

Department Chemie  
Lehrstuhl II für Organische Chemie  
der Technischen Universität München

# NMR-spektroskopische Untersuchungen zur Biosynthese des Antibiotikums Avilamycin A

Gerd Hauser

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der  
Technischen Universität München  
zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:  
Univ.-Prof. Dr. Horst Kessler

Prüfer der Dissertation:  
1. Univ.-Prof. Dr. Steffen J. Glaser  
2. Univ.-Prof. Dr. Sevil Weinkauff

Die Dissertation wurde am 28.10.2004 bei der  
Technischen Universität München  
eingereicht und durch die  
Fakultät für Chemie  
am 02.12.2004 angenommen.



"There is nothing like looking, if you want to find something.  
You certainly usually find something, if you look,  
but it is not always quite the something you were after."

J.R.R. Tolkien (1892-1973)

"Do not meddle in the affairs of Wizards,  
for they are subtle and quick to anger."

"The Fellowship of the Ring", J.R.R. Tolkien (1892-1973)



# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Vorwort .....	III
1 Biologisch-medizinischer Hintergrund.....	1
1.1 Krankheiten, Seuchen und Epidemien: Gefahren der menschlichen Mobilität.....	1
1.2 Antibiotika.....	2
1.2.1 Einteilung der Antibiotika.....	4
1.2.1.1 Hemmung der Zellwandsynthese.....	4
1.2.1.2 Blockade der Proteinsynthese.....	7
1.2.1.3 Unterdrückung der Nukleinsäuresynthese.....	9
1.2.1.4 Beeinflussung der Zytoplasmamembran.....	11
1.3 Resistenz.....	12
1.3.1 Die Resistenz-Mechanismen der Bakterien.....	12
1.3.1.1 Enzymatische Inaktivierung oder Modifikation des Antibiotikums.....	12
1.3.1.2 Veränderung der Zielstruktur.....	13
1.3.1.3 Verringerte Aufnahme des Wirkstoffs.....	14
1.3.2 Entstehung der Resistenzen und Mechanismen ihrer Verbreitung.....	14
1.3.2.1 Transformation.....	15
1.3.2.2 Konjugation.....	16
1.3.2.3 Transduktion.....	16
1.3.2.4 Konsequenzen dieser Mechanismen.....	17
1.4 Ausblick und Lösungsansätze.....	18
2 Avilamycine.....	19
2.1 Struktur und physikalische Eigenschaften der Avilamycine.....	19
2.2 Pharmakologie der Avilamycine.....	21
2.3 Kombinatorische Biosynthese.....	22
2.4 Mikrobiologische Vorarbeiten.....	24
2.5 Die kernmagnetische Resonanz-Spektroskopie.....	26
2.5.1 Einführung in Grundlagen der NMR-Spektroskopie.....	27
2.6 Die Proben und ihre Nomenklatur.....	29
2.6.1 Der Wildtyp: AviW.....	30
2.6.2 Methyltransferase-Inaktivierungen.....	33
2.6.2.1 AviG4_Met.....	33
2.6.2.2 AviG2_Met, AviG5_Met, AviG6_Met.....	34
2.6.3 Modifikationen im Ring H.....	35
2.6.3.1 AviW_Met.....	35
2.6.3.2 AviO2_Met.....	36
2.6.3.3 AviG4_Pyr.....	36
2.6.3.4 AviB1_Pyr.....	36
2.6.4 <sup>13</sup> C-Fütterungsexperimente.....	38
2.6.4.1 AviW_Glu.....	38
2.6.4.2 AviW_Ace.....	39
2.6.4.3 AviW_Pyr.....	39
3 Praktischer Teil.....	41
3.1 Herstellung der Mutanten und der Proben.....	41
3.2 Herstellung, Konzentration und Zusammensetzung der NMR-Proben.....	42
3.3 NMR-Experimente.....	43
3.3.1 Die verwendete Variante des <sup>13</sup> C-gefilterten NOESY.....	44
3.3.2 Allgemeines Verfahren bei der Zuordnung.....	46
3.4 Massenspektrometrie.....	49
4 Analyse der NMR Spektren.....	51
4.1 Vollständige Zuordnung der AviW-Spektren und Besonderheiten bei der Zuordnung.....	51
4.1.1 Konstitutionelle Änderung der Orthoesterbindung zwischen Ring C und D.....	54

4.1.2 Besonderheiten im Ring F.....	62
4.1.3 Avilamycin B.....	63
4.1.4 Avilamycin C.....	64
4.1.5 Weitere Avilamycine.....	65
4.1.6 Versuch, die Konfiguration der Orthoesterbindung zwischen den Ringen C und D zu klären.....	66
4.1.7 HMBC-Kontakte über die Orthoesterbindungen.....	67
4.1.8 Unterscheidung der Signale von 54 und 55.....	68
4.2 Spektren der Methyltransferase-Inaktivierungen.....	69
4.2.1 Identifizierung der Gruppen 1-4 in den Spektren des Wildtyps.....	69
4.2.2 Identifizierung der fehlenden Gruppen in den Spektren der Mutantenprodukte.....	71
4.2.2.1: AviG4_Met.....	71
4.2.2.2: AviG2_Met.....	72
4.2.2.3: AviG5_Met.....	72
4.2.2.3.1: Analyse des Spektrums der Variante des <sup>13</sup> C-gefilterten NOESY-Experiments.....	74
4.2.2.4: AviG6_Met.....	76
4.3 Spektren der Modifikationen im Ring H.....	76
4.3.1 Weitere Untersuchungen zur Unterscheidung der Signale von 54 und 55.....	80
4.4 Spektren der Fütterungsexperimente.....	81
4.4.1 Produkt des mit 1- <sup>13</sup> C-D-Glukose gefütterten Wildtyps (AviW_Glu).....	83
4.4.2 Produkt des mit 1- <sup>13</sup> C-Na-Acetat gefütterten Wildtyps (AviW_Ace).....	84
4.4.3 Produkt des mit 2- <sup>13</sup> C-Na-Pyruvat gefütterten Wildtyps (AviW_Pyr).....	84
5 Zusammenfassung, Diskussion und Ausblick.....	85
5.1 Zusammenfassung der Ergebnisse.....	85
5.1.1 Der Wildtyp: AviW.....	85
5.1.2 Methyltransferase-Inaktivierungen.....	86
5.1.3 Modifikationen im Ring H.....	86
5.1.4 <sup>13</sup> C-Fütterungsexperimente.....	87
5.2 Diskussion.....	87
5.2.1 <sup>13</sup> C-Fütterungsexperimente.....	87
5.2.2 Allgemeine Diskussion.....	89
5.3 Ausblick.....	91
6 Entwicklung einer neuen Pulssequenz.....	93
6.1 Motivation.....	93
6.2 Theorie und bisherige Lösungsversuche.....	94
6.3 Erste Iteration: Die BIRD-BIRD-Variante.....	98
6.4 Zweite Iteration: Die BIRD-INEPT-Variante.....	100
6.5 Dritte Iteration und Lösung: Die neue Pulssequenz.....	101
6.5.1 Varianten der neuen Pulssequenz.....	104
6.5.1.1 Verbesserte Selektivität durch eine zusätzliche <sup>13</sup> C-Dimension.....	104
6.5.1.2 Verbesserte Selektivität durch doppel-selektive CW-Kreuzpolarisation.....	105
6.5.1.2.1 1D-Version.....	105
6.5.1.2.2 2D-Version.....	107
7 Anhang.....	109
7.1 Zusammenfassung.....	109
7.1.1 NMR-spektroskopische Untersuchungen an Avilamycin A.....	109
7.1.2 Entwicklung einer neuen Pulssequenz.....	110
7.2 Pulsprogramm der verwendeten Variante des <sup>13</sup> C-gefilterten NOESY.....	111
7.2.1 Verwendete Parameter.....	112
7.3 Pulsprogramm der in Abb. 58 dargestellten Pulssequenz zur Bestimmung chemisch äquivalenter vicinaler Protonen.....	113
7.4 Literaturverzeichnis.....	116
7.5 Abkürzungsverzeichnis.....	124
7.6 Glossar.....	125
7.7 Chemische Verschiebungen für Avilamycin B und C.....	127
7.8 Danksagung.....	128

## **Vorwort:**

Diese Arbeit widmet sich einerseits der NMR-spektroskopischen Untersuchung des Antibiotikums Avilamycin A und andererseits der Entwicklung und Optimierung einer neuen NMR-Pulssequenz zur Konfigurationsbestimmung chemisch äquivalenter vicinaler Protonen.

**Kapitel 1** erläutert den biologisch-medizinischen Hintergrund der Antibiotika und der Resistenzen, die Bakterien gegen diese Wirkstoffe entwickelt haben. **Kapitel 2** beschreibt die Avilamycine, die kombinatorische Biosynthese sowie die untersuchten Proben. Die verwendeten Methoden werden in **Kapitel 3** dargelegt. Im folgenden **Kapitel 4** wird die Analyse der NMR-Spektren ausführlich diskutiert, deren Ergebnisse in **Kapitel 5** zusammengefasst und erläutert werden. Ferner wird hier ein Ausblick gegeben.

Anschließend (**Kapitel 6**) wird das zweite Projekt der Entwicklung eines effizienteren Experiments zur Untersuchung chemisch äquivalenter vicinaler Protonen dargestellt.

**Kapitel 7** stellt den Anhang dar und enthält neben dem Literatur- und dem Abkürzungsverzeichnis auch ein Glossar einiger medizinischer und mikrobiologischer Fachbegriffe.

Das Avilamycin-Projekt wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. A. Bechthold (Freiburg) bearbeitet. Dabei wurden die mikrobiologischen Arbeiten zur Herstellung der Proben in Freiburg durchgeführt. Die NMR-spektroskopischen Messungen und Auswertungen erfolgten dagegen in München.

Das zweite vorgestellte Projekt der Pulssequenz-Entwicklung war eine Kooperation mit Prof. A. Kirschning (Hannover). Die Probe wurde in Hannover erzeugt und die NMR-Spektroskopie in München durchgeführt.



# **1 Biologisch-medizinischer Hintergrund**

Das im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Avilamycin zeichnet sich insbesondere durch seine antibiotische Wirkung aus, daher soll in diesem Kapitel der biologische und medizinische Hintergrund für die Motivation dieses Projekts erläutert werden.

## **1.1 Krankheiten, Seuchen und Epidemien: Gefahren der menschlichen Mobilität**

Seuchen waren eine der großen Geißeln der Menschheit. Doch auch heute noch stellen sie eine ernste Bedrohung dar, denn jederzeit kann sich ein neuer Erreger entwickeln; in den überfüllten Großstädten der Entwicklungsländer oder den entfernten Dschungeln von Afrika, Südamerika oder Asien. Gegenden, die einst nur dünn besiedelt waren, inzwischen aber durch die moderne Zivilisation rasenden Veränderungen unterworfen sind. Und dieser Erreger könnte sich in kürzester Zeit zu einem globalen Problem entwickeln [1–4].

Denn einerseits hatte man Ausbrüche des hochinfektiösen und tödlichen Ebola-Virus in Afrika, bei denen etwa 50% der infizierten Personen starben (darunter auch die Mehrheit der behandelnden Ärzte und des Pflegepersonals). Und andererseits das HI-Virus, das sich von den ländlichen Gemeinden Afrikas erst in die nahe gelegenen Großstädte und von dort (bedingt durch seine lange Inkubationszeit) bis zum Auftreten von Symptomen bei den zuerst Erkrankten schon bis in die USA, Europa, Asien und den Rest der Welt ausgebreitet hatte. Einerseits also eine sehr infektiöse Krankheit, die aber relativ schnell ausbricht und so früh erkannt werden kann. Zum anderen eine, die sich durch ihre lange Inkubationszeit über den ganzen Globus verbreiten kann, dabei aber nur vergleichsweise schwer übertragen wird (d.h. nur über den Austausch von Körperflüssigkeiten wie z.B. Blut und Sperma, nicht über Tröpfcheninfektion). Eine Kombination dieser Eigenschaften wäre fatal.

Es gibt viele Faktoren, die das Auftreten neuer bzw. das Wiederauftreten alter infektiöser Krankheiten beeinflussen. Oft treten Epidemien als Folge von Veränderungen im menschlichen Verhalten, in sozialer Organisation, Urbanisation und in der Landwirtschaft auf.

Aber der wichtigste Faktor ist die Verbreitung der Organismen von ihrem Ursprungsort als Folge der Migration und des Reisens ihrer menschlichen Wirte [5]. So verbreiteten sich die ansteckenden Krankheiten (insbesondere Masern und Pocken) im Altertum (etwa 200 n. Chr.) langsam entlang der Karawanenrouten durch das römische Reich und Asien, wobei bis zu einem Drittel der Bevölkerung ausgelöscht wurde [6]. Die große Pest des 13. und 14. Jahrhunderts wurde von ihrem Ausgangspunkt im nördlichen Burma durch die mongolischen Rei-

ter (bzw. genau genommen durch die von ihnen eingeschleppten, infizierten Fliegen) bis nach Europa verbreitet und forderte dort etwa 25 Millionen Tote (was wieder etwa einem Drittel der Bevölkerung entsprach). Dabei kam es in manchen Landstrichen kaum zu Erkrankungen, während andere vollständig entvölkert wurden. Nach 1492 wurden die Ozeane die Hauptübertragungsrouten und erlaubten es Seuchen wie den Masern, die Welt innerhalb eines Jahres vollständig zu umrunden. Heutzutage können Flugreisende nahezu jeden Punkt der Erde innerhalb von 24 Stunden erreichen, wodurch es bei hoch ansteckenden Viren (wie z.B. Influenza) in wenigen Wochen weltweit zu Erkrankungen kommt [7]. Daher ist es heute wichtiger als jemals zuvor, nicht nur wachsam das Auftauchen neuer Krankheiten zu beobachten und dies durch die Verbesserung der hygienischen Bedingungen weltweit auch zu verhindern, sondern es müssen auch effiziente Mittel zu deren Bekämpfung zur Verfügung stehen.

## 1.2 Antibiotika

*Für viele der in Kapitel 1.1 erwähnten Krankheiten müsste man zur Behandlung auf Antiinfektiva zurückgreifen, von denen die Antibiotika nur eine Untergruppe darstellen. Zu deren Wirkungsbereich gehören nur bakterielle Infektionen (z.B. Cholera, Diphtherie und Gonorrhoe) und Protozoenerkrankungen (z.B. Malaria). Antiinfektiva beschreiben dagegen Wirkstoffe, die auch gegen Pilzinfektionen (Mykosen, z.B. Kandidosen), Viruserkrankungen (z.B. Masern, Röteln, Grippe und Pocken) sowie im weiteren Sinne auch Wurmkrankheiten (z.B. durch verschiedene Bandwürmer) wirksam sind. Da aber Avilamycin ein Antibiotikum ist und zur besseren Verständlichkeit sollen im Folgenden nur Antibiotika besprochen werden.*

Schon im alten China wurden, ohne dass die eigentlichen Hintergründe bekannt waren, Antibiotika eingesetzt, wie das folgende Beispiel [8] aus den „Rezepten für den Notfall“ (ca. 340 n. Chr) für die Behandlung der Malaria zeigt: „Man nehme eine Hand voll *qing hao*, weiche sie in einem *shang* (ca. 1 l) Wasser ein, siebe die Flüssigkeit und trinke sie, um das Fieber zu unterdrücken.“ Dieser Pflanzenextrakt aus *Artemisia annua* enthält, wie man heute weiß, Artemisinin, eine sehr stark gegen Blutschizonten wirkende Substanz [9]. Deren Wirkmechanismus ist zwar noch unklar [10], dennoch sind schon Medikamente im Handel, die auf diesem Wirkstoff basieren (z.B. Paluther<sup>®</sup>).

Allerdings begann die wissenschaftliche Entwicklung der Antibiotika erst gegen Ende des 19. und Anfang des 20. Jahrhunderts. Paul Ehrlich nutzte die Erkenntnisse von Robert Koch zur Formulierung des nach ihm benannten „Ehrlichschen Prinzip der selektiven Toxizität“: Wenn (wie Koch gezeigt hatte) Mikroorganismen spezifisch angefärbt werden können, wenn also ein Farbstoff eine unterschiedliche Affinität zum Mikro- oder Makroorganismus besitzt, dann müsste es auch möglich sein, Substanzen zu finden, die Mikroorganismen abtöten oder

zumindest in ihrem Wachstum hemmen, ohne den Wirtsorganismus empfindlich zu schädigen [11, 12]. So hat z.B. folgerichtig die Verabreichung von Methylenblau bei Malariakranken eine Eindämmung des Fiebers bewirkt. Auch der von Ehrlich entwickelte Wirkstoff Salvarsan basierte auf Farbstoffen. Er wirkt gegen Syphilis und war eines der bedeutsamsten Medikamente der damaligen Zeit. Ferner führten Ehrlichs Forschungen zur Behandlung der Schlafkrankheit mit Trypanrot 1920 zu Suramin, einem noch heute eingesetzten Arzneimittel [8].

Gerhard Domagk beschäftigte sich ebenfalls mit der Verwendung von Azofarbstoffen als Antibiotika. So beobachtete er 1932, dass das rote Sulfachrysiodin das Wachstum von Streptokokken zu hemmen vermochte. Dies führte in den nächsten Jahren zur Entwicklung einer Vielzahl von Sulfonamiden (vgl. Kapitel 1.2.1.3).

Daneben fand sich noch eine andere Quelle für Antibiotika, nämlich die von Pilzen und Bakterien produzierten Sekundärmetaboliten.<sup>1</sup> Ende 1928 entdeckte Alexander Fleming, dass Schimmelpilze der Art *Penicillium notatum* eine Substanz abgeben, die auf eine Reihe von Bakterienarten tödlich wirkt, insbesondere auf Gram-positive Bakterien. Obwohl er seine Ergebnisse in zwei Zeitschriften veröffentlichte und auch andeutete, dass dieses „Penicillin“ als Medikament geeignet sein müsste, dauerte es noch zehn Jahre, bevor diese Idee wieder aufgegriffen wurde. 1939 führten Howard Walter Florey und Ernst Boris Chain die Forschung weiter, aber erst ab etwa 1946 wurde Penicillin im klinischen Alltag eingesetzt.

Diese Erkenntnisse führten in der Folge zur Isolierung einer großen Zahl von Antibiotika aus Mikroorganismen, wie z.B. Gramicidin, Streptomycin [13, 14], Chloramphenicol und Tetracyclin. Weiterhin wurde jede dieser Substanzen noch für bessere Wirksamkeit und Verträglichkeit strukturell modifiziert, so dass eine Vielzahl von verschiedenen Antibiotika entwickelt wurden: So standen z.B. 1992 mehr als 50 Penicilline, 70 Cephalosporine, 12 Tetracycline, 8 Aminoglykoside, 1 Monobactam, 3 Carbapeneme, 9 Makrolide, 2 neue Streptogramine und 3 Dihydrofolsäure-Reduktase-Inhibitoren zur Verfügung [15].

---

<sup>1</sup> Dies war auch die früher vorgenommene Definition eines Antibiotikums: Ein antimikrobiell wirksamer Stoff biologischen Ursprungs (im Gegensatz zum synthetisch gewonnenen Chemotherapeutikum). Von dieser Unter-  
teilung ist man inzwischen allerdings abgerückt.

## 1.2.1 Einteilung der Antibiotika

Es gibt vier hauptsächliche Angriffspunkte auf die Erreger, denen entsprechend man die Wirkstoffe auch meist unterteilt:

- Hemmung der Zellwandsynthese
- Blockade der Proteinsynthese
- Unterdrückung der Nucleinsäuresynthese
- Beeinflussung der Zytoplasmamembran

Diese Mechanismen werden in den Kapiteln 1.2.1.1 bis 1.2.1.4 mit Beispielen genauer beleuchtet.

Weiterhin muss beachtet werden, dass die Wirkstoffe (teilweise auch abhängig von ihrer Konzentration) entweder die Keimvermehrung hemmen (bakteriostatische Wirkung) oder die Keime abtöten (bakterizide Wirkung). Dabei gilt aber in beiden Fällen, dass die „wirtseigene Abwehr“, also das Immunsystem der infizierten Person, eine wesentliche Voraussetzung für den Erfolg der Behandlung mit Antibiotika ist.<sup>2</sup> Ferner wirken manche Antibiotika nur gegen sich schnell vermehrende (proliferierende) Keime, während andere auch ruhende Keime betreffen. Es gibt aber noch eine Vielzahl weiterer Faktoren, die die Wirksamkeit von Antibiotika beeinflussen, deren Darstellung aber den Rahmen dieser Einführung sprengen würden.

Wichtig ist aber in allen Fällen, dass die Wirkstoffe in den nötigen Konzentrationen keine oder nur geringe Wirkung auf den Organismus der infizierten Person haben. Daher wirken die meisten Antibiotika auf Zellbestandteile oder Prozesse, die in dieser Form bei menschlichen Zellen nicht vorkommen.

### 1.2.1.1 Hemmung der Zellwandsynthese

Wie Abb. 1 zeigt, bestehen die Zellwände [11, 17] sowohl von Gram-positiven als auch von Gram-negativen Bakterien aus einer inneren Membran, auch als Zytoplasmamembran bezeichnet, um die herum sich ein Mureingerüst spannt.<sup>3</sup> Dieses Mureingerüst ist bei den beiden Bakteriensorten unterschiedlich stark ausgeprägt. Bei Gram-positiven Bakterien ist es etwa 250 Å dick und macht somit ca. 50 % der Zellwand aus, bei Gram-negativen Bakterien beträgt die Dicke nur etwa 30 Å und entspricht nur 5-10 % der Zellwand. Die Grundbausteine sind Aminosukerketten (die Glykane) und Oligopeptide, welche die Glykanstränge zu einem

---

<sup>2</sup> Dies ist auch einer der Gründe für das relativ häufige Therapieversagen bei Infizierten mit Immuninsuffizienz.

<sup>3</sup> Die Gram-negativen Bakterien verfügen weiterhin noch zwischen diesen beiden Zellwandbestandteilen über einen als periplasmatischen Raum bezeichneten Zwischenraum sowie zusätzlich über eine zweite, äußere Membran.

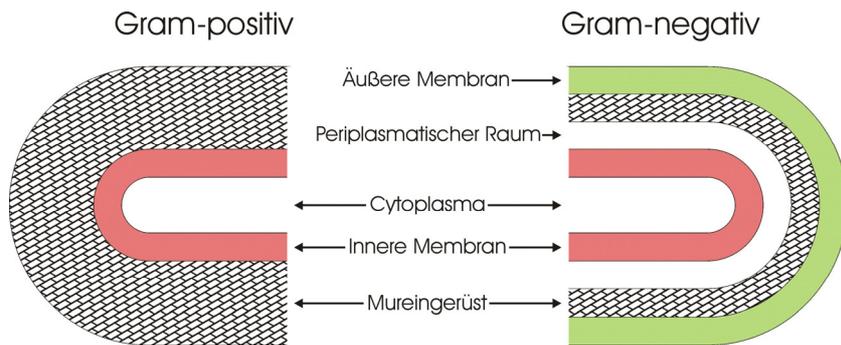


Abb. 1: Schematische Darstellung des Aufbaus der Zellwände bei Gram-positiven und -negativen Bakterien (nach [11]).

zweidimensionalen Gitter quervernetzen. Von diesen Netzen sind mehrere Schichten<sup>4</sup> übereinander gelagert und wahrscheinlich auch noch in der dritten Dimension miteinander verknüpft. Weiterhin bilden die einzelnen Schichten (zumindest bei Gram-positiven Bakterien) ein einziges dreidimensionales Makromolekül in der Form eines Beutels, das daher auch als Mureinsakkulus bezeichnet wird.

Die Glykanstränge bestehen aus sich abwechselnden Einheiten von N-Acetylglucosamin und dessen Milchsäureether, der N-Acetylmuraminsäure. Die quervernetzenden Oligopeptide sind spezifisch für die verschiedenen Bakterienarten.<sup>5</sup>

Die Bauteile dieses Mureingerüsts werden im Zytoplasma hergestellt und mittels spezieller Transportmoleküle zur Außenseite der inneren Membran transportiert. Dort wird das vorhandene Glykanpolymer durch Transglycosylasen verlängert und anschließend erfolgt die Quervernetzung der einzelnen Stränge durch Einsatz von Transpeptidasen.

Dabei ist beim Auf- und Umbau des Mureingerüsts im Rahmen von Zellteilung und -wachstum die genaue Abfolge der einzelnen Schritte für das Bakterium lebenswichtig, da im Inneren der Bakterien ein durch die Osmose bedingter Überdruck von mehreren Atmosphären herrscht. Daher sorgen schon kleine Instabilitäten in der Zellwand für die sofortige Zerstörung des Bakteriums (Bakteriolyse). Solche Instabilitäten treten z.B. auf, wenn  $\beta$ -Lactam-Antibiotika (z.B. Penicilline) eingesetzt werden, um die Transpeptidasen irreversibel zu blockieren.<sup>6</sup>

Die Enzyme, die an der Mureinsynthese beteiligt sind und die durch Bindung an  $\beta$ -Lactam-Antibiotika ihre Aktivität verlieren, werden als Penicillin-bindende Proteine (PBP) bezeichnet. Bisher ist die Existenz von sieben verschiedenen PBPs gesichert, wobei aber nicht alle Bakterienarten über alle sieben verfügen. Da diese PBPs unterschiedliche Affinitäten zu den verschiedenen  $\beta$ -Lactam-Antibiotika aufweisen, kann damit zum Teil auch die unterschiedliche Wirksamkeit dieser Antibiotika auf die verschiedenen Bakterienarten erklärt werden. Fer-

<sup>4</sup> Bei Gram-positiven Bakterien wurden bis zu 20 solcher Schichten beobachtet.

<sup>5</sup> Sie bestehen z.B. bei *Staphylococcus aureus* aus Tetrapeptiden und einer Pentaglyzinbrücke.

<sup>6</sup> Dies ist der Grund, warum diese Antibiotika zwar bakterizid wirken, aber nur gegen proliferierende Keime.

ner enthalten die Zellwände höherer Lebewesen kein Mureingerüst, daher werden sie auch nicht durch diese Antibiotika beeinflusst.

Die bekanntesten Vertreter der  $\beta$ -Lactam-Antibiotika sind die schon erwähnten Penicilline, deren Basis die 6-Aminopenicillansäure darstellt. Diese ist in Abb. 2 zusammen mit dem Penicillin-Grundgerüst und einigen Beispielen aus dieser Gruppe gezeigt. Dabei stellt Benzylpenicillin (Penicillin G) das einzige aus den Kulturen von *Penicillium notatum* (bzw. später *Penicillium chrysogenum*) isolierte Penicillin dar, das praktische Bedeutung erlangt hat. Es ist sehr wirksam, muss aber injiziert werden, da es bei oraler Einnahme im Magen-Darm-Trakt vor Eintritt in den Blutkreislauf weitgehend zerstört wird.<sup>7</sup> Dahingegen kann man Phenoxymethylpenicillin auch oral verabreichen, allerdings ist seine Wirkstärke merklich niedriger. Ampicillin stellt ein Breitspektrum-Penicillin dar, das gegen eine Vielzahl von Erregern wirksam ist. Und das zuletzt genannte Oxacillin ist ein Penicillinase-stabiles Penicillin, dessen besondere Eigenschaften in Kapitel 1.3.1.3 erklärt werden.

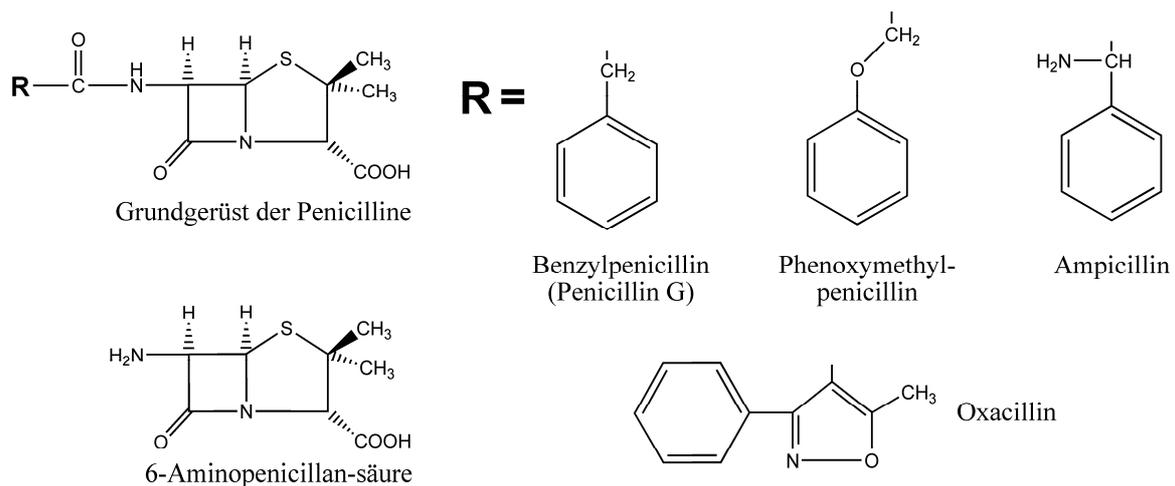


Abb. 2: Struktur des Penicillin-Grundgerüsts, der 6-Aminopenicillinsäure sowie einiger Stellvertreter aus der Gruppe der Penicilline.

Es gibt aber noch eine große Zahl von weiteren Penicillinen mit veränderten Resten und entsprechend unterschiedlichen Eigenschaften, auf deren Beschreibung aber aus Platzgründen verzichtet wird.

In diese Gruppe der Antibiotika fallen aber auch noch weitere Untergruppen, wie z.B. die Cephalosporine, die Carbapeneme und die Monobactame, die von anderen Mikroorganismen produziert werden und dennoch ein ähnliches, wenn auch leicht verändertes, Grundgerüst aufweisen (Abb. 3). Von diesen existiert ebenfalls eine Vielzahl von semisynthetischen und natürlichen Derivaten.

<sup>7</sup> Es weist also eine niedrige Bioverfügbarkeit bei oraler Applikation auf.

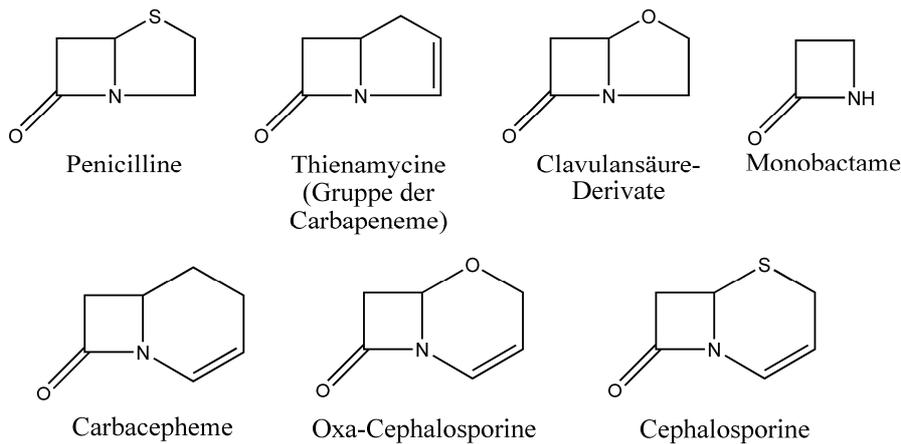


Abb. 3: Eine Übersicht über die Grundgerüste der  $\beta$ -Lactam-Antibiotika.

Eine weitere Gruppe von Antibiotika, die die Zellwandsynthese hemmen, sind die Glykopeptide. Diese hemmen aber nicht die Transpeptidasen, sondern lagern sich schon bei der im Zytoplasma stattfindenden Synthese der Bauteile des Mureingerüsts endständig an diese an und verhindern dadurch später die Elongation der Peptidoglykanketten und ihre Quervernetzung. Dabei ist insbesondere das Vancomycin (Abb. 4) zu nennen, das zu den Reserveantibiotika gehört und noch in Kapitel 1.3.2.4 Erwähnung findet.

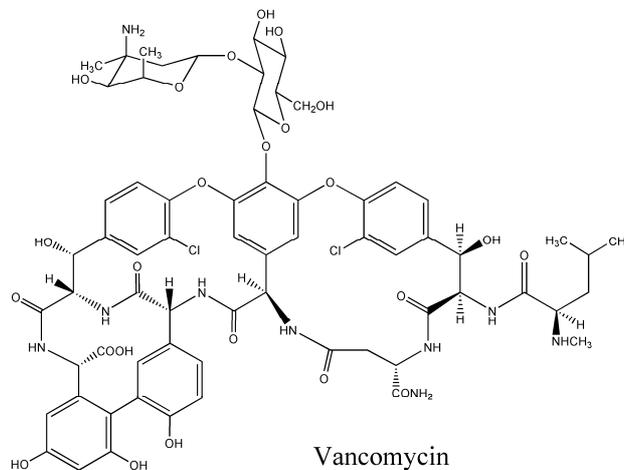


Abb. 4: Strukturformel des Reserveantibiotikums Vancomycin aus der Gruppe der Glykopeptide.

### 1.2.1.2 Blockade der Proteinsynthese

Um die verschiedenen Angriffspunkte der die Proteinsynthese [17] beeinflussenden Antibiotika zu erklären, soll hier die Proteinbiosynthese in Bakterien kurz erläutert werden. (Für eine genauere Diskussion dieses Themas siehe z.B. [17, 18].)

Nachdem die Informationen der DNA während der Transkription auf die mRNA überschrieben wurden (siehe Kapitel 1.2.1.3), lagern sich die beiden Ribosom-Untereinheiten (30S und

50S) am Startercodon (AUG) der mRNA zum 70S-Ribosom zusammen. Es folgen zwei an die ersten beiden Codons passende tRNAs, die jeweils mit einer entsprechenden Aminosäure beladen sind und an das Ribosom andocken. Dabei besetzt die erste tRNA die Donorseite und die zweite die Akzeptorseite des Ribosoms. Die erste Aminosäure wird nun durch Transpeptidierung auf die zweite Aminosäure übertragen und anschließend die inzwischen „leere“, erste tRNA von der Donorseite abgetrennt. Die zweite tRNA, die nun das Dipeptid trägt (und noch an der Akzeptorseite hängt), geht an die dadurch frei gewordene Donorseite und auch die mRNA rutscht ein Triplet weiter, so dass nun an der Akzeptorseite des Ribosoms das Codon für die dritte Aminosäure steht (Translokation). Nun dockt die passende tRNA an das dritte Codon, die von ihr getragene Aminosäure wird an das begonnene Protein gebunden und das Ganze anschließend durch Translokation eine Einheit weiter geschoben. Dieser als Elongation bezeichnete Prozess wiederholt sich, bis die mRNA ein Stopp-Codon zeigt, woraufhin im fertigen Protein ein Kettenabbruch erfolgt und dieses zur weiteren Verarbeitung abgespalten wird. Der gesamte Prozess von der mRNA zum Protein wird als Translation bezeichnet.

Wie man sieht, stellt das Ribosom einen zentralen Bestandteil der Proteinbiosynthese dar und ist daher auch ein Hauptangriffspunkt. Die Wirkstoffe zeigen aber eine wesentlich höhere Affinität zu Bakterien- als zu Säugetier-Ribosomen, wodurch bei richtiger Dosierung bevorzugt bakterielle Ribosomen angegriffen werden.<sup>8</sup>

Aminoglykosid-Antibiotika, wie z.B. das in Abb. 5 gezeigte Streptomycin (das auch das zweite in die Therapie eingeführte und von Mikroorganismen produzierte Antibiotikum darstellt), reichern sich erst im Bakterium an, um dann irreversibel an die 30S-Untereinheit zu binden. Dadurch behindern sie die Anlagerung von tRNA, was wiederum sowohl den Beginn als auch die Verlängerung der Peptidkette verhindern kann. Ferner kommt es zu Ablesefehlern, wodurch falsche Enzym- und Strukturproteine, sog. „Nonsense“-Proteine, gebildet werden. Die Tetracycline, z.B. das namensgebende Tetracyclin in Abb. 5, greifen ebenfalls am Ribosom an und verhindern dadurch ebenso die Anlagerung von tRNA.

Makrolide, wie z.B. Erythromycin, interferieren dagegen nach Bindung an die 50S-Untereinheit mit der Translokation, während Chloramphenicol die Transpeptidierung stört (beide in Abb. 5). Im Gegensatz zu den bisher genannten Substanzen wirkt Mupirocin (nicht abgebildet) nicht am Ribosom, sondern verhindert die Produktion der Isoleucin-tRNA, wodurch diese Aminosäure nicht für die Proteinsynthese verfügbar ist. Allerdings ist dieser Wirkstoff nicht plasmastabil und somit nur zur äußerlichen Anwendung geeignet.

---

<sup>8</sup> Dies könnte u.a. an der geringeren Größe der bakteriellen Ribosomen im Vergleich zu eukaryotischen liegen. (Bei letzteren bilden ein 60S- und eine 40S-Untereinheit zusammen das 80S-Ribosom).

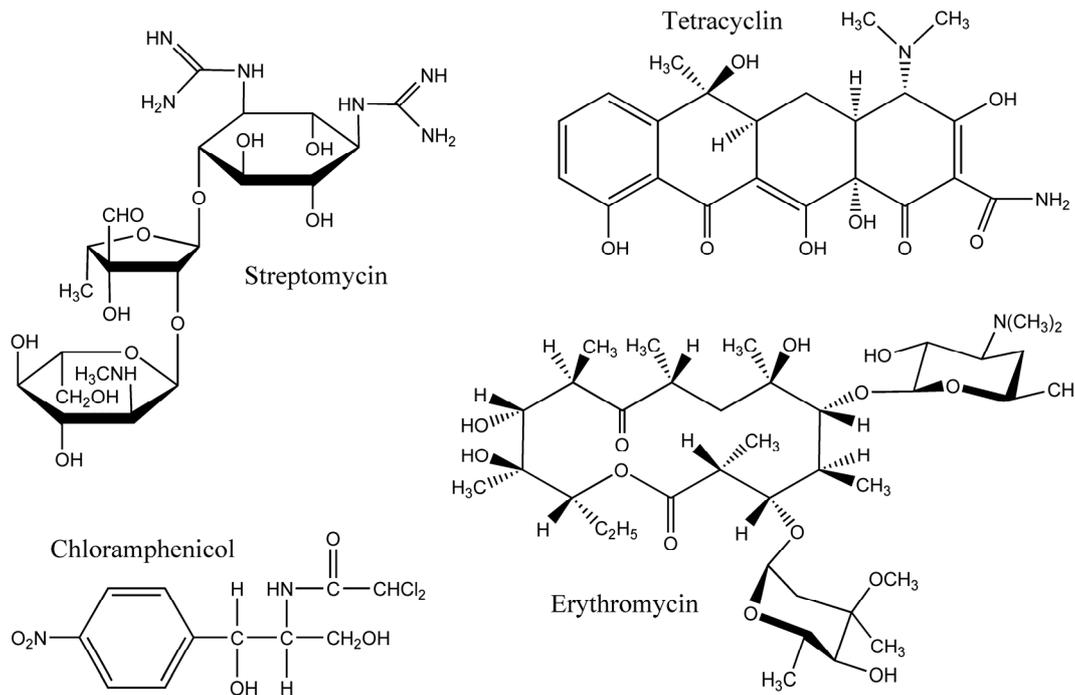


Abb. 5: Strukturen einiger Antibiotika, die die Proteinsynthese beeinflussen.

### 1.2.1.3 Unterdrückung der Nukleinsäuresynthese

Auch hier sind die Angriffspunkte sehr verschieden und betreffen nicht nur die Nukleinsäuresynthese, sondern auch direkt die DNA bzw. die Prozesse, an denen sie beteiligt ist.

Zwei Beispiele für die Beeinflussung der Nukleinsäuresynthese sind die Sulfonamide (deren Grundgerüst Abb. 6 zeigt) und die Diamino-benzylpyrimidine (vertreten durch das Trimethoprim ebenfalls in Abb. 6). Tetrahydrofolsäure, das als Coenzym am Nukleotidaufbau beteiligt ist, wird bei Bakterien und auch bei höheren Lebewesen durch Reduktion mittels Dihydrofolsäurereductase aus Dihydrofolsäure synthetisiert. Letztere wird aus Folsäure hergestellt, die aber von Bakterien nicht aufgenommen werden kann, sondern von ihnen selber aus p-Aminobenzoessäure produziert werden muss. Höhere Lebewesen dagegen können Folsäure (Vitamin B9) nicht selber synthetisieren, sondern sind auf die Zufuhr mit der Nahrung angewiesen.

Sulfonamide verdrängen nun die p-Aminobenzoessäure vom entsprechenden Enzym, verhindern dadurch die Folsäuresynthese und führen somit zur Bakteriostase, während sie gleichzeitig für den Menschen weitgehend untoxisch ist.

Die Diamino-benzylpyrimidine hemmen dagegen spezifisch die Dihydrofolsäurereductase und somit einen Syntheseschritt, der auch beim Menschen eine wichtige Rolle spielt. Da sie

dabei aber eine um Zehnerpotenzen höhere Affinität zum Enzym der Bakterien (im Vergleich zum entsprechenden Enzym beim Säuger) haben, sind sie dennoch als Medikament geeignet. Rifampicin (Abb. 6), ein wichtiger synthetisch hergestellter Wirkstoff zur Behandlung von Tuberkulose und Lepra, hemmt die bakterielle DNA-abhängige RNA-Polymerase, die für die Transkription der DNA in mRNA zuständig ist, und greift dabei wahrscheinlich an deren  $\beta$ -Untereinheit an.

Ein ganz anderes Ziel haben die Chinoloncarbonsäuren (vertreten durch das Ciprofloxacin in Abb. 6) und ihre Analoga. Bei ihnen handelt es sich um so genannte Gyrasehemmer. Die DNA-Gyrase gehört zu den Topoisomerasen II, die bei Bakterien an Replikation, Transkription, Rekombination und Reparatur der DNA beteiligt sind. Sie lösen Zucker-Phosphat-Bindungen, um die erneute Spiralisierung der DNA zu erlauben, da diese z.B. nach Zellteilung und mRNA-Bildung ganz oder teilweise entspiralisiert vorliegt. Nachdem die Spiralisierung stattgefunden hat, werden diese geöffneten Bindungen normalerweise wieder geschlossen, bevor sich die Gyrasen abspalten. Wahrscheinlich interferieren aber an dieser Stelle die Gyrasehemmer, wodurch der Stoffwechsel bei empfindlichen Bakterien rasch zusammenbricht. Da die chromosomale Konfiguration der DNA bei höheren Organismen sehr von der bakteriellen abweicht, ist die Wirkung dieser Substanzen hauptsächlich auf Bakterien beschränkt.

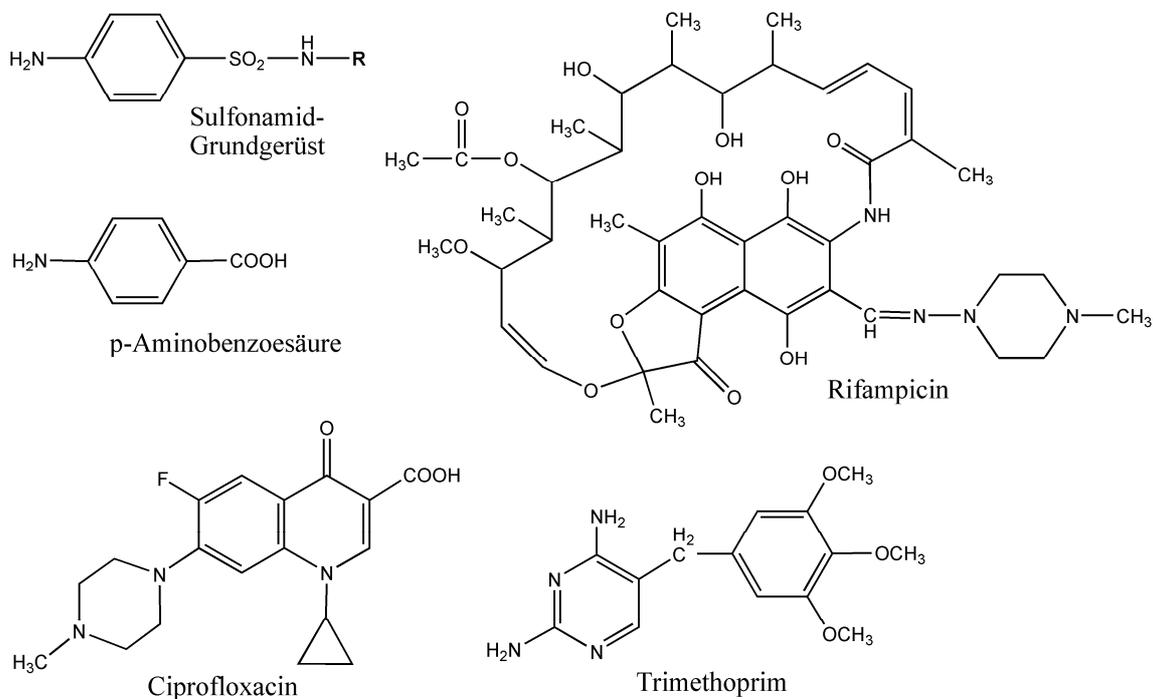


Abb. 6: Strukturen einiger Antibiotika, die die Nukleinsäuresynthese beeinflussen. Dabei ist Ciprofloxacin stellvertretend für die Chinoloncarbonsäuren aufgeführt.

### 1.2.1.4 Beeinflussung der Zytoplasmamembran

Da die Zytoplasmamembranen bei Bakterien und Menschen große Ähnlichkeiten aufweisen, gibt es nur wenige Antibiotika in dieser Gruppe. Und die vorhandenen zeichnen sich daher auch durch starke Nebenwirkungen aus, sofern sie nicht nur äußerlich eingesetzt werden. Ein Beispiel sind die Polypeptid-Antibiotika, wie z.B. Polymyxin B (Abb. 7), die die mikrobielle Zytoplasmamembran schädigen, da sie als kationische Detergentien wirken. Sie schädigen aber stark die Nieren und das Nervensystem (d.h. sie sind nephro- und neurotoxisch) und sind daher nur auf unverletzter (Schleim-)Haut einzusetzen.

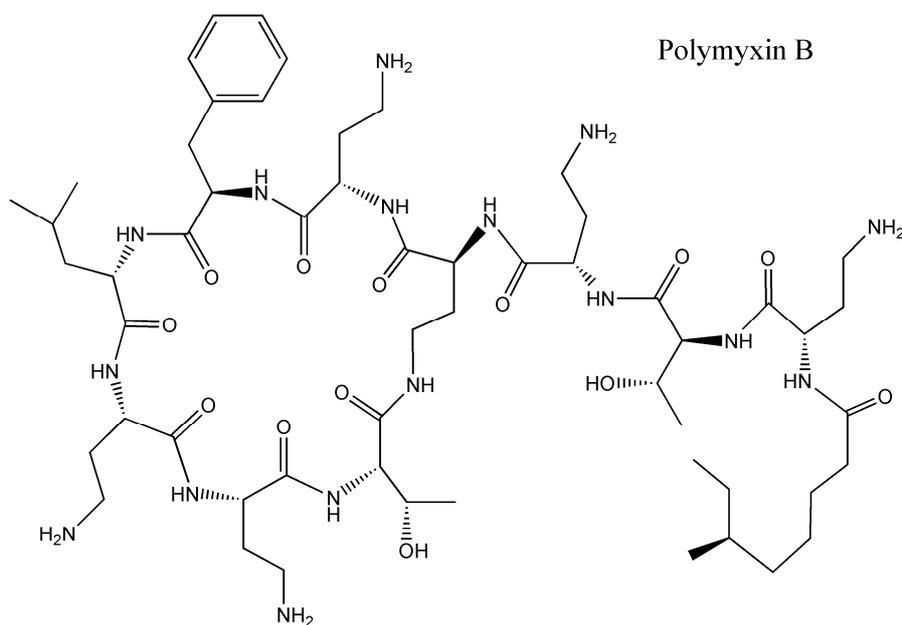


Abb. 7: Struktur von Polymyxin B, einem Wirkstoff, der die Zellmembran angreift.

## 1.3 Resistenz

*Ein Keim ist resistent, wenn die MHK (Minimale Hemmkonzentration) höher liegt als die höchste in vivo erreichbare (und nicht toxische) Konzentration des Wirkstoffs im Blutserum bzw. Gewebe.*

Als die ersten Antibiotika in den 1940er und 50er Jahren in den klinischen Alltag eingeführt wurden, wurden sie noch als Wunderdrogen bejubelt. Diesem Anspruch wurden sie auch gerecht, konnte man mit ihnen doch eine Vielzahl von bakteriellen Infektionen heilen und so zahllose Leben retten. Man dachte, die Schrecken der Infektionskrankheiten wären durch die Vielzahl an verfügbaren Antibiotika endlich bezwungen. Doch leider erwiesen sich die Erreger als ebenso einfallsreich in ihrer Verteidigung.

Um die Bedeutung dieser Resistenzen zu zeigen, hier ein kurzes Beispiel aus der Literatur: 1941 konnte eine durch Pneumokokken ausgelösten Lungenentzündung mit der Gabe von 10.000 Einheiten Penicillin viermal am Tag für vier Tage geheilt werden. Heute kann ein Patient 24 Millionen Einheiten täglich erhalten und trotzdem an einer durch Pneumokokken verursachten Hirnhautentzündung (Meningitis) sterben [15].

### 1.3.1 Die Resistenz-Mechanismen der Bakterien

Wie man in Kapitel 1.2 gesehen hat, gibt es eine Vielzahl von Angriffspunkten für die zahlreichen Antibiotika. In den folgenden drei Kapiteln sollen die Methoden, mit denen die Bakterien dieser Bedrohung begegnen, kurz mit einigen Beispielen umrissen werden [11, 19, 20].

#### 1.3.1.1 Enzymatische Inaktivierung oder Modifikation des Antibiotikums

Schon 1940, noch bevor sich Penicillin im klinischen Alltag etablierte, identifizierten Abraham und Chain [21] ein bakterielles Enzym, das den  $\beta$ -Lactam-Ring des Antibiotikums hydrolysieren und es dadurch inaktivieren konnte (siehe Abb. 8). Sie merkten an, dass dieses Enzym bei einer Therapie mit Penicillin Probleme bereiten könnte. Dem war auch so, allerdings in einem Maße, das damals noch nicht abzusehen war. Denn diese  $\beta$ -Lactamase ist einer der Hauptmechanismen der bakteriellen Resistenz gegen  $\beta$ -Lactam-Antibiotika. Natürlich wurde versucht, diesem Problem zu begegnen. Eine der Strategien war die Inhibierung der  $\beta$ -Lactamase z.B. durch Clavulansäure (siehe Abb. 9), das selber nur schwach antimikrobiell wirkt und auch genauso von der  $\beta$ -Lactamase angegriffen wurde wie die Antibiotika. Allerdings wird die Esterbindung in dieser Verbindung nur sehr viel langsamer von dem Enzym

hydrolysiert, so dass sich die  $\beta$ -Lactamasen mit diesen „falschen Zielen“ beschäftigen, während der eigentliche Wirkstoff seine Arbeit verrichten kann. Aber die Bakterien reagierten, indem sie zum einen einfach mehr  $\beta$ -Lactamasen und zum anderen neue Typen von  $\beta$ -Lactamasen produzierten, die die Inhibitoren nicht mehr angriffen.

Eine andere Strategie war das Design  $\beta$ -Lactamase-stabiler Antibiotika, wie z.B. Methicillin (bzw. dessen schon erwähnter Nachfolger Oxacillin in Abb. 2). Diese werden infolge der sterischen Abschirmung des  $\beta$ -Lactam-Rings nicht oder zumindest sehr viel weniger von dem Enzym hydrolysiert, besitzen aber auch eine bedeutend (Faktor 10-100) geringere Wirkstärke. Aber auch hier konnten die Bakterien wieder einen Ausweg finden (siehe 1.3.1.2).

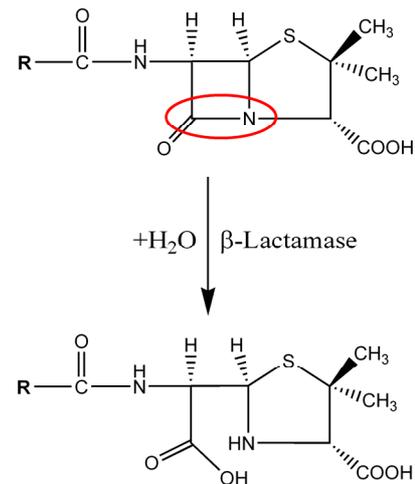


Abb. 8: Deaktivierung eines Penicillins durch Öffnung des  $\beta$ -Lactamrings mittels einer  $\beta$ -Lactamase.

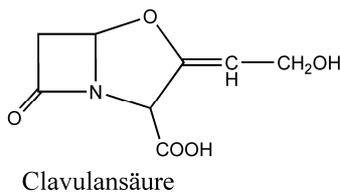


Abb. 9: Strukturformel eines  $\beta$ -Lactamase-Inhibitors.

Dieser Mechanismus ist natürlich nicht nur auf  $\beta$ -Lactamasen beschränkt. So existieren z.B. auch Chloramphenicol-Acetyltransferasen und Enzyme, die Aminoglykosid-Antibiotika (siehe 1.2.1.2) acetylieren oder phosphorylieren, um nur einige Beispiele zu nennen.

