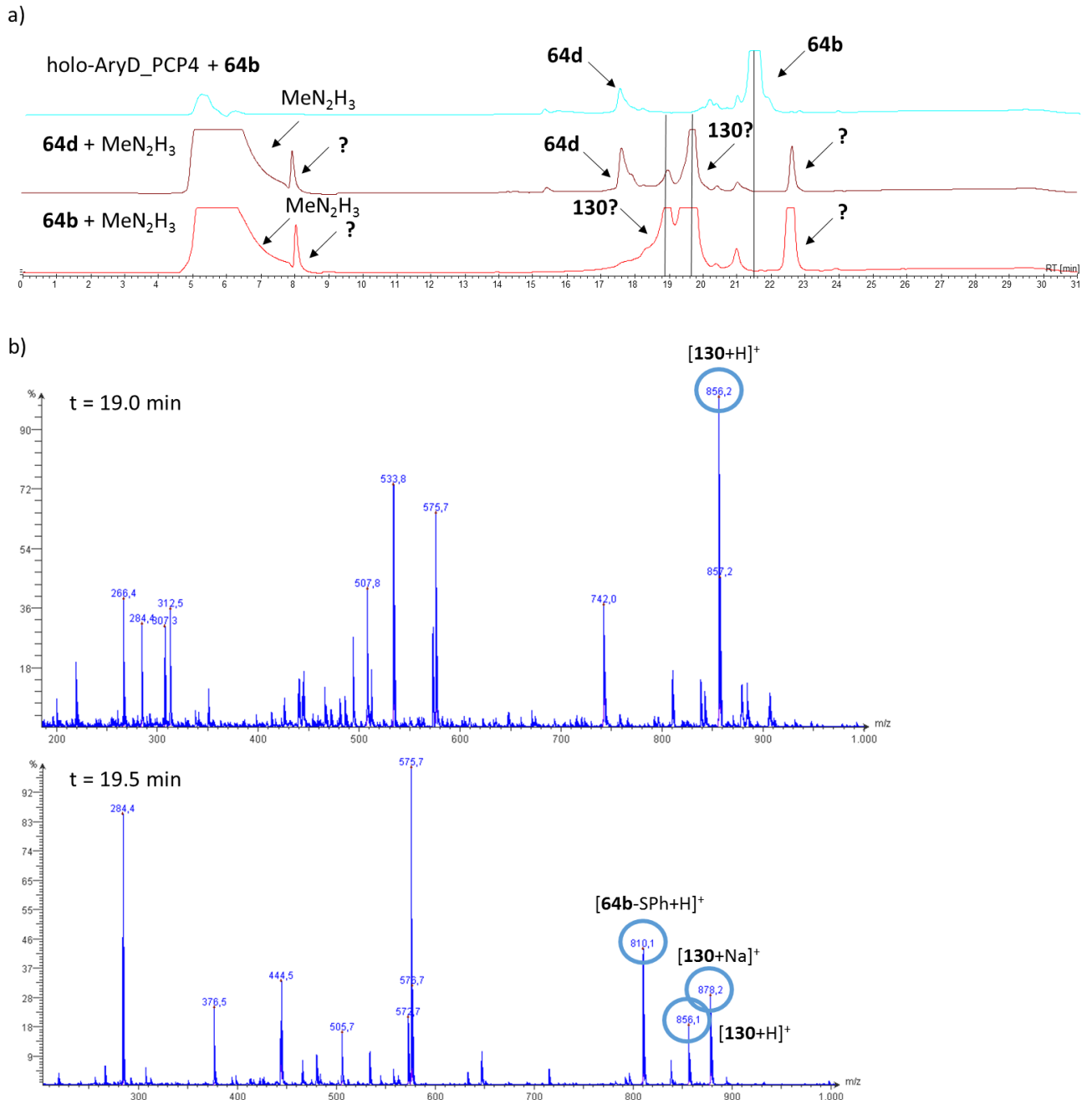


Abbildung 38. a) UV-Spur der Beladung der PCP-Domäne mit **64b** und Abspaltung durch Methylhydrazin; b) Massespektren der UV-Signale bei t = 19 und t = 19.5, m (**64b**) = 918.5 g/mol; m (**130**) = 854.5 g/mol.

Zur Isolierung von **64d** wurden drei verschiedene Aufreinigungsmethoden getestet. Als Erstes sollte mittels Vivaspin-Zentrifugatoren mit einem MWCO von 10000 Da das Enzymgebundene Substrat vom freien Thioester **64b**, sowie von anderen niedermolekularen Verunreinigungen abgetrennt werden.^[164] Nach der Konzentration der Reaktionslösung und

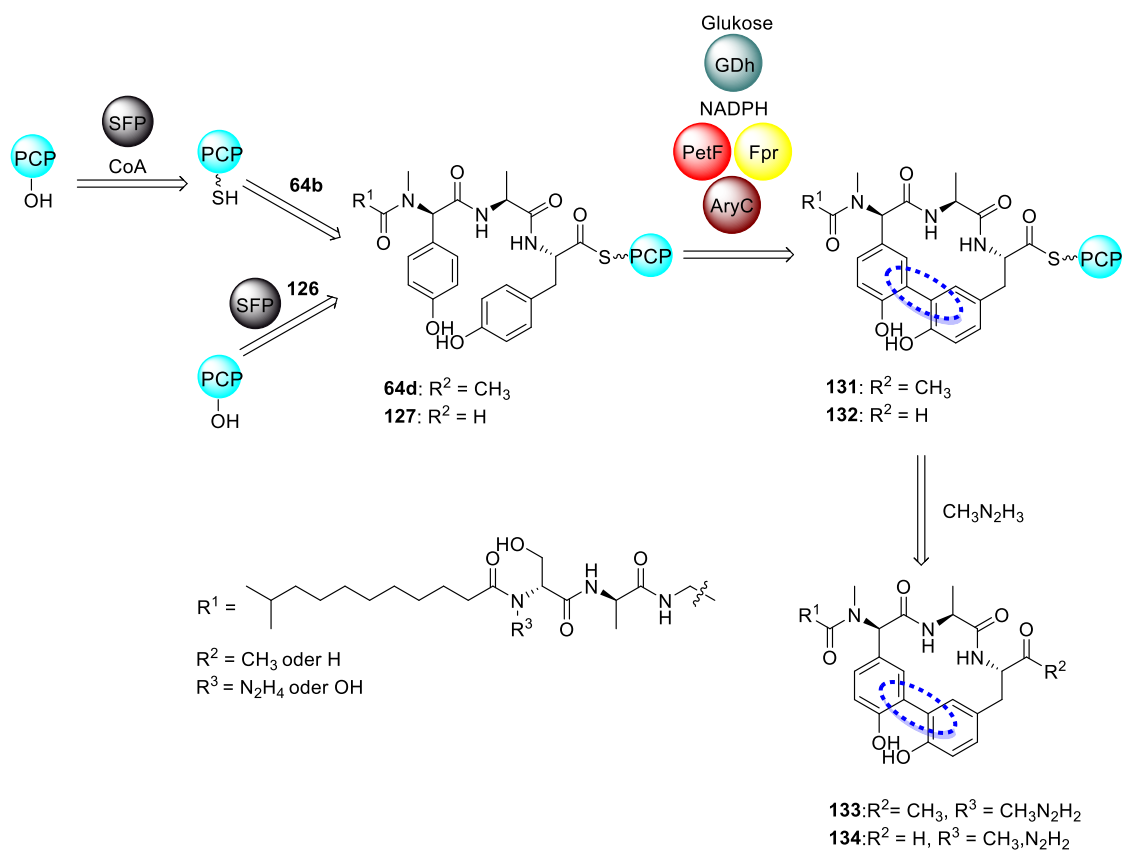
Chemo-enzymatische Totalsynthese der Arylomycine (60a-e)

dem zweifachen Waschen mit Tris-HCl-Puffer wurde im UV-Chromatogramm kein Signal für **64d** identifiziert. Möglicherweise ist der Substrat-Enzym-Komplex nicht stabil genug, um mehrere Konzentration-/Waschzyklen zu überstehen. Es konnten ebenfalls keine Massen für die freie PCP-Domäne identifiziert werden. Daher wurde als zweites versucht, das Produkt mittels semi-präparativer HPLC zu isolieren.^[167] Massenspektrometrische Analysen zeigten jedoch, dass es sich bei keiner der isolierten Substanzen um das Substrat **64d** handelte. Es wurden nur nicht-charakterisierbare Molekülmassen detektiert. Da die Lösungsmittel der HPLC mit 0.1% Trifluoressigsäure (TFA) gepuffert waren, ist es denkbar, dass die Säure die Hydrolyse des Enzym-Substrat-Komplexes katalysiert, so dass eine Isolierung des intakten Komplexes nicht möglich war. Dementsprechend wurde die Aufreinigung mittels semi-präparativer HPLC mit Laufmitteln ohne Säurezusatz wiederholt. Hierbei ließen sich jedoch keine Signale mehr beobachten, was ein Indiz dafür sein könnte, dass das Substrat **64d** bei der Verwendung von Laufmittel ohne Säurezusatz nicht von der Säule eluiert werden kann. Als Letztes wurde versucht, das Substrat **64d** mittels Affinitätschromatographie zu isolieren. Dafür wurde Ni-NTA zur Reaktionslösung gegeben und 2 h auf Eis inkubiert. Durch Auftragung der Lösung auf eine Ni-NTA-Säule sollten die Verunreinigungen entfernt und das His₈-getaggte Protein mit dem Substrat zum Schluss eluiert werden, analog zur Standard-Proteinaufreinigung. Aber auch bei dieser Methode wurde das gewünschte Produkt nicht erhalten.

Da keine Methode zur Isolierung der beladenen PCP-Domäne **64d** etabliert werden konnte, wurde beschlossen, die enzymatische Biarylkupplung zunächst dennoch ohne zuvorige Aufreinigung des Bealdungsexperimentes durchzuführen. Auch durch das Vorhandensein des freien Substrates, sollte die Biarylkupplung, katalysiert durch AryC an dem gewünschten beladenen Substrat stattfinden. Durch die folgende Abspaltung mit Methylhydrazin kann das gekuppelte Produkt von dem freien, nicht oxidierten Produkt mittels LC-MS unterschieden werden.

Ausgehend von den beiden Substraten **64b** und **126** wurde die PCP-Beladung, die Biarylkupplung zu **131** und **132** sowie die darauffolgende Abspaltung der Kupplungsprodukte **133** und **134** von der PCP-Domäne durchgeführt (Schema 28).

Chemo-enzymatische Totalsynthese der Arylomycine (60a-e)



Schema 28. Enzymatische Biarylkupplung des PCP-gebundenen Substrates und Abspaltung durch a) Methylhydrazin und b) TE-Domäne.

Zum einen wurde das Thiophenol-Substrat **64b** verwendet, das nach der Aktivierung der apo-PCP-Domäne mittels Sfp und CoA auf das Enzym geladen wurde. Zum anderen wurde direkt das CoA-Derivat **126** verwendet, wobei die beladene Carrier-Domäne in einem Schritt ausgehend von der apo-PCP-Domäne erhalten wurde (Kapitel 3.2.3.1).

Nachdem die Herstellung der beladenen PCP-Domänen **64d** und **127** mittels LC-MS nachgewiesen wurde, wurden frisch aufgereinigtes und rekonstituiertes AryC (8 μM), PetF (20 μM), Fpr (10 μM), NADPH (1 mM), Glukose (1 mM) und GDh (20 μM) zum vorherigen Beladungsassay zugegeben und für 90 min bei 30 °C inkubiert.^[138] Anschließend wurde der Reaktionslösung eine wässrige 50%-Lsg. Methylhydrazin zugegeben. Es wurde nochmals 30 min bei 30 °C schüttelnd inkubiert und die Ergebnisse mittels LC-MS analysiert (Abbildung **39**). Die Ergebnisse dieser Umsetzung mit dem Thioester **64b** waren analog der Testabspaltung (Abbildung 38).

Chemo-enzymatische Totalsynthese der Arylomycine (60a-e)

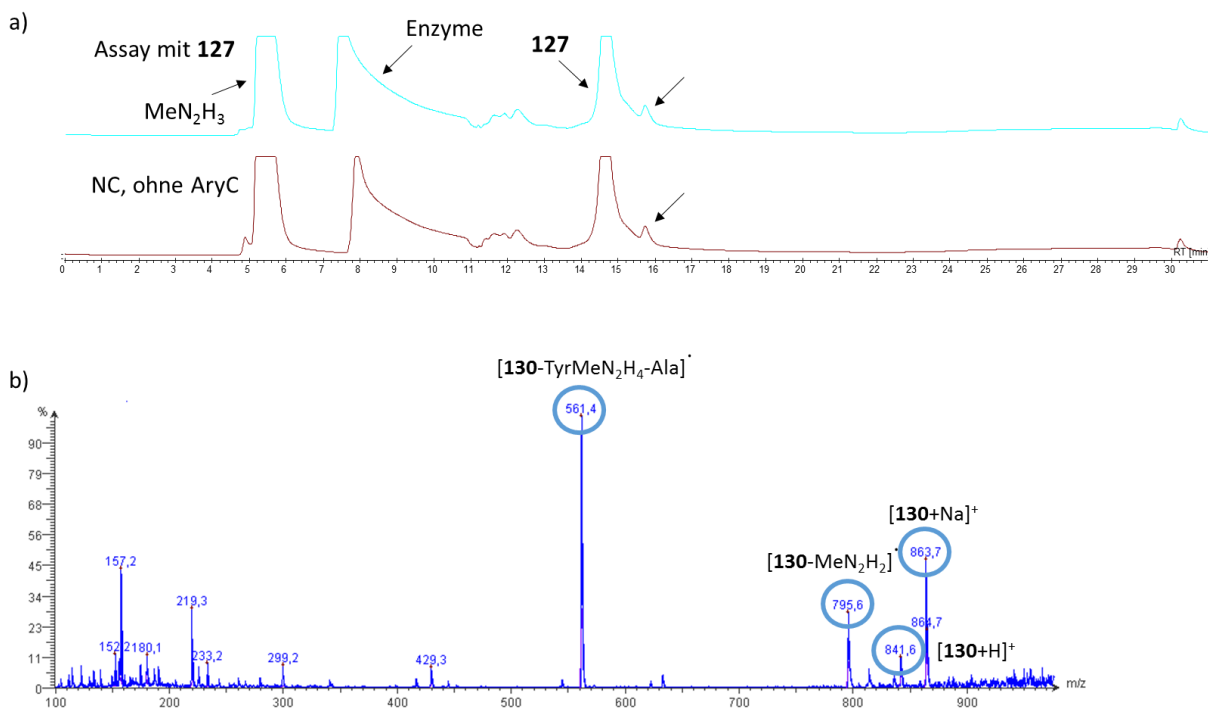


Abbildung 39. a) Vergleich der UV-Chromatogramme der enzymatischen Umsetzung des CoA-Derivats **126** mit der Negativkontrolle ohne AryC; b) Massenspektrum des neu entstandenen Signals; Masse des ungekoppelten Hydrazinadduktes; $m = 841.0$.

Nachdem das PCP-Addukt **64d** gebildet wurde, konnte nach der Abspaltung lediglich ein Signal für das ungekoppelte Produkt **130** charakterisiert werden. Ein mögliches Kupplungsprodukt **133** wurde nicht gebildet. Bei der Verwendung des CoA-Derivats **126** konnte mittels LC-MS das Auftreten eines neuen Signals bei einer Retentionszeit von 15.8 min beobachtet werden. Massenspektrometrische Analysen zeigten jedoch, dass es sich um das nicht-gekoppelte Methylhydrazinaddukt **134** handelte. Dieses neu-entstehende Signal konnte auch in der Negativkontrolle beobachtet werden und dem nicht gekoppelten Produkt zugeordnet werden.

Bislang konnte die Biarylkupplung, katalysiert durch AryC, an dem auf die PCP-geladenen Substrat noch nicht erfolgreich durchgeführt werden. Eine naheliegende Erklärung wäre, dass das Elektronentransfersystem nicht hinreichend gut funktioniert. Obwohl die Aktivitäten von PetF, Fpr und GDh von Herrn René Richarz einzeln getestet wurden, wäre es möglich, dass der Elektronenaustausch mit AryC und dem Elektronentransfersystem nicht stattfindet. Daher sollten in folgenden Umsetzungen andere Coenzyme verwendet werden, wie beispielsweise Adrenoxin und Adrenoxin-Reduktase^[168-169], Putidaredoxin und Putidaredoxin-Reduktase^[170] oder HaPux und HaPuR^[171], die ebenfalls als Elektronentransfersystem eingesetzt werden. Da der pH-Wert, der verwendete Puffer sowie die Temperatur bei enzymatischen Reaktionen

eine wichtige Rolle spielen, ist es auch denkbar, dass die ausgewählten Bedingungen für AryC und das Regenerationssystem nicht optimal waren. Weiterhin wurde für die Umsetzungen ausschließlich AryC_{lang} verwendet. Es besteht die Möglichkeit, dass das exprimierte Enzym eine im Vergleich zum natürlichen Enzym längere Proteinsequenz aufweist und dadurch das Substrat bzw. das Elektronentransfersystem nicht hinreichend binden kann. Dementsprechend könnte für folgende Assays AryC_{kurz} eingesetzt werden. In zukünftigen Versuchen sollte ferner getestet werden, das PCP-beladene Substrat **127** vor den Kupplungsversuchen aufzureinigen. Möglicherweise wird ausschließlich noch vorhandenes, freies CoA-Substrat **126** mit dem Methylhydrazin umgesetzt. Dementsprechend könnte das PCP-beladene Substrat **127** gekuppelt, jedoch nicht abgespalten worden sein. Bislang war es weder möglich das gekuppelte, noch das an der PCP-befestigte Substrat zu charakterisieren. Neben den bereits getesteten Methoden könnte die Festphasenextraktion eine Alternative zur Aufreinigung des Substrats darstellen. Diese wurde bereits in ähnlichen Umsetzungen von *Cryle et al.* verwendet.^[166]

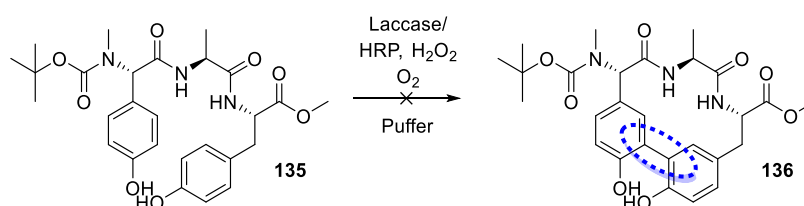
3.2.4 Laccasen als Katalysatoren zur Knüpfung von Biarylbindungen

Parallel zu den Biarylkupplungsassays mittels P450-Oxygenase wurde versucht, die enzymatische Reaktion mit Laccasen durchzuführen. Laccasen gehören zur Gruppe der Oxidoreduktasen und sind Kupfer-haltige Enzyme (Kapitel 1.4).^[172] Laccasen aus Pilzen sind dafür bekannt, dass sie Lignin abbauen, wohingegen Pflanzenlaccasen in der Ligninpolymerisation eine wichtige Rolle spielen.^[63] Weiterhin können sie organische und anorganische Substanzen oxidieren. Sie haben eine geringe Substratspezifität, benötigen nur Sauerstoff als Cofaktor und wurden daher bereits mehrfach in der organischen Chemie als Oxidationsmittel eingesetzt.^{[172],[173-175]} Für die vorliegende Arbeit war es jedoch vor allem interessant, dass diese „blauen Enzyme“ auch bekannt dafür sind, Biarylbindungen knüpfen zu können.^[176] Neben den Laccasen ist die Meerrettichperoxidase (HRP, engl. Horse Radish Peroxidase) ebenso in der Lage mit H₂O₂ als Cofaktor Bindungsbildung zwischen zwei Arylen zu katalysieren.^[177] Die Verwendung von Laccasen, beziehungsweise von der Meerrettichperoxidase, als Katalysatoren für die Biarylbildung hat zum einen den Vorteil, dass kein komplexes Elektronentransfersystem zur Reaktion benötigt wird. Zum anderen kann die

Chemo-enzymatische Totalsynthese der Arylomycine (60a-e)

Biarylbindung am freien Peptid, oder an freien Aminosäuren erzeugt werden, ohne dass das komplette lineare Molekül an einer PCP-Domäne befestigt werden müsste. Diese Vorteile führen dazu, dass weniger Reaktionsschritte für die chemo-enzymatische Totalsynthese der Arylomycine benötigt werden.

Als Edukt für die Biarylkupplungsreaktionen sollte der vereinfachte Biarylbaustein **135** dienen, der von Frau Dr. Hong synthetisiert wurde (Schema 29).^[130] Es wurden drei verschiedene Laccasen aus *Trametes versicolor* und *Agaricus bisporus* aus Pilzen sowie die pflanzliche Laccase aus *Rhus vernificera* neben der HRP verwendet.



Schema 29. Reaktion mit dem vereinfachten Arylomycin-Biaryl-Baustein **135** und der Laccasen sowie der HRP.

Bei der Umsetzung mit Laccasen aus *Rhus vernificera* und *Agaricus bisporus* nach Literaturvorschrift von *Constantin et al.*^[174] beziehungsweise *Shiba et al.*^[178] wurde keine Reaktion beobachtet. Auch der Zusatz von 2,2,6,6-Tetramethylpiperidinyloxy (TEMPO), das als Mediator für Laccasen eingesetzt wird, konnte nicht zum Gelingen der Biarylkupplung beitragen.^[179] Die Zugabe von 3.2 U/mL Laccase aus *T. versicolor* zu 1 mg/mL Edukt **135** in 1 mL Phosphatpuffer (0.1 M, pH = 7.4) führte zu einer Reaktion.^[180] Zu dem selben Ergebnis führte die Verwendung von 0.5 mg/mL Substrat und 0.37 U/mL Laccase aus *T. versicolor* in Citrat-Phosphatpuffer bei einem pH-Wert von 5.5 (Abbildung 40).^[181] Die Reaktionen wurden mittels HPLC nach 24 h überprüft. Dabei zeigte sich die Bildung mehrerer Produkte bei einer Retentionszeit von 15-18 min. Bei der Durchführung der Reaktion des Biaryl-Bausteins **135** (0.5 mg/mL) mit der HRP (45 U/mL) und H₂O₂ (2.5 mM) in 1 mL Citrat-Phosphatpuffer bei pH = 5.5 wurde ein ähnliches Chromatogramm wie bei der Verwendung der Laccase aus *T. versicolor* erhalten (Abbildung 40). Bereits nach 90 min wurde eine fast vollständige Umsetzung des Edukts **135** und die Bildung mehrerer Produkte beobachtet. Da die Laccasen, sowie die HRP, nicht nur Biarylbindungen, sondern auch Biaryletherbindungen knüpfen können, bestand die Möglichkeit, dass diese Produkte aus einem Gemisch verschieden verknüpfter Edukte **135** darstellt. Während der LC-MS-Messung war das Auftreten zweier

Chemo-enzymatische Totalsynthese der Arylomycine (60a-e)

Massen ($m/z = 957$ und $m/z = 1079$) im ersten neuen Peak bei $t = 16$ min dieses Gemisches auffällig. Um genauer zu analysieren, welche Produkte bei der enzymatischen Umsetzung entstanden, wurde eine LC-HRMS-Messung durchgeführt (A = Wasser + 0.05% TFA, B = ACN + 0.05% TFA, 0-30 min 30-100% B; Säule: RP C-18, 120 Å). Diese ergab, dass die Laccase sowie die HRP eine intermolekulare Biarylbindungsknüpfung katalysieren, wodurch sich Dimere, Tetramere und Pentamere bildeten. Das Natriumaddukt des Dimers besitzt eine Masse von $m/z = 1079$, die zuvor bereits bei der LC-MS beobachtet werden konnte. Die Masse von $m/z = 957$ entspricht der Masse des Dimers mit Verlust einer Boc-Gruppe.

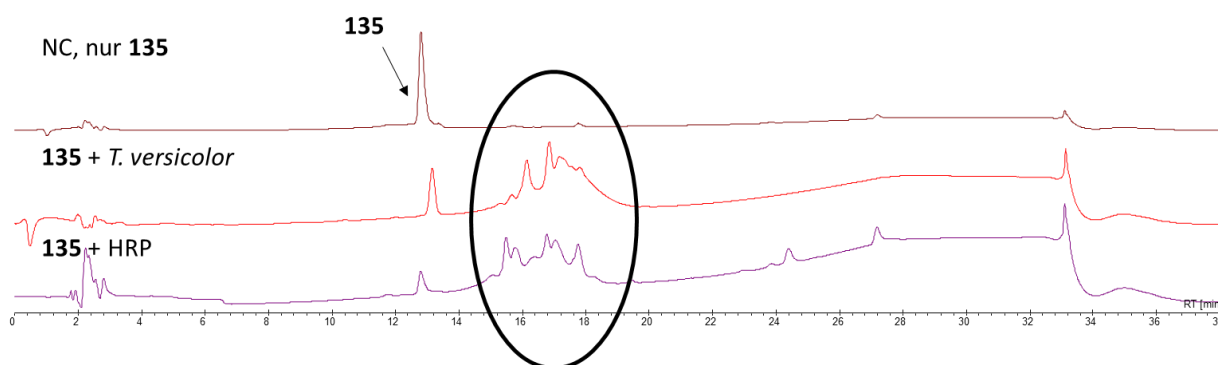


Abbildung 40. UV-Chromatogramme (220 nm) der Umsetzung von **135** mit der Laccase aus *T. versicolor* sowie HRP in Citrat-Phosphatpuffer pH = 5.5. Der schwarze Pfeil zeigt das Edukt, der schwarze Kreis die neu entstehenden Produkte.

Um die intramolekulare der intermolekularen Reaktion vorzuziehen, wurde für die Assays eine geringere Konzentration an **135** gewählt und das Enzym-Substrat Verhältnis um mehr als das Zehnfache gesteigert. Es wurden jeweils 0.53 mg/mL **135** in 10 mL Puffer gelöst und 0.37 u/mL Laccase aus *T. versicolor*, beziehungsweise 45 U/mL HRP und 2.5 mM H₂O₂ eingesetzt und 48 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Die HR-LC-MS-Analysen ergaben die selben Ergebnisse wie in den zuvor durchgeführten Assays. Obwohl die Konzentration erniedrigt wurde, konnte die unerwünschte intermolekulare Reaktion nicht vermieden werden.

Durch die Verwendung der Laccasen war es nicht möglich, die Biarylbindung in dem linearen Peptid **135** intramolekular zu knüpfen. Eine alternative Methode würde darin bestehen, die Biarylbindung zunächst zwischen den beiden Aminosäuren L-Hydroxyphenylglycin (HPG) und L-Tyrosin (Tyr) zu installieren und anschließend die Peptidkette aufzubauen. Aus diesem Grund wurden verschiedene geschützte sowie ungeschützte, einzelne Aminosäuren für die enzymatische Biarylkupplung eingesetzt. Als Katalysator wurde die Laccase aus *T. versicolor* eingesetzt (Tabelle 14). Die Konzentration der Edukte, die zuvor in 200-500 µL MeOH gelöst

Chemo-enzymatische Totalsynthese der Arylomycine (60a-e)

wurden, betrug 1 mg/mL. Die Reaktionen wurden im Citrat-Phosphatpuffer bei pH = 5.5 und 37 °C über Nacht durchgeführt. Das Ergebnis der Umsetzung von D-HPG und L-Tyr (Eintrag 1, Tabelle 14) konnte nicht ermittelt werden, da sich nach Zugabe des Puffers zur freien Aminosäure L-Tyr ein Niederschlag bildete und sich nicht mehr lösen ließ. Nur bei der Verwendung von D-HPG-OMe mit Boc-Ala-L-Tyr-OMe (Eintrag 4, Tabelle 14) wurde die Masse des vermeintlichen Produkts identifiziert (Abbildung 41).

Tabelle 14. Edukte der Laccase-vermittelten Biarylkupplungsexperimente.

	Substrat A	Substrat B
1	D-HPG	L-Tyr
2	Boc-D-HPG	Boc-Ala-L-Tyr-OMe
3	Boc-D-HPG	L-Tyr-OMe
4	D-HPG-OMe	Boc-Ala-L-Tyr-OMe

Dieser ist im Vergleich zu den anderen nicht zuordbaren Ionenpeaks jedoch sehr klein. Veränderte Reaktionsbedingungen, beziehungsweise der Einsatz anderer Schutzgruppen sind Möglichkeiten, um die Entstehung und die Ausbeute des Biarylproduktes zu verbessern.

Diese Arbeiten und weitere Möglichkeiten Laccase-katalysierte Biarylbindungen zu generieren, um diese Reaktionen in der chemoenzymatischen Totalsynthese der Arylomycine einzusetzen, wurden von Frau Michaela Geißler im Rahmen ihrer Masterarbeit basierend auf den hier erbrachten Grundlagen weiter eingehend behandelt.^[182]

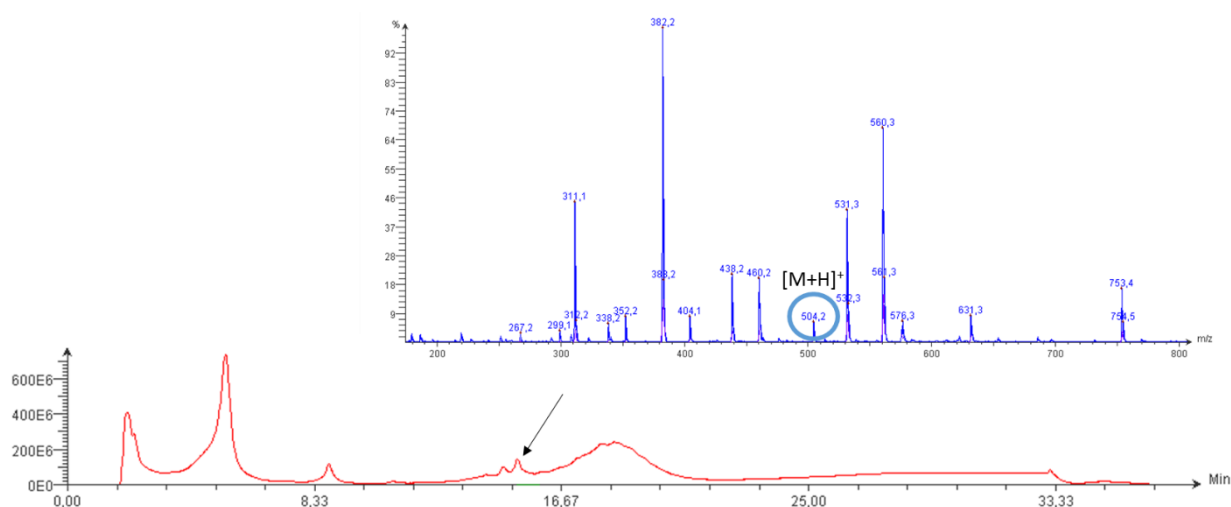


Abbildung 41. UV-Spur (220 nm) der Umsetzung von D-HPG-OMe mit Boc-Ala-L-Tyr-OMe und das Massenspektrum eines ausgewählten UV-Peaks, blau umrandet ist die Masse des erwünschten Biarylproduktes: 503.55 g/mol.

3.3 Aufklärung der Biosynthese von Ikarugamycin

3.3.1 Klonierung von *ikaA*, *ikaAB* und *ikaABC*

Die PTMs sind Naturstoffe, die nicht nur ein komplexes Strukturgerüst aufweisen, sondern auch eine Vielzahl pharmakologischer Aktivitäten aufweisen. Obwohl sie dadurch für medizinische Zwecke sehr interessante Verbindungen darstellen, ist bisher noch wenig über ihr Biosynthese bekannt (Kapitel 2.5). Die Gencluster der PTMs zeigen untereinander hohe Homologien auf und unterscheiden sich in der Anzahl an reduzierenden oder oxidierenden Enzymen, die das bei allen PTMs vorhandene Gen der *iPKS/NRPS* flankieren. Ikarugamycin (**66**) besitzt das kleinste, bisher bekannteste Gencluster, bestehend aus der *iPKS/NRPS* *ikaA*, der FAD-abhängigen Oxidoreduktase (FAD) *ikaB* und der Alkoholdehydrogenase (AD) *ikaC*.^[183]

In Zusammenarbeit mit Frau Dr. Antosch sollten Konstrukte mittels homologer Rekombination hergestellt werden, die entweder nur *ikaA* oder *ikaAB*, sowie alle drei Gene *ikaABC* enthielten. Heterologe Expressionen in *E. coli* und in Streptomyceten sollten die genauen Funktionen der einzelnen Enzyme bestimmen und so zur Aufklärung der Biosynthese von Ikarugamycin (**66**) führen.

Von Dr. Janine Antosch wurde eine pCC1Fos-basierende, genomische Library von *Streptomyces* sp. Tü 6239 (*Epicentre*, CopyControl™ Fosmid Library Production Kit) angefertigt. Auf einem Fosmid, *ika-Fos8*, wurde das putativ komplette Gencluster von Ikarugamycin (**66**) identifiziert.^[183] Zunächst sollten mittels PCR unter Verwendung der *Phusion*-Polymerase die zur homologen Rekombination^[184] benötigten DNA-Sequenzen aus dem *ika-Fos8* amplifiziert werden. Dafür wurden Primer erstellt, die an den Anfang der *iPKS/NRPS* (*ika* PKS/NRPS_1, Primer 29 und 30, Kapitel 4.2, Tabelle 17) binden sowie an die jeweiligen Enden der Sequenz von *ikaA*, (*ika* *iPKS/NRPS*, Primer 31 und 32) *ikaB* (*ika* FAD, Primer 33 und 34,) und *ikaC* (*ika* AD, Primer 35 und 36). Die ersten Versuche die Gene mit der Taq-Polymerase unter Standardbedingungen zu amplifizieren führten entweder zu einer geringen Konzentration an PCR-Produkt (FAD) oder zu gar keiner Amplifikation (*iPKS/NRPS* 1, *iPKS/NRPS*2 und AD). Auch die Verwendung der *Pfu-X*-Polymerase, sowie eine Erhöhung der Konzentration an DMSO führten nicht zu den erwarteten PCR-Produkten. Eine „two-step-PCR“

Aufklärung der Biosynthese von Ikarugamycin

(Kapitel 4.5.11) führte letztendlich zu der gewünschten Amplifizierung der Gene (Abbildung 42).

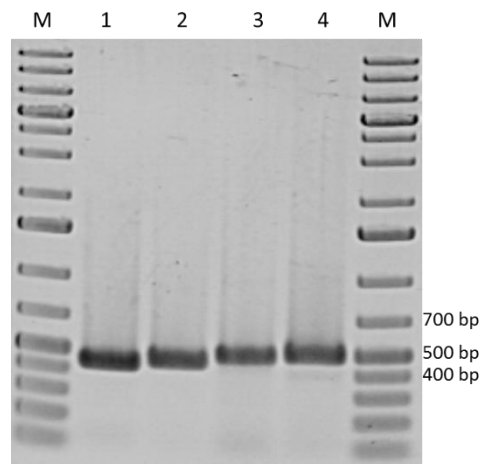
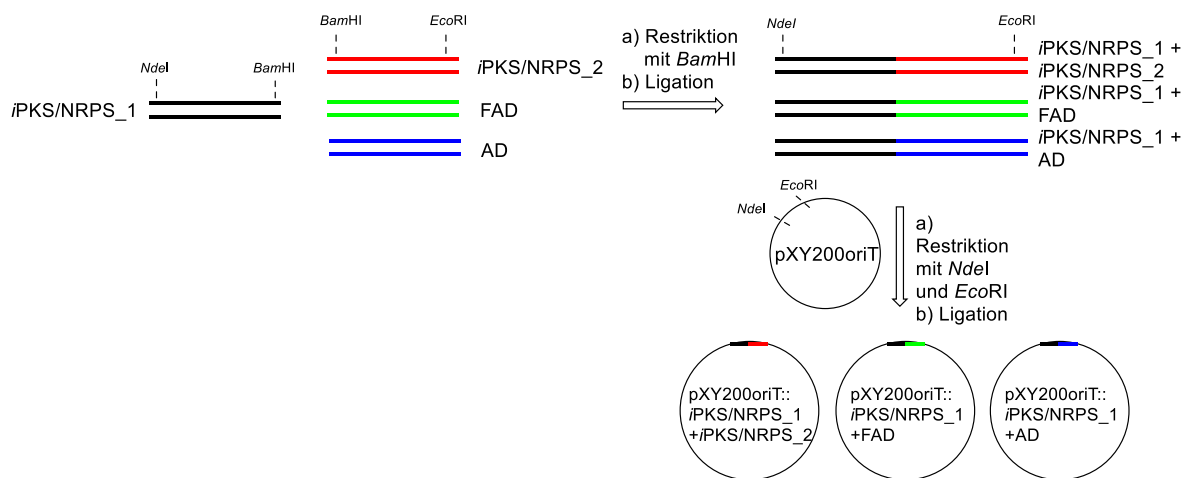


Abbildung 42. 1 % Agarose-Gel von der Amplifikation verschiedener Gene von Ikarugamycin mittels Two-Step-PCR, 1: *iPKSNRPS_1*, 2: AD, 3: FAD, 4: *iPKS/NRPS_2*, M = Generuler 1 kbplus DNA Ladder; Größen: *iPKS/NRPS* = 430 bp, FAD = 480 bp, AD = 450 bp, *iPKS_NRPS_2* = 487 bp.

Durch die verwendeten Primer wurden den Amplikons an jedem Ende eine Erkennungssequenz für Restriktionsenzyme eingefügt (Schema 30). Zunächst wurden alle PCR-Produkte mit *Bam*HI geschnitten. Anschließend wurden die jeweiligen Fragmente zu linearen Konstrukten ligiert. Diese besaßen die Anfangssequenz der *iPKS/NRPS* und die Schlussequenz des jeweiligen Gens, *ikaA*, *ikaB* und *ikaC*. Nach Restriktionsverdau der Konstrukte, sowie des shuttle-Vektors pXY200oriT mit *Nde*I und *Eco*RI folgte die Ligation zu den gewünschten Plasmiden.



Schema 30. Schematische Darstellung der Konstruktion der Plasmide für die folgende homologe Rekombination.

Aufklärung der Biosynthese von Ikarugamycin

Bei der Konstruktion der Plasmide musste auf die Reihenfolge der Restriktionen geachtet werden. Ein erster Restriktionsansatz mit allen drei Restriktionsenzymen, *Bam*HI, *Nde*I und *Eco*RI führte bei der anschließenden Ligation dazu, dass sich mehrere Ligationsprodukte bildeten. Wahrscheinlich kommt es durch das Vorhandensein mehrerer aktiver Schnittstellen zu ungewünschten Selbstligationsprodukten. Die fertigen Plasmide wurden in elektrokompetente *E. coli* DH5 α -Zellen transformiert und für die Durchführung der homologen Rekombination an Frau Dr. Antosch übergeben.

Synthese von 6-Chlorotryptophan

3.4 Synthese von 6-Chlorotryptophan zur Aufklärung der Biosynthese von JBIR-35 (135)

Das chlorierte NRPS-Produkt JBIR-35 (**137**) erlangte Aufmerksamkeit wegen seines 4-Methyloxazolidon-Strukturelements, das bislang selten in Naturstoffen gefunden wurde (Abbildung 43).^[185] Häufiger treten 5-Methyloxazolinringe oder 4-Methylthiazoncyclen auf, wie beispielsweise in der Struktur des Siderophores Yersiniabactin (**39**).^[186]

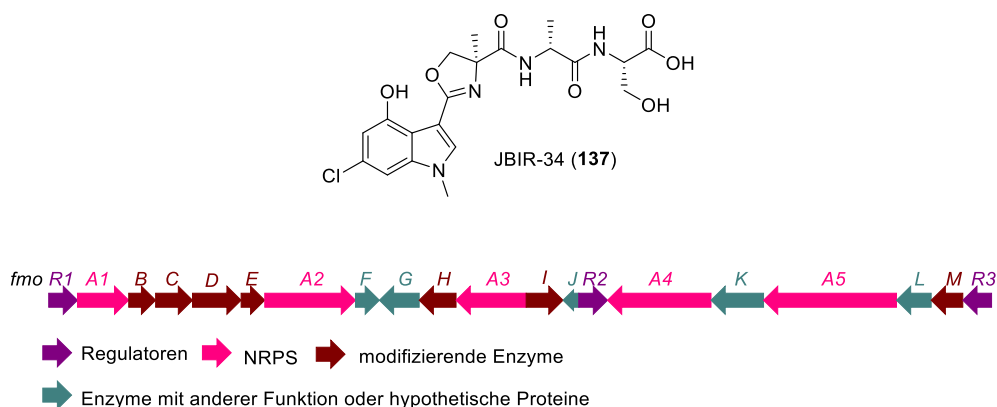
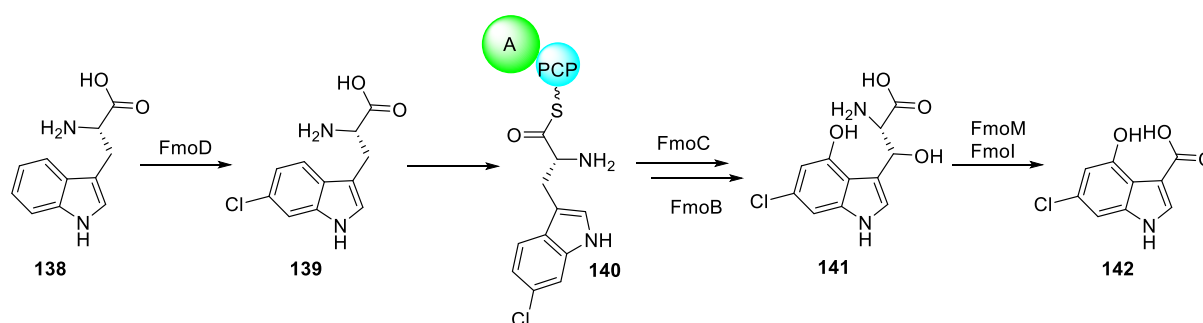


Abbildung 43. Strukturformel und Gencluster von JBIR-34 (**137**).^[185]

Für unsere Arbeitsgruppe ist dieser Naturstoff **137** von Interesse, da eine ungewöhnliche P450-Oxygenase im putativen Gencluster enthalten ist. Neben diesem Cytochrom besteht das Gencluster unter anderem aus fünf NRPS-Genen und einer Tryptophan Halogenase.^[185] Nachdem *Muliandi et al.* das Gencluster vollständig annotieren, wurde eine Biosynthese des Peptids **137** postuliert. Diese beginnt mit der Synthese von 6-Chloro-4-hydroxyindol-3-carbonsäure (**142**), die auf die zweite NRPS, *fmoA2*, als erster Baustein beladen wird (Schema **31**). Die Biosynthese dieses Substrats **142** startet mit einer Chlorierung der natürlichen Aminosäure L-Tryptophan (**138**) zu 6-Chloro-L-tryptophan (**139**), katalysiert durch die Halogenase FmoD (Schema 31). Nach Übertragung der Aminosäure **139** auf die bimodulare NRPS soll die P450-Oxygenase FmoC die Dihydroxylierung des Moleküls **140** katalysieren. Die alleinstehende TE-Domäne FmoB spaltet das Produkt **141** von der NRPS ab und das oxidierte Zwischenprodukt **141** wird durch eine retro-Aldol-Reaktion sowie einer weiteren Oxidation, katalysiert durch FmoM und FmoI zu der Carbonsäure **142** weiterprozessiert. Der für unsere Arbeitsgruppe interessanteste Schritt ist die Dihydroxylierung der an die PCP-gebundene

Synthese von 6-Chlorotryptophan

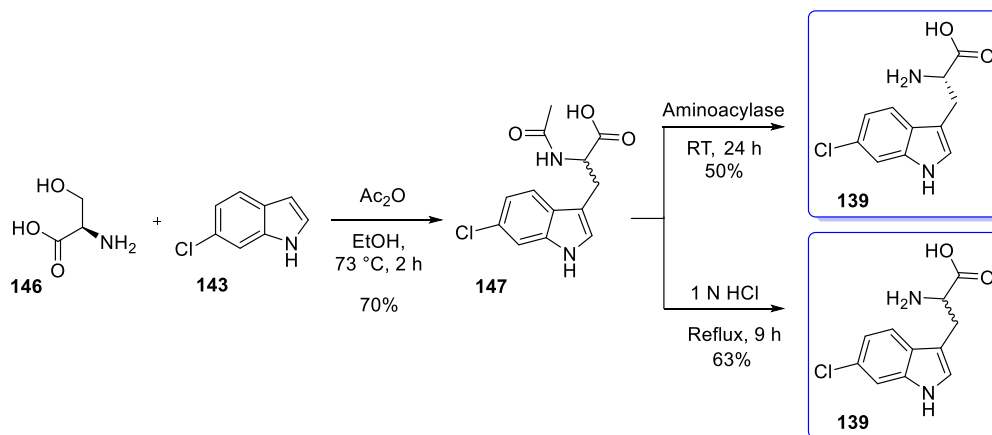
Aminosäure **140** durch das CYP450. *Muliandi et al.* postulierten, dass diese einzige Oxygenase für beide Chlorierung zuständig ist. Dies ist insofern ungewöhnlich, da die Oxidationen an zwei sehr unterschiedlichen Positionen des Moleküls stattfinden. Herr René Richarz sollte zunächst die Hydroxylierung der Aminosäure **138** *in-vitro* durchführen und anschließend die putative enzymatische Dihydroxylierung durch die P450-Oxygenase FmoC untersuchen. 6-Chloro-L-tryptophan (**139**) sollte dafür mittels chemischer Synthese hergestellt werden um zum einen als Standard für die Halogenierungsreaktion zu dienen und zum anderen als Edukt für die Oxidation eingesetzt zu werden.



Schema 31. Biosynthese von 6-Chloro-4-hydroxyindol-3-carbonsäure (**142**) ausgehend von L-Tryptophan (**138**).

6-Chloro-L-tryptophan (**139**) sollte aus 6-Chlorindol (**143**) und L-Serin (**73**) synthetisiert werden (Schema 32). **143** und **73** wurden mit Essigsäureanhydrid in Essigsäure erhitzt, so dass das *N*-Acetyl-geschützte 6-Chlorotryptophan (**144**) erhalten wurde.^[187] Die Entschützung der *N*-Acyl-Gruppe wurde zunächst mit einer 30% KOH-Lsg. durchgeführt, wobei das freie Amin **139** nicht erhalten wurde. Ebenso wurde durch die Verwendung von H₂O₂ und LiOH das gewünschte Produkt **139** nicht erhalten. Daraufhin wurde eine Aminoacylase getestet,^[188] die in der Lage ist, nur L-Aminosäuren zu deacylieren. Der Fortschritt der Reaktion wurde mittels HPLC verfolgt, wobei nach 24 h wie erwartet eine Umsetzung von ungefähr der Hälfte des Edukts **144**, das aus dem vorhergehenden Reaktionsschritt als Racemat erhalten wird, beobachtet wurde. Durch die Verwendung der Aminoacylase, konnte reines 6-L-Chlorotryptophan (**139**) erhalten werden. Weiterhin wurde 1 N HCl als Reagenz für die Deacylierung eingesetzt. Diese Säure wurde gegenüber der käuflich erwerblichen Aminoacylase aus Kosten- und Zeitgründen bevorzugt. Mit einer Ausbeute von 63% wurde nach Aufreinigung über MPLC das TFA-Salz 6-Chlorotryptophan-Trifluoroacetat **139** als Racemat erhalten. Das racemische Produkt **139** wurde Herrn René Richarz für enzymatische Versuche zur Verfügung gestellt.

Synthese von 6-Chlortryptophan

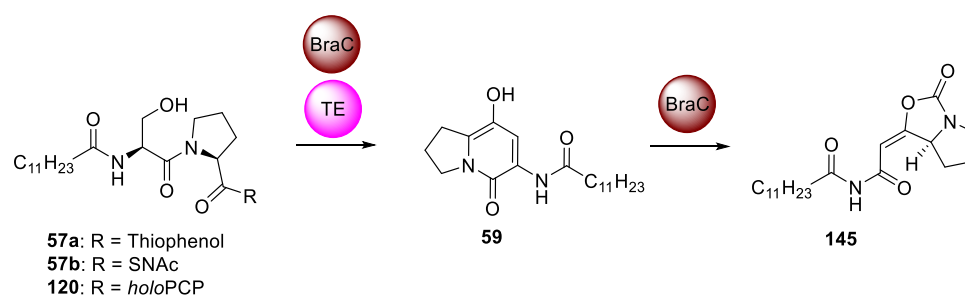


Schema 32. Reaktionssequenz zur Herstellung von 6-Chlortryptophan 139.

3.5 Zusammenfassung

Die Erforschung und Einführung neuer Antibiotika wird durch die steigende Resistenzentwicklung zunehmend zu einer Notwendigkeit. Nicht-ribosomale Peptide (NRP), Polyketide (PK) sowie deren Hybride sind Beispiele für Naturstoffe, die ein hohes biomedizinisches Potential aufweisen. Ihre teilweise sehr komplexen Strukturen verleihen den Sekundärmetaboliten dieser Verbindungsklassen ihre Bioaktivitäten, erschweren jedoch deren Totalsynthese, vor allem in industriellem Maßstab. Dementsprechend sind nicht nur die Wirkstoffe selbst, sondern auch ihre Biosynthesewege mit ihren beeindruckenden enzymkatalytischen Reaktionen von großem Interesse: die Biokatalysatoren, die für den Aufbau der Naturstoffe zuständig sind, genauer zu analysieren um ihre Fähigkeiten in chemoenzymatischen Totalsynthesen einzusetzen verspricht äußerst lohnenswert zu sein.

Ein Beispiel eines NRPs, das nicht nur durch sein pharmakologisches Potential, sondern auch aufgrund seiner außergewöhnlichen Biosynthese auf sich aufmerksam macht, ist Brabantamid A (**42a**). Das Lipocyclocarbamat **42a** wird von Pseudomonaden als Sekundärmetabolit produziert und ist ein vielversprechender Inhibitor der lipoprotein-assoziierten Phospholipase A2, einem putativ Arteriosklerose auslösendem Faktor. Die Biosynthese der Brabantamide **42a-c** wurde bislang noch nicht aufgeklärt. In der vorliegenden Arbeit wurden zwei postulierte Biosynthesen und die damit verbundenen enzymatischen Fähigkeiten der beteiligten Biokatalysatoren untersucht. Die Aufklärung der katalytischen Eigenschaften der Thioesterase-Domäne (TE-Domäne) sowie der putativen *Baeyer-Villiger*-Monooxygenase BraC aus dem Brabantamid-Gencluster standen dabei im Vordergrund der Arbeit (Schema 33).



Schema 33. Putative enzymatische Reaktionen der vereinfachten Vorstufe **57a,b** und **120** zu dem Brabantamid-Derivat **145** katalysiert durch die außergewöhnlichen Enzyme, BraC und der TE-Domäne, des Brabantamid-Genclusters.

Zusammenfassung

Zunächst wurden die *braB*_TE-Domäne, die *braB*_TE-PCP-Didomäne, die *braB*_PCP2-Domäne sowie *braC* aus der genomischen DNA (gDNA) von *Pseudomonas* sp. CH52 amplifiziert und in entsprechende Expressionsvektoren kloniert. Die Proteine wurden durch heterologe Expression in *E. coli* BL21(DE3) erhalten. Parallel wurden die vereinfachten Vorstufen für die enzymatischen Umsetzungen **57a-c** mittels Peptidkupplungschemie in der flüssigen Phase synthetisiert. Dabei wurde der Thiophenol-Thioester **57a** ausgehend von *tert*-Butyl-L-Serin (**77**) in sechs Schritten mit einer Gesamtausbeute von 11% erhalten. Der SNAc-Thioester **57b** wurde in vier Schritten ausgehend von L-Serin (**73**) mit einer Gesamtausbeute von 8% synthetisiert. Das CoA-Derivat **57c** wurde durch eine Austauschreaktion mit dem Thiophenol-Substrat **57a** erhalten. Mit den Edukten **57a,b** wurden zunächst enzymatische Umsetzungen mit der TE-Domäne, der TE-PCP-Didomäne sowie mit BraC durchgeführt. Die erhaltenen Ergebnisse deuteten auf keine Umsetzung zum Produkt hin. Daher wurde die terminale PCP-Domäne mit dem Substrat **57c** beladen und der PCP-Komplex **120** als Edukt für die enzymatischen Umsetzungen eingesetzt. Weder die einzelnen Enzyme, noch der gemeinsame Einsatz der Biokatalysatoren initiierten eine Umsetzung der Edukte **57a,b** sowie **120** zu den entsprechenden, postulierten Produkten oder anderen Substraten.

Die biosynthetische Zwischenstufe **59** soll nach *Gulder et al.* als auch laut *Magarvey et al.* das Edukt der Monooxygenase BraC darstellen. Zunächst sollte diese Verbindung durch Totalsynthese dargestellt werden. Aufgrund niedriger Ausbeuten der Reaktionssequenz wurde beschlossen, das putative biosynthetische Zwischenprodukt **59** nicht auf chemischem Wege zu synthetisieren, sondern es heterolog zu produzieren. Durch die Verbesserung der Expressionsbedingungen des Produktionsstamms, der das NRPS-Cluster der Pyrrolizidin-Alkaloide auf einem Plasmid beinhaltet, wurde der Bicyclus **59** in ausreichenden Mengen in *E. coli* DH10B::*mtaA* produziert. Die enzymatischen Umsetzungen des Edukts **59** mit BraC konnten bislang nicht zur Aufklärung der katalytischen Eigenschaften der Monooxygenase beitragen. Die geringe Löslichkeit des Edukts **59** in den Puffersystemen stellte das größte Problem dieser Reaktionen dar. Eine Verbesserung der Löslichkeit des Substrats **59** sowie veränderte Reaktionsbedingungen sollten in folgenden Arbeiten zur Aufklärung der biosynthetischen Funktion der *Baeyer-Villiger*-Monooxygenase führen.

Zusammenfassend gelang es in diesem Teilprojekt alle zur Aufklärung der Biosynthese der Brabantamide nötigen Substrate chemisch zu synthetisieren oder auf biotechnologischem

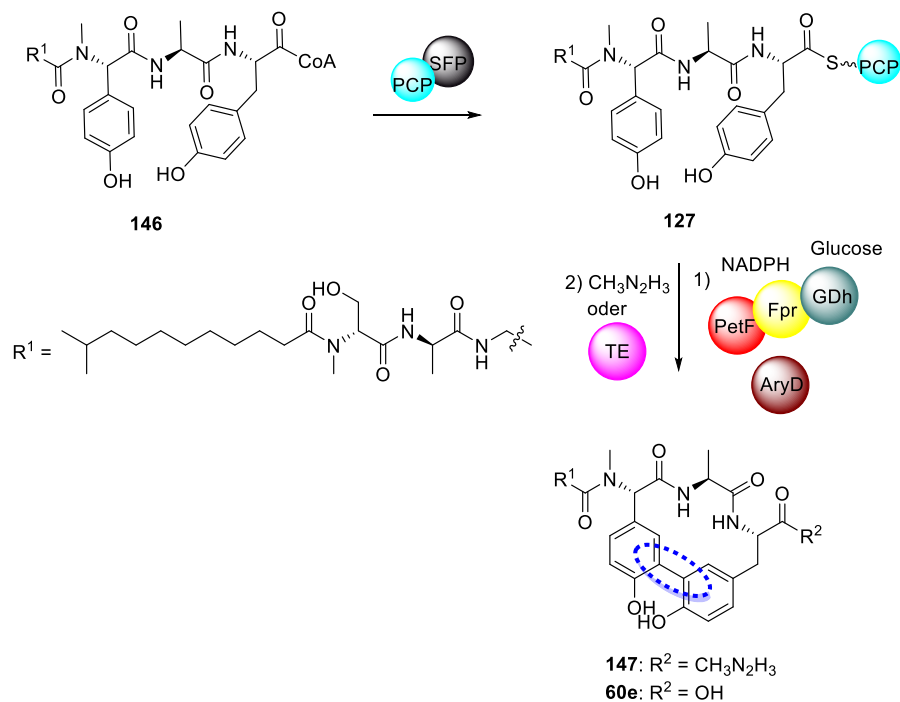
Zusammenfassung

Weg zu produzieren. Ferner konnten alle für diese Untersuchungen relevanten Biosyntheseenzyme kloniert, heterolog produziert und mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt werden. Dies, zusammen mit den umfangreichen, bereits durchgeführten Enzymassays, leistet einen wichtigen Beitrag zur weiteren Erforschung der komplexen Umlagerungskaskade in der Brabantamid-Biosynthese.

Arylomycine (**60a-l**) sind NRPS-abgeleitete Naturstoffe, die aufgrund ihrer diversen biologischen Aktivitäten interessante Verbindungen für die Forschung darstellen. Bisher ist die chemische Totalsynthese dieser strukturell anspruchsvollen Biaryl-haltigen Naturstoffe eine große Herausforderung. Die Einführung der Biarylbindung ist in den bislang publizierten, chemischen Totalsynthesen von *Zhu et al.* und *Romesberg et al.* hauptsächlich für die langen Synthesesequenzen und die geringen Gesamtausbeuten verantwortlich. Ein möglicher Ausweg ist die chemo-enzymatische Totalsynthese dieser Naturstoffe. In der vorliegenden Arbeit wurde ausgehend von der linearen Vorstufe des Arylomycins A2 (**60b**) ein Konzept zur Biarylknüpfung mittels der Arylomycin-P450-Oxygenase AryC entwickelt (Schema 34). Hierzu wurden die relevanten Enzyme des Arylomycin-Genclusters aus der gDNA von *Streptomyces roseosporus* NRRL 15998 amplifiziert und in entsprechende Expressionsvektoren kloniert. Anschließend wurden die P450-Oxygenase AryC, die TE-Domäne und die vier PCP-Domänen aus der AryD_NRPS in *E. coli* BL21(DE3) heterolog produziert. Die beiden PCP-Domänen aus der AryB_NRPS wurden mittels single-overlap-extension-PCR erfolgreich synthetisiert und anschließend kloniert, so dass diese ebenfalls durch heterologe Expression in *E. coli* BL21(DE3) erhalten werden konnten. Die Enzyme des Elektronenzuführungs- und Regenerationssystems PetF, Fpr und GDh, sowie die PPTase Sfp wurden bereits in vorherigen Arbeiten oder von Mitgliedern des Arbeitskreises erfolgreich kloniert und exprimiert. Zunächst wurden Kupplungsversuche der Edukte **63**, **64a** und **128** mit AryC und dem Elektronensystem unternommen. Da in diesen Ansätzen keinerlei Reaktionen nachzuweisen war, wurde angenommen, dass das Edukt an der terminale PCP-Domäne des Arylomycin-Genclusters gebunden sein muss, damit AryC es als Substrat erkennen und umsetzen kann. Dementsprechend wurde die AryD_PCP4-Domäne mit dem Thiophenol-Derivat **64b** sowie mit dem CoA-Substrat **126** erfolgreich beladen. Die Verwendung des Edukts **126** war effizienter,

Zusammenfassung

da hier die Aktivierung und die Beladung der PCP-Domäne in einem Schritt durchgeführt wurde.



Schema 34. Konzept zur enzymatischen Umsetzung der Arylomycin-Vorstufe **146** zu Arylomycin A2 (**60e**) oder seinem Hydrazin-Derivat **147**.

Anschließend wurden die besten Bedingungen für die Abspaltung des Endprodukts von der PCP-Domäne eruiert. Die Hydrolyse mittels TE-Domäne konnte bislang nicht erfolgreich durchgeführt werden. Eine Anpassung der Reaktionsbedingungen, vor allem bei der Wahl der Pufferkomponente sowie des pH-Werts, könnten in Zukunft bessere Ergebnisse liefern. Mit der Verwendung von Methylhydrazin wurde das Addukt **130** erhalten. Erste Kupplungsversuche mit dem, auf die PCP-geladenen Substrat **127** wurden ebenfalls durchgeführt. Mit den zur Verfügung stehenden Analysemethoden konnte bisher die Bildung der Biarylbindung jedoch nicht nachgewiesen werden.

Zusammenfassend konnten in diesem Teilprojekt neben den zwei Varianten der P450-Oxygenase AryC_{lang} und AryC_{kurz} auch alle sechs PCP-Domänen des Arylomycin-Genclusters erfolgreich kloniert und exprimiert werden. Weiterhin konnten optimale Bedingungen zur vollständigen Beladung der AryD_PCP4-Domäne mit dem CoA-Substrat **146**, sowie der folgenden Abspaltung mit Methylhydrazin etabliert werden. Durch diese Ergebnisse wird der Grundstein für eine chemo-enzymatische Totalsynthese der Arylomycine (**60a-I**) gelegt.

Zusammenfassung

Parallel zu den enzymatischen Umsetzungen mit der P450-Oxygenase wurde getestet, ob die Biarylbindung biokatalytisch mittels Laccasen oder der Meerrettichperoxidase (HRP) hergestellt werden können. Erste Experimente zeigten, dass beide Enzyme in der Lage sind, intermolekulare Biarylbindungen im Arylomycin-Baustein **135** (Abbildung 44) zu knüpfen. Obwohl bislang eine intramolekulare Biarylbindung chemo-enzymatisch nicht in nennenswerten Ausbeuten realisiert werden konnte, wurden optimale Reaktionsbedingungen für die Laccase aus *T. versicolor* sowie die HRP für Biarylbindungsknüpfungen ermittelt. Diese Ergebnisse dienen als Grundlage für weitere Arbeiten auf diesem Gebiet.

Ikarugamycin (**66**, Abbildung 44) gehört zu der Naturstoffklasse der polyzyklischen Tetramsäure-haltigen Macrolactame (PTM). Diese Naturstoffe überzeugen durch ihre vielfältigen Strukturgerüste und die damit verbundenen weitreichenden pharmakologischen Aktivitäten. Über die Biosynthese dieser interessanten Wirkstoffe war bislang noch nicht viel bekannt. Es wurde jedoch angenommen, dass sie durch ein in Bakterien einzigartiges, iteratives PKS/NRPS-System synthetisiert werden. Im Rahmen dieser Arbeiten wurden Beiträge zur Aufklärung der Biosynthese von Ikarugamycin (**66**) geleistet, die erstmalig Rückschlüsse auf die Bildung des carbacyclischen Systems in PTMs zulassen.

6-Chlorotryptophan (**139**, Abbildung 44) ist ein Zwischenprodukt der Biosynthese des Naturstoffes JBIR-35 (**137**). Zu diesem Intermediat **139** konnte eine Synthese etabliert werden. Dieses Substrat ermöglicht Herrn René Richarz die genaue Untersuchung der katalytischen Eigenschaften der P450-Oxygenase FmoC des JBIR-35-Genclusters.

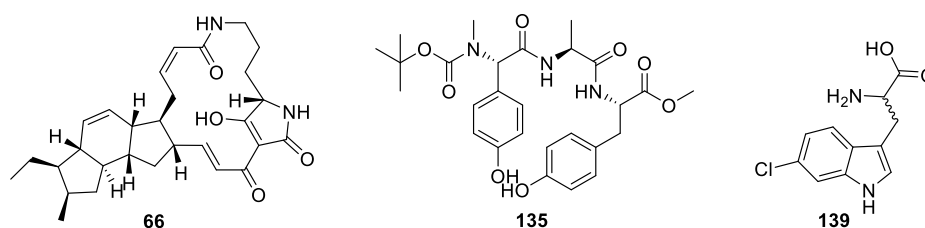
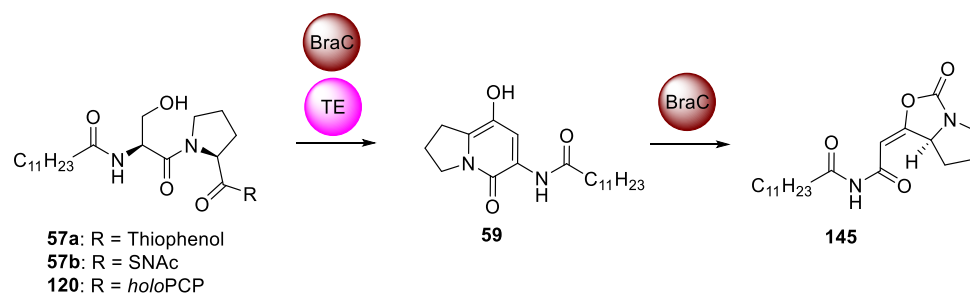


Abbildung 44. Struktur des Ikarugamycins (**66**), des Arylomycin-Bausteins **135**, der als Edukt für die Laccase-Umsetzungen eingesetzt wurde und von 6-Chlorotryptophan (**139**)

3.6 Abstract

The development of antibiotic resistance has led to the urgent need for the discovery and introduction of novel drugs. Two classes of biomedically relevant natural products are non-ribosomal peptides (NRP) and polyketides (PK) as well as their hybrids. The bioactivity of molecules of these compound classes are related to their complex chemical structures, which often also hinders the total synthesis of these natural products, especially at an industrial scale. Therefore, not only these bioactive molecules themselves, but also their biosynthetic pathways with their impressive enzyme-catalyzed reactions are of considerable interest: a detailed analysis of the biocatalysts responsible for the assembly of the natural products to facilitate their application in chemo-enzymatic total synthesis holds great promise.

Brabantamide A (**42a**) is one example of an NRP that not only exhibits important pharmacological potential, but is also constructed by an extraordinary biosynthetic pathway. The lipocyclocarbamat **42a** is produced by *Pseudomonas* and displays inhibitory activities towards lipoprotein-associated phospholipase A2 that causes inflammation in atherosclerosis plaques. The biosynthesis of the brabantamides (**42a-c**) remains elusive. In this work, two putative brabantamid biosynthetic enzymes were investigated. The elucidation of the catalytic function of the thioesterase domain (TE-domain) as well as of the putative *Baeyer-Villiger*-monooxygenase BraC from the brabantamid-genecluster were the main objectives of this thesis (Scheme 34)).



Scheme 34. Putative enzymatic reactions of the simplified precursors **57a,b** and **120** towards the brabantamide derivative **145** catalyzed by the unusual enzymes BraC and the TE-domain of the brabantamide gene cluster.

First, the *braB*_TE-domain, the *braB*_TE-PCP didomain, the *braB*_PCP2-domain and *braC* were individually amplified from the genomic DNA (gDNA) of *Pseudomonas* sp. CH52, cloned in appropriate expression vectors and heterologously expressed as soluble proteins in *E. coli*

Abstract

BL21(DE3). In parallel, simplified precursors **57a-c** were synthesized by solution phase peptide synthesis for their application as substrates for the proposed enzymatic reactions. Starting from *tert*-Butyl-L-Serine (**77**), the thiophenol thioester **57a** was obtained in six consecutive steps with an overall yield of 11%. The synthesis of the SNAc thioester **57b** was successfully accomplished in 8% yield over four steps from L-Serine (**73**) as starting material. Transesterification of the thiophenol substrate **57a** lead to the CoA derivative **57c**. Initial enzymatic reactions with the TE-domain, the TE-PCP didomain and BraC were carried out using the thioesters **57a,b** as substrates. The results obtained did not indicate conversion to the expected product. Thus, the terminal PCP-domain of the brabantamide gene cluster was loaded with the CoA substrate **57c** and the generated PCP complex **120** was used as starting material for further enzymatic reactions. Unfortunately, neither the single enzymes nor different combinations initiated a conversion of the substrates **57a,b** or **120** to the proposed products.

As postulated by *Gulder et al.* as well as *Magarvey et al.*, the biosynthetic intermediate **59** represents the substrate for the monooxygenase BraC. Initially, we proposed to construct this molecule by chemical synthesis. Due to low yields during the reaction sequence, heterologous production was instead used to generate the putative substrate **59** for the *Baeyer-Villiger* monooxygenase. The optimization of the expression conditions with a production strain bearing the NRPS cluster of the pyrrolizidine alkaloid biosynthesis on a plasmid resulted in the production of the bicycle **59** in adequate amounts in *E. coli* DH10B::*mtaA*. Due to the low solubility of the substrate **59** under buffer conditions, the catalytic function of BraC could not yet be elucidated by enzymatic reactions of **59** with the monooxygenase. Optimized conditions should lead to the elucidation of the biosynthetic function of the unusual *Baeyer-Villiger* monooxygenase BraC.

In summary, the putative substrates for the elucidation of the brabantamid biosynthesis were synthesized chemically or biotechnologically produced. In addition, all relevant enzymes were cloned, heterologously produced and purified through affinity chromatography. Combined with the extensive enzymatic assays performed in this thesis, this work strongly contributes to further investigations into the complex rearrangement reactions during brabantamide biosynthesis.

Abstract

The arylomycins (**60a-l**) are NRPS produced natural products exhibiting diverse biological activities and thus representing interesting compounds for further research. To date, total chemical synthesis of these biaryl-bond containing peptides remains challenging. Total syntheses by *Romesberg et al.* and *Zhu et al.* demonstrate that particularly the incorporation of the biaryl bond leads to a lengthy and low yielding synthesis. The chemo-enzymatic synthesis of these natural products is an attractive alternative. During this work a concept for the enzymatic biaryl coupling of the linear precursor of arylomycin A2 (**60b**) catalyzed by the P450 oxygenase AryC from the arylomycin gene cluster was established (Scheme). We initiated this study by the amplification of all relevant enzymes of the arylomycin gene cluster from the gDNA of *Streptomyces roseosporus* NRRL 15998 followed by their cloning in appropriate expression vectors. The heterologous expression of *aryC* the P450 oxygenase, the *aryD*_TE domain and the four PCP domains from *aryD* in *E. coli* BL21(DE3) were successfully achieved. The two PCP domains from the *aryB*_NRPS were synthesized through single-overlap-extension-PCR with subsequent cloning and heterologous expression of soluble proteins in *E. coli* BL21(DE3). The enzymes needed for electron support and regeneration, PetF, Fpr and GDh as well as the PPTase Sfp had previously been obtained in our working group. The first coupling assays were tested with the substrates **63**, **64a** and **128**, the P450 enzyme AryC and the electron supply system. The absence of the reaction products in the enzymatic assays with these free substrates lead to the conclusion that the substrate must be attached to the final PCP-domain of the arylomycin gene cluster in order to be recognized by the cytochrome P450. Therefore, the AryD_PCP4-domain was successfully loaded with the thiophenol derivative **64a** as well as with the CoA substrate **126**. The use of **126** as substrate was more efficient since the loading was carried out in only one step. Subsequently, strategies for the release of the final product from the PCP domain were established. The TE domain catalyzed hydrolysis could not yet be achieved. The optimization of the reaction conditions, especially in terms of buffer components and pH value could lead in future to effective results. The release of product **130** was achieved by applying methylhydrazin. Initial enzymatic coupling reactions with the PCP-loaded substrate **127** were performed. However, biaryl-bond formation could not be detected with the available methods for analyzing product formation. In summary, two variants of the P450 enzymes AryC_{long} and AryC_{short} as well as all PCP domains from the arylomycin gene cluster were successfully cloned and expressed. Furthermore, optimized conditions for the complete loading of the PCP domain with the CoA substrate **146**

Abstract

biosynthesis of ikarugamycin (**66**) were achieved. These results for the first time allow mechanistic insights into the generation of the carbacyclic system in PTMs

6-Chlorotryptophan (**139**, Figure) is an intermediate in the biosynthesis of the natural product JBIR-35 (**137**). A synthesis to intermediate **139** was established. With this substrate, Mr. René Richarz is able to perform investigations into the catalytic abilities of the P450 oxygenase FmoC from the JBIR-35 biosynthetic gene cluster.

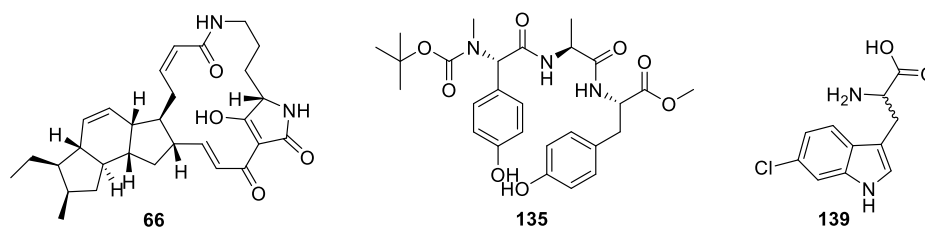


Figure 45. Structures of ikarugamycin (**66**) and 6-chlorotryptophan (**139**).

4 Experimenteller Teil

4.1 Verwendete Apparaturen und Messgeräte

Autoklav: Zum Sterilisieren von Medien und Verbrauchsmitteln wurde entweder ein Autoklav V65 der Fa. *Systemec* (Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn) oder ein Autoklav 3170 ELV der Fa. *Biomedis* (Technische Universität München) benutzt.

Elektrophorese: Die elektrische Spannung für die Gelelektrophorese wurde mit Hilfe eines Electrophoresis Power Supply EV243 der Fa. *Consort* angelegt. SDS-PAGE wurde in *Bio-Rad* Mini Protean® Tetra System Gelkammern durchgeführt.

Elektroporator: Ein MicroPulser der Fa. *Bio-Rad* wurde für die Elektroporation von elektrokompenten Zellen verwendet.

Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC): Zur Aufreinigung der Proteine wurde ein ÄKTApurifier der Fa. *GE Healthcare* verwendet.

Gefriertrocknung: Produkte in wässrigen Phasen wurden mit dem Gerät Alpha 2-4 von *Christ*, das an eine Chemistry-Hybrid-Pump-RC6-Pumpe von *Vacuubrand* angeschlossen war, getrocknet.

Gel-Bilder: Für die Dokumentation von Agarose-Gelen wurde das Bio-Imaging-System Gene Genius von *SynGene* benutzt. Das Gerät wurde über die GeneSnap-Software von derselben Firma gesteuert. SDS-Polyacrylamidgele wurden entweder ebenfalls mit dem Bio-Imaging-System abgebildet oder gescannt.

Heizblock / Wasserbad: Zur Erwärmung von kleinen Probenmengen wurden, wenn nicht ausdrücklich anders erwähnt, der ThermoMixer C von *Eppendorf* oder das Wasserbad FBH 604 von *Fischerbrand* verwendet.

Inkubationsschüttler: Die Inkubationsschüttler stammen von der Fa. *Infors HT* mit den Modellen Multitron Standard und Ecotron.

Verendete Apparaturen und Messgeräte

Kernresonanzspektroskopie (NMR): An der *Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn* wurden die ^1H - bzw. ^{13}C -NMR-Spektren an den Geräten DP300 (300 MHz bzw. 75 MHz), DP400 (400 MHz bzw. 100 MHz) und DRX 500 (500 MHz, nur ^1H -NMR-Spektren) der Fa. *Bruker* bei Raumtemperatur gemessen. An der *Technischen Universität München (TUM)* wurden die ^1H - bzw. ^{13}C -NMR-Spektren an den Geräten AV200 (200 MHz, nur ^1H -NMR-Spektren), AV360 (360 MHz), AV500 (500 MHz, nur ^1H -NMR-Spektren) der Fa. *Bruker* bei Raumtemperatur gemessen. Die Geräte AV200, AV360 und AV500 wurden durch die Geräte AVHD400 (400 MHz bzw. 100 MHz), AVHD300 (300 MHz bzw. 75 MHz) bzw. AVHD500 (500 MHz, nur ^1H -NMR-Spektren) der Fa. *Bruker* ersetzt. Die chemischen Verschiebungen δ sind in parts per million [ppm] angegeben und beziehen sich auf δ (TMS) = 0. Als interner Standard wurden die deuterierten Lösungsmittel CDCl_3 , MeOD, DMSO- d_6 , Aceton- d_6 sowie D_2O eingesetzt. Dabei dienten bei den ^1H -NMR-Spektren die Resonanzsignale der Restprotonen [δ (CDCl_3) = 7.26, δ (MeOD) = 3.31, δ (DMSO- d_6) = 2.50, δ (Aceton- d_6) = 2.05, δ (D_2O) = 4.79] und bei den ^{13}C -NMR-Spektren die entsprechenden ^{13}C -Resonanzsignale [δ (CDCl_3) = 77.16, δ (MeOD) = 49.00, δ (DMSO- d_6) = 39.52, δ (Aceton- d_6) = 29.84, 206.26] der verwendeten deuterierten Lösungsmittel zur Kalibrierung. Zur Beschreibung der Signalmultiplizitäten dienen die Abkürzungen: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett, dd = doppeltes Dublett, dt = doppeltes Triplett, dq = doppeltes Quartett, ddd = dreifaches Dublett, td = Triplett von Dubletts, m = Multiplett, br = breites Signal, pd = pseudo Dublett. Die Zuordnung der Signale erfolgte in einigen Fällen mit Hilfe von 2D-NMR-Spektren (H,H-COSY, HMBC, HMQC und NOESY). Die Kopplungskonstanten J wurden in Hertz ^[189] angegeben und die Spektren wurden mittels MestReNova (*Mestrelab Research S. L.*) ausgewertet.

Kristallisationsroboter: Zum Aliquotieren des Proteins in sitting drop vapour diffusion 96well-INTELLI-Platten der Fa. *Art Robbins Instruments* wurde ein Phoenix Robot System der Fa. *Art Robbins Instruments* benutzt.

Massenspektroskopie (MS): Die Massenspektren, die an der *Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn* gemessen wurden, wurden von den Mitarbeitern der Abteilung für Massenspektroskopie am *Kekulé-Institut für Organische Chemie und Biochemie* unter der Leitung von Frau Dr. Engeser aufgenommen. Die Aufnahme der Elektrosprayionisations-Massenspektren (ESIMS) und der High-Resolution-Massenspektren (HRMS) erfolgte an einem Time-of-Flight-Massenspektrometer (micrOTOF-Q, *Bruker Daltonics*). Für die

Verendete Apparaturen und Messgeräte

Elektronenstoßionisations-Massenspektren (EI-MS) wurde das Sektorfeld-Massenspektrometer MAT 95 XL der Fa. *Thermo Finnigan* mit einer Beschleunigungsspannung von 70 eV verwendet. An der *Technischen Universität München* wurden die ESI-MS entweder an einem *Advion* Expression LCMS-Gerät mit single-quadrupole mass analyzer, das zusammen mit einem *Peak Scientific* N118LA Stickstoffgenerator, einer *Edwards* RV12 Hochvakuumpumpe, einer *Camag* TLC-MS Interface und einer *Jasco* PU-1580 Intelligent HPLC-Pumpe betrieben wurde, oder an einem LCQ Fleet Ion Trap Massenspektrometer gekoppelt an ein UltiMate 3000 HPLC System (beides von *Thermo Scientific*) aufgenommen. Das Letztere wurde mittels Xcalibur Software gesteuert und die Ergebnisse der Messungen wurden mittels *Thermo Xcalibur Qual Browser 2.2 SP1.48* Software ausgewertet. Das *Advion*-MS-System wurde mit Hilfe der Mass Express Software gesteuert und die Auswertungen wurden mittels Data Express Software (beides von *Advion*) durchgeführt. Die Aufnahme von hochauflösenden ESI-MS erfolgte an dem Massenspektrometer *Thermo* LTQ FT Ultra. Die Massenspektrometer der HR-ESI-MS wurden ebenfalls mittels *Thermo Xcalibur Qual Browser 2.2 SP1.48* Software ausgewertet.

Mikroskopie: Zur Analyse der Kristallisationsansätze wurde ein Mikroskop SZX10 der Fa. *Olympus* benutzt.

Photometer: Zur Bestimmung der optischen Dichte bei 600 nm wurde ein Photometer der Fa. *Eppendorf* benutzt.

Polymerase-Kettenreaktion (PCR): Die Amplifikation von DNA erfolgte entweder mittels Life Eco-PCR-Geräten der Fa. *Bioer* oder an einem TC-5000-PCR-Gerät der Fa. *Techne*.

Protein- und DNA-Konzentrationsbestimmung: Protein- und DNA-Konzentrationen wurden mit Hilfe des Nanophotometer P330 von *Implen* bestimmt.

Thermofluorassay: Die Thermofluor Assay wurden auf dem Gerät Stratagene Mx3000P qPCR System der Fa. *Agilent Technologies* durchgeführt.

Zellaufschluss: Bakterienzellen wurden mit einem Ultraschallhomogenisator Sonopuls HD2070 von *Bandelin* aufgeschlossen.

Zentrifugation: Es wurden die Zentrifugen Heraeus Multifuge X3R Centrifuge der Fa. *Thermo Scientific*, 24/6 der Fa. *VWR* und Centrifuge 5418R der Fa. *Eppendorf* verwendet.

4.2 Vektoren, Organismen und Primer

4.2.1 Vektoren

Zur heterologen Expression in *E. coli* wurden verschiedene Vektoren eingesetzt (Tabelle 15).

Tabelle 15. Übersicht der verwendeten Vektoren.

Name	Expressionsspezifikation	Selektionsantibiotikum (verwendete Konzentrationen)	Herkunft
pHis8	Tag: N-terminaler His ₈ -Tag Promoter: T7 Induktion: IPTG 0.1 mM	<i>Kanamycin</i> (50 µg/mL)	[190]
pHis8_TEV	Tag: N-terminaler His ₈ -Tag Promoter: T7 Induktion: IPTG 0.1 mM	<i>Kanamycin</i> (50 µg/mL)	René Richarz
pGS21a	Tag: N-terminaler His ₈ -Tag, N-terminaler GST-Tag Promoter: T7 Induktion: IPTG 0.1 mM	<i>Ampicillin</i> (100 µg/mL)	Fa. <i>Genscript</i>
pXY200 oriT	Induktion: Thiostrepton Promoter: tipA	<i>Ampicillin</i> (100 µg/mL) <i>Apramycin</i> (100 µg/mL)	Prof. T.A.M. Gulder
pCX2_pxa	Promoter: T7 + pBAD Induktion: L-Arabinose 0.1 mM	<i>Kanamycin</i> (50 µg/mL)	Prof. Helge Bode

4.2.2 Organismen

Es wurden *E. coli* Stämme mit spezifischen Eigenschaften für mikrobiologische Methoden verwendet. Hierbei dienen die Endonuklease-deletierten *E. coli* DH5α zur effizienten Klonierung und anschließender Lagerung. *E. coli* BL21(DE3), sowie *E. coli*

Vektoren, Organismen und Primer

ArcticExpress RIL (DE3) und *E.coli* SoluBL21 wurden zur heterologen Proteinexpression verwendet. Zur heterologen Expression von pXst4 wurde *E. coli* DH10B::*mtaA* verwendet. Zur Amplifizierung verschiedener Gene des Arylomycin-Gencluster wurde die gDNA von *Streptomyces* sp. Tü 6075 verwendet. Die gDNA von *Pseudomonas* sp. SH-C52 wurde zur Amplifikation der Gene des Brabantamid-Genclusters verwendet. *Streptomyces lividans* TK 24 wurden zur Anfertigung von Protoplasten benutzt. Eine Übersicht wird in Tabelle 16 aufgeführt.

Tabelle 16. Übersicht über die verwendeten Organismen.

Stamm	Genotyp	Herkunft
<i>E. coli</i> DH5 α	F-ompT hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻) gal dcm (DE3)	[191]
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	F-ompT gal dcm lon hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻) λ (DE3)	Fa. Invitrogen
<i>E. coli</i> ArcticExpress RIL (DE3)	F ⁻ , ompT, hsdS(r _B ⁻ m _B ⁻), dcm ⁺ , Tet ^R , gal λ DE3, endA, Hte [cpn10cpn60 Gent ^R] [argU ileY leuW Str ^R]	Fa. Stratagene
<i>E. coli</i> SoluBL21	-	Prof. Michael Groll
<i>E. coli</i> BAP1	<i>E. coli</i> BL21(DE3): PT7: <i>sfp</i>	[156]
<i>E. coli</i> DH10B:: <i>mtaA</i>	F ⁻ mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 recA1 endA1 araD139 Δ (ara leu) 7697 galU galK rpsL nupG λ - mit <i>mtaA</i> from pCK_ <i>mtaA</i> Δ entD	Prof. Helge Bode
<i>Streptomyces lividans</i> TK 24	Wildtyp	Prof. Bradley Moore
<i>Streptomyces</i> sp. Tü 6075	Wildtyp	Prof. Hans-Peter Fiedler
<i>Pseudomonas</i> sp. SH-C52	Wildtyp	Prof. Harald Gross

4.2.3 Primer

Die in dieser Arbeit verwendeten Primer werden in Tabelle 17 aufgelistet.

Vektoren, Organismen und Primer

Tabelle 17. Übersicht der verwendeten Primer; die Erkennungssequenz der Restriktionsenzyme wurden unterstrichen.

Nr.	Name	Sequenz (5'-3')	Templat
1	BraC_fw	<u>CGGGATCC</u> ATGACAGAACCCAGG AAA	<i>Pseudomonas sp.</i> SH-C52 [75]
2	BraC_rev	GGGA <u>AAGCTT</u> GTTCATTGACGTAGGC TG	<i>Pseudomonas sp.</i> SH-C52 [75]
3	Bra_TE_fw	<u>CGGGATCCA</u> AAGAATGCCAGCCGG GCG	<i>Pseudomonas sp.</i> SH-C52 [75]
4	Bra_TE_rev	GGGA <u>AAGCTT</u> GTCCATTCGTGAGCG GAT	<i>Pseudomonas sp.</i> SH-C52 [75]
5	Bra_TEPCP_fw	<u>CGGGATCCCC</u> CAGGAATGCCACGG AA	<i>Pseudomonas sp.</i> SH-C52 [75]
6	BraB_PCP2_fw	ATAG <u>GATCC</u> CTGCGTCCGTTAC	<i>Pseudomonas sp.</i> SH-C52 [75]
7	BraB_PCP2_rev	ATGA <u>AAGCTT</u> CACCGCTGCAGGA	<i>Pseudomonas sp.</i> SH-C52 [75]
8	AryC _{lang} _for	CACGGATCCTTGAATGACTTAAGT GCGCTCACG	<i>S. roseosporus</i> NRRL 15998
9	AryC _{lang} _rev	CACA <u>AAGCTT</u> TTCAGCGGCGGGCGAA AAG	<i>S. roseosporus</i> NRRL 15998
10	AryC _{kurz} _for	CACGGATCCATGTACCTGGGCGGC AGGC	<i>S. roseosporus</i> NRRL 15998
11	AryD_PCP1_for	ATAG <u>GATCC</u> GCAGGCGCCGGCCG CGGGC	<i>S. roseosporus</i> NRRL 15998
12	AryD_PCP1_rev	TATA <u>AAGCTT</u> TTCAGCCGGCGAGGCG GGTGCGA	<i>S. roseosporus</i> NRRL 15998
13	AryD_PCP2_for	ATAG <u>GATCC</u> GACGTACGCGGCGG GGCACCCC	<i>S. roseosporus</i> NRRL 15998
14	AryD_PCP2_rev	TATA <u>AAGCTT</u> TTCAGGGGCCAGCCG CCGGGC	<i>S. roseosporus</i> NRRL 15998
15	AryD_PCP3_for	ATAG <u>GATCC</u> GCTGCGCAGGGCCGT GCCCCG	<i>S. roseosporus</i> NRRL 15998
16	AryD_PCP3_rev	TATA <u>AAGCTT</u> TTCACGAGGGGAGCGC CTCGACGAGG	<i>S. roseosporus</i> NRRL 15998
17	AryD_PCP4_for	ATAG <u>GATCC</u> GAACCGTCCGGCCGC GCCCCG	<i>S. roseosporus</i> NRRL 15998

Vektoren, Organismen und Primer

Nr.	Name	Sequenz (5'-3')	Templat
18	AryD_PCP4_rev	TATA <u>AAGCTT</u> TACGTCCCCAGCCGT TCGGCGAGTTC	<i>S. roseosporus</i> NRRL 15998
19	Primer1_fw_aryB_PCP1 s.o	ATTGTAG <u>GATCCC</u> AGGTGACCGGG CGGACCCCGCGCACCGCGCGGGA GGAACCTCTGCGGCCTGTTTCG C	Primer für Single- Overlap- Extension-PCR
20	Primer2_rev_aryB_PCP1 s.o	GATGCTGTCCCCGCCGAGGTCGAA GAAGCTGTGTCGATACCGACCGC GGGAGGCCGAGGACCTCGGCGA ACAGGCCGCAGAGGAG	Primer für Single- Overlap- Extension-PCR
21	Primer3_fw_aryB_PCP1 s.o	GACCTCGGCGGGGACAGCATCAG CTCCATCCAGCTGGTCGGCCGGGC CCAGCGCGGGCCTGGCCATCTC GCCGCGGATGTCTTC	Primer für Single- Overlap- Extension-PCR
22	Primer4_rev_aryB_PCP1 s.o	ATCATA <u>CTCGAGT</u> CAGGGGTCGC GATGTCGGCGAGGGCGAGGACGG TCTTGTGGCGGAAGACATCGCGCG GCGAGA	Primer für Single- Overlap- Extension-PCR
23	Primer1_fw_aryB_PCP2 s.o	ATTGTAG <u>GATCCG</u> GGGGGTCCGG CCGGGTGGCGCGCAACACGCGCG AGGAGGTGCTGTGCGCGCTGTTTCG GG	Primer für Single- Overlap- Extension-PCR
24	Primer2_rev_aryB_PCP2 s.o	GATGCTGTCCCCGCCGAGATCGAA GAAGCTGTGTCGTCGGCACCGACCGC GTCCACGTTCAAGACTTCCCCGAA CAGCGCGCACAGCAC	Primer für Single- Overlap- Extension-PCR
25	Primer3_fw_aryB_PCP2 s.o	GATCTCGGCGGGGACAGCATCAG CTCCATCCAGCTGGTGAGCAGGGC TCGCAAGCGGGTCTGGTGATCAC GCCGAAGGACGTCTTC	Primer für Single- Overlap- Extension-PCR
26	Primer4_rev_aryB_PCP2 s.o	ATCATA <u>CTCGAGT</u> CAACTCCGTGCC GCCTCGGCGAGCCCCGCCACCGTC CTGAAGTCGAAGACGTCCTTCGGC GTGAT	Primer für Single- Overlap- Extension-PCR
27	AryD_TE_for2	ATAGA <u>AATC</u> ACCGGCGCGCG	<i>S. roseosporus</i> NRRL 15998

Vektoren, Organismen und Primer

Nr.	Name	Sequenz (5'-3')	Templat
28	AryD_TE_rev	TATA <u>AAGCTT</u> TCAGGCGTCGTGAGT	<i>S. roseosporus</i> NRRL 15998
29	Ika1_PKS-NRPS_Fwd	CAG <u>CATATG</u> ATGGATTCCATGCAC CACC	IkaFos8 ^[183]
30	Ika1_PKS-NRPS_Rev	CAG <u>GGATCCC</u> GACGTACACCCCGA CAT	IkaFos8 ^[183]
31	Ika2_PKS_NRPS_solo_Fwd	CAG <u>GGATCCC</u> GGATCACCATCGAG AACTT	IkaFos8 ^[183]
32	Ika2_PKS_NRPS_solo_rev	CAG <u>GAATTC</u> CCTACACGCTCCTCGA CGATG	IkaFos8 ^[183]
33	Ika2_FAD_pXY200_Fwd	CAG <u>GGATCCC</u> GGATCACCATCGAG AACTT	IkaFos8 ^[183]
34	Ika2_FAD_pXY200_Rev	CAG <u>GAATTC</u> CCTACACGCTCCTCGA CGATG	IkaFos8 ^[183]
35	Ika2_AD_pXY200_Fwd	CAG <u>GGATCC</u> GCTTCGACGCGGTGG TGAA	IkaFos8 ^[183]
36	Ika2_AD_pXY200_Rev	CAG <u>GAATTC</u> CCTACAGGGCGACCAG GAC	IkaFos8 ^[183]
37	T7	TAATACGACTCACTATAGGG	Sequenzierprimer
38	pGEX-5	CTGGCAAGCCACGTTTGG	Sequenzierprimer
39	pET-RP	CTAGTTATTGCTCAGCGG	Sequenzierprimer
40	pRSETnew	GGGTTATGCTAGTTATTGC	Sequenzierprimer

Die Primer wurden bei Fa. *In3gen* oder Fa. *Sigma* synthetisiert und als Lyophilisat geliefert. Die Oligonukleotide wurden in sterilem Reinstwasser zu einer 100 µM Stammlösung gelöst und bei -20 °C gelagert.

4.3 Medien und Puffer

4.3.1 Nährmedien

Für die Anzucht von Bakterien in Flüssigkultur sowie auf Agar-Platten wurden folgende Nährmedien verwendet. Bei allen Medien wurde Reinstwasser verwendet und durch Autoklavieren wurden diese sterilisiert.

4.3.1.1 LB-Medium (*Luria Bertani*)

LB-Medium wurde für die Anzucht von *E. coli* nach der Transformation, zur Plasmidpräparation oder zur Proteinexpression verwendet.

Entweder wurde das Nährmedium aus den einzelnen Komponenten zubereitet (Tabelle 18) oder von der Fa. *Roth* als fertig zusammengesetztes Pulver bezogen und gemäß Herstellerangabe 25 g in 1 L Reinstwasser gelöst und autoklaviert.

Tabelle 18. Zusammensetzung des LB-Mediums.

Bestandteil	Menge
Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	5 g
H ₂ O	Auf 1 L

Für die Herstellung von Agar Platten wurden dem Medium noch 15 g Agar-Agar hinzugefügt. Der pH-Wert des Mediums wurde vor dem Autoklavieren auf 7.5 (HCl) eingestellt.

4.3.1.2 TB-Medium (*Terrific Broth*)

TB-Medium wurde für die Proteinexpression mit *E. coli*-Stämmen verwendet. Entweder wurde das Nährmedium aus den einzelnen Komponenten zubereitet (Tabelle 18) oder von der Fa.

Medien und Puffer

Roth als fertig zusammengesetztes Pulver bezogen und gemäß Herstellerangabe 47.6 g in 1 L Reinstwasser gelöst, mit 4 mL Glycerin versetzt und autoklaviert.

Tabelle 19. Zusammensetzung des TB-Mediums.

Bestandteil	Menge
Trypton	12 g
Hefeextrakt	24 g
Glycerin	4 mL
H ₂ O	Auf 900 mL

Nach dem Autoklavieren wurden 100 mL einer sterilen Lösung aus 0.17 M KH₂PO₄ und 0.72 M K₂HPO₄ (pH 7.2) zugegeben.

4.3.1.3 2xYT-Medium

2xYT-Medium wurde für die Proteinexpression mit *E. coli*-Stämmen oder für die horizontale Konjugation verwendet.

Tabelle 20. Zusammensetzung des 2xYT-Medium

Bestandteil	Menge
Trypton	16 g
Hefeextrakt	10 g
NaCl	5 g
H ₂ O	Auf 900 mL

Der pH-Wert des Mediums wurde vor dem Autoklavieren auf 7.0 (NaOH) eingestellt.

Medien und Puffer

4.3.1.4 SOC-Medium (*Super Optimal broth with Catabolite repression*)

Das SOC-Medium wurde zur Kultivierung von *E. coli*-Zellen benutzt, die in weiteren Schritten kompetent gemacht wurden.

Tabelle 21. Zusammensetzung des SOC-Mediums.

Bestandteil	Menge
Trypton	20.0 g
Hefeextrakt	5.00 g
NaCl	0.58 g
KCl	0.19 g
1 M MgSO ₄	10.0 mL
1 M MgCl ₂	10.0 mL
40% D-Glukose	9.0 mL
H ₂ O	Auf 1L

MgSO₄, MgCl und Glukose wurden nach dem Autoklavieren sterilfiltriert zugegeben.

4.3.1.5 GYM-Medium (*Glukose, Yeast and Malt*)

Das GYM Medium wurde zur Anzucht von Streptomyceten verwendet.

Tabelle 22. Zusammensetzung des GYM-Mediums.

Bestandteil	Menge
Glukose	4 g
Hefeextrakt	4 g
Malzextrakt	10 g
H ₂ O	Auf 1 L

Für die Herstellung von Agar Platten wurden dem Medium noch 12 g Agar-Agar, sowie 2 g CaCO₃ hinzugefügt. Der pH-Wert des Mediums wurde vor dem Autoklavieren auf 7.2 (HCl) eingestellt.

Medien und Puffer

4.3.1.6 YEME-Medium

Das YEME-Medium wurde zur Herstellung von Protoplasten aus *S. lividans* verwendet.

Tabelle 23. Zusammensetzung des YEME-Mediums.

Bestandteil	Menge
Glukose	10 g
Hefeextrakt	3 g
Pepton	5 g
Malzextrakt	3 g
Sucrose	340 g
MgCl ₂ (2.5 M)	2 mL
Glycin (20%)	25 mL
H ₂ O	Auf 1 L

Nach dem Autoklavieren wurden MgCl₂ und Glycin sterilfiltriert zugeben.

4.3.1.7 MS-Agar (Manitol, Soja)

MS-Agar wurde zur horizontalen Konjugation in Streptomyceten verwendet.

Tabelle 24. Zusammensetzung des MS-Agars.

Bestandteil	Menge
Agar	20.0 g
Mannitol	20.0 g
Sojamehl (Hensel, Hagstadt)	20.0 g
MgCl ₂	0.95 g

Der pH-Wert des Mediums wurde vor dem Autoklavieren auf 7.2 (HCl) eingestellt.

Medien und Puffer

4.3.1.8 R5-Agar

Zur Protoplasten-Transformation wurden R5-Agarplatten benötigt.

Tabelle 25. Zusammensetzung des R5-Agars.

Bestandteil	Menge
Sucrose	103 g
K ₂ SO ₄	0.25 g
MgCl ₂ x 6H ₂ O	10.1 g
Glukose	10.0 g
Difco Casaminoacids	0.10 g
Spurenelementlösung	2.00 mL
Hefeextrakt	5.00 g
TES Puffer	5.73 g
H ₂ O	Auf 1 L

Es wurden jeweils 2.2 g Agar zu 100 mL der Lösung gegeben und autoklaviert. Vor jedem Gebrauch wurde der Agar frisch verflüssigt und folgende Lösungen zugegeben:

Tabelle 26. Zusammensetzung der Lösung für den Zusatz zum R5-Agar.