### 1.3.1.2 Veränderung der Zielstruktur

Um das Beispiel der Resistenz gegen  $\beta$ -Lactam-Antibiotika weiterzuführen, gibt es auch einige Bakterien, die zwar nicht verhindern, dass die Wirkstoffmoleküle an ihrem Wirkungsort ankommen, aber die die Zielstruktur dahingehend verändern, dass diese eine sehr viel geringere Affinität zum Antibiotikum aufweist. Dies ist z.B. bei den PBPs (siehe Kapitel 1.2.1.1) von *Streptococcus pneumoniae* der Fall [22], die nun nicht mehr vom Antibiotikum angegriffen werden.

Eine Abwandlung dieses Mechanismus ist die Produktion sowohl von „normalen“ als auch modifizierten Zielstrukturen. Dadurch behält sich das Bakterium mehr Optionen offen und kann dennoch auch nach Blockade der normalen Zielstruktur weiterhin effizient funktionieren.

### 1.3.1.3 Verringerte Aufnahme des Wirkstoffs

Der dritte Mechanismus zielt auf die Konzentrationserniedrigung des Wirkstoffs in dem Bakterium ab. Dies kann zum einen durch eine Verringerung der Permeabilität der Zellwand geschehen, indem das Bakterium auf die Produktion bestimmter Porine verzichtet. So ist z.B. *Pseudomonas aeruginosa* sehr anfällig für Imipinem (einem  $\beta$ -Lactam-Antibiotikum aus der Untergruppe der Carbapeneme, Kapitel 1.2.1.1), da dieser Wirkstoff sehr gut durch einen bestimmten Ionenkanal (OprD) diffundieren kann. Diese speziellen Kanalproteine scheinen für die Bakterien aber nicht von lebenswichtiger Bedeutung zu sein, denn inzwischen sind eine Vielzahl von *Pseudomonas aeruginosa*-Stämmen isoliert worden, bei denen diese Porine fehlen und die dadurch resistent gegen Imipinem wurden [23]. Dieser Mechanismus ist für sich alleine genommen aber meist nicht sehr effizient, da selbst die effektivste Permeabilitätsbarriere nicht das Eindringen (Influx) kleiner Wirkstoffmoleküle verhindern kann. Allerdings kann er die Zuflussgeschwindigkeit erniedrigen und dies hilft nicht nur z.B. beim kontrollierten Abbau des Wirkstoffs durch Enzyme (wie in Kap. 1.3.1.1 erläutert), sondern auch beim zweiten Mechanismus zur Erniedrigung der Wirkstoffkonzentration im Bakterium, dem aktiven Efflux. Diesen beschleunigten und unter Verbrauch von Energie erfolgenden Transport aus der Zelle mittels spezieller Transportproteine kann man mit den Lenzpumpen der Schifffahrt vergleichen. Er spielt insbesondere bei der Tetracyclin-Resistenz vieler Enterobakterien eine bedeutende Rolle, indem er den Wirkstoff schneller hinauspumpt, als dieser in die Zelle eintreten kann [19].

Die in den letzten drei Kapiteln beschriebenen Mechanismen liegen meist nicht jeweils alleine vor, sondern werden von den Bakterien für einen effektiveren Schutz oft kombiniert.

### 1.3.2 Entstehung der Resistenzen und Mechanismen ihrer Verbreitung [24]

1941 konnten fast alle Stämme von *Staphylococcus aureus* mit Penicillin G behandelt werden, aber schon 1944 traten erste Resistenzen auf. 1992 waren mehr als 95% der *Staphylococcus aureus*-Stämme weltweit resistent gegen Penicillin G, Ampicillin und andere Penicilline [25]. Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus*-Stämme<sup>9</sup> (MRSA) waren Mitte der 1980er durch die neu eingeführte 2. Generation der Chinoloncarbonsäuren (siehe 1.2.1.3) sehr gut zu inhibieren [26], aber schon 1992 zeigte sich bei einer Studie in einer New Yorker Klinik, dass mehr als 80% der beobachteten Stämme resistent gegen diese Antibiotika waren. In diesem Zusammenhang zeigte eine Studie des US-amerikanischen CDC (Centers for Disease Control

---

<sup>9</sup> Eine der Gruppen der mehrfach-resistenten Problemkeime, auch mit dem Akronym MRSA bezeichnet.

and Prevention), dass die Resistenz der MRSA gegen eine dieser Chinoloncarbonsäuren (Ciprofloxacin) innerhalb eines Jahres von weniger als 5% auf über 80% stieg [27].

Aber woher kommen diese Resistenzen? Eine mögliche Quelle sind Mutationen. Denn wenn ein Stamm durch Mutation eine Resistenz erlangt, wird er natürlich durch den evolutionären Druck der Antibiotika-Therapie selektiert. Dadurch sind die überlebenden Bakterien von nun an resistent, sofern sie nicht vom körpereigenen Immunsystem eliminiert wurden; dies geschieht bevorzugt bei zu geringer Dosierung sowie zu frühem Abbruch der Behandlung [11].<sup>10</sup>

Mutationen alleine sind jedoch keine ausreichende Erklärung für die starke und vor allem schnelle Verbreitung von Resistenzen. Wichtiger sind die Mechanismen, die es den Bakterien erlauben, die von ihnen erworbenen Resistenzen nicht nur an ihre Artgenossen, sondern auch über die Grenzen hinweg an andere Bakterienarten weiterzugeben. Diese Mechanismen und ihre Auswirkungen sollen in den folgenden Kapiteln kurz erläutert werden.

### 1.3.2.1 Transformation

Hierbei handelt es sich streng genommen nicht um einen Mechanismus zur Übertragung von genetischen Informationen, sondern die Transformation bezeichnet nur die Aufnahme von DNA durch ein Bakterium. Diese DNA kann chromosomaler Natur sein oder in Form eines Plasmids vorliegen. Der Prozess ist, zumindest im Labor, nicht sehr effizient, da die DNA nur selten aufgenommen wird und selbst wenn dies geschieht, werden die DNA-Moleküle oft vom Bakterium abgebaut, bevor sie repliziert werden können. Es gibt aber einige Bakterienarten (insbesondere die Gattungen *Streptococcus* und *Bacillus*), die raffinierte Methoden zur Bindung und Aufnahme von DNA besitzen [28]. Dabei ist jedoch unklar, wie wichtig dieser Mechanismus für den Resistenztransfer „in freier Natur“ ist, da es schwierig ist, die Umgebungsbedingungen für Bakterien „in freier Natur“ zu definieren und somit im Labor zu überprüfen.

---

<sup>10</sup> In diesem Zusammenhang soll hier eine besonders beunruhigende Beobachtung erwähnt werden: Um den in Kapitel 1.3.1.1 erwähnten  $\beta$ -Lactamasen zu begegnen, wurden, wie schon erwähnt, neue Derivate erzeugt, deren veränderte Struktur von den Enzymen nicht mehr „erkannt“ werden sollte. Allerdings konnte schon die Veränderung einer einzigen Base im codierenden Gen die Substrat-Spezifität des Enzyms so weit verändern, dass es den neuen Wirkstoff wieder angreifen konnte [32]. Somit können solche Punktmutationen ausreichen, um 100 Millionen US-\$ an pharmakologischen Entwicklungskosten obsolet werden zu lassen [24].

### 1.3.2.2 Konjugation

Die Konjugation ist bei Bakterien der wichtigste natürliche Mechanismus zur Übertragung von genetischen Informationen innerhalb einer Generation.

Einige Bakterien verfügen über so genannte konjugative oder F-Plasmide (F für Fertilität) und werden daher als „F+“ oder männlich bezeichnet. Sie entwickeln nun fadenartige Gebilde auf der Oberfläche (so genannten „F Pili“), die an bestimmten Rezeptoren andocken können, die in der Zellhülle von solchen Bakterien zu finden sind, die nicht über ein F-Plasmid verfügen (F- bzw. weibliche Bakterien). Anschließend bildet sich bei der „F+“-Bakterie eine Ausstülpung der Zelloberfläche, die wie eine Brücke die Zytoplasmen beider Zellen miteinander verbindet. Durch diese Verbindung wird nun eine Kopie des F-Plasmids sowie – unter bestimmten Voraussetzungen – auch Kopien weiterer Plasmide an die „F-“-Zelle übertragen. Dadurch wird aus dieser zum einen ein „F+“-Bakterium, das aber zusätzlich noch über die Informationen verfügt, die sich auf dem übertragenen genetischen Material befanden.

Da dieser Prozess auch über Artgrenzen<sup>11</sup> hinweg stattfinden kann und sich Resistenzgene auch auf den F-Plasmiden befinden können, dürfte dies einen wichtigen Mechanismus zur Resistenzvermittlung darstellen.

### 1.3.2.3 Transduktion

Ein Bakteriophage ist ein Virus, dessen Wirt nur Bakterien sind. Ein solcher Phage infiziert ein Bakterium, indem er seine DNA injiziert, welche dann entweder in das Bakterienchromosom integriert wird oder – ähnlich einem Plasmid – frei im Zytoplasma vorliegt. In jedem Fall beginnt die Zelle nun neue Phagen-DNA und -hüllen herzustellen, die dann entweder kontinuierlich zusammengesetzt und an die Umgebung abgegeben werden oder sich erst ansammeln, um dann durch Lyse der Zelle freigesetzt zu werden. Allerdings geschieht es in etwa einem von tausend Fällen, dass statt Phagen-DNA ein Teil der Bakterien-DNA in die Hülle gerät. Der dabei entstehende Phage injiziert diese dann in eine andere Bakterie, wo sie wiederum in das Chromosom aufgenommen werden kann [17].

Weiterhin kann es nach Einbau der Phagen-DNA in das Bakterienchromosom geschehen, dass beim Kopieren der Phagen-DNA auch Teile der benachbarten Bakterien-DNA mitkopiert werden und dadurch bei der nächsten Infektion mit übertragen werden.

---

<sup>11</sup> Konjugation konnte sogar zwischen Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien [33, 34] sowie zu Hefen und in einem Fall auch zu Pflanzen [35, 36] nachgewiesen werden.

### 1.3.2.4 Konsequenzen dieser Mechanismen

Mit diesen Mechanismen lässt sich die schnelle und weitläufige Verbreitung von Resistenzen gut erklären. So können z.B. harmlose und immer im Körper anwesende Darmbakterien wie *Escherichia coli* bei – insbesondere unsachgemäßem – Gebrauch von Antibiotika Resistenzen erwerben und diese anschließend bei einer Infektion an die krankheitserregenden (pathogenen) Keime weitergeben. Es ergibt sich also ein körpereigenes Resistenzreservoir, aus dem Erreger schöpfen können.

Eine ähnliche Konsequenz hat auch die Verwendung von Antibiotika zur Prophylaxe und Wachstumsförderung in der Masttierhaltung. Dadurch kann sich in den Tieren ein Reservoir von resistenten Bakterien bilden, deren Resistenzen sich über die Nahrungskette auf die im menschlichen Verdauungstrakt lebenden Mikroorganismen übertragen können. Dieses Phänomen wurde z.B. schon bei der Verwendung des mit dem Vancomycin verwandten antimikrobiellen Futterzusatzmittels Avoparcin beobachtet [29].<sup>12</sup>

Aber auch im klinischen Alltag in Krankenhäusern haben diese Mechanismen gravierende Konsequenzen. Denn gerade hier treffen ein beständiger Evolutionsdruck und eine große Zahl unterschiedlicher Erreger mit verschiedenen Resistenzen aufeinander. Dadurch bildet sich insbesondere bei mangelnder Hygiene sehr schnell ein Reservoir mehrfach-resistenter Keime (sog. Hospitalflora), die zu ernstesten nosokomialen Infektionen führen können. Dabei sind besonders Staphylokokken und speziell MRSA zu nennen, die bevorzugt in den Nasenhöhlen des Pflegepersonals persistieren und hier ein Keimreservoir bilden, von dem aus sie auf Patienten übertragen werden können, um anschließend u.a. ihre Resistenzen auf andere Keime zu übertragen.

Mitte der 90er Jahre wurde auch noch eine andere Erklärung für die schnelle Verbreitung von Resistenzen gefunden. Die in der Pharmaindustrie zur Produktion verwendeten Mikroorganismen besitzen natürlich auch eine Resistenz gegen die von ihnen gebildeten Antibiotika. Werden nun die Wirkstoffe aus der Nährlösung isoliert, werden dabei auch die produzierenden Bakterien mit aufgearbeitet. Dadurch gelangen kleine Mengen ihrer DNA in die fertigen Arzneimittel, in denen sie auch schon nachgewiesen werden konnten [30]. Dadurch kann das Medikament auch gleich das den Bakterien helfende Resistenzgen enthalten!

---

<sup>12</sup> Daher wurde es auch 1997 von der EU verboten [37], woraufhin in verschiedenen Untersuchungen gezeigt werden konnte, dass die Häufigkeit der Vancomycin-resistenten Enterokokken (VRE, eine weitere Gruppe von mehrfach-resistenten Problemkeimen) sowohl in den Tieren als auch in den Menschen, die in den entsprechenden Gemeinschaften lebten, teilweise dramatisch abnahm [38, 39].

## 1.4 Ausblick und Lösungsansätze

Wie man sieht, gibt es zwar eine große Zahl von antibiotisch wirkenden Medikamenten und auch einige Schwachstellen bei den Bakterien, die als Angriffspunkte dienen können, doch leider haben auch die Bakterien Möglichkeiten, um in diesem Wettstreit siegreich zu sein. Und da es bis jetzt für jeden Wirkstoff schon eine Resistenz gibt, ist es wohl nur eine Frage der Zeit, bis sich ein Stamm entwickelt, bei dem sämtliche bisherigen Medikamente versagen. Aber man kann die Geschwindigkeit der Resistenzentwicklung heruntersetzen, indem man unter anderem

- die Anwendung der Antibiotika besser kontrolliert und sie auch nur dann verabreicht, wenn es erforderlich ist.<sup>13</sup>
- bei einer Therapie die Antibiotika in ausreichender Dosierung und hinreichend lange anwendet, um auch eine vollständige Erregerelimination zu erreichen.
- in Krankenhäusern mehr Wert auf gute allgemein-hygienische Maßnahmen (wie z.B. gründliche Desinfektion und Sterilisation) legt.
- die Nutzung von Antibiotika in der Tiermast zur Prophylaxe und Wachstumsförderung verbietet.

Dabei sollten diese Maßnahmen weltweit, auch in Ländern der zweiten und dritten Welt, ergriffen werden, da sich Resistenzen ebenso wie infektiöse Erreger durch die modernen Transportmethoden in kürzester Zeit global verbreiten können [31].

Da dies aber nur schwer umzusetzen sein dürfte, müssen neue Wirkstoffe mit neuen Wirkmechanismen entwickelt werden, um wieder einen Vorsprung gegenüber den Keimen zu haben. Denn die Bakterien werden sicher nicht aufgeben.

*[...] after all, the microbial population of this planet has survived successfully over the past 50 years in the face of relentless onslaught of antimicrobials. [...] [24]*

---

<sup>13</sup> So werden z.B. oft bei Infektionen Antibiotika verabreicht ohne vorher zu überprüfen, ob es sich nicht um eine virale Erkrankung handelt bzw. ob die infizierende Bakterienart überhaupt für das verwendete Antibiotikum anfällig ist.

## 2 Avilamycine

Avilamycine wurden erstmals 1959 aus den Kulturfiltraten von *Streptomyces viridochromogenes* Tü57 extrahiert, einem Stamm, der aus Bodenproben aus Caracas, Venezuela, isoliert wurde. [40]

Streptomyceten sind eine Gattung von Gram-positiven Boden-Bakterien, die zur Ordnung der Actinomycetales ("Strahlenpilze"; von griech.: aktís = Strahl, mykes = Pilz) gehören. Sie wachsen in Myzel-Form und bilden bei Nährstoffmangel auch Luftmyzelien aus, von denen anschließend Sporen abgeschnürt werden. Aus diesen kann dann bei ausreichendem Nährstoffangebot wieder ein Substratmyzel gebildet werden. Viele Streptomyceten bauen Zellulose, Chitin und andere schwer abbaubare Naturstoffe ab [41, 42]. Sie sind ferner – wie alle Actinomyceten – wichtige Produzenten von Sekundärmetaboliten (siehe Kapitel 2.3).

### 2.1 Struktur und physikalische Eigenschaften der Avilamycine

Avilamycine (Abb. 10a) gehören zusammen mit den Everninomicinen [43] (siehe Abb. 10b), den Flambamycinen [44] und den Curamycinen [45, 46] zur Gruppe der Orthosomycine.<sup>14</sup>

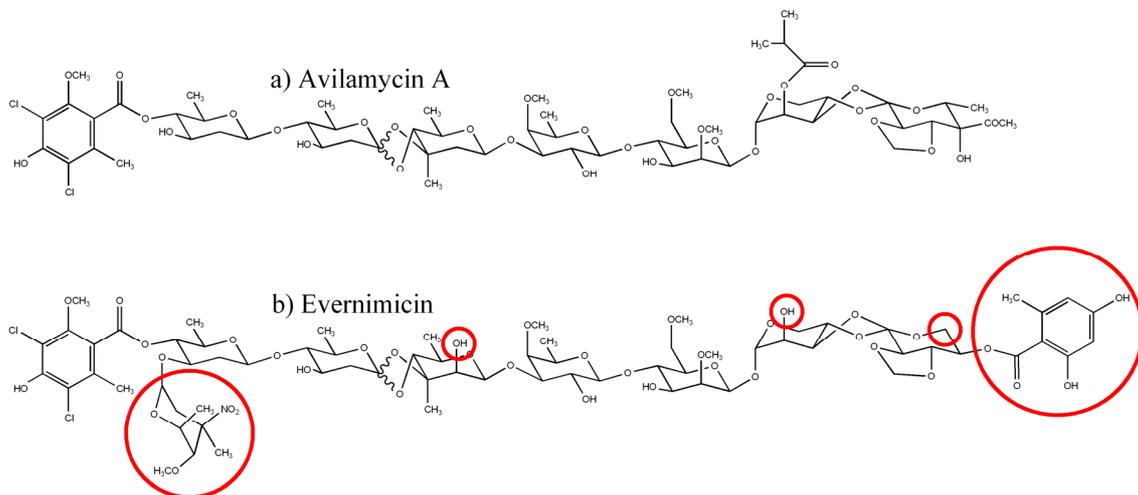


Abb. 10: Strukturen zweier zur Gruppe der Orthosomycine gehörenden Verbindungen:  
a) Avilamycin A (stellvertretend für die Avilamycine)  
b) Evernimicin (bzw. SCH27899 oder Ziracin, stellvertretend für die Everninomycine)  
Bereiche struktureller Unterschiede sind gekennzeichnet.

<sup>14</sup> Die Grundgerüste der Flambamycine und der Curamycine unterscheiden sich nur marginal von dem des Avilamycins und wurden daher nicht abgebildet. So ist z.B. das Curamycin A identisch mit Avilamycin B.

1968 wurden erste Strukturelemente sowie die antibiotische Wirkung aufgeklärt [47], die ersten vollständigen Strukturen der Avilamycine A, B und C folgten 1979 [48–50]. Inzwischen sind 16 Komponenten [51] dieses Antibiotika-Komplexes bekannt, die als Avilamycin A-N bezeichnet werden, aber nur geringe strukturelle Unterschiede aufweisen (Abb. 11 und Tab. 1, nach [51]).

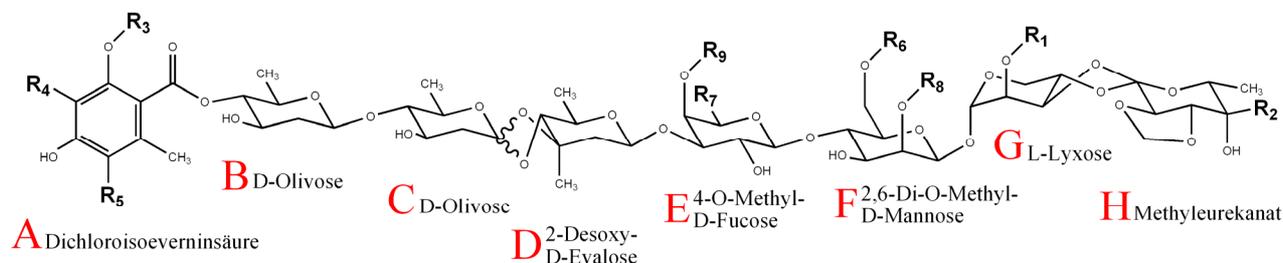


Abb. 11: Grundstruktur der Avilamycine

Avilamycin	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>6</sub>	R <sub>7</sub>	R <sub>8</sub>	R <sub>9</sub>
A	COCH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	COCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	Cl	Cl	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
A'	COCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>	Cl	Cl	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
B	COCH <sub>3</sub>	COCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	Cl	Cl	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
C	COCH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	CH(OH)CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	Cl	Cl	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
D <sub>1</sub>	H	COCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	Cl	Cl	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
D <sub>2</sub>	COCH <sub>3</sub>	CH(OH)CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	Cl	Cl	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
E	H	CH(OH)CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	Cl	Cl	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
F	COCH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	COCH <sub>3</sub>	H	H	Cl	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
G	COC <sub>4</sub> H <sub>9</sub>	COCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	Cl	Cl	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
H	COCH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	COCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	Cl	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
I	COCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	COCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	Cl	Cl	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
J	COCH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	COCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	Cl	Cl	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
K	COCH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	COCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	Cl	Cl	CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> OH	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
L	COCH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	CHO	CH <sub>3</sub>	Cl	Cl	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
M	COCH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	COCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	Cl	Cl	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
N	COCH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	COCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	Cl	Cl	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>

Tab. 1: Auflistung aller bisher identifizierten Avilamycine (nach [ad])

Die Avilamycine bestehen aus einem terminalen Dichloroisoeverninsäurerest (Ring A), der esterglykosidisch mit einer Heptasaccharidkette verknüpft ist. Diese wiederum besteht aus zwei D-Olivosen (Ringe B und C), gefolgt von 2-Desoxy-D-Evalose (Ring D), 4-O-Methyl-D-Fucose (Ring E), 2,6-Di-O-Methyl-D-Mannose (Ring F), L-Lyxose (Ring G) und Methyleurekanat (Ring H). Auffällig sind die beiden Orthoestergruppierungen (zwischen den Ringen C und D sowie G und H), die auch das charakteristische Merkmal der Orthosomycine darstellen.

Avilamycin A (CAS: 69787-79-7) hat eine Summenformel von C<sub>61</sub>H<sub>88</sub>Cl<sub>2</sub>O<sub>32</sub> und weist dementsprechend eine molare Masse von  $M = 1402 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$  auf. Der Schmelzpunkt der farblosen Nadeln beträgt 181-182 °C, die Lösung hat einen optischen Drehwert von  $[\alpha]_D^{20} = -8^\circ$  [41].

## 2.2 Pharmakologie der Avilamycine

Die Avilamycine besitzen eine hervorragende antibiotische Aktivität und sind dabei auch gegen multiresistente Gram-positive Keime aktiv [49]. Dies zeigten auch Tests, die in den 90er Jahren von der Firma Hoffmann-LaRoche durchgeführt wurden und bei denen sich Avilamycin A als sehr gut wirksam gegen multiresistente *Staphylococcus aureus*-, *Enterococcus faecalis*- und *Enterococcus faecium*-Stämme erwies [42].

Das schon in Abb. 10b gezeigte und strukturell sehr ähnliche Evernimicin (auch als SCH27899 bzw. Ziracin bezeichnet [52–54]), das von Schering-Plough (New Jersey) bis zur Phase III der klinischen Prüfung entwickelt wurde, zeigt ebenso hervorragende Aktivität gegen Glykopeptid-resistente Enterokokken (VRE), Methicillin-resistente Staphylokokken (MRSA) und Penicillin-resistente Streptokokken [55–58]. Die Entwicklung dieses Wirkstoffs wurde aber im Jahr 2000 abgebrochen, da laut einer Pressemitteilung der Firma das Nutzen/Risiko-Verhältnis bei einer therapeutischen Anwendung keine Weiterentwicklung rechtfertigte [59].

Bei diesen Untersuchungen zeigte sich, dass für die Wirksamkeit des Evernimicins einige Strukturelemente essentiell sind. Dazu gehört die terminale Dichloroisoeverninsäure sowie eine zur Esterbindung in para-Stellung befindliche freie Hydroxyl-Gruppe. Auch die beiden Orthoestergruppierungen und deren Konfiguration spielen eine entscheidende Rolle [48, 54]. Durch die große strukturelle Ähnlichkeit kann man davon ausgehen, dass ähnliches auch für die Avilamycine gilt.

Der genaue Wirkmechanismus ist für beide Verbindungen noch nicht vollständig geklärt. Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass es sich um Inhibitoren der Proteinbiosynthese, genauer der Elongation, handelt. Anfangs wurde eine Bindung an die ribosomale 30S Untereinheit vermutet [60]; allerdings wurden kürzlich in der ribosomalen 50S Untereinheit überlappende Bindungsstellen für Avilamycin und Evernimicin gefunden [61, 62], die auch abseits der Bindungsstellen anderer Antibiotika lokalisiert sind [63]. Ferner konnten inzwischen in *S. viridochromogenes* Tü57 vier Avilamycin-Resistenzgene identifiziert werden, deren Geneprodukte das Bakterium vor den selbst produzierten Avilamycinen schützen [64]. Zwei dieser Gene codieren für Enzyme, die jeweils ein bestimmtes Nukleotid der Domäne V der 23S rRNA methylieren [65], so dass sich Avilamycin nicht mehr am Ribosom anlagern kann.<sup>15</sup> Es handelt sich somit vermutlich um einen neuartigen Wirkungsmechanismus und bisher konnten noch keine Kreuzresistenzen zu anderen Antibiotika festgestellt werden.

---

<sup>15</sup> Die beiden anderen Gene codieren für ein Transportermolekül, das unter Verbrauch von Energie Avilamycin aus der Zelle pumpt (aktiver Efflux, siehe Kap. 1.3.1.3).

Allerdings gibt es auch einige negativen Eigenschaften, die eine mögliche Nutzung als Medikament erschweren könnten. So weisen einige Orthosomycine ein geringes nierenschädigendes Potential (Nephrotoxizität) auf [20, 55], das auch bei den Avilamycinen vorhanden sein könnte. Ferner zeigten einzelne Everninomycine eine auch für das Avilamycin zu erwartende, starke Bindung (ca. 94 %) an Serumproteine [43, 66], die nicht ganz unproblematisch sein dürfte. Eine der Hauptschwierigkeiten bei den physikalischen Eigenschaften ist aber die hohe Lipophilie und die daraus resultierende geringe Wasserlöslichkeit. Diese erschwert bzw. verhindert die sehr wichtige Möglichkeit zur peroralen Applikation.

Ferner zeigt Avilamycin A eine gewisse Instabilität der Orthoesterbindung zwischen den Ringen C und D in saurem Medium (siehe Kapitel 4.1.1). Ob dies eine Rolle bei der potentiellen klinischen Anwendung spielt, bleibt noch zu untersuchen.

Ein weiteres Problem bei einer eventuellen Nutzung als Humantherapeutikum ist nicht-chemischer Natur: Avilamycin wurde schon lange Jahre als Wachstumsförderer in der Tiermast, insbesondere der Geflügelzucht, genutzt (Produkt MaxusG<sup>TM</sup> der Fa. Lilly, Bad Homburg). Dadurch könnten sich die schon in Kapitel 1.3.2 besprochenen Konsequenzen ergeben. Es wurde aber inzwischen beschlossen, dass Avilamycin nur noch bis Januar 2006 als Zusatzstoff in Futtermitteln verwendet werden darf [67], wodurch man auch hier hoffen kann, dass möglicherweise vorhandene Resistenzen zurückgegangen sind, bis es zu einer eventuellen Einführung des Wirkstoffs in den klinischen Gebrauch kommt.

Auch wenn es derzeit noch keine umfassenden Untersuchungen zur Resistenzentwicklung und -verbreitung für die Avilamycine gibt [68], handelt es sich dennoch um eine extrem aussichtsreiche Verbindungsgruppe für die Entwicklung neuer Antibiotika mit einem neuen Wirkmechanismus.

Bevor nun darauf eingegangen wird, welche Veränderungen am Avilamycin und am produzierenden Mikroorganismus vorgenommen wurden, wird das verwendete Verfahren der kombinatorischen Biosynthese erläutert.

## **2.3 Kombinatorische Biosynthese**

Die Actinomyceten, zu denen wie schon erwähnt auch die Streptomyceten gehören, bilden nicht nur etwa 70 % aller bekannten mikrobiellen Stoffwechselprodukte, sondern auch fast 50 % der bekannten Antibiotika, u.a. Erythromycin, Tetracycline und Aminoglykoside. Aber auch so divers wirkende Verbindungen wie z.B. das Zytostatikum Daunorubicin und das Antidiabetikum Acarbose werden von diesen Bakterien produziert.

Das Bemerkenswerte an diesen Bakterien ist, dass die Gene, die die Stoffwechselwege dieser Naturstoffe codieren, häufig an *einem* Ort im Chromosom, einem so genannten *Cluster*, lokalisiert sind [69–71]. In diesen Clustern sind weiterhin auch die Gene für die entsprechenden Enzyme des Transports, der Resistenz- und der Biosyntheseregulation enthalten; dadurch wird die Identifizierung und Klonierung wesentlich erleichtert.

Obwohl sich die chemische Struktur der Sekundärmetaboliten meist deutlich unterscheidet, sind bestimmte Strukturen bzw. Strukturelemente, z.B. nicht ribosomal synthetisierte Peptide, Polyketide und Zucker, immer wieder zu identifizieren. Dennoch erlaubt deren unterschiedliche Kombination und Modifikation, z.B. durch Methylasen, Oxygenasen, Halogenasen, Glykosyltransferasen etc., der Natur, ein breites Spektrum an Substanzen und Wirkungen zu produzieren.

Durch die bisherigen molekulargenetisch-biochemischen Untersuchungen war es möglich, ein Grundverständnis für die Sekundärmetabolit-Biosynthese zu erreichen. So konnte unter anderem eine Datenbank mit Aminosäuresequenzen und Funktionen von Enzymen angelegt werden. Da die an der Biosynthese beteiligten Enzyme meist sehr ähnlich sind und dazu noch hoch konservierte Domänen besitzen, kann man durch Homologievergleich mit diesen Daten für ein neues und unbekanntes Enzym eine wahrscheinliche Funktion ermitteln. Somit ist es natürlich auch möglich bei einem unbekanntem Gen mit bekannter Basensequenz, die Funktion des darin codierten Enzyms zu bestimmen (oder zumindest eine begründete Vermutung anzustellen).

Viel wichtiger ist jedoch, dass man durch die gentechnische Beeinflussung der Actinomyceten deren natürliche Evolution neuer Sekundärstoffe imitieren und beschleunigen kann. Durch gezielte Inaktivierung und/oder heterologe Expression von nativen oder gentechnisch veränderten Genen, Clustern oder Clusterabschnitten können sowohl Derivate mit verbesserten Eigenschaften als auch völlig neue Substanzen produziert werden. Dies wird als *kombinatorische Biosynthese* [72] bezeichnet.

Ein Beispiel für erfolgreiche Geninaktivierung ist die Herstellung des 6-Desoxyerythromycin A durch eine Mutante von *Saccharopolyspora erythraea*. Erythromycin ist ein bakteriostatisch wirkendes Antibiotikum aus der Gruppe der Makrolide. Da es allerdings relativ säureinstabil ist, weist es eine niedrige Bioverfügbarkeit bei oraler Einnahme auf. Durch Inaktivierung des Hydroxylasegens *eryF* in der Mutante konnte diese das wesentlich säurestabilere 6-Desoxyerythromycin A produzieren, das somit auch eine deutlich verbesserte Resorption besitzt [11, 73].

4'-Epidoxorubicin (Epirubicin) ist ein wichtiges Zytostatikum und ein Beispiel für eine erfolgreiche Kombination aus Geninaktivierung und -expression. Es wurde normalerweise semisynthetisch aus dem von *Streptomyces coeruleorubidus* und *peuceitius* produzierten Doxorubicin hergestellt, allerdings in relativ geringer Ausbeute.<sup>16</sup> Da sich beide nur durch die Konfiguration einer Hydroxy-Gruppe an einer Zuckereinheit unterscheiden, wurde eine Mutante generiert, die das gewünschte 4'-Epimer in ausreichender Menge produziert. In dieser ist das Gen *dnmV*, eine 4-Ketoreduktase, inaktiviert, wodurch das 4-Keto-Intermediat produziert wird. Ferner wurden die Gene *eryBIV* bzw. *avrE* eingeführt, wodurch die Mutante die 4-Ketoreduktasen aus dem L-Mycarose- bzw. L-Oleandrose-Biosyntheseweg produziert, die eine an C4 entgegengesetzte Diastereoselektivität besitzen [11, 74].

Von großem Interesse sind auch die Arbeiten mit Polyketidsynthasegenen z.B. in *Saccharopolyspora erythraea* [75–77]. Durch die Kombination von Deletion, Substitution und Addition verschiedener Gene konnten Makrolactonringe unterschiedlicher Größe mit verändertem Oxidationsgrad und an einzelnen Positionen modifizierter Konfiguration produziert werden.

Um nun eine große Bibliothek verschiedener Grundgerüste und anschließender Modifikationen zu erhalten, ist es ein Ziel der kombinatorischen Biosynthese, Enzyme aus verschiedenen Naturstoff-Biosynthesewegen bezüglich der Sequenz der sie codierenden Gene sowie ihrer Funktion zu identifizieren.

## 2.4 Mikrobiologische Vorarbeiten

Die mikrobiologischen Vorarbeiten wurden in der Gruppe von Prof. Dr. A. Bechthold an der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg durchgeführt. Daher werden hier nur kurz die für diese Arbeit relevanten Ergebnisse besprochen; für weiterführende Informationen sei auf die entsprechende Literatur verwiesen [42, 64, 78–82].

Nach der Identifizierung des für die Avilamycin-Biosynthese verantwortlichen Genclusters, konnten in diesem insgesamt 46 offene Leserahmen (ORF, Open Reading Frame) identifiziert werden.<sup>17</sup> Nach Ermittlung der jeweiligen Gensequenz wurden für die in den ORFs enthaltenen Gene Homologie-Vergleiche mit der NCBI-Datenbank<sup>18</sup> durchgeführt. Dabei konnte einem großen Teil dieser Sequenzen (bzw. den von ihnen codierten Enzymen) schon eine mögliche Funktion zugeordnet werden. Dies ist in Tab. 2 für die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Gene gezeigt. Bei einigen der 46 Gene wurde diese Zuordnung schon verifiziert

---

<sup>16</sup> Doxorubicin selber wird auch als Zytostatikum verwendet, ist aber stärker kardiotoxisch und kann dadurch nur in geringerer Gesamtdosis verabreicht werden.

<sup>17</sup> Neben diesen konnten ferner noch acht weitere ORFs identifiziert werden, die aber wahrscheinlich nicht mehr zum Avilamycin-Biosynthesegencluster gehören.

<sup>18</sup> Datenbank des National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD

und anschließend – basierend auf diesen Informationen – ein möglicher Biosyntheseweg für Avilamycin erstellt.

Gen	Größe des Genproduktes	Homologie zu	Identische AS	Mögliche Funktion bezüglich der Avilamycin-Biosynthese	Lit.
<i>aviG2</i>	241 AS	putative Methyltransferase aus <i>Deinococcus radiodurans</i>	31%	Zuckermodifizierung (Methylierung)	[83]
<i>aviG4</i>	329 AS	O-Demethylpuromycin-O-Methyltransferase aus <i>Streptomyces alboniger</i>	44%	Modifizierung (Methylierung)	[84]
<i>aviG5</i>	200 AS	putative Methyltransferase aus <i>Aeropyrum pernix</i> K1	32%	Zuckermodifizierung (Methylierung)	[85]
<i>aviG6</i>	240 AS	putative Methyltransferase aus <i>Streptomyces avermitilis</i>	33%	Zuckermodifizierung (Methylierung)	[86]
<i>aviO2</i>	259 AS	L-Prolin-4-hydroxylase aus <i>Dactylosporangium</i> sp.	29%	Ausbildung der C-O-C-Bindung im Methyleurekanat	[87]
<i>aviB1</i>	335 AS	Pyruvatdehydrogenase ( $\alpha$ -Untereinheit) aus <i>Sulfolobus solfataricus</i>	50%	Zuckermodifizierung (Methyleurekanat-Biosynthese)	[88]

Tab. 2: Auflistung der im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten Gene sowie ihre Homologien und möglichen Funktionen bezüglich der Avilamycin-Biosynthese. AS = Aminosäuren

Diese Verifikation musste aber noch für weitere Gene des Clusters erfolgen. Da die mangelnde Hydrophilie ein großes Problem bei einer möglichen Nutzung des Avilamycins als Medikament darstellt, wurde als erstes die Funktion der als putative Methyltransferasen identifizierten Enzyme überprüft. Dazu wurden Mutanten hergestellt, in denen die entsprechenden Gene (*aviG4*, *aviG2*, *aviG5* und *aviG6*) inaktiviert waren (siehe Kap. 3.1).<sup>19</sup> Die Mutanten wurden anschließend zur Produktion in größeren Mengen angezüchtet und die Produkte extrahiert. In diesen sollten nun die vermutlich modifizierten Avilamycine, die im Folgenden auch als Gavibamycine bezeichnet werden (vergleiche Kapitel 2.6), vorliegen, bei denen an bestimmten Positionen im Molekül der Methyltransfer auf Hydroxygruppen zur Bildung von Methoxygruppen nicht stattgefunden hat. Durch die größere Zahl von Hydroxygruppen im Molekül müsste auch, wie erwünscht, die Hydrophilie zunehmen. Dies dürfte überdies kaum etwas an der antibiotischen Wirkung des Moleküls ändern, denn entsprechend den bisherigen Erkenntnissen sind Methoxygruppen hierfür nicht relevant (siehe Kapitel 2.2). Die Details bezüglich der in den einzelnen Methyltransferase-Mutanten inaktivierten Gene sind der Probenbeschreibung in Kapitel 2.6.2 zu entnehmen.

<sup>19</sup> Diese Gene boten sich auch an, da man davon ausgehen konnte, dass die entsprechenden Enzyme erst spät, also nach Aufbau des Grundgerüsts, in die Avilamycin-Biosynthese eingriffen und die Produktion somit nicht schon in einem frühen Schritt vollständig zusammenbrach.

Das gleiche Verfahren wurde auch angewendet, um die Funktion der von den Genen *aviO2* und *aviB1* codierten Enzyme zu identifizieren. Diese sollten laut Homologie-Vergleich und hypothetischem Biosyntheseweg im Ring H für die Bildung des Fünfringes bzw. der Anlagerung der Acetylfunktion verantwortlich sein (siehe Tab. 2). Dementsprechend müsste sich durch deren Inaktivierung ebenfalls die Hydrophilie ohne Verlust der antibiotischen Wirkung erhöhen. Für Details sei auch hier auf das entsprechende Kapitel verwiesen (Kap. 2.6.3).

Anschließend wurden noch Fütterungsexperimente durchgeführt, bei denen die Wildtyp-Bakterien während der Anzucht mit bestimmten selektiv  $^{13}\text{C}$ -markierten Substanzen gefüttert wurden. Diese markierten Kohlenstoffe sollten nun bei der Avilamycin-Biosynthese an bestimmten Stellen in die produzierten Avilamycine eingebaut werden, wodurch es möglich sein dürfte, den hypothetischen Biosyntheseweg zumindest teilweise zu verifizieren. Die verwendeten Edukte sowie weitere Details zu diesen Proben sind den Beschreibungen in Kapitel 2.6.4 zu entnehmen.

Die Produkte dieser genetisch veränderten Bakterien bzw. dieser Fütterungsexperimente sollten nun dahingehend untersucht werden, ob die vermuteten Veränderungen eingetreten sind bzw. wenn nicht, wo es stattdessen zu Veränderungen kam. Dies konnte zwar für eine der Methyltransferasen (Kapitel 2.6.2.1) auch durch synthetische Derivatisierung und anschließende massenspektroskopische Untersuchungen nachgewiesen werden, allerdings war dieses Verfahren für die Aufklärung der weiteren Mutationen bzw. der selektiven Markierung durch die Fütterungsexperimente nur bedingt geeignet. Daher wurde die im Folgenden beschriebene kernmagnetische Resonanz (NMR)-Spektroskopie ausgewählt, die zum einen eine atomare Auflösung bot und dabei auch noch eine ausreichende Flexibilität aufwies, um die speziellen Fragen dieses Projekts effektiv und gezielt beantworten zu können. Die geringen Veränderungen im Molekül, die aus der Inaktivierung bestimmter Gene resultieren, können durch Vergleich der Spektren und Identifikation der Veränderungen gezielt ermittelt werden (z.B. Kapitel 4.2.2). Weiterhin ermöglichte es die Vielseitigkeit der Methode, Experimente zu erstellen, die genau die Beantwortung bestimmter Fragestellungen erlauben (Kapitel 3.3.1).

## **2.5 Die kernmagnetische Resonanz-Spektroskopie**

Seit der Entdeckung des Phänomens der kernmagnetischen Resonanz (NMR) im Jahre 1946 [89, 90] hat sich die NMR-Spektroskopie zu einer äußerst vielseitigen Analysemethode in den Grenzbereichen zwischen Biologie, Chemie, Medizin und Physik entwickelt. So gehören heute eine Vielzahl verschiedener Anwendungsmethoden zum Alltag dieser Methode, angefangen bei der Messung kleiner Moleküle im Festkörper [91] und in Lösung [92, 93], über Anwen-

dungen in der Medizin (Tomographie) bis hin zur Strukturaufklärung von biologischen Makromolekülen [94–97]. Wichtige Fortschritte waren die Entwicklung der Fouriertransformationsspektroskopie (1966 [98]) und der zweidimensionalen Spektren [99-101] in den 70er Jahren. Für erstere wurde Richard Ernst 1991 der Nobelpreis verliehen [102]. Die nachfolgenden Entwicklungen in der mehrdimensionalen Spektroskopie erlaubten es 1985 die erste Proteinstruktur mittels NMR aufzuklären [103]. Es folgte die Entwicklung verschiedener Pulssequenzen zur sequenzspezifischen Zuordnung von Proteinsignalen und verbesserter Verfahren zur Strukturberechnung [104-107], wodurch die routinemäßige Strukturaufklärung von Proteinen mittels NMR-Spektroskopie ermöglicht wurde. So wurden z.B. 1996 etwa ein Viertel aller Proteinstrukturen mit dieser Methode aufgeklärt [108]. Diese Fortschritte wurden erneut mit einem Nobelpreis honoriert, diesmal für Kurt Wüthrich im Jahre 2002.

Auch der letztjährige Nobelpreis für Paul C. Lauterbur und Sir Peter Mansfield für ihre Entdeckungen auf dem Gebiet der bildgebenden NMR-Verfahren (MRI, Magnetic Resonance Imaging) zeigt, dass die NMR nicht nur vielseitig ist, sondern auch eine der interessantesten der modernen Spektroskopiemethoden darstellt.

### **2.5.1 Einführung in Grundlagen der NMR-Spektroskopie**

An dieser Stelle soll nur ein kurzer Überblick über die Grundlagen der NMR-Spektroskopie gegeben werden; für weitergehende Informationen sei auf die Fachliteratur verwiesen (z.B. [93, 101, 109]).

Die kernmagnetische Resonanz beruht auf der Wechselwirkung zwischen dem magnetischen Moment der Atomkerne und verschiedenen Magnetfeldern. Zum einen befinden sich die Kernspins im Spektrometer in einem statischen Magnetfeld  $B_0$ , wodurch sie um die Achse des Magnetfeldes präzedieren. Da sie dabei, abhängig von ihrer chemischen Umgebung, unterschiedlich stark von diesem Magnetfeld abgeschirmt sind, präzedieren sie auch mit einer charakteristischen Frequenz. Die Unterschiede dieser Resonanzfrequenzen zu einer Referenzfrequenz werden als „chemische Verschiebungen“ der Kerne bezeichnet und bewegen sich im ppm-Bereich (die aber mit modernen Geräten meist problemlos aufzulösen sind).

Durch kurzzeitig eingestrahlte hochfrequente Magnetfelder können die Kernspins aus ihrem Gleichgewichtszustand gebracht werden, in den sie anschließend unter Abgabe charakteristischer Energien wieder zurückkehren. Der dabei entstehende *free induction decay* (FID, Freier Induktionszerfall) kann detektiert und die einzelnen Resonanzfrequenzen mittels Fouriertransformation berechnet werden.

Zusätzlich können auch Wechselwirkungen zwischen Kernen mittels NMR-Spektroskopie detektiert werden, wodurch diese Kerne miteinander in Korrelation gebracht werden können. Zum einen ist die skalare Kopplung zu nennen, die über Elektronen und somit über chemische Bindungen vermittelt wird und die die Basis für den Großteil der Experimente (wie z.B. COSY<sup>20</sup> [100, 110] und HSQC [111]) bildet. Zum anderen die dipolare Kopplung, die direkt durch den Raum wirkt und die Grundlage für das NOESY-Experiment [112, 113] darstellt. Dieser „NOE-Effekt“ ist umgekehrt proportional zur sechsten Potenz des Abstands der beiden Atome und die aus diesen Experimenten gewonnenen Abstandsinformationen bilden den Grundstein der Strukturbestimmung von biologischen Makromolekülen.

Allerdings werden an die in der hochauflösenden NMR-Spektroskopie vermessenen Atome auch bestimmte physikalische Anforderungen gestellt, die aber glücklicherweise von den Kernen, die sich in den vorwiegend organischen Substanzen finden (Wasserstoff, Kohlenstoff, Stickstoff und Phosphor), zumeist gut erfüllt werden. So haben sie alle Isotope mit einem Kernspin von  $S = 1/2$ , die kein Quadrupolmoment aufweisen und daher scharfe Linien ergeben. (Wenn auch die entsprechenden Isotope von Kohlenstoff und Stickstoff nur in geringer natürlicher Häufigkeit vorliegen.) Insbesondere der Wasserstoff eignet sich sehr gut, da er in praktisch allen organischen Verbindungen enthalten ist und (abgesehen von Tritium) über das größte kernmagnetische Moment verfügt.

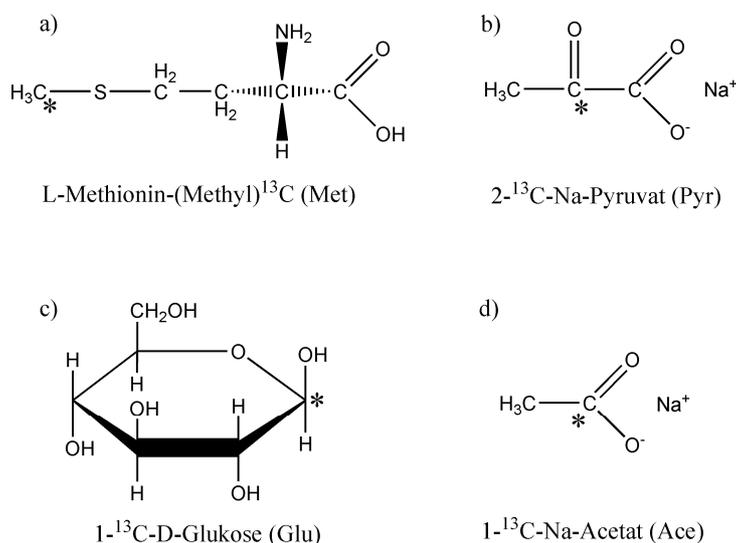


Abb. 13: Die verwendeten <sup>13</sup>C-markierten Edukte und die für sie im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Abkürzungen. Markierte Kohlenstoffatome sind durch \* gekennzeichnet.

<sup>20</sup> Für die Bedeutung der Akronyme COSY, HSQC, NOESY und NOE siehe Abkürzungsverzeichnis im Anhang.

## 2.6 Die Proben und ihre Nomenklatur

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwölf verschiedene Proben vermessen, eine Übersicht zeigen Tab. 3 sowie Abb. 12.

Um Verwechslungen bei den Bezeichnungen der Gene, Mutanten und ihren Produkten vorzubeugen, werden im Rahmen dieser Arbeit die folgenden Konventionen eingehalten:

- Die Bezeichnungen der Gene werden immer *kursiv* geschrieben. Ferner beginnen sie mit kleingeschriebenem „*avi*“, an das sich die genaue Bezeichnung anschließt, z.B. *aviG4*.
- Die Benennungen der genveränderten Bakterien (im Folgenden nur noch als Mutanten bezeichnet) werden nur mit Großbuchstaben geschrieben, z.B. GW4-Mutante. Doppelmutanten werden dementsprechend z.B. als GW4-GW2-Mutante bezeichnet.
- Die Bezeichnungen der Produktgemische der Bakterien sowie der entsprechenden NMR-Proben sind identisch und beginnen immer mit „*Avi*“, z.B. *AviG4* für das Produktgemisch der GW4-Mutante. Wenn die Bakterien bei der Herstellung der Probe mit einer <sup>13</sup>C-markierten Substanz gefüttert wurden und das Produkt somit markiert ist, wird an den Namen noch ein Kürzel mit einem „\_“ angehängt, z.B. *AviG4\_Met*. Abb. 13 zeigt die verwendeten <sup>13</sup>C-markierten Substanzen sowie deren Kürzel. Allgemein ist aber noch mal zu betonen, dass es sich bei diesen Produkten *immer* um Gemische verschiedener Avilamycine bzw. ihrer Derivate handelt.
- Die eigentlichen Komponenten der Produktgemische werden bei den Mutanten als Gavibamycine bezeichnet. Dabei gibt es verschiedene Reihen, die jeweils einer Mutante entsprechen. So werden z.B. die Produkte der GW4-GW2-Mutante, die in der *AviG2\_Met*-Probe enthalten sind, als Gavibamycine der C-Reihe bezeichnet. Die Bezeichnung der entsprechenden Reihe ist der jeweiligen Probenbeschreibung in den Kapiteln 2.6.2 und 2.6.3 sowie Tab. 3 zu entnehmen.
- Die einzelnen Gavibamycine einer Reihe erhalten eine Nummer entsprechend des Avilamycins, dessen Analogon sie darstellen. So entspricht das Gavibamycin C1 dem von der GW4-GW2-Mutante produzierten Analogon des Avilamycins A: A = 1, A' = 1', B = 2, C = 3, etc.

Die Kohlenstoffe im Avilamycin A sind entsprechend der Literatur von 1 bis 61 nummeriert worden und werden im Rahmen der Arbeit mit „C-1“ bis „C-61“ bezeichnet (vgl. Abb. 14).

Die Wasserstoffe erhalten entsprechend die Nummer des Kohlenstoffatoms, an das sie gebunden sind (z.B. H-45 an C-45). Handelt es sich um Methylenprotonen, werden sie mit den Indizes „ax“ (für axial) und „äq“ (für äquatorial) versehen, wenn sie unterschieden werden konnten, z.B. H-11<sub>a</sub> und H-11<sub>b</sub>. Sollte dies nicht möglich sein, erhalten sie die Indizes „a“ und „b“, wobei ersterer das Proton mit kleinerer und letzterer das mit höherer chemischer Verschiebung bezeichnet, z.B. H-48<sub>a</sub> und H-48<sub>b</sub>. Da Methylprotonen dagegen keine unterschiedlichen Resonanzfrequenzen zeigen, werden sie auch bei der Nomenklatur zusammengefasst, z.B. H-28.

Wasserstoffe in Hydroxy-Gruppen werden mit „HO-“ und der Nummer des entsprechenden Kohlenstoffs bezeichnet (z.B. HO-18).

Weiterhin werden zur Vereinfachung der Diskussion der „Methyltransferase-Inaktivierungs“-Experimente (Kapitel 4.2) die interessanten Methoxygruppen des Avilamycins A entsprechend Abb. 14 als Gruppe1 bis Gruppe4 bezeichnet.

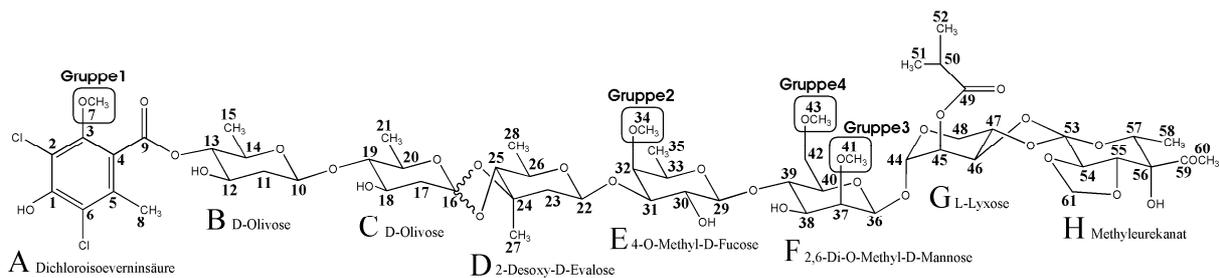


Abb. 14: Avilamycin A mit der verwendeten Nummerierung.

## 2.6.1 Der Wildtyp: AviW

Hierbei handelt es sich um das Hauptprodukt der Bakterien des Wildtyps *Streptomyces viridochromogenes*. Es lag anfangs nur unmarkiert vor, konnte aber später im Rahmen der Experimente zur Modifikation im Ring H auch in markierter Form vermessen werden (siehe AviW\_Met in Kapitel 2.6.3.1).