Bestandteil	Menge
KH ₂ PO ₄ (0.5 %)	1.0 mL
CaCl ₂ x 2H ₂ O (5 M)	0.4 mL
L-Prolin (20 %)	1.5 mL
NaOH (1 N)	0.7 mL

4.3.2 Puffer

Für die Herstellung aller Puffer wurde Reinstwasser verwendet.

4.3.2.1 Transformationspuffer (TB)

Tabelle 27. Zusammensetzung des TB-Puffers.

Bestandteil	Konzentration
Hepes	10 mM
CaCl	15 mM
KCl	250 mM

Der pH-Wert des Puffers wurde vor dem Autoklavieren auf 6.7 (HCl) eingestellt.

Nach dem Autoklavieren wurde 55 mM MnCl₂ sterilfiltriert zugeben.

4.3.2.2 Tris-EDTA-Puffer (TE)

Tabelle 28. Zusammensetzung des TE-Puffers.

Bestandteil	Konzentration
TrisHCl	10 mM
EDTA	1 mM

Der pH-Wert des Puffers wurde vor dem Autoklavieren auf 8.0 (HCl) eingestellt.

4.3.2.3 Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE)

Tabelle 29. Zusammensetzung des TAE-Puffers.

Bestandteil	Konzentration
TrisHCl	25 µM
EDTA	0.8 mM
Acetat	0.4 mM

Der pH-Wert des Puffers wurde vor dem Autoklavieren auf 8.5 (HCl) eingestellt.

Medien und Puffer

4.3.2.4 Lysispuffer

Tabelle 30. Zusammensetzung des Lysispuffers.

Bestandteil	Konzentration
NaH ₂ PO ₄	50 mM
NaCl	300 mM
Imidazol	10 mM
Glycerol	10%

Der pH-Wert wurde vor Gebrauch auf 8.0 (HCl) eingestellt.

4.3.2.5 Waschpuffer und Elutionspuffer

Diese Puffer wurden zur Aufreinigung von Proteinen an Nickelharz verwendet.

Tabelle 31. Zusammensetzung der Waschpuffer und des Elutionspuffers.

	<i>Waschpuffer 1</i>	<i>Waschpuffer 2</i>	<i>Waschpuffer 3</i>	<i>Elutionspuffer</i>
Bestandteil	Konzentration	Konzentration	Konzentration	Konzentration
NaH₂PO₄	50 mM	50 mM	50 mM	50 mM
NaCl	300 mM	300 mM	300 mM	300 mM
Imidazol	20 mM	40 mM	80 mM	250 mM
Glycerol	10%	10%	10%	10%

Der pH-Wert wurde bei allen Puffern auf 7.5 (HCl) eingestellt.

4.3.2.6 SDS-Ladepuffer (5x)

Tabelle 32. Zusammensetzung des 5 X SDS-Ladepuffers.

Bestandteil	Konzentration
TrisHCl	220 mM
β-Mercaptoethanol	5% (v/v)
SDS	10% (w/v)
Bromophenolblau	0.2% (w/v)
Glycerol	50% (v/v)

4.3.2.7 Trenngel-Puffer (4 X)

Tabelle 33. Zusammensetzung des Trenngel-Puffers.

Bestandteil	Konzentration
TrisHCl	1.5 M
SDS	0.8% (w/v)
pH	8.8

4.3.2.8 Sammelgel-Puffer (4 X)

Tabelle 34. Zusammensetzung des Sammelgel-Puffers.

Bestandteil	Konzentration
TrisHCl	0.5 M
SDS	0.8% (w/v)
pH	6.8

4.3.2.9 TEV-Protease-Cleavage-Puffer

Tabelle 35. Zusammensetzung des TEV-Protease-Cleavage-Puffer.

Bestandteil	Konzentration
TrisHCl	50.0 mM
EDTA	0.5 mM
DTT	1.0 mM

4.3.2.10 10 X DNA Färbelösung

Tabelle 36. Zusammensetzung der 10 X DNA Färbelösung für Agarose-Gele.

Bestandteil	Konzentration
Sucrose	20% (w/v)
Orange G (<i>Serva</i>)	0.15% (v/v)
Xylen cyanol	0.05% (v/v)
Bromphenolblau	0.05% (w/v)

4.3.2.11 Lysis-Puffer (L-Puffer)

Tabelle 37. Zusammensetzung des L-Puffers.

Bestandteil	Menge
Sucrose (10.3%)	100.0 mL
TES Puffer (5.73%, pH 7.2)	10.0 mL
K ₂ SO ₄ (2.5%)	1.0 mL
Spurenelementlösung	0.2 mL
KH ₂ PO ₄ (0.5%)	1.0 mL
MgCl ₂ x 6H ₂ O (2.5 M)	0.1 mL
CaCl ₂ (0.25 M)	1.0 mL

4.3.2.12 Protoplasten Puffer (P-Puffer)

Tabelle 38. Zusammensetzung des P-Puffers.

Bestandteil	Menge
Sucrose	103 g
K ₂ SO ₄	0.25 g
Spurenelementlösung	2. mL
MgCl ₂ x 6H ₂ O	2.02 g
H ₂ O	800 mL

Medien und Puffer

Der Puffer wurde in 80 mL aliquotiert und autoklaviert. Bevor der Puffer angewendet wurde, wurden folgende Lösungen hinzugefügt:

Tabelle 39. Zusätze für den P-Puffer.

Bestandteil	Menge
KH ₂ PO ₄ (0.5%)	1 mL
CaCl ₂ *2H ₂ O (3.68%)	10 mL
TES Puffer (5.73%, pH 7.2)	10 mL

4.3.2.13 Spurenelementlösung

Tabelle 40. Zusammensetzung der Spurenelementlösung.

Bestandteil	Menge
ZnCl ₂	40 mg
FeCl ₃ *6H ₂ O	200 mg
CuCl ₂ *2H ₂ O	10 mg
MnCl ₂ *4H ₂ O	10 mg
Na ₂ B ₄ O ₇ *10H ₂ O	10 mg
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ *4H ₂ O	10 mg

4.3.2.14 Enzym-Assay-Puffer

a) Tris-HCl-Puffer

Sofern nicht anders angegeben, wurde dieser Puffer als Standard-Tris-HCl-Puffer eingesetzt.

Tabelle 41. Zusammensetzung des Tris-HCl-Puffers.

Bestandteil	Konzentration
Tris-HCl	50 mM
NaCl	200 mM
Glycerol	10%

Der pH-Wert des Puffers wurde vor Gebrauch auf 7.5 (HCl) eingestellt.

b) Tris-HCl-Puffer für ppant-Assays

Tabelle 42. Zusammensetzung des Tris-HCl-Puffers für ppant Assays.

Bestandteil	Konzentration
Tris-HCl	50 mM
NaCl	200 mM
MgCl ₂	50 mM
Glycerol	10%

Der pH-Wert wurde vor Gebrauch auf 8.5 (HCl) eingestellt.

c) HEPES-Puffer

Tabelle 43. Zusammensetzung des HEPES-Puffers.

Bestandteil	Konzentration
HEPES	25 mM
NaCl	50 mM

Der pH-Wert wurde vor Gebrauch auf 6, 7 oder auf 7.5 (NaOH) eingestellt.

d) MOPS-Puffer

Tabelle 44. Zusammensetzung des MOPS-Puffers.

Bestandteil	Konzentration
MOPS	25 mM

Der pH-Wert wurde vor Gebrauch auf 6 oder 7 (NaOH) eingestellt.

Medien und Puffer

e) Kaliumphosphatpuffer (KPB)

Tabelle 45. Zusammensetzung der Kaliumphosphatpuffer.

Bestandteil	Konzentration A	Konzentration B
Kaliumphosphatpuffer	25.0 mM	0.1 M
KCl	1.0 M	-
pH	7.5	7.4

f) Citrat-Phosphatpuffer

Tabelle 46. Zusammensetzung des Citrat-Phosphatpuffers.

Bestandteil	Konzentration
Na ₂ HPO ₄	0.2 M
Citrat	0.1 M
pH	4.2 + 5.5

4.4 Antibiotika und Zusätze

Tabelle 47. Verwendete Antibiotika.

Antibiotikum	Stockkonzentration	Endkonzentration
Ampicillin	100 mg/mL	100 µg/mL
Kanamycin	50 mg/mL	50 µg/mL
Gentamycin	25 mg/mL	25 µg/mL
Chloramphenicol	25 mg/mL	25 µg/mL
Apramycin	30 mg/mL	30 µg/mL
Tetracyclin	50 mg/mL	50 µg/mL

Die Antibiotika Kanamycin und Apramycin wurden in destilliertem Wasser, Ampicillin in einem 1:1 Gemisch aus Ethanol und Wasser und Chloramphenicol und Tetracyclin in Ethanol gelöst.

Tabelle 48. Verwendete Zusätze.

Zusätze	Stockkonzentration	Endkonzentration
Isopropyl-β-D-thiogalacto-Pyranosid (IPTG)	1.0 M	0.1 mM
L-Arabinose	1.0 M	1.0 mM
δ-Aminolävulinsäure	5.0 mM	50.0 µM
Fe(SO ₄)	1.0 M	1.0 mM

IPTG, Arabinose, δ-Aminolävulinsäure und Eisen-(II)-Sulfat wurden in Reinstwasser gelöst. Aminolävulinsäure und Eisen-(II)-Sulfat wurden sterilfiltriert zugegeben.

4.5 Mikro- und molekularbiologische Techniken

4.5.1 Kultivierung von Bakterien

Die Bedingungen zur Kultivierung der verwendeten Bakterien in Flüssigkultur oder auf Agarplatten sind in Tabelle 49 angegeben. Die Schüttelgeschwindigkeiten beziehen sich auf die Flüssigkulturen.

Tabelle 49. Kultivierungsbedingungen der verwendeten Bakterien.

Stamm	Medium	Temperatur	Schüttelgeschwindigkeit
<i>E. coli</i> DH5 α	LB	37 °C	200 rpm
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	LB, TB	37 °C	200 rpm
<i>E. coli</i> SoluBL21	LB, TB	25°C	200 rpm
<i>E. coli</i> ArcticExpress RIL (DE3)	LB, TB	16 °C	200 rpm
<i>E. coli</i> DH10B:: <i>mtaA</i>	LB	28 °C	200 rpm
<i>Streptomyces lividans</i> TK24	GYM	28 °C	200 rpm
<i>Streptomyces roseosporus</i> NRRL 15998	GYM	28 °C	-
<i>Pseudomonas sp.</i> SH-C52	GYM	28 °C	-

Vorkulturen wurde in einem Standard Volumen von 5 mL kultiviert. Kulturvolumina und Temperaturen für Proteinexpressionen und Fermentationen sind entsprechend angegeben. Je nach verwendetem Expressionsplasmid (Tabelle 15) wurden die entsprechenden Antibiotika in der angegebenen Endkonzentration eingesetzt. Zusätzliche Parameter sind direkt zu den jeweiligen Experimenten aufgeführt.

4.5.2 Stockkulturen

Zur Lagerung von Bakterienstämmen wurden frische Übernachtskulturen unter sterilen Bedingungen mit einer Glycerinlösung in einer Enkonzentration von 15% versetzt. Die

Glycerinkultur wurde in Kryoröhrchen bei -80 °C gelagert. Streptomyceten-Sporen wurden in einer 20% (v/v) Glycerinlösung bei -80 °C gelagert.

4.5.3 Isolierung von Plasmiden

Die Isolierung von Plasmiden wurde mit Hilfe des ‚Plasmid-Extraction-Kits‘ der Fa. *Jena Bioscience*, der Fa. *Peqlab* oder der Fa. *Promega* durchgeführt. Die Isolierung erfolgte nach den Angaben des entsprechenden Herstellers.

4.5.4 Bestimmung der Zelldichte in Flüssigkulturen

Die Bestimmung der Zelldichte in Flüssigkulturen erfolgte mit Hilfe eines Photometers bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD₆₀₀). Als Referenzlösung wurde das jeweilige sterile Medium verwendet. Die Messungen wurden in Einwegküvetten mit einer optischen Weglänge von einem Zentimeter durchgeführt. Es gilt das Lambert-Beer´sche Gesetz:

$$E = \varepsilon \cdot c \cdot d$$

E = Extinktion

ε = Extinktionskoeffizient

c = Konzentration

d = Dicke der Küvette

Da die Parameter ε und d konstant sind, verhält sich die Extinktion linear proportional zur Konzentration der Lösung.

4.5.5 Herstellung chemisch kompetenter Zellen

5 mL einer frischen Übernachtskultur wurden in 250 mL SOC-Medium überführt und über Nacht bei 18 °C und 200 rpm kultiviert. Am folgenden Tag wurde die Inkubationstemperatur auf 30 °C erhöht und weiter bis zu einer OD₆₀₀ von 0.4-0.6 inkubiert. Die Zellen wurden 10 min

auf Eis inkubiert und anschließend für 10 min bei 4000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde steril entnommen und das Pellet in 80 mL 4 °C kaltem TB-Puffer resuspendiert und erneut für 10 min auf Eis gekühlt. Die Kulturen wurden ein weiteres Mal für 10 min bei 4000 rpm abzentrifugiert und der Überstand steril entnommen. Das Pellet wurde in 18.6 mL 4 °C kaltem TB resuspendiert, 1.4 mL DMSO (99.5%, 37 °C) zugegeben und die Suspension für 10 min auf Eis inkubiert. Es wurden jeweils 100 µL in -80 °C vorgekühlten, sterilen 1.5 mL Reaktionsgefäße aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Zellen wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

4.5.6 Herstellung elektrisch kompetenter Zellen

5 mL einer frischen Übernachtskultur wurden in 200 mL LB-Medium überführt und bei 37 °C und 200 rpm kultiviert bis eine OD₆₀₀ von 0.4 erreicht war. Die Zellen wurden bei 4 °C 5 min bei 5000 rpm abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Alle weiteren Arbeitsschritte erfolgten auf Eis. Die Zellen wurden nacheinander mit 200 mL, 100 mL, und 50 mL 10% (v/v) Glycerin gewaschen, wobei zwischen den Waschschritten jeweils für 5 min bei 5000 rpm und 4 °C abzentrifugiert und der Überstand verworfen wurde. Anschließend wurden die Zellen in 1 mL 1% (v/v) Glycerin resuspendiert und in sterile, vorgekühlte 1.5 mL Reaktionsgefäße zu 70 µL aliquotiert. Mit flüssigem Stickstoff wurden diese schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

4.5.7 Herstellung von Protoplasten aus *Streptomyces lividans*

50-100 µL einer Sporensuspension von *S. lividans* wurden zu 25 mL YEME Medium gegeben und für 36-40 h bei 30 °C und 200 rpm inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 10 min bei 3000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 15 mL einer 10.3% (w/v) Sucrose-Lösung suspendiert und erneut für 10 min bei 3000 rpm zentrifugiert. Dies wurde 2 Mal wiederholt bevor das Pellet in 4 mL L-Puffer, der mit 1 mg/mL Lysozym versetzt wurde, resuspendiert wurde und bei 30 °C unter leichtem Schütteln für 30 min

inkubiert wurde. 5 mL P-Puffer wurden zugegeben und die Suspension wurde für 10 min bei 30 °C inkubiert. Die Protoplasten wurden durch Baumwolle filtriert und anschliessend bei 3000 rpm für 7 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 5 mL P-Puffer resuspendiert und zu 50 µL in 1.5 mL Mikrozentrifugationsröhrchen aliquotiert und anschliessend bei -80 °C gelagert.

4.5.8 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR ist eine Methode um DNA selektiv zu amplifizieren. Als Template wurden die gDNA von *Pseudomonas sp.* SH-C52 und von *Streptomyces roseosporus* NRRL 15998 verwendet. Zudem wurden verschiedene Plasmide und Fosmide mit jeweiligen Inserts als Templat eingesetzt.

Es wurden verschiedene Polymerasen für unterschiedliche Amplifizierungsexperimente eingesetzt. Zur Amplifizierung von Genen direkt aus gDNA wurde entweder die hitzestabilen Phusion™ Polymerase (*Pfu-X*, von der *Pyrococcus furiosus*-Polymerase abgeleitetes Enzym) von *Jena Bioscience* oder die Q5® High-Fidelity-Polymerase von *NEB* verwendet. Beide besitzen eine Fehlerkorrekturfunktion, welches das Risiko falsch eingebauter Basen und Mutationen signifikant verringert.

Folgende Ansätze und Bedingungen wurden bei der PCR mit gDNA verwendet:

Tabelle 50. Zusammensetzung der Reaktionen für die PCR mit der *Pfu-X*-Polymerase.

Bestandteil	Menge
<i>Pfu-X</i> -Polymerase (2.5 U/µL)	0.2 µL
<i>Pfu-X</i> -Puffer (10 X)	5 µL
DMSO (100%)	2 µL
dNTPs (10 mM)	1 µL
Primer fw (20 pmol/µL)	0.5 µL
Primer rev (20 pmol/µL)	0.5 µL
gDNA	20-100 ng
rH ₂ O	auf 50 µL

Mikro- und molekularbiologische Techniken

Tabelle 51. Temperaturprogramm für die PCR mit der *Pfu-X*-Polymerase.

Segmente	Temperatur	Zeit
1 Anfangstemperatur	95 °C	120 s
2 Denaturierung	95 °C	20 s
3 Primerhybridisierung	Primerabhängig: 47-68 °C	20 s
4 Elongation	68 °C	60 s/kb
5 Finale Elongation	68 °C	300 s

Die Schritte 2-4 wurden 30 Mal wiederholt.

Tabelle 52. Zusammensetzung der Reaktionen der PCR mit Q5-Polymerase.

Bestandteil	Menge
Q5-Polymerase (200 U/mL)	0.125 µL
Q5-Puffer (5 X)	5 µL
GC Enhancer (5 X)	5 µL
dnTPS (10 mM)	0.5 µL
Primer fw (20 pmol/µL)	0.625 µL
Primer rev (20 pmol/µL)	0.625 µL
gDNA	20-100 ng
H ₂ O	Auf 25 µL

Tabelle 53. Temperaturprogramm für die PCR mit der Q5-Polymerase.

Segmente	Temperatur	Zeit
1 Anfangstemperatur	98 °C	30 s
2 Denaturierung	98 °C	8 s
3 Primerhybridisierung	Primerabhängig: 47-72 °C	20 s
4 Elongation	72 °C	10-20 s/kb
5 Finale Elongation	72 °C	120 s

Die Schritte 2-4 wurden 30 Mal wiederholt.

Bei langen Elongationszyklen muss darauf geachtet werden, die Finale Elongation dementsprechend anzupassen.

4.5.9 Screening-PCR

Die Screening PCR dient zur Überprüfung von Bakterienkolonien nach vorhergegangener Transformation auf Agarplatten auf das enthaltene Insert. Einzelne Kolonien wurden von den Agarplatten gepickt und in 5 µL sterilem Reinstwasser resuspendiert. Diese Lösung diente als Templat für die PCR. Als Polymerase wurde die *Taq*-Polymerase (*Jena Bioscience*) verwendet. Die Zusammensetzung der Reaktionslösung und das Temperaturprogramm sind aus Tabelle 54 und Tabelle 55 zu entnehmen.

Tabelle 54. Zusammensetzung der Reaktionen für die Screening-PCR.

Bestandteil	Menge
<i>Taq</i> -Polymerase (2.5 U/µL)	0.125 µL
<i>Taq</i> -Puffer (5 X)	2.5 µL
DMSO (100%)	1 µL
dNTPs (10 mM)	0.25 µL
Primer fw (20 pmol/µL)	0.125 µL
Primer rev (20 pmol/µL)	0.125 µL
Templat	5 µL
rH ₂ O	12.625 µL

Tabelle 55. Temperaturprogramm für die Screening-PCR.

Segmente	Temperatur	Zeit
1 Anfangstemperatur	94 °C	300 s
2 Denaturierung	94 °C	30 s
3 Primerhybridisierung	Primerabhängig: 47-72 °C	30 s
4 Elongation	72 °C	60 s/kb
5 Finale Elongation	72 °C	300 s

Die Schritte 2-4 wurden 33 Mal wiederholt.

4.5.10 Single-Overlap-Extension-PCR

Die Single-Overlap-Extension-PCR diente zur Synthese kleiner Gene. Als Templat dienten hierbei die Primer selbst (Tabelle 17). Die Zusammensetzung der Reaktionslösung und die Bedingungen der Single Overlap PCR, sowie deren Extension sind in folgenden Tabellen aufgelistet.

Tabelle 56. Zusammensetzung für die Reaktionen für die Single-Overlap-PCR.

Bestandteil	Menge
<i>Pfu-X</i> -Polymerase (2.5 U/ μL)	0.3 μL
<i>Pfu-X</i> -Puffer (10 X)	5 μL
dNTPs (10 mM)	1 μL
Primer fw	0.5 μL
Primer rev	0.5 μL
rH ₂ O	39.7 μL

Tabelle 57. Zusammensetzung für die Reaktionen der Single-Extension-PCR.

Bestandteil	Menge
<i>Pfu-X</i> -Polymerase (2.5 U/ μL)	0.5 μL
<i>Pfu-X</i> -Puffer (10 X)	5 μL
dNTPS (10 mM)	0.5 μL
Primer Forward	0.25 μL
Primer Reverse	0.25 μL
Konstrukt P1+P2	0.2 μL
Konstrukt P3+P4	0.2 μL
rH ₂ O	41.35 μL

Tabelle 58. Single-Overlap-PCR-Bedingungen.

	Segmente	Temperatur	Zeit
1	Anfangstemperatur	94 °C	120 s
2	Denaturierung	94 °C	60 s
3	Primerhybridisierung	Primerabhängig: 47-72 °C	120 s
4	Elongation	68 °C	180 s
5	Finale Elongation	68 °C	300 s

Die Schritte 2-4 wurden 30 Mal wiederholt.

4.5.11 Two-step-PCR

Die Two-step-PCR wurde zur Amplifikation der Ikarugamycin-Gensequenzen zur homologen Rekombination verwendet. Es wurden die Taq-Polymerase und die Primer 41-46 (Tabelle 17) verwendet. Die Zusammensetzung der Reaktionslösung und das Temperaturprogramm sind in folgenden Tabellen angegeben.

Tabelle 59. Zusammensetzung der Reaktion der Two-step-PCR.

Bestandteil	Menge
Taq-Polymerase (2.5 U/ μ L)	0.25 μ L
Taq-Puffer (5 X)	5 μ L
DMSO (100%)	2 μ L
dNTPs (10 mM)	0.5 μ L
Primer fw (20 pmol/ μ L)	0.5 μ L
Primer rev (20 pmol/ μ L)	0.5 μ L
Ika-Fos8	1 μ L
rH ₂ O	40.25 μ L

Tabelle 60. Two-step-PCR-Bedingungen.

Segmente	Temperatur	Zeit
1 Anfangstemperatur	94 °C	300 s
2 Denaturierung	94 °C	30 s
3 Primerhybridisierung	Primerabhängig: 53-57 °C	30 s
4 Primerhybridisierung_2	Primerabhängig: 58-62 °C	30 s
5 Elongation	72 °C	60 s/kb
6 Finale Elongation	72 °C	300 s

Die Schritte 2-4 wurden 40 Mal wiederholt.

Tabelle 61. Verwendete Temperaturen bei der Two-step-PCR.

	T1 in °C	T2 in °C
<i>i</i>PKS/NRPS_1	53.6	60.2
<i>i</i>PKS/NRPS_2	53.0	58.4
FAD	57.0	60.2
AD	57.2	62.0

4.5.12 PCR-Produkt-Aufreinigung

Die PCR-Produkte wurden mit Hilfe eines ‚PCR-Purification-Kit‘ der Fa. *Jena Bioscience*, der Fa. *Peqlab* oder der Fa. *Promega* aufgereinigt. Die Aufreinigung erfolgte nach den Angaben des entsprechenden Herstellers.

4.5.13 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese diente zur Analytik von PCR-Reaktionen, Plasmiden und Restriktionsverdauen. Außerdem wurden DNA-Fragmente über Agarosegele aufgereinigt und

isoliert (siehe 4.5.14). Standardmäßig wurden 1% (w/v) Agarose in 1 X TAE Puffer durch Erhitzen in einer Mikrowelle gelöst. Nachdem die Flüssigkeit auf etwa 60 °C abgekühlt war, wurde GelRED Nucleic acid stain von der Fa. *Biotium* oder Clear G DNA stain von der Fa. *Serva* zugegeben, die Lösung in einen Träger gegossen und ein Kamm eingesetzt. Nach dem Aushärten der Agarose wurde das Gel in eine Elektrophoresekammer eingesetzt. Bevor die Proben in die Taschen gefüllt werden konnten, wurden sie mit einer 10 X Färbelösung versetzt. Als flüssige Phase wurde 1 X TAE Puffer benutzt. Als Referenz zur Größen- und Konzentrationsbestimmung dienten 3 µL des 1 kb Plus Generuler der Fa. *ThermoFischer*. Durch Anlegen einer elektrischen Spannung (120 V) wurde die Migration der gleichmässig negativ geladenen Proben von Anode zu Kathode bewirkt. Nach 30 min konnten die Gele unter UV-Licht analysiert und dokumentiert werden.

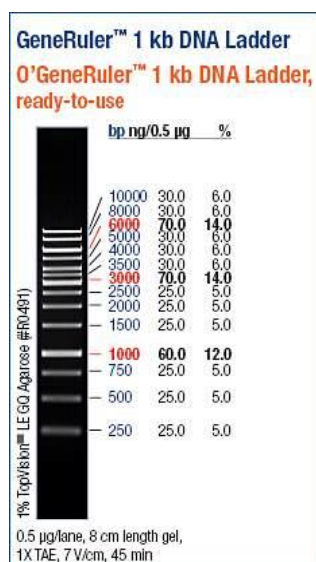


Abbildung 45. GeneRuler 1 kb Plus DNA Marker.

4.5.14 Agarosegel-Aufreinigung

Die Aufreinigung über Agarosegele wurde mit Hilfe des ‚Gel Extraction‘ Kits der Fa. *Jena Bioscience*, der Fa. *Peqlab* oder der Fa. *Promega* durchgeführt. Die Aufreinigung erfolgte nach den Angaben des entsprechenden Herstellers.

4.5.15 Restriktionspaltung von DNA

Restriktionen von DNA wurden zur präparativen Vorbereitung von Klonierungsexperimenten, sowie zur Analytik von Klonierungen und fertigen Plasmiden durchgeführt. Die Restriktionsenzyme wurden von der Fa. *Jena Bioscience* oder von der Fa. *New England Biolabs* bezogen. Die Ansätze wurden für 1.5-2.5 h bei 37 °C inkubiert und bei 65 °C für 20 min inaktiviert. Auf eine eventueller Dephosphorylierung (siehe 4.5.16) folgte die Aufreinigung der verdauten DANN, entweder per Gelextraktion (siehe 4.5.14), oder mittels PCR-Produkt Aufreinigung (siehe 4.5.16). Aus Tabelle 62 und Tabelle 63 sind die Standardzusammensetzungen der Verdauung zu entnehmen.

Tabelle 62. Zusammensetzung des Restriktionsverdau von Vektoren.

Bestandteil	Menge
Vektor	100-500 ng
Restriktionsenzym 1	1 µL
Restriktionsenzym 2	1 µL
Puffer (10 X)	2 µL
rH ₂ O	Auf 20 µL

Tabelle 63. Zusammensetzung des Restriktionsverdau von PCR-Produkten.

Bestandteil	Menge
PCR-Produkt	10 µL
Restriktionsenzym 1	1 µL
Restriktionsenzym 2	1 µL
Puffer (10 X)	2 µL
rH ₂ O	6 µL

Tabelle 64. Zusammensetzung der Restriktionsanalytik von neu klonierten Konstrukten.

Bestandteil	Menge
Plasmid	50-200 ng
Restriktionsenzym(e)	0.5 µL
Puffer (10 X)	1 µL
rH ₂ O	Auf 10 µL

4.5.16 Dephosphorylierung der Vektoren

Nach dem Restriktionsverdau wurden die linearisierten Vektoren vor der Ligation (siehe 4.5.17) an ihrem 5'-Ende dephosphoryliert um die Wahrscheinlichkeit einer Religation zu minimieren. Dazu wurde das Enzym Antarctic Phosphatase von der Fa. *Jena Bioscience* benutzt.

Tabelle 65. Zusammensetzung der Dephosphorylierungsreaktionen.

Bestandteil	Menge
Restriktionsverdau	20 µL
Antarctic Phosphatase Puffer (10 X)	3 µL
Antarctic Phosphatase	1 µL
rH ₂ O	7 µL

Es wurde für mindestens 2 h oder über Nacht bei 37 °C inkubiert und das Enzym anschließend 20 min bei 65 °C inaktiviert. Aufgereinigt wurden die Vektoren mittels ‚PCR-Purification-Kit‘ (siehe 4.5.12) oder Agarose-Gelextraktion (siehe 4.5.14).

4.5.17 Ligation

Zur Ligation von kompatiblen DNA-Enden wurde die T4-Ligase der Fa. *Jena Bioscience* benutzt. Die Zusammensetzung wurde für jede Ligation individuell aus der Konzentration der PCR-Fragmente und der Vektoren berechnet. Dabei war das Verhältnis Vektor zu Insert stets 1:5. Es wurde entweder über Nacht bei 16 °C, oder 3 Tage bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion für 20 min bei 65 °C inaktiviert und in kompetente Bakterienzellen transformiert (siehe 4.5.18)

4.5.18 Transformation

a) In chemisch-kompetente Zellen

20 µL der Ligationsansätze oder 1 µL Plasmid wurden in 100 µL kompetenter Zellkultur suspendiert und für 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 30 s bei 42 °C einem Hitzeschock unterzogen und erneut 2 min auf Eis gekühlt. Dann wurden 500 µL 37 °C warmes LB-Medium zugegeben und die Lösung für 60 min bei 37 °C inkubiert. Die Zellsuspension wurde auf LB-Agar-Platten mit entsprechendem Antibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

b) In elektrokompente Zellen

1-3 µL des Ligationsansatzes oder 1-100 ng Plasmid wurden zu 70 µL einer auf Eis aufgetauten kompetenten Zellsuspension hinzugegeben und in eisgekühlte, sterilisierte Elektroporationsküvetten (Schichtdicke 2 mm) überführt. In einem Elektroporator (Programm EC 2) wurden die Zellen einer kurzzeitigen Spannung von 2.5 kV ausgesetzt. Anschließend wurde 1 mL LB-Medium zugegeben und das Gemisch in ein 1.5 mL Reaktionsgefäß überführt. Es wurde 1 h bei 37 °C inkubiert, die Zellsuspension auf LB-Agar-Platten mit entsprechendem Antibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

4.5.19 Sequenzierung

Zur Überprüfung der erfolgreichen Klonierung sowie der Sequenz der DNA wurden die Plasmide zur Sequenzierung zur Firma *GATC Biotech* eingeschickt. Tabelle 17 zeigt die für die Sequenzierungen verwendeten Primer, sofern nicht die Amplifikationsprimer (Kapitel 4.2.3 , Tabelle 17) benutzt wurden. Die Sequenziererergebnisse sind dem Anhang zu entnehmen.

4.6 Proteinexpression und Proteinaufreinigung

4.6.1 Allgemeine Bedingungen zur Proteinexpression in *E. coli*

In diesem Kapitel wird beschrieben, wie im Allgemeinen die Proteine heterolog produziert wurden. Falls etwaige Proteinexpressionen von dieser Vorschrift abweichen, ist dies explizit im Experimenterteil beschrieben.

Zunächst wurde eine Vorkultur angesetzt, indem entweder ein Klon von einer LB-Agarplatte oder eine Stockkultur des jeweiligen Expressionsstammes zum Animpfen des LB-Mediums mit entsprechenden Antibiotikum benutzt wurde. Die Vorkultur wurde über Nacht bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Vorkultur in einer 1:100 Verdünnung zu 1 L TB-Medium mit Antibiotikum in einem 2 L Erlenmeyerkolben gegeben. Die Hauptkultur wurde bei 37 °C und 200 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 1 inkubiert und anschließend für 30 min auf Eis gekühlt. Mit einer Endkonzentration von 0.1 M IPTG wurde die Proteinüberproduktion induziert und die Kultur über Nacht bei 16 °C und 200 rpm inkubiert. Die Zellen wurden 5 min bei 6000 rpm und 4 °C abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet entweder bei -80 °C gelagert oder sofort weiterverwendet.

4.6.2 Zellaufschluss

Um die Proteine aus den Zellen zu isolieren und aufzureinigen, wurde das Pellet aus 4.6.1 in 4 °C kaltem Lysispuffer (4 mL/g Pellet) resuspendiert. Alle weiteren Schritte des Zellaufschlusses sowie der Aufreinigung wurden auf Eis durchgeführt. Mittels des Ultraschallhomogenisators wurden die Zellen lysiert, indem 10-20 mL Zellsuspension 6 Mal für 10 s beschallt wurden. Zwischen 2 Beschallungen wurde eine Pause von jeweils 10 s eingelegt. In einem Rosettengefäß wurden alternativ, für grössere Pelletvolumina, die Suspensionen 8 min jede 2te Sekunde beschallt. Anschließend wurde bei 4 °C für 30 min und 10000 rpm zentrifugiert und das Zellpellet verworfen.

Proteinexpression und Proteinaufreinigung

Zur Analytik wurden vor der Zentrifugation 100 µL entnommen und 10 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in 290 µL Reinstwasser gelöst und der Überstand mit 210 µL Wasser verdünnt. Von diesen Proben wurden 20 µL entnommen, mit 5 µL 5 X SDS-Ladepuffer (Tabelle 32) versetzt, 5 min bei 95 °C inkubiert, für 2 min bei 14000 rpm zentrifugiert und für die spätere SDS Analytik verwendet.

4.6.3 Aufreinigung von His-Tag-Fusionsproteinen

Zur Aufreinigung der überexprimierten His₈-Tag-Fusionsproteine wurde der Überstand nach dem Zellaufschluss zunächst mit einer Ni-NTA-Agarose-Lösung der Fa. *Jena Bioscience* (1 mL/L Zellkultur) versetzt und für 1 h leicht schüttelnd auf Eis inkubiert. Die Suspension wurde auf eine Ni-NTA-Säule der Fa. *Quiagen* gegeben, die das Harz mit dem gebundenen Fusionsprotein zurückhält und den Überstand mit den natürlichen Proteinen passieren lässt. Das Harz wurde mit verschiedenen Waschpuffern 1-3 (siehe 0) gewaschen, wobei Waschpuffer 3 aufgrund des hohen Imidazolgehalts oftmals zu viel des rekombinanten Proteins eluierte und daher selten verwendet wurde. Mittels des Elutionspuffers wurde das Protein von der Säule eluiert. Von den Waschfraktionen, sowie der Elutionsfraktion wurden je 20 µL entnommen, mit 5 µL SDS-Ladepuffer versetzt, 5 min bei 95 °C inkubiert, für 2 min bei 14000 rpm zentrifugiert und auf ein SDS-Gel aufgetragen.

4.6.4 Entsalzung und Aufkonzentration der Proteine

Das Eluat aus 4.6.3 wurde mittels PD10-Entsalzungssäulen der Fa. *GE Healthcare* entsalzt und umgepuffert. Es wurde nach Herstellerangaben verfahren. Das erhaltene Eluat wurde mittels Vivaspin Zentrifugationskonzentratoren der Fa. *Sartorius Stedim Biotech* zu der gewünschten Konzentration aufkonzentriert. Die verwendeten Vivaspin-Zentrifugatoren besitzen eine semipermeable Membran und arbeiten über Molekulargewichtsausschlussgrößen (MWCO, engl. Molecular Weight Cut-Off). Die Porengröße der ausgewählten Membran bestimmt über

Proteinexpression und Proteinaufreinigung

Größenausschluss die Permeabilität. Diese Porengröße sollte maximal die Hälfte des Molekulargewichts des gewünschten Proteins betragen.

4.6.1 His-Tag-Abspaltung

Nach der Aufreinigung des His₈-getaggten Proteins aus dem Konstrukt pHis8_TEV wurde AryC über eine PD10-Säule in den TEV-Protease-Cleavage-Puffer umgepuffert und mittels Vivaspinkonzentrator aufkonzentriert (siehe 4.6.4 und Tabelle 35). Das Konstrukt wurde mit 0.2 Äq. der TEV-Protease versetzt und anschließend über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am folgenden Tag wurde zu der Lösung Ni-NTA-Agarose gegeben, 45 min bei 0 °C schüttelnd inkubiert und auf eine Ni-Säule gegeben. Da es sich bei AryC um ein Häm-Protein handelt, welches eine charakteristische rote Färbung aufweist, kann eine vollständige Elution des Proteins an farblosem Durchfluss erkannt werden. Das freie Protein wurde mittels Vivaspinkonzentrator aufkonzentriert.

4.6.2 Rekonstitution von AryC

Zur Rekonstitution des Haeminproteins AryC wurde eine Häminchlorid-Stocklösung hergestellt, indem eine Spatelspitze Haeminchlorid in 1 mL einer 0.1 M NaOH-Lsg. gelöst wurde. Mit Hilfe des Nanodrop-Photometers wurde die Absorption der Probe gemessen. Dadurch wurde die Konzentration des Haemins mittels folgender Gleichung bestimmt.

$$A = \epsilon \cdot c \cdot d$$

$$\epsilon_{385} = 58.44 \text{ m/M}\cdot\text{cm und } d = 1 \text{ cm}$$

Es wurden 3 Äq. Haeminchlorid zu AryC in Tris/HCl-Puffer (Tabelle 41) gegeben und für 1.5-2 h auf Eis inkubiert. Zur Abtrennung des Haeminchlorids, wurde die Lösung wie in 4.6.4 beschrieben auf eine PD10 Säule gegeben und anschließend mittels Vivaspin aufkonzentriert.

4.6.3 Aufreinigung mittels FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography)

Zur Kristallisation von AryC wurde das Protein über eine Äkta-FPLC der Fa. *GE Healthcare* aufgereinigt. Daher wurde eine Superdex-75-16/60-Säule mit einem Volumen von 120 mL benutzt. Nach der Equilibrierung der Säule mit dem Laufpuffer (Tris/HCl, Tabelle 41), wurde 1 mL der Probe, gelöst im Puffer, eingespritzt. Die Trennung der Komponenten erfolgt anhand ihrer Größe. Die Flussrate betrug 1 mL/min und die Fraktionsgröße 4 mL. Über ein SDS-Gel wurden die verschiedenen Fraktionen analysiert.

4.6.4 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Proteinkonzentrationen wurden standardmäßig direkt über die berechneten Extinktionskoeffizienten bei 280 nm der einzelnen Proteine mit Hilfe eines Nanodrop-Photometers bestimmt. Bei allen exprimierten PCP-Domänen wurde ein Bradford-Test zur Proteinkonzentrationsbestimmung durchgeführt. Die Methode basiert auf einer Komplexbildung zwischen dem Farbstoff Coomassie-Brilliant-Blue G 250 und dem Protein, wobei sich die Farbe des Farbstoffs von rot nach blau ändert. Die proteingebundene, blaue Form besitzt ein Absorptionsmaximum bei 595 nm, während die ungebundene, rote Form bei 450 nm ein Absorptionsmaximum aufweist. Die photometrische Messung der Absorption bei 595 nm lieferte eine Standardkurve, die keine Linearität aufweist. Die Linearität ergibt sich, wenn jede Probe bei 590 und bei 450 nm vermessen wird und der Quotient OD_{590} und OD_{450} gegen die Konzentration aufgetragen wird.

Für den Bradford Test wurde die Absorption der Proteine in verschiedenen Konzentrationen gemessen. Dazu wurde eine Verdünnungsreihe der Proteinlösung mit Reinstwasser auf 200 μ L aufgefüllt und anschließend 800 μ L der 1 X Arbeitslösung Roti[®]-Nanoquant (*Roth*) zugegeben. Es wurden die Absorptionen bei 590 und 450 nm gemessen und der Quotient bestimmt. Mit Hilfe einer Eichgerade, die mittels Verdünnungsreihe von BSA angefertigt wurde, konnte die Konzentration der Proteine ermittelt werden. Der Mittelwert der aus der Verdünnungsreihe errechneten Konzentration wurde gebildet.

4.6.5 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Analytik der überexprimierten Proteine wurde SDS-Page (Natriumdodecylsulfat Polyacrylamidgelelektrophorese, engl. Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamid Gel Electrophoresis) benutzt. Natriumdodecylsulfat überdeckt die Eigenladung der Proteine, so dass alle Moleküle gleichermaßen negativ geladen sind. Daher findet die Trennung ausschließlich aufgrund der Molekülmassen der Proteine statt, so dass kleinere Moleküle bei angelegtem Strom schneller migrieren als Größere.

Im vertikalen Multigel-Elektrophoresesystem wurden diese Trennungen vorgenommen, wobei Gele in Konzentrationen von 8%, 12% und 15% Acrylamid, abhängig von der Molekularmasse des zu detektierenden Proteins, zum Einsatz kamen. Für kleine zu detektierende Proteine wurden höher-prozentige Gele benutzt. Zunächst wurde das Trenngel (Tabelle 66) angesetzt und zwischen 2 Glasplatten gegossen, welche durch Klammern fixiert waren. Mit Isopropanol wurde das Trenngel überschichtet, damit eine gerade, horizontale Grenzschicht zwischen den Gelen entstand. Nach der vollständigen Polymerisation des Trenngels wurde das Isopropanol verworfen, das Sammelgel (4%) (Tabelle 67) zugegossen und ein Kamm eingesetzt. Das Trenngel dient hierbei allein zur Trennung der Proteine, wobei das Sammelgel zur Fixierung der Proben dient. Das fertige Gel wurde in einer Elektrophoresekammer befestigt und dieses mit 1 X SDS-Laufpuffer der Fa. *Roth* überschichtet. Die Proben, erstellt wie in 4.6.2 und 4.6.3 beschrieben, wurden nach Zugabe des Ladepuffers 5 min bei 95 °C denaturiert, für 2 min bei 14000 rpm zentrifugiert und je 9 µL in die Taschen des Sammelgels überführt. Als Referenz wurde der Unstained Protein Molecular Weight Marker oder der Low Range Unstained Protein Molecular Weight Marker (*Thermo Scientific*, Abbildung 46) verwendet. Es wurde eine Spannung von entweder 90 V oder 120 V angelegt. Falls die Proteine zur sofortigen Weiterverwendung genutzt wurden, wurde die Färbung der Gele mittels Quick Coomassie Stain (*Serva*) für 15 min vorgenommen, wobei bei dieser Methode eine Entfärbung nicht nötig ist. Andernfalls wurden die Gele mittels Roti Blue der Fa. *Roth* zunächst für 12 h angefärbt und anschließend für 1-3 h mit einer Wasser-Methanol-Waschlösung (25% MeOH) entfärbt. Außerdem wurde mit einer weiteren Coomassie Färbelösung (10% (v/v) Eisessig, 30% (v/v) Methanol, 0.25% (w/v) Brilliant-Blau R250) für 30-60 min angefärbt und anschließend für 15 -30 min mit einer Entfärber-Lösung (10% (v/v) Eisessig, 30% (v/v) Methanol) entfärbt. Während des Färbens oder Entfärbens

Proteinexpression und Proteinaufreinigung

wurden die Gele leicht geschüttelt. Zur Dokumentation wurden diese entweder an einer Geldokumentation fotografiert oder eingescannt.

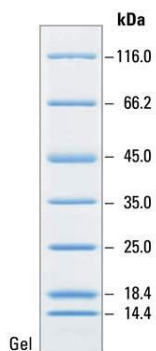
Tabelle 66. Zusammensetzung von Lösungen zur Herstellung von 2 Trenngelen.

Bestandteil Trenngel	8%	12%	15%
	Volumen	Volumen	Volumen
Trenngel-Puffer (Tabelle 33)	3.75 mL	3.75 mL	3.75 mL
H ₂ O	7.5 mL	6.75 mL	5.625 mL
Acrylamid (40%)	3.75 mL	4.5 mL	5.625 mL
APS (10%, w/v)	150 µL	150 µL	150 µL
TEMED	15 µL	15 µL	15 µL

Tabelle 67. Zusammensetzung für 2 Sammelgele.

Bestandteil Sammelgel	8%
	Volumen
Sammelgel-Puffer (Tabelle 34)	1.25 mL
H ₂ O	3.25 mL
Acrylamid (40%)	0.5 mL
APS (10%, w/v)	50 µL
TEMED	5 µL

a)



b)

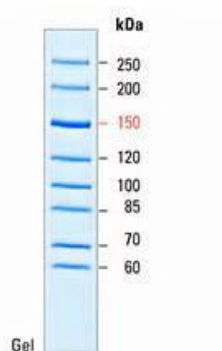


Abbildung 46. a) Unstained Protein Molecular Weight Marker, b) Low Range Unstained Protein Molecular Weight Marker der Fa. *Thermo Scientific*.

4.6.6 Horizontale Konjugation in Streptomyceten

Zur horizontalen Konjugation in Streptomyceten wurde der Shuttle Vektor pXY200oriT und die *E. coli* ET12567-Zellen mit dem pUZ8002 Vektor benutzt. Der Stamm ist in der Lage einen sogenannten Pilus aufzubauen, der es möglich macht, einen Shuttlevektor in Streptomyceten einzubringen. Nach Transformation des pXY200oriT mit entsprechendem Insert in elektrokompetente *E. coli* ET12567-Zellen, wurden Klone zu 5 mL LB-Medium mit Chloramphenicol (25 µg/mL) und Ampicillin (100 µg/mL) gegeben und bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Am folgenden Tag wurden 1.5 mL der Übernachtskultur in 300 mL frisches LB-Medium überführt und bis zu einer OD von 0.6 bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Die Zellen wurden zweimal bei 4°C für 5 min un 5000 rpm abzentrifugiert, und mit 10 mL LB-Medium ohne Antibiotikum gewaschen. Schließlich wurden sie in 500 µL LB-Medium resuspendiert. Parallel dazu wurde eine Sporenlösung von *S. lividans* TK24 (gelagert in 50 % Glycerol bei -80 °C) in 500 µL 2xYT-Medium auf 50 °C für 15 min erhitzt und bei 37 °C gelagert. Die aktivierten Sporen wurden mit den gewaschen *E. coli* ET12567 gemischt und kurz zentrifugiert. Das Pellet wurde auf eine MS-Platte ausgestrichen und bei 30 °C über Nacht inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Platte mit 1 mL rH₂O mit 1.25 mg Apramycin und 0.5 mg Nalidixinsäure, um das Wachstum der *E. colis* zu vermeiden, überschichtet und weiterhin bei 30 °C inkubiert. Nach 3 Tagen wurden die potentiellen Exkonjugate auf GYM-Platten mit Apramycin (50 µg/mL) überführt und es wurde weiter bei 30 °C inkubiert.

4.6.7 Protoplastentransformation

Die Protoplasten wurden wie in Kapitel 4.5.7 beschrieben vorbereitet. 4 µL Plasmid wurden mit Hilfe von 200 µL einer 25% Polyethylenglycol-Lsg. in Wasser zu 50 µL Protoplasten gegeben und das Gemisch wurde auf einer R5-Platte ausgestrichen. Es wurde für 20 Stunden bei 30 °C inkubiert, bevor 1.5 mL rH₂O mit 25 µL Apramycin (25 µg/mL) versetzt wurde und die Platte mit der Lösung vollständig bedeckt und weiterhin bei 30 °C inkubiert wurde.

4.7 Biotechnologische Produktion der Bicyclen 119a-c und 59

4.7.1 Allgemeine Expressionsbedingungen

Zunächst wurde Amberlite XAD-16 gewaschen. Hierzu wurden 10 g Amberlite 2 x mit 50 mL eines 1:1 Lösungsmittelgemisches aus MeOH und Aceton gewaschen. Anschließend wurde 10 x mit destilliertem Wasser gewaschen und das Amberlite an Luft getrocknet.

LB-Medium wurde mit Kanamycin versetzt und mit der Stockkultur von pCX2_pxa in *E. coli* DH10B::*mtaA* angeimpft. Diese wurde über Nacht bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Am folgenden Morgen wurden die Vorkultur in einer 1:100 Verdünnung zu TB Medium gegeben, welches mit Kanamycin versetzt war. Die Hauptkulturen wurden bei 28 °C und 200 rpm 19 h inkubiert, bevor L-Arabinose in einer Endkonzentration von 0.1 M, sowie wahlweise jeweils 100 mg/L Serin, Prolin und Octansäure oder Laurinsäure zugegeben wurden. Nach 12 h Inkubation wurden 2% (w/v) zuvor gewaschenes Amberlite XAD-16 zugegeben und für weitere 12 h bei den selben Bedingungen inkubiert.

4.7.2 Extraktion der Produkte

Die Zellkulturen wurden für 5 min bei 4000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Zur Elution der gebundenen Substanzen aus dem Amberlit-Material wurde dieses mit MeOH überschichtet, 1 h bei Raumtemperatur inkubiert und das MeOH durch Filtration abgetrennt. Dieser Prozess wurde weitere 2 Mal wiederholt. Anschließend wurden alle MeOH-Phasen vereinigt und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in einem H₂O/EtOAc, 1:1-Gemisch aufgenommen, die organische Phase wurde abgetrennt und die wässrige Phase wurde weitere 3 x mit EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Zur Analytik wurde der Rückstand in MeOH gelöst und mittels LC-MS untersucht. Die Substrate wurden mittels semi-präparativer HPLC (A = Wasser + 0.05% TFA, B = ACN + 0.05% TFA, 0-30 min 50% B; Säule: Eurospher II 100 RP C-18, 5 µm, 250 x 16 mm mit Vorsäule: 30 x 16 mm der Fa. Knauer) mit Detektion bei 340 nm isoliert.

Biotechnologische Produktion der Bicyclen 119a-c und 59

Tabelle 68. Retentionszeiten der isolierten Produkte.

Substrat	Retentionszeit
119a	12.5 min
119b	9.5 min
119c	15.5 min
59	20.5 min

4.8 Enzymatische Assays im Rahmen des Brabantamid-Projekts

4.8.1 PCP-Beladungsassays mit dem CoA-Derivat 57c

Die frisch aufgereinigte *apo*-Bra_PCP2-Domäne (120 μ M) wurde in Tris-HCl-Puffer gelöst und es wurden 10 μ M Sfp und 250 μ M CoA-Substrat **57c** zugegeben. Die Reaktionslösung wurde 2 h bei 30 °C inkubiert. Zur Analytik wurde nach den jeweiligen Reaktionen 10 min bei 10 °C und 14000 rpm zentrifugiert und 120 μ L des Überstandes entnommen. Es wurden 80 μ L der Probe in die HPLC injiziert und mittels LC-MS analysiert

4.8.2 Thioesterase Assays mit vereinfachten Substraten 57a,b und 83

Tabelle 69. Zusammensetzungen der enzymatischen Umsetzungen von **57a**, **57b** und **83** mit der Thioesterase oder Thioesterase-PCP-Domäne.

	Substrat, [c]	Substrat gelöst in:	Enzym, [c]	NADPH [c]	Puffer
1 ^[141]	57b , 391 μ M	DMSO (5%)	TE-PCP, 531 μ M	-	HEPES, pH 7.5, NaCl (50 mM)
2	57b , 1.2 mM	TrisHCl, pH 7.5	TE-PCP, 12 μ M	-	Tris-HCl (50 mM), pH 7.5
3	57b , 52 μ M	DMSO (5%)	TEPCP, 0.5 μ M	-	HEPES, pH 6.0
4 ^[146]	57b , 52 μ M	DMSO (5%)	TEPCP, 0.5 μ M		MOPS, pH 7.0
5 ^[140]	57b , 52 μ M	DMSO (5%)	TEPCP, 0.5 μ M		HEPES, pH 7.0
6	57b , 500 μ M	DMSO (5%)	TE, 5 μ M	-	Tris-HCl (50 mM), pH 7.5
7	57b , 500 μ M	DMSO (5%)	TE, 5 μ M	100 mM	Tris-HCl (50 mM), pH 8.0
8	57b , 500 μ M	DMSO (5%)	TEPCP, 5 μ M	100 mM	Tris-HCl (50 mM), pH 8.0

Enzymatische Assays im Rahmen des Brabantamid-Projekts

	Substrat, [c]	Substrat gelöst in:	Enzym, [c]	NADPH [c]	Puffer
9	57b , 1 mM	DMSO (5%)	TEPCP, 5 µM	100 mM	Tris-HCl (50 mM), pH 8.0
10	57b , 1 mM	ACN (1 mg/mL)	TE, 2.5 µM	-	Tris-HCl (50 mM), pH 7.5, NaCl (200 mM), 10 % Glycerol
11	57b , 1 mM	ACN (1 mg/mL)	TEPCP, 20 µM	-	Tris-HCl (50 mM), pH 7.5, NaCl (200 mM), 10 % Glycerol
12	83 , 500 µM	DMSO (5%)	TEPCP, 5 µM	-	Tris-HCl (50 mM), pH 7.5
13	83 , 500 µM	DMSO (5%)	TE, 5 µM	-	Tris-HCl (50 mM), pH 7.5
14	57b , 1 mM	ACN (1mg/mL)	TE, 2.5 µM	-	Tris-HCl (50 mM), pH 7.5, NaCl (200 mM), 10 % Glycerol
15	57b , 1 mM	ACN (1mg/mL)	TE-PCP, 20 µM	-	Tris-HCl (50 mM), pH 7.5, NaCl (200 mM), 10 % Glycerol

Zur enzymatischen Umsetzung der vereinfachten Substrate **57a,b** und **83** mit der Thioesterase (TE) oder der Thioesterase-PCP-Didomäne (TEPCP) des Brabantamid-Genclusters wurden mehrere Bedingungen getestet (Tabelle 69). Die Reaktionen wurden in einem Gesamtvolumen von 250 µL-1 mL durchgeführt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am folgenden Tag wurde das halbe Volumen an EtOAc zu den Lösungen gegeben, die Reaktion gemischt und es wurde 5 min bei 10.000 rpm zentrifugiert. Die organische Phase wurde abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß gegeben. Die Extraktion wurde ein weiteres Mal wiederholt, bevor das EtOAc unter einem Argonstrom eingeblasen wurde. Der Rückstand wurde in einer adäquaten Menge ACN aufgenommen und die Proben mittels HPLC, oder LC-MS untersucht.

4.8.3 BraC Assays mit vereinfachten Substraten

Folgende Bedingungen wurden zur enzymatischen Umsetzung von **57a** oder **57b** mit der Monooxygenase des Brabantamid Gencluster getestet:

Tabelle 70. Zusammensetzung der enzymatischen Umsetzungen von **57a, b** mit der Monooxygenase.

	Substrat, [c]0	Substrat gelöst in	MO [c]	FAD [c]	NADPH [c]	Puffer
1	57b 1 mM	DMSO (5%)	10 μ M	10 μ M	100 mM	Tris-HCl (50 mM), pH 8.0
2	57b 1 mM	DMSO (5%)	10 μ M	10 μ M	100 mM	Tris-HCl (50 mM), pH 8.0
3	57b 1 mM	ACN (1mg/mL)	10 μ M	10 μ M	100 mM	Tris-HCl (50 mM), pH 7.5, NaCl (200 mM), 10% Glycerol
4	57a 1 mM	ACN (1mg/mL)	10 μ M	10 μ M	100 mM	Tris-HCl (50 mM), pH 7.5, NaCl (200 mM), 10% Glycerol

Zur enzymatischen Umsetzung der vereinfachten Substrate **57a, b** mit der Monooxygenase, BraC des Brabantamid Gencluster wurden mehrere Bedingungen getestet (Tabelle 70). Die Reaktionen wurden in einem Gesamtvolumen von 250 μ L-1 mL durchgeführt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am folgenden Tag wurde das halbe Volumen an EtOAc zu den Lösungen gegeben, die Reaktion gemischt und es wurde 5 min bei 10.000 rpm zentrifugiert. Die organische Phase wurde abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß gegeben. Die Extraktion wurde ein weiteres Mal wiederholt, bevor das EtOAc unter einem Argonstrom eingeblasen wurde. Der Rückstand wurde in einer adäquaten Menge ACN aufgenommen und die Proben mittels HPLC, oder LC-MS untersucht.

4.8.4 Gekoppelte Assays von Thioesterase und BraC mit vereinfachten Substraten

Es wurden ebenso enzymatische Umsetzungen von vereinfachten Substraten **57a, b** mit der Thioesterase (TE), der Thioesterase-PCP-Didomäne (TEPCP) und der Monooxygenase (MO) des Brabantamid Genclusters durchgeführt (Tabelle 71).

Tabelle 71. Zusammensetzungen der enzymatischen Umsetzungen der vereinfachten **57a, b** mit der TE/TEPCP und der MO.

Substrat, [c]	Substrat gelöst in:	MO [c]	TEPCP/TE, [c]	FAD [c]	NADPH [c]	Puffer
57b 1 mM	DMSO (5%)	1 μ M	TEPCP, 1 μ M	1 μ M	100 mM	Tris-HCl (50 mM), pH 7.5, NaCl (200 mM), 10% Glycerol
57b 1 mM	ACN (1 mg/mL)	1 μ M	TE, 2.5 μ M	10 μ M	100 mM	Tris-HCl (50 mM), pH 7.5, NaCl (200 mM), 10% Glycerol
57a 1 mM	ACN (1 mg/mL)	1 μ M	TE, 2.5 μ M	10 μ M	100 mM	Tris-HCl (50 mM), pH 7.5, NaCl (200 mM), 10% Glycerol
57b 1 mM	ACN (1 mg/mL)	1 μ M	TEPCP, 20 μ M	10 μ M	100 mM	Tris-HCl (50 mM), pH 7.5, NaCl (200 mM), 10% Glycerol
57a, 1 mM	ACN (1 mg/mL)	1 μ M	TEPCP, 20 μ M	10 μ M	100 mM	Tris-HCl (50 mM), pH 7.5, NaCl (200 mM), 10% Glycerol

Zur enzymatischen Umsetzung der vereinfachten Substrate **57a,b** mit BraC und der TE-, beziehungsweise der TE-PCP-Domäne des Brabantamid Genclusters wurden mehrere Bedingungen getestet (Tabelle 71). Die Reaktionen wurden in einem Gesamtvolumen von 250 μ L-1 mL durchgeführt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am folgenden Tag wurde das halbe Volumen an EtOAc zu den Lösungen gegeben, die Reaktion gemischt und es wurde 5 min bei 10.000 rpm zentrifugiert. Die organische Phase wurde abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß gegeben. Die Extraktion wurde ein weiteres Mal wiederholt, bevor das EtOAc

unter einem Argonstrom eingeblasen wurde. Der Rückstand wurde in einer adäquaten Menge ACN aufgenommen und die Proben mittels HPLC, oder LC-MS untersucht.

4.8.5 BraC-Assays mit dem Bicyclus 59

a) Nach Huang et al.^[154]

Das Edukt **59** wurde in einem DMSO/ACN Gemisch 1:1 zunächst vorgelöst. Anschließend wurden 0.5 mM in den Tris-HCl-Puffer (100 mM, pH 8.25) gegeben. Es wurden 10 µM BraC, 20 µM PetF, 10 µM Fpr, 1 mM NADPH, 20 µM GDh, 20 µM Glukose (sterilfiltriert) und 20 µM FAD hinzugefügt. Die Reaktion wurde in 0.5 mL Gesamtvolumen durchgeführt und es wurde bei 30 °C und 800 rpm inkubiert. Nach vier Stunden und nach Inkubation über Nacht wurden jeweils 250 µL entnommen, mit EtOAc extrahiert, das Lösungsmittel entfernt, den Rückstand in ACN aufgenommen und die Probe mittels LC-MS untersucht.

b) Nach Gibson et al.^[37]

Das Edukt **59** wurde in einem DMSO/ACN Gemisch 1:1 zunächst vorgelöst. Anschließend wurden 0.5 mM in den Tris-HCl-Puffer (100 mM, pH 8.25) gegeben. Es wurden 0.1 mM BraC, 1 mM NADPH und 10 mM FAD hinzugefügt. Die Reaktion wurde in 0.5 mL Gesamtvolumen durchgeführt und es wurde bei 30 °C und 800 rpm inkubiert. Nach vier Stunden und nach Inkubation über Nacht wurden jeweils 250 µL entnommen, mit EtOAc extrahiert, das Lösungsmittel entfernt, den Rückstand in ACN aufgenommen und die Probe mittels LC-MS untersucht.

4.9 Enzymatische Assays im Rahmen des Arylomycin-Projekts

4.9.1 CO-Bindeassays von AryC

Um die Aktivität des Cytochrom-P450 AryC nachzuweisen wurde ein CO-Bindeassay durchgeführt. Zunächst wurde von dem unbehandelten Protein UV/Vis-Spektren im Bereich 400–600 nm aufgenommen. Dann wurden 20 µL des Proteins in 1.5 mL Reaktionsgefäße gefüllt und die Lösung 3 x mit CO-Gas gesättigt. Nach sofortiger Zugabe von Na₂S₂O₄ wurde ein weiteres UV-Spektrum aufgenommen. Als Negativ-Kontrolle diente eine ausschließlich mit Na₂S₂O₄ behandelte Probe.

4.9.2 PCP-Beladungsassays

a) Mit dem Thioester **64b**

Zunächst wurde die *apo*-PCP-Domäne zu dessen *holo*-Form aktiviert, indem 200 µM PCP-Domäne zusammen mit 10 µM Sfp und 500 µM CoA in dem Tris-HCl Puffer für ppant-Assays (Tabelle 42) gelöst und für eine Stunde bei 37 °C inkubiert wurde. Anschließend wurden 0.5 mM Substrat, gelöst in ACN, die selbe Menge an ACN und Puffer zugegeben und für 2 h bei 28 °C inkubiert. Zur Analytik wurde nach den jeweiligen Reaktionen 10 min bei 10 °C und 14000 rpm zentrifugiert und 120 µL des Überstandes entnommen. Es wurden 80 µL der Probe in die HPLC injiziert und mittels LC-MS analysiert.

b) Mit dem CoA-Derivat **126**

120 µM *apo*-PCP-Domäne wurden in Tris-HCl-Puffer für ppant-Assays gelöst und es wurde 10 µM Sfp und 250 µM CoA-Substrat **126** zugegeben. Die Reaktionslösung wurde 2 h bei 30 °C inkubiert.

Enzymatische Assays im Rahmen des Arylomycin-Projekts

Zur Analytik wurde nach den jeweiligen Reaktionen 10 min bei 10 °C und 14000 rpm zentrifugiert und 120 µL des Überstandes entnommen. Es wurden 80 µL der Probe in die HPLC injiziert und mittels LC-MS analysiert.

4.9.3 Biarylkupplungsassays

Für Beladungsassays wurden 4 µM frisch aufgereinigtes und rekonstituiertes AryC in Tris-HCl-Puffer zugegeben, sowie 10 µM PetF in Tris-HCl-Puffer, 20 µM FPrDH5α in Tris-HCl-Puffer, 1 mM NADPH in Wasser gelöst, 1 mM Glukose in Wasser gelöst und sterilfiltriert und 20 µM Gdh-BM3 in Tris-HCl-Puffer. Es wurde 1 h bei 30 °C und 300 rpm inkubiert. Anschließend wurde 1/13 des Gesamtassayvolumen von einer 1:1-Lsg von Methylhydrazin in Wasser zu der Reaktionslösung gegeben, um das Substrat von der PCP-Domäne abzuspalten. Es wurde für weitere 30 min bei 30 °C und 300 rpm inkubiert. Zur Analytik wurde nach den jeweiligen Reaktionen 10 min bei 10 °C und 14000 rpm zentrifugiert und 120 µL des Überstandes entnommen. Es wurden 80 µL der Probe in die HPLC injiziert.

4.9.4 Laccase-Assay

Zur Untersuchung der enzymatischen Biarylkupplung mittels der Laccase *Trametes versicolor* und der HRP an einem vereinfachten Arylomycin-Substrat **135** wurden folgende Ansätze angefertigt.

Tabelle 72. Zusammensetzung der enzymatischen Assays mit der Laccase aus *T.versicolor*.

c (Substrat)	c (<i>T.Versicolor</i>)	Inkubationszeit
0.53 mg/mL	0.37 U/mL	48 h
0.1 mg/mL	0.045 U/mL	24 h

Enzymatische Assays im Rahmen des Arylomycin-Projekts

Tabelle 73. Zusammensetzung der enzymatischen Assays mit HRP.

c (Substrat)	c (HRP)	H₂O₂	Inkubationszeit
0.53 mg/mL	45 U/mL	2.5 mM	48 h
0.1 mg/mL	30 U/mL	2.5 mM	24 h

Die Assays wurden im Citrat-Phosphat-Puffer bei pH = 5.5, bei Raumtemperatur und 300 rpm durchgeführt. Nach Ablauf der Reaktionsdauer wurden die Reaktionslösungen mit Ethylacetat extrahiert, die organische Phase entnommen, das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in EtOAc (HPLC-grade) aufgenommen und mittels LC-MS untersucht.

4.10 Kristallisation von AryC

4.10.1 Prä-Kristallisationstest

Um eine geeignete Konzentration für die folgenden Kristallisationsversuche zu bestimmen, wurde ein Prä-Kristallisationstest durchgeführt. Dieser bestand aus dem 'precrystallisation-Kit' der Fa. *Quiagen*, der nach Herstellerangaben angewendet wurde.

4.10.2 Thermostabilitätsassay

Um die besten Puffer-Bedingungen für die Kristallisation von AryC zu identifizieren, wurden Thermostabilitätstests durchgeführt. Im ersten Teil wird so die Denaturierungstemperatur des Proteins unter verschiedenen Pufferbedingungen getestet, wie pH-Wert, Salzkonzentration, Puffer-Typ und Puffer-Konzentration (siehe Anhang). Der Assay wurde mit einer Proteinkonzentration von 27 μM und dem Fluoreszenzfarbstoff SYPRO Orange (5 X) durchgeführt. Sypro Orange besitzt die Eigenschaft, Proteine zu binden und zu fluoreszieren, falls diese denaturieren. Der Farbstoff und das Protein wurden im Verhältnis 1:1 in die vorgefertigten 96-well-Platten (*EMBL Hamburg*) überführt. Anschließend wurde bei 4°C bei 4000 rpm für 10 min abzentrifugiert und die Platte in eine RT-PCR-Maschine überführt. Der erste Wendepunkt in der Fluoreszenzkurve beschreibt die Schmelztemperatur des Proteins unter den verschiedenen Bedingungen. Es werden zuerst 10 Zyklen bei 25 °C durchlaufen und darauffolgend 140 Zyklen mit einem graduellen Temperaturanstieg von 25 °C auf 98 °C, wobei jede Minute die Fluoreszenz gemessen wurde.

Im zweiten Teil wurde die Stabilität des Proteins in verschiedenen Puffern mit ausgewählten Additiven, wie Chaotropische Reagenzien, Salze, Mono- und Multivalente Ione, Reduktionsmittel, Polyamine, Imidazole, Detergenzien, Alkohole, Aminosäuren, Zucker und Cofaktoren (siehe Anhang) getestet. Das Prinzip und die Vorbereitungen, sowie die Durchführung sind gleich jener, die oben beschrieben wurden. Die Konzentration von AryC betrug hier 37 μM .

4.10.3 Kristallisation

Die verwendeten Proteinkonzentrationen zur Kristallisation lagen zwischen 15 und 50 mg/mL. Das Phoenix-Robot-System pipettierte das Protein und verschiedene Screening-Kits, pHClear Suite, Classic II Suite, PEG suite, AmSO₄ Suite, JCSG suite und die MPD Suite der Fa. *Qiagen* auf sitting-drop-vapour-diffusion-96-well-INTELLI-Platten der Fa. *Art Robbins Instruments*. Das Reservoir enthielt dabei 40 µL Fassungsvermögen, wobei die Tropfenvolumina bei 0.15 µL lag und das Protein:Puffer Verhältnis bei 1:1. Anschließend wurden die Platten luftdicht verschlossen und bei 4 °C und 20 °C über mehrere Wochen gelagert. Nach verschiedenen Zeitabständen von 1 Tag bis zu mehreren Wochen wurde der Kristallisationsfortschritt unter einem Mikroskop geprüft.

4.11 Chromatographische Methoden

Dünnschichtchromatographie (DC): Die für die Dünnschichtchromatographie verwendeten Aluminiumfolien (DC Kieselgel 60 F₂₄) stammten von der Firma *Merck*. Aufgetragene Substanzen wurden unter einer UV-Lampe bei 254 nm betrachtet. Bei UV-inaktiven Substanzen wurde die DC-Platte durch Eintauchen in folgenden Lösungen mit anschließender Wärmebehandlung (ca. 250 °C) entwickelt.

<i>Ninhydrinlösung:</i>	500 mg Ninhydrin, 3.0 mL Eisessig in 97 mL Ethanol
<i>Anisaldehydlösung:</i>	3.7 mL p-Anisaldehyd, 1.5 mL Eisessig, 5 mL konz. H ₂ SO ₄ in 135 mL Ethanol
<i>Seebach-Reagenz:</i>	5.0 g Ce(SO ₄) ₂ , 2.5 g (NH ₄) ₂ MoO ₄ , 16.0 mL konz. H ₂ SO ₄ in 450 mL Wasser
<i>Kaliumpermangantlösung</i>	4.00 g KMnO ₄ und 2.00 g NaHCO ₃ in 100 mL Wasser

Säulenchromatographie: Als stationäre Phase wurde für die Säulenchromatographie Silicagel 60 Geduran® Si 60 (40 - 60 µm) der Firma *Merck* verwendet.

High Performance Liquid Chromatography (HPLC): Für die HPLC-Analyse von Proben wurden computergesteuerte *Jasco*-Systeme verwendet (System1: MD-2010 Plus Multiwavelength Detector, DG-2080-53 3-Line Degaser, zwei PU-2086 Plus Intelligent Prep. Pumps, AS-2055 Plus Intelligent Sampler, MIKA 1000 Dynamic Mixing Chamber, 1000 µL *Portmann Instruments AG* Biel-Benken Probenschleife, LCNetII/ADC; System2: UV-1575 Intelligent UV/VIS Detector, DG-2080-53 3-Line Degaser, zwei PU-1580 Intelligent HPLC Pumps, AS-1550 Intelligent Sampler, HG-1580-32 Dynamic Mixer, LC-NetII/ADC). Die Auswertung erfolgte mittels ChromPass-Chromatography-Data-System-Software bzw. Galaxie-Chromatography-Software, jeweils von der Firma *Jasco*. Es wurde eine Säule Eurospher II 100-3 C18 A (150 x 4.6 mm) mit integrierter Vorsäule der Fa. *Knauer* eingesetzt. Als Laufmittel dienten A = Wasser + 0.05% TFA und B = Acetonitril + 0.05% TFA. Die entwickelte Methode bestand aus folgendem Gradienten: von 0-2 min 5% B, 2-25 min 95% B, 25-30 min 95 % B, 30-31 min 5% B, 31- 38 min

Chromatographische Methoden

5% B bei einem Fluss von 1 mL/min. Wenn nicht ausdrücklich ein anderer Gradient erwähnt wurde, wurde die Analyse nach dieser Methode durchgeführt.

Produkt-Isolierung über semi-präparative HPLC-Trennungen wurden an einem PC-gesteuerten *Jasco*-HPLC-System durchgeführt, das sich wie folgt zusammensetzte: UV-1575 Intelligent UV/VIS Detector, zwei PU-2086 Intelligent HPLC Pumps, MIKA 1000 Dynamic Mixing Chamber, 1000 µL *Portmann Instruments AG* Biel-Benken Probenschleife, LC-NetII/ADC, *Rheodyne* Injektionsventil. Die Programmsteuerung wurde mittels *Galaxie*-Software durchgeführt. Das Lösungsmittelsystem bestand aus A = Wasser + 0.05% TFA und B = Acetonitril + 0.05% TFA. Die angewendeten Gradienten und Säulen sind in den entsprechenden Versuchsvorschriften notiert.

Nach der präparativen Produkt-Isolierung wurden die entsprechenden Fraktionen kombiniert und unter vermindertem Druck vom Acetonitril befreit. Die wässrigen Phasen wurden anschließend entweder mittels Lyophilisation getrocknet oder mit Ethylacetat extrahiert. Die organischen produkthaltigen Lösungen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und das organische Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

HPLC-MS-Kopplung: HPLC-HRMS-Untersuchungen wurden an der *Rheinischen Friedrich-Wilhelms Universität Bonn* von den Mitarbeitern der Abteilung für Massenspektroskopie am *Kekulé-Institut für Organische Chemie und Biochemie* unter der Leitung von Frau Dr. Engeser an einem *micrOQ-TOF* Flugzeitspektrometer (*Bruker Daltonik*) mit *Apollo-ESI-Quelle* gekoppelt mit einer *Agilent-1200*-HPLC-Anlage mit einer Messgenauigkeit von 5 ppm durchgeführt. Die Steuerung des Systems erfolgte über *HyStar* (*Bruker*) und die Messergebnisse wurden mittels *Data Analysis* der Fa. *Bruker* ausgewertet. Die verwendeten HPLC-Methoden und Säulen sind, falls in der Synthesevorschrift nicht anders erwähnt, identisch mit denen aus der analytischen HPLC. An der *TUM* wurden für die HPLC-MS-Analyse die unter dem Kapitel *HPLC* und *MS* aufgelisteten analytischen HPLC-Systeme mit dem MS-System gekoppelt. Die verwendeten HPLC-Methoden und Säulen sind, falls in der Synthesevorschrift nicht anders erwähnt, identisch mit denen aus der analytischen HPLC.

Mitteldrucksäulenchromatographie (MPLC, engl. Medium Pressure Liquid Chromatography): Die *Reveleris®-X2*-MPLC-Anlage stammte von der Fa. *Grace*. Es wurden *Reveleris®-Silica-* oder *Reverse-Phase-(RP)-C18-Fertigsäulen* (*Grace*) unterschiedlicher Größen je nach Bedarf benutzt. Das System wurde mittels *Reveleris®-Navigator™* Software der Fa. *Grace* gesteuert,

Chromatographische Methoden

wobei die UV-Detektion bei 220 nm, 254 nm, 280 nm und 340 nm erfolgte. Die verwendeten Säulengrößen, Lösungsmittelsysteme und Gradienten sind in den entsprechenden Synthesevorschriften vermerkt.

4.12 Allgemeine Arbeitsvorschriften

4.12.1 Präparatives Arbeiten

Für luft- und feuchtigkeitsempfindliche Reaktionen wurde unter Verwendung der Standard-Schlenktechniken gearbeitet.^[192] Dafür wurden Glasgeräte vor Gebrauch mehrmals unter Vakuum ausgeheizt und mit Argon geflutet. Kanülen und Spritzen wurden vor Gebrauch mit Argon gespült und die Entnahme und Zugabe von flüssigen Reagenzien oder Lösungsmitteln erfolgte durch ein Septum.

Die verwendeten Chemikalien wurden in bestmöglicher Reinheit von den Firmen *abcr*, *Acros Organics*, *Alfa Aesar*, *Carbolution*, *Carl Roth*, *Merck*, *Sigma Aldrich* und *VWR* bezogen und, sofern nicht anders angegeben, ohne weitere Aufreinigung benutzt.

4.12.2 Lösungsmittel

Für die HPLC- und MS-Untersuchungen wurden HPLC-grade und HPLC-MS-grade Acetonitril von *Fisher Scientific Deutschland* und *VWR* und HPLC-grade Methanol von *VWR* verwendet. Das HPLC-Wasser wurde über ein *TKA-GenPure*-Wasseraufbereitungssystem gereinigt und entionisiert. Als Puffer wurde Trifluoressigsäure (TFA, für Peptidsynthese) der Fa. *Carl Roth* benutzt. Für die Säulenchromatographie wurden Dichlormethan, Methanol, Cyclohexan, Pentan, Ethylacetat und Aceton über Destillation gereinigt. Für die Synthesen wurden reine, und falls nötig trockene, Lösungsmittel von *Sigma Aldrich*, *Fisher Scientific*, *VWR*, *Acros Organics* und *Carl Roth* gekauft. THF, sowie DCM wurden entweder entsprechend D. B. G. Williams *et al.*^[193] getrocknet und unter Argon über Molekularsieb aufbewahrt, oder durch eine Lösungsmittelreinigungsanlage (SPS-800) der Fa. *Braun* gereinigt und über folgende Reinigungskolonnen, unter Verwendung von Argon als Inertgas, getrocknet:

Dichlormethan: 2 × MB-KOL-A (Aluminiumoxid)

Diethylether: 1 × MB-KOL-A (Aluminiumoxid), 1 × MB-KOL-M Typ 2
(Molekularsieb 3 Å)

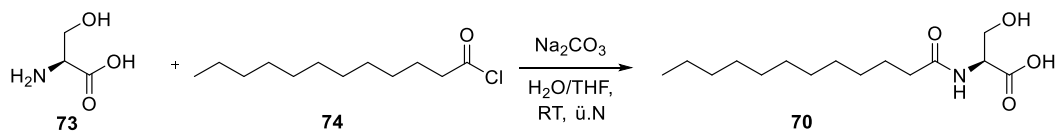
Allgemeine Arbeitsvorschriften

Tetrahydrofuran: 2 × MB-KOL-M Typ 2 (Molekularsieb 3 Å)

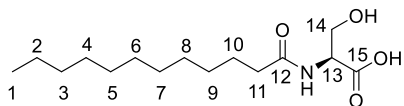
Prozentwerte (%) beziehen sich immer auf Massenprozente, Eluentenverhältnisse werden als Volumenmischungen mit v/v angegeben.

4.13 Synthesen der vereinfachten Substrate 57a-c

4.13.1 N-Lauryl-L-Ser-OMe (**70**)



L-Serin (**73**) (10.00 g, 0.09 mol, 1.0 Äq.) wurde in 250 mL dest. Wasser und 100 mL THF gelöst. Unter Rühren wurde Na_2CO_3 (15.13 g, 0.14 mol, 1.5 Äq.) zugefügt. Über 4 Stunden wurde jede Stunde eine Portion an Laurinsäurechlorid (**74**) (4 x 5.5 mL, 20.7 g, 0.09 mmol, 1.0 Äq.) zugegeben. Nach beendeter Zugabe wurde für weitere 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Am folgenden Tag wurde THF unter vermindertem Druck entfernt und die wässrige Lösung mit 1 N HCl auf einen pH-Wert von 2 angesäuert. Der sich dabei bildende weiße Feststoff wurde abfiltriert und unter Rühren in 100 mL Diethylether resuspendiert. Diese Suspension wurde für 2 Tage bei 4 °C gelagert, der Feststoff abfiltriert und unter Hochvakuum getrocknet. Es wurden 83% (21.5 g, 0.07 mol) eines weißen Feststoffes der Säure **70** erhalten.



Summenformel: $\text{C}_{15}\text{H}_{29}\text{NO}_4$.

Molmasse: 287.40 g/mol.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, MeOD-d_4): δ (ppm) = 4.49 (t, 1H, $^3J = 5.2$ Hz, H-13); 3.88 (dd, 1H, $^2J = 11.2$ Hz, $^3J = 5.2$ Hz, H-14); 3.80 (dd, 1H, $^3J = 11.2$ Hz, $^2J = 5.2$ Hz, H-14'); 2.27 (t, 2H, 1H, $^3J = 7.6$ Hz, H-11); 1.66-1.56 (m, 2H, H-10); 1.37-1.27 (m, 16H, H-2 bis H-9); 0.88 (t, 3H, $^3J = 6.8$ Hz, H-1).

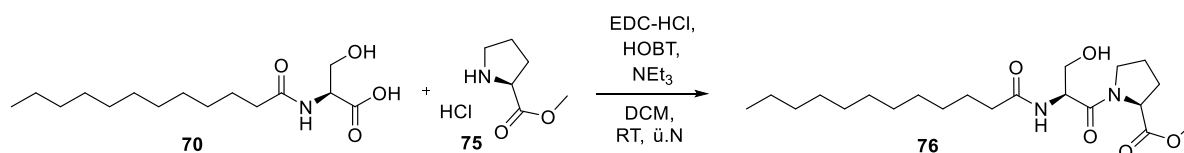
$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, MeOD-d_4): δ (ppm) = 174.5 (C-12); 171.6 (C-15); 61.0 (C-14); 54.1 (C-13); 34.9 (C-11); 31.1, 28.8, 28.7, 28.6, 28.5, 28.5, 28.3, 24.9 (C-3 bis C-10); (C-16); 21.8 (C-2); 12.5 (C-1).

ESI-MS (negativ): $m/z = 286.2$ $[\text{M-H}]^-$.

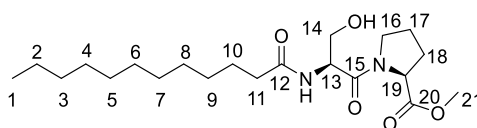
Synthesen der vereinfachten Substrate 57a-c

Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen aus der Literatur überein.^[194]

4.13.2 N-Lauryl-L-Ser-L-Pro-OMe (76)



Die Säure **70** (1.00 g, 3.01 mmol, 1.0 Äq.) wurde in 60 mL DCM gelöst und nacheinander wurden HOBT (0.45 g, 3.32 mmol, 1.1 Äq.), L-Prolinmethylester-Hydrochlorid (**75**) (0.55 g, 3.32 mmol, 1.1 Äq.), DMAP (0.40 g, 3.32 mmol 1.1 Äq.) und EDC-HCl (0.64 g, 3.32 mmol, 1.1 Äq.) zugegeben und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Am folgenden Tag wurden 100 mL EtOAc zugegeben. Die organische Phase wurde mit gesättigter, wässriger NH₄Cl-Lsg. (2 x 50 mL), gesättigter, wässriger NaHCO₃-Lsg. (2 x 50 mL), mit dest. Wasser (1 x 50 mL) und anschließend mit einer gesättigten, wässrigen NaCl-Lsg. (1 x 50 mL) gewaschen. Über MgSO₄ wurde getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels MPLC (A = Wasser + 0.05% TFA, B = ACN + 0.05% TFA, 0-1.0 min 95% A, 1.0-13.9 min 95% B; Säule: Reveleris C18 12 g; Flussrate: 30 mL/min) aufgereinigt und das Produkt **76** als weißer Feststoff (59%, 0.78 g, 1.96 mmol) erhalten.



Summenformel: C₂₁H₃₈N₂O₅.

Molmasse: 398.54 g/mol.

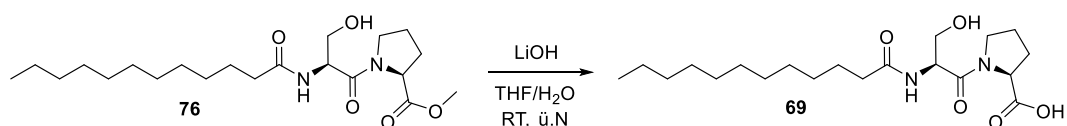
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 6.55 (d, 1H, ³J = 7.5 Hz, NH); 4.92-4.85 (m, 1H, H-13); 4.56 (dd, 1H, ²J = 8.7 Hz, ³J = 4.8 Hz, H-19); 3.94 (dd, 1H, ³J = 11.2 Hz, ²J = 5.2 Hz, H-14'); 3.85-3.40 (m, 3H, H-14, H-16); 3.75 (s, 3H, H-21); 2.28-2.22 (m, 1H, H-18'); 2.21 (t, 2H, ³J = 5.1 Hz, H-11); 2.07-1.94 (m, 3H, H-17, H-18); 1.63-1.56 (m, 2H, H-10); 1.31-1.24 (m, 16H, H-2 bis H-9); 0.87 (t, 3H, ³J = 6.6 Hz, H-1).

Synthesen der vereinfachten Substrate **57a-c**

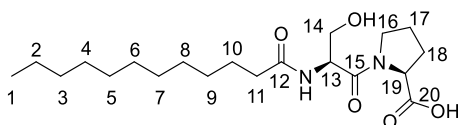
¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 173.6 (C-20); 172.9 (C-12); 169.8 (C-15); 64.2 (C-19); 59.1 (C-14); 52.8 (C-13); 47.5 (C-16); 36.6 (C-11); 29.7 (C-18); 32.0, 29.7, 29.6, 29.6, 29.5, 29.5, 29.4, 25.7 (C-3 bis C-10); 29.0 (C-17); 25.0 (C-21); 22.8 (C-2); 14.2 (C-1).

HR-ESI-MS (positiv): berechnet für C₂₁H₃₉N₂O₅ [M+H]⁺ 399.2853, gefunden 399.2859.

4.13.3 *N*-Lauryl-L-Ser-L-Pro (69)



N-Lauryl-L-serin-L-prolinmethylester (**76**) (1.00 g, 2.50 mmol, 1.0 Äq.) wurde in 25 mL THF gelöst. Es wurden 12 mL Wasser sowie festes LiOH (0.18 g, 7.53 mmol, 3.0 Äq.) portionsweise zugegeben und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Am folgenden Tag wurde THF unter vermindertem Druck entfernt und die wässrige Phase mit EtOAc (2 x 10 mL) gewaschen. Anschließend wurde diese mit einer 1 N HCl-Lsg. auf pH = 2 gebracht und es wurde erneut mit EtOAc (4 x 20 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit einer wässrigen, gesättigten NaCl-Lsg. (1 x 50 mL) gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Nachdem das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt wurde, wurde ein farbloses wachsartiges Öl mit einer Ausbeute von 71% (0.68 g, 1.77 mmol) erhalten.



Summenformel: C₂₀H₃₆N₂O₅.

Molmasse: 384.51 g/mol.

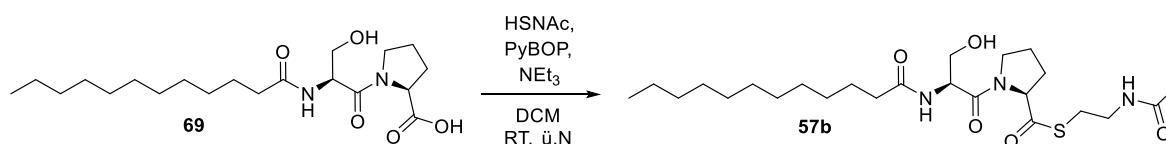
¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) = 4.76-4.55 (m, 1H, H-13); 4.24-4.19 (m, 1H, H-19); 3.69-3.51 (m, 3H, H-14, H-16); 3.45-3.38 (m, 1H, H-14'); 2.15-2.06 (m, 3H, H-11, H-17); 1.95-1.81 (m, 3H, H-17', H-18); 1.49-1.44 (m, 2H, H-10); 1.31-1.24 (m, 16H, H-2- bis H-9); 0.86 (t, 3H, ³J = 6.4 Hz, H-1).

Synthesen der vereinfachten Substrate **57a-c**

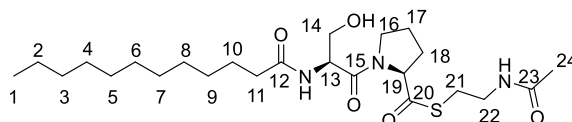
$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 173.6 (C-20); 172.3 (C-12); 169.5 (C-15); 62.3 (C-19); 58.9(C-14); 52.4 (C-13); 47.1 (C-16); 35.4 (C-11); 29.5 (C-18); 29.0 (C-17); 31.7, 29.4, 29.3, 29.2, 29.1, 29.0, 25.7, 24.7 (C-3 bis C-10); 22.6 (C-2); 14.4 (C-1).

HR-ESI-MS (negativ): berechnet für $\text{C}_{20}\text{H}_{37}\text{N}_2\text{O}_5$ $[\text{M-H}]^-$ 383.2551, gefunden 383.2553.

4.13.4 *N*-Lauryl-L-Ser-L-Pro-SNAC (**57b**)



Die Säure (**69**) (0.50 g, 1.13 mmol, 1.0 Äq.) wurde in 30 mL DCM gelöst und nacheinander wurden EDC-HCl (0.26 g, 1.36 mmol, 1.2 Äq.), HOBT (0.18 g, 1.36 mmol, 1.2 Äq.), NEt₃ (0.19 mL, 0.14 g, 1.36 mmol, 1.2 Äq.) und HSNAC (0.15 mL, 0.17 g, 1.36 mmol, 1.2 Äq.) zugefügt. Es wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Am folgenden Tag wurden 50 mL EtOAc zugegeben und die organische Phase nacheinander mit einer wässrigen 40% Zitronensäure-Lsg. (2 x 30 mL), mit einer wässrigen, gesättigten NaHCO₃-Lsg. (2 x 30 mL), mit dest. Wasser (1 x 20 mL) und einer wässrigen, gesättigten NaCl-Lsg. (1 x 20 mL) gewaschen. Nachdem über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt wurde, wurde das Rohprodukt mittels semi-präparativer HPLC (A = Wasser + 0.05% TFA, B = ACN + 0.05% TFA, 0-30 min 30% B; Säule: Eurospher II 100 RP C-18, 5 μm , 250 x 16 mm mit Vorsäule: 30 x 16 mm der Fa. *Knauer*) aufgereinigt und ein farbloses Öl in einer Ausbeute von 37% (0.28 g, 0.53 mmol) erhalten.



Summenformel: C₂₄H₄₃N₃O₅S.

Molmasse: 485.68 g/mol.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 6.60 (d, 1H, 3J = 8.0 Hz, NH_{Ser}); 5.97 (bs, 1H, NH_{SNAC}); 4.90-4.82 (m, 1H, H-13); 4.69 (dd, 1H, 3J = 4.0 Hz, 3J = 8.4 Hz, H-19); 3.94 (dd, 1H, 3J = 5.2 Hz, 2J =

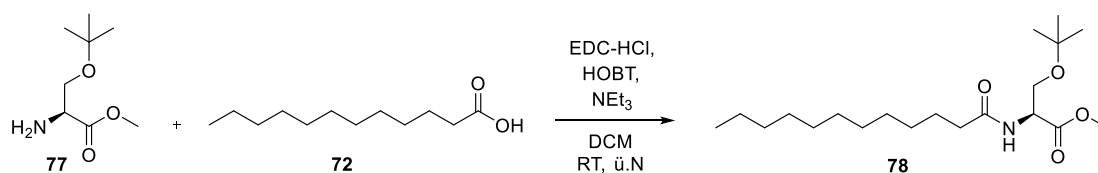
Synthesen der vereinfachten Substrate **57a-c**

8.4 Hz, H-14'); 3.87-3.61 (m, 3H, H-14, H-22); 3.60-3.32 (m, 2H, H-16), 3.14-2.91 (m, 2H, H-21); 2.30-2.20 (m, 1H, H-18'); 2.22 (t, 2H, $^3J = 7.2$ Hz, H-11); 2.13-1.99 (m, 3H, H-17, H-18); 1.97 (s, 3H, H-24); 1.66-1.56 (m, 2H, H-10); 1.35-1.24 (m, 16H, H-2 bis H-9); 0.88 (t, 3H, $^3J = 8.0$ Hz, H-1).

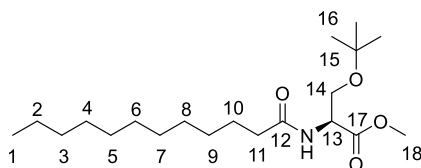
$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 200.3 (C-20); 173.7 (C-12); 171.2 (C-15); 170.3 (C-23); 77.2 (C-19); 66.1 (C-14); 62.9 (C-13); 52.5 (C-16); 47.5 (C-22); 39.1 (C-21); 38.5 (C-11); 31.8 (C-18); 36.1, 29.7, 29.6, 29.5, 29.4, 29.3, 28.5, 25.4 (C-3 bis C-10); 24.6 (C-17); 22.8 (C-2); 22.5 (C-24); 13.9 (C-1).

HR-ESI-MS (positiv): berechnet für $\text{C}_{28}\text{H}_{52}\text{N}_3\text{O}_5\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 486.2996, gefunden 486.3000.

4.13.5 *N*-Lauryl-*O*-*tert*-butyl-L-Ser-OMe (**78**)



O-*tert*-Butyl-L-serinmethylester (**77**) (1.00 g, 5.71 mmol, 1.0 Äq.) wurde in 60 mL Dichlormethan gelöst. Nacheinander wurden EDC-HCl (0.99 g, 5.16 mmol, 1.1 Äq.), HOBT (0.70 g, 5.16 mmol, 1.1 Äq.), NEt_3 (0.72 mL, 5.16 mmol, 1.1 Äq.) und Laurinsäure (**72**) (1.04 g, 5.16 mmol, 1.1 Äq.) zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Am folgenden Tag wurde mit einer wässrigen, gesättigten NaHCO_3 -Lsg. (2 x 50 mL), einer wässrigen 40% Zitronensäure-Lsg. (2 x 50 mL), dest. Wasser (1 x 50 mL) und mit einer wässrigen, gesättigten NaCl -Lsg. (1 x 50 mL) gewaschen. Anschließend wurde über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Es wurden 95% (1.59 g, 4.48 mmol) des Produkts (**78**) als blassgelbes Öl erhalten.



Summenformel: $\text{C}_{20}\text{H}_{39}\text{NO}_4$.

Synthesen der vereinfachten Substrate **57a-c**

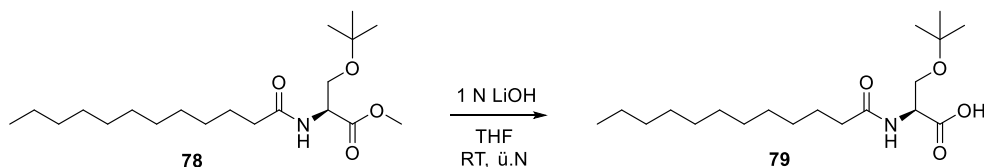
Molmasse: 357.53 g/mol.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 6.30 (d, 1H, ³J = 7.2 Hz, NH); 4.75-4.69 (m, 1H, H-13); 3.79 (dd, 1H, ²J = 3.6 Hz, ³J = 10.8 Hz, H-14); 3.73 (s, 3H, H-18); 3.54 (dd, 1H, ²J = 3.6 Hz, ³J = 10.8 Hz, H-14'); 2.24 (t, ³J = 7.2 Hz, 2H, H-11); 1.67-1.59 (m, 2H, H-10); 1.34-1.24 (m, 16H, H-2 bis H-9); 1.12 (s, 9H, H-16); 0.86 (t, 3H, ³J = 7.2 Hz, H-1).

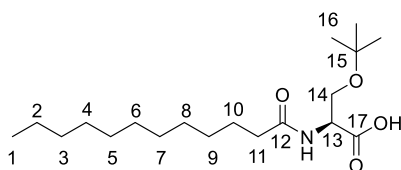
¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 173.1 (C-12); 171.1 (C-17); 73.4 (C-15); 62.0 (C-14); 52.7 (C-13); 52.2 (C-18); 36.6 (C-11); 31.8, 29.6, 29.5, 29.4, 29.3, 29.2, 29.1, 25.6 (C-3 bis C-10); 27.3 (C-16); 22.6 (C-2); 14.1 (C-1).

HR-ESI-MS (positiv): berechnet für C₂₀H₄₀NO₄⁺ [M+H]⁺ 358.2952, gefunden 358.2954; berechnet für C₂₀H₃₉NO₄Na⁺ [M+Na]⁺ 380.2771, gefunden 380.2776.

4.13.6 *N*-Lauryl-*O*-*tert*-butyl-L-Ser (**79**)



N-Lauryl-*O*-*tert*-butyl-L-serinmethylester (**78**) (1.38 g, 3.87 mmol, 1.0 Äq.) wurde in 7.75 mL THF gelöst. Eine 1 N LiOH-Lsg. (7.74 mL, 7.74 mmol, 2 Äq.) wurde langsam unter Rühren zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht gerührt und am folgenden Tag mit 4 N HCl auf einen pH-Wert von 3 angesäuert. Die weiß-trübe Lösung wurde mit Dichlormethan (3 x 20 mL) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen mit einer wässrigen, gesättigten NaCl-Lsg. (1 x 20 mL) gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Nachdem das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt wurde, wurde das Produkt **79** mit einer Ausbeute von 91% (1.2 g, 3.49 mmol) als farbloses Öl erhalten.



Summenformel: C₁₉H₃₇NO₄.

Synthesen der vereinfachten Substrate **57a-c**

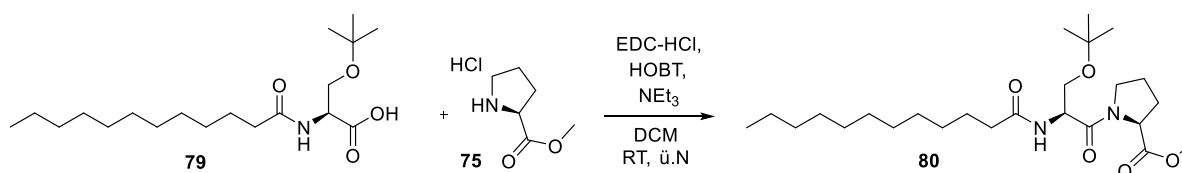
Molmasse: 343.50 g/mol.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 6.35 (d, 1H, ³J = 7.5 Hz, NH); 4.73-4.68 (m, 1H, H-13); 3.90 (dd, 1H, ²J = 4.0 Hz, ³J = 9.0 Hz, H-14); 3.55 (dd, 1H, ²J = 4.0 Hz, ³J = 9.0 Hz, H-14'); 2.26 (t, 2H, ³J = 7.0 Hz, H-11); 1.68-1.58 (m, 2H, H-10); 1.38-1.25 (m, 16H, H-2 bis H-9); 1.18 (s, 9H, H-16); 0.84 (t, 3H, ³J = 6.5 Hz, H-1).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 179.1 (C-12); 174.0 (C-17); 74.2 (C-15); 61.4 (C-14); 52.5 (C-13); 36.4 (C-11); 34.0, 31.8, 29.6, 29.5, 29.4, 29.3, 29.1, 25.5 (C-3 bis C-10); 27.3 (C-16); 22.6 (C-2); 14.1 (C-1).