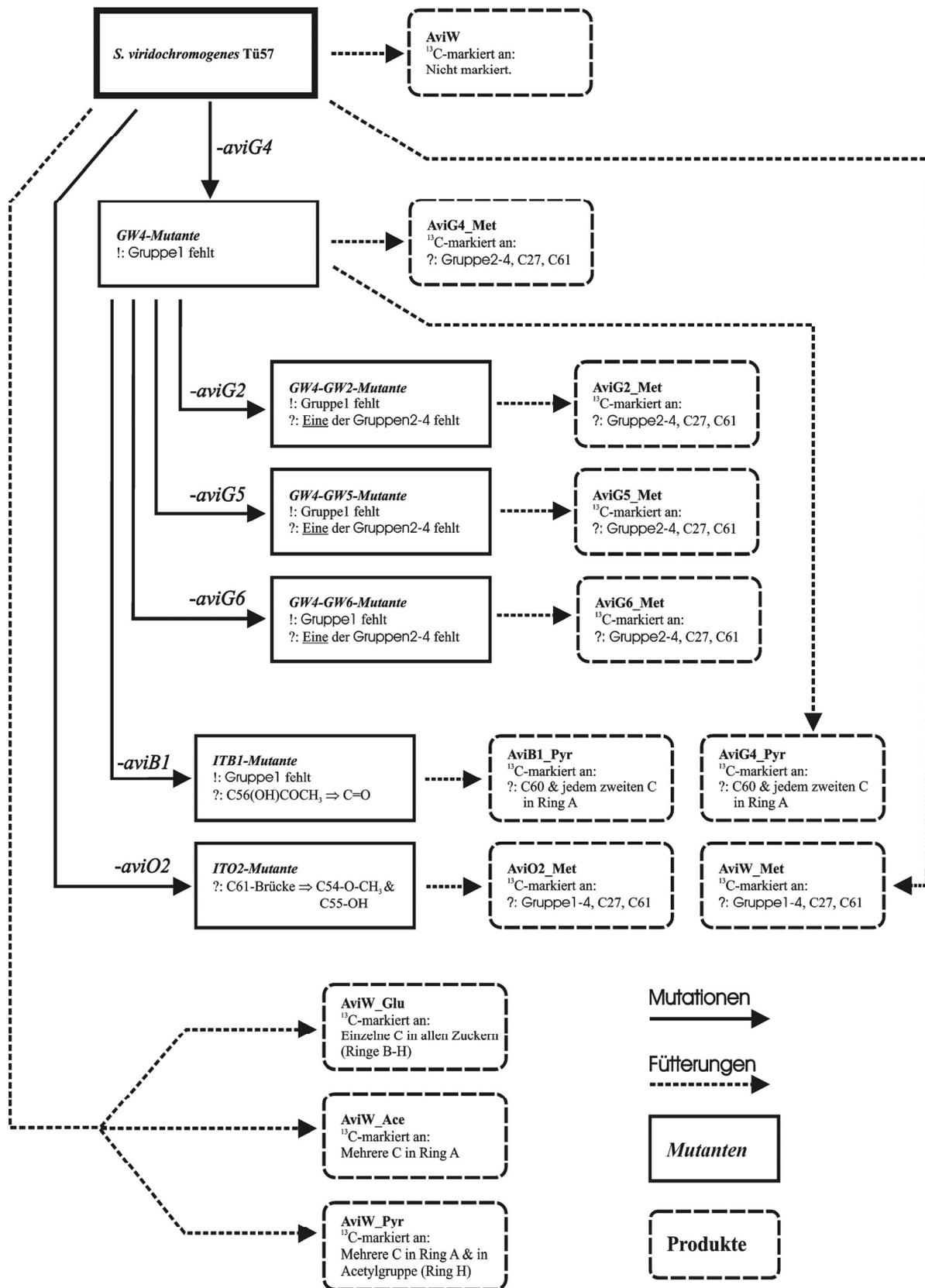


Abb. 12: Grafische Übersicht über die vermessenen Proben und ihre Relation zueinander. „!“ kennzeichnen schon vor der NMR-Untersuchung sichere Information, „?“ dagegen Vermutungen, die überprüft werden sollten.

Probe	Produziert von	Inaktivierte(s) Gen(e)	Beschreibung	Gavibamycin-Reihe	Geführt mit	Vermutliche <sup>13</sup> C- Markierungen	Bekannte Unterschiede zum Wildtyp-Produkt	Vermutliche Unterschiede zum Wildtyp-Produkt
AviW	<i>Streptomyces viridochromogenes</i> Tü57	-	Produkt des Wildtyps	-	-	-	-	-
AviG4_Met	GW4-Mutante	<i>aviG4</i>	Eine Methyltransferase inaktiviert	A-Reihe	L-Methionin-(Methyl) <sup>13</sup> C	Gruppe2-4, C27, C61	Es fehlt: Gruppe1	-
AviG2_Met	GW4-GW2-Mutante	<i>aviG4, aviG2</i>	Zwei vermutliche Methyltransferasen inaktiviert	C-Reihe	L-Methionin-(Methyl) <sup>13</sup> C	Gruppe2-4 (sofern vorhanden), C27, C61	Es fehlt: Gruppe1	Es fehlt: Eine der Gruppen2-4
AviG5_Met	GW4-GW5-Mutante	<i>aviG4, aviG5</i>	Zwei vermutliche Methyltransferasen inaktiviert	E-Reihe	L-Methionin-(Methyl) <sup>13</sup> C	Gruppe2-4 (sofern vorhanden), C27, C61	Es fehlt: Gruppe1	Es fehlt: Eine der Gruppen2-4
AviG6_Met	GW4-GW6-Mutante	<i>aviG4, aviG6</i>	Zwei vermutliche Methyltransferasen inaktiviert	I-Reihe	L-Methionin-(Methyl) <sup>13</sup> C	Gruppe2-4 (sofern vorhanden), C27, C61	Es fehlt: Gruppe1	Es fehlt: Eine der Gruppen2-4
AviW_Met	<i>Streptomyces viridochromogenes</i> Tü57	-	Teilweise <sup>13</sup> C-markiertes Produkt des Wildtyps	-	L-Methionin-(Methyl) <sup>13</sup> C	Gruppe1-4, C27, C61	-	-
AviO2_Met	ITO2-Mutante	<i>aviO2</i>	Eine vermutliche Oxygenase inaktiviert	N-Reihe	L-Methionin-(Methyl) <sup>13</sup> C	Gruppe1-4, C27 (nicht C61, wenn Vermutung richtig)	-	C61-Brücke ⇒ C54-O-CH <sub>3</sub> & C55-OH
AviG4_Pyr	GW4-Mutante	<i>aviG4</i>	Teilweise <sup>13</sup> C-markiertes Produkt der GW4-Mutante	A-Reihe	2- <sup>13</sup> C-Na-Pyruvat	C60, jedes zweite C in Ring A	Es fehlt: Gruppe1	-
AviB1_Pyr	ITB1-Mutante	<i>aviG4, aviB1</i>	Eine vermutliche Pyruvathydrogenase inaktiviert	M-Reihe	2- <sup>13</sup> C-Na-Pyruvat	Jedes zweite C in Ring A (und C60, wenn andere Vermutung falsch)	Es fehlt: Gruppe1	C56(OH)COCH <sub>3</sub> ⇒ C56=O
AviW_Glu	<i>Streptomyces viridochromogenes</i> Tü57	-	Teilweise <sup>13</sup> C-markiertes Produkt des Wildtyps	-	1- <sup>13</sup> C-D-Glukose	Einzelne Kohlenstoffe in allen Zuckern (Ringe B-H)	-	-
AviW_Ace	<i>Streptomyces viridochromogenes</i> Tü57	-	Teilweise <sup>13</sup> C-markiertes Produkt des Wildtyps	-	1- <sup>13</sup> C-Na-Acetat	Mehrere Kohlenstoffe in Ring A	-	-
AviW_Pyr	<i>Streptomyces viridochromogenes</i> Tü57	-	Teilweise <sup>13</sup> C-markiertes Produkt des Wildtyps	-	2- <sup>13</sup> C-Na-Pyruvat	Mehrere Kohlenstoffe in Ring A sowie in der Acetyl-funktion in Ring H	-	-

Tab. 3: Tabellarische Übersicht über alle vermessenen Proben.

## 2.6.2 Methyltransferase-Inaktivierungen

Zuerst werden die im Zuge der Untersuchung der inaktivierten Methyltransferasen hergestellten Proben beschrieben. Dabei wurde erst eine Mutante mit nur einem inaktivierten Gen hergestellt. Jeweils von dieser ausgehend wurden noch drei weitere Doppelmutanten hergestellt, in denen jeweils ein weiteres Gen inaktiviert wurde (siehe dazu auch Abb. 12).

### 2.6.2.1 AviG4\_Met

AviG4\_Met ist das Produktgemisch der GW4-Mutante, dessen Komponenten als Gavibamycine der A-Reihe bezeichnet werden. Die beiden Hauptkomponenten werden als Gavibamycin A1 (Abb. 15) und A3 bezeichnet [82, 114]. Dabei entspricht ersteres dem Derivat des Avilamycin A und letzteres dem Derivat von Avilamycin C. Bei der GW4-Mutante wurde das Gen *aviG4* inaktiviert, von dem vermutet wurde, dass es eine zuckermodifizierende Methyltransferase codiert (Tab. 2). Mittels synthetischer Derivatisierung und Massenspektrometrie konnte diese Annahme bereits in der Gruppe von Prof. Bechthold nachgewiesen werden [82, 114]. Im Rahmen dieser Untersuchungen konnte ferner gezeigt werden, dass die inaktivierte Methyltransferase für den Einbau der Methoxygruppe im Ring A (Gruppe 1) verantwortlich ist. Diese Erkenntnis sollte dennoch zusätzlich mittels NMR überprüft werden.

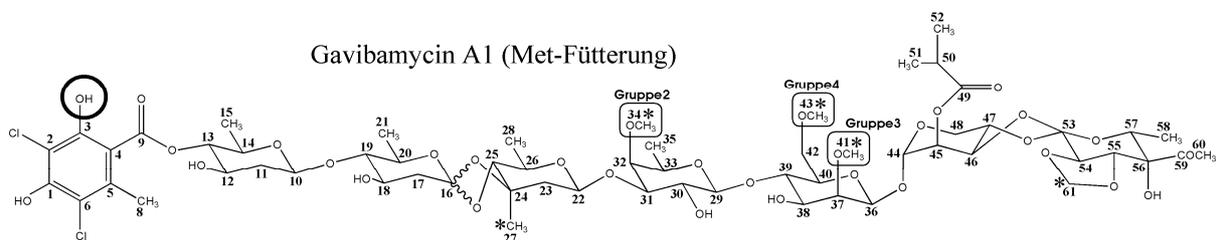


Abb. 15: Gavibamycin A1. \* kennzeichnen die  $^{13}\text{C}$ -Markierung und der Kreis die fehlende Methoxyfunktion (Gruppe 1).

Da die Bakterien während der Probenherstellung mit  $^{13}\text{C}$ -markiertem L-Methionin (siehe Abb. 13) gefüttert wurden, sollte diese Probe aufgrund der zu Beginn der NMR-Untersuchungen bekannten mikrobiologischen Erkenntnisse an den folgenden Positionen  $^{13}\text{C}$ -markiert sein:

- C-34, C-41, C-43: Hierbei handelt es sich um Methoxygruppen, entsprechend Abb. 14 auch als Gruppe 2-4 bezeichnet.
- C-27: Methylgruppe
- C-61: Methylengruppe

Die molare Masse der Hauptkomponente Gavibamycin A1 entspricht den Erwartungen gemäß  $M = 1388 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$  ( $1402 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1} - 14 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$  für die durch ein H ersetzte Methylgruppe).

### 2.6.2.2 AviG2\_Met, AviG5\_Met, AviG6\_Met

Die Produkte der Doppelmutanten (GW4-GW2, GW4-GW5 bzw. GW4-GW6) wurden als AviG2\_Met, AviG5\_Met bzw. AviG6\_Met bezeichnet. Sie wurden ausgehend von der GW4-Mutante hergestellt und im Vergleich zu dieser wurde jeweils ein weiteres Gen inaktiviert (*aviG2*, *aviG5* bzw. *aviG6*). Da diese Gene entsprechend dem Homologievergleich (Tab. 2) ebenfalls Methyltransferasen codieren sollten, müsste den Produkten neben Gruppe 1 auch noch jeweils eine weitere der Gruppen 2-4 fehlen.

Die Produkte der GW4-GW2-Doppelmutante werden als Gavibamycine der C-Reihe bezeichnet, die der GW4-GW5-Doppelmutante als Gavibamycine der E-Reihe und die der GW4-GW6-Doppelmutante als Gavibamycine der I-Reihe. Auch hier entsprechen die mit „1“ gekennzeichneten Verbindungen, d.h. C1, E1 und I1, den Derivaten des Avilamycin A; C3, E3 und I3 sind dementsprechend Derivate des Avilamycin C.

Die Vermutung zweier fehlender Methylgruppen wurde auch durch die Massenspektren [114] gestützt. Die molare Masse der Hauptkomponente betrug bei AviG2\_Met und AviG6\_Met jeweils  $M = 1374 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ . Dies entspricht der molare Masse des Avilamycins A ( $M = 1402 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) nach Austausch zweier Methylgruppen gegen jeweils einen Wasserstoff, also den Gavibamycinen C1 und I1.

Bei der AviG5\_Met-Probe gab es zwei Hauptkomponenten. Die im Massenspektrum weniger intensive Komponente wies ebenfalls die molare Masse von  $M = 1374 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$  auf und war daher vermutlich Gavibamycin E1. Die in den Spektren am stärksten vertretene Komponente zeigte eine molare Masse von  $M = 1376 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$  und stellte wahrscheinlich Gavibamycin E3, also das dem Avilamycin C entsprechende Derivat, dar. ( $1376 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1} = 1402 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1} - 2 \times 14 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1} + 2 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ; letzteres entspricht der Differenz zwischen Avilamycin A und C).

Dabei ist zu erwarten, dass wahrscheinlich jeweils eine andere der verbleibenden drei Gruppen 2-4 fehlt, es sei denn, zwei (oder alle drei) der Gene *aviG2*, *aviG5* und *aviG6* wären für die Codierung der gleichen Methyltransferase verantwortlich. Ein unwahrscheinlicher, aber nicht unmöglicher Fall.

Ferner wurden die jeweiligen Bakterien auch bei der Herstellung dieser Proben mit  $^{13}\text{C}$ -markiertem L-Methionin (siehe Abb. 13) gefüttert, so dass sie an denselben Stellen markiert sein sollten wie die AviG4\_Met-Probe. Die interessanten Gruppen 2-4 müssten also  $^{13}\text{C}$ -markiert sein, sofern sie in dem jeweiligen Molekül vorhanden sind.

## 2.6.3 Modifikationen im Ring H

Anschließend wurden zwei weitere Mutanten (ITO2, ITB1) sowie ihre Produktgemische (AviO2\_Met, AviB1\_Pyr) hergestellt, um die Auswirkungen der Inaktivierung der Gene *aviO2* und *aviB1* zu bestimmen. Zur besseren Untersuchung wurde auch jeweils eine Vergleichsprobe (AviW\_Met, AviG4\_Pyr) produziert.

### 2.6.3.1 AviW\_Met

AviW\_Met (Abb. 16a) ist das aufgereinigte Produkt der Wildtyp-Bakterien nach Fütterung mit  $^{13}\text{C}$ -markiertem L-Methionin (siehe Abb. 13a) während der Aufzucht. Entsprechend dem hypothetischen Biosyntheseweg müssten die Moleküle an den folgenden Positionen  $^{13}\text{C}$ -markiert sein:

- C-7, C-34, C-41, C-43: Hierbei handelt es sich um die vier Methoxygruppen (Gruppe1-4).
- C-27: Methylgruppe
- C-61: Methylengruppe

AviW\_Met diente zum Vergleich mit der folgenden AviO2\_Met-Probe, da die Produktionsbedingungen für beide nahezu identisch waren. Einziger Unterschied war die Verwendung der neu generierten ITO2-Mutante bei der Herstellung der AviO2\_Met-Probe und somit das bei letzterer inaktivierte *aviO2*-Gen.

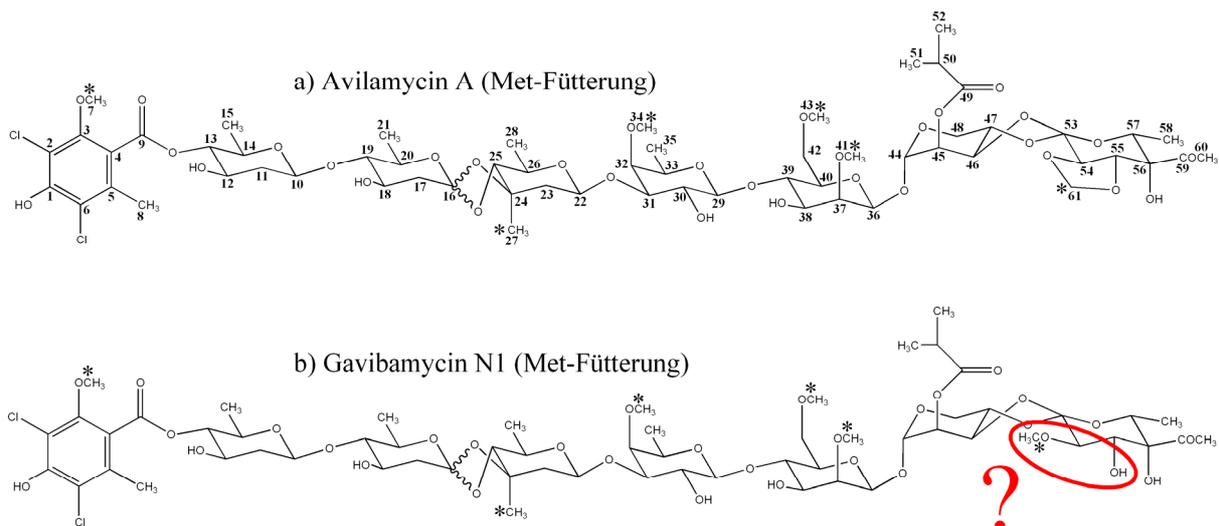


Abb. 16: a) Avilamycin A (Met-Fütterung), b) Vermutliche Struktur des Gavibamycin N1 (Met-Fütterung). Die  $^{13}\text{C}$ -Markierung ist durch \* und die vermutliche Modifikation im Ring H durch ein Oval gekennzeichnet.

### 2.6.3.2 AviO2\_Met

Das Produktgemisch der ITO2-Mutante, das aufgrund der Herstellungsbedingungen ebenso markiert sein sollte wie AviW\_Met, wurde als AviO2\_Met (Abb. 16b) bezeichnet. Die Komponenten werden als Gavibamycine der N-Reihe bezeichnet. Da die Gensequenz des inaktivierten *aviO2*-Genes Ähnlichkeiten zum L-Prolin-4-hydroxylase-codierenden Gen in *Dactylosporangium* sp. aufweist und dieses Protein für die Ausbildung einer C-O-C-Bindung verantwortlich ist, wurde vermutet, dass dieses Gen wiederum ein Protein codiert, welches an der Ausbildung der Methylen-Brücke im Methyleurekanat (Ring H) des Avilamycins beteiligt ist. Dementsprechend hätte die Methylenbrücke im Ring H geöffnet sein müssen, so dass sich an C-54 eine Methoxy- und an C-55 eine Hydroxygruppe befinden müsste. Diese Variante hätte dann eine molare Masse von  $M = 1404 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ . Allerdings zeigte das Massenspektrum, dass die Hauptkomponente der Probe eine molare Masse von  $M = 1360 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$  hatte. Ferner gab es noch eine zweite Komponente mit etwa der halben Stoffmenge, die eine um  $18 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$  höhere molare Masse von  $M = 1378 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$  aufwies. Somit musste es sich um eine andere, noch unbekannte Veränderung im Produkt handeln.

### 2.6.3.3 AviG4\_Pyr

AviG4\_Pyr (Abb. 17a) ist identisch mit AviG4\_Met, außer dass die Bakterien während der Produktion nicht mit  $^{13}\text{C}$ -markiertem L-Methionin, sondern mit  $^{13}\text{C}$ -markiertem L-Pyruvat (siehe Abb. 13b) gefüttert wurden. Dadurch sollten die produzierten Gavibamycine der A-Reihe an C-60 und jedem zweiten Kohlenstoff des aromatischen Ringes markiert sein.

### 2.6.3.4 AviB1\_Pyr

Das Produktgemisch AviB1\_Pyr (Abb. 17b) wurde von der GW4-ITB1-Mutante unter den gleichen Bedingungen wie die AviG4\_Pyr-Probe hergestellt und die dabei produzierten Avilamycin-Derivate werden als Gavibamycine der M-Reihe bezeichnet. Insbesondere wurde ebenfalls  $^{13}\text{C}$ -markiertes L-Pyruvat zugefüttert, wodurch auch diese Probe nur an C-60 sowie jedem zweiten Kohlenstoffatom im Ring A markiert sein sollte. Da aber bei der GW4-ITB1-Mutante im Vergleich zur GW4-Mutante das Gen *aviB1* inaktiviert wurde und von diesem vermutet wurde (Tab. 2), dass es an Bildung und Anlagerung der Acetylgruppe ( $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$ ) an C-56 beteiligt sei, sollte diese Probe nur im Ring A markiert sein, wenn es überhaupt zu einem Einbau käme. Denn sowohl die Hydroxygruppe HO-56 als auch die Acetylgruppe an C-56 sollten durch einen Carbonyl-Sauerstoff ersetzt worden sein und dementsprechend sollte

das Molekül eine molare Masse von  $M = 1344 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$  aufweisen. Dies entsprach aber nicht den Massenspektren der hergestellten Probe, denn bei dieser hatte die Hauptkomponente eine molare Masse von  $M = 1346 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ . Ferner wurde auch bei dieser Probe eine  $18 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$  schwerere Komponente (mit  $M = 1364 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) detektiert, die hier aber in deutlich geringerer Menge vorlag. Es war also auch hierbei nicht das erwartete Produkt entstanden.

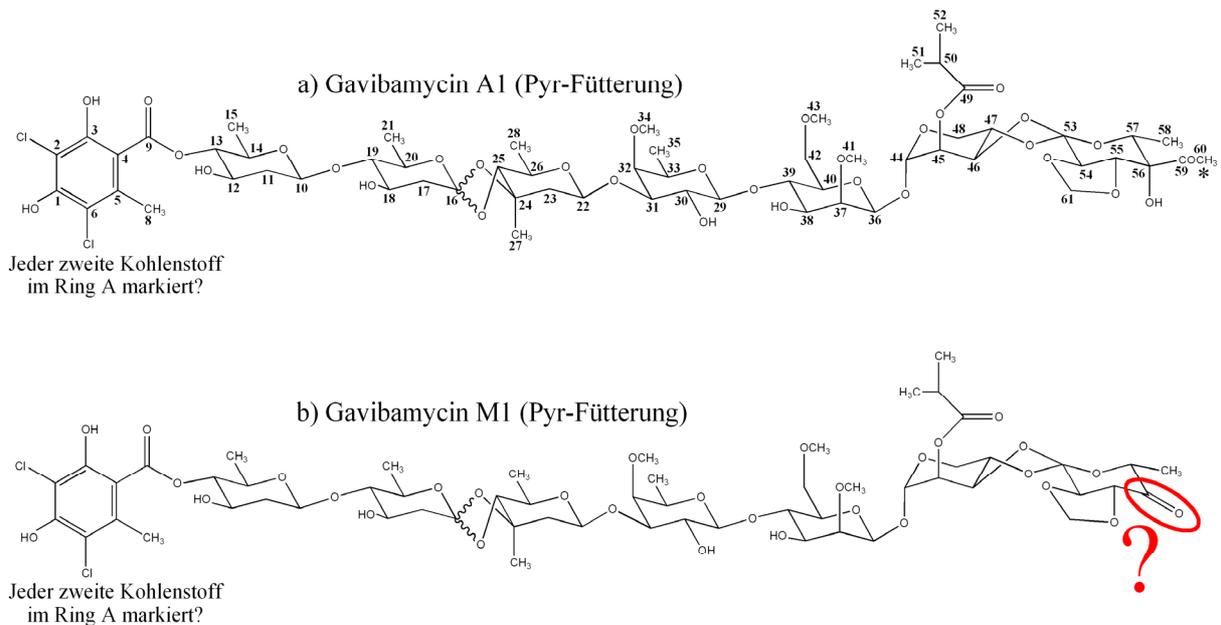


Abb. 17: a) Avilamycin A (Met-Fütterung), b) Vermutliche Struktur des Gavibamycin M1 (Met-Fütterung). Die  $^{13}\text{C}$ -Markierung ist durch \* und die vermutliche Modifikation im Ring H durch ein Oval gekennzeichnet.

## 2.6.4 <sup>13</sup>C-Fütterungsexperimente

Es folgten noch drei Fütterungsexperimente, um zu klären, welche Edukte beim Aufbau der verschiedenen Untereinheiten des Avilamycins während der Biosynthese verarbeitet bzw. an welchen Stellen und auf welchen Wegen sie in das Avilamycin eingebaut wurden. Zur Herstellung dieser drei Produktgemische wurde der Wildtyp mit verschiedenen markierten Substanzen (s.u.) gefüttert. Allerdings konnte bei der Herstellung der AviW\_Glu-Probe nur ein kleiner Teil des entsprechenden Edukts markiert zugegeben werden, da die Produktion des Avilamycins bei zu hohem Markierungsgrad zusammenbrechen könnte. Bei den beiden anderen Proben wurde zwar das markierte Edukt nur in markierter Form zugegeben, allerdings entstehen diese Edukte auch als Produkte des Glukose-Abbaus im Bakterium. Daher war unklar, wie hoch der Markierungsgrad in diesen beiden Proben war.

Wegen der geringen Ausbeute bei der Herstellung wurden diese Proben nicht wie bisher mittels präparativer HPLC aufgereinigt. Daher enthielten sie laut analytischer HPLC neben Avilamycin A auch noch vergleichbare Mengen Avilamycin C, sowie in geringeren Konzentrationen weitere Avilamycine wie z.B. Avilamycin B [115].

### 2.6.4.1 AviW\_Glu

Zur Herstellung der AviW\_Glu-Probe wurden die Bakterien bei der Aufzucht mit 1-<sup>13</sup>C-D-Glukose (siehe Abb. 13c) gefüttert. Diese wurde zu verschiedenen Zeiten der Anzucht zugegeben, so dass der Anteil der markierten Glukose zur insgesamt zugegebenen Menge am Ende 10% betrug. Aus den Massenspektren konnte ein reger Einbau der markierten Glukose abgeleitet werden, aufgrund des geringen Markierungsgrads konnten aber keine weiteren Erkenntnisse aus diesen Spektren gewonnen werden. Es wurde vermutet, dass die Glukose am Aufbau aller Zuckereinheiten des Avilamycins beteiligt ist und somit <sup>13</sup>C-Markierungen in den Ringen B bis H auftreten. Weiterhin wird Glukose wie schon erwähnt auch zu Pyruvat und Acetat abgebaut, die wiederum vermutlich für den Aufbau des Rings A und der Acetylgruppe im Ring H verwendet werden. Somit müssten auch hier <sup>13</sup>C-Markierungen zu detektieren sein (vergleiche durchgezogene Linie in Abb. 18).

### 2.6.4.2 AviW\_Ace

Durch Zufütterung von 1-<sup>13</sup>C-Na-Acetat (siehe Abb. 13d) bei der Aufzucht wurde dieses Probenmisch hergestellt. Den bisherigen Vermutungen nach sollte es nur zum Aufbau des Aromaten verwendet werden und somit sollte es auch nur in Ring A zu <sup>13</sup>C-Markierungen kommen (vergleiche gepunkteten Bereich in Abb. 18).

### 2.6.4.3 AviW\_Pyr

Für diese Probe wurden die Bakterien bei der Produktion mit 2-<sup>13</sup>C-Na-Pyruvat (siehe Abb. 13b) gefüttert. Den hypothetischen Biosyntheseweg zugrunde legend sollten Kohlenstoffe im Ring A und der Acetylfunktion im Ring H markiert sein (vergleiche gestrichelte Markierungen in Abb. 18).

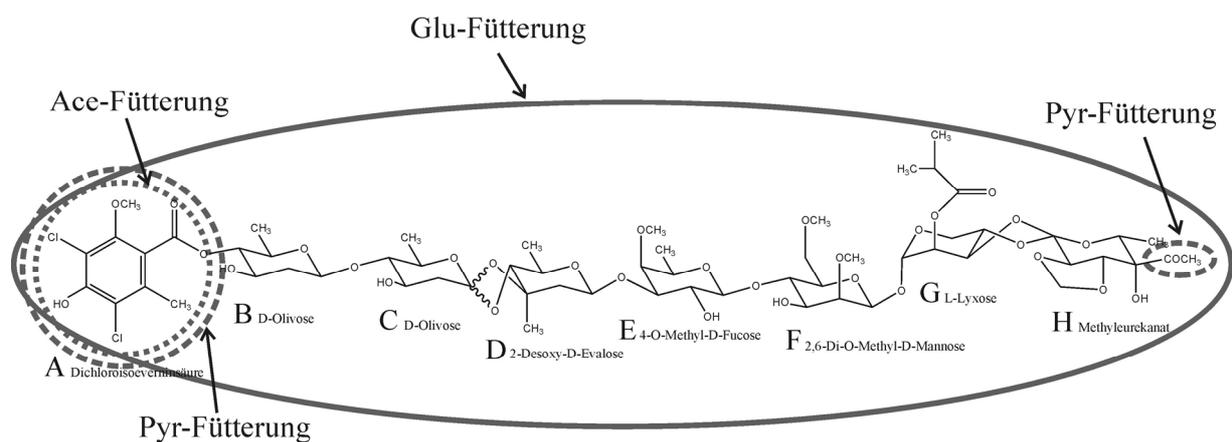


Abb. 18: Avilamycin A. Gekennzeichnet sind die Bereiche, in denen für die jeweilige Fütterung <sup>13</sup>C-Markierungen erwartet werden. Durchgezogene Linie: Glu-Fütterung; gepunktete Linie: Ace-Fütterung; gestrichelte Linie: Pyr-Fütterung. Für die Bedeutung der Abkürzungen (Glu, Ace und Pyr) siehe Abb. 13 oder das Abkürzungsverzeichnis.



### **3 Praktischer Teil**

In diesem Kapitel werden neben der Herstellung der Proben auch die verwendeten Messverfahren und -bedingungen beschrieben.

#### **3.1 Herstellung der Mutanten und der Proben**

Da diese Arbeiten in der Gruppe von Prof. Dr. A. Bechthold durchgeführt wurden, wird hier lediglich das angewandte Verfahren im Überblick beschrieben werden; für genauere Details sei auch hier auf die entsprechende Literatur verwiesen [28, 42, 79, 80].

Zuerst wurde das zu deaktivierende Gen aus dem Gencluster isoliert und mittels PCR vervielfältigt. Anschließend wurde es in einen geeigneten Vektor (in diesem Fall ein Plasmid) eingefügt (ligiert), wobei auch eine bestimmte Antibiotikaresistenz als so genannter Selektionsmarker mit eingebaut wurde. Nun konnte das interessante Gen mittels einer Frameshift-Mutation inaktiviert werden. Dazu wurde es an geeigneter Stelle mit einem speziellen Enzym (einer Restriktionsendonuklease) gespalten, um dann mit einem als T4-Polymerase bezeichneten Enzym vier zusätzliche Basen an der Schnittstelle einzufügen. Da die Aminosäuresequenz aber in 3er Codons codiert ist, wurden dadurch alle folgenden Codons falsch abgelesen und somit war alles nach der Schnittstelle „unbrauchbar“ für die Transkription; es würde nur ein Nonsense-Protein gebildet werden. Somit war das ganze Gen ohne Funktion.

Dieser Vektor wurde nun in die Bakterien transformiert. Dazu wurden die Bakterien mit Lysozym behandelt, um die Mureingerüste ihrer Zellwände abzubauen, wodurch nur noch die Zytoplasmamembranen als Hüllen blieben. Diese als Protoplasten bezeichneten Zellen konnten nun die DNA gut aufnehmen. Nach Entfernung des Lysozyms und einer Regenerationsphase konnten die Bakterien ihre Zellwände wieder aufbauen.

Nun folgte ein als homologe Rekombination bezeichneter Prozess, der bei einem geringen Prozentsatz der Bakterien von selbst geschieht. Bei diesen wurden die in dem Vektor lokalisierten und inaktivierten Gene gegen die intakten Gene im Chromosom ausgetauscht. Da dabei auch der Selektionsmarker (die oben genannte Antibiotika-Resistenz) mit in das Chromosom eingebaut wurde, waren die Bakterien, die den Austausch vorgenommen haben, anschließend resistent gegen dieses spezielle Antibiotikum. Dadurch konnte man diese Mutanten bei der folgenden Anzucht selektieren, da nur sie sich trotz des zugegebenen Antibiotikums vermehren konnten.

Nun wurden die Mutanten für die Gavibamycin-Produktion in größerem Maßstab (etwa 2 l) kultiviert. Anschließend wurden die Kulturen filtriert, die produzierten Gavibamycine mit geeigneten Lösungsmitteln extrahiert und dann im Vakuum bis zur Trockne eingengt. Zusätzlich wurden einige der Proben nach erneutem Lösen noch über spezielle Säulen (RP18-Harz) weiter aufgereinigt. Dennoch lagen die Proben nicht rein vor, sondern meist als Gemisch verschiedener Avilamycine. Als Beispiel sei hier die Analyse des HPLC-Spektrums der AviW-Probe in Tab. 4 aufgeführt.

Avilamycin	HPLC Signalfläche [%]
A	74,56
B	11,40
L, M, N	1,94
G	1,84
I	1,66
K, C	1,58
D <sub>1</sub>	1,14
H	1,13
J	1,09
F	0,88
A'	0,71
D <sub>2</sub>	0,11

Tab. 4: Zusammensetzung der AviW-Probe laut HPLC.

### 3.2 Herstellung, Konzentration und Zusammensetzung der NMR-Proben

Als Lösungsmittel wurde für alle Proben DMSO-d<sub>6</sub> (Reinheit >99,95 %, H<sub>2</sub>O <0,01 %) der Firma Deutero GmbH verwendet (entnommen jeweils aus 0,75 ml-Ampullen).

Da nur das unmarkierte Produkt des Wildtyps (AviW) in größerer Menge vorlag, wurde nur diese Probe in einem normalen 5 mm-NMR-Probenröhrchen (Typ: 506-PP-7) der Firma Wilmad vermessen. Für alle weiteren Proben wurden aufgrund der geringen Substanzmengen 5 mm-DMSO-Shigemiröhrchen (Typ: DMS 005) für die Messungen verwendet.

Für die Herstellung der AviW-NMR-Probe wurden ca. 40 mg festes AviW in etwa 0,65 ml DMSO-d<sub>6</sub> gelöst. (Dies entspricht einer Konzentration von ca. 45 mmol/l). Bei alle anderen Proben wurden jeweils die gesamte uns zur Verfügung stehende Menge an Substanz in ca. 0,35 ml DMSO-d<sub>6</sub> gelöst. Da die Feststoffe vorher nicht gewogen werden konnten (um dabei auftretende Verluste zu vermeiden und mangels entsprechend empfindlicher Geräte), konnte die Konzentration nur aus den Intensitäten der Signale im HSQC-Spektrum abgeschätzt werden. Hierbei ergab sich z.B. für die AviG5\_Met-Probe eine relativ geringe Konzentration von nur ca. 3 mmol/l.

### 3.3 NMR-Experimente

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Vielzahl von NMR-Experimenten aufgenommen, da eine genaue Auflistung all dieser Experimente mit den verwandten Parametern zu umfangreich und auch wenig informativ wäre, wird hier nur ein Überblick gegeben.

Für jede der in Kapitel 2.6 besprochenen Proben wurde ein Satz von Experimenten aufgenommen, der sich üblicherweise wie folgt zusammensetzte:

- $^1\text{H}$ -1D,  $^{13}\text{C}$ -1D, mit und ohne Entkopplung während  $t_2$
- DEPT45, DEPT90, DEPT135 [116]
- COSY [110]
- TOCSY [117–119] (Mischzeit  $\tau = 75$  ms)
- NOESY<sup>21</sup> [112] (Mischzeit  $\tau = 200$  ms), mit und ohne Entkopplung während  $t_2$
- Eine Variante des  $^{13}\text{C}$ -gefilterten NOESY (siehe Kap. 3.3.1, Mischzeit  $\tau = 200$  ms), mit und ohne Entkopplung während  $t_2$
- HMQC [146] / HSQC [111]
- HMBC [120]
- HMQC-COSY [121]
- HSQC-TOCSY [122]
- INEPT-1D [123], nur für die Fütterungsexperimente

Allerdings wurden nicht immer alle Spektren aufgenommen. Die gemessenen *spektralen Breiten* umfassten in der  $^1\text{H}$ -Dimension 0,7–6,3 ppm bzw. bei den Fütterungsexperimenten 0,3–5,7 ppm. In der  $^{13}\text{C}$ -Dimension wurde der Bereich 0–110 ppm (sowie vereinzelt auch 0–160 ppm) vermessen. Damit wurden alle Protonensignale überspannt und die Kohlenstoffspins, die sich außerhalb dieser Grenzen befanden, falteten z.B. in HSQC- und HMBC-Experimenten zurück in das Spektrum und konnten so zugeordnet werden.

Die Zahl der aufgenommenen Scans betrug bei den 2D-Experimenten meist 32, teilweise wurden auch 16 oder 64 Scans aufgenommen. Bei den 1D-Experimenten wurden dagegen normalerweise 1024 Scans akquiriert.

In der indirekten Dimension (F1) wurden meist 256 Punkte aufgenommen, in der direkten (F2) dagegen waren es bei entkoppelten Experimenten 1024 und bei nicht-entkoppelten 4096 oder 8192 Punkte. In beiden Dimensionen wurde üblicherweise zur Prozessierung die Zahl der Punkte mittels *Zero filling* jeweils verdoppelt.

---

<sup>21</sup> Da die NOESY-Spektren bereits ein gutes Signal-zu-Rausch-Verhältnis (S/N) zeigten, wurde auf die Aufnahme von ROESY-Spektren verzichtet.

Das Relaxationsdelay (d1) betrug üblicherweise 2,0 s. Allerdings ist erneut zu betonen, dass es sich bei diesen Daten um Richtwerte handelt, da in einzelnen Fällen z.B. aus Zeitgründen eine andere Zahl von Scans aufgenommen bzw. die d1-Zeiten verändert wurden. Die Temperatur betrug allerdings bei allen Messungen jeweils 295 K.

Fast alle Experimente wurden auf einem 750 MHz DMX-Spektrometer der Firma Bruker BioSpin aufgenommen, nur für einige anfängliche Spektren wurde ein 600 MHz DMX-Spektrometer des gleichen Herstellers genutzt. Beide Spektrometer sind Teil des Bayerischen NMR-Zentrums in Garching.

### 3.3.1 Die verwendete Variante des $^{13}\text{C}$ -gefilterten NOESY

Zur Klärung einer speziellen, später erörterten Frage (siehe Kap. 4.2.2.3) wurde eine Abwandlung des klassischen  $^{13}\text{C}$ -gefilterten NOESY [124] aufgenommen (siehe Abb. 19). Das Pulsprogramm und die Parameter sind in den Kapiteln 7.2 und 7.2.1 gezeigt, die Theorie hinter der Sequenz wird im Folgenden besprochen.

Anfangs werden unter Verwendung von INEPT-Schritten nur  $^{13}\text{C}$ -gebundene Wasserstoffe angeregt, während Magnetisierung auf  $^{12}\text{C}$ -gebundenen Wasserstoffkernen mittels Gradienten zerstört wird. Anschließend wird die Magnetisierung während der Mischzeit  $\tau$  mittels NOE auf räumlich benachbarte  $^1\text{H}$ -Kerne übertragen. Somit sind nur bei den Resonanzen der  $^{13}\text{C}$ -gebundenen Protonen NOE-Kontakte in der  $f_2$ -Dimension zu sehen.

Im Detail wird mit dem ersten  $90_y$ -(H)-Puls  $H_x$ -Magnetisierung erzeugt.

$$H_z \xrightarrow{90_y(H)} H_x$$

Anschließend bildet der INEPT-artige Sequenzblock für  $^{13}\text{C}$ -gebundene Protonen  $2H_z^{13}\text{C}_z$ -Magnetisierung. Dabei ist  $\tau = (4 \cdot {}^1J_{(C,H)})^{-1}$ .

$$H_x \xrightarrow{\tau-180_y(H,C)-\tau} 2H_y^{13}\text{C}_z \xrightarrow{90_x(H)} 2H_z^{13}\text{C}_z$$

Die  $H_x$ -Magnetisierung auf den  $^{12}\text{C}$ -gebundenen Protonen dagegen entwickelt sich nicht.

$$H_x \xrightarrow{\tau-180_y(H,C)-\tau} H_x \xrightarrow{90_x(H)} H_x$$

Sie verbleibt somit bei  $H_x$  und wird von dem nun folgenden Gradienten zerstört. Der zweite INEPT-artige Sequenzblock überführt den Operator  $2H_z^{13}\text{C}_z$  wieder nach  $H_z$ .

$$2H_z^{13}\text{C}_z \xrightarrow{90_y(H)} 2H_x^{13}\text{C}_z \xrightarrow{\tau-180_y(H,C)-\tau} H_y \xrightarrow{90_x(H)} H_z$$

Der nun folgende Gradient zerstört erneut inzwischen eventuell gebildete, unerwünschte transversale Magnetisierung. Somit verbleibt nur Magnetisierung auf  $^{13}\text{C}$ -gebundenen Protonen, die nun mittels der folgenden NOESY-Sequenz auf räumlich benachbarte Protonen übertragen und dann auf diesen detektiert wird. Auf eine Entkopplung während der Detektion

wurde verzichtet, um zum einen in dieser Dimension eine größere Zahl von Punkten aufnehmen zu können; zum anderen ist sie auch nur bedingt nötig, da zwar die Aufspaltung der Diagonalen zu vermeiden gewesen wäre, aber alle anderen Signale keine merkliche Aufspaltung aufgrund von  $^1J_{(C,H)}$ -Kopplung aufweisen. Denn durch das spezielle Markierungsschema der hier verwendeten Probe (AviG5\_Met, siehe Kapitel 2.6.2.2) sind insgesamt nur vier Kohlenstoffe  $^{13}\text{C}$ -markiert und somit sind nahezu alle NOE-Kontakte zu Protonen, deren direkt gebundene Kohlenstoffe nur eine natürliche Häufigkeit an  $^{13}\text{C}$  aufweisen.<sup>22</sup> Die einzige Ausnahme stellt der Kontakt zwischen Gruppe3 und Gruppe4 dar und dieser ist im Spektrum aufgrund des geringen Unterschieds der chemischen Verschiebung ohnehin von der Diagonalen überlagert.

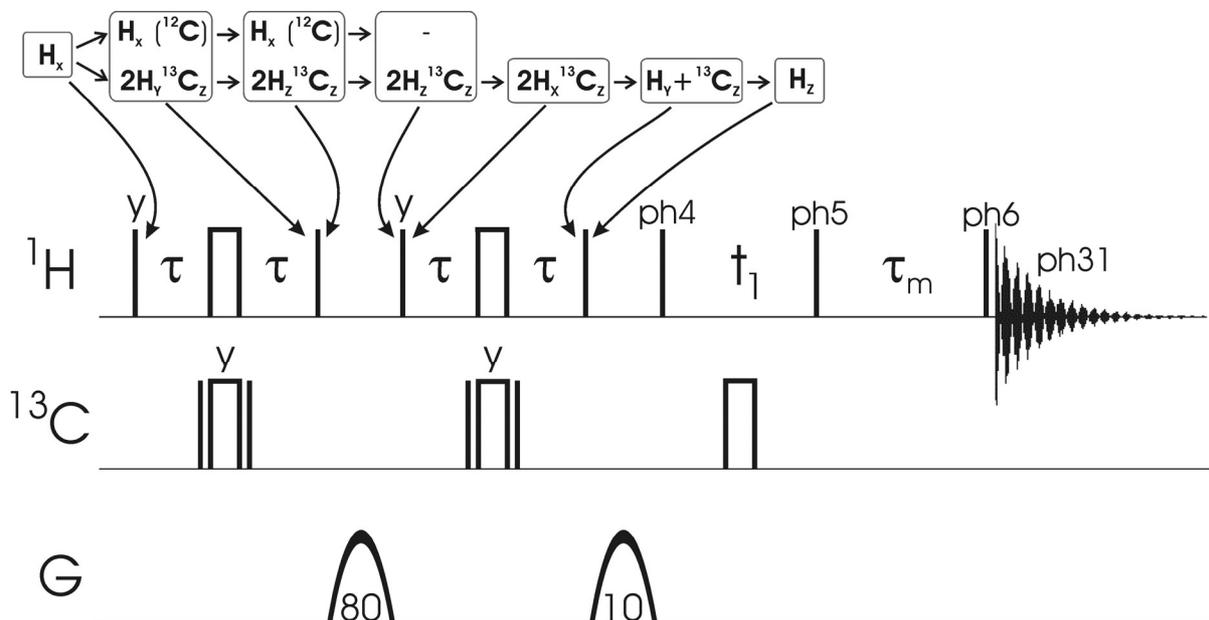


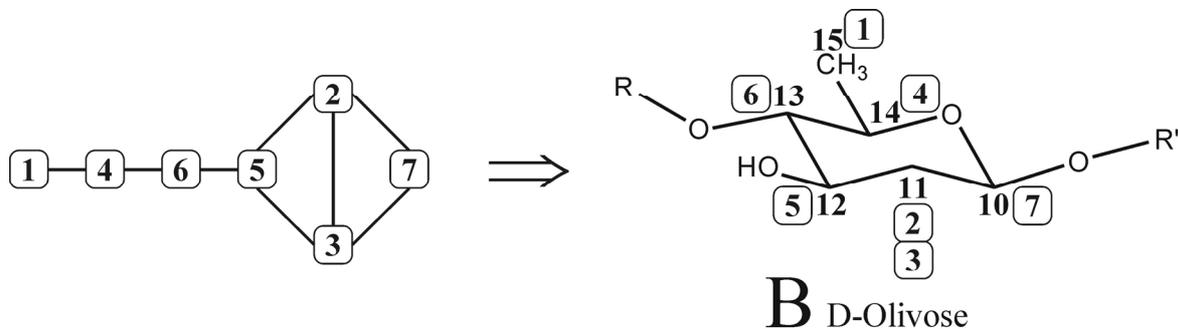
Abb. 19: Schematische Darstellung der Pulssequenz der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Variante des  $^{13}\text{C}$ -gefilterten NOESY. Dabei entspricht  $\tau = (4 \cdot ^1J_{(C,H)})^{-1}$ . In dieser und allen folgenden Abbildungen von Pulssequenzen werden  $90^\circ$  ( $180^\circ$ ) von schmalen (breiten) Rechtecken repräsentiert. Nur von x abweichende Phasen sind mit kleinen lateinischen Buchstaben oberhalb der Pulse bezeichnet. Das zugehörige Pulsprogramm sowie die dafür benötigten Parameter finden sich im Anhang in Kapitel 7.2.

<sup>22</sup> Somit zeigen für diese Kreuzsignale nur etwa 1,1 % des Signals eine Aufspaltung aufgrund von  $^1J_{(C,H)}$ -Kopplungen und diese  $^{13}\text{C}$ -Satelliten sind dementsprechend vernachlässigbar.

### 3.3.2 Allgemeines Verfahren bei der Zuordnung

Zuerst wurden mittels der TOCSY-Spektren die Spinsysteme identifiziert und anschließend die Reihenfolge der Spins innerhalb dieser Systeme durch Analyse der COSY-Spektren festgelegt. Daraufhin konnten die Verbindungen der Spinsysteme untereinander durch HMBC- und NOESY-Kontakte geklärt werden.

Dieses Verfahren soll anhand eines Beispiels verdeutlicht werden. Abb. 20 zeigt das TOCSY-Spektrum von AviW. Man erkennt ein Spinsystem, dass aus sieben einzelnen Spins besteht. Der Spin 1 stellt aufgrund seiner chemischen Verschiebung von 1,21 ppm wahrscheinlich eine Methylgruppe dar. Mithilfe des COSY-Spektrums (Abb. 21) kann nun die Verknüpfung dieser sieben Spins untereinander geklärt werden. Dabei erkennt man folgende Reihenfolge:



Die Spins 2 und 3 sind u.a. aufgrund des im COSY-Spektrum erkennbaren Verknüpfungsmusters als Methylengruppe zu identifizieren. Anhand der Intensitäten der Kreuzsignale bei diesem Experiment lassen sich die Methylenprotonen auch, sofern keine Überlagerungen vorliegen, bezüglich ihrer Konformation identifizieren, da zwischen den im COSY zur Korrelation verwendeten  $^3J_{(H,H)}$ -Kopplungen und dem Dihedralwinkel  $\phi$  dieser beiden Protonen eine Relation besteht, die durch die *Karplus-Conroy*-Kurve beschrieben wird [93]. Diese Beziehung weist bei Dihedralwinkeln von etwa  $0^\circ$  bzw.  $180^\circ$  Maxima und bei einem Winkel von etwa  $90^\circ$  ein Minimum für die  $^3J_{(H,H)}$ -Kopplung auf.

So beträgt z.B. Dihedralwinkel zwischen dem Spin 7 und dem axialen Methylenproton (ax) etwa  $180^\circ$ , während der Dihedralwinkel zum äquatorialen Methylenproton (äq) nur etwa  $60^\circ$  beträgt. Daher besitzt das Kreuzsignal der ersteren Korrelation eine größere Intensität als das der letzteren und somit entspricht gemäß Abb. 21 der Spin 2 dem axialen und der Spin 3 dem äquatorialen Methylenproton. Dies wird auch durch die Analyse der Kreuzsignale des Spins 5 mit den Methylenprotonen bestätigt.

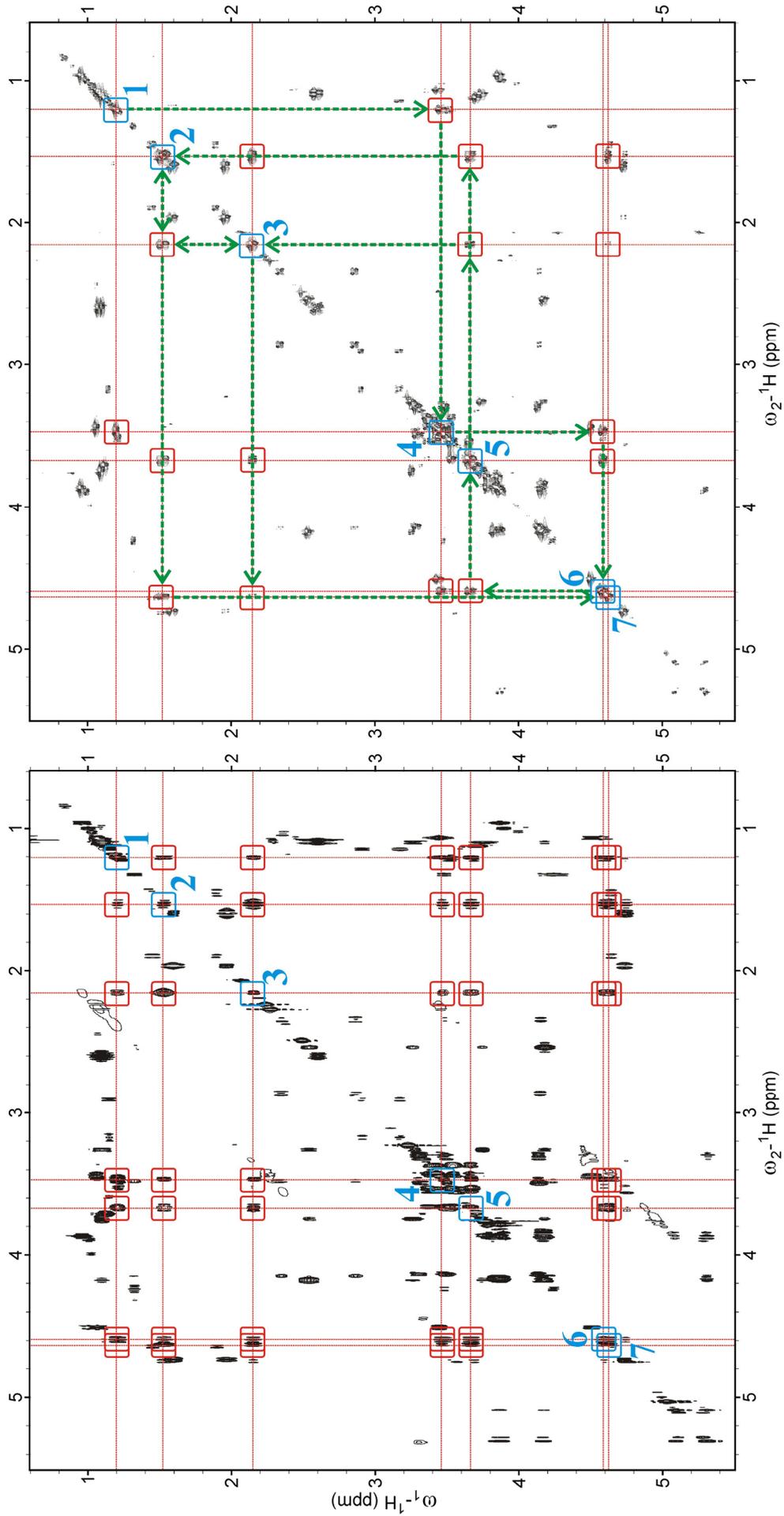


Abb. 20: Ausschnitt aus dem TOCSY-Spektrum der AviW-Probe. Man erkennt ein Spinsystem, das aus sieben Spins besteht, die entsprechend ihrer chemischen Verschiebung mit den Nummern 1 bis 7 bezeichnet wurden. In dieser, wie auch in allen folgenden Abbildungen von Spektren, sind positive Signale mit schwarzen Konturen und negative mit grauen dargestellt.

Abb. 21: Ausschnitt aus dem COSY-Spektrum der AviW-Probe. Mit diesem Experiment kann die Reihenfolge der sieben Spins innerhalb des Spinsystems bestimmt werden. Sie lautet 1-4-6-5-2/3-7.

Nun konnte schon aufgrund dieser Erkenntnisse dieses Spinsystem dem Ring B zugeordnet werden. Denn da es aus sieben Spins besteht, hätte es nur noch das Spinsystem in Ring F sein können. Letzteres enthält aber keine Methylgruppe und die Methylengruppe wäre in diesem auch endständig.

Um dies zu bestätigen bzw. um die Verknüpfung zu den anderen Spinsystemen festzulegen, wurden nun sowohl die HMBC- als auch die NOESY-Spektren untersucht. Dabei geht die Untersuchung des HMBC-Spektrums mit einer Zuordnung der Kohlenstoffe mittels HSQC-/HMQC-Spektrum einher. Abb. 22a und b zeigen einen Teil der wichtigen HMBC- und NOE-Kontakte des Rings B zu seinen Nachbarn. Dadurch kann sowohl die Reihenfolge der einzelnen Untereinheiten des Moleküls, als auch die Verknüpfungen zu isolierten „Seitengruppen“ wie z.B. dem Isopropylrest an C-49 (Ring G) und der Methylengruppe 61 (Ring H), festgelegt werden.

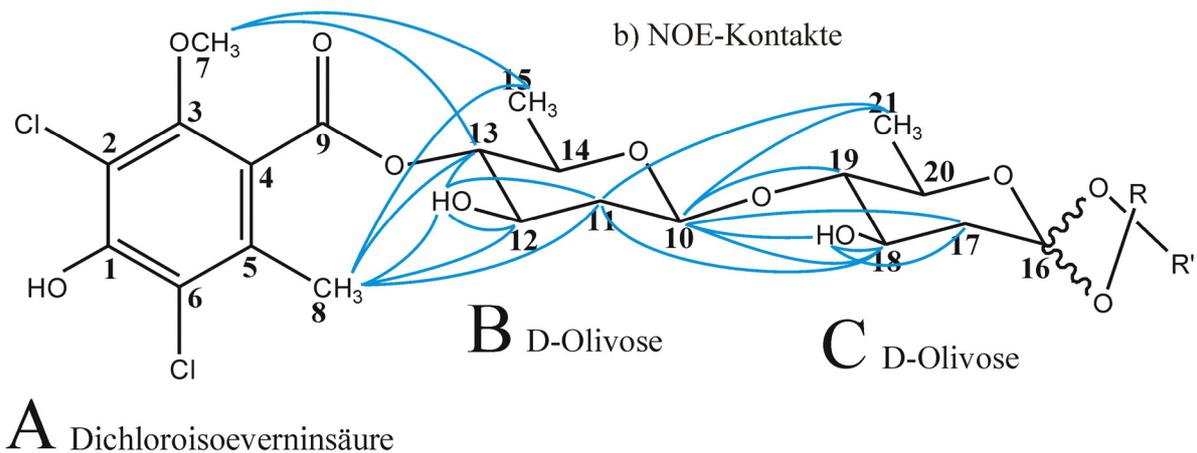
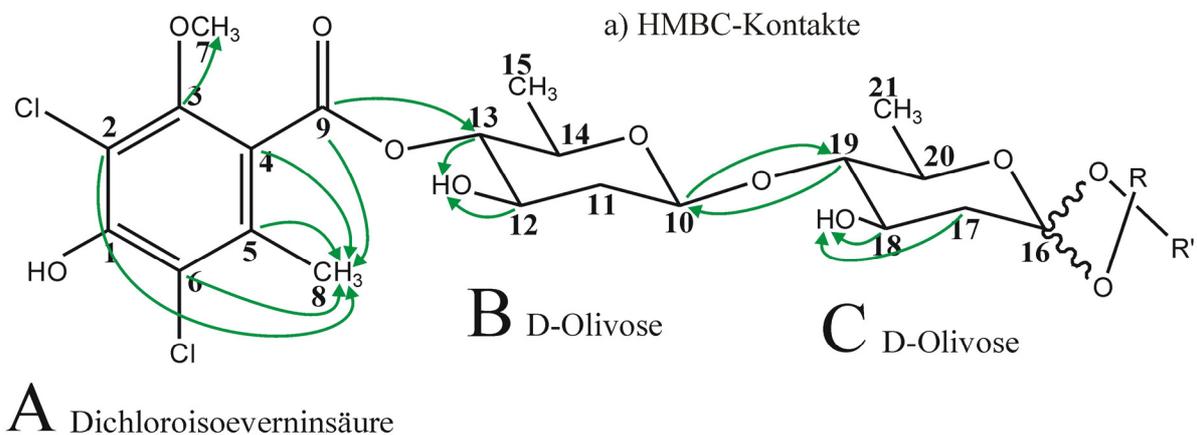


Abb. 22: Wichtige a) HMBC- und b) NOE-Kontakte des Rings B mit seinen Nachbarn sowie den sich nicht im Spinsystem befindenden Protonen in den Hydroxygruppen. Die Pfeile in a) kennzeichnen die Kontakte von Kohlenstoff- zu Wasserstoffatomen (C → H). Bei beiden Abbildungen wurde ein Teil der Wasserstoffatome aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht dargestellt. Dennoch sind die NOE-Kontakte selbstverständlich zwischen Protonen.

### **3.4 Massenspektrometrie**

Die Massenspektren wurden durch *Elektrospray Ionisation* (ESI) erhalten. Die Messungen der HPLC-ESI-MS Massenspektren wurden mit einem Gerät der Firma Finnigan vom Typ LCQ in Kombination mit dem HPLC-System Hewlett Packard HP 1100 (Säulenmaterial Nucleosil 100 5C<sub>18</sub>) durchgeführt.



## **4 Analyse der NMR Spektren**

Im Folgenden wird die Analyse der NMR-Spektren der verschiedenen Proben sowie die daraus resultierenden Konsequenzen besprochen. Dabei wird zuerst gezeigt, wie die AviW-Spektren zugeordnet wurden und welche Besonderheiten dabei auftraten. Anschließend werden die Erkenntnisse aus den weiteren Spektren erläutert. Diese Reihenfolge entspricht zwar nicht dem chronologischen Ablauf der Untersuchung, wurde hier dennoch aus Gründen der besseren Übersicht gewählt.

### **4.1 Vollständige Zuordnung der AviW-Spektren und Besonderheiten bei der Zuordnung**

Um effektiv die Veränderungen in den Produkten der Mutanten identifizieren zu können, war eine vollständige Zuordnung des vom Wildtyp produzierten Avilamycins A unerlässlich. Anschließend sollte sich durch Vergleich der Spektren (insbesondere der HMQC-Spektren) einfach feststellen lassen, welche Signale in den Spektren der Mutantenprodukte nicht mehr vorhanden sind, um somit eindeutig zu klären, welche Veränderungen während der Biosynthese aufgetreten sind. Ebenso wichtig ist die vollständige Zuordnung bei der Identifizierung der markierten Kohlenstoffe in den Produkten der Fütterungsexperimente. Daher wurde als erstes eine Literatur-Recherche durchgeführt, um zu überprüfen, ob schon Zuordnungsdaten für das Produkt des Wildtyps vorhanden sind. Dabei zeigte sich aber, dass bisher nur sehr unvollständige Zuordnungen durchgeführt wurden (Tab. 5) [50, 51].

Es wurde ein erster Satz von Spektren aufgenommen (HMQC, HMBC, NOESY, COSY, TOCSY und 1D-Spektren) und entsprechend dem in Kapitel 3.3.2 beschriebenen Verfahren zugeordnet. Dabei zeigte sich aber schon recht früh, dass die Signale teilweise stark überlagern und eindeutige Zuordnungen daher nur bedingt möglich waren. Ferner gab es bedeutend mehr als die erwartete Zahl an Signalen, was auf nicht zu vernachlässigende Verunreinigungen hindeutete.

Nach dem ersten Durchgang waren etwa 85 % der Wasserstoffe (bzw. ca. 92 % der sich nicht in Hydroxygruppen befindlichen Wasserstoffe) sowie ca. 78 % der Kohlenstoffe zugeordnet. Die Hauptlücken waren der gesamte Ring G (Positionen 44–48) sowie die Hälfte des Rings F (Positionen 36–38). Letzterer zeigte zu viele Überlagerungen innerhalb des Rings und erlaubte dadurch keine eindeutige Zuordnung. Daher gab es von dieser Seite keinen Ansatzpunkt, um Atome des Rings G zu identifizieren, da keine Konnektivitäten festgelegt werden konnten. Auch auf der anderen Seite des Rings G gab es keine eindeutigen Kontakte zum nächsten

Ring, da weder HMBC- noch eindeutige NOE-Kontakte über die Orthoesterbindungen gefunden werden konnten. Der vermutliche Grund für die fehlenden HMBC-Kreuzsignale wird in Kap. 4.1.7 besprochen. NOE-Kontakte waren problematisch, da im „vorderen“ Teil des Rings H mit H-54 nur ein einziges Proton vorhanden war und dieses mit einigen zu diesem Zeitpunkt noch nicht identifizierten Protonen überlagerte. Diese Protonen waren Teil eines sich ebenfalls überlagernden und nicht zugeordneten Spinsystems nicht genau bestimmbarer Größe.

Position	$\delta_{\text{Literatur}}$ [ppm]	$\delta$ [ppm]	Position	$\delta_{\text{Literatur}}$ [ppm]	$\delta$ [ppm]	Position	$\delta_{\text{Literatur}}$ [ppm]	$\delta$ [ppm]	Position	$\delta_{\text{Literatur}}$ [ppm]	$\delta$ [ppm]
HO-1		?	H-34	3,54	3,44	C-1	151,9	151,3	C-32	<sup>b</sup>	80,6
H-7	3,88	3,76	H-35	<sup>a</sup>	1,13	C-2	113,2	113,5	C-33	<sup>b</sup>	69,6
H-8	2,36	2,27	H-36		4,75	C-3	150,4	151,2	C-34	62,0	60,7
H-10		4,62	H-37		3,56	C-4	117,9	118,3	C-35	16,3	15,8
H-11 <sub>ax</sub>		1,53	H-38		3,53	C-5	132,9	132,3	C-36	96,1	95,2
H-11 <sub>äq</sub>		2,15	HO-38		4,44	C-6	122,3	122,2	C-37	<sup>b</sup>	78,9
H-12		3,67	H-39		3,43	C-7	62,3	61,6	C-38	<sup>b</sup>	71,3
HO-12		5,25	H-40		3,37	C-8	17,4	17,1	C-39	<sup>b</sup>	77,4
H-13		4,59	H-41	3,55	3,42	C-9	166,3	165,5	C-40	<sup>b</sup>	74,1
H-14		3,47	H-42 <sub>a</sub>		3,54	C-10	100,9	99,7	C-41	61,7	60,6
H-15	<sup>a</sup>	1,21	H-42 <sub>b</sub>		3,66	C-11	39,2	39,9	C-42		70,2
H-17 <sub>a/b</sub>		2,54 <sup>e</sup>	H-43	3,30	3,23	C-12	<sup>b</sup>	67,3	C-43	59,2	58,1
H-18		4,18	H-44		5,09	C-13	<sup>b</sup>	78,7	C-44	94,9	93,8
HO-18		4,50	H-45		5,31	C-14	<sup>b</sup>	68,7	C-45	<sup>b</sup>	68,4
H-19		3,26	H-46		3,87	C-15	18,6	17,2	C-46	<sup>b</sup>	77,6
H-20		3,75	H-47		4,16	C-16	120,2	171,1	C-47	<sup>b</sup>	69,2
H-21	<sup>a</sup>	1,10	H-48 <sub>a</sub>		3,84	C-17	40,1	39,0	C-48	<sup>b</sup>	62,0
H-22		4,73	H-48 <sub>b</sub>		4,17	C-18	<sup>b</sup>	66,7	C-49	175,2	174,5
H-23 <sub>ax</sub>		1,60	H-50		2,60	C-19	<sup>b</sup>	84,8	C-50	33,9	33,0
H-23 <sub>äq</sub>		1,97	H-51	<sup>a, c</sup>	1,08 <sup>c</sup>	C-20	<sup>b</sup>	65,6	C-51	19,1 <sup>c</sup>	18,0 <sup>c</sup>
H-25		4,51	H-52	<sup>a, c</sup>	1,10 <sup>c</sup>	C-21	18,6	19,6	C-52	19,7 <sup>c</sup>	18,6 <sup>c</sup>
H-26		3,44	H-54		3,78 <sup>d</sup>	C-22	101,7	100,6	C-53	118,9	118,4
H-27	1,38	1,18	H-55		3,86 <sup>d</sup>	C-23	43,9	45,6	C-54	<sup>b</sup>	71,4 <sup>d</sup>
H-28	<sup>a</sup>	1,07	HO-56		?	C-24	<sup>b</sup>	69,1	C-55	<sup>b</sup>	79,2 <sup>d</sup>
H-29		4,14	H-57		3,87	C-25	<sup>b</sup>	78,6	C-56	<sup>b</sup>	81,6
H-30		3,29	H-58	<sup>a</sup>	0,96	C-26	<sup>b</sup>	68,4	C-57	<sup>b</sup>	73,8
HO-30		5,34	H-60	2,31	2,24	C-27	17,4	20,9	C-58	13,5	13,4
H-31		3,49	H-61 <sub>a</sub>		5,03	C-28	17,7	17,9	C-59	206,2	210,3
H-32		3,32	H-61 <sub>b</sub>		5,04	C-29	104,4	103,1	C-60	25,4	27,3
H-33		3,71				C-30	<sup>b</sup>	69,0	C-61	96,9	95,7
						C-31	<sup>b</sup>	81,8			

Tab. 5: Übersicht über die chemischen Verschiebungen des Avilamycin A in der Literatur [50, 51] und nach der ersten Zuordnung.

*a*: Signale werden im Bereich 1,00-1,40ppm erwartet.

*b*: Signale werden im Bereich 63,1-88,3ppm erwartet.

*c*: 51 und 52 sind nicht zu unterscheiden.

*d*: 54 und 55 waren anfangs nicht eindeutig zu unterscheiden (siehe Kap. 4.1.8).

*e*: Für diese beiden Methylenprotonen war nur ein Signal zu finden (siehe auch Kap. 4.1.1).

Daher wurden HMQC-COSY- und HSQC-TOCSY-Spektren aufgenommen, welche eine beinahe vollständige Zuordnung erlaubten. Ring G konnte durch die neuen Spektren und die aus der Variante des  $^{13}\text{C}$ -gefilterten NOESY-Experiments gewonnenen Informationen identifiziert werden. Das Experiment wird in Kapitel 3.3.1 beschrieben, seine Anwendung in Kapitel 4.2.2.3.1. Durch die neuen NOE-Kontakte wurden Spins identifiziert, die sich wahrscheinlich im Ring G befanden, woraufhin dessen Überlagerungen mit den neuen Experimenten aufgeklärt werden konnten. Auch die Zuordnung des Rings F konnte damit vervollständigt werden, was in Kap. 4.1.2 detaillierter beschrieben ist.

Die Konnektivitäten und somit die Reihenfolge der einzelnen Ringe sowie die Verbindung zu isolierten Seitenketten konnte durch die HMBC- (Abb. 23) und NOESY-Spektren (Abb. 24) eindeutig geklärt werden.

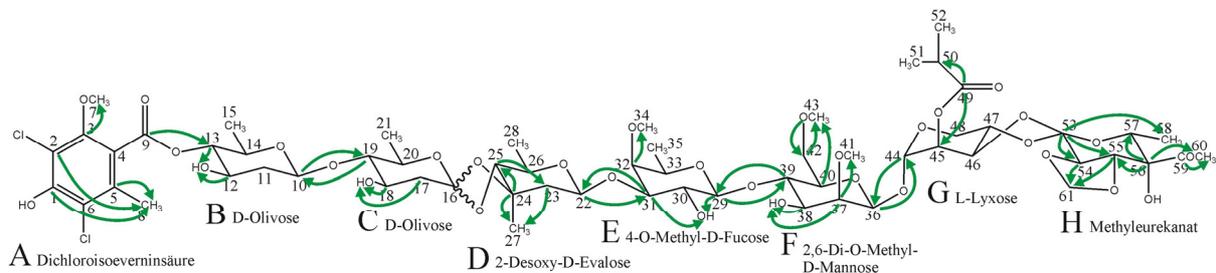


Abb. 23: Wichtige HMBC-Kontakte des Avilamycin A. Die Pfeile kennzeichnen die Kontakte von Kohlenstoff- zu Wasserstoffatomen (C  $\rightarrow$  H).

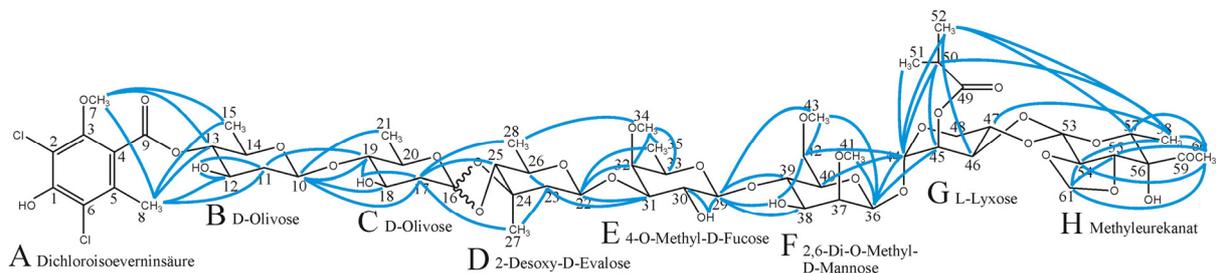


Abb. 24: Wichtige NOE-Kontakte des Avilamycin A. Ein Teil der Wasserstoffe wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht dargestellt, dennoch handelt es sich um homonukleare NOE-Kontakte.

Somit waren alle Kohlenstoffverschiebungen und abgesehen von den Hydroxygruppen fast alle Protonenresonanzen zugeordnet (Tab. 5). Von den beiden verbleibenden Lücken in der Zuordnung befand sich eine in Ring C, denn für die Methylenprotonen H-17<sub>a/b</sub> konnte nur eine Resonanz (statt der erwarteten zwei) gefunden werden. Es wurde vermutet, dass die beiden Resonanzen zufällig so nahe beieinander liegen, dass sie im Spektrum nicht mehr aufgelöst sind. Diese Unklarheit konnte aber im Laufe späterer Untersuchungen noch eindeutig geklärt werden (Kap. 4.1.1). Die zweite Lücke in der Aufklärung war die mangelnde Unterscheidung der beiden Protonen H-54 und H-55. Es gab zwar schon erste Hinweise auf deren korrekte Zuordnung, aber diese waren nicht eindeutig. Da diese beiden Spins isoliert vom Rest des Spinsystems in Ring H sind, konnte mittels COSY keine Reihenfolge ermittelt werden. NOE-Kontakte zu nahen Protonen waren nur zu den überlappenden Methylenprotonen von H61<sub>a/b</sub> vorhanden und somit ebenfalls nicht zur Identifikation geeignet. Die Klärung dieser Unklarheit wird in den Kapiteln 4.1.8 und 4.3.1 genauer besprochen.

Bezüglich der Hydroxygruppen konnten vier der erwarteten sechs Gruppen identifiziert werden (HO-12, HO-18, HO-30 und HO-38). HO-1 konnte mangels Protonen in der Umgebung nicht im NOESY-Spektrum identifiziert werden und HMBC-Kontakte waren ebenfalls nicht zu erkennen. HO-56 dagegen scheint mit einer der anderen Protonenfrequenzen in Ring H zu überlagern und dadurch nicht zu identifizieren zu sein.

#### **4.1.1 Konstitutionelle Änderung der Orthoesterbindung zwischen Ring C und D**

Bei der Untersuchung der Vergleichsproben für die Modifikationen im Ring H (AviW\_Met und AviG4\_Pyr, Kap. 4.3) wurde ein zweiter, sehr deutlicher, Signalsatz mit abweichenden chemischen Verschiebungswerten für die Atome der Ringe B bis E bemerkt. Beim Vergleich mit den Wildtyp-Spektren zeigte sich, dass er auch schon in der AviW-Probe vorhanden war, wenn auch nur mit sehr geringer Intensität. Dieser neue Signalsatz war aber in den AviW\_Met und AviG4\_Pyr -Proben intensiver als der bisher zugeordnete und wies insbesondere für die Ringe C und D deutliche und für die Ringe B und E immer noch merkliche Abweichungen auf. Ferner zeigte er zwei Resonanzen für die beiden Methylenprotonen H-17<sub>a/b</sub>, während bei der bisherigen Zuordnung nur ein Signal zu finden war.

Es wurde vermutet, dass bei der Aufarbeitung oder Lagerung eine der beiden Bindungen der Orthoestergruppe zwischen den Ringen C und D durch Hydrolyse geöffnet worden war, wie in Abb. 25 gezeigt.<sup>23</sup> Da dies aber nicht das Ziel dieser Untersuchung war, wurde anfangs nicht weiter darauf eingegangen.

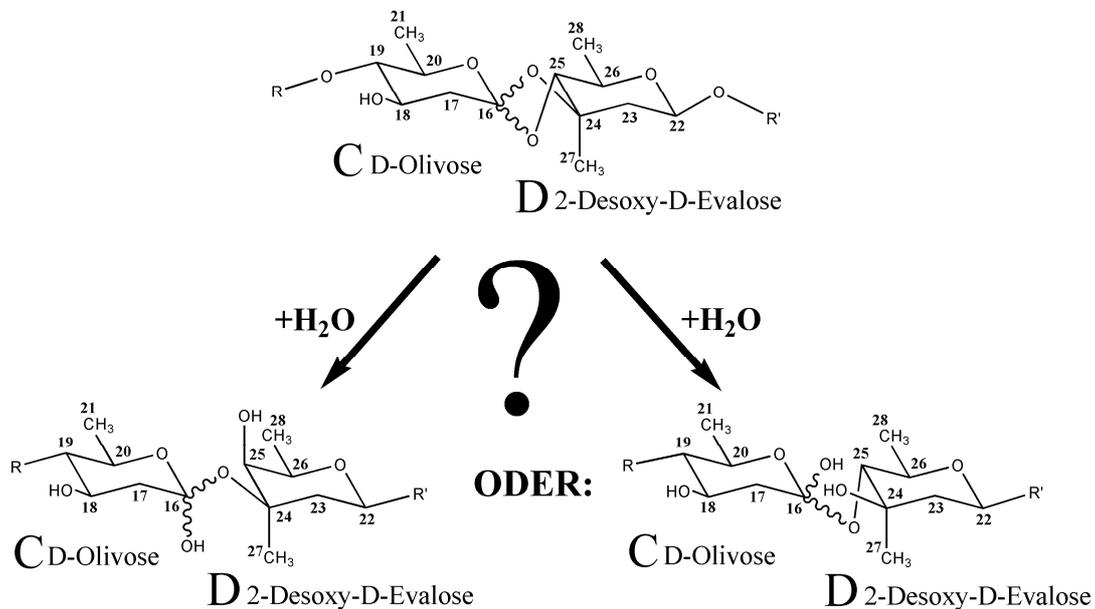


Abb. 25: Erste Vermutung zum Mechanismus der Öffnung der Orthoesterbindung zwischen den Ringen C und D. Dabei wird eine der beiden R-O-R-Brücken durch Anlagerung von  $\text{H}_2\text{O}$  gespalten, so dass anschließend zwei neu gebildete Hydroxygruppen im Molekül vorhanden sind.

Als allerdings bei der Untersuchung der Proben der Fütterungsexperimente (AviW\_Glu, AviW\_Pyr und AviW\_Ace) in den NMR-Spektren fast ausschließlich der neue Signalsatz der vermeintlich geöffneten Form vorhanden war, wurde diese Diskrepanz genauer untersucht. Die Proben waren direkt nach der Herstellung und Aufarbeitung massenspektroskopisch untersucht worden und dabei wurde fast nur die geschlossene Form mit einer molekularen Masse von  $1402 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$  nachgewiesen [115]. Da dies aber den Daten aus den NMR-Spektren widersprach, wurden mehrere Proben, die wie folgt hergestellt wurden, erneut NMR- und massenspektroskopisch untersucht:

<sup>23</sup> Dadurch steigt die molare Masse der Verbindung um  $18 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$  an.

- *Probe1*: 0,1 mg des AviW-Feststoffs, aus dem anfangs die AviW-NMR-Probe hergestellt wurde und der seitdem (etwa drei Jahre) im Kühlschrank (bei ca. +4 °C) gelagert wurde, wurde in etwa 1 ml ACN gelöst.
- *Probe2*: Aus dem AviW-Feststoff wurde eine frische, in DMSO-d<sub>6</sub> gelöste, NMR-Probe hergestellt und sofort im NMR-Spektrometer (HSQC) vermessen. Anschließend wurde sie noch etwa sechs Tage bei Raumtemperatur gelagert. Dann wurden etwa 5 µl entnommen und in 3 ml ACN gelöst.
- *Probe3*: Aus der vor etwa drei Jahren hergestellten und seitdem im Kühlschrank bei etwa +4 °C gelagerten AviW-NMR-Probe wurden ebenfalls etwa 5 µl entnommen und in 3 ml ACN gelöst. Zuvor wurde von der Probe noch ein HSQC-Spektrum aufgenommen.
- *Probe4*: Aus der AviW\_Glu-NMR-Probe wurden nach Messen der NMR-Spektren und ca. 25-tägiger Lagerung der DMSO-d<sub>6</sub> gelösten Probe bei +4 °C ebenfalls etwa 5 µl entnommen und in 3 ml ACN gelöst. Ferner wurde etwa zwei Wochen später, nach insgesamt ca. 38-tägiger Lagerung bei +4 °C, ein weiteres HSQC-Spektrum aufgenommen.

Die Auswertung der Massenspektren ergab folgendes Ergebnis:

- *Probe1* enthielt fast nur die geschlossene Form des Moleküls (geschätzte 95 %) mit einer molaren Masse von 1402 g·mol<sup>-1</sup>. Somit zeigte sich, dass der Feststoff auch über Jahre hinweg bei +4 °C ohne merkliche Verluste gelagert werden kann.
- *Probe2* zeigte ein (abgeschätztes) Verhältnis von ca. 70 : 30 von geschlossener ( $M = 1402 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) zu geöffneter Form ( $M = 1420 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ). Es sind also schon nach wenigen Tagen merkliche Verluste nachweisbar.
- In *Probe3* war die geschlossene Form nicht mehr nachweisbar, da eine anscheinend vollständige Reaktion zur offenen, hydrolysierten Form stattgefunden hatte.
- Für *Probe4* zeigte sich ein ähnliches Ergebnis wie für *Probe2*, also ebenfalls ein ungefähres Verhältnis von ca. 70 : 30 (geschlossen : geöffnet). Dies ist ein deutlicher Unterschied zu der Messung, die direkt nach der Herstellung durchgeführt wurde, denn wie oben erwähnt wurde dabei fast nur die geschlossene Form nachgewiesen. Da aber die Probe in der Zwischenzeit schon ca. zwei Tage bei +25 °C vermessen und anschließend noch etwa 25 Tage bei +4 °C gelagert wurde, ist dieser Unterschied nicht überraschend.

Nun wurden die dazugehörigen neu aufgenommenen HSQC-Spektren ausgewertet:

Schon die Untersuchung des Probe2-Spektrums zeigte, dass die bisherige Auswertung falsch war. Denn im Gegensatz zu den Ergebnissen des Massenspektrums konnten bei dieser Probe im Zuge der NMR-Untersuchung nur solche Resonanzen identifiziert werden, die Teil des neuen Signalsatzes sind, der bisher der offenen Form zugeordnet wurde. Somit musste dieser stattdessen der geschlossenen Form zugesprochen werden.

Dementsprechend muss die bisherige Zuordnung des Wildtyps aus Tab. 5 der offenen Form des Avilamycins entsprechen. Daher wird folgende Nomenklaturerweiterung eingeführt: Sofern nicht anders angegeben ist immer die geschlossene Form einer Verbindung gemeint. Ferner werden die offenen Verbindungen von nun an mit einem angehängten „\_O“ gekennzeichnet, z.B. Gavibamycin N1\_O.

Diese neue Zuordnung (Tab. 6) zeigte aber auch, dass die erste, anfangs vermessene, AviW-Probe zum Zeitpunkt der NMR-Messungen, auf denen der Großteil der Zuordnung beruhte, schon fast vollständig zur offenen, hydrolysierten Form umgesetzt worden war. Es muss aber betont werden, dass alle bisherigen Erkenntnisse auch weiterhin korrekt sind, da beide Zuordnungen bekannt waren und sonstige Unterschiede, z.B. fehlende Methoxygruppen in AviG4\_Met etc. oder Strukturänderungen aufgrund anderer Avilamycine, nicht in den Ringen C und D lokalisiert waren. Weiterhin konnte mit dieser Erkenntnis schon ein Teil der Unreinheiten in der AviW-Probe erklärt werden, denn ein Teil der Signale entsprach der noch nicht zersetzten und somit noch geschlossenen Form.

Auch die HSQC-Spektren der anderen Proben unterstützten diese Erkenntnis. So zeigte die schon mehrere Jahre in DMSO-d<sub>6</sub> gelöste und bei +4 °C gelagerte Probe3 nur noch die inzwischen als geöffnet erkannte Form des Avilamycins.

Besonders gut war dies aber bei Probe4 zu erkennen. Bei den ersten NMR-Messungen direkt nach Lösen der Probe zeigte sich ein geschätzter Überschuss von 95 : 5 für die geschlossene Form. Das etwa 25 Tage später gemessene Massenspektrum zeigte nur noch einen Überschuss von ca. 70 : 30. Zwei Wochen später waren beide Formen des Avilamycins laut HSQC in etwa gleicher Menge vorhanden.

Position	Avilamycin A $\delta$ [ppm]	Avilamycin A_O $\delta$ [ppm]	Position	Avilamycin A $\delta$ [ppm]	Avilamycin A_O $\delta$ [ppm]
H-10	4,72	4,62	C-10	99,6	99,7
H-11 <sub>ax</sub>	1,55	1,53	C-11	39,6	39,9
H-11 <sub>äq</sub>	2,18	2,15	C-12	67,1	67,3
H-12	3,70	3,67	C-13	78,3	78,7
HO-12	5,20	5,25	C-14	69,0	68,7
H-13	4,62	4,59	C-15	17,0	17,2
H-14	3,58	3,47	C-16	119,7	171,1
H-15	1,22	1,21	C-17	40,4	39,0
H-17 <sub>ax</sub>	1,58	2,54 <sup>a</sup>	C-18	67,3	66,7
H-17 <sub>äq</sub>	2,19	<sup>a</sup>	C-19	85,9	84,8
H-18	3,60	4,18	C-20	69,5	65,6
HO-18	4,48	4,50	C-21	17,3	19,6
H-19	3,07	3,26	C-22	101,2	100,6
H-20	3,63	3,75	C-23	42,9	45,6
HO-20		?	C-24	78,0	69,1
H-21	1,15	1,10	C-25	84,1	78,6
H-22	4,98	4,73	C-26	67,2	68,4
H-23 <sub>ax</sub>	1,65	1,60	C-27	19,3	20,9
H-23 <sub>äq</sub>	2,25	1,97	C-28	18,4	17,9
HO-24		4,78	C-29	103,2	103,1
H-25	3,29	4,51	C-30	69,0	69,0
H-26	3,76	3,44	C-31	82,2	81,8
H-27	1,27	1,18	C-32	80,6	80,6
H-28	1,20	1,07	C-33	69,6	69,6
H-29	4,13	4,14	C-34	60,7	60,7
H-30	3,31	3,29	C-35	15,7	15,8
HO-30	5,34	5,34			
H-31	3,51	3,49			
H-32	3,33	3,32			
H-33	3,71	3,71			
H-34	3,44	3,44			
H-35	1,13	1,13			

Tab. 6: Chemische Verschiebungen ( $^1\text{H}$  und  $^{13}\text{C}$ ) für Avilamycin A und Avilamycin A\_O. Es sind nur die Verschiebungen der Ringe B bis E aufgelistet. Leider war die neu entstandene Hydroxygruppe HO-20, vermutlich aufgrund von Überlagerungen, nicht zu identifizieren. *a*: Für die Methylenprotonen H-17<sub>ax/b</sub> in Avilamycin A\_O war nur eine Resonanz zu identifizieren.

Da die neue Zuordnung für die geschlossene Form zwei eindeutige Signale für die beiden Methylenprotonen H-17<sub>ax/äq</sub> zeigte, war nun auch diese Lücke der Zuordnung des Avilamycin A geschlossen. Allerdings war immer noch unklar, warum bei der offenen Form nur ein Signal für diese beiden Protonen zu identifizieren war. Ferner zeigte auch C-16 in der offenen Form mit einer chemischen Verschiebung von 171,1 ppm einen vergleichsweise hohen Wert, insbesondere im Vergleich zur geschlossenen Form mit 119,7 ppm. Da diese Verschiebung denen von C-9 (165,5 ppm) und C-49 (174,5 ppm) ähnelt und es sich bei diesen beiden um Kohlenstoffe in Carbonylgruppen handelt, wurde vermutet, dass es sich auch bei C-16 um einen Kohlenstoff in einer Carbonylfunktion handelte. Daher wurden alternative Mechanis-

men für die Hydrolyse von Orthoesterbindungen gesucht und gefunden [125, 126]. Abb. 26 zeigt zwei der drei Möglichkeiten (Varianten A und B) einer hydrolytischen Öffnung einer der Bindung der Orthoestergruppe zwischen den Ringen C und D in Avilamycin A.<sup>24</sup> Dieser Mechanismus konnte u.a. auch schon für ein anderes Orthosomycin (Evernimicin) nachgewiesen werden [127].

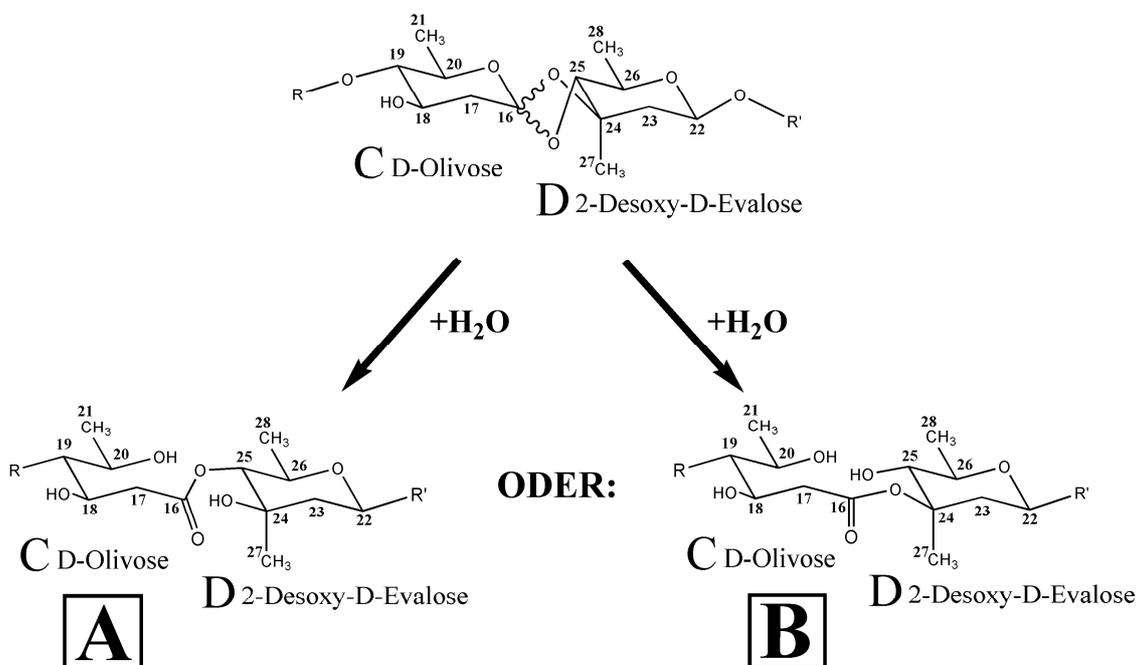


Abb. 26: Mechanismus der Öffnung der Orthoesterbindung zwischen den Ringen C und D unter Wasseranlagerung mit den beiden möglichen Endprodukten **A** und **B**. Dabei wird auch der Ring C geöffnet und es entsteht neben zwei Hydroxyfunktion eine Carbonylgruppe an C-16.

Wie man sieht, entsteht bei beiden Varianten eine Carbonylfunktion an C-16, wodurch sich dessen hohe chemische Verschiebung erklären lässt. Ferner kann auch das Fehlen eines zweiten Signals für die beiden Methylenprotonen H-17<sub>a/b</sub> mit der erhöhten internen Flexibilität durch die Ringöffnung begründet werden.

Um nun zu unterscheiden, ob die OH-Gruppe im Ring D an C-24 (Variante A) oder C-25 (Variante B) hängt, wurde zuerst die Änderung der chemischen Verschiebung (<sup>13</sup>C) beim Übergang von der geschlossenen zur offenen Form untersucht. Die größte Änderung erfährt C-24 (+8,9 ppm<sup>25</sup>), gefolgt von C-25 (-5,5 ppm) und C-23 (+2,7 ppm). Bei der benachbarten Methylgruppe C-27 ist diese Änderung mit 1,6 ppm auch noch merklich, während sie bei den verbleibenden Kohlenstoffen nur noch recht schwach ausfällt (C-22 [-0,6 ppm], C-26 [+0,8 ppm] und C-28 [-0,5 ppm]). Dies würde für Variante A sprechen.

<sup>24</sup> Bei der theoretischen dritten Möglichkeit würde das Molekül in zwei Teile zerfallen, was hier aber durch Massen- und NMR-Spektroskopie ausgeschlossen werden konnte.

<sup>25</sup> Die chemische Verschiebung dieses Signals steigt beim Übergang von der geschlossenen zur geöffneten Form um 8,9 ppm an, daher +8,9 ppm. Dementsprechend bedeutet eine negative Zahl eine Erniedrigung der chemischen Verschiebung bei diesem Übergang.

Als nächstes wurde das HMBC untersucht.<sup>26</sup> Zuerst wurde die neue HO-Gruppe eindeutig identifiziert und dann alle HMBC-Kontakte vom Hydroxyproton zu den Kohlenstoff des Rings D zugeordnet (Abb. 27 links). Dabei zeigte sich ein schwacher, aber dennoch eindeutiger Kontakt zu C-22, stärkere Kontakte zu C-23, C-25 und C-27 sowie ein sehr starker zu C-24. Das Kreuzsignal zu C-26 war leicht überlagert, so dass ein schwacher Kontakt nicht zu erkennen gewesen wäre, aber es konnte sicher festgestellt werden, dass kein starker Kontakt vorhanden war. Zu C-28 war keine Korrelation nachzuweisen. Und auch wenn die Intensitäten von HMBC-Kontakten nicht quantitativ miteinander verglichen werden können, sprach dieses Muster von Kontakten ebenfalls für die Variante A mit der Hydroxyfunktion an C-24. Ein weiteres Indiz für diese Hypothese ergab die Untersuchung der NOE-Kontakte (Abb. 27 rechts).<sup>27</sup> Das intensivste Kreuzsignal (als 100 % definiert) wurde zu H-23<sub>ax</sub> beobachtet, gefolgt von einem etwa 15 % schwächeren zu H-27. Noch kleiner, wenn auch nur geringfügig (etwa 5 %), war die Intensität der Kontakte zu H-23<sub>äq</sub> und H-25. Minimal war der Kontakt zu

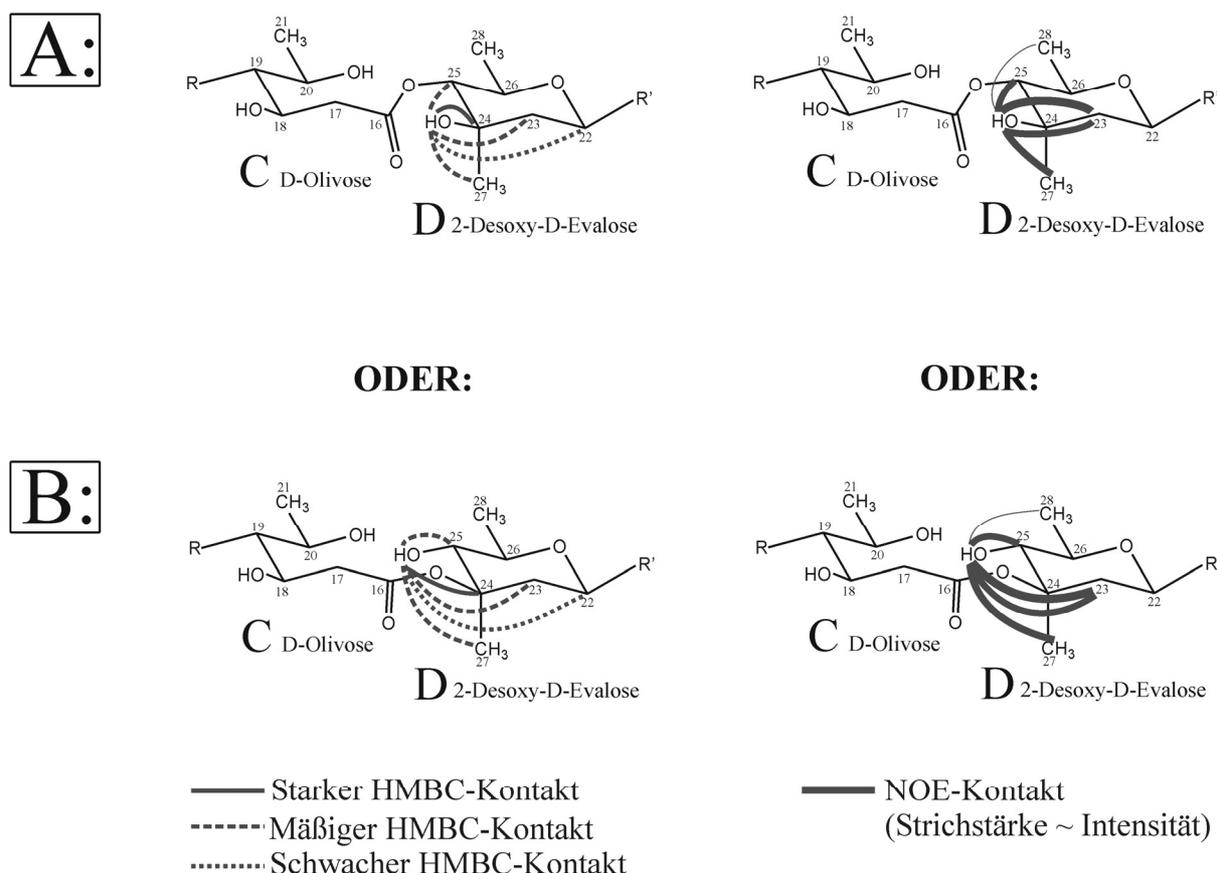


Abb. 27: Zur Unterscheidung der bei der hydrolytischen Öffnung der Orthoesterbindung entstehenden Produkte **A** und **B** wurden HMBC- (links) und NOE-Kontakte (rechts) zum Wasserstoff der neu gebildeten Hydroxyfunktion in Ring D eingezeichnet, die sich entweder an Position 25 (**A**) oder 24 (**B**) befindet.

<sup>26</sup> In diesem Fall das HMBC von AviW\_Glu, da es eine besonders gute Qualität aufwies.

<sup>27</sup> Diese Untersuchung wurde aufgrund der guten Qualität im NOESY-Spektrum der AviO2\_Met-Probe durchgeführt.

H-28, denn dieses Signal wurde schon von den Ausläufern eines Kreuzsignals zum Ring C überdeckt, das selbst nur eine geschätzte Intensität von ca. 25 % aufwies. Die Kreuzsignale zu H-22 und H-26 waren von der Diagonalen bzw. von anderen intensiven Signalen überlagert und damit nicht zu interpretieren.

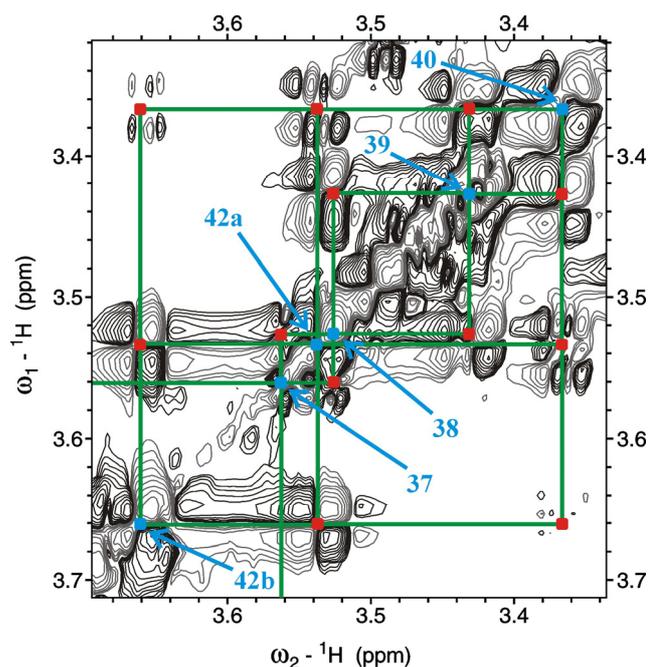
Diese drei Indizien sprachen alle für Variante A und auch wenn jedes für sich genommen nicht eindeutig war, kann man doch insgesamt davon ausgehen, dass diese Variante zutrifft.

Abschließend lässt sich sagen, dass Avilamycin A zwar als Feststoff bei +4 °C über Jahre hinweg stabil ist, sich aber nach Lösen in DMSO-d<sub>6</sub> innerhalb von wenigen Wochen durch hydrolytische Spaltung quantitativ in die offene Form umsetzt, was auch durch Lagerung bei +4 °C ( $F_{p_{DMSO}} = 18,5 \text{ °C}$ ) nicht zu vermeiden ist. Untersuchungen in der Gruppe von Prof. Bechthold zeigten, dass diese Spaltung bei geringerem pH-Wert der Lösung schneller voranschreitet und dass die Orthoesterbindung dann nicht nur teilweise, sondern durch eine zweite Hydrolyse vollständig gespalten wird. So konnte z.B. gezeigt werden, dass dies bei einem pH-Wert von etwa 3 innerhalb von nur ca. 30 min geschieht [115]. Eine solche vollständige Spaltung des Moleküls zwischen den Ringen C und D konnte aber bei den NMR-Proben bisher weder in den Massen- noch in den NMR-Spektren beobachtet werden, vermutlich da der dafür nötige pH-Wert bei den in DMSO-d<sub>6</sub> gelösten Proben nicht gegeben ist.

Eine Hydrolyse der zweiten Orthoestergruppe zwischen den Ringen G und H konnte bislang ebenfalls weder in den NMR-Spektren noch bei Untersuchungen in der Arbeitsgruppe von Prof. Bechthold nachgewiesen werden. Der Grund dafür ist allerdings noch unklar, möglicherweise gibt es eine sterische Hinderung, die diese Bindung schützt.

Abb. 28: Ausschnitt aus dem COSY-Spektrum der AviW-Probe mit dem eingezeichneten Spinsystem von Ring F. Die Diagonalsignale sind blau und die Kreuzsignale rot markiert. Die Kontakte sind durch grüne Linien miteinander verbunden.

Die Kontakte von H-37 aus nach links und unten führen zu den Kreuzsignalen mit H-36. Das Diagonalsignal von H-41 wurde ebenso wie die Bezeichnungen weiterer Protonensignale aus Gründen der Übersicht weggelassen.



## 4.1.2 Besonderheiten im Ring F

Obwohl es an mehreren Stellen der Zuordnung Probleme durch Überlagerungen gab, erwies sich die Zuordnung des Rings F als besonders anspruchsvoll. Denn von den zehn  $^1\text{H}$ -Resonanzen des Ringes befanden sich acht innerhalb von ca. 0,45 ppm (und davon wiederum sechs innerhalb von ca. 0,2 ppm). Daher waren aus den homonuklearen Korrelationsexperimenten (COSY und TOCSY) nur wenige Zuordnungsinformationen zu gewinnen. Abb. 28 zeigt beispielsweise einen Ausschnitt aus dem COSY-Spektrum von AviW, in den ein Teil des Spinsystems von Ring F eingetragen ist.

Um dennoch die Signale zuordnen zu können, wurden erst Spektren mit größerer Auflösung aufgenommen, die aber nicht zum erhofften Ergebnis führten. Daher wurden anschließend, wie oben schon erwähnt, heteronukleare Korrelationsexperimente (HMQC-COSY und HSQC-TOCSY) implementiert, denn mit der Verwendung einer  $^{13}\text{C}$ -Dimension konnten die Spektren entlang dieser Achse entzerrt werden. Dadurch gab es bedeutend weniger Überlagerungen und der Ring F konnte nun zugeordnet werden. Ferner erlaubten diese Spektren auch eine Überprüfung der bisherigen Zuordnung und insbesondere eine eindeutige Zuordnung der  $^{13}\text{C}$ -Resonanzen, die in HSQC und HMBC teilweise noch nicht sicher war. Abb. 29 zeigt einen Ausschnitt des HMQC-COSY, in dem das Spinsystem des Rings F markiert wurde.

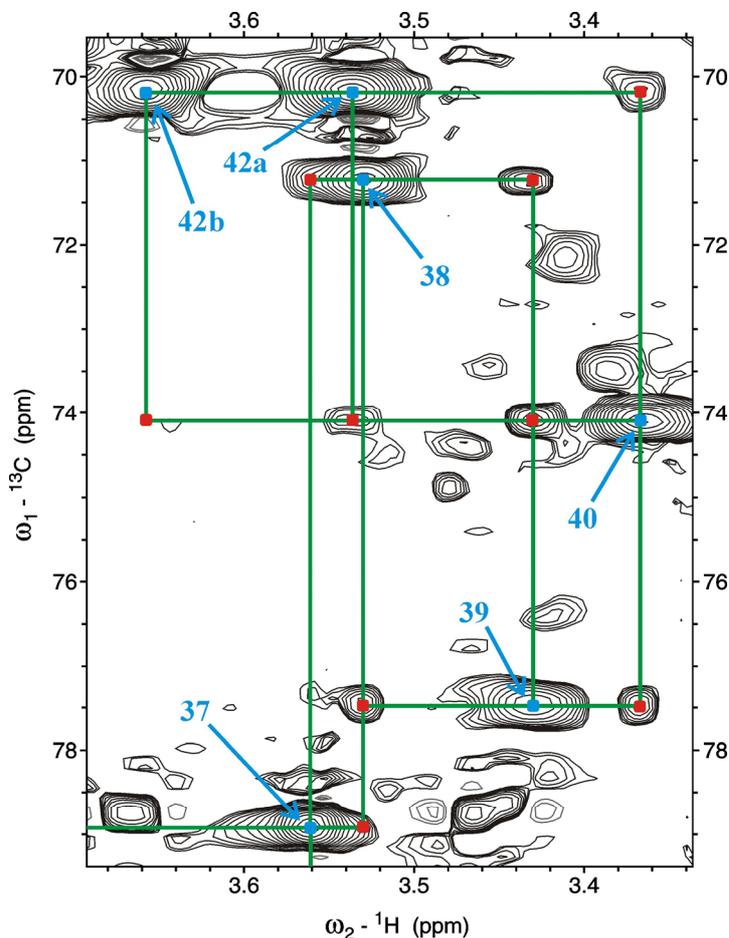
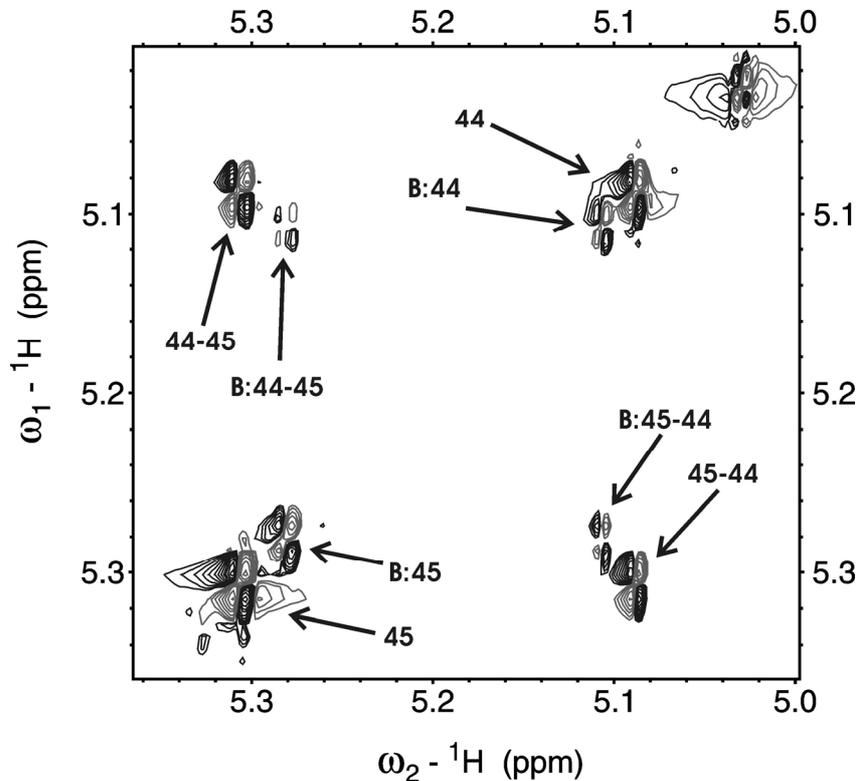


Abb. 29: Ausschnitt aus dem HMQC-COSY-Spektrum der AviW-Probe mit dem eingezeichneten Spinsystem von Ring F. Die HMQC-Signale sind blau und die Kreuzsignale rot markiert. Die Kontakte sind durch grüne Linien miteinander verbunden. Die Kontakte von 37 aus nach links und unten führen zu den Kreuzsignalen mit 36. Die Bezeichnungen weiterer Signale wurden auch hier aus Gründen der Übersicht weggelassen.