HR-ESI-MS (positiv): berechnet C₁₉H₃₈NO₄⁺ [M+H]⁺ 344.2795, gefunden 344.2796; berechnet für C₁₉H₃₇NO₄Na⁺ [M+Na]⁺ 366.2651, gefunden 366.2616.

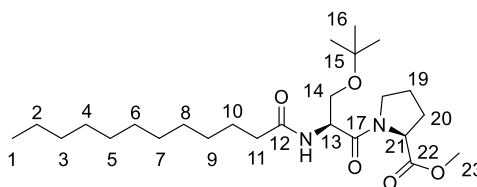
4.13.7 *N*-Lauryl-*O*-*tert*-butyl-L-Ser-L-Pro-OMe (**80**)



N-Lauryl-*O*-*tert*-butyl-L-serin (**79**) (2.42 g, 7.06 mmol, 1.1 Äq.) wurde zusammen mit EDC-HCl (1.35 g, 7.06 mmol, 1.1 Äq.), HOBT (0.96 g, 7.06 mmol, 1.1 Äq.), NEt₃ (0.98 mL, 7.06 mmol, 1.1 Äq.) und L-Prolinmethylester-Hydrochlorid (**75**) (0.58 g, 6.43 mmol, 1.0 Äq.) in 100 mL Dichlormethan gelöst und über Nacht gerührt. Am folgenden Tag wurde das Reaktionsgemisch mit einer wässrigen, gesättigten NaHCO₃-Lsg. (2 x 50 mL), einer wässrigen 40% Zitronensäure-Lsg. (2 x 50 mL), dest. Wasser (1 x 50 mL) und einer wässrigen, gesättigten NaCl-Lsg. (1 x 50 mL) gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Unter vermindertem Druck wurde das Lösungsmittel entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (Silikagel, 3:1 EtOAc/Pentan) aufgereinigt. Es wurden 74% (2.44 g, 5.19 mmol) eines gelben Öls erhalten.

R_f = 0.68 (Silikagel, 3:1 EtOAc/Pentan).

Synthesen der vereinfachten Substrate **57a-c**



Summenformel: C₂₅H₄₆N₂O₅.

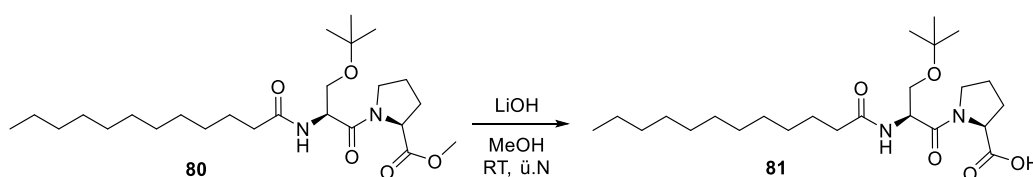
Molmasse: 454.65 g/mol.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 6.36-6.31 (m, 1H, NH); 4.97-4.87 (m, 1H, H-13); 4.49-4.44 (m, 1H, H-21); 3.99-3.89 (m, 1H, H-14); 3.77 (s, 3H, H-23); 3.76-3.34 (m, 3H, H-14', H-18); 2.33-2.19 (m, 1H, H-19'); 2.19 (t, 2H, ³J = 7.6 Hz, H-11); 2.09-1.91 (m, 3H, H-19, H-20); 1.66-1.59 (m, 2H, H-10); 1.33-1.25 (m, 16H, H-2 bis H-9); 1.19 (pd, 9H, H-16); 0.88 (t, 3H, ³J = 7.2 Hz, H-1).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 172.3 (C-22); 169.9 (C-12); 169.9 (C-17); 77.2 (C-21); 73.4 (C-15); 63.1 (C-14); 59.0 (C-13); 52.2 (C-23); 51.0 (C-18); 36.5 (C-11); 31.9 (C-20); 29.6, 29.5, 29.4, 29.3, 29.3, 29.2, 29.1, 25.6 (C-3 bis C-10); 27.3 (C-16); 24.8 (C-19); 22.6 (C-2); 14.1 (C-1).

HR-ESI-MS (positiv): berechnet für C₂₅H₄₇N₂O₅⁺ [M+H]⁺ 455.3479, gefunden 455.3484; berechnet für C₂₅H₄₆N₂O₅Na⁺ [M+Na]⁺ 477.3299, gefunden 477.3307.

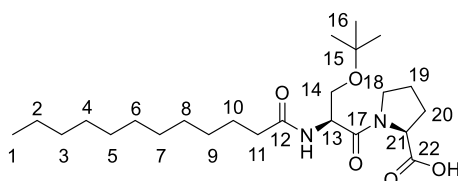
4.13.8 *N*-Lauryl-*O*-*tert*-butyl-L-Ser-L-Pro (81)



N-Lauryl-*O*-*tert*-butyl-L-serin-L-prolinmethylester (**80**) (1.00 g, 2.19 mmol, 1.0 Äq.) wurde in 25 mL THF gelöst. Anschließend wurden 12 mL dest. Wasser und portionsweise festes LiOH (0.16 g, 6.59 mmol, 3.0 Äq.) zugegeben. Nachdem über Nacht gerührt wurde, wurde THF unter vermindertem Druck entfernt. Die wässrige Phase wurde mit EtOAc (2 x 10 mL) gewaschen, anschließend mit einer 1 N HCl-Lsg auf einen pH-Wert = 2 gebracht und es wurde erneut mit EtOAc (4 x 20 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit einer wässrigen, gesättigten NaCl-Lsg. (1 x 50 mL) gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Unter

Synthesen der vereinfachten Substrate **57a-c**

vermindertem Druck wurde das Lösungsmittel entfernt und das Produkt (**81**) in Form eines farblosen wachsartigen Öls (77%, 0.75 g, 1.69 mmol) erhalten.



Summenformel: C₂₄H₄₄N₂O₅.

Molmasse: 440.62 g/mol.

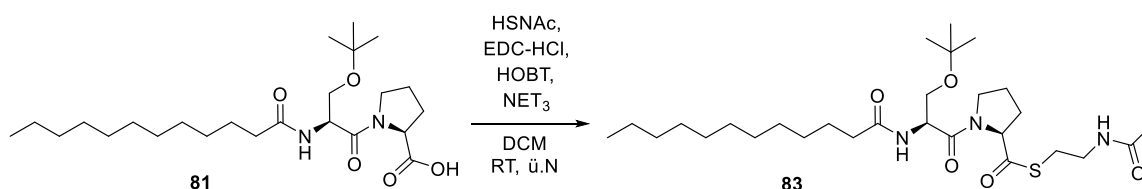
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 8.73 (bs, 1H, COOH); 6.70 (d, 1H, ³J = 8 Hz, NH); 5.01-4.96 (m, 1H, H-13); 4.61-4.50 (m, 1H, H-21); 3.95-3.88 (m, 1H, H-14); 3.76-3.69 (m, 1H, H-14'), 3.66-3.36 (m, 2H, H-18); 2.37-2.20 (m, 1H, H-19); 2.21 (t, 2H, ³J = 9 Hz, H-11); 2.08-1.93 (m, 3H, H-19, H-20); 1.67-1.55 (m, 2H, H-10); 1.37-1.26 (m, 16H, H-2 bis H-9); 1.14 (s, 9H, H-16); 0.89 (t, 3H, ³J = 7.2 Hz, H-1).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 175.8 (C-22); 173.3 (C-12); 171.6 (C-17); 77.2 (C-21); 73.7 (C-15); 62.3 (C-14); 59.6 (C-13); 51.1 (C-18); 36.5 (C-11); 31.9 (C-20); 36.3, 29.6, 29.5, 29.3, 29.3, 29.2, 28.8, 24.7 (C-3 bis C-10); 27.3 (C-16); 25.5 (C-19); 22.7 (C-2); 14.1 (C-1).

HR-ESI-MS (positiv): berechnet für C₂₄H₄₅N₂O₅ [M+H]⁺ 441.3323, gefunden 441.3325; berechnet für C₂₄H₄₄N₂O₅Na⁺ [M+Na]⁺ 463.3142, gefunden 463.3148.

HR-ESI-MS (negativ): berechnet für C₂₄H₄₃N₂O₅ [M-H]⁻ 439.3177, gefunden 391.3177.

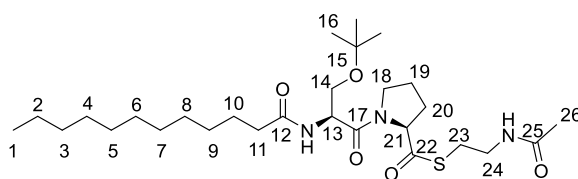
4.13.9 *N*-Lauryl-*O*-*tert*-butyl-L-Ser-L-Pro-SNAc (**83**)



Die Säure **81** (0.50 g, 1.13 mmol, 1.0 Äq.) wurde in 30 mL DCM gelöst und nacheinander wurden EDC-HCl (0.26 g, 1.36 mmol, 1.2 Äq.), HOBT (0.18 g, 1.36 mmol, 1.2 Äq.), NEt₃ (0.19 mL, 0.14 g, 1.36 mmol, 1.2 Äq.) und HSNac (0.15 mL, 0.17 g, 1.36 mmol, 1.2 Äq.)

Synthesen der vereinfachten Substrate 57a-c

zugefügt. Es wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Am folgenden Tag wurden 50 mL EtOAc zugegeben und die organische Phase nacheinander mit einer wässrigen 40% Zitronensäure-Lsg. (2 x 30 mL), einer wässrigen, gesättigten NaHCO₃-Lsg. (2 x 30 mL), dest. Wasser (1 x 20 mL) und einer wässrigen, gesättigten NaCl-Lsg. (1 x 20 mL) gewaschen. Nachdem über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt wurde, wurde das Rohprodukt mittels semi-präparativer HPLC (A = Wasser + 0.05% TFA, B = ACN + 0.05% TFA, 0-30 min 30% B; Säule: Eurospher II 100 RP C-18, 5 µm, 250 x 16 mm mit Vorsäule: 30 x 16 mm der Fa. Knauer) aufgereinigt und ein farbloses Öl wurde in einer Ausbeute von 37% (0.28 g, 0.53 mmol) erhalten.



Summenformel: C₂₈H₅₁N₃O₅S.

Molmasse: 541.79 g/mol.

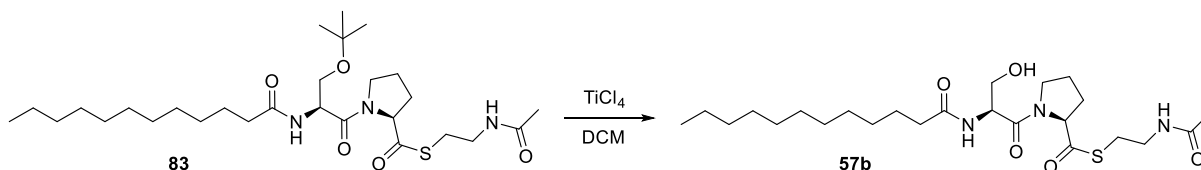
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 6.25 (d, 1H, ³J = 8.0 Hz, NH_{Ser}); 6.04 (bs, 1H, NH_{SNAC}); 4.98-4.91 (m, 1H, H-13); 4.61 (dd, 1H, ³J = 4.0 Hz, ³J = 8.4 Hz, H-21); 3.99-3.93 (m, 2H, H-24); 3.78-3.71 (m, 1H, H-14); 3.61 (dd, 1H, ³J = 5.2 Hz, ²J = 8.4 Hz, H-14'); 3.34 (t, 2H, ³J = 14.4 Hz, H-23); 3.07-3.01 (m, 2H, H-18); 2.19 (t, ³J = 7.2 Hz, 2H, H-11); 2.22-2.16 (m, 3H, H-19); 2.11-1.01 (m, 1H, H-19', H-20); 1.97 (s, 3H, H-26); 1.65-1.57 (m, 2H, H-10); 1.33-1.24 (m, 16 H, H-2 bis H-9); 1.12 (s, 9H, H-16); 0.88 (t, 3H, ³J = 8.0 Hz, H-1).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 207.1 (C-22); 200.3 (C-12); 172.9 (C-25); 170.8 (C-17); 77.4 (C-21); 73.7 (C-15); 66.4 (C-14); 62.9 (C-13); 51.1 (C-18); 47.7 (C-24); 39.6 (C-23); 36.7 (C-11); 32.0 (C-20); 31.1, 30.1, 29.7, 29.6, 29.5, 29.4, 29.4, 28.4 (C-3 bis C-10); 27.5 (C-16); 25.7 (C-19); 24.7 (C-2); 22.8 (C-26); 14.2 (C-1).

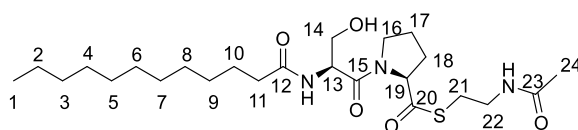
HR-ESI-MS (positiv): berechnet für C₂₈H₅₂N₃O₅S [M+H]⁺ 542.3622, gefunden 542.3622.

ESI-MS (positiv): m/z = 542.4 [M+H]⁺, 564.4 [M+Na]⁺.

4.13.10 *N*-Lauryl-L-Ser-L-Pro-SNAc (**57b**)



Unter Schutzgasatmosphäre wurde der HSNAc **83** (0.60 g, 1.11 mmol, 1.0 Äq.) in 10 mL DCM gelöst und auf $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlt. Langsam wurde TiCl_4 (0.18 mL, 0.32 g, 1.66 mmol, 1.5 Äq.) zugegeben und die Reaktionslösung bei $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 45 min gerührt. Anschließend wurde mit dest. Wasser (3 x 5 mL) und einer wässrigen, gesättigten NaCl-Lsg. (1 x 5 mL) gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde über eine semi-präparative HPLC (A = Wasser + 0.05% TFA, B = ACN + 0.05% TFA, 0-30 min 50% B; Säule: Eurospher II 100 RP C-18, 5 μm , 250 x 16 mm mit Vorsäule: 30 x 16 mm der Fa. *Knauer*) aufgereinigt und es wurde ein weißer Feststoff mit einer Ausbeute von 56% (0.29 g, 0.61 mmol) erhalten.



Summenformel: $\text{C}_{24}\text{H}_{43}\text{N}_3\text{O}_5\text{S}$.

Molmasse: 485.68 g/mol.

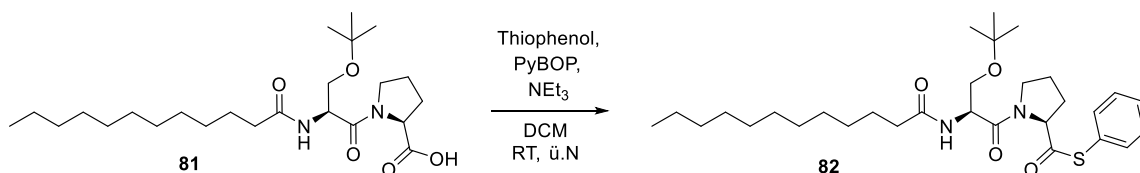
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 6.60 (d, 1H, $^3J = 8.0$ Hz, NH_{Ser}); 5.97 (bs, 1H, NH_{SNAc}); 4.90-4.82 (m, 1H, H-13); 4.69 (dd, 1H, $^3J = 4.0$ Hz, $^3J = 8.4$ Hz, H-19); 3.94 (dd, 1H, $^3J = 5.2$ Hz, $^2J = 8.4$ Hz, H-14'); 3.87-3.61 (m, 3H, H-14, H-22); 3.60-3.32 (m, 2H, H-16), 3.14-2.91 (m, 2H, H-21); 2.30-2.20 (m, 1H, H-18'); 2.22 (t, 2H, $^3J = 7.2$ Hz, H-11); 2.13-1.99 (m, 3H, H-17, H-18); 1.97 (s, 3H, H-24); 1.66-1.56 (m, 2H, H-10); 1.35-1.24 (m, 16H, H-2 bis H-9); 0.88 (t, 3H, $^3J = 8.0$ Hz, H-1).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 200.3 (C-20); 173.7 (C-12); 171.2 (C-15); 170.3 (C-23); 77.2 (C-19); 66.1 (C-14); 62.9 (C-13); 52.5 (C-16); 47.5 (C-22); 39.1 (C-21); 38.5 (C-11); 31.8 (C-18); 36.1, 29.7, 29.6, 29.5, 29.4, 29.3, 28.5, 25.4 (C-3 bis C-10); 24.6 (C-17); 22.8 (C-2); 22.5 (C-24); 13.9 (C-1).

Synthesen der vereinfachten Substrate **57a-c**

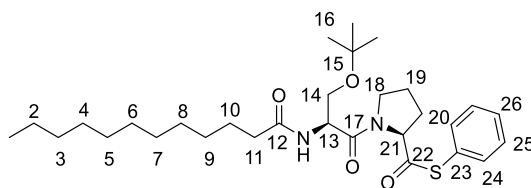
HR-ESI-MS (positiv): berechnet für C₂₄H₄₄N₃O₅S [M+H]⁺ 486.2996, gefunden 486.3000.

4.13.11 *N*-Lauryl-*O*-*tert*-butyl-L-Ser-L-Pro-Thiophenol (**82**)



Die Säure **81** (0.1 g, 0.43 mmol, 1.0 Äq.) und Thiophenol (0.06 mL, 65.0 mg, 0.65 mmol, 1.5 Äq.) wurden unter Schutzgasatmosphäre in 3 mL trockenem DCM gelöst und auf 0 °C gekühlt. NEt₃ (0.09 mL, 0.06 g, 0.65 mmol, 1.5 Äq.) wurde tropfenweise zugegeben. PyBOP (0.03 g, 0.65 mmol, 1.5 Äq.) wurde anschließend in einer Portion zugegeben und es wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Am folgenden Tag wurden 60 mL EtOAc zugegeben und nacheinander mit 0.1 N HCl (2 x 30 mL), einer wässrigen, gesättigten NaHCO₃-Lsg. (2 x 30 mL) und einer wässrigen, gesättigten NaCl-Lsg. (1 x 30 mL) gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (Silikagel, 1:3 EtOAc/Pentan) aufgereinigt, so dass ein gelbliches Öl (59%, 0.13 g, 0.25 mmol) erhalten wurde.

R_f = 0.38 (Silikagel, 1:3 EtOAc/Pentan).



Summernformel: C₃₀H₄₈N₂O₄S.

Molmasse: 532.33 g/mol.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 7.44-7.40 (m, 5H, H-24, H-25, H-26); 6.29 (d, 1H, ³J = 8.0 Hz, NH_{Ser}); 5.04-4.92 (m, 1H, H-13); 4.83-4.76 (m, 1H, H-21); 4.07-3.98 (m, 1H, H-14); 3.83-3.76 (m, 1H, H-14'); 3.68-3.59 (m, 2H, H-18); 2.28-2.18 (m, 1H, H-20'); 2.20 (t, 2H, ³J = 7 Hz, H-11);

Synthesen der vereinfachten Substrate **57a-c**

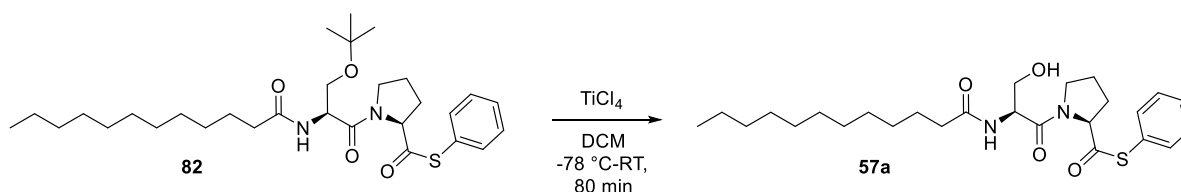
2.18-1.97 (m, 3H, H-19, H-20); 1.69-1.59 (m, 2H, H-10); 1.35-1.24 (m, 16 H, H-2 bis H-9); 1.12 (pd, 9H, H-16); 0.88 (t, 3H, $^3J = 8$ Hz, H-1).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 197.8 (C-22); 172.8 (C-12); 170.6 (C-17); 134.8 (C-25); 134.5 (C-24); 129.3 (C-23); 127.2 (C-26); 77.2 (C-21); 73.5 (C-15); 66.3 (C-14); 63.0 (C-13); 51.2 (C-18); 47.7 (C-11); 31.9 (C-20); 36.7, 30.1, 29.7, 29.6, 29.5, 29.4, 29.2, 24.7 (C-3 bis C-10); 27.3 (C-16); 25.6 (C-19); 22.6 (C-2); 14.1 (C-1).

HR-ESI-MS (positiv): berechnet für $\text{C}_{30}\text{H}_{49}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 533.3408, gefunden 533.3412; berechnet für $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{N}_2\text{O}_4\text{SNa}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 555.3227, gefunden 555.3237.

ESI-MS (positiv): $m/z = 533.4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, 555.3 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

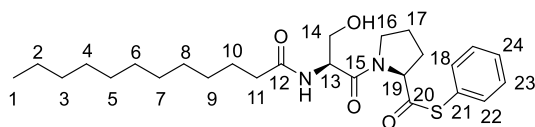
4.13.12 *N*-Lauryl-L-Ser-L-Pro-Thiophenol (**57a**)



Das Thiophenol-Derivat **82** (0.46 g, 0.87 mmol, 1.0 Äq.) wurde unter Schutzgasatmosphäre in 10 mL trockenem DCM gelöst und auf -78 °C gekühlt. TiCl_4 (0.19 mL, 0.33 g, 1.75 mmol, 2.0 Äq.) wurde sehr langsam zugetropft und die Reaktionslösung für 20 min bei -78 °C gerührt. Anschließend wurde langsam auf Raumtemperatur erwärmt und es wurde für eine weitere Stunde bei Raumtemperatur gerührt. 10 mL Wasser wurden zum Abbruch der Reaktion zugegeben und die organische Phase von der wässrigen getrennt. Die organische Phase wurde mit einer wässrigen, gesättigten NaCl-Lsg. (1 x 5 mL) gewaschen und über MgSO_4 getrocknet. Nachdem das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt wurde, wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch (Silikagel, 50:1 EtOAc/Pentan) aufgereinigt, so dass ein gelbliches Öl (63%, 0.26 g, 0.55 mmol) erhalten wurde.

$R_f = 0.48$ (Silikagel, 50:1 EtOAc/Pentan).

Synthesen der vereinfachten Substrate **57a-c**



Summenformel: C₂₆H₄₀N₂O₄S.

Molmasse: 476.67 g/mol.

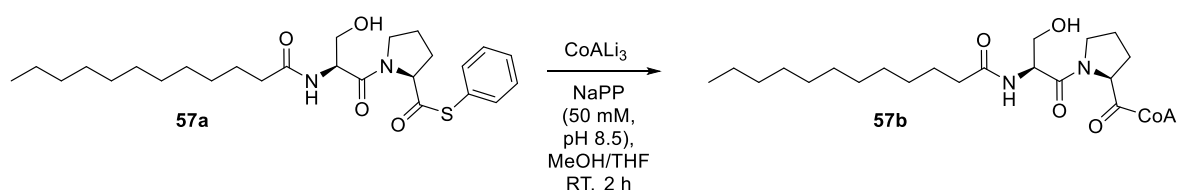
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 7.43 (s, 5H, H-22, H-23, H-24); 6.62 (d, 1H, ³J = 8.0 Hz, NH); 4.92-4.82 (m, 2H, H-13, H-19); 3.97 (dd, 1H, ²J = 4.8 Hz, ³J = 12.8 Hz, H-14'); 3.88-3.83 (m, 3H, H-14, H-16); 2.36-3.31 (m, 1H, H-18'); 2.28 (t, 2H, ³J = 8 Hz, H-11); 2.22-2.04 (m, 3H, H-17, H-18); 1.69-1.59 (m, 2H, H-10); 1.35-1.23 (m, 16 H, H-2 bis H-9); 0.90 (t, 3H, ³J = 8 Hz, 3H, H-1).

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 197.8 (C-20); 173.7 (C-12); 169.9 (C-15); 134.6 (C-23); 129.6 (C-22); 129.3 (C-21); 126.5 (C-24); 77.2 (C-19); 65.9 (C-14); 64.1 (C-13); 52.8 (C-16); 47.6 (C-11); 31.9 (C-18); 36.5, 29.8, 29.6, 29.4, 29.3, 29.3, 29.2, 24.7 (C-3 bis C-10); 25.5 (C-17); 22.7 (C-2); 14.1 (C-1).

HR-ESI-MS (positiv): berechnet für C₂₆H₄₁N₂O₄S [M+H]⁺ 477.2782, gefunden 477.2782.

ESI-MS (positiv): m/z = 477.4 [M+H]⁺, 599.5 [M+Na]⁺.

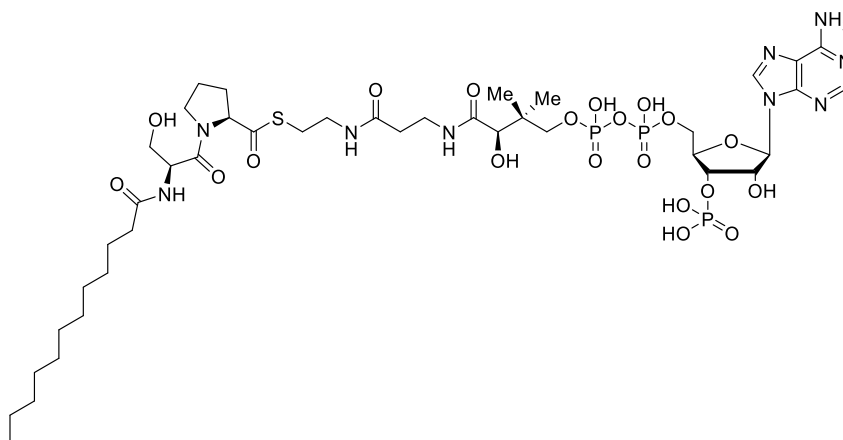
4.13.13 N-Lauryl-L-Ser-L-Pro-Coenzym A (57c)



Coenzym-A-Trilithiumsalz (13.1 mg, 0.017 mmol, 4.0 Äq) wurde unter Argonatmosphäre in 1 mL Natriumphosphatpuffer (50 mM) pH 8.5 gelöst. **57a** (2 mg, 0.004 mmol, 1.0 Äq.) wurde in 100 µL MeOH und 0.5 mL Natriumphosphatpuffer (50 mM) pH 8.5 gelöst und es wurden 100 µL THF zugegeben. Es wurde für 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wurde im Argonstrom auf etwa 700 µL eingengt und sofort mittels semi-präparativer HPLC (A = Wasser + 0.05% TFA, B = ACN + 0.05% TFA, 0-30 min 50% B; Säule: Eurospher II 100 RP C-18,

Synthesen der vereinfachten Substrate 57a-c

5 μm , 250 x 16 mm mit Vorsäule: 30 x 16 mm der Fa. *Knauer*) aufgereinigt. Es wurde **57c** ein weißer Feststoff mit einer Ausbeute von 32% (0.6 mg, 0.0005 mmol) erhalten.



Summenformel: $\text{C}_{41}\text{H}_{70}\text{N}_9\text{O}_{20}\text{P}_3\text{S}$.

Molmasse: 1134.0 g/mol.

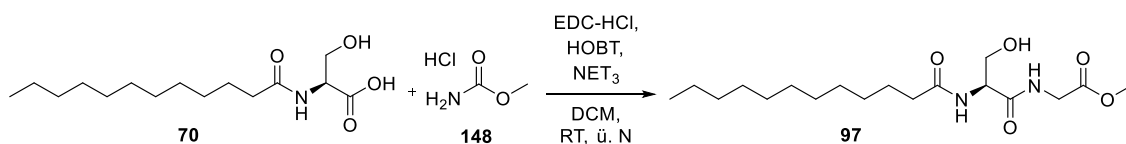
ESI-MS (positiv): $m/z = 1134.7$ $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Aufgrund der geringen erhaltenen Menge an **57c**, konnte die Substanz nur mittels LC-MS charakterisiert werden.

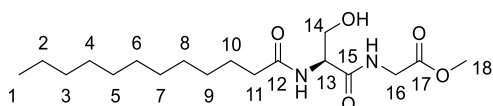
Synthese der Dehydroalanin-Analoga

4.14 Synthese der Dehydroalanin-Analoga

4.14.1 N-Lauryl-L-Ser-Gly-OMe (97)



N-Lauryl-L-serin (**70**) (2.00 g, 8.73 mmol, 1.0 Äq.) wurde in 100 mL DCM bei Raumtemperatur gelöst und nacheinander wurden HOBT (1.30 g, 9.62 mmol, 1.1 Äq.), EDC-HCl (1.80 g, 9.62 mmol, 1.1 Äq.), Glycinmethylester-Hydrochlorid (**148**) (1.2 g, 9.62 mmol, 1.1 Äq.) und NET₃ (1.80 mL, 1.33 g, 9.62 mmol, 1.1 Äq.) zugegeben. Die Reaktionslösung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Am folgenden Tag wurden 100 mL EtOAc zugegeben und die organische Phase nacheinander mit einer wässrigen 40% Zitronensäure-Lsg. (2 x 30 mL), mit einer wässrigen, gesättigten NaHCO₃-Lsg. (2 x 30 mL), mit dest. Wasser (1 x 20 mL) und einer wässrigen, gesättigten NaCl-Lsg. (1 x 20 mL) gewaschen. Nachdem über MgSO₄ getrocknet wurde, wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und ein farbloses Öl mit einer Ausbeute von 50% (1.55 g, 4.32 mmol) erhalten.



Summenformel: C₁₈H₃₄N₂O₅.

Molmasse: 358.48 g/mol.

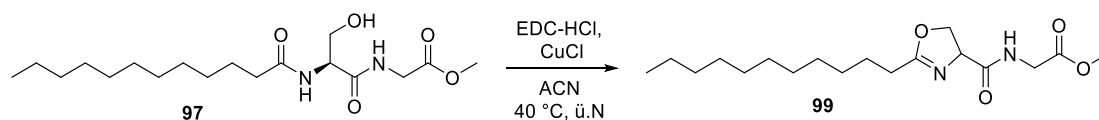
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 7.63 (t, 1H, ³J = 5.2 Hz, NH_{Gly}); 6.86 (d, 1H, ³J = 7.2 Hz, NH_{Ser}); 4.60-4.56 (m, 1H, H-13); 4.06-4.01 (m, 3H, H-14, H-16); 3.74 (s, 1H, H-18); 3.67 (dd, 1H, ²J = 6.0 Hz, ³J = 11.6 Hz, H-14'); 2.26 (t, 2H, ³J = 7.2 Hz, H-11); 1.65-1.57 (m, 2H, H-10); 1.34-1.25 (m, 16H, H-2 bis H-9), 0.88 (t, 3H, ³J = 6.4 Hz, H-1).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 174.3 (C-12); 171.5 (C-15); 170.2 (C-17); 62.9 (C-14); 54.1 (C-13); 52.4 (C-18); 41.2 (C-16); 36.4 (C-11); 30.9, 29.6, 29.6, 29.5, 29.3, 29.3, 29.2, 25.6 (C-3 bis C-10); 22.7 (C-2); 14.1 (C-1).

Synthese der Dehydroalanin-Analoga

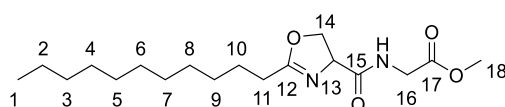
HR-ESI-MS (positiv): berechnet für $C_{18}H_{35}N_2O_5$ $[M+H]^+$ 359.2540, gefunden 359.2543.

4.14.2 Methyl (2-undecyl-4,5-dihydrooxazol-4-carbonyl)-Gly-OMe (**99**)



Unter Argonatmosphäre wurde der Methyl ester **97** (0.10 g, 0.28 mmol, 3.5 Äq.) in 50 mL absolutem ACN gelöst. Nachfolgend wurden EDC·HCl (0.18 g, 9.65 mmol, 12.0 Äq.) und CuCl (7.90 mg, 0.08 mmol, 1.0 Äq.) zugegeben und die Reaktionslösung auf 40 °C erhitzt. Nachdem die Reaktionslösung über Nacht gerührt wurde, wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck evaporiert und der Rückstand in 10 mL EtOAc aufgenommen. Die organische Phase wurde mit einer wässrigen, gesättigten $NaHCO_3$ -Lsg. (2 x 5 mL), dest. Wasser (1 x 5 mL) und einer wässrigen, gesättigten NaCl-Lsg. (1 x 5 mL) gewaschen. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (Silikagel, 3:1 EtOAc/Pentan) aufgereinigt, so dass das Produkt **99** als farbloses Öl (68%, 0.06 g, 0.17 mmol) erhalten wurde.

$R_f = 0.41$ (Silikagel, 3:1 EtOAc/Pentan).



Summenformel: $C_{18}H_{32}N_2O_4$.

Molmasse: 340.46 g/mol.

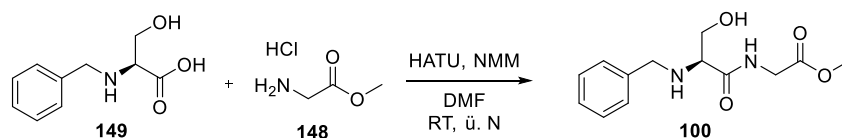
1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 7.10 (bs, 1H, NH_{Gly}); 4.68 (dd, 1H, $^3J = 8.0$ Hz, $^3J = 10.8$ Hz, H-13); 4.51-4.39 (m, 2H, H-14); 4.07 (t, 2H, $^3J = 5.6$ Hz, H-16); 3.77 (s, 3H, H-18); 2.33 (t, 2H, $^3J = 8.0$ Hz, H-11); 1.69-1.62 (m, 2H, H-10); 1.39-1.27 (m, 16H, H-2 bis H-9), 0.89 (t, 3H, $^3J = 6.4$ Hz, H-1).

Synthese der Dehydroalanin-Analoga

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 172.2 (C-12); 171.4 (C-17); 169.8 (C-15); 69.9 (C-14); 68.5 (C-13); 52.3 (C-18); 40.8 (C-16); 31.9 (C-11); 29.6, 29.5, 29.4, 29.3, 29.2, 29.2, 29.1, 28.1 (C-3 bis C-10); 25.9 (C-2); 22.7 (C-1).

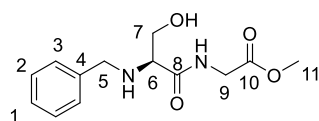
HR-ESI-MS (positiv): berechnet für $\text{C}_{18}\text{H}_{33}\text{N}_2\text{O}_4^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 341.2435, gefunden 341.2435.

4.14.3 *N*-Bz-L-Ser-Gly-OMe (100)



N-Benzyl-L-serin (**149**) (0.2 g, 1.0 mmol, 1.1 Äq) wurde zusammen mit Glycinmethylester-Hydrochlorid (**148**) (0.12 g, 0.93 mmol, 1.0 Äq.), HATU (0.39 g, 1.00 mmol, 1.1 Äq.) und NMM (0.50 mL, 0.46 g, 4.66 mmol, 5.0 Äq.) bei 0 °C in 10 mL DMF gelöst und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Am folgenden Tag wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (Silikagel, 4:1:1 DCM/Aceton/MeOH) aufgereinigt, so dass ein gelb-rotes Öl (80%, 0.21 g, 0.8 mmol) erhalten wurde.

R_f = 0.38 (Silikagel, 4:1:1 DCM/Aceton/MeOH).



Summenformel: $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_4$.

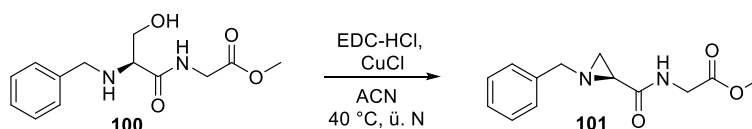
Molmasse: 266.29 g/mol.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO-d_6): δ (ppm) = 8.29 (t, 1H, 3J = 5.7 Hz, NH_{Gly}); 7.39-7.24 (m, 5H, H-1, H-2, H-3); 4.83 (t, 1H, 3J = 5.7 Hz, H-6); 3.89 (dd, 2H, 2J = 6.3 Hz, 3J = 8.1 Hz, H-9); 3.83-3.77 (m, 1H, H-5); 3.67-3.62 (m, 1H, H-5'); 3.65 (s, 3H, H-11); 3.62-3.41 (m, 2H, H-7); 3.11 (dd, 1H, 3J = 4.5 Hz, 3J = 6.6 Hz, OH).

Synthese der Dehydroalanin-Analoga

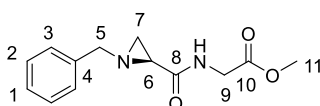
$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 170.6, 161.9 (C-8, C-10); 140.9 (C-4); 128.6 (C-2, C-3); 127.2 (C-1); 52.8 (C-7); 52.0 (C-6); 45.6 (C-5); 36.2 (C-11); 31.2 (C-9).

4.14.4 1-Benzylaziridin-2-carbonyl-glycinmethylester (101)



Unter Schlenkbedingungen wurde das geschützte Dipeptid **100** (0.12 g, 0.47 mmol, 3.5 Äq.) in 75 mL absolutem ACN gelöst. EDC-HCl (0.30 g, 1.60 mmol, 12.0 Äq.) sowie CuCl (0.01 g, 0.13 mmol, 1.0 Äq.) wurden zugegeben und die Reaktionslösung für 24 h auf 40 °C erhitzt. Am folgenden Tag wurde das Lösungsmittel evaporiert und der grüne Rückstand in 50 mL EtOAc aufgenommen. Es wurde mit einer wässrigen, gesättigten NaHCO_3 -Lsg. (1 x 30 mL), dest. Wasser (1 x 30 mL) und einer wässrigen, gesättigten NaCl-Lsg. (1 x 30 mL) gewaschen und über MgSO_4 getrocknet. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (Silikagel, 4:1:1 DCM/Aceton/MeOH) aufgereinigt, so dass ein gelbliches Öl (43%, 0.05 g, 0.20 mmol) erhalten wurde.

R_f = 0.5 (Silikagel, 4:1:1 DCM/Aceton/MeOH).



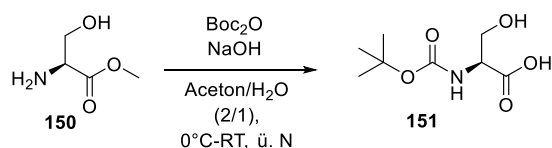
Summenformel: $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_3$.

Molmasse: 248.28 g/mol.

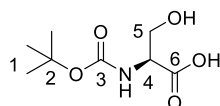
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 7.95 (t, 1H, 3J = 6.0 Hz, NH_{Gly}); 7.41-7.24 (m, 5H, H-1, H-2, H-3); 3.82 (d, 2H, 3J = 6.3 Hz, H-9); 3.62 (s, 3H, H-11); 3.51 (s, 2H, H-5); 2.22 (dd, 1H, 3J = 3 Hz, 3J = 6.6 Hz, H-6); 1.92 (dd, 1H, 2J = 1.5 Hz, 3J = 3.3 Hz, H-7); 1.80 (dd, 1H, 2J = 1.5 Hz, 3J = 6.9 Hz, H-7').

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) = 170.6, 170.7 (C-8, C-10); 139.3 (C-4); 128.7 (C-2); 128.3 (C-3); 127.4 (C-1); 62.6 (C-5); 52.1 (C-11); 40.8 (C-6); 38.9 (C-9); 34.2 (C-7).

4.14.5 N-Boc-L-Ser (148)



L-Serinmethylester (**150**) (1.00 g, 7.06 mmol, 1.0 Äq.) wurde in 20 mL Aceton/H₂O (1:1) gelöst und auf 0 °C gekühlt. Langsam wurde zunächst eine 1 N NaOH-Lsg. (14.0 mL, 14.0 mmol, 2.0 Äq.) zugetropft und anschließend wurde Boc₂O gelöst in 10 mL Aceton zugegeben. Es wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und das Aceton am folgenden Tag unter vermindertem Druck entfernt. Die wässrige Phase wurde mit DEE (2 x 20 mL) gewaschen. Mit einer wässrigen, gesättigten KHSO₄-Lsg. wurde der pH-Wert auf 2 eingestellt und mit DEE (4 x 20 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit einer wässrigen, gesättigten NaCl-Lsg. (1 x 50 mL) gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und nach Entfernung des Lösungsmittels unter vermindertem Druck wurde ein farbloser Feststoff (71%, 1.03 g, 5.04 mmol) erhalten.



Summenformel: C₈H₁₅NO₅.

Molmasse: 205.09 g/mol.

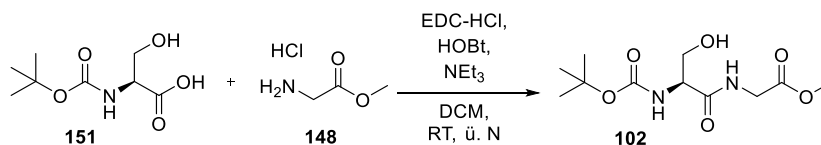
¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) = 6.70 (d, 1H, ³J = 8.4 Hz, NH); 3.99-3.95 (m, 1H, H-4); 3.63 (d, 2H, ³J = 4.4 Hz, H-5); 1.39 (s, 9H, H-1).

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) = 172.8 (C-6); 155.8 (C-3); 78.6 (C-2); 61.9 (C-5); 56.6 (C-4); 28.6 (C-1).

Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen aus der Literatur überein.^[195]

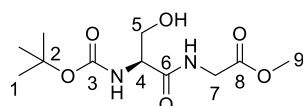
Synthese der Dehydroalanin-Analoga

4.14.6 N-Boc-L-Ser-Gly-OMe (102)



N-Boc-L-serin (**151**) (1.00 g, 4.82 mmol, 1.0 Äq.) wurde in 50 mL DCM gelöst und es wurden nacheinander HOBT (0.70 g, 5.43 mmol, 1.1 Äq.), EDC-HCl (1.00 g, 5.43 mmol, 1.1 Äq.), Glycinmethylester-Hydrochlorid (**148**) (0.67 g, 5.43 mmol, 1.1 Äq.) und NEt₃ (0.75 mL, 0.55 g, 5.43 mmol, 1.1 Äq.) zugegeben. Die Reaktionslösung wurde bei Raumtemperatur über Nacht gerührt und am folgenden Tag wurden 50 mL EtOAc zugegeben. Es wurde nacheinander mit einer wässrigen 40% Zitronensäure-Lsg. (2 x 30 mL), mit einer wässrigen, gesättigten NaHCO₃-Lsg. (2 x 30 mL), mit dest. Wasser (1 x 20 mL) und einer wässrigen, gesättigten NaCl-Lsg. (1 x 20 mL) gewaschen. Nachdem über MgSO₄ getrocknet wurde, wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (Silikagel, 3:1 EtOAc/Pentan) aufgereinigt. Es wurde ein farbloser Feststoff mit einer Ausbeute von 47% (0.62 g, 2.24 mmol) erhalten.

R_f = 0.26 (Silikagel, 3:1 EtOAc/Pentan).



Summenformel: C₁₁H₂₀N₂O₆.

Molmasse: 276.28 g/mol.

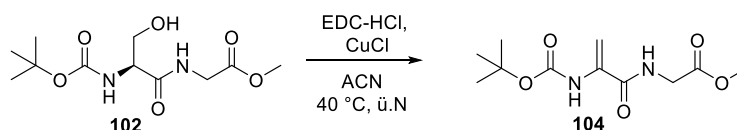
¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) = 8.21 (t, 1H, ³J = 5.6 Hz, NH_{Gly}); 6.65 (d, 1H, ³J = 8.4 Hz, NH_{Ser}); 4.81 (t, 1H, ³J = 6.0 Hz, H-4); 3.85 (dd, 2H, ²J = 2.8 Hz, ³J = 6.0 Hz, H-5); 3.62 (s, 3H, H-9); 3.60-3.48 (m, 2H, H-7); 1.39 (s, 9H, H-1).

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) = 171.5 (C-6); 170.6 (C-8); 155.7 (C-3); 78.7 (C-2); 62.3 (C-5); 57.1 (C-4); 52.1 (C-9); 41.1 (C-7); 28.6 (C-1).

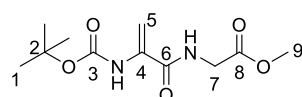
HR-ESI-MS (positiv): berechnet für C₁₁H₂₁N₂O₆ [M+H]⁺ 277.1394, gefunden 277.1393; berechnet für C₁₁H₂₀N₂O₆Na⁺ [M+Na]⁺ 299.1214, gefunden 299.1212.

Synthese der Dehydroalanin-Analoga

4.14.7 N-Boc-Acrylmethylester (104)



Unter Schutzgasatmosphäre wurde das Dipeptid **102** (0.08 g, 0.27 mmol, 3.5 Äq.) in 50 mL absolutem ACN gelöst. Nachfolgend wurden EDC-HCl (0.05 g, 0.27 mmol, 12.0 Äq.) und CuCl (7.70 mg, 0.08 mmol, 1.0 Äq.) zugegeben und auf 40 °C erhitzt. Nachdem die Reaktionslösung über Nacht gerührt wurde, wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand wurde in 10 mL EtOAc aufgenommen und mit einer wässrigen, gesättigten NaHCO₃-Lsg. (2 x 5 mL), dest. Wasser (1 x 5 mL) und einer wässrigen, gesättigten NaCl-Lsg. (1 x 5 mL) gewaschen. Nachdem das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt wurde, wurde das Produkt **104** als gelblicher Feststoff (68%, 0.06 g, 0.17 mmol) erhalten.



Summenformel: C₁₁H₁₈N₂O₄.

Molmasse: 258.27 g/mol.

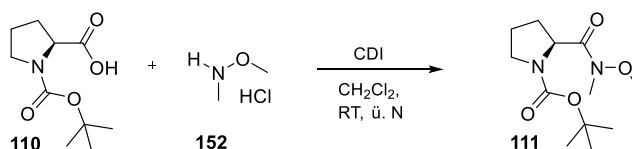
¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) = 8.88 (t, 1H, ³J = 5.7 Hz, NH_{Gly}); 7.96 (bs, 1H, NH_{ser}); 5.75 (bs, 1H, H-5); 5.43 (bs, 1H, H-5'); 3.96 (d, 2H, ³J = 5.7 Hz, H-7); 3.70 (s, 3H, H-9); 1.48 (s, 9H, H-1).

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) = 169.9 (C-8); 164.2 (C-6); 152.7 (C-3); 134.3 (C-4); 98.5 (C-5); 80.6 (C-2); 52.4 (C-9); 41.7 (C-7); 28.2 (C-1).

HR-ESI-MS (positiv): berechnet für C₁₁H₁₉N₂O₅⁺ [M+H]⁺ 259.1288, gefunden 259.1289.

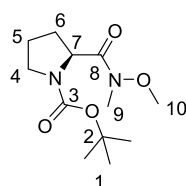
4.15 Synthese der Zwischenstufe 59

4.15.1 *tert*-Butyl-2-(methoxy(methyl)carbanoyl)pyrrolidin-1-carboxylat (**111**)



N-Boc-*L*-Prolin (**110**) (5.00 g, 23.2 mmol, 1.0 Äq.) wurde in 100 mL DCM gelöst und CDI (5.65 g, 34.8 mmol, 1.5 Äq.) wurde portionsweise zugegeben. Es wurde so lange gerührt, bis keine CO₂-Entwicklung mehr sichtbar war. Anschließend wurde *N,O*-Dimethylhydroxylamid-Hydrochlorid (**152**) (3.39 g, 34.8 mmol, 1.5 Äq.) zugegeben und die Reaktionsmischung für 15 h bei Raumtemperatur gerührt. Mit 100 mL Wasser wurde die Reaktion abgebrochen, die Phasen getrennt und die wässrige Phase mit DCM (3 x 50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit einer wässrigen, gesättigten NaCl-Lsg. (1 x 30 mL) gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (Silikagel, 3:1 EtOAc/Pentan) aufgereinigt und es wurde das Produkt **111** in Form eines farblosen Öls (73%, 4.38 g; 16.9 mmol) als Rotamerengemisch (50:50) erhalten.

$R_f = 0.43$ (Silikagel, 3:1 EtOAc/Pentan).



Summenformel: C₁₂H₂₂N₂O₄.

Molmasse: 258.31 g/mol.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 4.65 (dd, 1H, ³J = 30.0 Hz, ³J = 9.0 Hz, H-7); 3.76 (pd, 3H, H-10); 3.59-3.39 (m, 2H, H-4); 3.19 (s, 3H, H-9); 2.24-2.12 (m, 1H, H-6); 2.04-1.87 (m, 3H, H-5, H-6'); 1.43 (pd, 9H, H-1).

Synthese der Zwischenstufe 59

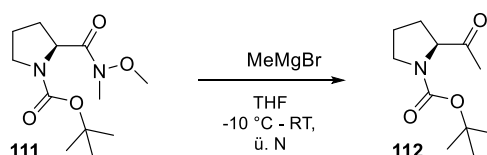
¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 173.9 und 173.3 (C-8); 154.5 und 153.9 (C-3); 79.5 und 79.3 (C-2); 61.3 und 61.2 (C-7); 56.8 und 56.5 (C-10); 46.9 und 46.6 (C-4); 32.4 und 32.3 (C-9); 30.5 und 29.6 (C-6); 28.5 und 28.4 (C-1); 24.1 und 23.4 (C-5).