### 4.1.3 Avilamycin B

Bei der Zuordnung der AviW-Spektren fiel neben den Signalen des Rings G ein zweiter, leicht verschobener Signalsatz auf. Dieser war z.B. recht gut im COSY-Spektrum zu erkennen (siehe Abb. 30).

Abb. 30: Ausschnitt aus dem COSY-Spektrum der AviW-Probe. Der zweite Signalsatz des Avilamycin B ist gut erkennbar („B:“).



Diese Signale waren zwar weniger intensiv, zeigten aber dennoch sehr ähnliche Konnektivitäten. Aber durch die fehlenden NOE-Kontakte zu den Protonen der Isopropylgruppe an C-49 (d.h. die Protonen H-50 bis H-52) und dem statt dessen zu erkennenden Kontakt zu einer bisher nicht zugeordneten Methylgruppe konnten sie erfolgreich zugeordnet werden. Es handelt sich ebenfalls um das Spinsystem G, allerdings im Avilamycin B (Abb. 31), das ja in nicht zu vernachlässigender Menge in der AviW-Probe vorhanden ist (siehe Tab. 4 und Kapitel 3.2). Der einzige Unterschied ist die Substitution des Isopropylrests an C-49 durch eine Methylgruppe, wodurch das molekulare Gewicht von  $1402 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$  auf  $1374 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$  sinkt. Die ent-

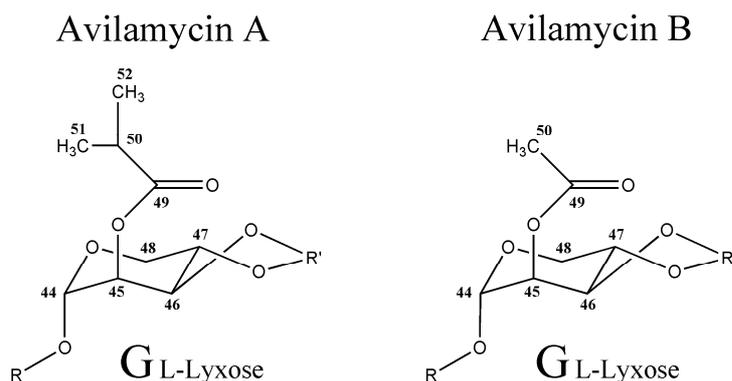


Abb. 31: Ausschnitte aus den Strukturformeln von Avilamycin A und B; gezeigt ist nur Ring G. Der an C-49 gebundenen Isopropylrest ist in Avilamycin B durch eine Methylgruppe substituiert.

sprechenden Verschiebungen sind im Anhang noch einmal zusammengefasst (Kap. 7.7). Dabei war überraschend, dass sich auch zahlreiche Resonanzen im Ring H im Vergleich zu Avilamycin A verschoben haben. Eine Hypothese war, dass durch die strukturell sehr feste Orthoesterbindung Teile des Rings H sehr nahe an den Ring G gezwungen werden. Daher wurde die Struktur mithilfe des Programms *Insight II* (Accelrys Inc.) energieminiert<sup>28</sup> und ließ anschließend tatsächlich ein derartiges Verhalten beobachten. Um dies aber eindeutig zu beweisen, wäre eine vollständige Strukturrechnung erforderlich, von der bisher abgesehen wurde (siehe auch Kap. 5).

#### 4.1.4 Avilamycin C

Ein weiterer bei diesen Untersuchungen wichtiger Bestandteil des Avilamycin Antibiotika-Komplexes war das Avilamycin C. Dies war zwar in den zu Anfang untersuchten, nicht markierten Produkten des Wildtyps kaum enthalten, trat aber bei fast allen späteren Proben in größeren Mengen auf. Insbesondere bei der AviW\_Met-Probe war es in großer Menge vorhanden (siehe Kap. 4.3). Dabei hängt das Verhältnis von produziertem Avilamycin A zu C stark von den Bedingungen während der Aufzucht ab.

Es unterscheidet sich von Avilamycin A an nur einer Position, nämlich der Acetatgruppe im Ring H. Diese ist in Avilamycin C durch einen 1-Hydroxyethyl-Rest (-CH(OH)CH<sub>3</sub>) ersetzt, wodurch diese Verbindung eine um 2 g·mol<sup>-1</sup> erhöhte molekulare Masse von M = 1404 g·mol<sup>-1</sup> aufweist (Abb. 32). Die entsprechenden Verschiebungen finden sich ebenfalls im Anhang (Kap. 7.7).

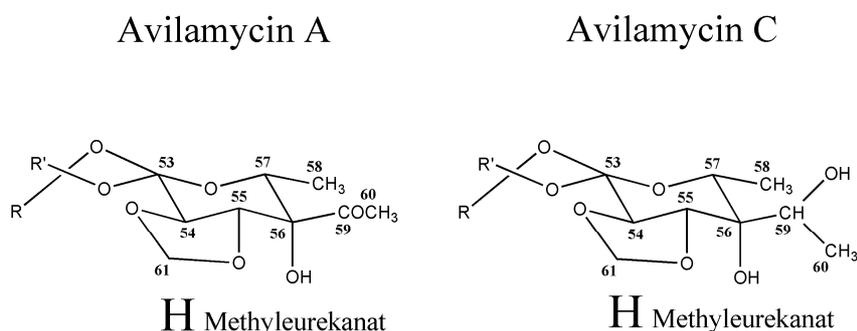


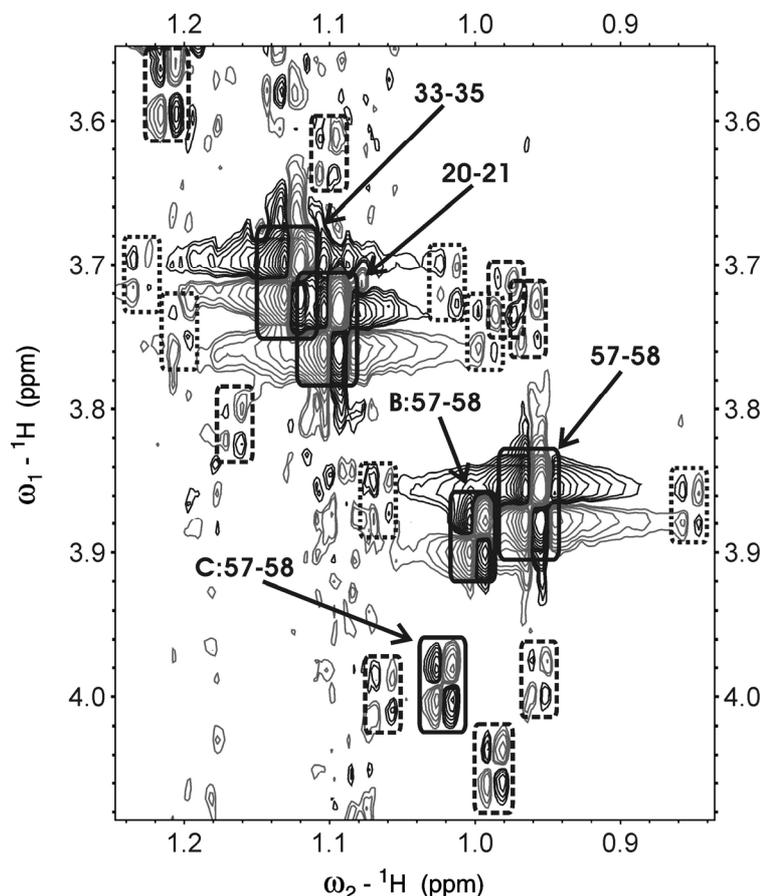
Abb. 32: Ausschnitte aus den Strukturformeln von Avilamycin A und C; gezeigt ist nur Ring H. Der an C-56 gebundenen Acetatrest ist in Avilamycin C durch eine 1-Hydroxyethylgruppe substituiert.

<sup>28</sup> Die Struktur wurde nach dem *Insight II*-Standardprotokoll, wie es im *Builder*-Modul implementierte ist, optimiert.

### 4.1.5 Weitere Avilamycine

Auch nach Zuordnung aller Avilamycin A-, B- und C-Spinsysteme sowie den offenen und geschlossenen Formen dieser Verbindungen waren immer noch zahlreiche Signale in den Spektren der Wildtyp-Probe vorhanden, wie man z.B. gut in dem Ausschnitt des AviW-COSY-Spektrums in Abb. 33 sieht.

Abb. 33: Ausschnitt aus dem COSY-Spektrum der AviW-Probe. Man erkennt neben den identifizierten Signalen noch ein Mehrzahl an weiteren schwachen COSY-Kreuzsignalen, die wahrscheinlich anderen Bestandteilen des Avilamycin-Komplexes entsprechen (siehe Abb. 11, Tab. 1 und 4). Identifizierte Signale sind mit durchgezogenen Kästen und nicht-identifizierte mit gestrichelten gekennzeichnet. Die gepunkteten Kästen markieren Signale, die den nicht-entkoppelten  $^{13}\text{C}$ -Satelliten der Kreuzsignale des Avilamycin A entsprechen. „B:“ und „C:“ bezeichnen Signale der Avilamycine B und C.



Manche dieser Signale waren recht schwach, konnten aber bei genauer Betrachtung mit der verwendeten Software [128] dennoch vom Rauschen unterschieden werden. Sie waren aber in der Abbildung teilweise nicht gut zu erkennen und wurden deswegen hervorgehoben.

Man erkennt unter anderem den COSY-Kontakt zwischen H-57 und H-58 sowie die entsprechenden Kontakte für Avilamycin B und C. Für Avilamycin C ist die leichte Veränderung der chemischen Verschiebung nicht überraschend, da sich der strukturelle Unterschied direkt in Nachbarschaft zu den Positionen 57 und 58 befindet (Abb. 32). Bei Avilamycin B ist wahrscheinlich die in Kap. 4.1.3 erwähnte relativ große räumliche Nähe zwischen dem Isopropylrest und den Atomen des Rings H der Grund für die entsprechende Abweichung.

Wie schon Abb. 11 und Tab. 1 in Kapitel 2.1 zeigten, gibt es aber noch weitere von den Bakterien produzierte Avilamycine, die in den Ringen G und H strukturelle Änderungen aufweisen und daher zu einem Teil der zusätzlichen Signale führen können. Diese weiteren Avila-

mycine sind gemäß der HPLC-Analyse in der Probe vorhanden (Tab. 4) und scheinen somit auch trotz der geringen Menge NMR-spektroskopisch nachweisbar zu sein. Dementsprechendes könnte auch für die Kreuzsignale von H-20 und H-21 (Ring C) bzw. von H-33 und H-35 (Ring E) gelten.

Damit gibt es eine Erklärung für den Großteil der verbleibenden Signale, auch wenn sie noch nicht zugeordnet sind.

#### **4.1.6 Versuch, die Konfiguration der Orthoesterbindung zwischen den Ringen C und D zu klären**

Bei keiner der bisher veröffentlichten Untersuchungen wurde angegeben, in welcher der beiden möglichen Konfigurationen die Orthoesterbindung zwischen den Ringen C und D vorliegt bzw. ob es sich um ein Gemisch der beiden handelt. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit versucht, die Konfiguration durch Auswertung der aus den NOE-Kontakten gewonnenen Abstandsinformationen zu bestimmen. Dazu wurden zuerst die Kreuzsignale aller Kontakte innerhalb und zwischen den Ringen C und D im NOESY-Spektrum der frisch angesetzten AviW\_Glu-Probe integriert, sofern dies nicht durch zu starke Überlagerung verhindert wurde. Weiterhin wurden die Integrale der nicht überlagerten Kontakte zwischen Methylenprotonen, wie z.B. H-11<sub>ax</sub> – H-11<sub>äq</sub>, als Referenzen bestimmt. Nun wurde für beide Konfigurationen eine energieminierte Struktur ermittelt, aus denen wiederum die entsprechenden Distanzen abgelesen werden konnten. Anschließend wurden diese mit den aus den NOESY-Integralen berechneten Abständen verglichen.

Die Übereinstimmung dieser Abstände innerhalb der Ringe C bzw. D bewegte sich größtenteils im Rahmen von 70 pm bzw. 50 pm. Dahingegen zeigte der Vergleich der Abstände zwischen den Ringen nur bei wenigen Werten Ähnlichkeiten. Die meisten Abstände wichen um mehr als 200 pm ab, wobei eine der beiden Konfigurationen geringfügig bessere Werte zeigte. Da dies aber keine begründete Vermutung zuließ, müssten weitere Untersuchungen wie z.B. eine volle Strukturrechnung durchgeführt werden, um eindeutige Ergebnisse zu erhalten. Davon wurde aber abgesehen, da es nicht zu den Zielsetzungen dieser Arbeit gehörte. Die Tatsache, dass bisher nur ein Signalsatz gefunden wurde, lässt allerdings vermuten, dass eine der beiden Konfigurationen entweder rein oder zumindest im großen Überschuss vorliegt und somit eine entsprechende Untersuchung zu einem eindeutigen Ergebnis führen dürfte.

#### 4.1.7 HMBC-Kontakte über die Orthoesterbindungen

Insbesondere bei der Untersuchung der in Kapitel 4.1.1 diskutierten Frage nach den offenen und geschlossenen Formen der Avilamycine fiel auf, dass sich keine HMBC-Kontakte identifizieren lassen, die über die Orthoesterbindungen hinwegreichen. Wie schon Abb. 23 zeigte, waren zwischen allen anderen Zuckereinheiten jeweils zwei  $^3J_{(C,H)}$ -Kontakte zu erkennen und auch bei der esterglykosidischen Verbindung zwischen den Ringen A und B war zumindest ein HMBC-Kontakt messbar.  $^4J_{(C,H)}$ -Korrelationen wurden bei keiner Zuckerverknüpfung entdeckt, allerdings sind diese bei über Sauerstoff verbundenen, nicht-konjugierten und nicht-markierten Systemen auch meist zu schwach.

Die Konstitution des Avilamycins würde insgesamt drei  $^3J_{(C,H)}$ -Kontakte über die Orthoesterbindungen erlauben:

- 1) C-16 – H-25
- 2) C-53 – H-47
- 3) C-53 – H-46

Bei keiner dieser Korrelationen war für die geschlossene Form ein Signal im HMBC-Spektrum zu erkennen, obwohl keine Überlagerungen vorlagen. Selbst bei einer Verbindung, bei der die Kohlenstoffe markiert waren (AviW\_Glu, Kap. 2.6.4.1 und 4.4.1) konnten auch bei variierten Transferzeiten für die C,H-Weitbereichskopplung keine Signale charakterisiert werden.<sup>29</sup>

Diese Beobachtung könnte folgenden Grund haben: Die Größe der  $^3J_{(C,H)}$ -Kopplung hängt ebenso wie die der  $^3J_{(H,H)}$ -Kopplung vom Dihedralwinkel  $\phi$  ab und für beide Kopplungen gibt es ein Minimum bei einem Winkel von etwa  $90^\circ$  [109].<sup>30, 31</sup>

Daher wurde erneut die schon in Kap. 4.1.3 erwähnte energieminierte Struktur untersucht und die entsprechenden Winkel ausgemessen:

- 1) C-16 – H-25: ca.  $73^\circ$  bzw.  $78^\circ$  (abhängig von der Konfiguration der Orthoesterbindung, Kap. 4.1.6)
- 2) C-53 – H-47: ca.  $79^\circ$
- 3) C-53 – H-46: ca.  $84^\circ$

Daraus wiederum ergaben sich gemäß der oben genannten Beziehung Kopplungen von etwa 0,90–0,47 Hz. Diese geringen Werte bieten eine plausible Erklärung für das Fehlen von  $^3J_{(C,H)}$ -Kontakten über die Orthoesterbindungen hinweg. Diese Hypothese wird auch durch

<sup>29</sup> Allerdings wäre das Signal von 2), sofern vorhanden, im HMBC-Spektrum dieser Probe überlagert.

<sup>30</sup> Bei den homonuklearen  $^3J$ -Kopplungen wird diese Abhängigkeit durch die *Karplus-Conroy-Kurve* beschrieben.

<sup>31</sup> Die Gleichung mit den hier verwendeten Parametern lautet:  $^3J_{(C,H)} = 4,50 - 0,87 \cos \phi + 4,03 \cos 2 \phi$

folgende Beobachtung gestützt: Für die geöffnete Orthoesterbindung konnte ein Kontakt von C-16 nach H-25 gefunden werden. Wenn die Öffnung wie in Kap. 4.1.1 vermutet zwischen den Positionen 16 und 24 stattfindet, wäre dies eine  $^3J_{(C,H)}$ -Kopplung, die groß genug ist, um detektiert zu werden und deren Dihedralwinkel somit im Gegensatz zur geschlossenen Form nicht aufgrund der Struktur im Bereich geringer Kopplung liegt.

#### 4.1.8 Unterscheidung der Signale von 54 und 55

Wie schon in Kap. 4.1 beschrieben gab es Schwierigkeiten, die Resonanzen der Positionen 54 und 55 eindeutig voneinander zu unterscheiden. Da die Protonen vom restlichen Spinsystem des Rings H getrennt waren, konnte mithilfe der COSY-Spektren keine klare Aussage gemacht werden. Weiterhin waren nur NOE-Kontakte zu den Methylenprotonen H-61<sub>a/b</sub> erkennbar und diese waren ebenfalls nicht zu unterscheiden. Ein NOE-Kontakt zu HO-56 würde eine eindeutige Zuordnung ermöglichen, allerdings konnte diese Resonanz, wie schon erwähnt, noch nicht zugeordnet werden, da sie wahrscheinlich mit einer der Resonanzen des Rings H überlagert.

Bei der Untersuchung der AviG4\_Met-Probe sowie der weiteren Methyltransferase-Deaktivierungsproben fiel aber auf, dass diese einen großen Anteil an Avilamycin C enthalten und in diesen Verbindungen war HO-56 eindeutig zu identifizieren. Weiterhin wiesen 54 und 55 nahezu identische Verschiebungen wie in Avilamycin A auf.<sup>32</sup> Daher schien es angemessen, anzunehmen, dass diese beiden Resonanzen nicht miteinander vertauscht wurden.

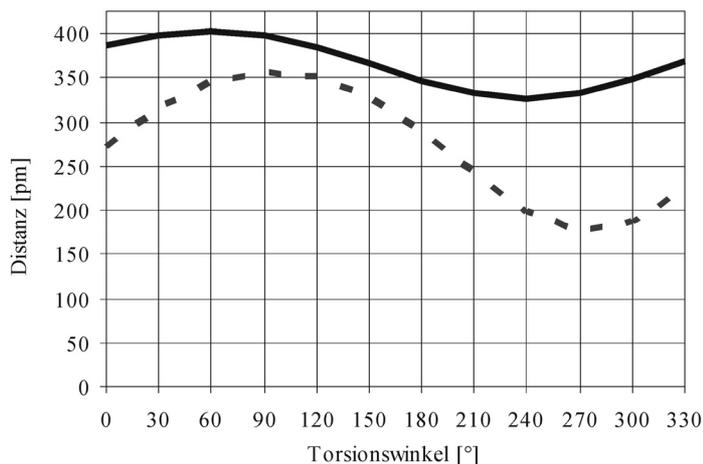
Also wurde das NOESY-Spektrum untersucht und dabei konnte festgestellt werden, dass tatsächlich der NOE-Kontakt zu einer der beiden Resonanzen deutlich intensiver als zur anderen war. Daher wurde erneut die mit *Insight II* energieminierte Struktur untersucht und von dieser ausgehend die Abstände zwischen dem Hydroxyproton und den Wasserstoffen H-54 und H-55 in Abhängigkeit vom Torsionswinkel H – O – C-56 – C-57 gemessen. Dies ist in Abb. 34 gezeigt. Man erkennt eindeutig, dass der Abstand von HO-56 zu H-54 immer kleiner als der zu H-55 ist. Somit musste das größere NOE-Kreuzsignal dem Kontakt von HO-56 zu H-54 entsprechen, wodurch eine eindeutige Unterscheidung möglich war.

Weitere Bestätigungen für diese Zuordnung konnten in den Spektren der Proben für die Modifikationen im Ring H gefunden werden. Dies soll aber erst in dem entsprechenden Kapitel (4.3.1) besprochen werden, da es die vorherige Erläuterung dieser Spektren erfordert.

---

<sup>32</sup> Avilamycin A: 3,78 / 71,4 ppm und 3,86 / 79,2 ppm; Avilamycin C: 3,75 / 72,2 ppm und 3,84 / 76,2 ppm.

Abb. 34: Abhängigkeit des Abstands von HO-56 zu H-54 (gestrichelt) und zu H-55 (durchgezogen) vom Torsionswinkel H – O – C-56 – C-57. Die Daten wurden aus einer energieminierten Struktur abgeleitet (siehe Fußnote <sup>5</sup> in Kap. 4.3).



## 4.2 Spektren der Methyltransferase-Inaktivierungen

Die Aufgabenstellung dieses Teils war die Klärung der Frage, welche der Gruppen 1-4 jeweils in den Proben AviG4\_Met, AviG2\_Met, AviG5\_Met und AviG6\_Met fehlt. Dazu mussten als erstes die Gruppen in den AviW-Spektren identifiziert werden. Anschließend sollte sich leicht zeigen lassen, welches Signal in den Spektren des jeweiligen Mutantenprodukts fehlt.

Die Identifizierung dieser Gruppen erfolgte bereits im Rahmen der in Kapitel 4.1 beschriebenen Zuordnung, wird hier aber noch einmal detailliert beschrieben.

### 4.2.1 Identifizierung der Gruppen 1-4 in den Spektren des Wildtyps

Obwohl bei der bereits erwähnten Literaturrecherche kaum Zuordnungsdaten gefunden werden konnten, enthielten die Artikel schon die relevanten chemischen Verschiebungen der Gruppen 1-4. Daher wurde anfangs versucht, die entsprechenden Signale im AviW-HMQC-Spektrum nur mit diesen Informationen zu identifizieren (siehe Abb. 35).

Man erkannte eine leichte systematische Abweichung aller Signale zu geringerer chemischer Verschiebung, die wahrscheinlich auf Lösungsmittel- und Temperatureffekte zurückzuführen war. Ferner war es offensichtlich, die beiden äußeren Signale mit hoher Wahrscheinlichkeit den Gruppen 1 und 4 zuzuordnen. Dagegen überlagerten die beiden zentralen Signale sowohl in der Literatur als auch in den gemessenen Spektren zu sehr, um sie eindeutig zuordnen zu können.

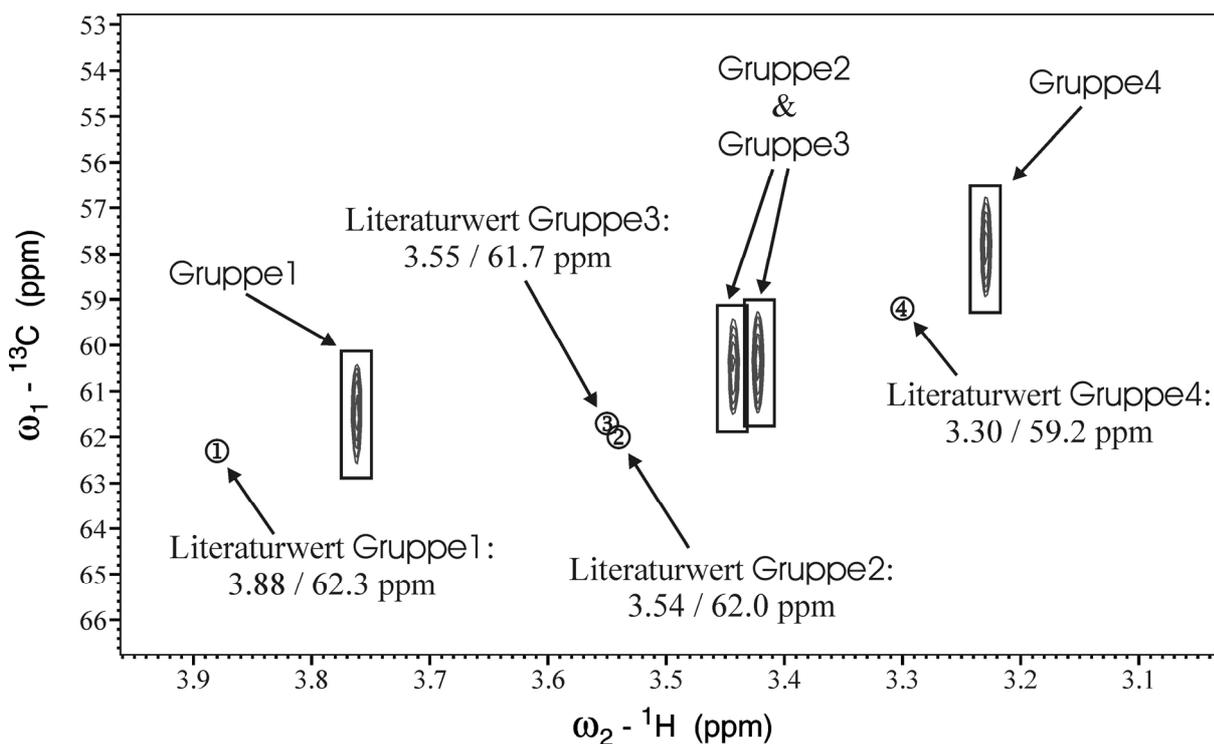


Abb. 35: Erste nur auf dem Vergleich der chemischen Verschiebung der Signale mit den Literaturwerten basierende Zuordnung der Gruppen im HMQC-Spektrum der AviW-Probe. Man erkennt eine systemische Abweichung aller Signale zu kleiner Verschiebungen hin, die wahrscheinlich auf Lösungsmittel- und Temperatureffekten basiert. Weiterhin ist die Zuordnung der Gruppen 1 und 4 unproblematisch, während sie für die Gruppen 2 und 3 aufgrund der Überlagerung nicht möglich ist. Die Höhenlevel dieser, wie auch einiger der folgenden, Darstellungen (Abb. 36, A41 und A42) wurden so gewählt, dass nur die interessanten Signale zu erkennen sind.

Da für die Atome in der Umgebung der beiden unbekannt Gruppen 2 und 3 kaum Zuordnungen bekannt waren, war es nicht möglich, diese mittels anderer, weiter reichender Spektren (z.B. HMBC oder NOESY) zuzuordnen. Daher wurde wie in Kapitel 4.1 erläutert erst die Zuordnung vervollständigt und anschließend erneut versucht, die überlagernden Gruppen zu identifizieren.

Mit den im ersten Durchgang der Zuordnung gewonnenen Daten war es zum einen möglich, die Zuordnung der Gruppen 1 und 4 sowohl durch HMBC- (Abb. 23) als auch durch NOE-Korrelationen (Abb. 24) zu erhärten. Zum anderen konnte auch das linke der beiden zentralen, überlagernden Signale der Gruppe 2 zugeordnet werden. Somit musste das letzte verbleibende Signal der Gruppe 3 entsprechen.

Um diese begründete Vermutung aber eindeutig zu bestätigen, wurden die weiteren, in Kapitel 3.3 erwähnten, Experimente (HMQC-COSY und HSQC-TOCSY) für die AviW-Probe aufgenommen. Mithilfe dieser Informationen und der HMBC- und NOESY-Daten konnte auch die Gruppe 3 eindeutig zugeordnet werden (Abb. 36a).

## 4.2.2 Identifizierung der fehlenden Gruppen in den Spektren der Mutantenprodukte

Nachdem nun die Gruppen im Wildtyp eindeutig zugeordnet waren, wurden die Produkte der Mutanten untersucht, bei denen vermeintliche Methyltransferasen inaktiviert worden waren.

### 4.2.2.1: AviG4\_Met

Bei AviG4\_Met konnte, wie schon in der Probenbeschreibung (Kap. 2.6.2.1) erläutert, bereits auf anderem Wege nachgewiesen werden [82, 114], dass das inaktivierte Gen *aviG4* für ein Enzym codiert, das für den Einbau von Gruppe1 an den aromatischen Ring verantwortlich ist. Dies war auch gut an den Ausschnitten aus den HMQC-Spektren von AviW und AviG4\_Met zu erkennen (Abb. 36a und b), denn offensichtlich fehlt in letzterem Spektrum das Signal der Gruppe1.

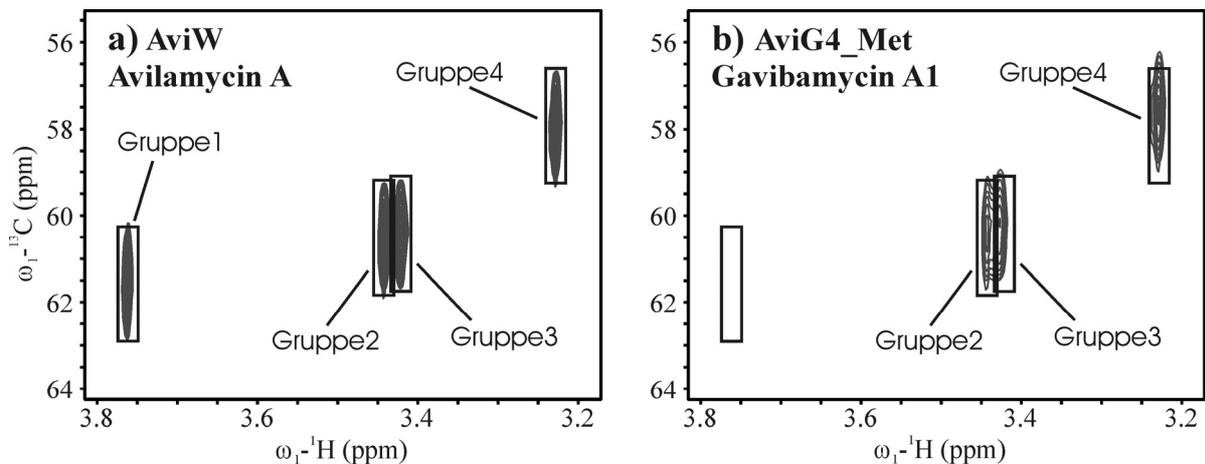


Abb. 36: Ausschnitte aus den HMQC-Spektren der AviW- (a) und der AviG4\_Met-Probe (b). Die Rahmen um die Signale sind zum besseren Vergleich in diesen und den folgenden Abbildungen (Abb. 37a, b und 40) exakt an den gleichen Positionen.

#### 4.2.2.2: AviG2\_Met

Auch die Analyse des HMQC-Spektrums von AviG2\_Met (Abb. 37a) fiel leicht. Aufgrund der zusätzlich inaktivierten Methyltransferase und den aus den Massenspektren gewonnenen Informationen erwartete man das Fehlen genau einer weiteren Gruppe. Dies ließ sich gut erkennen, da offensichtlich außer dem Signal von Gruppe1 noch das äußerste, rechte Signal fehlte und somit Gruppe4 während der Biosynthese nicht in das Molekül eingebaut wurde.

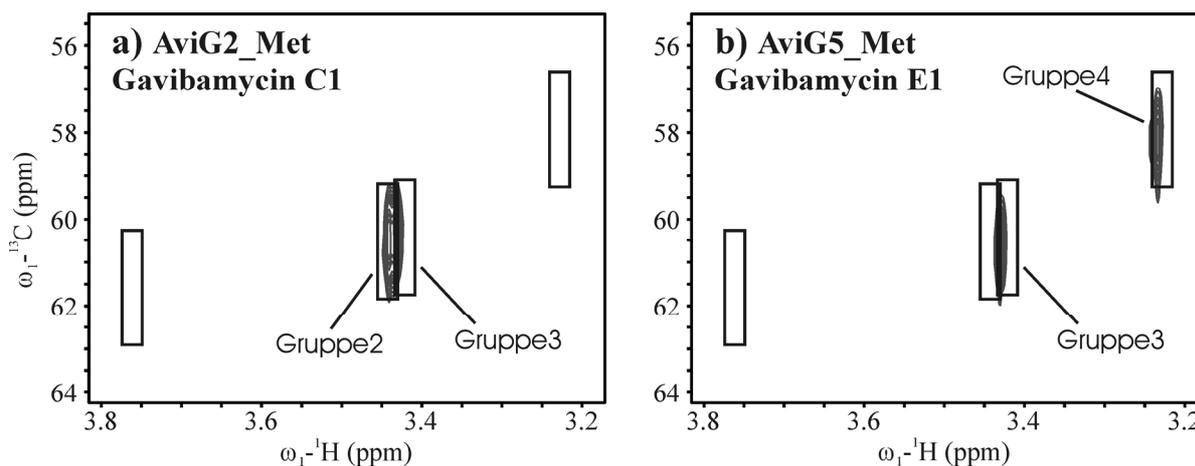


Abb. 37: Ausschnitte aus den HMQC-Spektren der AviG2\_Met- (a) und der AviG5\_Met-Probe (b).

#### 4.2.2.3: AviG5\_Met

Auch beim HMQC-Spektrum von AviG5\_Met (Abb. 37b) fehlten wieder zwei Signale und auch dies entsprach den Erwartungen. Allerdings war nur das Fehlen des Signals von Gruppe1 eindeutig. Das zweite nicht vorhandene Signal konnte sowohl Gruppe2 als auch Gruppe3 entsprechen. Dies war aufgrund des geringen Unterschieds zwischen den beiden Resonanzfrequenzen nicht eindeutig zu bestimmen, obwohl die chemische Verschiebung des Signals eher auf ein Fehlen der Gruppe2 hindeutete. Aufgrund der geringen Konzentration brachten leider auch die nahe liegenden Analysen des HMBC- und des NOESY-Spektrums keine weiteren Informationen. Daher wurde als nächstes die Veränderung der chemischen Verschiebungen aller Kerne in den Ringen E und F beim Übergang von Avilamycin A zu Gavibamycin E1 untersucht. Die Ergebnisse zeigt Tab. 7.

Ring	Position	Avilamycin A	Gavibamycin E1	Ring	Position	Avilamycin A	Gavibamycin E1
E	H-29	4,14 ppm	4,14 ppm	E	C-29	103,1 ppm	103,4 ppm
E	H-30	3,30 ppm	3,39 ppm	E	C-30	69,0 ppm	68,9 ppm
E	H-31	3,50 ppm	3,44 ppm *	E	C-31	81,6 ppm	81,1 ppm *
E	H-32	3,33 ppm	3,55 ppm *	E	C-32	80,7 ppm	*
E	H-33	3,71 ppm	3,69 ppm *	E	C-33	69,6 ppm	70,2 ppm *
E	H-35	1,13 ppm	1,10 ppm	E	C-35	15,8 ppm	15,9 ppm
F	H-36	4,76 ppm	4,76 ppm	F	C-36	95,2 ppm	95,2 ppm
F	H-37	3,56 ppm	3,56 ppm	F	C-37	78,9 ppm	78,9 ppm
F	H-38	3,53 ppm	3,55 ppm	F	C-38	71,3 ppm	71,3 ppm
F	H-39	3,44 ppm	3,43 ppm	F	C-39	77,5 ppm	77,5 ppm
F	H-40	3,37 ppm	3,38 ppm	F	C-40	74,1 ppm	74,1 ppm
F	H-42a	3,54 ppm	3,54 ppm	F	C-42	70,2 ppm	70,2 ppm
F	H-42b	3,67 ppm	3,67 ppm				

Tab. 7: Vergleich der chemischen Verschiebungen der  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -Kerne in den Ringen E und F in Avilamycin A und Gavibamycin E1. Die mit \* markierten Werte in Gavibamycin E1 sind aufgrund der geringen Konzentration der Probe und dem daraus resultierenden geringen Signal-zu-Rausch-Verhältnis (S/N) nicht sicher zugeordnet. Allerdings lässt sich sicher sagen, dass bei den dem Avilamycin A entsprechenden Verschiebungen keine Signale vorhanden sind.

Die Resonanzen der Atome im Ring F weisen nur geringe Verschiebungen auf. Im Ring E sind dagegen nur die chemischen Verschiebungen von Position 29 nahezu unverändert geblieben, die von Position 30 zeigt insbesondere in der  $^1\text{H}$ -Dimension schon eine deutliche Veränderung. Leider konnten die verbleibenden veränderten Verschiebungen für Ring E in AviG5 aufgrund des aus der niedrigen Konzentration resultierenden niedrigen Signal-zu-Rausch-Verhältnis (S/N) nicht vollständig zugeordnet werden. Aber es kann mit Sicherheit festgestellt werden, dass die Signale verschoben sind, da an den erwarteten Resonanzen im Spektrum eindeutig keine Signale mehr erkennbar waren. Es konnte in den entsprechenden Korrelationsspektren auch eine mögliche teilweise Zuordnung gemacht werden, die in Tab. 7 aufgeführt ist. Allerdings kann sie aufgrund der starken Überlagerungen nicht als sicher betrachtet werden. Die veränderten Verschiebungen sind also ein weiterer Hinweis auf das Fehlen des Signals von Gruppe2.

Um dies aber eindeutig nachzuweisen, wurde eine Variante des  $^{13}\text{C}$ -gefilterten NOESY aufgenommen.

### 4.2.2.3.1: Analyse des Spektrums der Variante des <sup>13</sup>C-gefilterten NOESY-Experiments

Abb. 38 zeigt das gesamte Spektrum, das mit der verwendeten Pulssequenz (Kap. 3.3.1) aufgenommen wurde. Man erkennt, dass bei insgesamt vier verschiedenen F1-Frequenzen Signale auftreten (1,17 ppm, 3,23 ppm, 3,43 ppm und 4,99 ppm). Diese sind im Spektrum mit waagerechten Linien gekennzeichnet. Dies entspricht den Erwartungen, da neben den zwei vorhandenen Gruppen noch die Kohlenstoffe C-27 und C-61 markiert sind. Die hochfeldige Resonanz (1,17 ppm) gehört zur Methylgruppe H-27.<sup>33</sup> Die tieffeldige (4,99 ppm) Resonanz entspricht dagegen den beiden Wasserstoffen der Methylengruppe H-61<sub>a/b</sub>. Genau genommen zeigt letztere mehrere Sätze von Signalen. Die stärkeren stammen von den beiden Methylenprotonen im Gavibamycin E3 und die schwächeren von den gleichen Protonen im Gavibamycin E1. Allerdings ist der geringe Unterschied zwischen diesen bei dieser Darstellung kaum erkennbar. Der Signalsatz bei 3,23 ppm entspricht der schon identifizierten Gruppe4. Vom letzten verbleibenden Signalsatz bei 3,43 ppm wurde ein 1D-Schnitt ausgelesen, dieser ist in Abb. 39 zu sehen. Die NOE-Kontakte zeigen für die Methoxygruppe fast ausschließlich räumliche Nähe zu Protonen der Ringe F und G. Die einzige Ausnahme stellt der Kontakt zu H-29 (Ring E) da. Aufgrund dessen Nähe zu Ring F widerspricht dies aber nicht der Aussage, dass es sich bei der im Molekül vorhandenen Methoxygruppe um Gruppe3 handelt und somit in AviG5 neben Gruppe1 die Gruppe2 fehlt.

---

<sup>33</sup> Die Aufspaltung des Signalsatzes bei  $\delta(F1) = 1,17$  ppm (NOE-Kontakte von H-27 zu benachbarten Protonen) in ein Triplett rührt von der in diesem Bereich schon mangelhaften Unterdrückung der  $^1J_{(C,H)}$ -Kopplung während  $t_1$  her. Denn der zur Entkopplung verwendete  $180^\circ_x(C)$ -Puls wurde bei 70 ppm eingestrahlt, wodurch C-27 einen Offset von ca. 50 ppm aufwies. Bei der verwendeten Pulsleistung entspricht dies laut Simulation nur noch etwa 62 %-iger Inversion. Zum Vergleich betrug der Offset von C-61 nur ca. 25 ppm (ca. 90 %-ige Inversion) und der Gruppen3 und 4 weniger als 12,5 ppm (> 97 %-ige Inversion). Man hätte diese Aufspaltung z.B. durch Verwendung eines Kompositpulses vermeiden bzw. reduzieren können, aber da dies für die Beantwortung der Problemstellung irrelevant war, wurde davon abgesehen, das Experiment zu wiederholen.

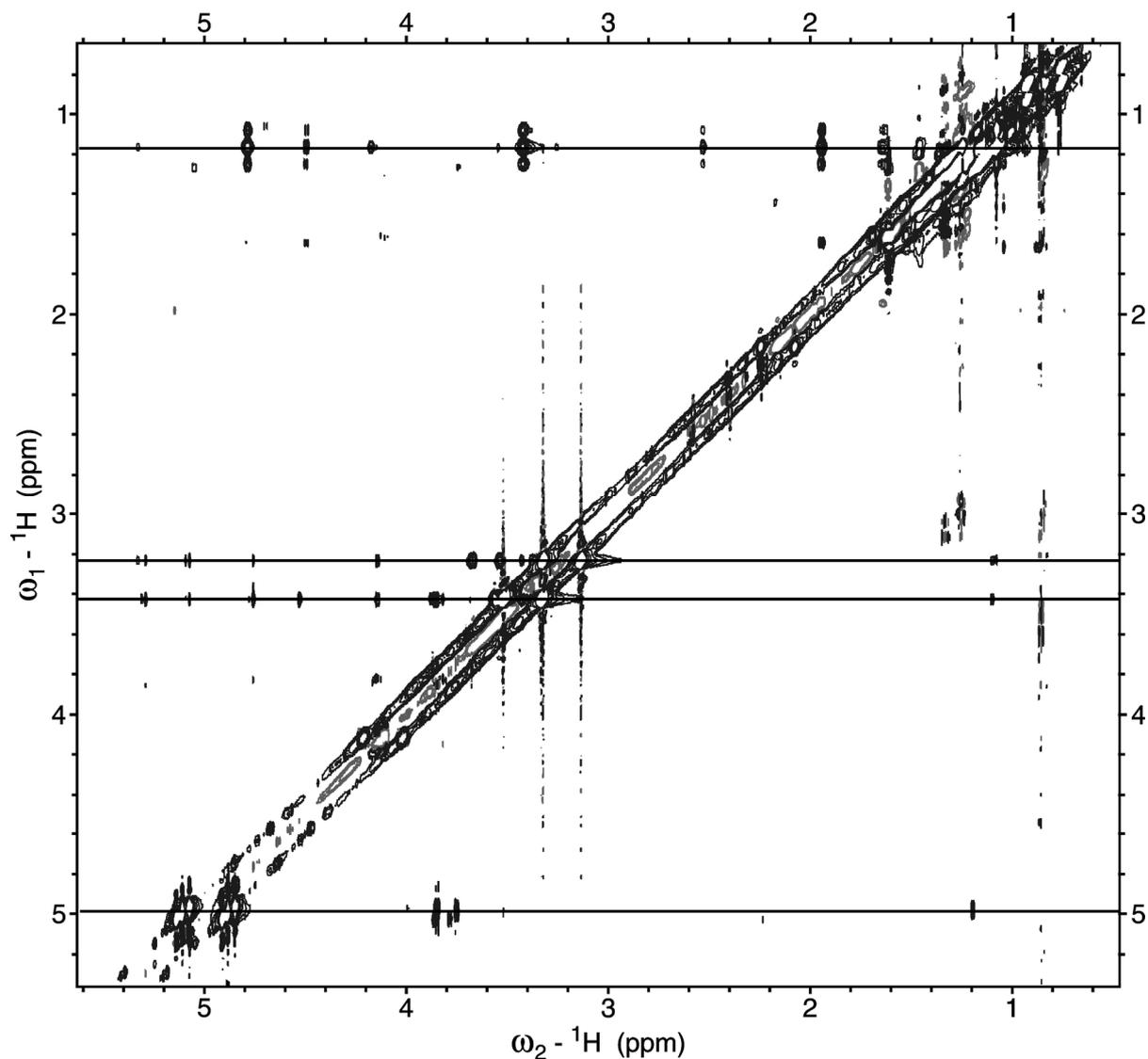
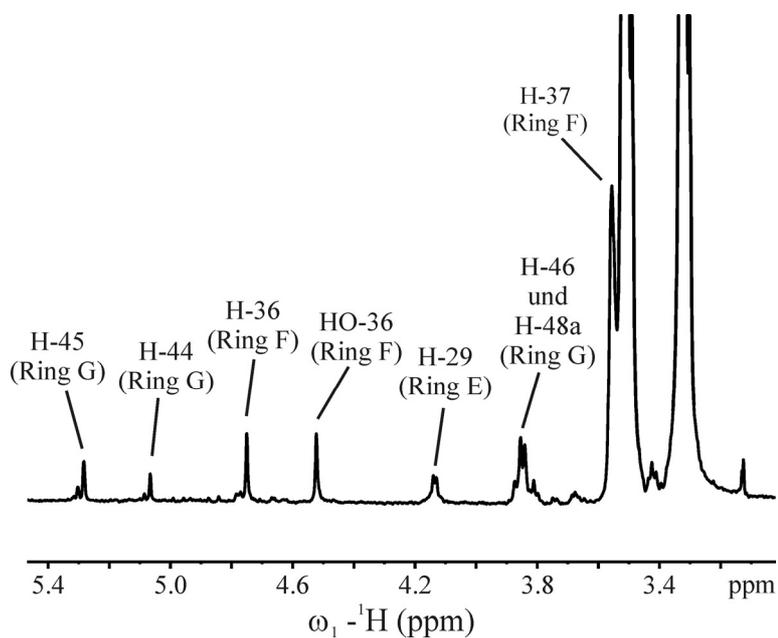


Abb. 38: Spektrum, das mit der in Kapitel 3.3.1 beschriebenen Variante des  $^{13}\text{C}$ -gefilterten NOESY aufgenommen wurde.

Abb. 39: 1D-Schnitt bei  $F1 = 3,43$  ppm aus dem in Abb. 38 dargestellten Spektrum, das mit einer Variante des  $^{13}\text{C}$ -gefilterten NOESY (vgl. Kap. 3.3.1) gemessen wurde. Er zeigt deutlich die NOE-Kontakte der unbekanntes Methoxygruppe.



#### 4.2.2.4: AviG6\_Met

Wie das HSQC-Spektrum von AviG6\_Met (Abb. 40) zeigt, ergeben sich auch hier die gleichen Schwierigkeiten wie für AviG5. Während das Fehlen der Gruppe1 offensichtlich ist,

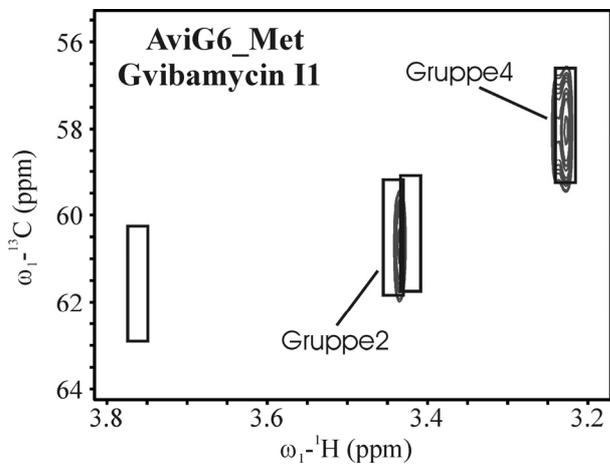


Abb. 40: Ausschnitt aus dem HSQC-Spektrum der AviG6\_Met-Probe.

kann man nur durch Betrachtung des HSQC-Spektrums keine eindeutige Aussage darüber machen, welche der beiden Gruppen2 und 3 fehlt. Glücklicherweise war die Konzentration der AviG6\_Met-Probe deutlich höher als die der AviG5\_Met-Probe. Daher konnten im HMBC-Spektrum eindeutige Kontakte von Gruppe2 zu benachbarten Positionen bestimmt werden. Somit fehlten den Molekülen der AviG6\_Met-Probe sowohl die Gruppe1 als auch die Gruppe3.

### 4.3 Spektren der Modifikationen im Ring H

Wie schon bei der Probenbeschreibung in Kapitel 2.6.3 erwähnt, wurden zur Herstellung dieser Proben (AviO2\_Met und AviB1\_Pyr) jeweils ein weiteres Gen im Avilamycin-Biosynthesegencluster inaktiviert, um deren Rolle bei der Avilamycinproduktion zu klären.

Da aber bei beiden Proben die Massenspektren nicht mit den Erwartungen übereinstimmten, war es zu Beginn der Auswertung der Spektren unklar, wo die Veränderung zu erwarten waren. Nach einer ersten Zuordnung zeigte sich recht schnell, dass für beide Proben Veränderungen in jeweils zwei Bereichen der Moleküle auftraten und zwar sowohl in den Ringen C und D und somit auch noch schwach in den Ringen B und E detektierbar als auch im Ring H. Überraschend war, dass die Veränderungen in den Spektren beider Proben sehr ähnlich und größtenteils im Rahmen der Messgenauigkeit identisch waren. Es machte daher den Eindruck, dass beide Gene für die gleiche Veränderung zuständig waren.

Die Untersuchung der Abweichungen im vorderen Teil des Moleküls (Ringe B bis E) führte zur Identifizierung der offenen und geschlossenen Form des Avilamycins (siehe Kap. 4.1.1) und war somit kein Resultat der Geninaktivierung.

Da in den Spektren der neuen Proben die Signale des Rings H bis auf das charakteristische Signalpaar der Positionen 61<sub>a</sub> und 61<sub>b</sub> verschoben waren, wurde die Zuordnung an dieser Stelle begonnen. Durch eindeutige NOE-Kontakte konnten die beiden Protonen H-54 und H-55 identifiziert werden. Deren Resonanzen waren Teil eines bisher nicht zugeordneten 6-Protonen-Spinsystems, das in TOCSY und COSY unter Zuhilfenahme von HMQC-COSY und HSQC-TOCSY eindeutig definiert werden konnte. Bei einem der Protonenspins handelte es sich um eine OH-Gruppe, da u.a. im HSQC keine H,C-Korrelation festgestellt wurde. Somit konnte dieses Spinsystem als

H-54 – H-55 – H-56 (– HO-56) – H-57 – H-58

identifiziert werden. Die <sup>13</sup>C-Verschiebungen des Rings H wurden im Laufe dieser Untersuchung ebenfalls vollständig zugeordnet. Die an C-56 lokalisierte Acetylgruppe wurde also in den Gavibamycinen der M- und N-Reihe durch ein Wasserstoffatom ersetzt (Abb. 41 rechts).

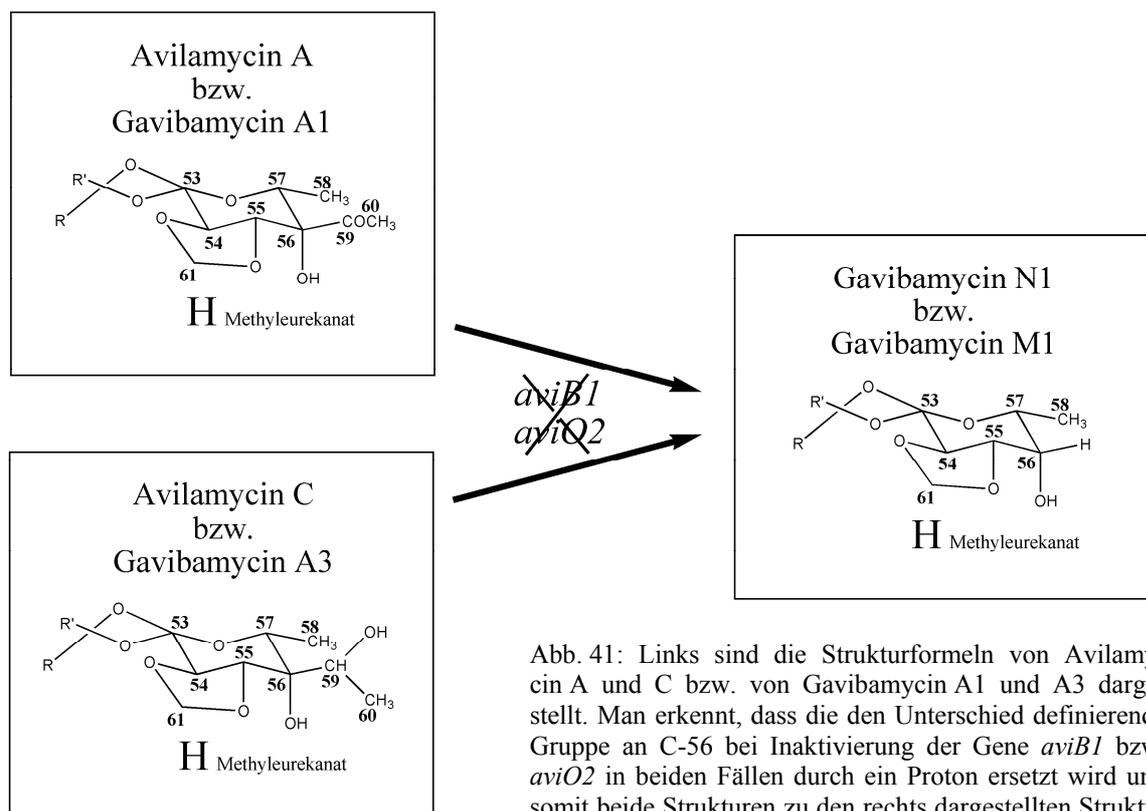


Abb. 41: Links sind die Strukturformeln von Avilamycin A und C bzw. von Gavibamycin A1 und A3 dargestellt. Man erkennt, dass die den Unterschied definierende Gruppe an C-56 bei Inaktivierung der Gene *aviB1* bzw. *aviO2* in beiden Fällen durch ein Proton ersetzt wird und somit beide Strukturen zu den rechts dargestellten Strukturen von Gavibamycin N1 und M1 zusammengeführt werden.

Dementsprechend waren diese modifizierten Verbindungen um  $42 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$  leichter als Avilamycin A bzw. Gavibamycin A1, was auch die beobachteten Massenspektren erklärte:

$$\text{Gavibamycin N1: } 1402 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1} - 42 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1} = 1360 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$$

$$\text{Gavibamycin M1: } 1402 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1} - 14 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1} - 42 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1} = 1346 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$$

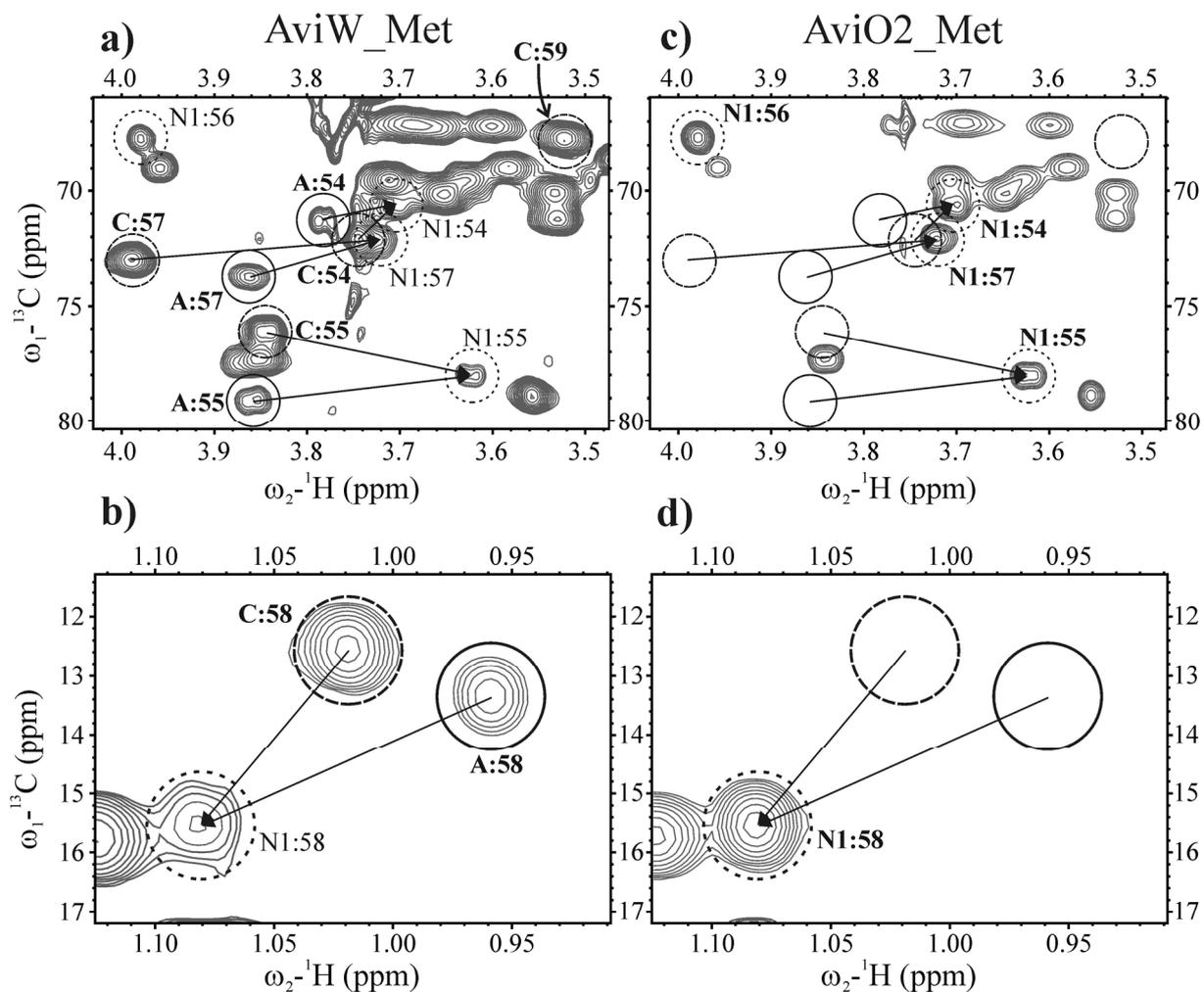


Abb. 42: Ausschnitte aus den HSQC-Spektren der AviW\_Met- (a und b) sowie der AviO2\_Met- Probe (c und d). Dabei markieren die Kreise die Positionen der Signale der verschiedenen Avilamycine und des Gavibamycins N1. Durchgezogene Kreise: Avilamycin A („A:“); gestrichelte Kreise: Avilamycin C („C:“); gepunktete Kreise: Gavibamycin N1 („N1:“). Die Pfeile sollen die Änderung der chemischen Verschiebung bei Inaktivierung des *aviO2*-Gens verdeutlichen.

Beim Vergleich dieser Ergebnisse mit den Spektren der Vergleichssubstanzen AviW\_Met und AviG4\_Pyr zeigte sich, dass dieses Spinsystem des Rings H ohne Acetylgruppe auch schon in diesen Referenzproben enthalten ist, allerdings nur mit einer Konzentration von jeweils etwa 15%. Dies führte zu der Vermutung, dass die Einführung dieser Acetylgruppe erst gegen Ende der Biosynthese stattfindet und daher bei einem Teil der Moleküle in diesen Proben noch nicht stattgefunden hat, d.h. dass die Biosynthese bei diesen Molekülen noch nicht abgeschlossen war [129]. Da aber die Produkte der Mutanten ITO2 und ITB1 *nur* die „deacetylierte“ Form enthielten, war die Funktion der beiden Gene dennoch eindeutig geklärt.

Weiterhin enthält die Vergleichsprobe AviW\_Met ein Gemisch von Avilamycin A und C bzw. die Vergleichsprobe AviG4\_Pyr ein Gemisch der entsprechenden Derivate (Gavibamycin A1 und A3). Dabei liegt das jeweils letztere in einem Überschuss von etwa 3,8 : 1 bzw.

3,3 : 1 vor.<sup>34</sup> Der Unterschied zwischen Avilamycin A und C bzw. Gavibamycin A1 und A3 ist ebenfalls im Ring H lokalisiert, wodurch man für die Atome dieses Rings jeweils zwei Signalsätze sieht. Einen mit den schon bekannten Verschiebungen für Avilamycin A (bzw. Gavibamycin A1) und einen weiteren mit leicht verschobenen Frequenzen und einem zusätzlichen Protonensignal. Letzterer entspricht Avilamycin C (bzw. Gavibamycin A3) und das neue Signal ist ein zusätzlicher Wasserstoff an C-59 (siehe Abb. 41 links unten und Kap. 4.1.4). Dabei ist zu beachten, dass der Unterschied zwischen den Avilamycinen und den entsprechenden Gavibamycinen der A-Reihe in Ring A lokalisiert ist. Dies hat keinen Einfluss auf die Verschiebungen im Ring H, die somit identisch sind.

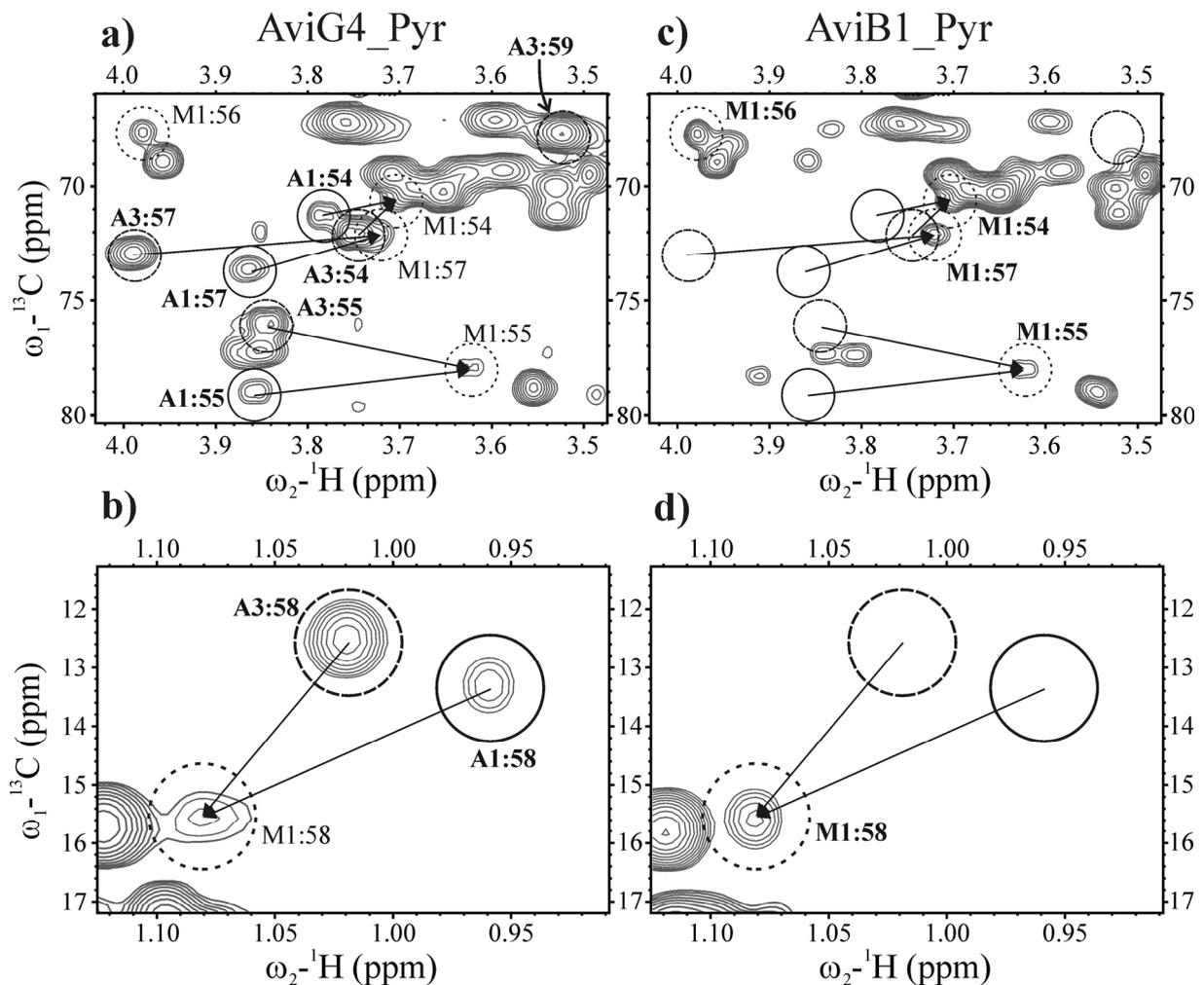


Abb. 43: Ausschnitte aus den HSQC-Spektren der AviG4\_Pyr- (a und b) sowie der AviB1\_Pyr-Probe (c und d). Dabei markieren die Kreise die Positionen der Signale der verschiedenen Gavibamycine. Durchgezogene Kreise: Gavibamycin A1 („A1:“); gestrichelte Kreise: Gavibamycin A3 („A3:“); gepunktete Kreise: Gavibamycin M1 („M1:“). Die Pfeile sollen die Änderung der chemischen Verschiebung bei Inaktivierung des *aviB1*-Gens verdeutlichen.

<sup>34</sup> Diese Abschätzung beruht auf dem Intensitätsvergleich der nicht überlagerten Signale der Positionen 54, 55, 57 und 58 des Rings H im HSQC-Spektrum.

Da sich nun der durch die Inaktivierung der Gene *aviO2* und *aviB1* bewirkte Unterschied in dem an C-56 gebundenen Rest befindet, kollabieren diese beiden Signalsätze in *AviO2\_Met* und *AviB1\_Pyr* zu einem Satz für die entstehenden Gavibamycine M1 und N1 (Abb. 41 rechts).

Dies ist auch gut in den Spektren zu sehen. Abb. 42 a und b zeigen zwei Ausschnitte aus dem HSQC-Spektrum von *AviW\_Met*. Sie zeigen unter anderem die Signale der Positionen 54, 55, 57 und 58 des Avilamycin A und C sowie das Signal von Position 59 des Avilamycin C.<sup>35</sup> Man kann erkennen, dass die beiden Signalsätze kollabieren und dass Gavibamycin N1 auch schon in geringer Menge in dieser Probe vorliegt. Die Abb. 42 c und d zeigen die gleichen Ausschnitte aus dem HSQC-Spektrum von *AviO2\_Met*. Auch hier sind die Signale der deacetylierten Form (Gavibamycin N1) zu sehen, während die Avilamycine A und C in diesem Spektren nicht vorhanden sind.

Abb. 43 a bis d zeigen die gleichen Spektren für *AviG4\_Pyr* und *AviB1\_Pyr* und die gleichen Ergebnisse, wobei hier die Signalsätze von Gavibamycin A1 und A3 zu dem von Gavibamycin M1 kollabieren.

### 4.3.1 Weitere Untersuchung zur Unterscheidung der Signale von 54 und 55

Die Untersuchung der *AviW\_Met*- und der *AviO2\_Met*-Probe konnte die Ergebnisse aus Kapitel 4.1.8 bezüglich der Zuordnung der Signale von Position 54 und 55 weiter erhärten. So konnte die Annahme, dass jeweils die tieffeldigen bzw. hochfeldigen Signale identisch sind, bestätigt werden. Denn die entsprechenden Signale (A:54 / C:54 sowie A:55 / C:55) liegen im HSQC-Spektrum der *AviW\_Met*- Probe (Abb. 42a) jeweils nahe beieinander und die Veränderung der Position im Spektrum beim Übergang von Avilamycin A nach C ist für 55 größer, da auch die strukturelle Änderung in größerer Nähe zu dieser Position erfolgt.

Weiterhin konnte, wie schon beschrieben, für das Gavibamycin N1 die Reihenfolge der Protonen im Ring H mittels COSY-Kontakten eindeutig bestimmt werden. Daher wurden auch für diese Verbindung die NOE-Kontakte von HO-56 zu H-54 und H-55 wie in Kapitel 4.1.8 untersucht und auch hier konnte das gleiche Ergebnis gefunden werden. Nun musste diese Zuordnung der Positionen 54 und 55 von Gavibamycin N1 auf die Avilamycine übertragen werden, wofür die Verschiebung der Signalpositionen im HSQC-Spektrum die nötigen Hinweise liefert (siehe wieder Abb. 42a). Denn während sich die Signale von A:54 und C:54 beim Übergang zu N1:54 nur minimal verschieben, zeigen die gleichen Änderungen für 55

---

<sup>35</sup> Die Ausschnitte des HSQC-Spektrums mit dem Signal von 60 wurde hier aus Platzgründen weggelassen, zeigen aber das gleiche Ergebnis.

deutliche Abweichungen. Dies entspricht aber der Vermutung, denn wie schon erwähnt erfolgt die strukturelle Änderung näher an Position 55. Weiterhin ist bei dieser Zuordnung die Änderung der chemischen Verschiebung in der  $^{13}\text{C}$ -Dimension merklich geringer als in der  $^1\text{H}$ -Dimension, was den experimentellen Erfahrungen entspricht.

Da auch alle weiteren Untersuchungen konform zur bisherigen Zuordnung der Positionen 54 und 55 waren, kann davon ausgegangen werden, dass sie korrekt ist.

#### 4.4 Spektren der Fütterungsexperimente

Wie schon in der Probenbeschreibung erläutert (Kap. 2.6.4), wurden die Wildtyp-Bakterien bei der Herstellung von drei Proben (AviW\_Glu, AviW\_Ace und AviW\_Pyr) mit verschiedenen  $^{13}\text{C}$ -markierten Substanzen gefüttert, wodurch die Produkte an bestimmten Positionen im Molekül eine  $^{13}\text{C}$ -Markierung aufweisen müssten. Diese Positionen sollten nun mittels NMR-Spektroskopie ermittelt werden, um so zu bestimmen, welche Teile des Moleküls aus dem jeweiligen Edukt aufgebaut wurden und somit weitere Informationen über den Biosyntheseweg zu gewinnen.

Diese Fragestellung sollte aufgrund der durch die Vorarbeiten verfügbaren Zuordnung mit NMR-Spektroskopie gut lösbar sein, allerdings zeigten sich bei der Auswertung doch deutliche Schwierigkeiten. Zum einen war dies die mangelnde Reinheit der Proben, da wie beschrieben aufgrund der geringen produzierten Stoffmenge auf eine weitere Aufreinigung verzichtet wurde. Dadurch betrug das Verhältnis der hauptsächlich in der AviW\_Glu-Probe vorhandenen Avilamycine A : B : C etwa 40 : 10 : 50.<sup>36</sup> In der AviW\_Ace-Probe lag es bei etwa 50 : 5 : 45 und in der AviW\_Pyr-Probe bei etwa 75 : 5 : 20. Das Verhältnis der geschlossenen zu den offenen Formen betrug in allen drei Proben etwa 90 : 10. Dementsprechend waren in allen Proben insbesondere für die Ringe G und H mehrere Signalsätze und somit insgesamt mehr Überlagerungen vorhanden.<sup>37</sup>

Ein weiteres Problem war der geringe Markierungsgrad der Proben. Wie schon besprochen, wurde für die AviW\_Glu-Probe erwartet, dass bei vollständigem Einbau der  $^{13}\text{C}$ -Edukte ein Markierungsgrad von etwa 10 % erreicht wird, während für die beiden anderen Fütterungsproben keine Angaben gemacht werden konnten. In den NMR-Spektren konnte bei der AviW\_Glu- und der AviW\_Pyr-Probe eine etwa 5-10 %-ige Markierung nachgewiesen werden, für die AviW\_Ace Probe lag sie bei etwa 10-15 %.

---

<sup>36</sup> Gemäß Abschätzungen aus dem Massen- und HMQC-Spektrum.

<sup>37</sup> In diesem Zusammenhang sei erwähnt, dass daraufhin angeregt wurde, für die zukünftigen Proben eine erhöhte Reinheit einer erhöhten Konzentration vorzuziehen. Dies wurde inzwischen auch bei zwei weiteren, nicht im Rahmen dieser Arbeit besprochenen, Fütterungsexperimenten erfolgreich durchgeführt.

Weiterhin traten die folgenden, methodenbedingten Probleme bei der Ermittlung und Interpretation der Signalintensitäten auf. Aufgrund der unterschiedlichen und teilweise recht großen longitudinalen Relaxationszeiten (T1) der  $^{13}\text{C}$ -Kerne kann es bei einem Teil der Kohlenstoffe passieren, dass sie nach einem Einzelexperiment noch nicht wieder in den Gleichgewichtszustand zurückgekehrt sind, bevor das nächste Einzelexperiment erfolgt, wodurch dann in diesem ein geringeres Signal detektiert wird. Um dies zu vermeiden bzw. um zu bestimmen, ob dieser Effekt für den jeweiligen Kern eintritt, wurden die Experimente mit unterschiedlichen, teilweise langen, Relaxationsdelays aufgenommen. Dabei waren zumindest keine drastischen Schwankungen erkennbar. Dieses Problem tritt zwar bei Polarisationstransferexperimenten, wie z.B. INEPT oder HSQC, nicht auf, allerdings können diese nicht für alle Positionen angewendet werden, da nicht alle Kohlenstoffe an Protonen gebunden sind. Weiterhin sind auch bei diesen Experimenten die resultierenden Signale aufgrund der unterschiedlichen Transfer-effizienz durch die verschiedenen  $^1\text{J}_{(\text{C,H})}$ -Kopplungen nicht quantitativ miteinander vergleichbar.

Weiterhin zeigten die Signale unterschiedliche Linienbreiten, so dass die Signalhöhe nicht verglichen werden konnte, sondern oftmals die Integration eines Großteils der Signale eines Spektrums erforderlich war. Dies war wiederum durch die Überlagerungen nicht trivial.

Daher wurden jeweils verschiedene Spektren untersucht und aus der Gesamtheit dieser Informationen die benötigten Ergebnisse abgeleitet. Insbesondere die entkoppelten und nicht entkoppelten  $^{13}\text{C}$ -1D-Spektren erwiesen sich als ergiebig, aber auch die Untersuchungen mit INEPT-1D-Experimenten brachten wichtige Informationen. Ein Teil der Markierungen wurde auch mithilfe anderer Spektren (darunter auch 2D-Experimente) identifiziert; ein Beispiel wären die COSY-Spektren, in denen vereinzelt neben Kreuzsignalen schwache  $^{13}\text{C}$ -Satelliten dieser Signale detektiert werden konnten. Weiterhin wurden die Spektren mit denen der unmarkierten AviW-Probe verglichen, um dadurch intensivere Signale zu identifizieren.

Dennoch war aufgrund der oben beschriebenen Probleme keine quantitative Analyse der Markierungen möglich. Es konnte zwar größtenteils geklärt werden, ob eine Position markiert ist oder nicht, aber die Frage nach dem Markierungsgrad würde besser aufgereinigte und stärker markierte Proben erfordern.

#### 4.4.1 Produkt des mit 1-<sup>13</sup>C-D-Glukose gefütterten Wildtyps (AviW\_Glu)

In dieser Probe konnten sieben intensivere <sup>13</sup>C-Signale identifiziert werden (siehe Abb. 44). Es handelt sich dabei um C-10, C-16, C-22, C-29, C-36, C-44 und C-53, also alle anomeren Kohlenstoffe der Zuckereinheiten.

Dabei war insbesondere die Identifikation der Position 53 schwierig, da das Signal dieses Kohlenstoffkerns in den in der Probe vorhandenen Avilamycinen A, B und C jeweils leicht unterschiedliche chemische Verschiebung aufwies. Dadurch war es im entkoppelten Spektrum nicht ein einzelnes, intensiveres Signal, sondern eine Gruppe von drei unterschiedlich starken Signalen. Deren Gesamtintegral war aufgrund von leichten Überlagerungen nicht problemlos zu messen und zusätzlich nur geringfügig intensiver als der Durchschnitt der Signale der anderen nicht markierten Kohlenstoffe.

Weiterhin hätten noch <sup>13</sup>C-Markierungen im Ring A und der Acetylgruppe im Ring H detektiert werden sollen, was aber nicht der Fall war, da der Markierungsgrad an diesen Stellen zu gering war. Der Grund dafür wird in der Diskussion in Kapitel 5.2.4 genauer beleuchtet.

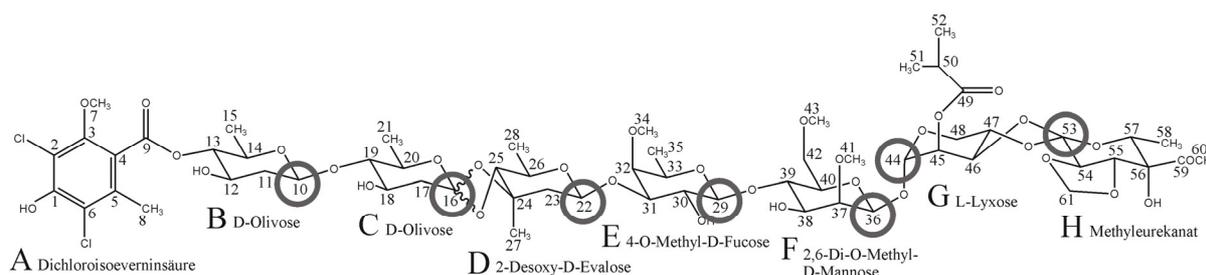


Abb. 44: Strukturformel von Avilamycin A. Die gekennzeichneten Stellen zeigen die gefundenen <sup>13</sup>C-Markierungen in der im Rahmen der Fütterungsexperimente hergestellte AviW\_Glu-Probe.

#### 4.4.2 Produkt des mit 1-<sup>13</sup>C-Na-Acetat gefütterten Wildtyps (AviW\_Ace)

In dieser Probe wurden drei Kohlenstoffe identifiziert, bei denen sicher eine <sup>13</sup>C-Markierung stattgefunden hat, nämlich C-3, C-5 und C-9 (siehe Abb. 45). Das Signal des Kohlenstoffs C-1, der dem Markierungsmuster gemäß wahrscheinlich auch markiert ist, überlagerte mit dem von C-3. Für letzteren konnte aber ein sicherer HMBC-Kontakt zu H-7 gefunden werden, während C-1 keine eindeutigen Kontakte zu anderen Positionen zeigte. Das Gesamtintegral der beiden überlagerten Signale von C-1 und C-3 war zwar etwas größer als z.B. das von C-5, aber dies kann auch wie schon besprochen andere Ursachen haben. Es ist also nur ein Indiz aber kein Beweis für eine <sup>13</sup>C-Markierung an Position C-1.

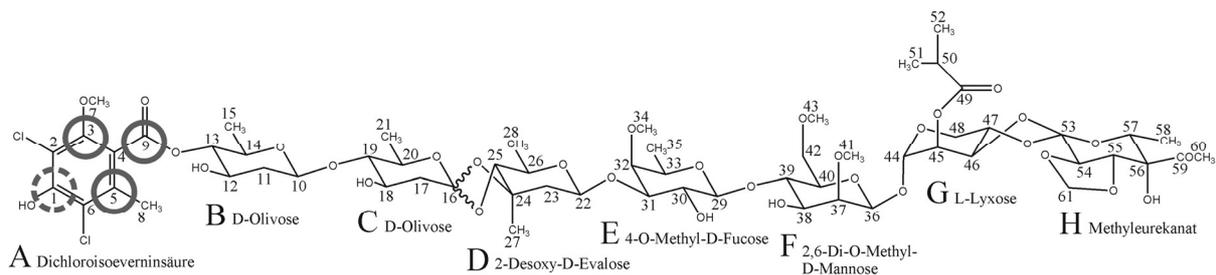


Abb. 45: Strukturformel von Avilamycin A. Die gekennzeichneten Stellen zeigen die gefundenen <sup>13</sup>C-Markierungen in der im Rahmen der Fütterungsexperimente hergestellte AviW\_Ace-Probe. Der gestrichelte Kreis kennzeichnet eine wahrscheinlich <sup>13</sup>C-markierte Position.

#### 4.4.3 Produkt des mit 2-<sup>13</sup>C-Na-Pyruvat gefütterten Wildtyps (AviW\_Pyr)

Auch hier wurden die gleichen Ergebnisse wie bei der AviW\_Ace-Probe gefunden. Den Erwartungen gemäß konnte aber zusätzlich noch C-59 als markiert identifiziert werden (siehe Abb. 46).

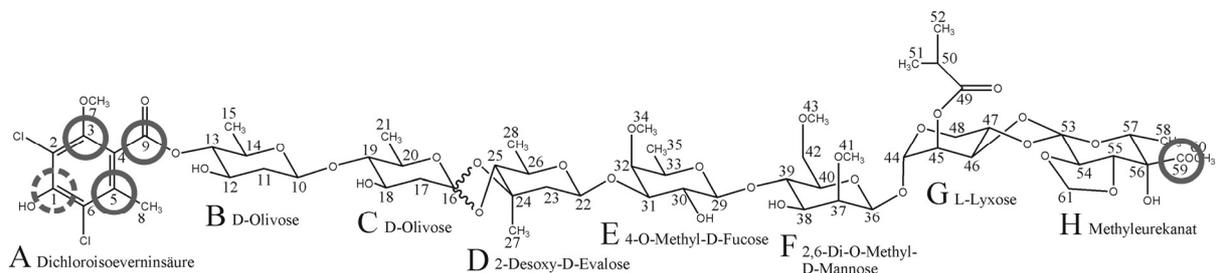


Abb. 46: Strukturformel von Avilamycin A. Die gekennzeichneten Stellen zeigen die gefundene <sup>13</sup>C-Markierung in der im Rahmen der Fütterungsexperimente hergestellte AviW\_Pyr-Probe. Der gestrichelte Kreis kennzeichnet eine wahrscheinlich <sup>13</sup>C-markierte Position.

## 5 Zusammenfassung, Diskussion und Ausblick

### 5.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Nach einer Zusammenfassung der Ergebnisse der im letzten Kapitel beschriebenen Auswertung werden die dabei gewonnenen Erkenntnisse (Kap. 5.2) diskutiert.

#### 5.1.1 Der Wildtyp: AviW

Die bisher in der Literatur veröffentlichte NMR-spektroskopische Zuordnung des Avilamycin A war nur sehr unvollständig. Lediglich sieben der 59  $^1\text{H}$ -Signale waren eindeutig zugeordnet und bei sieben weiteren wurde für die Resonanzfrequenz der Bereich 1,00–1,40 ppm angegeben. Von den 61  $^{13}\text{C}$ -Resonanzen waren bisher nur 35 eindeutig und die restlichen 26 als im Bereich 63,1–88,3 ppm befindlich veröffentlicht.

Für die in dieser Arbeit behandelten Fragestellungen war allerdings eine vollständige Zuordnung unumgänglich. Es war möglich die Kohlenstoffsignale vollständig zu identifizieren, bei den  $^1\text{H}$ -Resonanzen sind 57 der 59 Positionen zugeordnet. Die beiden fehlenden Resonanzen sind zum einen HO-56, die wahrscheinlich mit einer anderen  $^1\text{H}$ -Resonanz des Rings H überlagert, und zum anderen HO-1. Diese Gruppe ist in der Struktur von Avilamycin A verhältnismäßig isoliert von anderen Protonen, wodurch bisher keine NOE-Kontakte zu diesem Hydroxyproton gefunden werden konnten. HMBC-Kontakte waren ebenfalls nicht zu identifizieren, so dass für dieses Proton keine Zuordnung möglich war.

Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass sich eine Bindung der Orthoestergruppe zwischen den Ringen C und D nach Lösen in DMSO- $d_6$  innerhalb weniger Wochen beinahe vollständig öffnet, wobei ein möglicher Mechanismus ermittelt werden konnte, bei dem eine der beiden Esterbindungen hydrolysiert wird. Für die dabei entstehende, offene Form konnte ebenfalls eine nahezu komplette Zuordnung ermittelt werden. Abgesehen von den auch hier fehlenden Identifikationen von HO-1 und HO-56, konnte eine der neu entstandenen Hydroxygruppen (HO-24) nicht in den Spektren identifiziert werden, vermutlich da sie ebenfalls mit einer anderen Protonenresonanz innerhalb des Rings überlagert. Weiterhin konnte den beiden Methylenprotonen H-17<sub>a/b</sub> nur eine Resonanz zugeordnet werden, was aufgrund der erhöhten Flexibilität bei geöffneter Orthoesterbindung plausibel erscheint. Die Zuordnung der Kohlenstoffsignale ist vollständig.

Weiterhin konnten auch die Avilamycine B und C, die teilweise in vergleichbaren Mengen in den Proben vorhanden waren, im Spektrum identifiziert und nahezu vollständig zugeordnet werden.

### 5.1.2 Methyltransferase-Inaktivierungen

Für die AviG4\_Met-Probe<sup>38</sup> konnte das erwartete und schon auf anderem Wege bestimmte Ergebnis der fehlenden Gruppe1 bestätigt werden. Bei den Produkten der drei weiteren Methyltransferase-Inaktivierungsmutanten konnte ebenfalls jeweils die Gruppe1 als fehlend erkannt werden. Weiterhin wurde nachgewiesen, dass jeweils eine weitere Methoxygruppe ersetzt worden war; dies war bei der AviG2\_Met-Probe die Gruppe4, bei der AviG5\_Met-Probe die Gruppe2 und bei der AviG6\_Met-Probe die Gruppe3. Während diese Ergebnisse bei der AviG2\_Met- und der AviG6\_Met-Probe wegen der nun verfügbaren Zuordnung vergleichsweise schnell ermittelt werden konnten, waren bei der AviG5\_Met-Probe aufgrund der starken Signalüberlagerungen zusätzliche Messungen erforderlich.

### 5.1.3 Modifikationen im Ring H

Die für die AviO2\_Met- und die AviB1\_Pyr-Probe aus den Sequenzen der inaktivierten Gene mittels Homologievergleich ermittelten Funktionen sowie die daraus abgeleiteten Vermutungen bezüglich der Strukturveränderungen in den Produkten konnte schon durch Analyse der Massenspektren als falsch identifiziert werden. Allerdings ließ sich aus diesen Spektren kein weiteres eindeutiges Ergebnis ableiten. Somit waren zu Beginn der NMR-Untersuchung nahezu keine Informationen bezüglich der Veränderungen im Molekül vorhanden. Diese konnte aber aufgrund der inzwischen vorhandenen Zuordnung bestimmt werden.

Für die AviO2\_Met-Probe war eine Öffnung der Methylenbrücke im Ring H vermutet worden, dies konnte aber durch die Auswertung der NMR-Spektren eindeutig ausgeschlossen werden. Es konnte allerdings gezeigt werden, dass an C-56 keine Acetylgruppe, sondern ein Wasserstoff gebunden ist.

An der gleichen Position (C-56) wurde bei der AviB1\_Pyr-Probe eine Carbonylfunktion erwartet, die dadurch sowohl die Hydroxy- als auch die Acetylgruppe ersetzt haben müsste. Ferner sollte auch hier die Gruppe1 fehlen, da bei der Herstellung der ITO2-Mutante von der GW4-Mutante ausgegangen wurde. Während letzteres auch in den NMR-Spektren nachgewiesen werden konnte, wurde statt der Carbonylfunktion eine zur AviO2\_Met-Probe identische Struktur im Ring H nachgewiesen, also die Substitution der Acetylgruppe durch ein Wasserstoffatom.

---

<sup>38</sup> Bezüglich der Probenomenklatur, siehe Beschreibung der Proben in Kapitel 2.6.

Weiterhin konnte zum einen gezeigt werden, dass diese deacetylierten Formen schon zu einem geringen Prozentsatz von etwa 15 % in den Vergleichsproben enthalten sind. Zum anderen konnte für diese Gavibamycine ebenfalls eine vollständige Zuordnung ermittelt werden.

### 5.1.4 <sup>13</sup>C-Fütterungsexperimente

In der AviW\_Glu-Probe konnten in allen Zuckereinheiten <sup>13</sup>C-Markierungen nachgewiesen werden und zwar jeweils an den anomeren Zentren (Positionen 10, 16, 22, 29, 36, 44 und 53). Mögliche <sup>13</sup>C-Markierungen im Ring A und in der Acetylgruppe an C-56 konnte aufgrund des geringen Markierungsgrads nicht belegt werden.

Das Produkt des bei der Aufzucht mit 1-<sup>13</sup>C-Na-Acetat gefütterten Wildtyps (AviW\_Ace) zeigte eindeutige <sup>13</sup>C-Markierungen an den Kohlenstoffen C-3, C-5 und C-9, was auch mit den Erwartungen übereinstimmte, dass das 1-<sup>13</sup>C-Na-Acetat in den Ring A eingebaut wird. Allerdings kann eine vermutliche Markierung an C-1 aufgrund von Signalüberlagerungen nicht eindeutig nachgewiesen werden.

Für die Spektren der AviW\_Pyr-Probe wurden die gleichen Ergebnisse wie für die eben besprochene AviW\_Ace-Probe gefunden, allerdings war zusätzlich noch der Kohlenstoff C-59 in der Acetylgruppe des Rings H markiert. Dies entsprach ebenfalls den Erwartungen.

## 5.2 Diskussion

Vor einer allgemeinen Diskussion der in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse, werden die bei der Auswertung der Fütterungsexperimente gemachten Beobachtungen diskutiert.

### 5.2.1 <sup>13</sup>C-Fütterungsexperimente

Die Analyse der Fütterungsexperimente erlaubte einige neue Erkenntnisse über die Biosynthesewege des Avilamycins, für deren Erläuterung hier der Glukoseabbau in der Bakterie kurz und vereinfacht dargelegt wird.

Durch Glykolyse wird Glukose zu Brenztraubensäure umgesetzt, deren Salze als Pyruvate bezeichnet werden. Diese C<sub>3</sub>-Einheiten werden nun u.a. weiter zu Acetat metabolisiert, welches anschließend auf das Coenzym A übertragen und in der Atmungskette weiter metabolisiert wird.<sup>39</sup> Wenn die Bakterien nun Acetat und Pyruvat für die Avilamycin-Biosynthese benötigen, können sie diese sowohl aus der Umgebung als auch aus ihrem eigenen Stoffwech-

---

<sup>39</sup> Alle diese Umsetzungen erfolgen über mehrere Zwischenschritte, die aber für die weiteren Erläuterungen nicht benötigt werden und daher aus Gründen der Übersicht ausgelassen wurden. Für eine genauere Diskussion diese Themas siehe z.B. [17, 18]

sel beziehen. Wie der Markierungsgrad bei der AviW\_Ace- und der AviW\_Pyr-Probe zeigte, bedienen sich die Bakterien auch dieser beiden Quellen.

Diese Reihenfolge des Glukose-Abbaus und die aus den NMR-Spektren gewonnenen Erkenntnisse zeigen, dass 1-<sup>13</sup>C-Na-Acetat von der Bakterie nur für den Aufbau des Rings A verwendet wird, aber nicht für die Erzeugung der Acetylgruppe an C-56. Füttert man dagegen <sup>13</sup>C-markiertes Pyruvat zu, wird ein Teil davon über Zwischenschritte in die Acetylgruppe des Rings H eingebaut. Der Rest wird zu markiertem Acetat umgesetzt, das wiederum teilweise für den Aufbau des Rings A genutzt wird.

Bei der Zugabe von 1-<sup>13</sup>C-D-Glukose wird ein Teil dieser von den Bakterien für den Aufbau der sieben Zuckereinheiten verwendet. Der verbleibende Teil wird metabolisiert, wobei aus jedem Molekül Glukose zwei Moleküle Pyruvat entstehen können, von denen aber nur noch eins <sup>13</sup>C-markiert ist. Dadurch kommt es zu einer Halbierung des Markierungsgrads bei allen Positionen, für deren Aufbau Pyruvat verwendet wird. Dies bietet auch eine mögliche Erklärung, warum in der Acetylgruppe (Ring H) und dem Ring A der AviW\_Glu-Probe keine <sup>13</sup>C-Markierung nachgewiesen werden konnte.<sup>40</sup> In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, dass das Signal von C-59 im Spektrum nochmals um etwa den Faktor 2 schwächer ist, da die Intensität auf zwei Signale verteilt wird, nämlich dem einer Carbonylfunktion in Avilamycin A und B (ca. 50 %) und dem einer -CH(OH)-Gruppe in Avilamycin C (ebenfalls ca. 50 %).

Eine weitere interessante Feststellung konnte aus der nachgewiesenen <sup>13</sup>C-Markierung der Position 44 im Ring G abgeleitet werden. Dieser besteht aus einer L-Lyxose, die nur fünf Kohlenstoffatomen aufweist und somit zu den Pentosen gehört. Da aber das markierte anomere Kohlenstoffatom immer noch im Avilamycin vorhanden ist, muss die Kürzung der C<sub>6</sub>-Einheit der Glukose um einen Kohlenstoff an einer anderen Position der Kette stattgefunden haben.

Bezüglich einer qualitativen Auswertung der NMR-Spektren weiterer Fütterungsexperimente lässt sich abschließend sagen, dass dafür ein höherer Markierungsgrad durch eine größere Konzentration von <sup>13</sup>C-markierten Edukten bei der Herstellung der Proben sowie eine gründliche Aufreinigung erforderlich sind.<sup>41</sup>

---

<sup>40</sup> Eine weitere mögliche Ursache für den erniedrigten <sup>13</sup>C-Markierungsgrad ist der Abbau anderer Kohlenhydrate zu Pyruvat und Acetat. Bei diesem Fütterungsexperiment wurde neben 1-<sup>13</sup>C-D-Glukose auch nicht markiertes Mannit in einem Verhältnis von 3 : 1 zugegeben. Dabei ist allerdings unklar, wie stark der Einfluss des Mannitabbaus auf den Markierungsgrad ist [115].

<sup>41</sup> Es wurden inzwischen schon erfolgreich dementsprechende Proben hergestellt, die sehr viel deutlichere und somit leichter zu interpretierende NMR-Signale zeigen.

## 5.2.2 Allgemeine Diskussion

Bezüglich der Zuordnung wurden bereits fast alle wichtigen Probleme und Ergebnisse in den Kapiteln 4.1 bis 4.1.8 ausgiebig diskutiert. Ein noch ausstehender Punkt ist struktureller Natur und könnte einer der Gründe für die höhere Stabilität der Orthoesterbindung zwischen den Ringen G und H im Vergleich zu der zwischen den Ringen C und D sein:

Es ist auffällig, dass sich die chemische Verschiebung von Avilamycin A und Avilamycin B<sup>42</sup> nicht nur im Ring G unterscheidet, sondern auch im Ring H Abweichungen aufweist, die sich aber auf die „hintere“ Seite des Rings, also auf die Positionen 57 und 58, beschränken. Eine ähnliche Interaktion zwischen diesen beiden Ringen zeigt sich bei den NOE-Kontakten (Abb. 24). Sowohl in Avilamycin A als auch in B, können vom Ring G aus fast ausschließlich nur Korrelationen zu H-57 und H-58, aber nicht zu anderen Kernen des Rings H identifiziert werden. Daher lässt sich vermuten, dass der Ring H in den Avilamycinen zum Teil „zurückgebogen“ ist, so dass die Positionen 57 und 58 in der Nähe der Seitenkette von Ring G lokalisiert sind. Dieses teilweise „Einrollen“ des Moleküls könnte eventuell die Orthoesterbindung zwischen den Ringen G und H sterisch vor Angriffen schützen. Eine Überprüfung dieser Vermutung wäre anhand einer Strukturrechnung des Moleküls möglich.

Im Zuge der hier vorgestellten Untersuchungen konnten die Kenntnisse über den für die Avilamycin-Biosynthese verantwortlichen Gencluster in *Streptomyces viridochromogenes* Tü57 erweitert werden. Ein Gen (*aviG4*) konnte in seiner Funktion bestätigt und drei weitere (*aviG2*, *aviG5* und *aviG6*) neu festgelegt werden. Ferner sind die Funktionen zweier weiterer Gene (*aviO2* und *aviB1*) teilweise geklärt, da nun bekannt ist, dass sie für Enzyme codieren, die am Einbau der Acetylgruppe im Ring H beteiligt sind. Dabei wird vermutet, dass das von *aviB1* codierte Enzym das Pyruvat in ein Acetyl-carbanion überführt, welches dann wiederum vom *aviO2* codierten Enzym an das Avilamycin Grundgerüst transferiert wird [130]. Die Inaktivierung dieser Gene führt in jedem Fall zum Fehlen dieser Acetylgruppe in den produzierten Avilamycinen. Diese Informationen erweitern aber auch die für die kombinatorische Biosynthese wichtige Bibliothek von Genen und deren Funktionen. Ferner haben die in den Fütterungsexperimenten gewonnenen Erkenntnisse das Verständnis des Biosynthesewegs an einigen wichtigen Stellen erweitert, wie bereits oben erwähnt wurde.

Aufgrund der bei den Untersuchungen der inaktivierten Methyltransferasen gefundenen Ergebnisse, wurden in der Gruppe von Prof. Dr. A. Bechthold weitere Experimente bezüglich einer möglichen pharmazeutischen Anwendung der Avilamycine und Gavibamycine durchgeführt [131]. Dabei konnte unter anderem gezeigt werden, dass die Inaktivierung der Methyl-

---

<sup>42</sup> Wie in Kapitel 4.1.3 erläutert, weist Avilamycin B in der Seitenkette nur eine Methylgruppe an C-49 auf. Bei Avilamycin A liegt hier stattdessen eine Isopropylgruppe vor.

transferasen den erwünschten Effekt einer erhöhten Wasserlöslichkeit hatte, wie die folgende Auflistung zeigt. Dabei entsprechend die Faktoren der Wasserlöslichkeit relativ zu der von Avilamycin A.

AviG4-Mutante (Gavibamycin A1): Faktor 1,7

AviG6-Mutante (Gavibamycin I1): Faktor 3,7

AviG2-Mutante (Gavibamycin C1): Faktor 6,0

AviG5-Mutante (Gavibamycin E1): Faktor 10,5

Diese Gavibamycine zeigen weiterhin eine antibiotische Wirkung, welche nur geringfügig schwächer ist als die des Avilamycin A. Sie sind z.B. gegen die zwei getesteten Vancomycin-resistenten Enterokokken-Stämme gut bis moderat wirksam.<sup>43</sup> Es konnte also gezeigt werden, dass gezielte Genmodifikationen genutzt werden können, um die physikalischen Eigenschaften des Genprodukts auf die gewünschte Art zu verändern.

Als Abschluss der Diskussion und Übergang zum Ausblick, wird nun erläutert, wie sich die im Rahmen dieser Arbeit erworbenen Informationen auf die NMR-spektroskopische Untersuchung weiterer Avilamycin-Derivate nutzen lassen. Da nahezu alle Verschiebungsdaten der wichtigen Varianten des Avilamycin A bekannt sind<sup>44</sup>, dürften die Identifikation eines geringen strukturellen Unterschieds, wie z.B. einer fehlenden Methylgruppe, bei weiteren Mutantenprodukten sehr leicht fallen. Schon die Akquisition eines HMQC- oder HSQC-Spektrums sowie der einfache Abgleich der knapp 60 Signale mit der bekannten Zuordnung müssten ausreichen, um die fehlende Gruppe zu identifizieren. Dies dürfte nur wenige Stunden beanspruchen und würde z.B. dem Vorgehen entsprechen, das bei der Charakterisierung der AviG2\_Met-Probe angewandt wurde.

Sollte die Veränderung auch stärkere Auswirkungen auf die chemische Verschiebung der Nachbarkerne haben, dürften sich zumindest die unveränderten oder nur leicht verschobenen Signale identifizieren lassen. Dadurch sollten sich die Bereiche im Molekül, die eine strukturelle Änderung erfahren haben, identifizieren lassen.

Die Spinsysteme, die sich in diesen veränderten Bereichen des Moleküls befinden, sowie die Reihenfolge der Kerne innerhalb dieser Spinsysteme, könnten mit der Aufnahme und Auswertung eines entsprechenden Spektrums, wie z.B. eines COSY- oder besser eines HMQC-COSY-Spektrums, identifiziert werden. Anschließend müssten HMBC- und/oder NOESY-Spektren ausreichen, um diese Spinsysteme in Relation zu den unveränderten Mole-

---

<sup>43</sup> Die minimalen Hemmkonzentrationen (MHK) betragen 1-8 µg/ml.

<sup>44</sup> Dazu gehört neben den Hauptprodukten der Bakterien (Avilamycin A und C sowie in geringeren Mengen B) auch die jeweils an der Orthoestergruppe zwischen den Ringen C und D geöffnete Form.

külteilen zu bringen und damit das Problem zu lösen. Auf diesem Wege konnten z.B. die Veränderungen in der AviO2\_Met-Probe aufgeklärt werden.

Besonders gut und sicher lassen sich Proben auswerten, die an bekannten Positionen markiert sind und denen dann eine dieser Positionen fehlt, wie dies z.B. bei der AviG5\_Met-Probe der Fall war. Bei dieser Probe waren zwar Überlagerungen noch ein Problem, welches aber mit der erfolgreichen Implementation der Variante des  $^{13}\text{C}$ -gefilterten NOESY gelöst werden konnte. Weiterhin dürften durch die inzwischen vorhandenen Zuordnungsdaten von nun an nicht markierte Proben vollkommen ausreichend sein, um weitere Avilamycin-Derivate schnell und erfolgreich untersuchen zu können. Dadurch kann sozusagen „Hand-in-Hand“ mit der Biochemie gearbeitet werden, da die NMR-spektroskopische Untersuchung neuer Mutantenprodukte bedeutend schneller als deren Herstellung erfolgen dürfte.

### 5.3 Ausblick

Durch die Identifizierung weiterer für die Avilamycin-Biosynthese codierender Gene sowie der Aufklärung des entsprechenden Biosynthesewegs in *S. viridochromogenes*, dürften sich in Zukunft neben den bereits untersuchten eine Vielzahl weiterer Avilamycin-Derivate produzieren lassen, die dann bezüglich ihrer pharmakologischen Wirksamkeit und physikalischen Eigenschaften untersucht werden können. Wenn dabei auch die Abhängigkeit der Wirksamkeit und der Eigenschaften von der Struktur geklärt werden könnte, müsste es möglich werden, den molekularen Aufbau effizienter Strukturen zu ermitteln, um anschließend den Biosynthese-Gencluster dahingehen zu verändern, dass das Bakterium genau diese Avilamycin-Derivate produziert.

Dies wäre insbesondere dann sinnvoll, wenn der genaue Wirkmechanismus am Ribosom bekannt wäre. Sollte dafür eine mit NMR ermittelte 3D-Struktur benötigt werden, sollten die dafür nötigen Parameter aufgrund der nun bekannten Zuordnung leicht in den Spektren zu ermitteln sein.

Diese Möglichkeit zur gezielten Produktveränderung durch Genmodifikation ist aber nicht nur auf die Avilamycine beschränkt. Bei weiteren Entwicklungen auf dem Gebiet der kombinatorischen Biosynthese dürfte sich ein Punkt erreichen lassen, an dem ein beliebiger, von einem Mikroorganismus produzierter, Sekundärmetabolit in nahezu jeder gewünschten Art und Weise alleine durch die Veränderung der für die Biosynthese codierenden Gene modifiziert werden kann. Es könnte eventuell sogar möglich werden, durch Neukombination verschiedener – auch aus unterschiedlichen Mikroorganismen stammender – Gene, ein neues Produktmolekül von Grund auf zu kreieren, statt vorhandene Strukturen zu modifizieren. Wenn die Datenban-

ken, in denen Gene, ihre Sequenzen sowie die Funktion der durch sie codierten Enzyme enthalten sind, deutlich erweitert werden können, könnte es sogar möglich werden, nur anhand der Gensequenzen unbekannter Mikroorganismen deren Biosynthesewege vorherzusagen.

Damit sollte es nicht nur möglich sein, neue pharmazeutische Wirkstoffe zu produzieren, sondern auch auf anderen Gebieten, wie z.B. der Materialforschung, könnten die Fortschritte der kombinatorischen Biosynthese genutzt werden.

Für die nähere Zukunft dürfte es mit den Möglichkeiten dieser Technik vor allem schneller zur Entwicklung neuer Medikamente kommen. Insbesondere neue Antibiotika werden dringend für die Lösung der in der Einleitung beschriebenen Problematik der rasant ansteigenden Zahl von mehrfach-resistenten Krankheitserregern benötigt. Die Bakterien werden sich zwar voraussichtlich immer wieder an neue Wirkstoffe anpassen, aber man könnte erneut einen Vorsprung gewinnen und zudem ein so großes Arsenal an Antibiotika schaffen, dass es möglich wird, immer mehrere gut wirksame Substanzen in Kombination zu verabreichen, wodurch die weitere Resistenzentwicklung auf einem Minimum gehalten werden könnte.

## 6 Entwicklung einer neuen Pulssequenz

Dieses Projekt behandelt die Entwicklung einer neuen Pulssequenz zur Bestimmung der Konfiguration chemisch äquivalenter vicinaler Protonen mithilfe der NMR-Spektroskopie. Es wurde in Zusammenarbeit mit Prof. Kirschning (Hannover) durchgeführt, der freundlicherweise die Proben zur Verfügung stellte.