ESI-MS (positiv): $m/z = 281.2 [M+Na]^+$.

Die NMR-Spektren weisen Signale von zwei Rotationsisomeren auf. Aufgelistet sind jeweils die Signale beider Isomere.

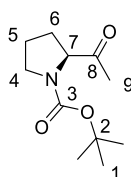
Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen aus der Literatur überein. ^[132]

4.15.2 N-Boc-2-Acetylpyrrolidin (112)



Unter Argonatmosphäre wurde das Weinreb Amid (**111**) (1.50 g, 5.80 mmol, 1.0 Äq.) in 50 mL trockenem THF gelöst und das Reaktionsgemisch mit Hilfe einer Eis-Salz-Mischung auf -10 °C gekühlt. Methylmagnesiumbromid (3.90 mL, 11.6 mmol, 2.0 Äq.) wurde so zugetropft, dass die Temperatur -8 °C nicht überschritt. Die Reaktion wurde über Nacht gerührt. Am folgenden Tag wurden 50 mL EtOAc zugegeben, sowie 30 mL 1 N HCl. Die wässrige Phase wurde mit EtOAc (3 x 20 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit einer wässrigen, gesättigten NaHCO₃-Lsg. (1 x 20 mL) und einer wässrigen, gesättigten NaCl-Lsg. (1 x 20 mL) gewaschen. Über MgSO₄ wurde getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (Silikagel, 3:1 EtOAc/Pentan) aufgereinigt und es wurde ein blassgelbes Öl (76%, 0.95 g, 4.38 mmol) als Rotamerengemisch (60:40) erhalten.

R_f = 0.65 (Silikagel, 3:1 EtOAc/Pentan).



Synthese der Zwischenstufe 59

Summelformel: C₁₁H₁₉NO₃.

Molmasse: 213.28 g/mol.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 4.31-4.16 (m, 1H, H-7); 3.54-3.41 (m, 2H, H-4); 2.23-2.10 (m, 1H, H-5); 2.13 (pd, 3H, H-9); 1.90-1.77 (m, 3H, H-5', H-6); 1.41 (pd, 9H, H-1).

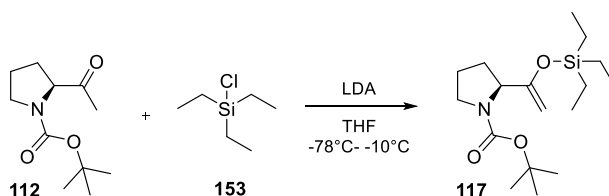
¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 208.3 und 208.1 (C-8); 154.6 und 153.8 (C-3); 80.1 und 79.8 (C-2); 65.7 und 65.2 (C-7); 46.8 und 46.6 (C-4); 29.8 und 28.7 (C-6); 28.4 und 28.3 (C-1); 26.4 und 25.5 (C-9); 24.4 und 23.7 (C-5).

ESI (positiv): *m/z* = 236.1 [M+Na]⁺.

Die NMR-Spektren weisen Signale von zwei Rotationsisomeren auf. Aufgelistet sind jeweils die Signale beider Isomere.

Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen aus der Literatur überein.^[132]

4.15.3 *tert*-Butyl-2(1-((triethylsilyl)oxy)vinyl)pyrrolidin-1-carboxylat (**117**)

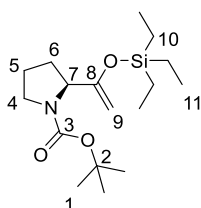


Diisopropylamin (1.60 mL, 11.2 mmol, 1.2 Äq.) wurde in 10 mL absolutem THF gelöst und auf -78 °C gekühlt. *n*-BuLi (2.5 M in Hexan, 4.50 mL, 11.2 mmol, 1.2 Äq.) wurde langsam zugetropft und die Lösung wurde 5 min bei -78 °C und 15 min bei 0 °C gerührt. Es wurde wieder auf -78 °C gekühlt bevor das Keton **112** (2.00 g, 9.37 mmol, 1.0 Äq.) gelöst in 20 mL absolutem THF langsam zugetropft wurde. Es wurde auf -40 °C erwärmt und Triethylsilylchlorid (**153**) (2.40 mL, 14.1 mmol, 1.5 Äq.) zugegeben. Anschließend wurde so lange gerührt, bis die Temperatur -10 °C betrug. Es wurde wieder auf -78 °C gekühlt und die Reaktion mit 30 mL einer wässrigen, gesättigten NaHCO₃-Lsg. abgebrochen. Es wurde mit EtOAc (2 x 20 mL) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen mit 1 N HCl so lange gewaschen, bis der pH-Wert der wässrigen Phase sauer wurde. Demfolgend wurde mit dest. Wasser (1 x 10 mL), sowie mit einer wässrigen, gesättigten NaCl-Lsg. (1 x 20 mL) gewaschen. Über MgSO₄ wurde

Synthese der Zwischenstufe 59

getrocknet, unter vermindertem Druck wurde das Lösungsmittel entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (Silikagel, 1:20 EtOAc/Pentan) aufgereingt, so dass ein farbloses Öl mit einer Ausbeute von 73% (2.25 g, 6.80 mmol) als Rotamerengemisch (75:25) erhalten wurde.

$R_f = 0.4$ (Silikagel, 1:20 EtOAc/Pentan).



Summenformel: C₁₇H₃₃NO₃Si.

Molmasse: 327.5 g/mol.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 4.23-4.07 (m, 3H, H-7, H-9); 3.45-3.36 (m, 2H, H-4); 2.02-1.91 (m, 3H, H-6, H-5); 1.82-1.73 (m, 1H, H-6'); 1.46 (s, 9H, H-1); 1.00 (t, 9H, ³J = 8.0 Hz, H-11); 0.73 (q, 6H, ³J = 8.0 Hz H-10).

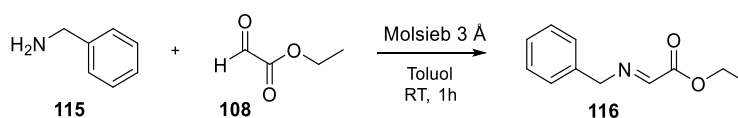
¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 158.5 und 158.1 (C-8); 154.6 und 154.2 (C-3); 88.4 und 87.8 (C-2); 79.1 und 78.9 (C-9); 60.6 und 60.5 (C-7); 46.8 und 46.3 (C-4); 30.6 und 29.9 (C-6); 28.5 und 28.4 (C-1); 23.7 und 22.7 (C-5); 6.6 und 6.5 (C-11); 4.8 (C-10).

ESI (positiv): $m/z = 328.2$ [M+H]⁺.

HR-ESI-MS (positiv): berechnet für C₁₇H₃₄NO₃Si⁺ [M+H]⁺ 328.2302; gefunden 328.2302.

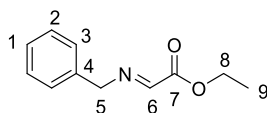
Die NMR-Spektren weisen Signale von zwei Rotationsisomeren auf. Aufgelistet sind jeweils die Signale beider Isomere.

4.15.4 Ethyl-*E*-2-(benzylimino)acetat (116)



Synthese der Zwischenstufe 59

Ethylglyoxylat (**108**) (50% in Toluol, 2.00 mL, 7.68 mmol, 1.0 Äq.) wurde zu 20 mL Toluol und 6.00 g Molsieb unter Schutzgasatmosphäre gegeben. Benzylamin (**115**) (0.84 mL, 7.68 mmol, 1.0 Äq.) wurde zugetropft und die Reaktion für 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Bevor über Celite filtriert wurde, wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das instabile, gelbe Öl, das mit einer Ausbeute von 67% (0.99 g, 5.17 mmol) erhalten wurde, wurde am selben Tag für die Folgereaktion eingesetzt.



Summenformel: C₁₁H₁₃NO₂.

Molmasse: 191.23 g/mol.

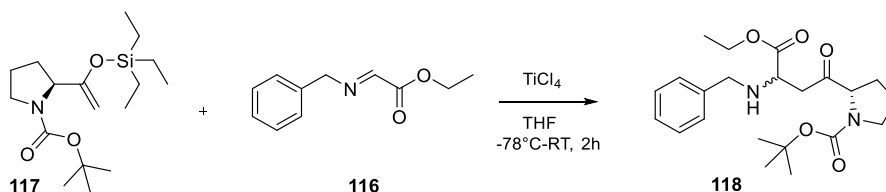
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 7.73 (s, 1H, H-6); 7.38-7.20 (m, 5H, H-1, H-2, H-3); 4.87 (s, 2H, H-5); 4.35 (q, 2H, ³J = 5.1 Hz, H-8); 1.36 (t, 3H, ³J = 5.1 Hz, H-9).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 163.1 (C-7); 154.3 (C-6); 136.6 (C-4); 128.7 (C-2); 128.6 (C-3); 127.5 (C-1); 64.6 (C-5); 61.8 (C-8); 14.1 (C-9).

ESI (positiv): *m/z* = 192.0 [M+H]⁺.

Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen aus der Literatur überein. ^[196]

4.15.5 *tert*-Butyl-2-(3-(benzylamino)-4-ethoxy-4-oxobutanoyl)pyrrolidin-1-carboxylate (**118**)

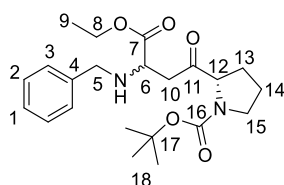


Unter Argonatmosphäre wurden das Keton **117** (0.50 g, 1.53 mmol, 1.2 Äq.) und das Imin **116** (0.30 g, 1.27 mmol, 1.0 Äq.) in 20 mL absolutem THF vorgelegt und auf -78 °C gekühlt. Anschließend wurde TiCl₄ (0.17 mL, 1.53 mmol, 1.0 Äq.) zugetropft und die gelbe Lösung 30 min bei -78 °C gerührt. Das Kältebad wurde entfernt und es wurde weitere 2 h bei

Synthese der Zwischenstufe 59

Raumtemperatur gerührt. Die rot-braune Lösung wurde erneut auf $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlt und es wurden 20 mL einer wässrigen, gesättigten NH_4Cl -Lsg. zugegeben. Es wurde mit EtOAc (3 x 20 mL) extrahiert und die vereinigten, organischen Phasen mit einer wässrigen, gesättigten NaCl-Lsg. (1 x 20 mL) gewaschen. Unter vermindertem Druck wurde das Lösungsmittel entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (Silikagel, 3:1 EtOAc/Pentan) aufgereinigt. Anschließend wurde das Produkt zusätzlich mittels semi-präparativer HPLC (A = Wasser + 0.05% TFA, B = ACN + 0.05% TFA, 0-30 min 30% B; Säule: Eurospher II 100 RP C-18, $5\text{ }\mu\text{m}$, $250 \times 16\text{ mm}$ mit Vorsäule: $30 \times 16\text{ mm}$ der Fa. Knauer) aufgereinigt um 70 mg (14%, 0.17 mg) eines gelb-braunen Öls zu erhalten.

$R_f = 0.27$ (Silikagel, 3:1 EtOAc/Pentan).



Summenformel: $\text{C}_{22}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_5$.

Molmasse: 404.5 g/mol.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 7.61-7.42 (m, 5H, H-1, H-2, H-3); 4.50-4.22 (m, 6H, H-5, H-6, H-8, H-12); 3.65-3.41 (m, 4H, H-10, H-15). 2.17-2.12 (m, 1H, H-13'); 1.97-1.80 (m, 3H, H-13, H-14), 1.41 (pd, 9H, H-18); 1.32 (t, 3H, $^3J = 6.3\text{ Hz}$, H-9).

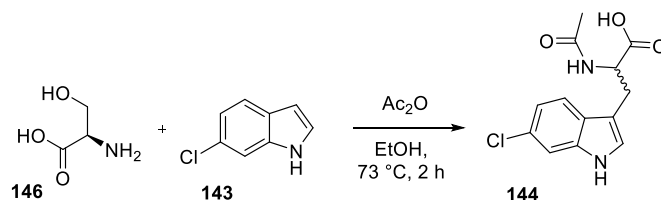
ESI-MS (positiv): $m/z = 405.1$ $[\text{M}+\text{H}]^+$.

HR-ESI-MS (positiv): berechnet für $\text{C}_{22}\text{H}_{33}\text{N}_2\text{O}_5^+ [\text{M}+\text{H}]^+$ 405.2384; gefunden 405.2384.

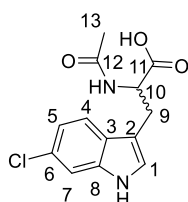
Synthese von 6-Chlortryptophan (139)

4.16 Synthese von 6-Chlortryptophan (139)

4.16.1 N-Acetyl-6-chlorotryptophan (144)



6-Chlorindol (**143**) (0.20 g, 1.90 mmol, 1.0 Äq.) wurde in 7.5 mL Essigsäure gelöst und L-Serin (**73**) (0.40 g, 3.80 mmol, 2.0 Äq.) sowie Essigsäureanhydrid (1.70 mL, 1.81 mmol, 9.5 Äq.) wurden zugegeben und für 2 h bei 73 °C erhitzt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand in 10 mL EtOAc aufgenommen und es wurde mit dest. Wasser (3 x 5 mL) sowie mit einer wässrigen, gesättigten NaCl-Lsg (1 x 5 mL) gewaschen. Über MgSO₄ wurde getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels MPLC (A = Wasser + 0.05 % TFA, B = ACN + 0.05 % TFA, 0-1 min 95 % A, 1-13.9 min 95 % B; Säule: Reveleris C18 40 g; Flussrate: 30 mL/min) aufgereinigt und das Produkt **144** wurde als brauner Feststoff mit einer Ausbeute von 70% (0.37 g, 1.30 mmol) erhalten.



Summenformel: C₁₃H₁₃ClN₂O₃.

Molmasse: 280.71 g/mol.

¹H-NMR (400 MHz, MeOD): δ (ppm) = 7.53 (d, 1H, ³J = 8.0 Hz, H-4); 7.35 (d, 1H, ⁴J = 1.8 Hz, H-7); 7.12 (s, 1H, H-1); 7.00 (dd, 1H, ³J = 8.5 Hz, ⁴J = 1.9 Hz, H-5); 4.72 (dd, 1H, ³J = 8.0 Hz, ³J = 7.4 Hz, H-10); 3.33 (dd, 1H, ²J = 15.5 Hz, ³J = 8.0 Hz, H-9); 3.15 (dd, 1H, ²J = 15.3 Hz, ³J = 8.6 Hz, H-9'); 1.92 (s, 3H, H-13).

Synthese von 6-Chlortryptophan (**139**)

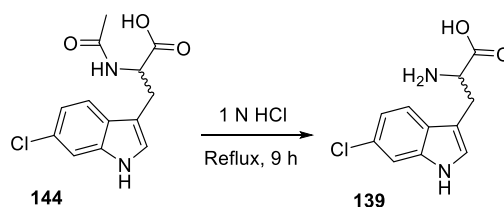
¹³C-NMR (100 MHz, MeOD): δ (ppm) = 173.6 (C-11); 171.7 (C-12); 139.9 (C-8); 126.9 (C-6); 126.2 (C-3); 123.9 (C-1); 118.9 (C-5); 118.8 (C-4); 110.6 (C-7); 110.1 (C-2); 53.2 (C-10); 26.9 (C-9); 20.9 (C-13).

HR-ESI-MS (positiv): berechnet für $C_{13}H_{14}ClN_2O_3^+ [M+H]^+$ 281.0687; gefunden 281.0686.

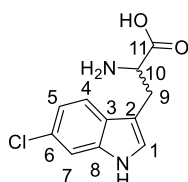
Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen aus der Literatur überein.^[197]

4.16.2 6-Chlortryptophan (**139**)

A)



N-Acetyl-6-chlorotryptophan (**144**) (0.21 g, 0.75 mmol, 1.0 Äq.) wurde in 1 N HCl (2.24 mL, 2.24 mmol, 3 Äq.) gelöst und für 9 h bei 100 °C refluxiert. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der rote Feststoff über MPLC (A = Wasser + 0.05 % TFA, B = ACN + 0.05 % TFA, 0-1 min 95 % A, 1-13.9 min 95 % B; Säule: Reveleris C18 40 g; Flussrate: 30 mL/min) aufgereinigt. Es wurde ein hellbrauner Feststoff mit einer Ausbeute von 63% (0.11 g, 0.47 mmol) erhalten.



Summelformel: $C_{11}H_{11}ClN_2O_2$.

Molmasse: 238.67 g/mol.

Synthese von 6-Chlortryptophan (**139**)

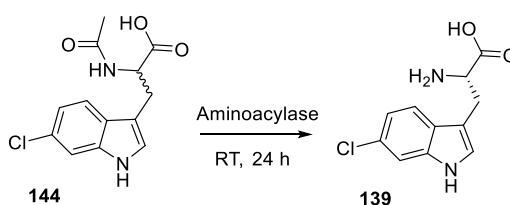
¹H-NMR (400 MHz, D₂O): δ (ppm) = 7.41 (d, 1H, ³J = 8.8 Hz, H-4); 7.34 (d, 1H, ⁴J = 1.6 Hz, H-7); 7.14 (s, 1H, H-1); 6.98 (dd, 1H, ³J = 8.4 Hz, ⁴J = 1.6 Hz, H-5); 4.19 (dd, 1H, ³J = 7.2 Hz, ³J = 5.2 Hz, H-10); 3.30 (dd, 1H, ²J = 15.6 Hz, ³J = 5.4 Hz, H-9); 3.22 (dd, 1H, ²J = 15.6 Hz, ³J = 7.2 Hz, H-9').

¹³C-NMR (100 MHz, D₂O): δ (ppm) = 171.2 (C-11); 136.6 (C-8); 127.3 (C-6); 125.9 (C-3); 125.2 (C-1); 119.8 (C-5); 119.1 (C-4); 111.5 (C-7); 106.6 (C-2); 53.3 (C-10); 25.6 (C-9).

HR-ESI-MS (positiv): berechnet für C₁₁H₁₂ClN₂O₂⁺ [M+H]⁺ 239.0582; gefunden 239.0581.

Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen aus der Literatur überein.^[198]

B)



N-Acetyl-6-chlorotryptophan (**144**) (0.01 g, 0.04 mmol) wurde in 1 M Kaliumphosphatpuffer pH 7.0 (0.5 mL) gelöst und Kaliumchlorid-Hexahydrat (0.13 mL, 2.5 mM, 0.32 μ mol) wurde zugegeben. Der pH-Wert wurde mit einer wässrigen 1 M KOH-Lsg. auf pH = 7 eingestellt und Natriumazid (57 μ L, 154 mM, 8.9 μ mol) zugegeben. Anschließend wurde die Aminoacylase (60 μ L, 25 mg/mL) zugegeben und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die Charakterisierung folgte wegen der geringen Menge ausschließlich über die HPLC.

5 Literaturverzeichnis

- [1] B. Bahr, J. Resag, K. Riebe, *Faszinierende Physik*, Springer Spektrum, **2015**.
- [2] W. Barthlott, C. Neinhuis, *Planta* **1997**, *202*, 1-8.
- [3] D. S. Fabricant, N. R. Farnsworth, *Environ. Health Perspect.* **2001**, *109*, 69-75.
- [4] K. M. O'Connell, J. T. Hodgkinson, H. F. Sore, M. Welch, G. P. Salmond, D. R. Spring, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2013**, *52*, 10706-10733.
- [5] P. Flemming, *Proc. R. Soc. Med.* **1929**, *22*, 771-782.
- [6] S. Rachakonda, L. Cartee, *Curr. Med. Chem.* **2004**, *11*, 775-793.
- [7] J. Davies, *Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol.* **2006**, *17*, 287-290.
- [8] F. von Nussbaum, M. Brands, B. Hinzen, S. Weigand, D. Habich, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2006**, *45*, 5072-5129.
- [9] C. Nathan, *Nature* **2004**, *431*, 899-902.
- [10] N. M. Clark, E. Hershberger, M. J. Zervosc, J. P. Lynch, 3rd, *Curr. Opin. Crit. Care.* **2003**, *9*, 403-412.
- [11] A. Bruggink, E. C. Roos, E. de Vroom, *Org. Process Res. Dev.* **1998**, *2*, 128-133.
- [12] J. M. Choi, S. S. Han, H. S. Kim, *Biotechnol. Adv.* **2015**, *33*, 1443-1454.
- [13] T. Purkarthofer, W. Skranc, C. Schuster, H. Griengl, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2007**, *76*, 309-320.
- [14] U. T. Bornscheuer, G. W. Huisman, R. J. Kazlauskas, S. Lutz, J. C. Moore, K. Robins, *Nature* **2012**, *485*, 185-194.
- [15] D. Rothlisberger, O. Khersonsky, A. M. Wollacott, L. Jiang, J. DeChancie, J. Betker, J. L. Gallaher, E. A. Althoff, A. Zanghellini, O. Dym, S. Albeck, K. N. Houk, D. S. Tawfik, D. Baker, *Nature* **2008**, *453*, 190-194.
- [16] J. B. Siegel, A. Zanghellini, H. M. Lovick, G. Kiss, A. R. Lambert, J. L. S. Clair, J. L. Gallaher, D. Hilvert, M. H. Gelb, B. L. Stoddard, K. N. Houk, F. E. Michael, D. Baker, *Science* **2010**, *329*, 309-313.
- [17] C. K. Savile, J. M. Janey, E. C. Mundorff, J. C. Moore, S. Tam, W. R. Jarvis, J. C. Colbeck, A. Krebber, F. J. Fleitz, J. Brands, P. N. Devine, G. W. Huisman, G. J. Hughes, *Science* **2010**, *329*, 305-309.
- [18] R. A. Maplestone, M. J. Stone, D. H. Williams, *Gene* **1992**, *115*, 151-157.
- [19] L. Li, W. Deng, J. Song, W. Ding, Q. F. Zhao, C. Peng, W. W. Song, G. L. Tang, W. Liu, *J. Bacteriol.* **2008**, *190*, 251-263.

Literaturverzeichnis

- [20] V. R. Hegde, M. S. Puar, P. Dai, M. Patel, V. P. Gullo, T. M. Chan, J. Silver, B. N. Pramanik, C. H. Jenh, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 573-575.
- [21] D. Schwarzer, R. Finking, M. A. Marahiel, *Nat. Prod. Rep.* **2003**, *20*, 275-287.
- [22] F. Lipmann, W. Gevers, Kleinkau.H, R. Roskoski, *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **1971**, *35*, 1-34.
- [23] M. A. Marahiel, T. Stachelhaus, H. D. Mootz, *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 2651-2673.
- [24] C. T. Walsh, A. M. Gehring, P. H. Weinreb, L. E. N. Quadri, R. S. Flugel, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1997**, *1*, 309-315.
- [25] S. A. Sieber, M. A. Marahiel, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 715-738.
- [26] C. T. Walsh, H. W. Chen, T. A. Keating, B. K. Hubbard, H. C. Losey, L. S. Luo, C. G. Marshall, D. A. Miller, H. M. Patel, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2001**, *5*, 525-534.
- [27] T. A. Keating, D. E. Ehmann, R. M. Kohli, C. G. Marshall, J. W. Trauger, C. T. Walsh, *ChemBioChem.* **2001**, *2*, 99-107.
- [28] L. C. Du, L. L. Lou, *Nat. Prod. Rep.* **2010**, *27*, 255-278.
- [29] D. E. Ehmann, A. M. Gehring, C. T. Walsh, *Biochemistry* **1999**, *38*, 6171-6177.
- [30] R. Finking, M. A. Marahiel, *Annu. Rev. Microbiol.* **2004**, *58*, 453-488.
- [31] A. M. Mulichak, H. C. Losey, C. T. Walsh, R. M. Garavito, *Structure* **2001**, *9*, 547-557.
- [32] H. Aldemir, R. Richarz, T. A. M. Gulder, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 8286-8293.
- [33] H. Seto, T. Fujioka, K. Furihata, I. Kaneko, S. Takahashi, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 4987-4990.
- [34] K. Momota, I. Kaneko, S. Kimura, K. Mitamura, K. Shimada, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1991**, *179*, 243-250.
- [35] H. Leisch, K. Morley, P. C. K. Lau, *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 4165-4222.
- [36] B. J. Kennedy, J. L. Torkelson, *Med. Pediatr. Oncol.* **1995**, *24*, 327-328.
- [37] M. Gibson, M. Nur-e-alam, F. Lipata, M. A. Oliveira, J. Rohr, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 17594-17595.
- [38] H. Leisch, K. Morley, P. C. Lau, *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 4165-4222.
- [39] K. Balke, M. Kadow, H. Mallin, S. Sass, U. T. Bornscheuer, *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 6249-6265.
- [40] L. P. Parra, J. P. Acevedo, M. T. Reetz, *Biotechnol. Bioeng.* **2015**, *112*, 1354-1364.
- [41] J.-H. Seo, H.-H. Kim, E.-Y. Jeon, Y.-H. Song, C.-S. Shin, J.-B. Park, *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 28223.
- [42] J. A. Tobert, *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2003**, *2*, 517-526.
- [43] G. Bringmann, A. Irmer, D. Feineis, T. A. M. Gulder, H. P. Fiedler, *Phytochemistry* **2009**, *70*, 1776-1786.
- [44] C. Hertweck, *Angew. Chem. Int. Edit.* **2009**, *48*, 4688-4716.
- [45] D. A. Hopwood, *Plos Biol.* **2004**, *2*, 166-169.

Literaturverzeichnis

- [46] E. S. Sattely, M. A. Fischbach, C. T. Walsh, *Nat. Prod. Rep.* **2008**, *25*, 757-793.
- [47] U. Rix, C. Fischer, L. L. Remsing, J. Rohr, *Nat. Prod. Rep.* **2002**, *19*, 542-580.
- [48] J. Staunton, K. J. Weissman, *Nat. Prod. Rep.* **2001**, *18*, 380-416.
- [49] F. Schaefer, T. A. M. Gulder, C. Bressy, M. Smietana, E. Benedetti, S. Arseniyadis, M. Kalesse, M. Cordes, in *From Biosynthesis to Total Synthesis*, John Wiley & Sons, Inc, **2016**, pp. 19-129.
- [50] R. J. Cox, T. J. Simpson, *Methods Enzymol.* **2009**, *459*, 49-78.
- [51] H. T. Chen, L. C. Du, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2016**, *100*, 541-557.
- [52] R. J. Cox, *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 2010-2026.
- [53] C. Khosla, Y. Tang, A. Y. Chen, N. A. Schnarr, D. E. Cane, *Annu. Rev. Biochem.* **2007**, *76*, 195-221.
- [54] D. E. Cane, C. T. Walsh, C. Khosla, *Science* **1998**, *282*, 63-68.
- [55] E. J. N. Helfrich, J. Piel, *Nat. Prod. Rep.* **2016**, *33*, 231-316.
- [56] J. Piel, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **2002**, *99*, 14002-14007.
- [57] R. Ueoka, A. R. Uria, S. Reiter, T. Mori, P. Karbaum, E. E. Peters, E. J. N. Helfrich, B. I. Morinaka, M. Gugger, H. Takeyama, S. Matsunaga, J. Piel, *Nat. Chem. Biol.* **2015**, *11*, 705-+.
- [58] M. A. Fischbach, C. T. Walsh, *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 3468-3496.
- [59] D. A. Miller, L. S. Luo, N. Hillson, T. A. Keating, C. T. Walsh, *Chem. Biol.* **2002**, *9*, 333-344.
- [60] H. Aldemir, R. Richarz, T. A. M. Gulder, *Angew Chem. Int. Edit.* **2014**, *53*, 8286-8293.
- [61] J. C. J. Barna, D. H. Williams, D. J. M. Stone, T. W. C. Leung, D. M. Doddrell, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 4895-4902.
- [62] M. Ezaki, M. Iwami, M. Yamashita, S. Hashimoto, T. Komori, K. Umehara, Y. Mine, M. Kohsaka, H. Aoki, H. Imanaka, *J. Antibiot.* **1985**, *38*, 1453-1461.
- [63] S. Riva, *Trends Biotechnol.* **2006**, *24*, 219-226.
- [64] M. Nagai, M. Kawata, H. Watanabe, M. Ogawa, K. Saito, T. Takesawa, K. Kanda, T. Sato, *Microbiology* **2003**, *149*, 2455-2462.
- [65] K. J. Kramer, M. R. Kanost, T. L. Hopkins, H. B. Jiang, Y. C. Zhu, R. D. Xu, J. L. Kerwin, F. Turecek, *Tetrahedron* **2001**, *57*, 385-392.
- [66] F. J. Enguita, L. O. Martins, A. O. Henriques, M. A. Carrondo, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 19416-19425.
- [67] S. Witayakran, A. J. Ragauskas, *Adv. Synth. Catal.* **2009**, *351*, 1187-1209.
- [68] K. Reder-Christ, Y. Schmidt, M. Dorr, H. G. Sahl, M. Josten, J. M. Raaijmakers, H. Gross, G. Bendas, *Biomembranes* **2012**, *1818*, 566-573.
- [69] K. Reder-Christ, Y. Schmidt, M. Dorr, H. G. Sahl, M. Josten, J. M. Raaijmakers, H. Gross, G. Bendas, *Biochim. Biophys. Acta* **2012**, *1818*, 566-573.
- [70] J. Thirkettle, *Biodiversity* **2000**, 100-109.

Literaturverzeichnis

- [71] D. G. Tew, C. Southan, S. Q. J. Rice, G. M. P. Lawrence, H. D. Li, H. F. Boyd, K. Moores, I. S. Gloger, C. H. Macphee, *Arterioscl. Throm. Vas.* **1996**, *16*, 591-599.
- [72] M. T. Quinn, S. Parthasarathy, D. Steinberg, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **1988**, *85*, 2805-2809.
- [73] C. L. Cowan, R. P. Steffen, *Arterioscl. Throm. Vas.* **1995**, *15*, 2290-2297.
- [74] P. F. Andersson, J. Levenfors, A. Broberg, *Biocontrol.* **2012**, *57*, 463-469.
- [75] Y. Schmidt, M. van der Voort, M. Crüsemann, J. Piel, M. Josten, H.-G. Sahl, H. Miess, J. M. Raaijmakers, H. Gross, *ChemBioChem.* **2014**, *15*, 259-266.
- [76] K. Balke, M. Kadow, H. Mallin, S. Sass, U. T. Bornscheuer, *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 6249-6265.
- [77] B. Faust, D. Hoffmeister, G. Weitnauer, L. Westrich, S. Haag, P. Schneider, H. Decker, E. Kunzel, J. Rohr, A. Bechthold, *Microbiology* **2000**, *146*, 147-154.
- [78] A. Rottig, A. Steinbuchel, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2013**, *77*, 277-321.
- [79] F. Schaefers, Heterologe Expression und *In-vitro*-Charakterisierung neuer Biokatalysatoren zur Darstellung von Peptid-Naturstoffen, *Diplomarbeit*, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, **2011**.
- [80] D. J. Busby, R. C. B. Copley, J. A. Hueso, S. A. Readshaw, A. Rivera, *J. Antibiot.* **2000**, *53*, 670-676.
- [81] C. W. Johnston, R. Zvanych, N. Khyzha, N. A. Magarvey, *ChemBioChem.* **2013**, *14*, 431-435.
- [82] D. Tillett, E. Dittmann, M. Erhard, H. von Dohren, T. Borner, B. A. Neilan, *Chem. Biol.* **2000**, *7*, 753-764.
- [83] C. J. Balibar, A. R. Howard-, C. T. Walsh, *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3*, 584-592.
- [84] C. W. Johnston, R. Zvanych, N. Khyzha, N. A. Magarvey, *ChemBioChem.* **2013**, *14*, 431-435.
- [85] R. Mendes, M. Kruijt, I. de Bruijn, E. Dekkers, M. van der Voort, J. H. M. Schneider, Y. M. Piceno, T. Z. DeSantis, G. L. Andersen, P. A. H. M. Bakker, J. M. Raaijmakers, *Science* **2011**, *332*, 1097-1100.
- [86] J. Watrous, P. Roach, T. Alexandrov, B. S. Heath, J. Y. Yang, R. D. Kersten, M. van der Voort, K. Pogliano, H. Gross, J. M. Raaijmakers, B. S. Moore, J. Laskin, N. Bandeira, P. C. Dorrestein, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **2012**, *109*, E1743-E1752.
- [87] J. Schimana, K. Gebhardt, A. Holtzel, D. G. Schmid, R. Sussmuth, J. Muller, R. Pukall, H. P. Fiedler, *J. Antibiot.* **2002**, *55*, 565-570.
- [88] A. Holtzel, D. G. Schmid, G. J. Nicholson, S. Stevanovic, J. Schimana, K. Gebhardt, H. P. Fiedler, G. Jung, *J. Antibiot.* **2002**, *55*, 571-577.
- [89] P. Kulanthaivel, A. J. Kreuzman, M. A. Strege, M. D. Belvo, T. A. Smitka, M. Clemens, J. R. Swartling, K. L. Minton, F. Zheng, E. L. Angleton, D. Mullen, L. N. Jungheim, V. J. Klimkowski, T. I. Nicas, R. C. Thompson, S. B. Peng, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 36250-36258.

Literaturverzeichnis

- [90] J. Dufour, L. Neuville, J. Zhu, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 10523-10534.
- [91] R. Tuteja, *Arch. Biochem. Biophys.* **2005**, *441*, 107-111.
- [92] R. E. Dalbey, M. O. Lively, S. Bron, J. M. VanDijl, *Protein Sci.* **1997**, *6*, 1129-1138.
- [93] M. Paetzel, J. J. Goodall, M. Kania, R. E. Dalbey, M. G. Page, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 30781-30790.
- [94] T. C. Roberts, P. A. Smith, R. T. Cirtz, F. E. Romesberg, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 15830-15838.
- [95] R. Lépine, J. Zhu, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 2981-2984.
- [96] W. T. Liu, R. D. Kersten, Y. L. Yang, B. S. Moore, P. C. Dorrestein, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 18010-18013.
- [97] S. Weist, C. Kittel, D. Bischoff, B. Bister, V. Pfeifer, G. J. Nicholson, W. Wohlleben, R. D. Süßmuth, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 5942-5943.
- [98] D. B. Li, K. Woithe, N. Geib, K. Abou-Hadeed, K. Zerbe, J. A. Robinson, *Complex Enzymes in Microbial Natural Product Biosynthesis, Part A: Overview Articles and Peptides* **2009**, *458*, 487-509.
- [99] M. Jakobi, G. Winkelmann, D. Kaiser, C. Kempter, G. Jung, G. Berg, H. Bahl, *J. Antibiot.* **1996**, *49*, 1101-1104.
- [100] K. Jomon, M. Ajisaka, H. Sakai, Y. Kuroda, *J. Antibiot.* **1972**, *25*, 271-&.
- [101] P. R. Graupner, S. Thornburgh, J. T. Mathieson, E. L. Chapin, G. M. Kemmitt, J. M. Brown, C. E. Snipes, *J. Antibiot.* **1997**, *50*, 1014-1019.
- [102] H. Shigemori, M. A. Bae, K. Yazawa, T. Sasaki, J. Kobayashi, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 4317-4320.
- [103] M. A. Bae, K. Yamada, D. Uemura, J. H. Seu, Y. H. Kim, *J. Microbiol. Biotechn.* **1998**, *8*, 455-460.
- [104] F. Yu, K. Zaleta-Rivera, X. Zhu, J. Huffman, J. C. Millet, S. D. Harris, G. Yuen, X.-C. Li, L. Du, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2007**, *51*, 64-72.
- [105] H. A. Kirst, K. H. Michel, J. W. Martin, L. C. Creemer, E. H. Chio, R. C. Yao, W. M. Nakatsukasa, L. D. Boeck, J. L. Occolowitz, J. W. Paschal, J. B. Deeter, N. D. Jones, G. D. Thompson, *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 4839-4842.
- [106] S. Cao, J. A. V. Blodgett, J. Clardy, *Org. Lett.* **2010**, *12*, 4652-4654.
- [107] J. A. V. Blodgett, D.-C. Oh, S. Cao, C. R. Currie, R. Kolter, J. Clardy, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 11692-11697.
- [108] L. Lou, G. Qian, Y. Xie, J. Hang, H. Chen, K. Zaleta-Rivera, Y. Li, Y. Shen, P. H. Dussault, F. Liu, L. Du, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 643-645.
- [109] L. L. Lou, H. T. Chen, R. L. Cerny, Y. Y. Li, Y. M. Shen, L. C. Du, *Biochemistry* **2012**, *51*, 4-6.
- [110] M. Bertasso, M. Holzenkampfer, A. Zeeck, E. Stackebrandt, W. Beil, H. P. Fiedler, *J. Antibiot.* **2003**, *56*, 364-371.

Literaturverzeichnis

- [111] K. Nishihara, M. Kanemori, M. Kitagawa, H. Yanagi, T. Yura, *Appl. Env. Microb.* **1998**, *64*, 1694-1699.
- [112] J. Martin, F. U. Hartl, *Curr. Opin. Struc. Biol.* **1997**, *7*, 41-52.
- [113] T. Kieser, M. J. Bibb, M. J. Buttner, K. F. Chater, D. A. Hopwood, *Practical Streptomyces genetics*, The John Innes Foundation, Norwich, **2000**.
- [114] S. Uhlmann, R. D. Sussmuth, M. J. Cryle, *ACS Chem. Biol.* **2013**, *8*, 2586-2596.
- [115] C. Arenz, A. Giannis, *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, 137-140.
- [116] J. S. Yadav, N. N. Yadav, T. S. Rao, B. V. S. Reddy, A. A. Al Ghamdi, *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, 4603-4608.
- [117] H. C. Beyerman, Heiszwol.Gj, *J. Chem. Soc.* **1963**, 755-&.
- [118] U. Eder, G. Haffer, G. Neef, G. Sauer, A. Seeger, R. Wiechert, *Chem Ber.* **1977**, *110*, 3161-3167.
- [119] H. Paulsen, K. Adermann, *Liebigs Ann. Chem.* **1989**, 751-769.
- [120] R. H. Schlessinger, R. A. Nugent, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 1116-1118.
- [121] P. J. Kociensky, *Protecting groups*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, **2005**.
- [122] A. Sib, Chemische Totalsynthese einer Brabantamidvorstufe zur Aufklärung des Biosyntheseweges, *Bachelorarbeit*, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität-Bonn, **2013**.
- [123] L. Navarre, R. Martinez, J.-P. Genet, S. Darses, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 6159-6169.
- [124] F. Kelleher, K. ó. Proinsias, *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 4879-4882.
- [125] N. V. Bell, W. R. Bowman, P. F. Coe, A. T. Turner, D. Whybrow, *Can. J. Chem.* **1997**, *75*, 873-883.
- [126] L. A. Adams, V. K. Aggarwal, R. V. Bonnert, B. Bressel, R. J. Cox, J. Shepherd, J. de Vicente, M. Walter, W. G. Whittingham, C. L. Winn, *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 9433-9440.
- [127] H. Miyake, K. Yoshida, H. Sugimoto, H. Tsukube, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 6524-6525.
- [128] M. Galibert, Z. H. Jin, T. Furukawa, T. Fukumura, T. Saga, Y. Fujibayashi, P. Dumy, D. Boturyn, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 5422-5425.
- [129] C. McGregor, C. Perrin, M. Monck, P. Camilleri, A. J. Kirby, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 6215-6220.
- [130] H. Hong, Total Synthesis of Novel Bioactive Cyclic Peptide Natural Products, *Dissertation*, Technische Universität München, **2016**.
- [131] J. N. T. Burrows, H., (Astrazeneca), WO 2004/024715 A1, **2004**.
- [132] K. Chen, J. Navendu, D. Tom G., *Org. Lett.* **2013**, *15*, 824-827.
- [133] N. R. Yepuri, S. A. Jamieson, T. A. Darwish, A. Rawal, J. M. Hook, P. Thordarson, P. J. Holden, M. James, *Tetrahedron Lett.* **2013**, *54*, 2538-2541.
- [134] C. Mioskowski, C. Catala, A. Wagner, (N. a. VanderHye), US 2007/0043240 A1, **2007**.
- [135] J.-i. Matsuo, M. Murakami, *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 9280-9289.
- [136] J. Itoh, K. Fuchibe, T. Akiyama, *Synthesis* **2006**, 4075-4080.

Literaturverzeichnis

- [137] O. Schimming, F. Fleischhacker, F. I. Nollmann, H. B. Bode, *ChemBioChem*. **2014**, *15*, 1290-1294.
- [138] K. Woithe, N. Geib, K. Zerbe, D. B. Li, M. Heck, S. Fournier-Rousset, O. Meyer, F. Vitali, N. Matoba, K. Abou-Hadeed, J. Robinson, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 6887-6895.
- [139] K. Reuter, M. R. Mofid, M. A. Marahiel, R. Ficner, *EMBO J.* **1999**, *18*, 6823-6831.
- [140] S. A. Samel, B. Wagner, M. A. Marahiel, L. O. Essen, *J. Mol. Biol.* **2006**, *359*, 876-889.
- [141] K. M. Hoyer, C. Mahlert, M. A. Marahiel, *Chem. Biol.* **2007**, *14*, 13-22.
- [142] R. M. Kohli, J. W. Trauger, D. Schwarzer, M. A. Marahiel, C. T. Walsh, *Biochemistry* **2001**, *40*, 7099-7108.
- [143] D. Schwarzer, H. D. Mootz, M. A. Marahiel, *Chem. Biol.* **2001**, *8*, 997-1010.
- [144] F. Secundo, S. Fiala, M. W. Fraaije, G. de Gonzalo, M. Meli, F. Zambianchi, G. Ottolina, *Biotechnol. Bioeng.* **2011**, *108*, 491-499.
- [145] G. de Gonzalo, M. D. Mihovilovic, M. W. Fraaije, *ChemBioChem* **2010**, *11*, 2208-2231.
- [146] J. W. Trauger, R. M. Kohli, H. D. Mootz, M. A. Marahiel, C. T. Walsh, *Nature* **2000**, *407*, 215-218.
- [147] N. A. Donoghue, D. B. Norris, P. W. Trudgill, *Eur. J. Biochem.* **1976**, *63*, 175-192.
- [148] H. Leisch, R. Shi, S. Grosse, K. Morley, H. Bergeron, M. Cygler, H. Iwaki, Y. Hasegawa, P. C. Lau, *Appl. Environ. Microbiol.* **2012**, *78*, 2200-2212.
- [149] M. Gibson, M. Nur-e-alam, F. Lipata, M. A. Oliveire, J. Rohr, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 17594-17595.
- [150] H. Nakano, M. Wieser, B. Hurh, T. Kawai, T. Yoshida, T. Yamane, T. Nagasawa, *Eur. J. Biochem.* **1999**, *260*, 120-126.
- [151] F. Schulz, F. Leca, F. Hollmann, M. T. Reetz, *Beilstein J. Org. Chem.* **2005**, *1*, 10.
- [152] C. V. F. Baldwin, R. Wohlgemuth, J. M. Woodley, *Org. Process Res. Dev.* **2008**, *12*, 660-665.
- [153] M. P. Beam, M. A. Bosserman, N. Noinaj, M. Wehenkel, J. Rohr, *Biochemistry* **2009**, *48*, 4476-4487.
- [154] S. Huang, J. Tabudravu, S. S. Elsayed, J. Travert, D. Peace, M. H. Tong, K. Kyeremeh, S. M. Kelly, L. Trembleau, R. Ebel, M. Jaspars, Y. Yu, H. Deng, *Angew. Chem. Int. Edit.* **2015**, *54*, 12697-12701.
- [155] O. Schimming, V. L. Challinor, N. J. Tobias, H. Adihou, P. Grun, L. Poschel, C. Richter, H. Schwalbe, H. B. Bode, *Angew. Chem. Int. Edit.* **2015**, *54*, 12702-12705.
- [156] B. A. Pfeifer, S. J. Admiraal, H. Gramajo, D. E. Cane, C. Khosla, *Science* **2001**, *291*, 1790-1792.
- [157] Y. Liu, T. F. Zheng, S. D. Bruner, *Chem. Biol.* **2011**, *18*, 1482-1488.

Literaturverzeichnis

- [158] K. Zerbe, O. Pylypenko, F. Vitali, W. Zhang, S. Rousset, M. Heck, J. W. Vrijbloed, D. Bischoff, B. Bister, R. D. Sussmuth, S. Pelzer, W. Wohlleben, J. A. Robinson, I. Schlichting, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 47476-47485.
- [159] J. Liu, C. Luo, P. A. Smith, J. K. Chin, M. G. Page, M. Paetzel, F. E. Romesberg, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 17869-17877.
- [160] M. Nakamura, K. Saeki, Y. Takahashi, *J. Biochem.* **1999**, *126*, 10-18.
- [161] C. M. Jenkins, M. R. Waterman, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 27401-27408.
- [162] A. Luthra, I. G. Denisov, S. G. Sligar, *Arch. Biochem. Biophys.* **2011**, *507*, 26-35.
- [163] K. Zerbe, K. Woithe, D. B. Li, F. Vitali, L. Bigler, J. A. Robinson, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2004**, *43*, 6709-6713.
- [164] K. Haslinger, E. Maximowitsch, C. Brieke, A. Koch, M. J. Cryle, *ChemBioChem.* **2014**, *15*, 2719-2728.
- [165] M. Peschke, K. Haslinger, C. Brieke, J. Reinstein, M. J. Cryle, *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 6746-6753.
- [166] C. Brieke, V. Kratzig, K. Haslinger, A. Winkler, M. J. Cryle, *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 2012-2021.
- [167] P. C. Schmartz, K. Wolfel, K. Zerbe, E. Gad, S. El Tamany el, H. K. Ibrahim, K. Abou-Hadeed, J. A. Robinson, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2012**, *51*, 11468-11472.
- [168] H. Uhlmann, V. Beckert, D. Schwarz, R. Bernhardt, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **1992**, *188*, 1131-1138.
- [169] Y. Sagara, A. Wada, Y. Takata, M. R. Waterman, K. Sekimizu, T. Horiuchi, *Biol. Pharm. Bull.* **1993**, *16*, 627-630.
- [170] J. A. Peterson, M. C. Lorence, B. Amarneh, *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 6066-6073.
- [171] S. G. Bell, A. B. H. Tan, E. O. D. Johnson, L. L. Wong, *Mol. Biosyst.* **2010**, *6*, 206-214.
- [172] M. Mogharabi, M. A. Faramarzi, *Adv. Synth. Catal.* **2014**, *356*, 897-927.
- [173] A. Mikolasch, M. Wurster, M. Lalk, S. Witt, S. Seefeldt, E. Hammer, F. Schauer, W. D. Julich, U. Lindequist, *Chem. Pharm. Bull.* **2008**, *56*, 902-907.
- [174] M. A. Constantin, J. Conrad, U. Beifuss, *Green Chemistry* **2012**, *14*, 2375-2379.
- [175] M. A. Constantin, J. Conrad, E. Merisor, K. Koschorreck, V. B. Urlacher, U. Beifuss, *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 4528-4543.
- [176] T. Wezeman, S. Brase, K. S. Masters, *Nat. Prod. Rep.* **2015**, *32*, 6-28.
- [177] M. Hosny, J. P. Rosazza, *J. Agric. Food. Chem.* **2002**, *50*, 5539-5545.
- [178] T. Shiba, L. Xiao, T. Miyakoshi, C. L. Chen, *J. Mol. Catal. B-Enzym* **2000**, *10*, 605-615.
- [179] O. V. Morozova, G. P. Shumakovich, S. V. Shleev, Y. I. Yaropolov, *Appl. Biochem. Micro.* **2007**, *43*, 523-535.

Literaturverzeichnis

- [180] A. C. Sousa, M. C. Oliveira, L. O. Martins, M. P. Robalo, *Green Chemistry* **2014**, *16*, 4127-4136.
- [181] T. Hoff, S. Y. Liu, J. M. Bollag, *Appl. Environ. Microb.* **1985**, *49*, 1040-1045.
- [182] M. Geißler, Biokatalytische Synthese von Biarylbausteinen, *Masterarbeit*, T. U. München, **2016**.
- [183] J. Antosch, F. Schaefer, T. A. M. Gulder, *Angew. Chem. Int. Edit.* **2014**, *53*, 3011-3014.
- [184] B. Gust, G. L. Challis, K. Fowler, T. Kieser, K. F. Chater, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **2003**, *100*, 1541-1546.
- [185] A. Muliandi, Y. Katsuyama, K. Sone, M. Izumikawa, T. Moriya, J. Hashimoto, I. Kozone, M. Takagi, K. Shin-ya, Y. Ohnishi, *Chem. Biol.* **2014**, *21*, 923-934.
- [186] B. A. Pfeifer, C. C. C. Wang, C. T. Walsh, C. Khosla, *Appl. Environ. Microbiol.* **2003**, *69*, 6698-6702.
- [187] M. Tanaka, X. Li, H. Hikawa, T. Suzuki, K. Tsutsumi, M. Sato, O. Takikawa, H. Suzuki, Y. Yokoyama, *Bioorgan. Med. Chem.* **2013**, *21*, 1159-1165.
- [188] G. Blaser, J. M. Sanderson, A. S. Batsanov, J. A. K. Howard, *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 2795-2798.
- [189] P. Garcia-Reynaga, A. K. Carrillo, M. S. VanNieuwenhze, *Org. Lett.* **2012**, *14*, 1030-1033.
- [190] J. M. Jez, J. L. Ferrer, M. E. Bowman, R. A. Dixon, J. P. Noel, *Biochemistry* **2000**, *39*, 890-902.
- [191] D. Hanahan, *J. Mol. Biol.* **1983**, *166*, 557-580.
- [192] W. A. Herrmann, A. Salzer, *Synthetic Methods of Organometallic and Inorganic Chemistry: Literature, laboratory techniques, and common starting materials*, Georg Thieme Verlag, **1996**.
- [193] D. B. Williams, M. Lawton, *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 8351-8354.
- [194] C. W. Phoon, B. Somanadhan, S. C. H. Heng, A. Ngo, S. B. Ng, M. S. Butler, A. D. Buss, M. M. Sim, *Tetrahedron* **2004**, *60*, 11619-11628.
- [195] M. Cortes-Clerget, O. Gager, M. Monteil, J. L. Pirat, E. Migianu-Griffoni, J. Deschamp, M. Lecouvey, *Adv. Synth. Catal.* **2016**, *358*, 34-40.
- [196] M. Kojima, K. Mikami, *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 13950-13953.
- [197] J. M. S. G. Blaser, A.S. Batsanov, J.A.K. Howard, *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 2795-2798.
- [198] D. R. Smith, T. Willemse, D. S. Gkotsi, W. Schepens, B. U. Maes, S. Ballet, R. J. Goss, *Org. Lett.* **2014**, *16*, 2622-2625.

6 Abkürzungsverzeichnis

A-Domäne:	Adenylierungsdomäne
ACN:	Acetonitril
AMP:	Adenosinmonophosphat
AT:	Acetyltransferase
ATP:	Adenosintriphosphat
ADP:	Adenosindiphosphat
Äq.:	Äquivalente
BCP:	Biarylpeptide (engl. <u>B</u> iaryl <u>C</u> ontaining <u>P</u> eptides)
Bn:	Benzyl
Boc:	<i>tert</i> -Butoxycarbonyl
Boc ₂ O:	Di- <i>tert</i> -butyldicarbonat
bp:	Basenpaar
br:	broad
BVMO:	<i>Baeyer-Villiger</i> -Monooxygenase
bzw:	beziehungsweise
c:	Konzentration (engl. <u>C</u> oncentration)
CDI:	1,1'-Carbodiimidazol
C-Domäne:	Kondensationsdomäne
CHMO:	Cyclohexanon-Monooxygenase
CoA:	Coenzym A
CYP450:	Cytochrom P450
d:	dublett

Abkürzungsverzeichnis

DCC:	<i>N-N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimid
DCM:	Dichlormethan
DEE:	Diethylether
dest.:	destilliert
DIAD:	Azodicarbonsäurediisopropylester (engl. Diisopropyl AzoDicarboxylate)
DIPA:	Diisopropylamin
DIPEA:	Diisopropylethylamin
DMAP:	4-Dimethylaminopyridin
DMF:	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO:	Dimethylsulfoxid
DNA:	Desoxyribonukleinsäure (engl. <u>D</u> eoxyribo <u>N</u> ucleic <u>A</u> cid)
EDC-HCl:	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid-Hydrochlorid
E-Domäne:	Epimierungsdomäne
ER:	Enoylreductase
ESI:	Elektronensprayionisierung (engl. <u>E</u> lectron <u>S</u> pray <u>I</u> onisation)
Et ₂ O:	Diethylether
Et ₃ N:	Triethylamin
EtOAc:	Ethylacetat
EtOH:	Ethanol
Fa.:	Firma
FAS:	Fettsäure-Biosynthese
FAD:	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FPLC:	Fast Protein Liquid Chromatography
GT:	Glycosyltransferase
GYM:	Glucose, Yeast, Malt-Medium

Abkürzungsverzeichnis

h:	Stunde
HATU:	<i>O</i> -(7-Azabenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium-hexafluorophosphat
HIV:	Humanes Immundefizienz Virus
HPLC:	Hochleistungsflüssigkeitchromatographie (engl. <u>H</u> igh <u>P</u> erformance <u>L</u> iquid <u>C</u> hromatography)
HOAT:	1-Hydroxy-7-azabenzotriazol
HOBT:	1-Hydroxybenzotriazol
Hz:	Hertz
HR:	Hochauflösend (engl. <u>H</u> igh <u>R</u> esolution)
HRP:	Meerrettichperoxidase (HRP, engl. <u>H</u> orse <u>R</u> adish <u>P</u> eroxidase)
<i>i</i> -Prop:	<i>iso</i> -Propanol
Isc:	Eisen-Schwefel-Cluster (engl. <u>I</u> ron- <u>S</u> ulfur- <u>C</u> luster)
KHMDS:	Kaliumhexamethyldisilazan
KPP:	Kaliumphosphatpuffer
KR:	Ketoreduktase
KS:	Ketosynthase
LC:	Flüssigkeitschromatographie
LM:	Lösemittel
M:	Molar
m:	Multipllett
MSC:	Multiple Klonierungsstelle (engl. <u>M</u> ultiple <u>C</u> loning <u>S</u> ite)
MeOH:	Methanol
min:	Minuten
MO:	Monooxygenase

Abkürzungsverzeichnis

MPLC:	Mitteldrucksäulenchromatographie (engl. <u>M</u> edium <u>P</u> ressure <u>L</u> iquid <u>C</u> hromatography)
MS-Agar:	Mannitol, Soja(engl. <u>M</u> annit, <u>S</u> oy)
Ms:	Mesyl
MS:	Massenspektrometrie
MT:	Methyltransferase
LDA:	Lithiumdiisopropylamid
Lsg.:	Lösung
M-Domäne:	Methylierungsdomäne
MS:	Massenspektrometrie
MWCO:	Molekulargewichtsausschlussgrößen (engl. <u>M</u> olecular <u>W</u> eight <u>C</u> ut- <u>O</u> ff)
m/z:	Masse/Ladung
NAD(P)H:	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid(-Phosphat)
NAPP:	Natriumphosphatpuffer
N-HIS:	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
Ni-NTA:	Nickel-Nitrilotriessigsäure
NMM:	<i>N</i> -Methylmorpholin
NMR:	Kernresonanzspektroskopie (engl. <u>N</u> uclear <u>M</u> agnetic <u>R</u> esonance spectroscopy)
NRPS:	Nicht-ribosomale Peptidsynthase
ORF:	Offener Leserahmen (engl. <u>O</u> pen <u>R</u> eadin <u>G</u> <u>F</u> rame)
PA:	Pyrrolizidin Alkaloide
PAMO:	Phenylaceton-Monooxygenase
PCP:	Peptidyl-Carrier-Protein
PFP:	Pentafluorophenol
PKS:	Polyketidsynthase

Abkürzungsverzeichnis

PLE:	Schweineleberesterase (engl. <u>P</u> ig <u>L</u> iver <u>E</u> sterase)
Ppant:	Phosphopantetheinyl
PPTase:	Phosphopantetheinyl-Transferase
PPTS:	Pyridinium- <i>p</i> -toluolsulfonat
ppm:	parts per million
PyBop:	Benzotriazol-1-yloxytripyrrolidinophosphonium Hexafluorophosphat
q:	Quartett
RT:	Raumtemperatur
R _f :	Retentionsfaktor
s:	Singulett
SDS:	Natriumdodecylsulfat Polyacrylamidgelelektrophorese (engl.: <u>S</u> odium <u>D</u> odecyl <u>S</u> ulfate polyacrylamid gel electrophoresis)
SNAc:	<i>N</i> -Acetylcysteamin
t:	Triplett
TE:	Thioesterase
TESCl:	Triethylsilanchlorid
TFA:	Trifluoressigsäure (engl. <u>T</u> ri <u>F</u> luor <u>A</u> cetic acid)
THF:	Tetrahydrofuran
TMSCl:	Trimethylsilanchlorid
TMSOTf:	Trimethylsylantriflat
TsOH:	Toluolsulfonsäure
t _R :	Retentionszeit
ü.N:	über Nacht
vgl:	Vergleich
z.B.:	zum Beispiel

7 Anhang

7.1 Vektorkarten

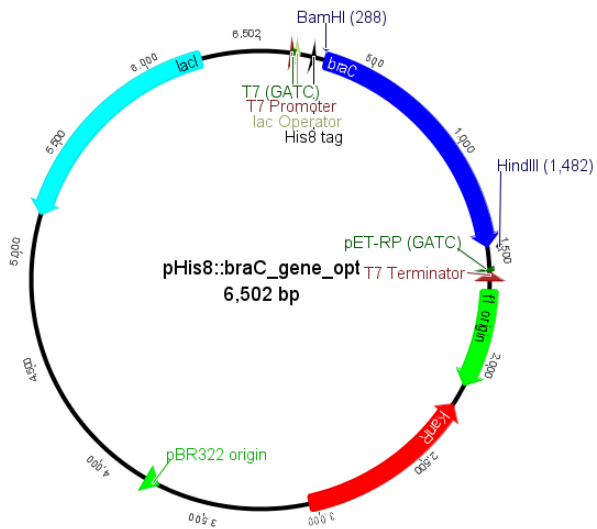


Abbildung I. Vektorkarte von pHis8::braC_gene_opt.

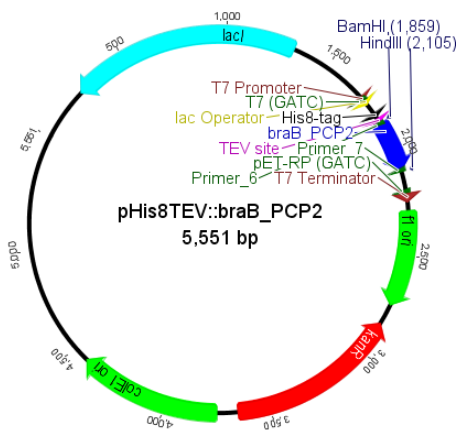


Abbildung II. Vektorkarte von pHis8TEV::braB_PCP2.

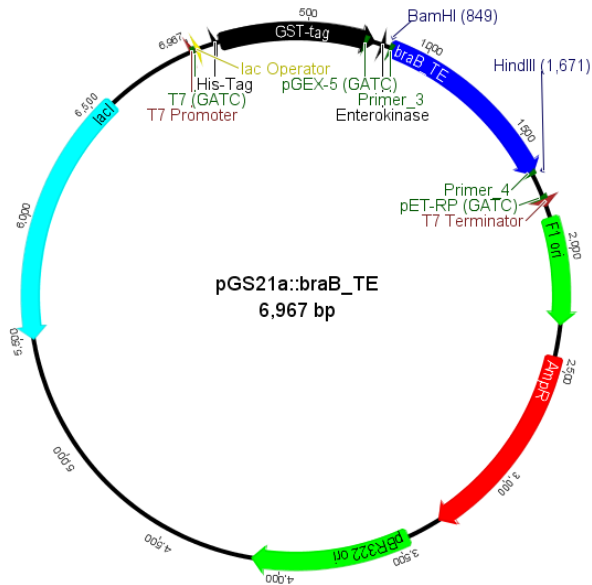


Abbildung III. Vektorkarte von pGS21a::braB_TE.

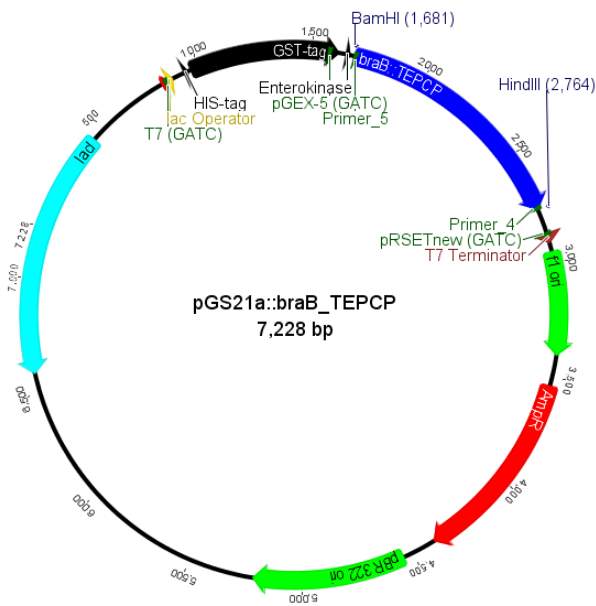


Abbildung IV. Vektorkarte von pGS21a::braB_TEPCP.

Anhang

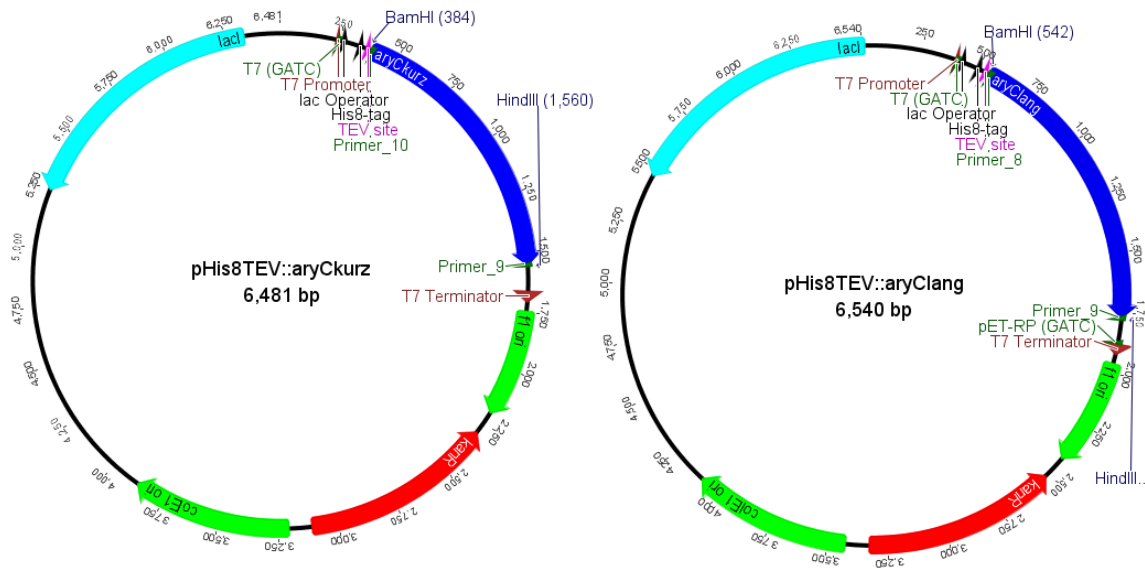


Abbildung V. Vektorkarte von pHis8TEV::aryCkurz (links) und pHis8TEV::aryClang (rechts).

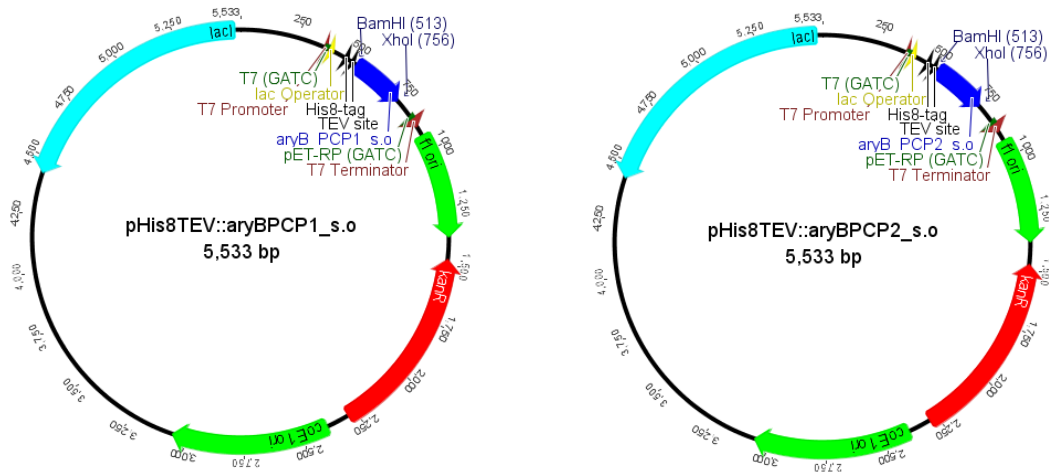


Abbildung VI. Vektorkarte von pHis8TEV::aryB_PCP1 (links) und pHis8TEV::aryB_PCP2 (rechts).

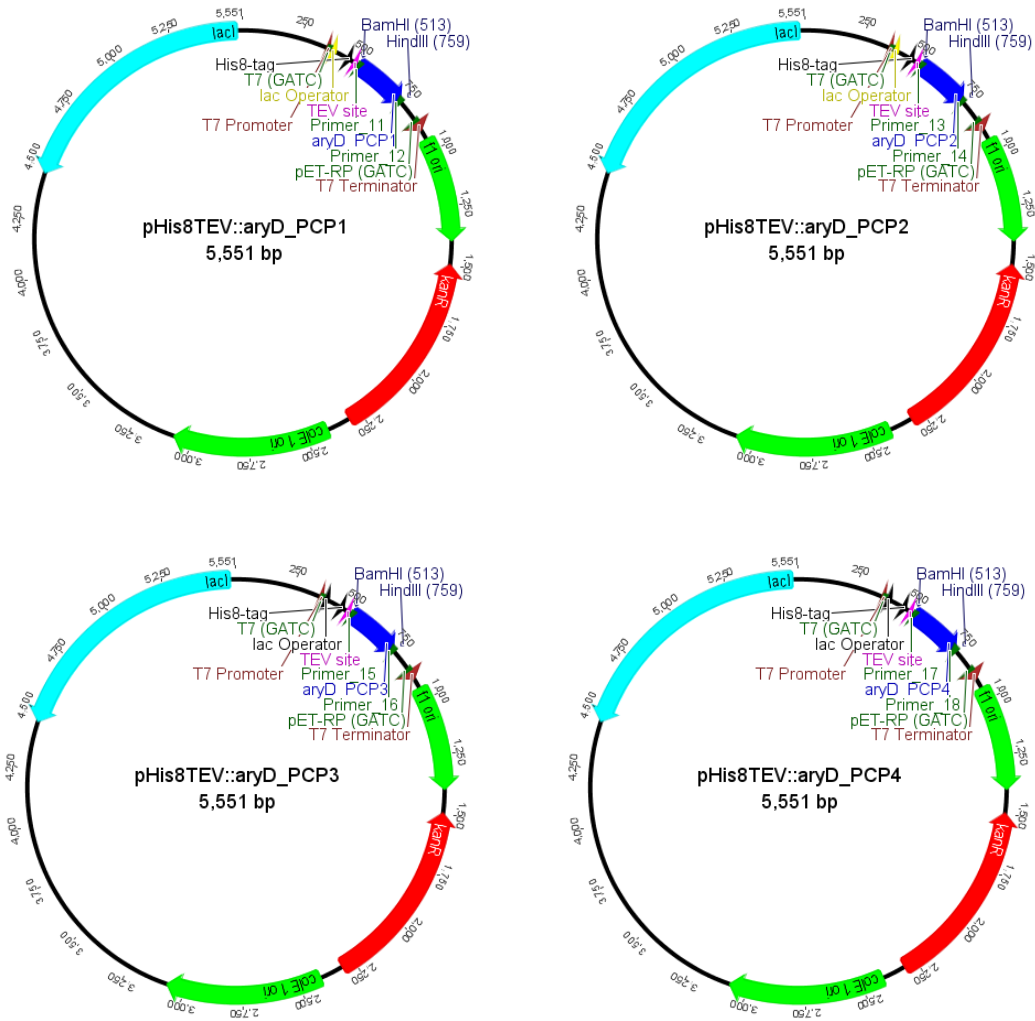


Abbildung VII. Vektorkarte von pHis8TEV::aryD_PCP1 (oben links), pHis8TEV::aryD_PCP2 (oben rechts), pHis8TEV::aryD_PCP3 (unten links) und pHis8TEV::aryD_PCP4 (unten rechts).

7.2 Sequenzierungen

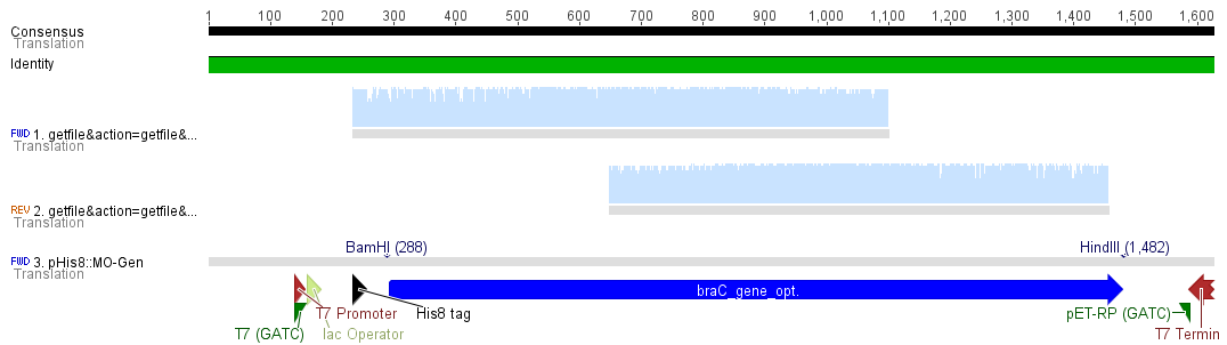


Abbildung IX. Sequenzierung von pHis8::BraC mit den Primer T7 (Primer_37) und pET-RP (Primer_39).

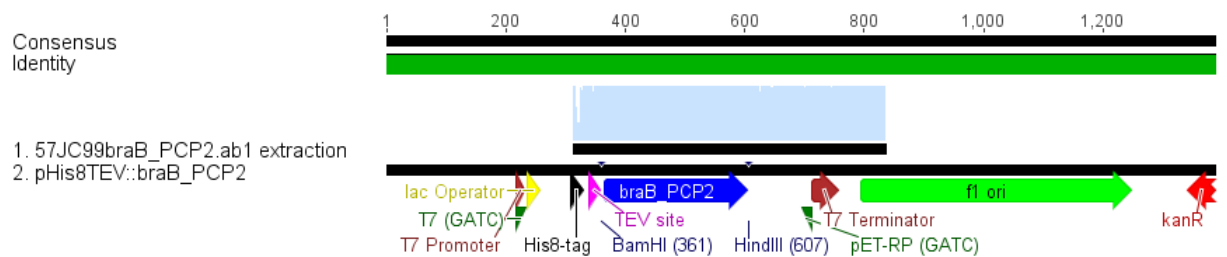


Abbildung X. Sequenzierung von pHis8EV::braB_PCP2 mit dem Primer T7 (Primer_37).

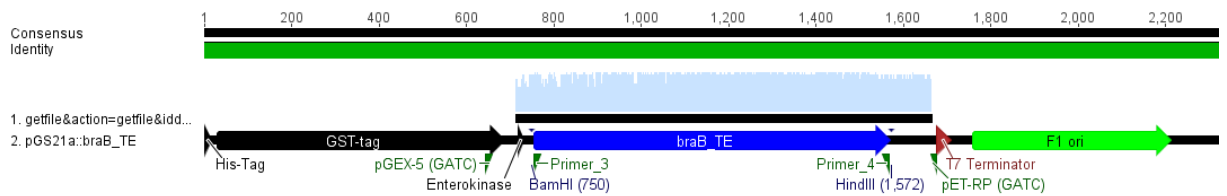


Abbildung XI. Sequenzierung von pGS21a::braB_TE mit dem Primer pGEX-5 (Primer_38).

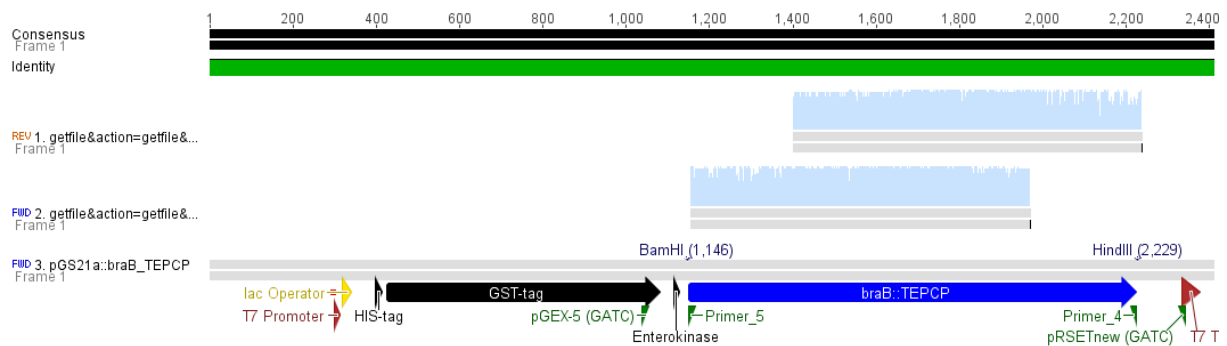


Abbildung XII. Sequenzierung von pGS21a::braB_TPCP mit dem Primer pGEX-5 (Primer_38) und Primer pRSETnew (Primer_40).

Anhang

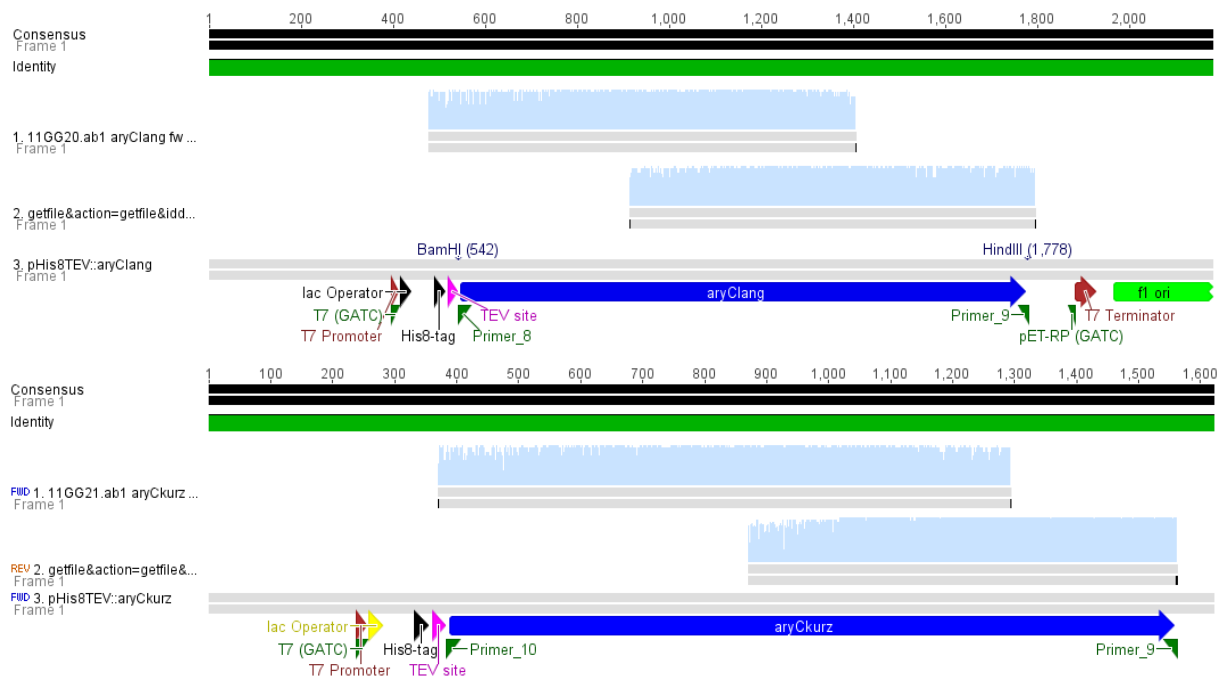


Abbildung XIII. Sequenzierung von pHis8TEV::aryClang (oben) und pHis8TEV::aryCkurz (unten) mit dem Primer T7 (Primer_37) und pET-RP (Primer_39).

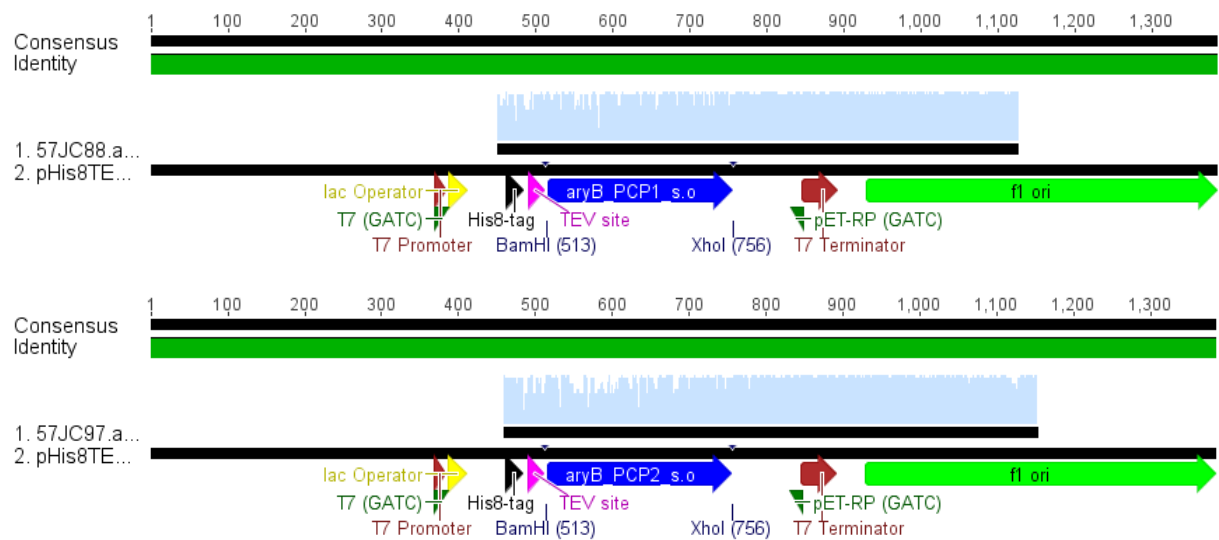


Abbildung XIV. Sequenzierung von pHis8TEV::aryB_PCP1 und pHis8TEV::aryB_PCP2 mit dem Primer T7 (Primer_37).

Anhang

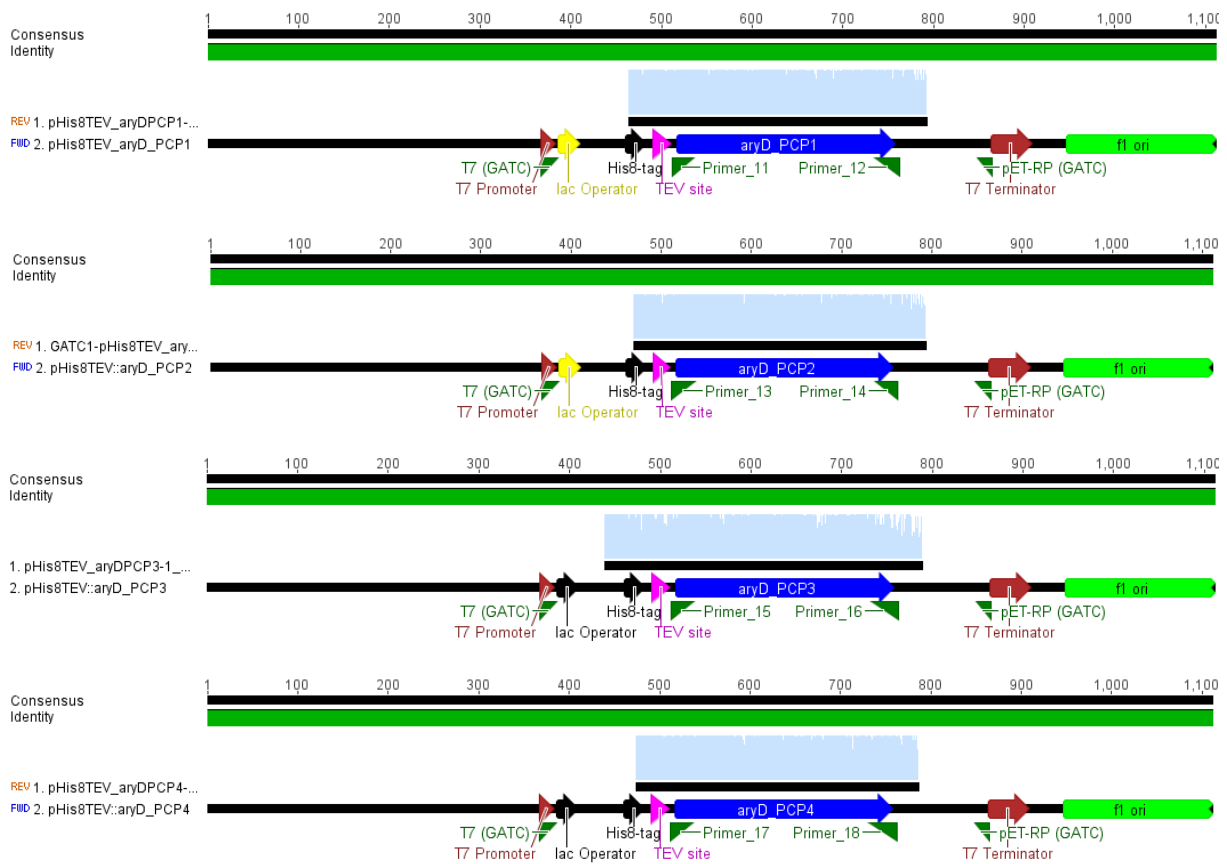


Abbildung XV. Sequenzierung von pHis8TEV::aryD_PCP1, pHis8TEV::aryD_PCP2, pHis8TEV::aryD_PCP3 und pHis8TEV::aryD_PCP4 mit dem Primer pET-RP (Primer_39).

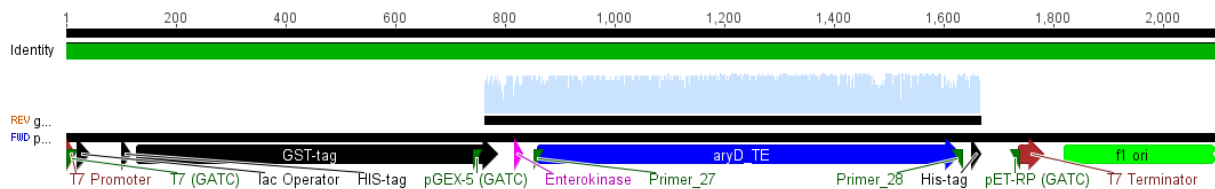


Abbildung XVI. Sequenzierung von pGS21a::aryD_TE mit dem Primer pET-RP (Primer_39).

7.3 Zusammensetzungen der Kristallisationsplatten

The pHClear Suite Composition Table

Number	Buffer	Salt	pH	Cat. no. (Refill-Hit Solution, 4 x 12.5 ml tubes)
1	0.1 M Citric acid	1.0 M Sodium chloride	4.0	134801
2	0.1 M Citric acid	1.0 M Sodium chloride	5.0	134802
3	0.1 M MES	1.0 M Sodium chloride	6.0	134803
4	0.1 M HEPES	1.0 M Sodium chloride	7.0	134804
5	0.1 M Tris	1.0 M Sodium chloride	8.0	134805
6	0.1 M Bicine	1.0 M Sodium chloride	9.0	134806
7	0.1 M Citric acid	2.0 M Sodium chloride	4.0	134807
8	0.1 M Citric acid	2.0 M Sodium chloride	5.0	134808
9	0.1 M MES	2.0 M Sodium chloride	6.0	134809
10	0.1 M HEPES	2.0 M Sodium chloride	7.0	134810
11	0.1 M Tris	2.0 M Sodium chloride	8.0	134811
12	0.1 M Bicine	2.0 M Sodium chloride	9.0	134812
13	0.1 M Citric acid	3.0 M Sodium chloride	4.0	134813
14	0.1 M Citric acid	3.0 M Sodium chloride	5.0	134814
15	0.1 M MES	3.0 M Sodium chloride	6.0	134815
16	0.1 M HEPES	3.0 M Sodium chloride	7.0	134816
17	0.1 M Tris	3.0 M Sodium chloride	8.0	134817
18	0.1 M Bicine	3.0 M Sodium chloride	9.0	134818
19	0.1 M Citric acid	4.0 M Sodium chloride	4.0	134819
20	0.1 M Citric acid	4.0 M Sodium chloride	5.0	134820
21	0.1 M MES	4.0 M Sodium chloride	6.0	134821
22	0.1 M HEPES	4.0 M Sodium chloride	7.0	134822
23	0.1 M Tris	4.0 M Sodium chloride	8.0	134823
24	0.1 M Bicine	4.0 M Sodium chloride	9.0	134824
25	0.1 M Citric acid	5% (w/v) PEG 6000	4.0	134825
26	0.1 M Citric acid	5% (w/v) PEG 6000	5.0	134826
27	0.1 M MES	5% (w/v) PEG 6000	6.0	134827
28	0.1 M HEPES	5% (w/v) PEG 6000	7.0	134828
29	0.1 M Tris	5% (w/v) PEG 6000	8.0	134829
30	0.1 M Bicine	5% (w/v) PEG 6000	9.0	134830
31	0.1 M Citric acid	10% (w/v) PEG 6000	4.0	134831
32	0.1 M Citric acid	10% (w/v) PEG 6000	5.0	134832
33	0.1 M MES	10% (w/v) PEG 6000	6.0	134833
34	0.1 M HEPES	10% (w/v) PEG 6000	7.0	134834
35	0.1 M Tris	10% (w/v) PEG 6000	8.0	134835
36	0.1 M Bicine	10% (w/v) PEG 6000	9.0	134836
37	0.1 M Citric acid	20% (w/v) PEG 6000	4.0	134837
38	0.1 M Citric acid	20% (w/v) PEG 6000	5.0	134838
39	0.1 M MES	20% (w/v) PEG 6000	6.0	134839
40	0.1 M HEPES	20% (w/v) PEG 6000	7.0	134840
41	0.1 M Tris	20% (w/v) PEG 6000	8.0	134841
42	0.1 M Bicine	20% (w/v) PEG 6000	9.0	134842
43	0.1 M Citric acid	30% (w/v) PEG 6000	4.0	134843
44	0.1 M Citric acid	30% (w/v) PEG 6000	5.0	134844
45	0.1 M MES	30% (w/v) PEG 6000	6.0	134845
46	0.1 M HEPES	30% (w/v) PEG 6000	7.0	134846
47	0.1 M Tris	30% (w/v) PEG 6000	8.0	134847
48	0.1 M Bicine	30% (w/v) PEG 6000	9.0	134848

Abbildung XVII. Zusammensetzung der Kristallisationsplatte pHClear Suite; Qiagen.

Anhang

The pHClear Suite Composition Table

Number	Buffer	Salt	pH	Cat. no. (Refill-Hit Solution, 4 x 12.5 ml tubes)
49	0.1 M Citric acid	0.8 M Ammonium sulfate	4.0	134849
50	0.1 M Citric acid	0.8 M Ammonium sulfate	5.0	134850
51	0.1 M MES	0.8 M Ammonium sulfate	6.0	134851
52	0.1 M HEPES	0.8 M Ammonium sulfate	7.0	134852
53	0.1 M Tris	0.8 M Ammonium sulfate	8.0	134853
54	0.1 M Bicine	0.8 M Ammonium sulfate	9.0	134854
55	0.1 M Citric acid	1.6 M Ammonium sulfate	4.0	134855
56	0.1 M Citric acid	1.6 M Ammonium sulfate	5.0	134856
57	0.1 M MES	1.6 M Ammonium sulfate	6.0	134857
58	0.1 M HEPES	1.6 M Ammonium sulfate	7.0	134858
59	0.1 M Tris	1.6 M Ammonium sulfate	8.0	134859
60	0.1 M Bicine	1.6 M Ammonium sulfate	9.0	134860
61	0.1 M Citric acid	2.4 M Ammonium sulfate	4.0	134861
62	0.1 M Citric acid	2.4 M Ammonium sulfate	5.0	134862
63	0.1 M MES	2.4 M Ammonium sulfate	6.0	134863
64	0.1 M HEPES	2.4 M Ammonium sulfate	7.0	134864
65	0.1 M Tris	2.4 M Ammonium sulfate	8.0	134865
66	0.1 M Bicine	2.4 M Ammonium sulfate	9.0	134866
67	0.1 M Citric acid	3.2 M Ammonium sulfate	4.0	134867
68	0.1 M Citric acid	3.2 M Ammonium sulfate	5.0	134868
69	0.1 M MES	3.2 M Ammonium sulfate	6.0	134869
70	0.1 M HEPES	3.2 M Ammonium sulfate	7.0	134870
71	0.1 M Tris	3.2 M Ammonium sulfate	8.0	134871
72	0.1 M Bicine	3.2 M Ammonium sulfate	9.0	134872
73	0.1 M Citric acid	10% (v/v) MPD	4.0	134873
74	0.1 M Sodium acetate	10% (v/v) MPD	5.0	134874
75	0.1 M MES	10% (v/v) MPD	6.0	134875
76	0.1 M HEPES	10% (v/v) MPD	7.0	134876
77	0.1 M Tris	10% (v/v) MPD	8.0	134877
78	0.1 M Bicine	10% (v/v) MPD	9.0	134878
79	0.1 M Citric acid	20% (v/v) MPD	4.0	134879
80	0.1 M Sodium acetate	20% (v/v) MPD	5.0	134880
81	0.1 M MES	20% (v/v) MPD	6.0	134881
82	0.1 M HEPES	20% (v/v) MPD	7.0	134882
83	0.1 M Tris	20% (v/v) MPD	8.0	134883
84	0.1 M Bicine	20% (v/v) MPD	9.0	134884
85	0.1 M Citric acid	40% (v/v) MPD	4.0	134885
86	0.1 M Sodium acetate	40% (v/v) MPD	5.0	134886
87	0.1 M MES	40% (v/v) MPD	6.0	134887
88	0.1 M HEPES	40% (v/v) MPD	7.0	134888
89	0.1 M Tris	40% (v/v) MPD	8.0	134889
90	0.1 M Bicine	40% (v/v) MPD	9.0	134890
91	0.1 M Citric acid	65% (v/v) MPD	4.0	134891
92	0.1 M Sodium acetate	65% (v/v) MPD	5.0	134892
93	0.1 M MES	65% (v/v) MPD	6.0	134893
94	0.1 M HEPES	65% (v/v) MPD	7.0	134894
95	0.1 M Tris	65% (v/v) MPD	8.0	134895
96	0.1 M Bicine	65% (v/v) MPD	9.0	134896

Abbildung XVIII-Fortsetzung. Zusammensetzung der Kristallisationsplatte pHClear Suite; *Quiagen*.

Anhang

The Classics II Suite Composition Table

Number	Salt	Buffer	Precipitant	Cat. no. (Refill-Hit Solution, 4 x 12.5 ml tubes)
1		0.1 M Citric acid pH 3.5	2 M Ammonium sulfate	136101
2		0.1 M Sodium acetate pH 4.5	2 M Ammonium sulfate	136102
3		0.1 M Bis-Tris pH 5.5	2 M Ammonium sulfate	136103
4		0.1 M Bis-Tris pH 6.5	2 M Ammonium sulfate	136104
5		0.1 M HEPES pH 7.5	2 M Ammonium sulfate	136105
6		0.1 M Tris pH 8.5	2 M Ammonium sulfate	136106
7		0.1 M Citric acid pH 3.5	3 M Sodium chloride	136107
8		0.1 M Sodium acetate pH 4.5	3 M Sodium chloride	136108
9		0.1 M Bis-Tris pH 5.5	3 M Sodium chloride	136109
10		0.1 M Bis-Tris pH 6.5	3 M Sodium chloride	136110
11		0.1 M HEPES pH 7.5	3 M Sodium chloride	136111
12		0.1 M Tris pH 8.5	3 M Sodium chloride	136112
13	0.3 M Magnesium formate	0.1 M Bis-Tris pH 5.5		136113
14	0.5 M Magnesium formate	0.1 M Bis-Tris pH 6.5		136114
15	0.5 M Magnesium formate	0.1 M HEPES pH 7.5		136115
16	0.3 M Magnesium formate	0.1 M Tris pH 8.5		136116
17	1.26 M Sodium phosphate; 0.14 M Potassium phosphate			136117
18	0.49 M Sodium phosphate; 0.91 M Potassium phosphate			136118
19	0.056 M Sodium phosphate; 1.344 M Potassium phosphate			136119
20		0.1 M HEPES pH 7.5	1.4 M Sodium citrate	136120
21		1.8 M Ammonium citrate pH 7.0		136121
22		0.8 M Succinic acid pH 7.0		136122
23		2.1 M DL-Malic acid pH 7.0		136123
24		2.8 M Sodium acetate pH 7.0		136124
25		3.5 M Sodium formate pH 7.0		136125
26		1.1 M Ammonium tartrate pH 7.0		136126
27		2.4 M Sodium malonate pH 7.0		136127
28		0.56 M Sodium citrate pH 7.0		136128
29		0.96 M Sodium citrate pH 7.0		136129
30	0.1 M Sodium chloride	0.1 M Bis-Tris pH 6.5	1.5 M Ammonium sulfate	136130
31	0.8 M Sodium/Potassium tartrate	0.1 M Tris pH 8.5	0.5% (w/v) PEG 5000 MME	136131
32	1 M Ammonium sulfate	0.1 M Bis-Tris pH 5.5	1% (w/v) PEG 3350	136132
33	1.1 M Sodium malonate	0.1 M HEPES pH 7.0	0.5% (v/v) Jeffamine ED-2001	136133
34	1 M Succinic acid	0.1 M HEPES pH 7.0	1% (w/v) PEG 2000 MME	136134
35	1 M Ammonium sulfate	0.1 M HEPES pH 7.0	0.5% (w/v) PEG 8000	136135
36	0.191 M Sodium citrate pH 7.0	0.1 M HEPES pH 7.0	2% (w/v) PEG 3350	136136
37			25% (w/v) PEG 1500	136137
38		0.1 M HEPES pH 7.0	30% (v/v) Jeffamine M-600	136138
39		0.1 M HEPES pH 7.0	30% (v/v) Jeffamine ED-2001	136139
40		0.1 M Citric acid pH 3.5	25% (w/v) PEG 3350	136140
41		0.1 M Sodium acetate pH 4.5	25% (w/v) PEG 3350	136141
42		0.1 M Bis-Tris pH 5.5	25% (w/v) PEG 3350	136142
43		0.1 M Bis-Tris pH 6.5	25% (w/v) PEG 3350	136143
44		0.1 M HEPES pH 7.5	25% (w/v) PEG 3350	136144
45		0.1 M Tris pH 8.5	25% (w/v) PEG 3350	136145
46		0.1 M Bis-Tris pH 6.5	20% (w/v) PEG 5000 MME	136146
47		0.1 M Bis-Tris pH 6.5	28% (w/v) PEG 2000 MME	136147
48	0.2 M Calcium chloride	0.1 M Bis-Tris pH 5.5	45% (v/v) MPD	136148

Abbildung XIX. Zusammensetzung der Kristallisationsplatte Classics II Suite; *Quiagen*.