### 6.1 Motivation

Abb. 47 zeigt die Struktur des durch Metathese-Olefinierung gewonnenen Linker-verbrückten Aminoglykosids **1**. Aufgrund der identischen Seitenketten ist dieses Molekül, abhängig von der Konfiguration der Doppelbindung, entweder spiegel- oder punktsymmetrisch. In der zu untersuchenden Probe lag nun ein Gemisch der (*E*)- und (*Z*)-Konfiguration vor und es war die Problemstellung, die Verhältnisse der beiden zu bestimmen. Das übliche Vorgehen zur Ermittlung der Konfiguration einer Doppelbindung mittels NMR wäre die Messung der  $^3J_{(H,H)}$ -Kopplung der vicinalen Protonen [92, 109]:

(*Z*)-Konfiguration: 6-14 Hz, meist ca. 10 Hz

(*E*)-Konfiguration: 14-20 Hz, meist ca. 16 Hz

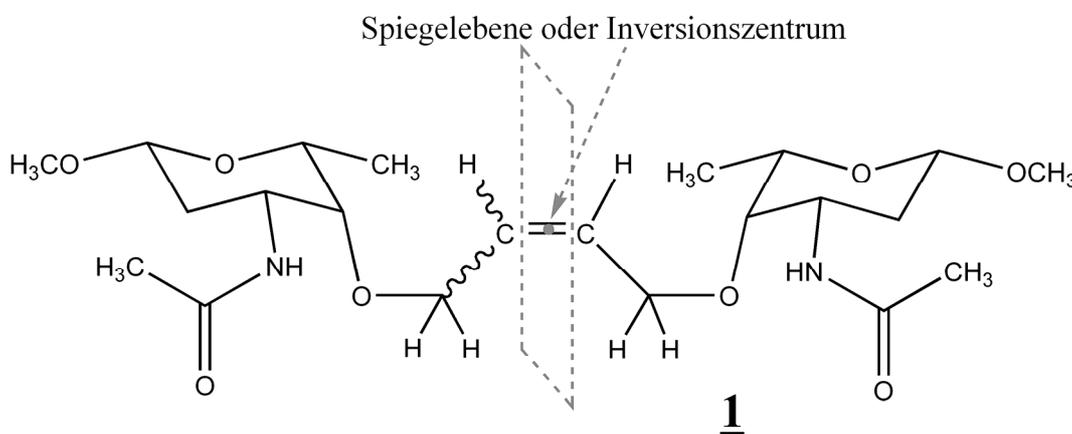


Abb. 47: Strukturformel des Linker-verbrückten Aminoglykosids **1** in (*E*)- bzw. (*Z*)-Konfiguration mit Inversionszentrum bzw. Spiegelebene.

Allerdings sind diese beiden Protonen in **1** aufgrund der Symmetrie homotop und die Messung der Kopplung ist daher nicht direkt aus der Signalaufspaltung möglich, wie im nächsten Kapitel erläutert wird.

Ein zusätzliches Problem bei den weiteren Untersuchungen war, dass nur eine sehr geringe Substanzmenge zur Verfügung stand und somit die NMR-Probe nur eine sehr niedrige Konzentration aufwies.

## 6.2 Theorie und bisherige Lösungsversuche

Das  $^1\text{H}$ -1D-Spektrum (Abb. 48) zeigt zwei nah beieinander liegende Signale bei etwa 5,8 ppm für die vicinalen olefinischen Protonen der beiden Konfigurationen, so dass sich das Verhältnis leicht als etwa 70 : 30 bestimmen ließ. Allerdings war die Klärung, welches Signal welcher Konfiguration entspricht, mittels Bestimmung der  $^3J_{(\text{H,H})}$ -Kopplung nicht ohne weiteres möglich.

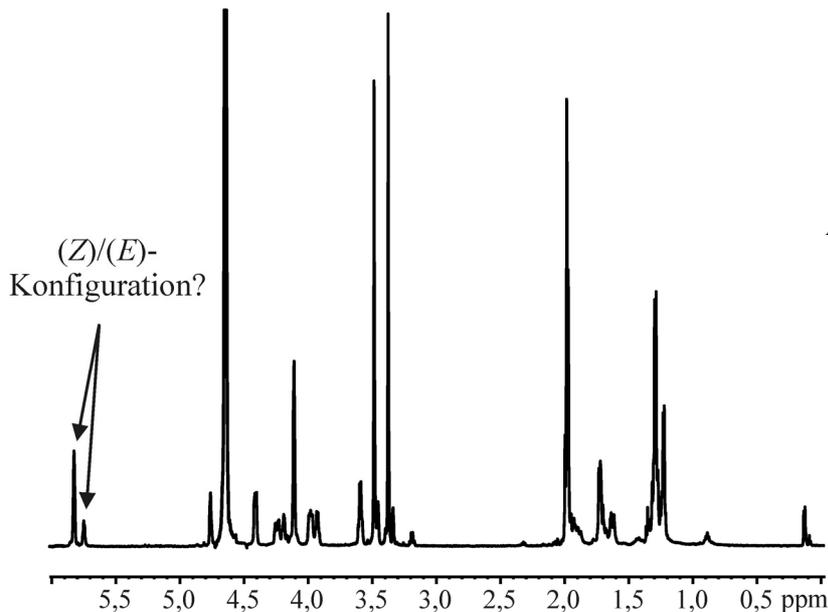


Abb. 48: 1D- $^1\text{H}$ -Spektrum von **1**. Die vicinalen, homotopen Protonen der Doppelbindung liegen in (E)- und (Z)-Konfiguration vor (siehe Markierung).

Koppeln zwei Kerne miteinander, erkennt man im Spektrum für beide Signale eine Dublett-Aufspaltung, deren Größe der Kopplung entspricht (Abb. 49). Für die vier resultierenden Signale ( $f_1$  bis  $f_4$ ) ergeben sich folgende Resonanzfrequenzen und Intensitäten:

Signal	Resonanzfrequenz	Intensität
$f_1$	$\frac{\nu_A}{2} + \frac{\nu_B}{2} + \frac{J}{2} + C$	$1 - \sin 2\theta$
$f_2$	$\frac{\nu_A}{2} + \frac{\nu_B}{2} - \frac{J}{2} + C$	$1 + \sin 2\theta$
$f_3$	$\frac{\nu_A}{2} + \frac{\nu_B}{2} + \frac{J}{2} - C$	$1 + \sin 2\theta$
$f_4$	$\frac{\nu_A}{2} + \frac{\nu_B}{2} - \frac{J}{2} - C$	$1 - \sin 2\theta$

Tabelle 8: Auflistung der zu erwartenden Frequenzen und Intensitäten im Fall zweier gekoppelter Protonen.

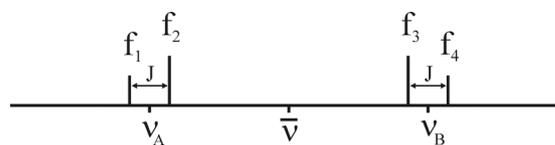


Abb. 49: Schematische Darstellung der zu erwartenden Frequenzen und Intensitäten im Fall zweier gekoppelter Protonen.

Dabei gilt:

$$C = \frac{1}{2} \sqrt{J^2 + (\nu_A - \nu_B)^2} \quad \text{sowie} \quad \sin 2\theta = \frac{J}{2C}.$$

Ist nun die Differenz der chemischen Verschiebung  $\Delta\nu = |\nu_A - \nu_B|$  sehr viel größer als die Kopplung  $J$ , also wenn  $\Delta\nu \gg J$ , befindet man sich im Grenzfall der schwachen Kopplung. Somit vereinfacht sich

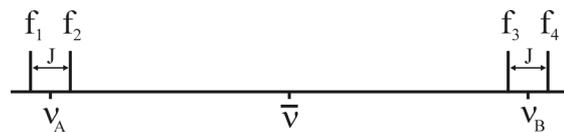
$$C = \frac{1}{2} \sqrt{J^2 + (\nu_A - \nu_B)^2} \quad \text{zu} \quad C = \frac{1}{2} \sqrt{(\nu_A - \nu_B)^2} = \frac{\nu_A}{2} - \frac{\nu_B}{2}$$

und  $\sin 2\theta = \frac{J}{2C}$  kann gleich 0 gesetzt werden.

Wird dies in die Gleichungen in Tab. 8 eingesetzt, ergeben sich folgende Resonanzfrequenzen und Intensitäten sowie das in Abb. 50 dargestellte schematische Spektrum.

Signal    Resonanzfrequenz    Intensität

$f_1$	$\frac{\nu_A}{2} + \frac{J}{2}$	1
$f_2$	$\frac{\nu_A}{2} - \frac{J}{2}$	1
$f_3$	$\frac{\nu_B}{2} + \frac{J}{2}$	1
$f_4$	$\frac{\nu_B}{2} - \frac{J}{2}$	1



Tab. 9: Auflistung der zu erwartenden Frequenzen und Intensitäten zweier Protonen im Grenzfall der schwachen Kopplung.

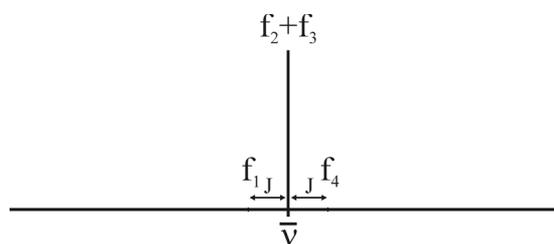
Abb. 50: Schematische Darstellung der zu erwartenden Frequenzen und Intensitäten zweier Protonen im Grenzfall der schwachen Kopplung.

Befindet man sich andererseits im Grenzfall der äquivalenten Kerne ( $\Delta\nu = 0$ ), ergibt sich

$$C = \frac{1}{2} \sqrt{J^2 + (0)^2} = \frac{J}{2} \quad \text{und} \quad \sin 2\theta = \frac{J}{2 \cdot \frac{J}{2}} = 1.$$

Dies wird erneut in die Formeln eingesetzt und führt mit  $\frac{\nu_A}{2} + \frac{\nu_B}{2} = \bar{\nu}$  zu folgendem Ergebnis:

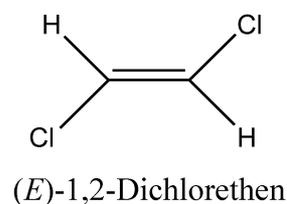
Signal	Resonanzfrequenz	Intensität
$f_1$	$\frac{\nu_A}{2} + \frac{\nu_B}{2} + J = \bar{\nu} + J$	0
$f_2$	$\frac{\nu_A}{2} + \frac{\nu_B}{2} = \bar{\nu}$	2
$f_3$	$\frac{\nu_A}{2} + \frac{\nu_B}{2} = \bar{\nu}$	2
$f_4$	$\frac{\nu_A}{2} + \frac{\nu_B}{2} - J = \bar{\nu} - J$	0



Tab. 10: Auflistung der zu erwartenden Frequenzen und Intensitäten zweier Protonen im Grenzfall der äquivalenten Kerne.

Abb. 51: Schematische Darstellung der zu erwartenden Frequenzen und Intensitäten zweier Protonen im Grenzfall der äquivalenten Kerne.

Im daraus resultierenden Spektrum (Abb. 51) lässt sich die Kopplung nicht mehr ablesen. Einen praktischen Vergleich zeigt Abb. 52a, in der das  $^1\text{H}$ -Signal einer Testprobe aus (*E*)-1,2-Dichlorethen gezeigt ist.<sup>45</sup>



Eine Lösung dieses Problems ist der Symmetriebruch dieses  $A_2$ -Systems in ein  $AA'X$ -System durch Ausnutzung des in etwa 1,1 % natürlicher Häufigkeit vorliegenden  $^{13}\text{C}$ -Kohlenstoffs. Im einfachsten Fall kann die  $^3J_{(\text{H,H})}$ -Kopplung also direkt aus den  $^{13}\text{C}$ -Satelliten des Signals abgelesen werden, wie in Abb. 52b gut zu erkennen ist.

Allerdings sind diese Signale nur sehr schwach, daher befassten sich die ersten Ansätze zur Bestimmung der Kopplung äquivalenter Protonen auch mit Experimenten an  $^{13}\text{C}$ -markierten Proben [132, 133]. Allerdings ist es nicht immer möglich,  $^{13}\text{C}$ -markierte Proben herzustellen bzw. selbst bei solchen Proben kann es dennoch oft zu Überlagerungen mit anderen Signalen kommen. Daher wurden weitere, meist zweidimensionale, Experimente entwickelt [134–140], deren Großteil  $^{13}\text{C}$ -detektiert [134–137] ist, um das zwei Größenordnungen stärkere Signal der  $^{13}\text{C}$ -gebundenen Protonen zu unterdrücken. Diese Detektion führt aber zu einer geringen Empfindlichkeit, da zum einen die heute gebräuchlichen invers detektierenden Probenköpfe hauptsächlich für die  $^1\text{H}$ -Detektion ausgelegt sind. Zum anderen hängt die Empfindlichkeit entscheidend von den gyromagnetischen Verhältnissen der angeregten und detektierten Kerne ab. So kann man durch  $^1\text{H}$ -Detektion den Faktor

$$\left(\gamma_{^1\text{H}}/\gamma_{^{13}\text{C}}\right)^2 \approx 8$$

<sup>45</sup> Diese Testprobe war in DMSO- $d_6$  gelöst und wies eine Konzentration von etwa 15 % auf. Sie wurde auch für die weiteren Untersuchungen verwendet.

an Empfindlichkeit gewinnen, wodurch bei gleichem Signal-zu-Rausch-Verhältnis die Dauer des Experiments um den Faktor 64 verkürzt werden kann.

Aber diese beiden Arten von Experimenten leiden dennoch an einem weiteren, sehr häufig auftretendem Problem, nämlich der Kopplung zu weiteren Protonen, die zu sehr komplizierten und dadurch nicht mehr zu analysierenden Aufspaltungsmustern führt. Dies ist z.B. auch in **1** gegeben, denn die vicinalen olefinischen Protonen zeigen auch noch zusätzliche  $^3J$ -Kopplungen zu benachbarten Methylenprotonen (siehe Abb. A50).

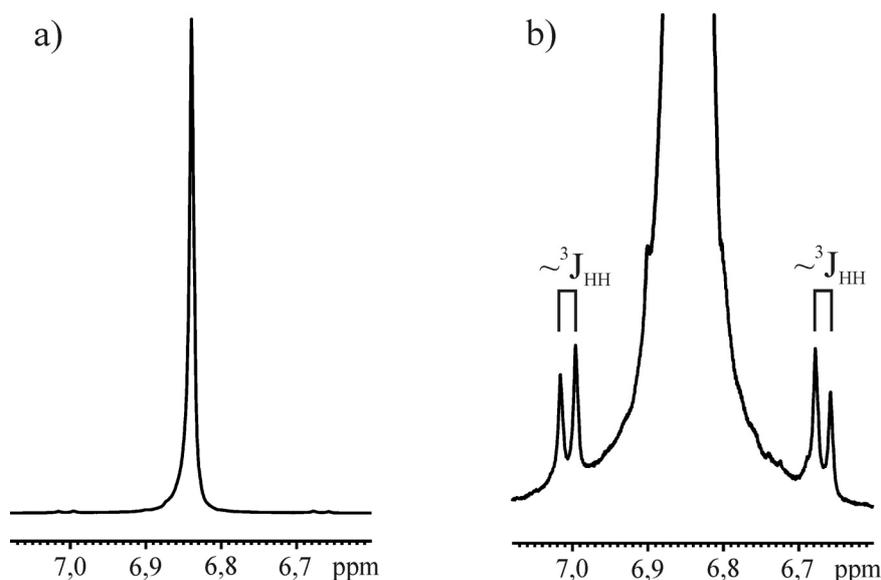


Abb. 52: a) zeigt einen Ausschnitt aus dem nicht  $^{13}\text{C}$ -entkoppelten  $^1\text{H}$ -1D-Spektrum von (*E*)-1,2-Dichlorethen. In b) ist der gleiche Ausschnitt in etwa 100-facher Vergrößerung dargestellt.

Dennoch wurden zwei dieser Sequenzen [135, 137] sowohl für 1,2-Dichlorethen als auch für **1** getestet. Bei der Testsubstanz ergaben sich die erwarteten 12,5Hz als Kopplung. Für **1** konnte kein auswertbares Signal detektiert werden, da die Probe zu schwach konzentriert war.<sup>46</sup>

Daher sollte eine neuere und effizientere Pulssequenz entwickelt werden.

<sup>46</sup> So war z.B. im  $^{13}\text{C}$ -Spektrum auch nach 1024 Experimenten auf einem Bruker DMX 600 MHz-Spektrometer mit einem HCN-TXI-Probenkopf nur das stärkere Signal gerade noch sichtbar.

### 6.3 Erste Iteration: Die BIRD-BIRD-Variante

Der Hauptunterschied dieses und der folgenden Experimente zu allen bisher veröffentlichten und oben erwähnten Pulssequenzen ist die Verwendung einer selektiv wirksamen *isotropen* J-Evolution. Denn bei einem Zwei-Spinsystem im Zustand  $I_{1x} - I_{2x}$  entwickelt sich die Magnetisierung des ersten Spins unter isotropen Mischbedingungen [117] mit der doppelten Frequenz [119], verglichen mit der Oszillation bei freier Evolution unter schwacher, skalarer Kopplung:

$$\langle I_{1x} \rangle^{iso} = \cos 2\pi J t_1 \quad \langle I_{1x} \rangle^{schwach} = \cos \pi J t_1$$

Weiterhin hat das isotrope Mischen den Vorteil, dass sich auch der Zustand  $I_{1z} - I_{2z}$  entwickelt, während dies bei skalarer Kopplung nicht der Fall ist. Dadurch kann die Magnetisierung während der Evolutionszeit longitudinal orientiert sein und erfährt damit auch keine Entwicklung aufgrund chemischer Verschiebung.

Damit kann im resultierenden Spektrum die doppelte Kopplung abgelesen werden bzw. bei gleicher relativer Auflösung wird nur die halbe Evolutionszeit benötigt, wodurch bei großen Molekülen aufgrund der stärkeren Relaxation bessere Ergebnisse im Vergleich zu konventionellen Methoden möglich sind.

Die Pulssequenz dieses ersten Experiments ist in Abb. 53 dargestellt. Mittels eines BIRD-Elements [141] werden  $^{13}\text{C}$ -gebundene Protonen selektiv invertiert, um den gewünschten Zustand  $I_{1z} - I_{2z}$  zu erreichen. Dies geschieht allerdings nur bei den für dieses Experiment interessanten etwa 2,2 % der Moleküle, bei denen einer der beiden Kohlenstoffe der Doppelbindung ein  $^{13}\text{C}$ -Kohlenstoff ist ( $^{13}\text{C}=\text{C}$  und  $\text{C}=\text{C}^{13}$ ). Bei den ca. 97,8 % der Moleküle, die nur  $^{12}\text{C}$  in der Doppelbindung enthalten ( $^{12}\text{C}=\text{C}$ ) tritt keine Veränderung ein (d.h.  $I_{1z} + I_{2z}$ ), während für die etwa 0,012 % der Moleküle, bei denen beide Doppelbindungspositionen von  $^{13}\text{C}$  eingenommen werden ( $^{13}\text{C}=\text{C}$ ), beide  $^1\text{H}$ -Spins invertiert werden (entspricht  $-I_{1z} - I_{2z}$ ).

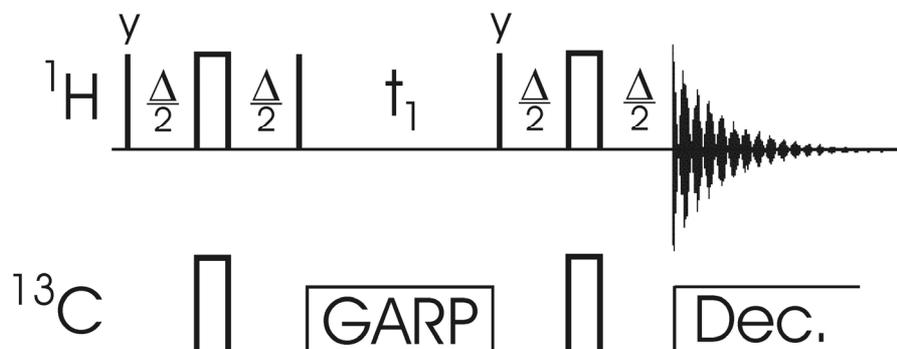


Abb. 53: Schematische Darstellung der BIRD-BIRD-Variante der Pulssequenz. Dabei entspricht  $\Delta = ({}^1J_{\text{C,H}})^{-1}$ . (Die Nomenklatur der Pulssequenzen ist in Abb. 19 dargestellt.)

Nun werden die Kohlenstoffe mittels einer während  $t_1$  auf dem  $^{13}\text{C}$ -Kanal eingestrahlenen GARP-Sequenz entkoppelt, wodurch für die vicinalen olefinischen Protonen wieder das  $A_2$ -Spinsystem und somit die isotrope Mischbedingung gegeben ist. Die Magnetisierung entwickelt sich nun bei den interessanten 2,2 % der Moleküle gemäß obiger Gleichung abhängig von  $t_1$ .<sup>47</sup> Da aber die Summe dieser Magnetisierung gleich null ist, muss anschließend ihr  $^{13}\text{C}$ -gebundener Anteil mittels einer weiteren BIRD-Sequenz erneut invertiert werden. Es folgt die Detektion auf dem  $^1\text{H}$ -Kanal bei gleichzeitiger  $^{13}\text{C}$ -Breitband-Entkopplung (Dec.).

Das für die vicinalen Protonen erwartete Spektrum nach entsprechender Prozessierung ist in Abb. 54 schematisch dargestellt. Man sieht ein großes Zentralsignal, das den etwa 97,8 % + 0,012 % der Moleküle entspricht, deren Doppelbindungs-Kohlenstoffe identisch sind. Weiterhin, mit einer Aufspaltung von  $2 \cdot {}^3J_{(\text{H,H})}$ , sind die Signale der restlichen 2,2 % der Moleküle zu erkennen. Obwohl während  $t_1$  nicht  $^1\text{H}$ -entkoppelt wird, zeigen die Signale in F1 keine Aufspaltung entsprechend den aktiven Protonenkopplungen, da sämtliche Magnetisierung während  $t_1$  longitudinal ist.

Dieses Experiment zeigte aber weder für die Probe **1** noch für die Testsubstanz auswertbare Ergebnisse. Mögliche Gründe könnten das nicht unterdrückte, sehr intensive Zentralsignal sowie die eventuell nicht vollständig erfüllte Hartmann-Hahn-Bedingung sein. Denn nur bei identischen chemischen Verschiebungen ist diese Bedingung gegeben und somit der TOCSY-Transfer optimal. Allerdings könnte in den „ $^{12}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$ “-Molekülen eventuell eine Isotopenverschiebung auftreten, wodurch der Transfer ineffizienter würde.

Es war also eine Verbesserung nötig.

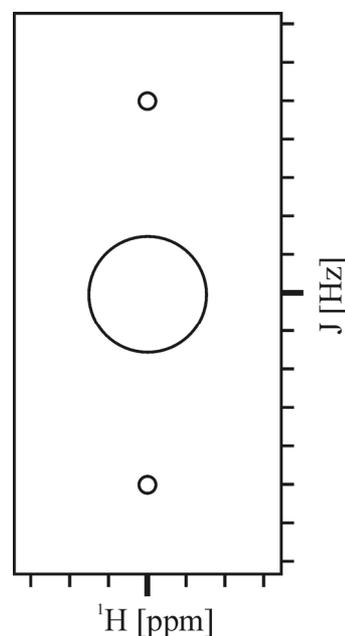


Abb. 54: Schematische Darstellung des Spektrums, das man bei Anwendung der in Abb. 53 gezeigten Pulssequenz erwartet.

<sup>47</sup> Die Magnetisierung der anderen Moleküle entwickelt sich nicht, da der Zustand  $I_{1z} + I_{2z}$  bzw.  $-I_{1z} - I_{2z}$  unter isotropen Mischbedingungen invariant ist.

## 6.4 Zweite Iteration: Die BIRD-INEPT-Variante

In die zweite Version (Abb. 55) der Pulssequenz wurde eine Unterdrückung der Signale der  $^{12}\text{C}$ -gebundenen Wasserstoffe durch  $^{13}\text{C}$ -Detektion durchgeführt, obwohl das Experiment dadurch deutlich an Empfindlichkeit verliert. Allerdings lassen sich aufgrund der klareren Spektren bessere Ergebnisse erwarten. Erreicht wird dies durch einen Transfer der Kohärenzen auf die Kohlenstoffe mittels eines refokussierten INEPT-Schritts [123, 142] im Anschluss an  $t_1$ . Damit wird die Magnetisierung der 97,8 % „ $^{12}\text{C}=^{12}\text{C}$ “-Moleküle nicht detektiert, allerdings verliert man dabei auch die Hälfte der erwünschten Magnetisierung, da sich diese auf einem  $^{12}\text{C}$ -gebundenen Proton befindet. Weiterhin bleibt die Magnetisierung der 0,012 % „ $^{13}\text{C}=^{13}\text{C}$ “-Moleküle als vernachlässigbares und nicht moduliertes Zentralsignal. Während der Akquisition wurde auf dem  $^1\text{H}$ -Kanal breitbandig entkoppelt, um eine Aufspaltung in der F2-Dimension zu vermeiden. Das erwartete Spektrum ist in Abb. 56 gezeigt, das für die Testsubstanz gemessene zeigt Abb. 57. Man sieht eine gute Übereinstimmung, insbesondere konnte die doppelte Kopplung ( $2 \cdot {}^3J_{(\text{H,H})} \approx 24 \text{ Hz}$ ) als Aufspaltung gemessen werden. Allerdings zeigt das gemessene Spektrum einen nicht korrigierbaren Phasenfehler. Weiterhin war dieses Spektrum auch zu unempfindlich für die Messung der Probe 1, die wie oben geschildert nur in sehr niedriger Konzentration vorlag. Daher musste eine neue Variante entwickelt werden, die sich zum einen durch eine höhere Empfindlichkeit bevorzugt durch Detektion auf dem  $^1\text{H}$ -Kanal und zum anderen durch eine gute Unterdrückung unerwünschter Signale und Kopplungen auszeichnete.

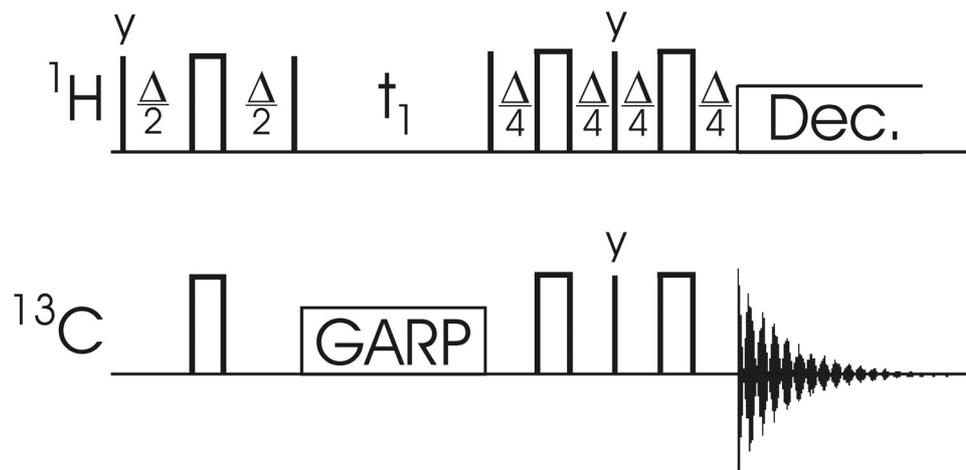


Abb. 55: Schematische Darstellung der BIRD-INEPT-Variante der Pulssequenz.

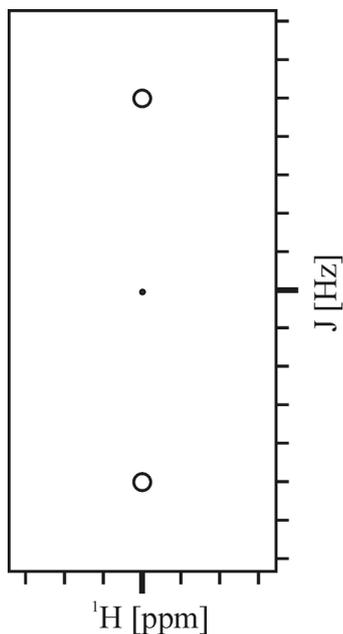


Abb. 56: Schematische Darstellung des Spektroms, das man bei Anwendung der in Abb. 55 gezeigten Pulssequenz erwartet.

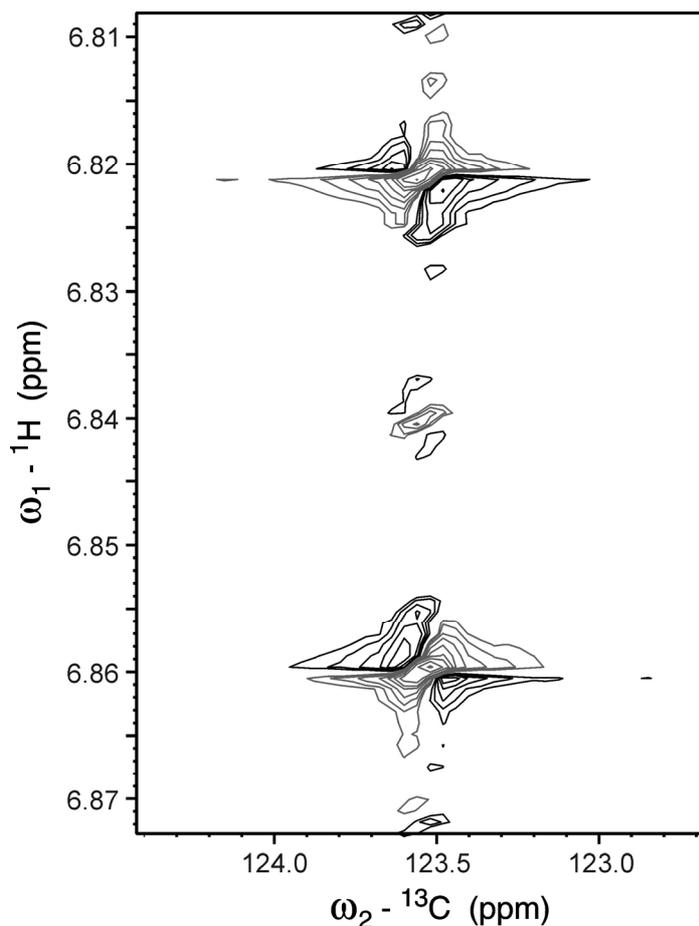


Abb. 57: Gemessenes Spektrum von (*E*)-1,2-Dichlorethen bei Anwendung der in Abb. 55 gezeigten Pulssequenz.

## 6.5 Dritte Iteration und Lösung: Die neue Pulssequenz

Diese eben genannten Anforderungen konnten durch zwei entscheidende Veränderungen erreicht werden. Die erste war der Ersatz der  $^{13}\text{C}$ -Entkopplung, mit dem bisher die isotropen Mischbedingung während  $t_1$  erreicht wurde. Stattdessen wurde nun eine selektive TOCSY-Multipulssequenz<sup>48</sup> eingestrahlt, deren Transferbandbreite lediglich die beiden gewünschten Protonensignale umfasst. Dadurch wird die alleinige Evolution der  $^3J_{(\text{H,H})}$ -Kopplung der vicinalen Protonen erreicht und gleichzeitig werden sowohl weitere Protonen als auch alle  $^{13}\text{C}$ -Kerne entkoppelt. Dies ist bei den chemisch äquivalenten Protonen besonders einfach, da sich ihre chemische Verschiebung nicht oder nur marginal unterscheidet.

<sup>48</sup> Bei den Messungen wurde ein MLEV-16-expandierter  $180^\circ$ -Puls mit einer Einstrahlleistung von 500 Hz, entsprechend einem  $180^\circ$ -Puls von 1 ms Dauer, dessen Transferprofil eine effektive Bandbreite von ca. 360 Hz aufweist.

Die zweite Änderung war eine Detektion auf dem  $^1\text{H}$ -Kanal (mit  $^{13}\text{C}$ -Entkopplung), die durch eine neue Variante zur Unterdrückung des unerwünschten Zentralsignals der  $^{12}\text{C}$ -gebundenen Protonen möglich wurde. Dazu wurde eine Abwandlung einer zur Wasserunterdrückung entwickelten Pulssequenz verwandt [7]. Mittels eines refokussierten INEPT-Schritts wird die Magnetisierung der an  $^{13}\text{C}$ -gebundenen Protonen auf Kohlenstoff übertragen und entlang der z-Achse gespeichert. Nun wird die verbleibende  $^1\text{H}$ -Magnetisierung, sowie eventuell vorhandene nicht longitudinale  $^{13}\text{C}$ -Magnetisierung, durch die Kombination eines  $^1\text{H}$ -Spinlock-Pulses und eines Gradienten vollständig dephasiert. Anschließend wird die Magnetisierung durch einen weiteren refokussierten INEPT-Schritt zur empfindlicheren Akquisition wieder auf die Protonen transferiert.

Die daraus resultierende Pulssequenz [143] ist in Abb. 58 und das erwartete Spektrum schematisch in Abb. 59 gezeigt.<sup>49</sup> Die beiden Signale dürften außer der erwünschten keine weitere Aufspaltung zeigen und ihre Intensität müsste durch die  $^1\text{H}$ -Detektion vervielfacht sein.<sup>50</sup>

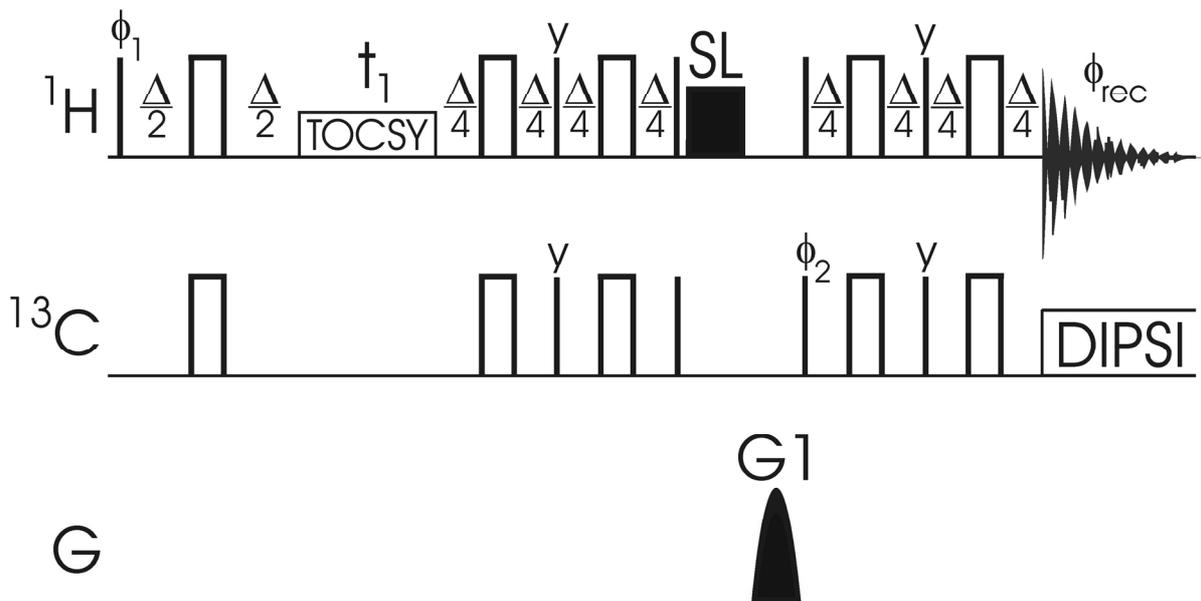


Abb. 58: Schematische Darstellung der neuen Pulssequenz. Die verwendeten Parameter sind dem Anhang 7.3 zu entnehmen.

<sup>49</sup> Ferner ist das Pulsprogramm sowie wichtige Parameter der Messung im Anhang in aufgeführt (7.2 und 7.2.1).

<sup>50</sup> Auch bei diesem Experiment bleibt die Magnetisierung der 0,012 % „ $^{13}\text{C}=^{13}\text{C}$ “-Moleküle als vernachlässigbares nicht moduliertes Zentralsignal erhalten.

Das Experiment wurde mit der Probe **1** durchgeführt und dauerte etwa 40 min. Da die Resonanzfrequenzen der vicinalen Protonen in beiden Konfigurationen nahe beieinander liegen ( $\Delta\nu \approx 48$  Hz), werden beide gleichzeitig von der selektiven TOCSY-Sequenz erfasst, so dass nur ein Experiment nötig ist. Aus dem dabei gemessenen Spektrum (Abb. 60) lässt sich die der zweifachen  ${}^3J_{(H,H)}$ -Kopplung entsprechende Aufspaltung für beide Konfigurationen leicht ablesen. Dem linken, intensiveren Signal entspricht dabei eine Kopplung von  ${}^3J_{(H,H)} = 15,2$  Hz und dem rechten eine Kopplung von  ${}^3J_{(H,H)} = 11,1$  Hz. Mit den in Kapitel 6.1 genannten Literaturwerten ergibt sich somit für Probe **1** ein Verhältnis von 30 % (*Z*)- und 70 % (*E*)-Konfiguration.

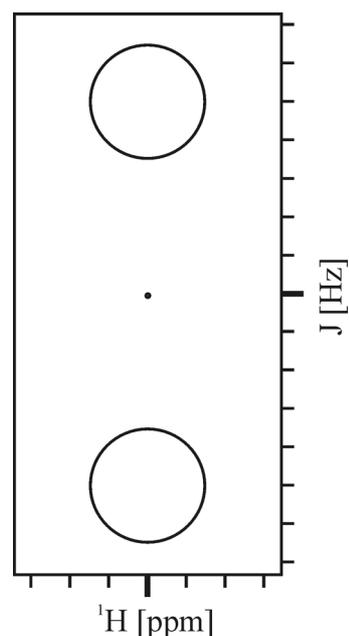


Abb. 59: Schematische Darstellung des Spektrums, das man bei Anwendung der in Abb. 58 gezeigten Pulssequenz erwartet.

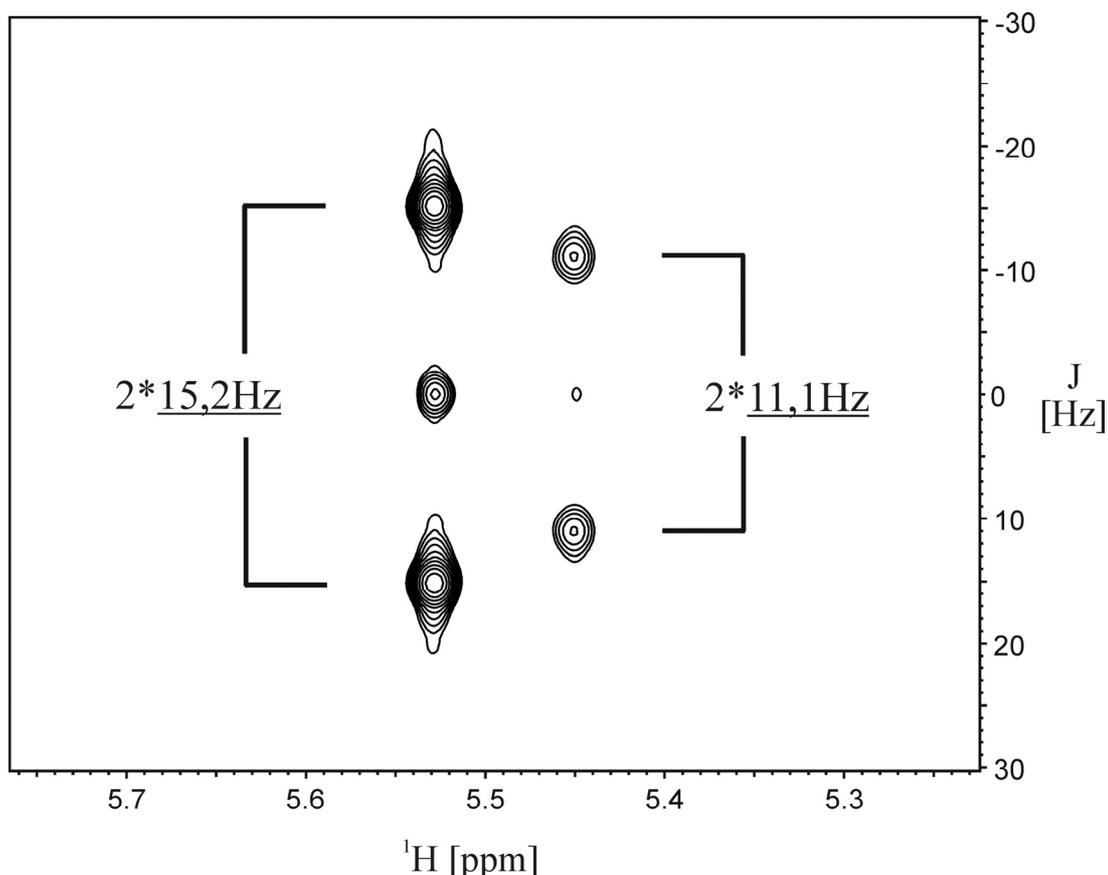


Abb. 60: Gemessenes Spektrum von **1** bei Anwendung der in Abb. 58 gezeigten Pulssequenz. Das linke Signal entspricht aufgrund seiner  ${}^3J_{(H,H)}$ -Kopplung von 15,2 Hz der (*E*)-Konfiguration. Die (*Z*)-Konfiguration ( ${}^3J_{(H,H)} = 11,1$  Hz) entspricht dem rechten Signal.

## 6.5.1 Varianten der neuen Pulssequenz

Die in Kap. 6.5 vorgestellte Pulssequenz konnte bereits die Problemstellung effizient lösen und stellt das vorläufige Ergebnis dieses Projekts dar. Dennoch wurden für sehr stark überlagerte Proben noch zwei selektivere Varianten entwickelt, die allerdings einen größeren experimentellen Aufwand erfordern und nur in Spezialfällen benötigt werden.

### 6.5.1.1 Verbesserte Selektivität durch eine zusätzliche $^{13}\text{C}$ -Dimension

Sollte das zu untersuchende Signal der vicinalen Protonen der Doppelbindung in der  $^1\text{H}$ -Dimension überlagert sein, ist es möglich, durch Einführung einer zusätzlichen  $^{13}\text{C}$ -Dimension diese Überlagerung aufzuheben. Dies kann durch das Einfügen einer  $t_2$ -Zeit, in der sich die chemische Verschiebung der Kohlenstoffe entwickelt, erreicht werden. Dadurch entsteht das in Abb. 61 dargestellte 3D-Experiment.

Zur Überprüfung wurde Probe **1** mit diesem Experiment vermessen. Nach der Prozessierung wurden die 2D-Ebenen mit den chemischen Verschiebungen, die den Werten der Doppelbindungs-Kohlenstoffe der (*E*)- und der (*Z*)-Konfiguration entsprechen, ausgelesen und in Abb. 62 dargestellt. Das linke Spektrum zeigt nur die erwarteten Signale der (*E*)-Konfiguration, das rechte nur die der (*Z*)-Konfiguration.

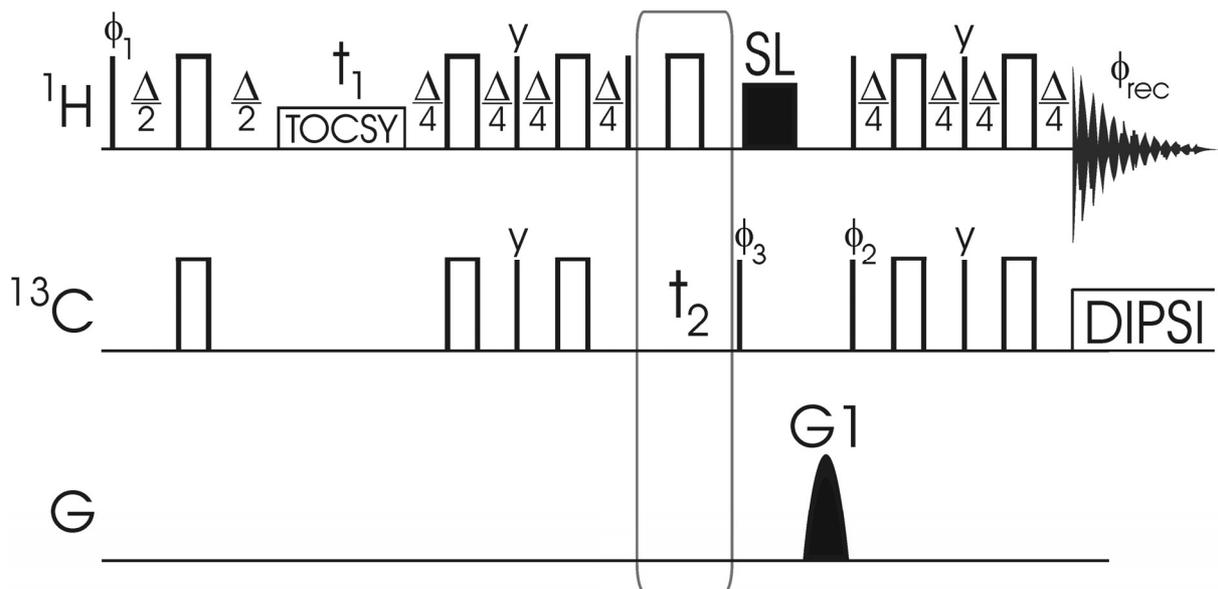


Abb. 61: Schematische Darstellung einer Variante der in Kapitel 6.5 beschriebenen neuen Pulssequenz. Sie weist eine verbesserte Selektivität durch die Erweiterung um eine zusätzliche  $^{13}\text{C}$ -Dimension auf.

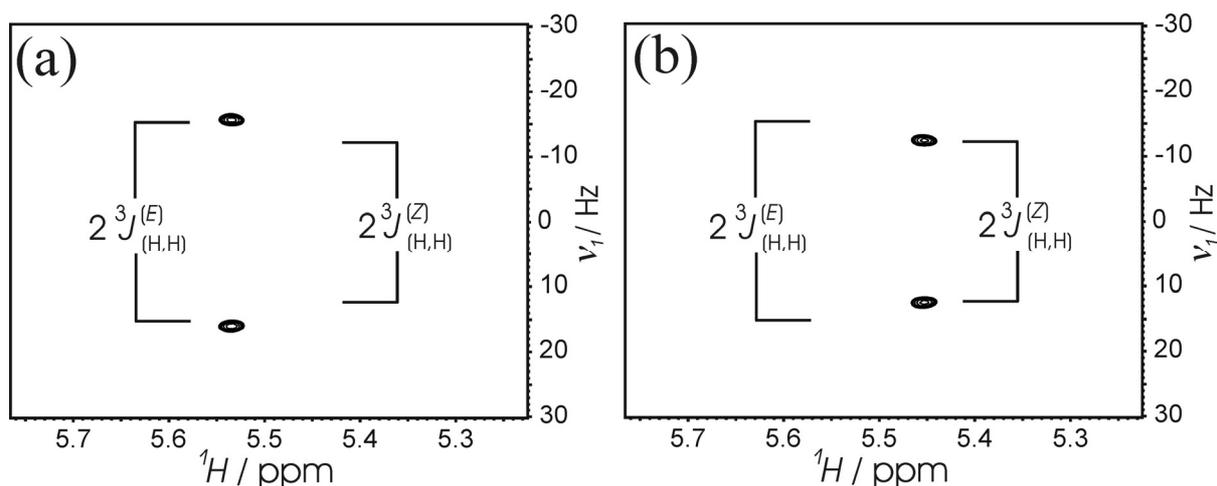


Abb. 62: 2D-Ebenen aus dem von **1** gemessenen Spektrum unter Verwendung der in Abb. 61 gezeigten Pulssequenz. a) **1** in (E)-Konfiguration, b) **1** in (Z)-Konfiguration.

Dies zeigt, dass diese Pulssequenz im Vergleich zu der in Kap. 6.5 beschriebenen selektiver ist, allerdings auf Kosten einer erhöhten Messzeit. Dieser Nachteil kann mit der im Folgenden beschriebenen Pulssequenz aber vermieden werden.

### 6.5.1.2 Verbesserte Selektivität durch doppel-selektive

#### CW-Kreuzpolarisation

Eine weitere Möglichkeit zur Erhöhung der Selektivität bei Signalüberlagerungen ist die Verwendung von doppel-selektiver CW-Kreuzpolarisation [144, 145] zum Transfer der  $^1\text{H}$ -Magnetisierung auf Kohlenstoff und zurück. Dies wurde erst an einer 1D-Version getestet, bevor dieser hochselektive Transfer in das in Abb. 58 dargestellte 2D-Experiment implementiert wurde.

#### 6.5.1.2.1 1D-Version

In diesem Experiment (Abb. 63) wird die CW-Sequenz zuerst dazu genutzt, um nach Anregung mit einem  $90^\circ$ - $^1\text{H}$ -Puls nur die gewünschte Magnetisierung der  $^{13}\text{C}$ -gebundenen Protonen auf die Kohlenstoffe zu übertragen. Diese wird nun mit einem  $90^\circ$ - $^{13}\text{C}$ -Puls entlang der z-Achse orientiert, wodurch sie nicht von dem nun folgenden Spinlock-Gradienten-Block betroffen wird, der sämtliche unerwünschte Magnetisierung eliminiert. Durch einen weiteren  $90^\circ$ - $^{13}\text{C}$ -Puls wird die verbleibende Magnetisierung wieder in die Transversale übertragen und durch eine erneute Applikation der CW-Sequenz zur empfindlicheren Detektion auf die Protonen übertragen. Allerdings müssen sowohl die  $^1\text{H}$ - als auch die  $^{13}\text{C}$ -Senderfrequenzen auf

die Resonanzfrequenzen der vicinalen olefinischen Protonen und der direkt gebundenen Kohlenstoffe eingestellt werden, damit dieses Experiment erfolgreich ist.

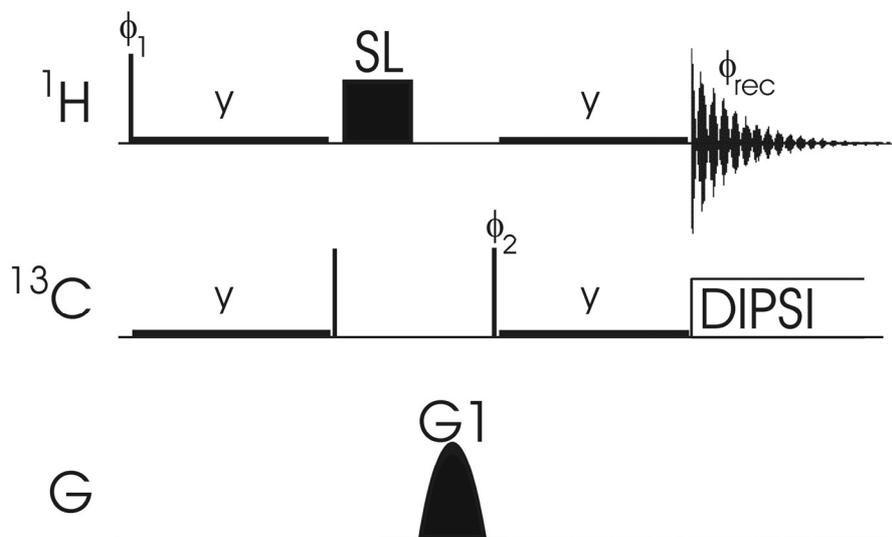


Abb. 63: Schematische Darstellung der Pulssequenz des in Kap. 6.5.1.2.1 beschriebenen Experiments zur selektiven Detektion der  $^{13}\text{C}$ -Satelliten unter Verwendung von doppel-selektiver CW-Kreuzpolarisation

Im Spektrum sollten somit *nur* die  $^{13}\text{C}$ -Satelliten des Signals der Protonen der Doppelbindung zu sehen sein, die neben der erwünschten  $^3J_{(\text{H,H})}$ -Kopplung auch alle weiteren homonuklearen Kopplungen zeigen. Alle anderen Signale sollten unterdrückt sein.

Dies wurde mit der Messung der Probe **1** überprüft, wobei die Senderfrequenzen auf die Werte der (*E*)-Konfiguration eingestellt wurden. Dabei konnte das in Abb. 64 dargestellte Spektrum erhalten werden, in dem nur das erwartete Signal zu sehen ist. Weiterhin konnte die gesuchte  $^3J_{(\text{H,H})}$ -Kopplung trotz der weiteren Kopplungen in den Satelliten vermessen werden. Das nicht weiter störende Zentralsignal resultiert aus dem homonuklearen TOCSY-Transfer, der während der zweiten CW-Sequenz auftritt.<sup>51</sup>

<sup>51</sup> Dieser unerwünschte TOCSY-Transfer erfolgt auch während der ersten CW-Sequenz, allerdings wird die dabei übertragene Magnetisierung durch den folgenden Spinlock-Gradienten-Schritt dephasiert.