Anhang

The Classics II Suite Composition Table

Number	Salt	Buffer	Precipitant	Cat. no. (Refill-Hit Solution, 4 x 12.5 ml tubes)
49	0.2 M Calcium chloride	0.1 M Bis-Tris pH 6.5	45% (v/v) MPD	136149
50	0.2 M Ammonium acetate	0.1 M Bis-Tris pH 5.5	45% (v/v) MPD	136150
51	0.2 M Ammonium acetate	0.1 M Bis-Tris pH 6.5	45% (v/v) MPD	136151
52	0.2 M Ammonium acetate	0.1 M HEPES pH 7.5	45% (v/v) MPD	136152
53	0.2 M Ammonium acetate	0.1 M Tris pH 8.5	45% (v/v) MPD	136153
54	0.05 M Calcium chloride	0.1 M Bis-Tris pH 6.5	30% (v/v) PEG 550 MME	136154
55	0.05 M Magnesium chloride	0.1 M HEPES pH 7.5	30% (v/v) PEG 550 MME	136155
56	0.2 M Potassium chloride	0.05 M HEPES pH 7.5	35% (v/v) Pentaerythritol propoxylate	136156
57	0.05 M Ammonium sulfate	0.05 M Bis-Tris pH 6.5	30% (v/v) Pentaerythritol ethoxylate	136157
58		0.1 M Bis-Tris pH 6.5	45% (v/v) PEG P 400	136158
59	0.02 M Magnesium chloride	0.1 M HEPES pH 7.5	22% (w/v) Sodium Polyacrylate 5100	136159
60	0.01 M Cobalt (II) chloride	0.1 M Tris pH 8.5	20% (w/v) PVP K15	136160
61	0.2 M L-Proline	0.1 M HEPES pH 7.5	10% (w/v) PEG 3350	136161
62	0.2 M Trimethylamine N-oxide	0.1 M Tris pH 8.5	20% (w/v) PEG 2000 MME	136162
63	0.064 M Sodium citrate pH 7.0	0.1 M HEPES pH 7.0	10% (w/v) PEG 5000 MME	136163
64	0.005 M Magnesium chloride; 0.005 M Cobalt chloride; 0.005 M Nickel chloride; 0.005 M Cadmium chloride	0.1 M HEPES pH 7.5	12% (w/v) PEG 3350	136164
65	0.1 M Ammonium acetate	0.1 M Bis-Tris pH 5.5	17% (w/v) PEG 10000	136165
66	0.2 M Ammonium sulfate	0.1 M Bis-Tris pH 5.5	25% (w/v) PEG 3350	136166
67	0.2 M Ammonium sulfate	0.1 M Bis-Tris pH 6.5	25% (w/v) PEG 3350	136167
68	0.2 M Ammonium sulfate	0.1 M HEPES pH 7.5	25% (w/v) PEG 3350	136168
69	0.2 M Ammonium sulfate	0.1 M Tris pH 8.5	25% (w/v) PEG 3350	136169
70	0.2 M Sodium chloride	0.1 M Bis-Tris pH 5.5	25% (w/v) PEG 3350	136170
71	0.2 M Sodium chloride	0.1 M Bis-Tris pH 6.5	25% (w/v) PEG 3350	136171
72	0.2 M Sodium chloride	0.1 M HEPES pH 7.5	25% (w/v) PEG 3350	136172
73	0.2 M Sodium chloride	0.1 M Tris pH 8.5	25% (w/v) PEG 3350	136173
74	0.2 M Lithium sulfate	0.1 M Bis-Tris pH 5.5	25% (w/v) PEG 3350	136174
75	0.2 M Lithium sulfate	0.1 M Bis-Tris pH 6.5	25% (w/v) PEG 3350	136175
76	0.2 M Lithium sulfate	0.1 M HEPES pH 7.5	25% (w/v) PEG 3350	136176
77	0.2 M Lithium sulfate	0.1 M Tris pH 8.5	25% (w/v) PEG 3350	136177
78	0.2 M Ammonium acetate	0.1 M Bis-Tris pH 5.5	25% (w/v) PEG 3350	136178
79	0.2 M Ammonium acetate	0.1 M Bis-Tris pH 6.5	25% (w/v) PEG 3350	136179
80	0.2 M Ammonium acetate	0.1 M HEPES pH 7.5	25% (w/v) PEG 3350	136180
81	0.2 M Ammonium acetate	0.1 M Tris pH 8.5	25% (w/v) PEG 3350	136181
82	0.2 M Magnesium chloride	0.1 M Bis-Tris pH 5.5	25% (w/v) PEG 3350	136182
83	0.2 M Magnesium chloride	0.1 M Bis-Tris pH 6.5	25% (w/v) PEG 3350	136183
84	0.2 M Magnesium chloride	0.1 M HEPES pH 7.5	25% (w/v) PEG 3350	136184
85	0.2 M Magnesium chloride	0.1 M Tris pH 8.5	25% (w/v) PEG 3350	136185
86	0.2 M Potassium Sodium tartrate		20% (w/v) PEG 3350	136186
87		0.24 M Sodium malonate pH 7.0	20% (w/v) PEG 3350	136187
88		0.2 M Ammonium citrate pH 7.0	20% (w/v) PEG 3350	136188
89		0.1 M Succinic acid pH 7.0	15% (w/v) PEG 3350	136189
90	0.2 M Sodium formate		20% (w/v) PEG 3350	136190
91		0.15 M DL-Malic acid pH 7.0	20% (w/v) PEG 3350	136191
92	0.1 M Magnesium formate		15% (w/v) PEG 3350	136192
93	0.05 M Zinc acetate		20% (w/v) PEG 3350	136193
94	0.2 M Sodium citrate		20% (w/v) PEG 3350	136194
95	0.1 M Potassium thiocyanate		30% (w/v) PEG 2000 MME	136195
96	0.15 M Potassium bromide		30% (w/v) PEG 2000 MME	136196

Abbildung XX-Fortsetzung. Zusammensetzung der Kristallisationsplatte Classics II Suite; *Quiagen*.

Anhang

The PEGs Suite Composition Table

Number	Salt	Buffer	Precipitant	Cat. no. (Refill-Hit Solution, 4 x 12.5 ml tubes)
1		0.1 M Sodium acetate pH 4.6	40% (v/v) PEG 200	134301
2		0.1 M Sodium acetate pH 4.6	30% (v/v) PEG 300	134302
3		0.1 M Sodium acetate pH 4.6	30% (v/v) PEG 400	134303
4		0.1 M Sodium acetate pH 4.6	25% (v/v) PEG 550 MME	134304
5		0.1 M Sodium acetate pH 4.6	25% (w/v) PEG 1000	134305
6		0.1 M Sodium acetate pH 4.6	25% (w/v) PEG 2000 MME	134306
7		0.1 M MES pH 6.5	40% (v/v) PEG 200	134307
8		0.1 M MES pH 6.5	30% (v/v) PEG 300	134308
9		0.1 M MES pH 6.5	30% (v/v) PEG 400	134309
10		0.1 M MES pH 6.5	25% (v/v) PEG 550 MME	134310
11		0.1 M MES pH 6.5	25% (w/v) PEG 1000	134311
12		0.1 M MES pH 6.5	25% (w/v) PEG 2000 MME	134312
13		0.1 M Sodium HEPES pH 7.5	40% (v/v) PEG 200	134313
14		0.1 M Sodium HEPES pH 7.5	30% (v/v) PEG 300	134314
15		0.1 M Sodium HEPES pH 7.5	30% (v/v) PEG 400	134315
16		0.1 M Sodium HEPES pH 7.5	25% (v/v) PEG 550 MME	134316
17		0.1 M Sodium HEPES pH 7.5	25% (w/v) PEG 1000	134317
18		0.1 M Sodium HEPES pH 7.5	25% (w/v) PEG 2000 MME	134318
19		0.1 M TRIS-HCl pH 8.5	40% (v/v) PEG 200	134319
20		0.1 M TRIS-HCl pH 8.5	30% (v/v) PEG 300	134320
21		0.1 M TRIS-HCl pH 8.5	30% (v/v) PEG 400	134321
22		0.1 M TRIS-HCl pH 8.5	25% (v/v) PEG 550 MME	134322
23		0.1 M TRIS-HCl pH 8.5	25% (w/v) PEG 1000	134323
24		0.1 M TRIS-HCl pH 8.5	25% (w/v) PEG 2000 MME	134324
25		0.1 M Sodium acetate pH 4.6	25% (w/v) PEG 3000	134325
26		0.1 M Sodium acetate pH 4.6	25% (w/v) PEG 4000	134326
27		0.1 M Sodium acetate pH 4.6	25% (w/v) PEG 6000	134327
28		0.1 M Sodium acetate pH 4.6	25% (w/v) PEG 8000	134328
29		0.1 M Sodium acetate pH 4.6	20% (w/v) PEG 10000	134329
30		0.1 M Sodium acetate pH 4.6	15% (w/v) PEG 20000	134330
31		0.1 M MES pH 6.5	25% (w/v) PEG 3000	134331
32		0.1 M MES pH 6.5	25% (w/v) PEG 4000	134332
33		0.1 M MES pH 6.5	25% (w/v) PEG 6000	134333
34		0.1 M MES pH 6.5	25% (w/v) PEG 8000	134334
35		0.1 M MES pH 6.5	20% (w/v) PEG 10000	134335
36		0.1 M MES pH 6.5	15% (w/v) PEG 20000	134336
37		0.1 M Sodium HEPES pH 7.5	25% (w/v) PEG 3000	134337
38		0.1 M Sodium HEPES pH 7.5	25% (w/v) PEG 4000	134338
39		0.1 M Sodium HEPES pH 7.5	25% (w/v) PEG 6000	134339
40		0.1 M Sodium HEPES pH 7.5	25% (w/v) PEG 8000	134340
41		0.1 M Sodium HEPES pH 7.5	20% (w/v) PEG 10000	134341
42		0.1 M Sodium HEPES pH 7.5	15% (w/v) PEG 20000	134342
43		0.1 M TRIS-HCl pH 8.5	25% (w/v) PEG 3000	134343
44		0.1 M TRIS-HCl pH 8.5	25% (w/v) PEG 4000	134344
45		0.1 M TRIS-HCl pH 8.5	25% (w/v) PEG 6000	134345
46		0.1 M TRIS-HCl pH 8.5	25% (w/v) PEG 8000	134346
47		0.1 M TRIS-HCl pH 8.5	20% (w/v) PEG 10000	134347
48		0.1 M TRIS-HCl pH 8.5	15% (w/v) PEG 20000	134348

Abbildung XXI. Zusammensetzung der Kristallisationsplatte PEGs Suite, *Qiagen*.

Anhang

The PEGs Suite Composition Table

Number	Salt	Buffer	Precipitant	Cat. no. (Refill-Hit Solution, 4 x 12.5 ml tubes)
49	0.2 M Sodium fluoride		20% (w/v) PEG 3350	134349
50	0.2 M Potassium fluoride		20% (w/v) PEG 3350	134350
51	0.2 M Ammonium fluoride		20% (w/v) PEG 3350	134351
52	0.2 M Lithium chloride		20% (w/v) PEG 3350	134352
53	0.2 M Magnesium chloride		20% (w/v) PEG 3350	134353
54	0.2 M Sodium chloride		20% (w/v) PEG 3350	134354
55	0.2 M Calcium chloride		20% (w/v) PEG 3350	134355
56	0.2 M Potassium chloride		20% (w/v) PEG 3350	134356
57	0.2 M Ammonium chloride		20% (w/v) PEG 3350	134357
58	0.2 M Sodium iodide		20% (w/v) PEG 3350	134358
59	0.2 M Potassium iodide		20% (w/v) PEG 3350	134359
60	0.2 M Ammonium iodide		20% (w/v) PEG 3350	134360
61	0.2 M Sodium thiocyanate		20% (w/v) PEG 3350	134361
62	0.2 M Potassium thiocyanate		20% (w/v) PEG 3350	134362
63	0.2 M Lithium nitrate		20% (w/v) PEG 3350	134363
64	0.2 M Magnesium nitrate		20% (w/v) PEG 3350	134364
65	0.2 M Sodium nitrate		20% (w/v) PEG 3350	134365
66	0.2 M Potassium nitrate		20% (w/v) PEG 3350	134366
67	0.2 M Ammonium nitrate		20% (w/v) PEG 3350	134367
68	0.2 M Magnesium formate		20% (w/v) PEG 3350	134368
69	0.2 M Sodium formate		20% (w/v) PEG 3350	134369
70	0.2 M Potassium formate		20% (w/v) PEG 3350	134370
71	0.2 M Ammonium formate		20% (w/v) PEG 3350	134371
72	0.2 M Lithium acetate		20% (w/v) PEG 3350	134372
73	0.2 M Magnesium acetate		20% (w/v) PEG 3350	134373
74	0.2 M Zinc acetate		20% (w/v) PEG 3350	134374
75	0.2 M Sodium acetate		20% (w/v) PEG 3350	134375
76	0.2 M Calcium acetate		20% (w/v) PEG 3350	134376
77	0.2 M Potassium acetate		20% (w/v) PEG 3350	134377
78	0.2 M Ammonium acetate		20% (w/v) PEG 3350	134378
79	0.2 M Lithium sulfate		20% (w/v) PEG 3350	134379
80	0.2 M Magnesium sulfate		20% (w/v) PEG 3350	134380
81	0.2 M Sodium sulfate		20% (w/v) PEG 3350	134381
82	0.2 M Potassium sulfate		20% (w/v) PEG 3350	134382
83	0.2 M Ammonium sulfate		20% (w/v) PEG 3350	134383
84	0.2 M di-Sodium tartrate		20% (w/v) PEG 3350	134384
85	0.2 M K/Na tartrate		20% (w/v) PEG 3350	134385
86	0.2 M di-Ammonium tartrate		20% (w/v) PEG 3350	134386
87	0.2 M Sodium phosphate		20% (w/v) PEG 3350	134387
88	0.2 M di-Sodium phosphate		20% (w/v) PEG 3350	134388
89	0.2 M Potassium phosphate		20% (w/v) PEG 3350	134389
90	0.2 M di-Potassium phosphate		20% (w/v) PEG 3350	134390
91	0.2 M Ammonium phosphate		20% (w/v) PEG 3350	134391
92	0.2 M di-Ammonium phosphate		20% (w/v) PEG 3350	134392
93	0.2 M tri-Lithium citrate		20% (w/v) PEG 3350	134393
94	0.2 M tri-Sodium citrate		20% (w/v) PEG 3350	134394
95	0.2 M tri-Potassium citrate		20% (w/v) PEG 3350	134395
96	0.18 M tri-Ammonium citrate		20% (w/v) PEG 3350	134396

Abbildung XXII-Fortsetzung. Zusammensetzung der Kristallisationsplatte PEGs Suite, *Quiagen*.

Anhang

The AmSO₄ Suite Composition Table

Number	Salt	Buffer	Precipitant	Cat. no. (Refill-Hit Solution, 4 x 12.5 ml tubes)
1			2.2 M Ammonium sulfate	134401
2	0.2 M Ammonium acetate		2.2 M Ammonium sulfate	134402
3	0.2 M Ammonium chloride		2.2 M Ammonium sulfate	134403
4	0.2 M Ammonium phosphate		2.2 M Ammonium sulfate	134404
5	0.2 M Ammonium fluoride		2.2 M Ammonium sulfate	134405
6	0.2 M Ammonium formate		2.2 M Ammonium sulfate	134406
7	0.18 M tri-Ammonium citrate		2.2 M Ammonium sulfate	134407
8	0.2 M di-Ammonium phosphate		2.2 M Ammonium sulfate	134408
9	0.2 M Ammonium iodide		2.2 M Ammonium sulfate	134409
10	0.2 M Ammonium nitrate		2.2 M Ammonium sulfate	134410
11	0.2 M di-Ammonium tartrate		2.2 M Ammonium sulfate	134411
12	0.2 M Cadmium chloride		2.2 M Ammonium sulfate	134412
13	0.2 M Cadmium sulfate		2.2 M Ammonium sulfate	134413
14	0.2 M Cesium chloride		2.2 M Ammonium sulfate	134414
15	0.2 M Cesium sulfate		2.2 M Ammonium sulfate	134415
16	0.2 M Ammonium bromide		2.2 M Ammonium sulfate	134416
17	0.2 M Lithium acetate		2.2 M Ammonium sulfate	134417
18	0.2 M Lithium chloride		2.2 M Ammonium sulfate	134418
19	0.2 M tri-Lithium citrate		2.2 M Ammonium sulfate	134419
20	0.2 M Lithium nitrate		2.2 M Ammonium sulfate	134420
21	0.2 M Lithium sulfate		2.2 M Ammonium sulfate	134421
22	0.2 M Potassium acetate		2.2 M Ammonium sulfate	134422
23	0.2 M Potassium bromide		2.2 M Ammonium sulfate	134423
24	0.2 M Potassium chloride		2.2 M Ammonium sulfate	134424
25	0.2 M tri-Potassium citrate		2.2 M Ammonium sulfate	134425
26	0.2 M Potassium phosphate		2.2 M Ammonium sulfate	134426
27	0.2 M Potassium fluoride		2.2 M Ammonium sulfate	134427
28	0.2 M Potassium formate		2.2 M Ammonium sulfate	134428
29	0.2 M di-Potassium phosphate		2.2 M Ammonium sulfate	134429
30	0.2 M Potassium iodide		2.2 M Ammonium sulfate	134430
31	0.2 M Potassium nitrate		2.2 M Ammonium sulfate	134431
32	0.2 M K/Na tartrate		2.2 M Ammonium sulfate	134432
33	0.2 M Potassium sulfate		2.2 M Ammonium sulfate	134433
34	0.2 M Potassium thiocyanate		2.2 M Ammonium sulfate	134434
35	0.2 M Sodium acetate		2.2 M Ammonium sulfate	134435
36	0.2 M Sodium bromide		2.2 M Ammonium sulfate	134436
37	0.2 M Sodium chloride		2.2 M Ammonium sulfate	134437
38	0.2 M tri-Sodium citrate		2.2 M Ammonium sulfate	134438
39	0.2 M Sodium phosphate		2.2 M Ammonium sulfate	134439
40	0.2 M Sodium fluoride		2.2 M Ammonium sulfate	134440
41	0.2 M Sodium formate		2.2 M Ammonium sulfate	134441
42	0.2 M di-Sodium phosphate		2.2 M Ammonium sulfate	134442
43	0.2 M Sodium iodide		2.2 M Ammonium sulfate	134443
44	0.2 M Sodium malonate		2.2 M Ammonium sulfate	134444
45	0.2 M Sodium nitrate		2.2 M Ammonium sulfate	134445
46	0.2 M Sodium sulfate		2.2 M Ammonium sulfate	134446
47	0.2 M di-Sodium tartrate		2.2 M Ammonium sulfate	134447
48	0.2 M Sodium thiocyanate		2.2 M Ammonium sulfate	134448

Abbildung XXIII. Zusammensetzung der Kristallisationsplatte AmSO₄ Suite, *Quiagen*.

Anhang

The AmSO₄ Suite Composition Table

Number	Salt	Buffer	Precipitant	Cat. no. (Refill-Hit Solution, 4 x 12.5 ml tubes)
49		0.1 M Citric acid pH 4.0	0.8 M Ammonium sulfate	134449
50		0.1 M Citric acid pH 5.0	0.8 M Ammonium sulfate	134450
51		0.1 M MES pH 6.0	0.8 M Ammonium sulfate	134451
52		0.1 M HEPES pH 7.0	0.8 M Ammonium sulfate	134452
53		0.1 M Tris pH 8.0	0.8 M Ammonium sulfate	134453
54		0.1 M Bicine pH 9.0	0.8 M Ammonium sulfate	134454
55		0.1 M Citric acid pH 4.0	1.6 M Ammonium sulfate	134455
56		0.1 M Citric acid pH 5.0	1.6 M Ammonium sulfate	134456
57		0.1 M MES pH 6.0	1.6 M Ammonium sulfate	134457
58		0.1 M HEPES pH 7.0	1.6 M Ammonium sulfate	134458
59		0.1 M Tris pH 8.0	1.6 M Ammonium sulfate	134459
60		0.1 M Bicine pH 9.0	1.6 M Ammonium sulfate	134460
61		0.1 M Citric acid pH 4.0	2.4 M Ammonium sulfate	134461
62		0.1 M Citric acid pH 5.0	2.4 M Ammonium sulfate	134462
63		0.1 M MES pH 6.0	2.4 M Ammonium sulfate	134463
64		0.1 M HEPES pH 7.0	2.4 M Ammonium sulfate	134464
65		0.1 M Tris pH 8.0	2.4 M Ammonium sulfate	134465
66		0.1 M Bicine pH 9.0	2.4 M Ammonium sulfate	134466
67		0.1 M Citric acid pH 4.0	3.2 M Ammonium sulfate	134467
68		0.1 M Citric acid pH 5.0	3.2 M Ammonium sulfate	134468
69		0.1 M MES pH 6.0	3.2 M Ammonium sulfate	134469
70		0.1 M HEPES pH 7.0	3.2 M Ammonium sulfate	134470
71		0.1 M Tris pH 8.0	3.2 M Ammonium sulfate	134471
72		0.1 M Bicine pH 9.0	3.2 M Ammonium sulfate	134472
73	0.1 M tri-Sodium citrate		0.5 M Ammonium sulfate; 1.0 M Lithium Sulfate	134473
74			1.0 M Ammonium sulfate	134474
75		0.1 M Sodium acetate pH 4.6	1.0 M Ammonium sulfate	134475
76		0.1 M HEPES sodium salt pH 7.5	1.0 M Ammonium sulfate; 2% (w/v) PEG 400	134476
77		0.1 M Tris-HCl pH 8.5	1.0 M Ammonium sulfate	134477
78	0.05 M tri-Sodium citrate		1.2 M Ammonium sulfate; 3% (w/v) Isopropanol	134478
79		0.1 M Tris-HCl pH 8.5	1.5 M Ammonium sulfate; 15% (w/v) Glycerol	134479
80	0.5 M Lithium chloride		1.6 M Ammonium sulfate	134480
81	1.0 M Lithium sulfate		1.6 M Ammonium sulfate	134481
82	0.2 M Sodium chloride	0.1 M HEPES sodium salt pH 7.5	1.6 M Ammonium sulfate	134482
83		0.1 M HEPES sodium salt pH 7.5	1.6 M Ammonium sulfate; 2% (w/v) PEG 1000	134483
84		0.1 M MES sodium salt pH 6.5	1.8 M Ammonium sulfate	134484
85	2.0 M Sodium chloride		2.0 M Ammonium sulfate	134485
86		0.1 M Sodium acetate pH 4.6	2.0 M Ammonium sulfate	134486
87		0.1 M MES sodium salt pH 6.5	2.0 M Ammonium sulfate; 5% (w/v) PEG 400	134487
88		0.1 M Tris-HCl pH 8.5	2.0 M Ammonium sulfate	134488
89			2.2 M Ammonium sulfate	134489
90			2.2 M Ammonium sulfate; 20% (w/v) Glycerol	134490
91	0.1 M tri-Sodium citrate		2.4 M Ammonium sulfate	134491
92			3.0 M Ammonium sulfate; 1% (w/v) MPD	134492
93			3.0 M Ammonium sulfate; 10% (w/v) Glycerol	134493
94		0.1 M HEPES sodium salt pH 7.5	3.5 M Ammonium sulfate	134494
95		0.1 M MES sodium salt pH 6.5	3.5 M Ammonium sulfate; 1% (w/v) MPD	134495
96			3.5 M Ammonium sulfate	134496

Abbildung XXIV-Fortsetzung. Zusammensetzung der Kristallisationsplatte AmSO₄ Suite, *Quiagen*.

Anhang

The JCSG+ Suite Composition Table

Number	Salt	Buffer	Precipitant	Final pH	Cat. no. (Refill-Hit Solution, 4 x 12.5 ml tubes)
1	0.2 M Lithium sulfate	0.1 M Sodium acetate pH 4.5	50% (v/v) PEG 400		135901
2		0.1 M tri-Sodium citrate pH 5.5	20% (w/v) PEG 3000		135902
3	0.18 M tri-Ammonium citrate		20% (w/v) PEG 3350		135903
4	0.02 M Calcium chloride	0.1 M Sodium acetate pH 4.6	30% (v/v) MPD		135904
5	0.2 M Magnesium formate		20% (w/v) PEG 3350		135905
6	0.2 M Lithium sulfate	0.1 M Phosphate-citrate pH 4.2	20% (w/v) PEG 1000		135906
7		0.1 M CHES pH 9.5	20% (w/v) PEG 8000		135907
8	0.2 M Ammonium formate		20% (w/v) PEG 3350		135908
9	0.2 M Ammonium chloride		20% (w/v) PEG 3350		135909
10	0.2 M Potassium formate		20% (w/v) PEG 3350		135910
11	0.2 M Ammonium phosphate	0.1 M Tris pH 8.5	50% (v/v) MPD		135911
12	0.2 M Potassium nitrate		20% (w/v) PEG 3350		135912
13	0.8 M Ammonium sulfate	0.1 M Citric acid pH 3.5		4.0	135913
14	0.2 M Sodium thiocyanate		20% (w/v) PEG 3350		135914
15		0.1 M Bicine pH 8.5	20% (w/v) PEG 6000	9.0	135915
16		0.1 M HEPES pH 7.5	10% (w/v) PEG 8000; 8% (v/v) Ethylene glycol		135916
17		0.1 M Sodium cacodylate pH 6.5	40% (v/v) MPD; 5% (w/v) PEG 8000		135917
18		0.1 M Phosphate-citrate pH 4.2	40% (v/v) Ethanol; 5% (w/v) PEG 1000		135918
19		0.1 M Sodium acetate pH 4.6	8% (w/v) PEG 4000		135919
20	0.2 M Magnesium chloride	0.1 M Tris pH 7.0	10% (w/v) PEG 8000		135920
21		0.1 M Citric acid pH 4.0	20% (w/v) PEG 6000	5.0	135921
22	0.2 M Magnesium chloride	0.1 M Sodium cacodylate pH 6.5	50% (v/v) PEG 200		135922
23		1.6 M tri-Sodium citrate pH 6.5		6.5	135923
24	0.2 M tri-Potassium citrate		20% (w/v) PEG 3350		135924
25	0.2 M Sodium chloride	0.1 M Phosphate-citrate pH 4.2	20% (w/v) PEG 8000		135925
26	1 M Lithium chloride	0.1 M Citric acid pH 4.0	20% (w/v) PEG 6000	4.0	135926
27	0.2 M Ammonium nitrate		20% (w/v) PEG 3350		135927
28		0.1 M HEPES pH 6.5	10% (w/v) PEG 6000	7.0	135928
29	0.8 M Sodium phosphate; 0.8 M Potassium phosphate	0.1 M HEPES pH 7.5			135929
30		0.1 M Phosphate-citrate pH 4.2	40% (v/v) PEG 300		135930
31	0.2 M Zinc acetate	0.1 M Sodium acetate pH 4.5	10% (w/v) PEG 3000		135931
32		0.1 M Tris pH 8.5	20% (v/v) Ethanol		135932
33		0.1 M Na/K phosphate pH 6.2	25% (v/v) 1,2 propanediol; 10% (v/v) Glycerol		135933
34		0.1 M Bicine pH 9.0	10% (w/v) PEG 20000; 2% (v/v) 1,4-Dioxane		135934
35	2 M Ammonium sulfate	0.1 M Sodium acetate pH 4.6			135935
36			10% (w/v) PEG 1000; 10% (w/v) PEG 8000		135936
37			24% (w/v) PEG 1500; 20% (w/v) Glycerol		135937
38	0.2 M Magnesium chloride	0.1 M HEPES pH 7.5	30% (v/v) PEG 400		135938
39	0.2 M Sodium chloride	0.1 M Na/K phosphate pH 6.2	50% (v/v) PEG 200		135939
40	0.2 M Lithium sulfate	0.1 M Sodium acetate pH 4.5	30% (w/v) PEG 8000		135940
41		0.1 M HEPES pH 7.5	70% (v/v) MPD		135941
42	0.2 M Magnesium chloride	0.1 M Tris pH 8.5	20% (w/v) PEG 8000		135942
43	0.2 M Lithium sulfate	0.1 M Tris pH 8.5	40% (v/v) PEG 400		135943
44		0.1 M Tris pH 8.0	40% (v/v) MPD	8.0	135944
45	0.17 M Ammonium sulfate		25.5% (w/v) PEG 4000; 15% (v/v) Glycerol		135945
46	0.2 M Calcium acetate	0.1 M Sodium cacodylate pH 6.5	40% (v/v) PEG 300		135946
47	0.14 M Calcium chloride	0.07 M Sodium acetate pH 4.6	14% (v/v) Isopropanol; 30% (v/v) Glycerol		135947
48	0.04 M Potassium phosphate		16% (w/v) PEG 8000; 20% (v/v) Glycerol		135948

Abbildung XXV. Zusammensetzung der Kristallisationsplatte JCSG+ Suite, *Quiagen*.

Anhang

The JCSG+ Suite Composition Table

Number	Salt	Buffer	Precipitant	Final pH	Cat. no. (Refill-Hit Solution, 4 x 12.5 ml tubes)
49	1 M tri-Sodium citrate	0.1 M Sodium cacodylate pH 6.5			135949
50	0.2 M Sodium chloride	0.1 M Sodium cacodylate pH 6.5	2 M Ammonium sulfate		135950
51	0.2 M Sodium chloride	0.1 M HEPES pH 7.5	10% (v/v) Isopropanol		135951
52	0.2 M Lithium sulfate	0.1 M Tris pH 8.5	1.26 M Ammonium sulfate		135952
53		0.1 M CAPS pH 10.5	40% (v/v) MPD		135953
54	0.2 M Zinc acetate	0.1 M Imidazole pH 8.0	20% (w/v) PEG 3000		135954
55	0.2 M Zinc acetate	0.1 M Sodium cacodylate pH 6.5	10% (v/v) Isopropanol		135955
56	1 M di-Ammonium phosphate	0.1 M Sodium acetate pH 4.5			135956
57	1.6 M Magnesium sulfate	0.1 M MES pH 6.5			135957
58		0.1 M Bicine pH 9.0	10% (w/v) PEG 6000	9.0	135958
59	0.16 M Calcium acetate	0.08 M Sodium cacodylate pH 6.5	14.4% (w/v) PEG 8000; 20% (v/v) Glycerol		135959
60		0.1 M Imidazole pH 8.0	10% (w/v) PEG 8000		135960
61	0.05 M Cesium chloride	0.1 M MES pH 6.5	30% (v/v) Jeffamine M-600		135961
62	3.2 M Ammonium sulfate	0.1 M Citric acid pH 4.0	(final 5.0)	5.0	135962
63		0.1 M Tris pH 8.5	20% (v/v) MPD (final 8.0)	8.0	135963
64		0.1 M HEPES pH 7.5	20% (v/v) Jeffamine M-600		135964
65	0.2 M Magnesium chloride	0.1 M Tris pH 8.5	50% (v/v) Ethylene glycol		135965
66		0.1 M Bicine pH 8.5	10% (v/v) MPD (final 9.0)	9.0	135966
67	0.8 M Succinic acid pH 7.0				135967
68	2.1 M DL-Malic acid pH 7.0				135968
69	2.4 M Sodium malonate pH 7.0				135969
70	1.1 M Sodium malonate	0.1 M HEPES pH 7.0	0.5% (v/v) Jeffamine ED-2001	7.0	135970
71	1 M Succinic acid	0.1 M HEPES pH 7.0	1% (w/v) PEG MME 2000	7.0	135971
72		0.1 M HEPES pH 7.0	30% (v/v) Jeffamine M-600	7.0	135972
73		0.1 M HEPES pH 7.0	30% (v/v) Jeffamine ED-2001	7.0	135973
74	0.02 M Magnesium chloride	0.1 M HEPES pH 7.5	22% (w/v) Polyacrylic acid 5100, sodium salt		135974
75	0.01 M Cobalt chloride	0.1 M Tris pH 8.5	20% (w/v) Polyvinylpyrrolidone K15		135975
76	0.2 M Trimethylamine N-oxide	0.1 M Tris pH 8.5	20% (w/v) PEG MME 2000		135976
77	0.005 M Cobalt chloride; 0.005 M Cadmium chloride; 0.005 M Magnesium chloride; 0.005 M Nickel chloride	0.1 M HEPES pH 7.5	12% (w/v) PEG 3350		135977
78	0.24 M Sodium malonate pH 7.0		20% (w/v) PEG 3350		135978
79	0.1 M Succinic acid pH 7.0		15% (w/v) PEG 3350		135979
80	0.15 M DL-Malic acid pH 7.0		20% (w/v) PEG 3350		135980
81	0.1 M Potassium thiocyanate		30% (w/v) PEG MME 2000		135981
82	0.15 M Potassium bromide		30% (w/v) PEG MME 2000		135982
83	2 M Ammonium sulfate	0.1 M Bis-Tris pH 5.5			135983
84	3 M Sodium chloride	0.1 M Bis-Tris pH 5.5			135984
85	0.3 M Magnesium formate	0.1 M Bis-Tris pH 5.5			135985
86	1 M Ammonium sulfate	0.1 M Bis-Tris pH 5.5	1% (w/v) PEG 3350		135986
87	0.1 M tri-Sodium acetate pH 4.5	0.1 M Bis-Tris pH 5.5	25% (w/v) PEG 3350		135987
88	0.2 M Calcium chloride	0.1 M Bis-Tris pH 5.5	45% (v/v) MPD		135988
89	0.2 M Ammonium acetate	0.1 M Bis-Tris pH 5.5	45% (v/v) MPD		135989
90	0.1 M Ammonium acetate	0.1 M Bis-Tris pH 5.5	17% (w/v) PEG 10000		135990
91	0.2 M Ammonium sulfate	0.1 M Bis-Tris pH 5.5	25% (w/v) PEG 3350		135991
92	0.2 M Sodium chloride	0.1 M Bis-Tris pH 5.5	25% (w/v) PEG 3350		135992
93	0.2 M Lithium sulfate	0.1 M Bis-Tris pH 5.5	25% (w/v) PEG 3350		135993
94	0.2 M Ammonium acetate	0.1 M Bis-Tris pH 5.5	25% (w/v) PEG 3350		135994
95	0.2 M Magnesium chloride	0.1 M Bis-Tris pH 5.5	25% (w/v) PEG 3350		135995
96	0.2 M Ammonium acetate	0.1 M HEPES pH 7.5	45% (v/v) MPD		135996

Abbildung XXVI-Fortsetzung. Zusammensetzung der Kristallisationsplatte JCSG+ Suite, *Quiagen*.

The MPD Suite Composition Table

Number	Salt	Buffer	Precipitant	Cat. no. (Refill-Hit Solution, 4 x 12.5 ml tubes)
1	0.2 M Cadmium chloride		40% (v/v) MPD	134501
2	0.2 M Potassium fluoride		40% (v/v) MPD	134502
3	0.2 M Ammonium fluoride		40% (v/v) MPD	134503
4	0.2 M Lithium chloride		40% (v/v) MPD	134504
5	0.2 M Magnesium chloride		40% (v/v) MPD	134505
6	0.2 M Sodium chloride		40% (v/v) MPD	134506
7	0.2 M Calcium chloride		40% (v/v) MPD	134507
8	0.2 M Potassium chloride		40% (v/v) MPD	134508
9	0.2 M Ammonium chloride		40% (v/v) MPD	134509
10	0.2 M Sodium iodide		40% (v/v) MPD	134510
11	0.2 M Potassium iodide		40% (v/v) MPD	134511
12	0.2 M Ammonium iodide		40% (v/v) MPD	134512
13	0.2 M Sodium thiocyanate		40% (v/v) MPD	134513
14	0.2 M Potassium thiocyanate		40% (v/v) MPD	134514
15	0.2 M Lithium nitrate		40% (v/v) MPD	134515
16	0.2 M Magnesium nitrate		40% (v/v) MPD	134516
17	0.2 M Sodium nitrate		40% (v/v) MPD	134517
18	0.2 M Potassium nitrate		40% (v/v) MPD	134518
19	0.2 M Ammonium nitrate		40% (v/v) MPD	134519
20	0.2 M Zinc sulfate		40% (v/v) MPD	134520
21	0.2 M Sodium formate		40% (v/v) MPD	134521
22	0.2 M Potassium formate		40% (v/v) MPD	134522
23	0.2 M Ammonium formate		40% (v/v) MPD	134523
24	0.2 M Lithium acetate		40% (v/v) MPD	134524
25	0.2 M Magnesium acetate		40% (v/v) MPD	134525
26	0.2 M Sodium malonate		40% (v/v) MPD	134526
27	0.2 M Sodium acetate		40% (v/v) MPD	134527
28	0.2 M Calcium acetate		40% (v/v) MPD	134528
29	0.2 M Potassium acetate		40% (v/v) MPD	134529
30	0.2 M Ammonium acetate		40% (v/v) MPD	134530
31	0.2 M Lithium sulfate		40% (v/v) MPD	134531
32	0.2 M Magnesium sulfate		40% (v/v) MPD	134532
33	0.2 M Cesium chloride		40% (v/v) MPD	134533
34	0.2 M Nickel chloride		40% (v/v) MPD	134534
35	0.2 M Ammonium sulfate		40% (v/v) MPD	134535
36	0.2 M di-Sodium tartrate		40% (v/v) MPD	134536
37	0.2 M K/Na tartrate		40% (v/v) MPD	134537
38	0.2 M di-Ammonium tartrate		40% (v/v) MPD	134538
39	0.2 M Sodium phosphate		40% (v/v) MPD	134539
40	0.2 M Potassium bromide		40% (v/v) MPD	134540
41	0.2 M Sodium bromide		40% (v/v) MPD	134541
42	0.2 M di-Potassium phosphate		40% (v/v) MPD	134542
43	0.2 M Ammonium phosphate		40% (v/v) MPD	134543
44	0.2 M di-Ammonium phosphate		40% (v/v) MPD	134544
45	0.2 M tri-Lithium citrate		40% (v/v) MPD	134545
46	0.2 M tri-Sodium citrate		40% (v/v) MPD	134546
47	0.2 M tri-Potassium citrate		40% (v/v) MPD	134547
48	0.18 M tri-Ammonium citrate		40% (v/v) MPD	134548

Abbildung XXVII. Zusammensetzung der Kristallisationsplatte MPD Suite, Qiagen.

The MPD Suite Composition Table

Number	Salt	Buffer	Precipitant	Cat. no. (Refill-Hit Solution, 4 x 12.5 ml tubes)
49		0.1 M Citric acid pH 4.0	10% (v/v) MPD	134549
50		0.1 M Sodium acetate pH 5.0	10% (v/v) MPD	134550
51		0.1 M MES pH 6.0	10% (v/v) MPD	134551
52		0.1 M HEPES pH 7.0	10% (v/v) MPD	134552
53		0.1 M Tris pH 8.0	10% (v/v) MPD	134553
54		0.1 M Bicine pH 9.0	10% (v/v) MPD	134554
55		0.1 M Citric acid pH 4.0	20% (v/v) MPD	134555
56		0.1 M Sodium acetate pH 5.0	20% (v/v) MPD	134556
57		0.1 M MES pH 6.0	20% (v/v) MPD	134557
58		0.1 M HEPES pH 7.0	20% (v/v) MPD	134558
59		0.1 M Tris pH 8.0	20% (v/v) MPD	134559
60		0.1 M Bicine pH 9.0	20% (v/v) MPD	134560
61		0.1 M Citric acid pH 4.0	40% (v/v) MPD	134561
62		0.1 M Sodium acetate pH 5.0	40% (v/v) MPD	134562
63		0.1 M MES pH 6.0	40% (v/v) MPD	134563
64		0.1 M HEPES pH 7.0	40% (v/v) MPD	134564
65		0.1 M Tris pH 8.0	40% (v/v) MPD	134565
66		0.1 M Bicine pH 9.0	40% (v/v) MPD	134566
67		0.1 M Sodium acetate pH 4.0	65% (v/v) MPD	134567
68		0.1 M Sodium acetate pH 5.0	65% (v/v) MPD	134568
69		0.1 M MES pH 6.0	65% (v/v) MPD	134569
70		0.1 M HEPES pH 7.0	65% (v/v) MPD	134570
71		0.1 M Tris pH 8.0	65% (v/v) MPD	134571
72		0.1 M Bicine pH 9.0	65% (v/v) MPD	134572
73	0.1 M tri-Sodium citrate	0.1 M HEPES sodium salt pH 7.5	10% (w/v) MPD	134573
74	0.05 M Magnesium chloride	0.1 M Tris-HCl pH 8.5	12% (w/v) MPD	134574
75	0.02 M Calcium chloride	0.1 M Sodium acetate pH 4.6	15% (w/v) MPD	134575
76		0.1 M Imidazole-HCl pH 8.0	15% (w/v) MPD; 5% (w/v) PEG 4000	134576
77	0.2 M Ammonium acetate	0.1 M tri-Sodium citrate pH 5.6	15% (w/v) MPD	134577
78	0.2 M Magnesium acetate	0.1 M MES sodium salt pH 6.5	15% (w/v) MPD	134578
79	0.2 M tri-Sodium citrate	0.1 M HEPES sodium salt pH 7.5	15% (w/v) MPD	134579
80	0.1 M tri-Sodium citrate	0.1 M HEPES sodium salt pH 7.5	20% (w/v) MPD	134580
81		0.1 M Imidazole-HCl pH 8.0	20% (w/v) MPD	134581
82	0.2 M Sodium chloride		20% (w/v) MPD; 4% (w/v) Glycerol	134582
83	0.02 M Calcium chloride	0.1 M Sodium acetate pH 4.6	30% (w/v) MPD	134583
84	0.2 M Ammonium acetate	0.1 M tri-Sodium citrate pH 5.6	30% (w/v) MPD	134584
85	0.2 M Magnesium acetate	0.1 M MES sodium salt pH 6.5	30% (w/v) MPD	134585
86	0.5 M Ammonium sulfate	0.1 M HEPES sodium salt pH 7.5	30% (w/v) MPD	134586
87	0.2 M tri-Sodium citrate	0.1 M HEPES sodium salt pH 7.5	30% (w/v) MPD	134587
88		0.1 M HEPES sodium salt pH 7.5	30% (w/v) MPD; 5% (w/v) PEG 4000	134588
89		0.1 M Imidazole-HCl pH 8.0	30% (w/v) MPD; 10% (w/v) PEG 4000	134589
90			30% (w/v) MPD; 20% (w/v) Ethanol	134590
91			35% (w/v) MPD	134591
92		0.1 M Imidazole-HCl pH 8.0	35% (w/v) MPD	134592
93		0.1 M Tris-HCl pH 8.5	40% (w/v) MPD	134593
94		0.1 M HEPES sodium salt pH 7.5	47% (w/v) MPD	134594
95			47% (w/v) MPD; 2% (w/v) tert-Butanol	134595
96			50% (w/v) MPD	134596

Abbildung XXVIII-Fortsetzung. Zusammensetzung der Kristallisationsplatte MPD Suite, *Quiagen*.

7.4 Bedingungen der Thermofluor-Assays

Description of the thermofluor (Screen 1)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Water	Citric Acid	Na Acetate	Citric Acid	MES	K Phosphate	Citric Acid	Bis-Tris	Na Cacodylate	Na Phosphate	K Phosphate	HEPES
		pH 4.0	pH 4.5	pH 5.0	pH 6.0	pH 6.0	pH 6.0	pH 6.5	pH 6.5	pH 7.0	pH 7.0	pH 7.0
B	MOPS	Am Acetate	Tris-HCl	Na Phosphate	Imidazol	HEPES	Tris-HCl	Tricine	Bicine	Bicine	Tris-HCl	Bicine
	pH 7.0	pH 7.3	pH 7.5	7,5	pH 8.0	ph 8.0	pH 8.0	pH 8.0	pH 8.0	pH 8.5	pH 8.5	pH 9.0
C	Water	Citric Acid	Na Acetate	Citric Acid	MES	K Phosphate	Citric Acid	Bis-Tris	Na Cacodylate	Na Phosphate	K Phosphate	HEPES
	250mM NaCl	250mM NaCl	250mM NaCl	250mM NaCl	250mM NaCl	250mM NaCl	250mM NaCl	250mM NaCl	250mM NaCl	250mM NaCl	250mM NaCl	250mM NaCl
D	MOPS	Am Acetate	Tris-HCl	Na Phosphate	Imidazol	HEPES	Tris-HCl	Tricine	Bicine	Bicine	Tris-HCl	Bicine
	250mM NaCl	250mM NaCl	250mM NaCl	250mM NaCl	250mM NaCl	250mM NaCl	250mM NaCl	250mM NaCl	250mM NaCl	250mM NaCl	250mM NaCl	250mM NaCl
E	Buffer Screen	Buffer Screen	Buffer Screen	Buffer Screen	Buffer Screen	Buffer Screen	Buffer Screen	Buffer Screen	Buffer Screen	Buffer Screen	Buffer Screen	Buffer Screen
	"A"	"A"	"A"	"A"	"A"	"A"	"A"	"A"	"A"	"A"	"A"	"A"
F	Buffer Screen	Buffer Screen	Buffer Screen	Buffer Screen	Buffer Screen	Buffer Screen	Buffer Screen	Buffer Screen	Buffer Screen	Buffer Screen	Buffer Screen	Buffer Screen
	"B"	"B"	"B"	"B"	"B"	"B"	"B"	"B"	"B"	"B"	"B"	"B"
G	10mM HEPES	50mM HEPES	100mM HEPES	250mM HEPES	10mM NaPO4	50mM NaPO4	100mM NaPO4	200mM NaPO4	10mM Tris-HCl	50mM Tris-HCl	100mM Tris-HCl	250mM Tris-HCl
	pH 7.5	pH 7.5	pH 7.5	pH 7.5	pH 7.5	pH 7.5	pH 7.5	pH 7.5	pH 8.0	pH 8.0	pH 8.0	pH 8.0
H	50mM HEPES	50mM HEPES	50mM HEPES	50mM HEPES	50mM HEPES	50mM HEPES	50mM Tris-HCl	50mM Tris-HCl	50mM Tris-HCl	50mM Tris-HCl	50mM Tris-HCl	50mM Tris-HCl
	50mM NaCl	125mM NaCl	250mM NaCl	500mM NaCl	750mM NaCl	1000mM NaCl	50mM NaCl	125mM NaCl	250mM NaCl	500mM NaCl	750mM NaCl	1000mM NaCl
	pH 7.5	pH 7.5	pH 7.5	pH 7.5	pH 7.5	pH 7.5	pH 8.0	pH 8.0	pH 8.0	pH 8.0	pH 8.0	pH 8.0

Buffers from lane A, B, C, D, E, F are at 100mM

Buffer screens: A) Succinic Acid / Na PO4 [2:7], B) Citric acid / CHES / HEPES [2:4:3]

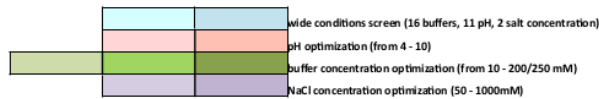


Abbildung XXIX. Bedingungen des Thermofluor-Assays Screen 1; Pufferkomponenten und Salzeffekt (A1-B12; C1-D12), pH-Effekt (E1-E12; F1-F12); Salzkonzentrationeffekt (G1-G12), Pufferkonzentrationeffekt (H1-H12); EMBL Hamburg.

Anhang

Design of the thermofluor screen 2 "Optimisation screen"

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,1 M Urea	0,5 M Urea	1 M Urea	2 M Urea	4 M Urea	6 M Urea	150 mM GdnHCl	500 mM GdnHCl	3% (v/v) DMSO	100 mM NaHCO ₂	100 mM KHCO ₂	100 mM NH ₄ HCO ₂
B	100 mM Na ₂ C ₂ H ₃ O ₂	100 mM Ca(C ₂ H ₃ O ₂) ₂	100 mM CH ₃ CO ₂ K	100 mM CH ₃ COONH ₄	100 mM Na ₂ SO ₄	100 mM Mg ₂ SO ₄	100 mM K ₂ SO ₄	100 mM (NH ₄) ₂ SO ₄	100 mM Na ₂ HPO ₄	100 mM NaH ₂ PO ₄	100 mM K ₂ HPO ₄	100 mM KH ₂ PO ₄
C	100 mM Na ₂ C ₄ H ₄ O ₆	100 mM Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇	100 mM Na ₂ C ₃ H ₂ O ₄	100 mM NaNO ₃	10 mM DTT	1 mM TCEP	5 mM TCEP	20 mM TCEP	100 mM Trimethyl- amineHCl	1 mM Spermidine	1 mM Spermine-HCl	5 mM EDTA
D	10 mM Betaine	50 mM Imidazole	100 mM Imidazole	250 mM Imidazole	500 mM Imidazole	10 mM MgCl ₂	10 mM CaCl ₂	1 mM MnCl ₂	1 mM NiCl ₂	1 mM FeCl ₃	1 mM ZnCl ₂	1 mM CoCl ₂
E	100 mM NaF	100 mM KF	100 mM NH ₄ F	100 mM LiCl	100 mM NaCl	100 mM KCl	100 mM NH ₄ Cl	100 mM NaI	100 mM KI	100 mM NaBr	2 mM CHAPS	1 mM Octyl-β-D- Glucoside
F	3% (v/v) Ethylene glycol	1% (v/v) Glycerol	5% (v/v) Glycerol	10% (v/v) Glycerol	20% (v/v) Glycerol	5% (v/v) PEG 400	5% (w/v) PEG 1000	5% (w/v) PEG 4000	10 mM L-Proline	50 mM Taurine	50 mM L-Gly	25 mM L-His
G	50 mM L-Arg	50 mM (each) L-Arg + L-Glu	500 mM (each) L-Arg + L-Glu	50 mM L-Glu	25 mM L-Gln	50 mM L-Lys	100 mM D-Glucose	100 mM Sucrose	100 mM Maltose	100 mM D-Sorbitol	2 mM NADH (5mM MgCl ₂)	2 mM ATP (5mM MgCl ₂)
H	2 mM ADP (5mM MgCl ₂)	2 mM cAMP (5mM MgCl ₂)	2 mM GTP (5mM MgCl ₂)	2 mM GDP (5mM MgCl ₂)	2 mM cGMP (5mM MgCl ₂)	buffer	Free	Free	Free	Free	Free	Free

Chaotropic / dissociation reagents	Linker	Polyol
Salts	Imidazole	Amino acid
Reducing reagent	Multivalent ion	Carbohydrate
Polyamine	Monovalent ion	Co-factor
Chelating agent	Detergents	Buffer control

Abbildung XXX. Bedingungen des Thermofluor-Assays Screen 2; Additive, wie chaotropische Reagenzien (A1-A8), Salze (A10-C4), Monovalente Ione (E1-E10), Multivalente Ione (D6-D12), Reduktionsmittel (C5-C8), Polyamine (C9-C11), Imidazole (D2-D5), Detergenzien (E11-E12), Alkohole (F1-F8), Aminosäuren (F9-G6), Zucker (G7-G10) und Cofaktoren (G11-H5). Reduktionsmittel.