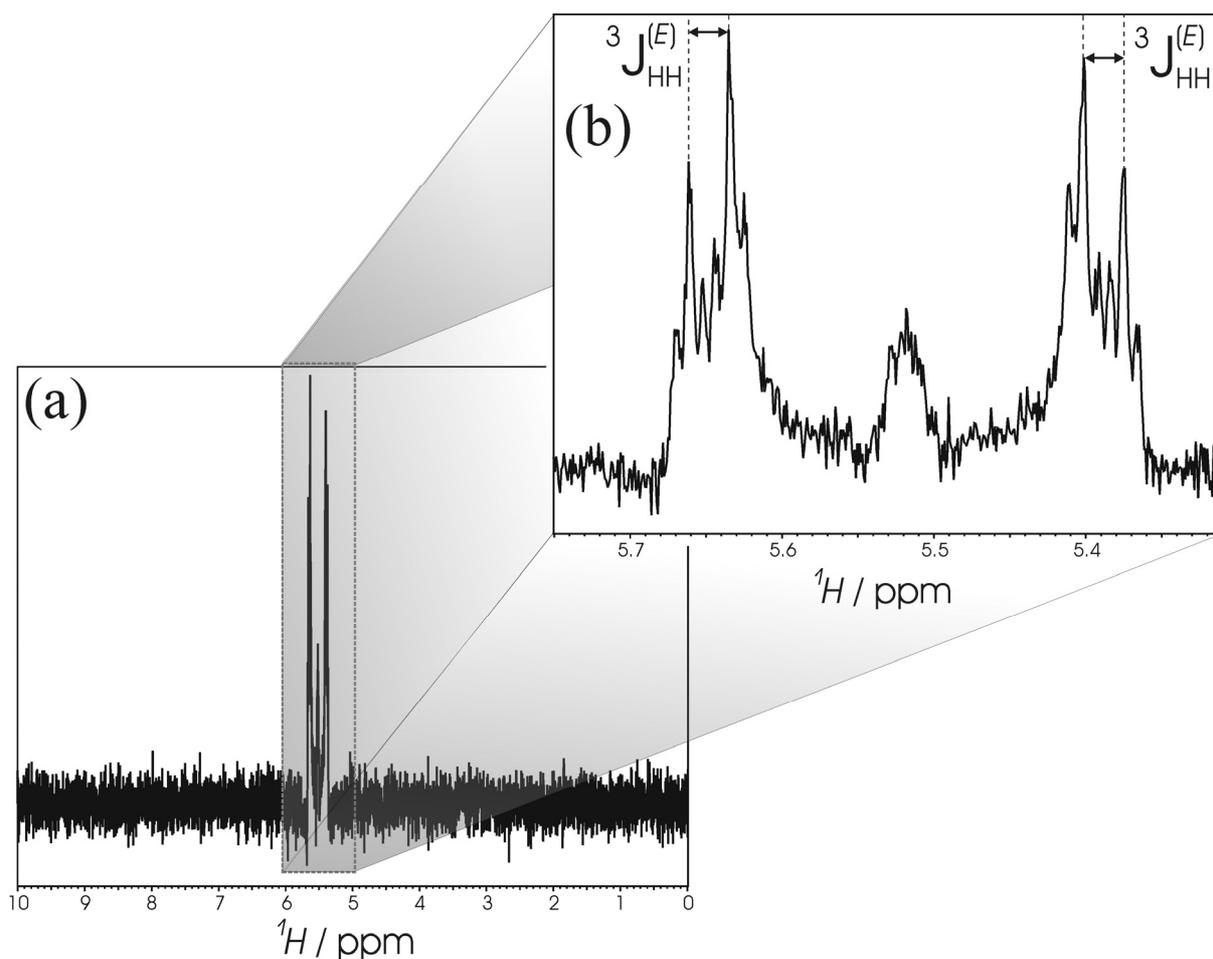


Abb. 64: 1D- $^{13}\text{C}$ -Spektrum von **1**, das mit der in Abb. 63 gezeigten Pulssequenz aufgenommen wurde.

### 6.5.1.2.2 2D-Version

Die doppel-selektive CW-Kreuzpolarisation kann aber auch anstelle der refokussierten INEPT-Schritte zum selektiven Transfer zwischen  $^1\text{H}$  und  $^{13}\text{C}$  in der Standardpulssequenz genutzt werden. Dies führt zu dem in Abb. 65 dargestellten Experiment.

Auch bei der Applikation dieses Experiments müssen die Senderfrequenzen auf die entsprechenden Resonanzfrequenzen eingestellt werden, allerdings werden dabei sehr saubere und leicht zu interpretierende Spektren erhalten. Dieses Experiment wurde zweimal mit Probe **1** durchgeführt, wobei die Senderfrequenzen einmal für die (*E*)- und einmal für die (*Z*)-Konfiguration optimiert waren. Die beiden resultierenden Spektren sind in Abb. 66 wiedergegeben. Es sind jeweils nur die erwünschten Signale ohne Zentralsignal und zusätzliche Kopplungen zu sehen. Die Messzeit dieses sehr selektiven Experiments ist im Vergleich zu dem in Kapitel 6.5 beschriebenen nicht erhöht, allerdings ist die praktische Implementierung anspruchsvoller als die der in Kap. 6.5.1.1 beschriebenen Variante.

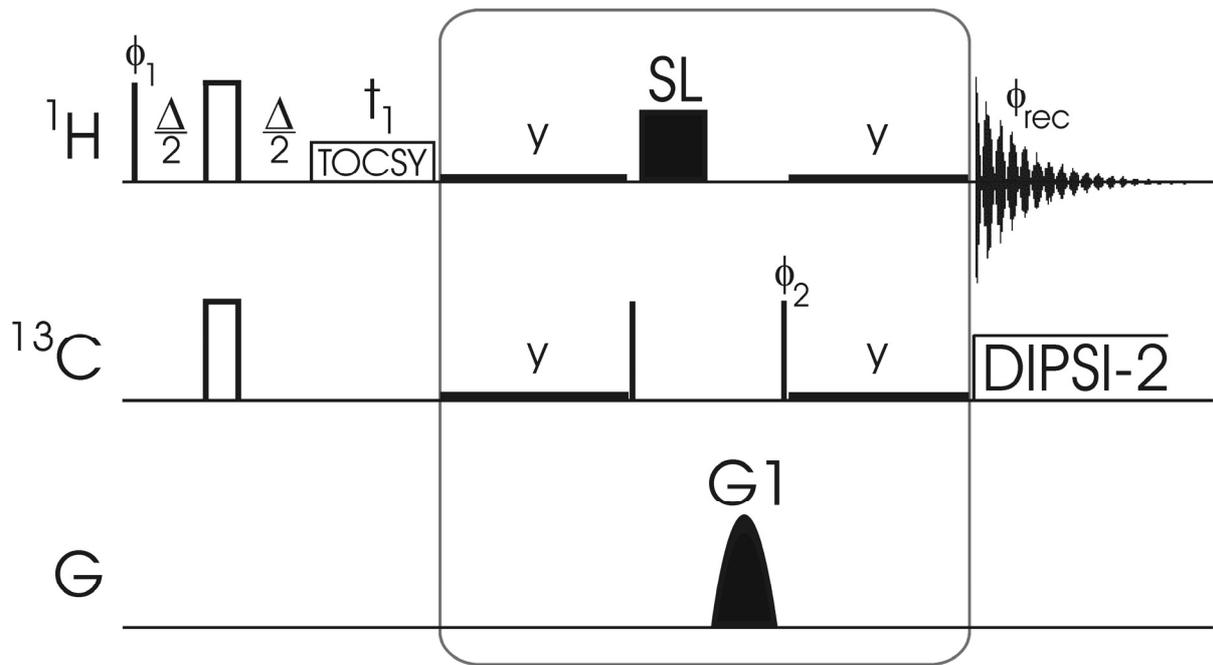


Abb. 65: Schematische Darstellung einer Variante der in Kap. 6.5 beschriebenen neuen Pulssequenz, bei der doppel-selektive CW-Kreuzpolarisation zum selektiven Transfer zwischen  $^1\text{H}$  und  $^{13}\text{C}$  genutzt wird.

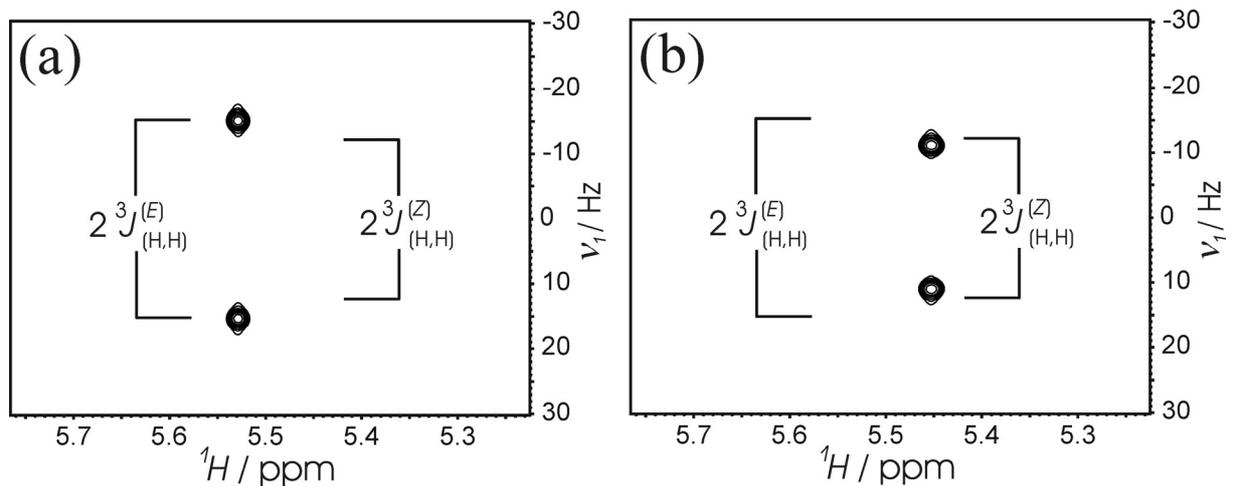


Abb. 66: Gemessene Spektren von **1** bei Verwendung der in Abb. 65 gezeigten Pulssequenz mit für die (*E*)-Konfiguration (a) bzw. (*Z*)-Konfiguration (b) optimierten Senderfrequenzen.

## 7 Anhang

### 7.1 Zusammenfassung

Es folgen die Zusammenfassungen der beiden in dieser Arbeit besprochenen Projekte.

#### 7.1.1 NMR-spektroskopische Untersuchungen an Avilamycin A

Im Rahmen dieser Arbeit konnte die bisher nur sehr unvollständige NMR-Zuordnung des von *Streptomyces viridochromogenes* Tü57 produzierten Avilamycin A, einem Antibiotikum mit einem neuen Wirkmechanismus, nahezu vervollständigt werden. Diese Zuordnung war durch teilweise merkliche Überlagerungen und der Tatsache, dass die Proben nicht rein, sondern als Produktgemische vorlagen, merklich erschwert.

In der Gruppe von Prof. Dr. A. Bechthold (Freiburg) wurden Mutanten erstellt, in denen gezielt Gene inaktiviert waren. Deren als Gavibamycine bezeichneten Produkte wurden NMR-spektroskopisch untersucht, um die strukturellen Veränderungen im Molekül und somit die Funktion des vom inaktivierten Gen codierten Enzyms zu identifizieren. Dies konnte bei allen sechs im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Proben erfolgreich durchgeführt werden. Dadurch konnte ein Gen in seiner Funktion bestätigt und drei weitere neu identifiziert werden. Ferner konnten für zwei weitere Gene bzw. die von ihnen codierten Enzyme der Reaktions-schritt identifiziert werden, an dem sie beteiligt sind.

Weiterhin konnten in drei Avilamycin A-Proben, bei deren Herstellung bestimmte <sup>13</sup>C-markierte Edukte zugefüttert wurden, die markierten Positionen trotz eines niedrigen Markierungsgrads von etwa 5-10 % annähernd vollständig identifiziert werden. Dadurch wurden neue Erkenntnisse bezüglich des Avilamycin-Biosynthesewegs gewonnen.

Im Zuge dieser Untersuchungen konnten auch die Avilamycine B und C sowie ein Teil der neuen Gavibamycine vollständig zugeordnet werden. Weiterhin konnte die teilweise Öffnung einer Orthoesterbindung in diesen Molekülen nachgewiesen, die veränderte Struktur im Spektrum zugeordnet und ein wahrscheinlicher Mechanismus aufgezeigt werden.

Es steht nun ein effizientes und schon erfolgreich getestetes Werkzeug zur Untersuchung weiterer geplanter Produkte neuer Mutationen und <sup>13</sup>C-Fütterungen zur Verfügung.

### 7.1.2 Entwicklung einer neuen Pulssequenz

Es wurde die Entwicklung einer neuen Pulssequenz zur Bestimmung der Konfiguration chemisch äquivalenter vicinaler Protonen mithilfe der NMR-Spektroskopie beschrieben. Deren Ergebnis ist ein leicht zu implementierendes 2D-Experiment, das sich durch ein hohes Signal-zu-Rausch-Verhältnis aufgrund von  $^1\text{H}$ -Detektion auszeichnet. Die Spektren sind leicht zu interpretieren, da alle unerwünschten Kopplungen eliminiert werden. Weiterhin zeigen die Signale durch die Verwendung des Transfers unter selektiven isotropen Mischbedingungen die doppelte skalare Kopplung als Aufspaltung, wodurch man entweder die Auflösung verdoppeln oder die Evolutionszeiten halbieren kann. Letzteres ist insbesondere für die Untersuchung großer Moleküle mit kurzen Relaxationszeiten von Interesse. Weiterhin wurden zwei Varianten dieser Sequenz entwickelt, die durch Nutzung einer zusätzlichen  $^{13}\text{C}$ -Dimension bzw. von doppel-selektiver CW-Kreuzpolarisation die Selektivität der vorgestellten Sequenz im Falle von Signalüberlagerungen deutlich erhöhen können.

## 7.2 Pulsprogramm der verwendeten Variante des $^{13}\text{C}$ -gefilterten NOESY

```
;geha13Cnoesytp                ;geha 18.03.2002
;avance-version
;2D homonuclear correlation via dipolar coupling
;dipolar coupling may be due to noe or chemical exchange.
;phase sensitive using TPPI

;Starts with 13C-Filter => only protons bound to 13C are
; selected and then "used" for the NOE-mixing time

#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>

;"d0=3u"
"p2=p1*2"
"p4=p3*2"
;"d28=(p4-p2)/2"                ;Non-composite 180 Degree 13C-Pulse
"d27=(2*p3+p4+6u-p2)/2"        ;180 Degree 13C-Pulse=90x180y90x

1 ze
2 d1
3 (p1 ph1):f1                    ;Start 13C-Filter
  d4
; (d28 p2 ph0):f1 (p4 ph0):f2    ;Non-composite 180 Degree 13C-Pulse
  (d27 p2 ph0):f1 (p3 ph0 3u p4 ph1 3u p3 ph0):f2
                                ;180 Degree 13C-Pulse=90x180y90x
  d4 UNBLKGRAD
  (p1 ph0):f1
  GRADIENT(cnst21)
  d16
  (p1 ph1):f1
  d4
; (d28 p2 ph0):f1 (p4 ph0):f2    ;Non-composite 180 Degree 13C-Pulse
  (d27 p2 ph0):f1 (p3 ph0 3u p4 ph1 3u p3 ph0):f2
                                ;180 Degree 13C-Pulse=90x180y90x
  d4
  (p1 ph0):f1
  GRADIENT(cnst22)
  d16                            ;End 13C-Filter
  4u BLKGRAD
  (p1 ph4):f1
  d0
  (p4 ph0):f2                    ;Refocussing during t1
  d0
  (p1 ph5):f1
  d8
  (p1 ph6):f1
  go=2 ph31
  d1 wr #0 if #0 id0 ip4 zd
  lo to 3 times td1
exit

ph0=0
ph1=1
ph4=0 2
ph5=0 0 0 0 0 0 0 0 2 2 2 2 2 2 2 2
ph6=0 0 2 2 1 1 3 3
```

```
ph31=0 2 2 0 1 3 3 1 2 0 0 2 3 1 1 3
```

```
;p11 : f1 channel - power level for pulse (default)
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse on 1H (f1) at p11
;p3 : f2 channel - 90 degree high power pulse on 13C (f2) at p12
;p16 : gradient pulse length (=1ms)
;d0 : incremented delay (2D) [3 usec]
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d4 : <=1/4J for HX
;d8 : mixing time
;d16 :gradient recovery delay (=200u)
;in0: 1/(2 * SW) = DW
;nd0: 4
;NS: 8 * n
;DS: 16
;td1: number of experiments
;MC2: TPPI
```

```
;use gradient program (GRDPROG) : 2sine
;use gradient ratios:
; 80 : 10
```

## 7.2.1 Verwendete Parameter

p11 = 0dB  
p1 = 8,5  $\mu$ s  
p2 = 17,8  $\mu$ s  
p16 = 1000  $\mu$ s

d1 = 1,7 s  
d4 = 1,7241 ms (optimiert für eine  $^1J_{(C,H)}$ -Kopplung von 145 Hz)<sup>52</sup>  
d8 = 200  $\mu$ s  
d16 = 200  $\mu$ s

SW (F1/F2) = 7 ppm / 52501 Hz  
o1p/o2p = 3,5 ppm

td (F1) = 256  
td (F2) = 4096  
ns = 256

---

<sup>52</sup> Die  $^1J_{(C,H)}$ -Kopplungen der Gruppen 1-4 liegen laut HMBC-Spektrum im Bereich 139,2–147,0 Hz.

### 7.3 Pulsprogramm der in Abb. 58 dargestellten Pulssequenz zur Bestimmung der Konfiguration chemisch äquivalenter vicinaler Protonen<sup>53</sup>

```
;bulukidop
;avance-version
;2D-sequence for measurement of 3JHH-coupling constants for determination
;of configuration of chemically equivalent vicinal protons.
;B. Luy, G. Hauser, A. Kirschning, S. J. Glaser,
;Angew. Chemie 115, 1338-1341 (2003).

"p2=p1*2"
"p4=p3*2"
"d2=1/(cnst4*2)"
"d4=1/(cnst4*4)"
"d16=200u"
"d24=p3-p1"
"d23=(p3-p1)/2"

#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>

1 ze
2 10m
3 d1 pl1:f1 pl2:f2 do:f2
  10u UNBLKGRAD
  p1 ph5
  d2
  (d24 p2 ph0):f1 (p4 ph0):f2
  d2 pl11:f1
  if "l4 < 1" goto 8
4 (p20 ph10):f1
  (p20 ph11):f1
  (p20 ph11):f1
  (p20 ph10):f1

  (p20 ph10):f1
  (p20 ph10):f1
  (p20 ph11):f1
  (p20 ph11):f1

  (p20 ph11):f1
  (p20 ph10):f1
  (p20 ph10):f1
  (p20 ph11):f1

  (p20 ph11):f1
  (p20 ph11):f1
  (p20 ph10):f1
  (p20 ph10):f1

  lo to 4 times l4
8 d4 pl1:f1 pl2:f2
  (d24 p2 ph0):f1 (p4 ph0):f2
  d4
  (d23 p1 ph1):f1 (p3 ph1):f2
  d4
  (d24 p2 ph0):f1 (p4 ph0):f2
```

<sup>53</sup> Die zu verwendenden Parameter sind den Kommentaren des Pulsprogramms zu entnehmen.

```

d4
(p3 ph0):f2
3u pl13:f1
(p27 ph0):f1
3u
p11:gp1
d16 pl1:f1
(p3 ph4):f2
d4
(d24 p2 ph0):f1 (p4 ph0):f2
d4
(d23 p1 ph1):f1 (p3 ph1):f2
d4
(d24 p2 ph0):f1 (p4 ph0):f2
d4

10u BLKGRAD
3u pl12:f2

go=2 ph31 cpds2:f2
30m do:f2 wr #0 if #0 zd iu4
lo to 3 times td1
exit

ph0=0
ph1=1
ph2=2
ph3=3
ph4=0 2
ph5=0 0 2 2
ph10=(360) 101
ph11=(360) 281
ph31=0 2 2 0

;p11 : f1 channel - power level for pulse 1H(default)
;p12 : f2 channel - power level for pulse 13C(default)
;p111 : f1 channel - selective TOCSY power
;      (typically rf-amplitude of 500 Hz)
;p112 : f2 channel - 13C decoupling power
;p113 : f1 channel - power for spin lock pulse
;      (typically 6 dB lower than p11)
;p1 : f1 channel - high power 90 pulse 1H
;p2 : f1 channel - high power 180 pulse 1H
;p3 : f2 channel - high power 90 pulse 13C
;p4 : f2 channel - high power 180 pulse 13C
;p11: gradient pulse for removing 12C-bound signals
;      (typically 5ms)
;p20 : f1 channel - selective TOCSY 180 pulse
;      (typically 1 ms for 500 Hz rf-amplitude)
;p27 : f1 channel - spin lock pulse
;      (typically 2ms)
;l4 : loop counter for TOCSY incrementation MUST BE 0!
;cnst4 : JHC coupling constant for vicinal protons (e.g. 160)
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d2 : 1/2J(HC)
;d4 : 1/4J(HC)
;d16 : gradient relaxation delay
;      (typically 200u)
;d24 : difference f2/f1 180 pulse
;d23 : difference f2/f1 90 pulse

```

```

;gp1 : gradient for removing 12C-bound signals
;      (typically 30% on x,y,z on a triple axis gradient probehead)
;cpdprg : DIPSI-2 or GARP. Since the decoupling bandwidth needed is rather
;        narrow, DIPSI-2 might give cleaner decoupling.
;ph10, ph11: y, -y phase, corrected for selective TOCSY relative to
;            hard pulse phase.
;O1 : must be set onresonant on the chemically equivalent vicinal protons
;     for the selective TOCSY.
;O2 : roughly at the 13C-chemical shift of the adjacent carbon.
;DS : 16
;NS : 4 * n
;TD1 : e.g. 64 points for about 1 Hz/Pt resolution in J-dimension for
;      500 Hz rf-amplitude selective TOCSY.
;TD2 : e.g. 4k points, depends on 1H-resolution needed.
;
;COMMENT: Calibrate pulses carefully!! Wrongly calibrated pulses lead to
;a central artifact signal in the J-dimension. IF THIS CENTRAL SIGNAL IS
;DUE TO A MISCALIBRATED SELECTIVE TOCSY PULSE THE MEASURED COUPLING
;CONSTANT MIGHT NOT BE RELIABLE!!! The integral of the artefact at 0 Hz in
;the center of the J-splitting relative to the integral of the J-split
;signal itself gives an estimate for the error of the determined coupling
;constant. Errornous splittings should be generally larger than the correct
;ones.
;PROCESSING: In the indirect dimension only REAL data are available. With
;X-WINNMR software MC2 = QF and PH_mod = mc can be set to view the spectrum
;in magnitude mode. Sharper lines can be achieved for example using nmrPipe
;as described in the publication (see top of this file).

```

## 7.4 Literaturverzeichnis

Anmerkung: Bei mehr als zehn Autoren wurde nur der erste sowie der Zusatz „et al“ genannt.

- [1] R.M. Krause (1991) *Cosmos* **1**, 15
- [2] E.D. Kilbourne (1990) *J. Am. Med. Assoc.* **264**, 68-70
- [3] S.S. Morse, A. Schluederberg (1990) *J. Infect. Dis.* **162**, 1-7
- [4] J. Lederberg (1988) *J. Am. Med. Assoc.* **260**, 684-685
- [5] S.S. Morse (1991) *Perspect. Biol. Med.* **34**, 387-409
- [6] W.H. McNeill (1976) *Plagues and Peoples*, Doubleday, New York
- [7] R.M. Krause (1992) *Science* **257**, 1073-1077
- [8] U. Holzgrabe, A. Bechthold (1999) *Chemotherapie Journal* **2**, 69-81
- [9] G. Rücker (1995) *Pharm. Unserer Zeit* **24**, 189-195
- [10] A. Robert, B. Meunier (1998) *Chem. Soc. Rev.* **27**, 273-279
- [11] E. Mutschler (1996) *Arzneimittelwirkungen: Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart
- [12] P. Ehrlich (1913) *Lancet* **181**, 445-451
- [13] A. Schatz, E. Bugie, S.A. Waksman (1944) *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **55**, 66-69
- [14] C.S. Keefer, F.G. Blake, J.S. Lockwood, P.H. Long, E.K. Marshall Jr, W.B. Wood Jr (1946) *J. Am. Med. Assoc.* **132**, 4-10, 70-77
- [15] H.C. Neu (1992) *Science* **257**, 1064-1073
- [17] D. Voet, J.G. Voet (1990) *Biochemistry*, John Wiley & Sons, Inc.
- [18] L. Stryer (1988) *Biochemistry*, W.H. Freeman and Company, New York
- [19] P.M. Hawkey (1998) *BMJ* **317**, 657-660
- [20] J. Travis (1994) *Science* **264**, 360-362
- [21] E.P. Abraham, E. Chain (1940) *Nature* **146**, 837-839
- [22] B.G. Spratt (1994) *Science* **264**, 388-393

- [23] J.P. Quinn, E.J. Dudek, C.A. diVincenzo, D.A. Lucks, S.A. Lerner (1986) *J. Infect. Dis.* **154**, 289-294
- [24] J. Davies (1994) *Science* **264**, 375-381
- [25] B.R. Lyon, R. Skurray (1987) *Microbiol. Rev.* **51**, 88-134
- [26] H.C. Neu (1992) *Annu. Rev. Med.* **43**, 465-486
- [27] H.A. Blumberg, D. Rimland, D.J. Carroll, P. Terry, I.K. Wachsmuth (1991) *J. Infect. Dis.* **163**, 1279-1285
- [28] T.A. Brown (1996) *Gentechnologie für Einsteiger*, 2. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg – Berlin
- [29] H.C. Wegener, F.M. Aarestrup, L.B. Jensen, A.M. Hammerum, F. Bager (1999) *Emerg. Infect. Dis* **5**, 329-335
- [30] V. Webb, J. Davies (1993) *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**, 2379-2384
- [31] R. Munoz et al. (1991) *J. Infect. Dis.* **164**, 302-306
- [32] G.A. Jacoby, A.A. Medeiros (1991) *Antimicrob. Agents Chemother.* **35**, 1697-1704
- [33] P. Trieu-Cuot, C. Carlier, P. Martin, P. Courvalin (1987) *FEMS Microbiol. Lett.* **48**, 289-294
- [34] P. Trieu-Cuot, C. Carlier, P. Courvalin (1988) *J. Bacteriol.* **170**, 4388-4391
- [35] P. Mazodier, J. Davies (1991) *Annu. Rev. Genet.* **25**, 147-171
- [36] D.B. Clewell (1993) *Bacterial Conjugation*, Plenum, New York
- [37] EU-Pressemitteilung vom 30.01.1997, IP/97/71
- [38] F. Bager, F.M. Aarestrup, M. Madsen, H.C. Wegener (1999) *Microb. Drug Resist.* **5**, 53-56
- [39] I. Klare, D. Badstübner, C. Konstabel, G. Böhme, H. Claus, W. Witte (1999) *Microb. Drug Resist.* **5**, 45-52
- [40] E. Gäumann, V. Prelog, E. Vischer (1960) Herstellung und Gewinnung des Antibiotikums Avilamycin. Deutsches Patentamt, Auslegeschrift: 1116864
- [41] H. Roempp, J. Falbe, M. Regitz (1996) *Roempp Lexikon der Chemie*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart

- [42] G. Weitnauer (2002) Methyltransfer in *Streptomyces viridochromogenes* Tü57 – kleine Veränderungen, bedeutender Effekt. Dissertation der Fakultät für Chemie und Pharmazie, Eberhard-Karls-Universität Tübingen
- [43] M.J. Weinstein, G.H. Wagman, E.M. Oden, G.M. Luedemann, P. Sloane, A. Murawski, J. Marquez (1965) *Antimicrob. Agents Chemother.* **5**, 821-827
- [44] L. Ninet, F. Benazet, Y. Charpentie, M. Dubost, J. Florent, J. Lunel, D. Mancy, J. Preud'Homme (1974) *Experientia* **30**, 1270-1272
- [45] O.L. Galmarini, V. Deulofeu (1961) *Tetrahedron* **15**, 76-88
- [46] C. Braun (1995) Untersuchungen an einem Antibiotikum aus der Orthosomycingruppe. Diplomarbeit der Fakultät für Biologie, Eberhard-Karls-Universität Tübingen
- [47] F. Buzzetti, F. Eisenberg, H.N. Grant, W. Keller-Schierlein, W. Voser, H. Zähler (1968) *Experientia* **24**, 320-323
- [48] E.D. Wright (1979) *Tetrahedron* **35**, 1207-1237
- [49] W. Heilman, E. Kupfer, W. Keller-Schierlein, H. Zähler, H. Wolf, H.H. Peter (1979) *Helv. Chim. Acta* **62**, 1-6
- [50] W. Keller-Schierlein, W. Heilman, W.D. Ollis, C. Smith (1979) *Helv. Chim. Acta* **62**, 7-20
- [51] J.L. Mertz, J.S. Peloso, B.J. Barker, G.E. Babbitt, J.L. Occolowitz, V.L. Simson, R.M. Kline (1986) *J. Antibiotics* **39**, 877-887
- [52] D. Loebenberg, A. Cacciapuoti, L. Naples, E.L. Moss, F. Menzel, R.S. Hare, G.H. Miller (1994) Biological activity of SCH27899 (EVE), an eveninomycin antibiotic. 33rd ICAAC, Session 41:Poster 456
- [53] A.K. Ganguly, B. Praminik, T.M. Chan, Y.T. Liu, J. Morton, V. Girijavallabhan (1989) *Heterocycles* **28**, 83-88
- [54] A.K. Ganguly (2000) *J. Antibiotics* **53**, 1038-1044
- [55] S. Nakashio, H. Iwasawa, F.Y. Dun, K. Kanemitsu, J. Shimada (1995) *Drugs Exp. Clin. Res.* **21**, 7-16
- [56] R.N. Jones, M.S. Barret (1995) *J. Clin. Microb. Infect.* **1**, 35-43
- [57] D.R. Foster, M.J. Rybak (1999) *Pharmacotherapy* **19**, 1111-1117
- [58] P.C. Fuchs, A.L. Barry, S.D. Brown (1999) *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**, 2996-2997

- [59] Schering-Plough (2000) Pressemitteilung,  
[http://www.sch-plough.com/schering\\_plough/news/release.jsp?releaseID=369364](http://www.sch-plough.com/schering_plough/news/release.jsp?releaseID=369364)
- [60] H. Wolf (1973) *FEBS Lett.* **36**, 181-186
- [61] P.M. McNicholas, D.J. Najarian, P.A. Mann, D. Hesk, R.S. Hare, K.J. Shaw, T.A. Black (2000) *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**, 1121-1126
- [62] L. Belova, T. Tenson, L. Xiong, P.M. McNicholas, A.S. Mankin (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 3726-3731
- [63] A.S. Mankin (2001) *Mol. Biol.* **35**, 509-520
- [64] G. Weitnauer, S. Gaisser, A. Trefzer, S. Stockert, L. Westrich, L.M. Quiros, C. Mendez, J.A. Salas, A. Bechthold (2001) *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**, 690-695
- [65] I. Treede, L. Jakobsen, F. Kirkepar, B. Vester, G. Weitnauer, A. Bechthold, S. Douthwaite (2003) *Mol. Microbiol.* **49**, 309-318
- [66] W.E. Sanders Jr., C.C. Sanders (1974) *Antimicrob. Agents Chemother.* **6**, 232-238
- [67] EU-Pressemitteilung vom 22.07.2003, IP/03/1058
- [68] A. Bechthold, S. Domann, B. Faust, D. Hoffmeister, S. Stockert, A. Trefzer, G. Weitnauer, L. Westrich (1999) *Chemotherapie Journal* **4**, 130-135
- [69] J.F. Martin, P. Liras (1989) *Annu. Rev. Microbiol.* **43**, 173-206
- [70] B.A.M. Rudd, D.A. Hopwood (1979) *J. Gen. Microbiol.* **14**, 35-43
- [71] L. Katz, R. Hutchinson (1992) *Annual reports in medicinal chemistry* **27**, 129-138
- [72] D. Hoffmeister, S. Pelzer, W. Wohlleben, A. Bechthold (2002) *Biospektrum Sonderausgabe* 508-510
- [73] J.M. Weber, J.O. Leung, S.J. Swanson, K.B. Idler, J.B. McAlpine (1991) *Science* **252**, 114-117
- [74] K. Madduri et al. (1998) *Nat. Biotechnol.* **16**, 69-74
- [75] L. Katz (1997) *Chem. Rev.* **97**, 2557-2576
- [76] L. Katz, R. McDaniel (1999) *Med. Res. Rev.* **19**, 543-558
- [77] R. McDaniel, A. Thamchaipenet, C. Gustafsson, H. Fu, M. Betlach, M. Betlach, G. Ashley (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 1846-1851

- [78] A. Trefzer (1997) Molekularbiologische Untersuchungen zur Biosynthese von Avilamycin A. Diplomarbeit der Fakultät für Biologie, Eberhard-Karls-Universität Tübingen
- [79] I. Treede (2004) Aufklärung des Resistenzmechanismus gegenüber Avilamycin und Untersuchungen zur Eurenkat-Biosynthese in *Streptomyces viridochromogenes* Tü57, Dissertation der Fakultät für Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg, befindet sich im Promotionsverfahren
- [80] S. Gaisser (1998) Molekularbiologische und biochemische Untersuchungen zur Avilamycin-Biosynthese und Resistenz in *Streptomyces viridochromogenes* Tü57. Dissertation der Fakultät für Chemie und Pharmazie, Eberhard-Karls-Universität Tübingen
- [81] G. Weitnauer, S. Gaisser, L. Kellenberger, P.F. Leadley, A. Bechthold (2002) *Microbiology* **148**, 373-379
- [82] G. Weitnauer, A. Mühlenweg, A. Trefzer, D. Hoffmeister, R.D. Süßmuth, G. Jung, K. Welzel, A. Vente, U. Girreser, A. Bechthold (2001) *Chem. Biol.* **8**, 569-581
- [83] O. White et al. (1999) *Science* **19**, 1571-1577
- [84] R.A. Lacalle, D. Ruiz, A. Jimenez (1991) *Gene* **109**, 55-61
- [85] Y. Kawarabayasi et al. (1999) *DNA Res.* **30**, 83-101, 145-152
- [86] S. Omura et al (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98 (21)**, 12215-12220
- [87] T. Shibasaki, H. Mori, S. Chiba, A. Ozaki (1999) *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 4028-4031
- [88] Q. She et al. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 7835-7840
- [89] F. Bloch, W.W. Hansen, M. Packard (1946) *Phys. Rev.* **69**, 127-127
- [90] E.M. Purcell, H.C. Torrey, R.V. Pound (1946) *Phys. Rev.* **69**, 37-38
- [91] M. Mehring (1983) Principles of High Resolution NMR of Solids, Springer Verlag, Berlin
- [92] H. Friebolin (1988) Ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim
- [93] A.E. Derome (1987) Modern NMR Techniques for Chemistry Research, Pergamon Press, Oxford
- [94] K. Wüthrich (1986) NMR of Proteins and Nucleic Acids, Wiley, New York
- [95] W.R. Croasmun, R.M.K. Carlson (1994) Two-Dimensional NMR Spectroscopy, VCH Publishers, Weinheim

- [96] J.N.S. Evans (1995) *Biomolecular NMR Spectroscopy*, Oxford University Press, Oxford
- [97] D.M. Grant, R.K. Harris (Hrsg.) (1996) *Encyclopedia of Nuclear Magnetic Resonance*, Wiley, Chichester
- [98] R.R. Ernst, W.A. Anderson (1966) *Rev. Sci. Instr.* **37**, 93-102
- [99] J. Jeener (1971) *Ampère Int. Summerschool II*, Basko Polje, Jugoslawien
- [100] W.P. Aue, E. Bartholdi, R.R. Ernst (1976) *J. Chem. Phys.* **64**, 2229-2246
- [101] R.R. Ernst, G. Bodenhausen, A. Wokaun (1987) *Principles of Nuclear Magnetic Resonance in one and two Dimensions*, Clarendon Press, Oxford
- [102] R.R. Ernst (1992) *Angew. Chem.* **104**, 817-836
- [103] M.P. Williamson, T.F. Havel, K. Wüthrich (1985) *J. Mol. Biol.* **182**, 295-315
- [104] H. Kessler, M. Gehrke, C. Griesinger (1988) *Angew. Chem.* **100**, 507-554
- [105] G.W. Vuister, R. Boelens, R. Kaptein (1988) *J. Magn. Reson.* **80**, 176-185
- [106] H. Oschkinat, C. Griesinger, P.J. Kraulis, O.W. Sørensen, R.R. Ernst, A.M. Gronenborn, G.M. Clore (1988) *Nature* **332**, 374-376
- [107] L.E. Kay, G.M. Clore, A. Bax, A.M. Gronenborn (1990) *Science* **249**, 411-414
- [108] W.A. Hendrikson, K. Wüthrich (1996) *Macromolecular Structures*, Current Biology, London
- [109] H. Günther (1983) *NMR-Spektroskopie: Grundlagen, Konzepte und Anwendungen der Protonen und Kohlenstoff-13-Kernresonanz-Spektroskopie in der Chemie*, 3. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart – New York
- [110] M. Rance, O.W. Sørensen, G. Bodenhausen, G. Wagner, R.R. Ernst, K. Wüthrich (1983) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **117**, 479-485.
- [111] G. Bodenhausen, D.J. Ruben (1980) *Chem. Phys. Lett.* **69**, 185-189.
- [112] J. Jeener, B.H. Meier, P. Bachmann, R.R. Ernst (1979) *J. Chem. Phys.* **71**, 4546-4553.
- [113] A. Kumar, R.R. Ernst, K. Wüthrich (1980) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **95**, 1-6
- [114] Persönliche Mitteilung von Dr. Gabriele Weitnauer
- [115] Persönliche Mitteilung von Carsten Harald Hofmann
- [116] D.M. Doddrell, D.T. Pegg, M.R. Bendall (1982) *J. Magn. Reson.* **48**, 323-327
- [117] L. Braunschweiler, R.R. Ernst (1983) *J. Magn. Reson.* **53**, 521-528.

- [118] A. Bax, D.G. Davis (1985) *J. Magn. Reson.* **65**, 355-360.
- [119] S.J. Glaser, J.J. Quant (1996) *Advances in Magnetic and Optical Resonance, Vol. 19* (Ed.: W.S. Warren), Academic Press, San Diego, Seiten 59-252
- [120] M.F. Summers, L.G. Marzilli, A. Bax (1986) *J. Am. Chem. Soc.* **108**, 4285-4294.
- [121] T.J. Norwood, J. Boyd, J.E. Heritage, N. Soffe, I.D. Campbell (1990) *J. Magn. Reson.* **87**, 488-501.
- [122] J. Cavanagh, A.G. Palmer III, P.E. Wright, M. Rance (1991) *J. Magn. Reson.* **91**, 429-436.
- [123] G.A. Morris, R. Freeman (1979) *J. Amer. Chem. Soc.* **101**, 760-762
- [124] G. Otting, H. Senn, G. Wagner, K. Wüthrich (1986) *J. Magn. Reson.* **70**, 500-505.
- [125] Persönliche Mitteilung von PD Dr. Hans-Achim Wagenknecht
- [126] T.W. Green, P.G.M. Wuts (1999) *Protective Groups in Organic Syntheses*, John Wiley & Sons, Inc., New York
- [127] P.A. Shipkova, L. Heimark, P.L. Bartner, G. Chen, B.N. Pramanik, A.K. Ganguly, R.B. Cody, A. Kusai (2000) *J. Mass Spectrom.* **35**, 1252-1258
- [128] T.D. Goddard, D.G. Kneller, Sparky 3, University of California, San Francisco  
[[www.cgl.ucsf.edu/home/sparky](http://www.cgl.ucsf.edu/home/sparky)]
- [129] Persönliche Mitteilung von Irina Treede
- [130] I. Treede, G. Hauser, A. Mühlenweg, C. Hofmann, M. Schmidt, G. Weitnauer, S. J. Glaser, A. Bechthold (2004) *AEM* (im Druck)
- [131] G. Weitnauer, G. Hauser, C. Hofmann, U. Linder, R. Boll, K. Pelz, S. J. Glaser, A. Bechthold (2004) *Chem. Biol.* **11**, 1403-1411
- [132] A.D. Cohen, N. Sheppard, J.J. Turner (1958) *Proc. Chem. Soc.* 118-119
- [133] N. Sheppard, J.J. Turner (1959) *Proc. R. Soc.* **252**, 506-519
- [134] R. Radeaglia, H. Poleschner, M. Heydenreich (1991) *Magn. Reson. Chem.* **29**, 1028-1035
- [135] R. Radeaglia (1993) *J. prakt. Chem.* **335**, 291-293
- [136] V. Rutar (1983) *J. Am. Chem. Soc.* **105**, 4496-4497
- [137] V. Rutar (1983) *J. Phys. Chem.* **87**, 1669-1670
- [138] L. Müller (1979) *J. Am. Chem. Soc.* **101**, 4481-4484

- [139] M.R. Bendall, D.T. Pegg, D.M. Doddrell (1983) *J. Magn. Reson.* **52**, 81-117
- [140] A. Bax, R.H. Griffey, B.L. Hawkins (1983) *J. Magn. Reson.* **55**, 301-315
- [141] M.R. Bendall, D.T. Pegg, D.M. Doddrell, J. Field (1981) *J. Am. Chem. Soc.* **103**, 934-936
- [142] D.P. Burum, R.R. Ernst (1980) *J. Magn. Reson.* **39**, 163-168
- [143] B. Luy, G. Hauser, A. Kirschning, S.J. Glaser (2003) *Angew. Chem. Int. Ed.* **42**, 1300-1302
- [144] E. Chiarparin, P. Pelupessy, G. Bodenhausen (1998) *Mol. Phys.* **95**, 759-767
- [145] P. Pelupessy, E. Chiarparin (2000) *Concepts Magn. Reson.* **12**, 103-124
- [146] A. Bax, M.F. Summers (1986) *J. Am. Chem. Soc.* **108**, 2093-2094.

## 7.5 Abkürzungsverzeichnis

1D	eindimensional (z.B. 1D- <sup>1</sup> H-Spektrum)
2D	zweidimensional
Ace	1- <sup>13</sup> C-Na-Acetat
ACN	Acetonitril
COSY	Correlated Spectroscopy
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ESI	Elektrospray-Ionisation
FID	Free Induction Decay (deutsch: Freier Induktionszerfall)
Fp	Fest- oder Schmelzpunkt
Glu	1- <sup>13</sup> C-D-Glucose
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Coherence
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (bzw. in den Anfangszeiten dieser Technik "High Pressure Liquid Chromatography").
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
INEPT	Insensitive Nuclei Enhanced by Polarization Transfer
Met	L-Methionin-(Methyl) <sup>13</sup> C
MHK	Minimale Hemmkonzentration (siehe Glossar)
MRI	Magnetic Resonance Imaging (deutsch: Magnetresonanztomografie)
mRNA	messenger-RNA (Boten-RNA)
MRSE	Methicillin-resistente <i>Staphylococcus aureus</i>
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NOE	Nuclear Overhauser Enhancement
NOESY	Nuclear Overhauser Enhancement and Exchange Spectroscopy
ORF	Open Reading Frame (deutsch: Offener Leserahmen)
PCR	Polymerase Chain Reaction (deutsch: Polymerase-Kettenreaktion)
ppm	parts per million (=10 <sup>-6</sup> )
Pyr	2- <sup>13</sup> C-Na-Pyruvat
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale RNA
S/N	Signal to Noise ratio (Signal-zu-Rausch-Verhältnis)
TOCSY	Total Correlation Spectroscopy
tRNA	transfer-RNA
VRE	Vancomycin-resistente Enterokokken

## 7.6 Glossar

Antidiabetikum	blutzuckersenkendes Mittel
Bakteriolyse	die Auflösung bzw. Vernichtung von Bakterien, z.B. durch bestimmte Antibiotika
bakteriostatisch	die Keimvermehrung hemmend
bakterizid	die Keime eliminierend (Um eine klinisch relevante Bakterizidie zu besitzen, muss ein Antiinfektivum innerhalb von 4-8 Stunden mindestens 99% aller Bakterien abtöten.)
Bioverfügbarkeit	Ausmaß und Geschwindigkeit, mit der ein Medikament im Körper freigesetzt, resorbiert und letztendlich am Wirkort verfügbar wird (beträgt bei intravenöser Applikation definitionsgemäß 100%)
Blutschizonten	eine der Entwicklungsstufen der Parasiten bei der Malariaerkrankung
Codon	eine in <u>mRNA</u> -Molekülen vorkommende Sequenz von drei <u>Nukleotiden</u> , die im genetischen Code eine Aminosäure codiert
Gram-positiv/-negativ	Einteilung der Bakterien nach ihrem Verhalten bei der Gram-Färbung (benannt nach ihrem Entwickler Hans Christian Gram). Bakterien besitzen ein aus Murein (Peptidoglykan) bestehendes Gerüst als Teil ihrer Zellwand (Abb. 1). Bei Gram-positiven Bakterien macht es etwa 50%, bei Gram-negativen nur 5-10% der Zellwand aus. Ferner ist es bei letzteren zusätzlich noch von einer aus (teilweise ungewöhnlichen) Lipiden bestehenden, äußeren Membrane umgeben. Die Farbstoffe interkalieren nun unterschiedlich mit diesem Mureingerüst.
Immuninsuffizienz	geschwächte oder fehlende Abwehr des Organismus mit erhöhter Anfälligkeit für Infektionen (z.B. bei HIV-Infektion oder der Therapie mit Zytostatika)
inhibieren	hemmen
intravenös	in die Vene injiziert
kardiotoxisch	herzschädigend
Meningitis	Hirnhautentzündung
Minimale Hemmkonzentr.	Geringste Konzentration eines Antiinfektivums, die in vitro das Wachstum eines Erregerstammes zu unterbinden vermag.
Myzel	(auch Mycel), die Gesamtheit aller Hyphen (Hyphen = fadenförmige Zellen eines Pilzes)
Mykose	Pilzerkrankung
nephrotoxisch	nierenschädigend
neurotoxisch	das Nervensystem schädigend
nosokomiale Infektion	bei einem Krankenhausaufenthalt erworbene Infektion (auch als Hospitalismus bezeichnet)

pathogen	krankmachend
(per)oral	Aufnahme eines Medikaments „durch den Mund“ und anschließende Resorption im Magen-Darm-Kanal
persistent	fortbestehend
Plasmid	Kleine DNA-Ringe, die man in Bakterien und einigen anderen Organismen findet. Plasmide können sich unabhängig vom Chromosom der Wirtszelle vermehren. Sie können relativ einfach auf andere Bakterien übertragen werden.
Porin	<u>porenformende</u> Transmembran- <u>Proteine</u> in der äußeren Membran von gram-negativen Bakterien. Sie dienen dem Stoffaustausch durch die Membran hindurch.
proliferierend	wuchernd, sich schnell teilend, gesteigertes Wachstum zeigend
Protozoen	(Einzahl: Protozoon) Einzeller, die keine Zellwand, aber im Gegensatz zu Bakterien einen Zellkern besitzen. Sie werden daher auch zu den Eukaryoten gezählt. (Bakterien, mangels Zellkern, dagegen zu den Prokaryoten.) Zu den durch Protozoen ausgelösten Erkrankungen gehört z.B. die Malaria.
Reserveantibiotika	Antibiotika, die für normale Infektionen nicht zur Therapie in Betracht gezogen werden, um Resistenzentwicklung zu verhindern. Sie sollen nur bei schweren Infektionen, mit bestimmten gegen andere Antibiotika unempfindlichen Bakterienstämmen (z.B. MRSA), zum Einsatz kommen.
Resorption	Die Aufnahme eines Wirkstoffs von der Körperoberfläche (auch den Schleimhäuten des Magen-Darm-Kanals) oder aus örtlich begrenzten Stellen im Körperinneren in die Blutbahn oder das Lymphgefäßsystem, von wo aus die Verteilung in den Gesamtorganismus erfolgt.
Zytostatikum	Wirkstoffe, die das Wachstum (und insbesondere die Zellteilung) von (Tumor-)Zellen hemmen. (Streng genommen müsste man von zytotoxischer Wirkung sprechen, da die Zellen zerstört bzw. geschädigt werden.)

## 7.7 Chemische Verschiebungen für Avilamycin B und C

Ring	Position	Avilamycin A $\delta(^1\text{H})$ [ppm]	Avilamycin B $\delta(^1\text{H})$ [ppm]
G	H-44	5,09	5,11
G	H-45	5,31	5,28
G	H-46	3,87	3,89
G	H-47	4,16	4,15
G	H-48a	3,84	3,83
G	H-48b	4,17	<sup>b</sup>
G	H-50	2,60	2,06
G	H-51	1,08 <sup>a</sup>	
G	H-52	1,10 <sup>a</sup>	
H	H-54	3,78	<sup>b</sup>
H	H-55	3,86	<sup>b</sup>
H	H-57	3,87	3,89
H	H-58	0,96	1,00
H	H-60	2,24	2,25
H	H-61a	5,03	<sup>b</sup>
H	H-61b	5,04	<sup>b</sup>

Ring	Position	Avilamycin A $\delta(^{13}\text{C})$ [ppm]	Avilamycin B $\delta(^{13}\text{C})$ [ppm]
G	C-44	93,8	93,8
G	C-45	68,4	68,9
G	C-46	77,6	77,4
G	C-47	69,2	69,1
G	C-48	62,0	62,1
G	C-49	174,5	168,9
G	C-50	33,0	20,2
G	C-51	18,0 <sup>a</sup>	
G	C-52	18,6 <sup>a</sup>	
H	C-53	118,4	118,1
H	C-54	71,4	<sup>b</sup>
H	C-55	79,2	<sup>b</sup>
H	C-56	81,6	81,7
H	C-57	73,8	73,7
H	C-58	13,4	13,5
H	C-59	210,3	<sup>b</sup>
H	C-60	27,3	<sup>b</sup>
H	C-61	95,7	<sup>b</sup>

a: 51 und 52 sind nicht zu unterscheiden.

b: Diese Atome von Avilamycin B weisen die gleichen chemischen Verschiebungen wie die entsprechenden Atome in Avilamycin A.

Ring	Position	Avilamycin A $\delta(^1\text{H})$ [ppm]	Avilamycin C $\delta(^1\text{H})$ [ppm]
H	H-54	3,78	3,75
H	H-55	3,86	3,84
H	HO-56	?	4,80
H	H-57	3,87	3,99
H	H-58	0,96	1,02
H	H-59		3,52
H	HO-59		4,86
H	H-60	2,24	1,19
H	H-61a	5,03	4,96
H	H-61b	5,04	5,00

Ring	Position	Avilamycin A $\delta(^{13}\text{C})$ [ppm]	Avilamycin C $\delta(^{13}\text{C})$ [ppm]
H	C-53	118,4	118,6
H	C-54	71,4	72,2
H	C-55	79,2	76,2
H	C-56	81,6	84,8
H	C-57	73,8	73,1
H	C-58	13,4	12,6
H	C-59	210,3	67,7
H	C-60	27,3	18,6
H	C-61	95,7	95,2

## 7.8 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von April 1999 bis Oktober 2004 am Institut für Organische Chemie und Biochemie der Technischen Universität München unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Steffen J. Glaser angefertigt.

Ihm möchte ich auch als erstem meinen besonderen Dank aussprechen. Für das interessante Thema, die uneingeschränkte Unterstützung, die freie und ungezwungene Arbeitsatmosphäre, die hervorragenden Arbeitsbedingungen und insbesondere seine überragende Geduld.

Frau Prof. Dr. S. Weinkauf danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferats (insbesondere angesichts ihres vollen Terminkalenders).

Der Freiburger Gruppe um Prof. Dr. A. Bechthold (insbes. Dr. G. Weitnauer, I. Treede, C.H. Hofmann): Für die Bereitstellung der Avilamycin/Gavibamycin-Proben, die Antwort bei allen Fragen und ebenfalls die Geduld.

Prof. Dr. A. Kirschning: Für die KIDOP-Proben.

Dr. Rainer Haeßner, Monika Goede, Alexander Frenzel: Für die Hilfe bei allem, was mit Computern und Spektrometern zu tun hat. Und somit die Aufrechterhaltung der Arbeitsmöglichkeiten.

Der ersten Generation meiner Mitinsassen (Dr. F. Kramer und Dr. T. Reiss): Für die angenehme Atmosphäre im Raum 42102, die Hilfe bei allen sich ergebenden Problemen und was noch alles in mehreren Jahren gemeinsamer Arbeit auf etwa 35m<sup>2</sup> anfällt.

Der zweiten Generation meiner Mitinsassen (Dr. B. Heitmann und J. Neves): Ebenfalls für die angenehme Atmosphäre im Raum 42102 und dem Training der Hand-Augen-Koordination. Und ersterem natürlich auch für die große Hilfe bei der Messung und Auswertung der Fütterungsexperimente.

Dem NCE, insbesondere Dr. M. Haupt, Dr. M. Heller, Dr. M. John und J. Klages: Dass sie auch uns „Viert-Flurige“ immer willkommen hießen und bei sämtlichen (zahlreichen!) Problemen halfen. Und natürlich für die angeregten Diskussionen um 1500 (freitags 1330).

PD Dr. G. Gemmecker: Für die Hilfe bei vielen NMR-/Spektrometerfragen.

FHagn: Für die Hilfe bei biochemischen Fragen.

Dr. J. Liermann (Prä-NCE): Für die Hilfe beim Einleben in den AK Kessler. Und für Hilfe bei so einigen (Computer-)Problemen.

Dr. B. Heitmann und Dr. M. Heller: Für das hoch-effiziente Lektorat dieser Arbeit.

Dr. B. Luy: Für seine große Hilfe und Motivation beim Vorantreiben des KIDOP-Projekts und der –Publikation.

PD Dr. A. Wagenknecht: Für die Hilfe bezüglich der sich öffnenden Orthoesterbindungen.

V. Marte: Für die letzten (und hoffentlich auch für die kommenden) Jahre.

Meinen Eltern: Erneut für die langjährige Unterstützung. Und die ebenfalls langjährige Geduld.

Den gesamten AKs Glaser und Kessler für die angenehme und interessante Arbeitsatmosphäre sowie der stets bereitwillig zur Verfügung gestellten Hilfe bei Fragen und Problemen aller Art. (Das gilt auch für Euch alle, die Ihr schon Ex-AK-Mitglieder seid.)

*"It is the job that is never started that takes longest to finish."  
J.R.R. Tolkien (1892-1973)*