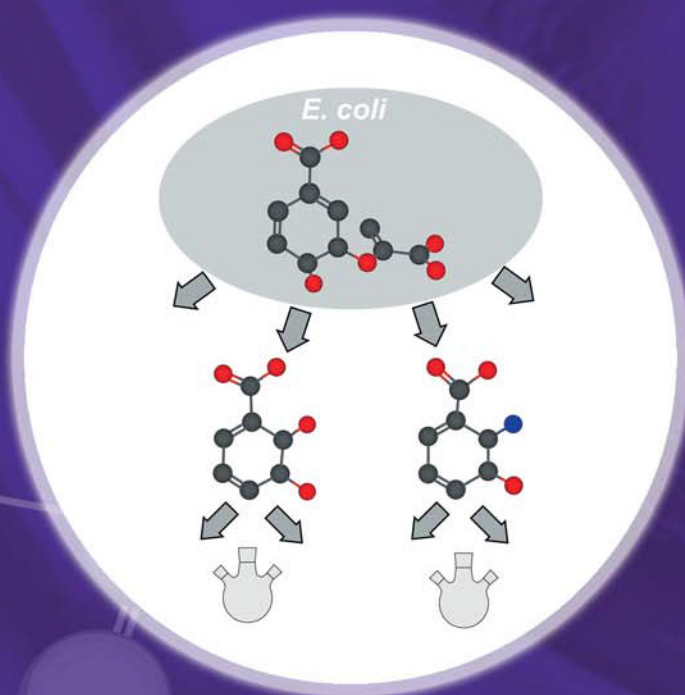


Von Chorismat abgeleitete funktionalisierte Cyclohexadiene:

Verwendung als chirale Synthesebausteine
und Erweiterung der mikrobiell zugänglichen
Produktpalette um einen Aminoalkohol

Volker Lorbach



Forschungszentrum Jülich GmbH
Institut für Biotechnologie 2

Von Chorismat abgeleitete funktionalisierte Cyclohexadiene:

Verwendung als chirale Synthesebausteine
und Erweiterung der mikrobiell zugänglichen
Produktpalette um einen Aminoalkohol

Volker Lorbach

Schriften des Forschungszentrums Jülich
Reihe Lebenswissenschaften/Life Sciences

Band/Volume 39

ISSN 1433-5549

ISBN 978-3-89336-500-5

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek.
Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen
Nationalbibliografie; detaillierte Bibliografische Daten sind im Internet
über <<http://dnb.d-nb.de>> abrufbar.

Herausgeber Forschungszentrum Jülich GmbH
und Vertrieb: Zentralbibliothek, Verlag
 52425 Jülich
 Telefon: 02461 61-5368 · Telefax: 02461 61-6103
 E-Mail: zb-publikation@fz-juelich.de
 Internet: <http://www.fz-juelich.de/zb>

Umschlaggestaltung: Grafische Medien, Forschungszentrum Jülich GmbH

Druck: Grafische Medien, Forschungszentrum Jülich GmbH

Copyright: Forschungszentrum Jülich 2007

Schriften des Forschungszentrums Jülich
Reihe Lebenswissenschaften/Life Sciences Band/Volume 39

D 5 (Diss., Bonn, Univ., 2005)

ISSN 1433-5549
ISBN: 978-3-89336-500-5

Vollständig frei verfügbar im Internet auf dem Jülicher Open Access Server (JUWEL)
unter <http://www.fz-juelich.de/zb/juwel>

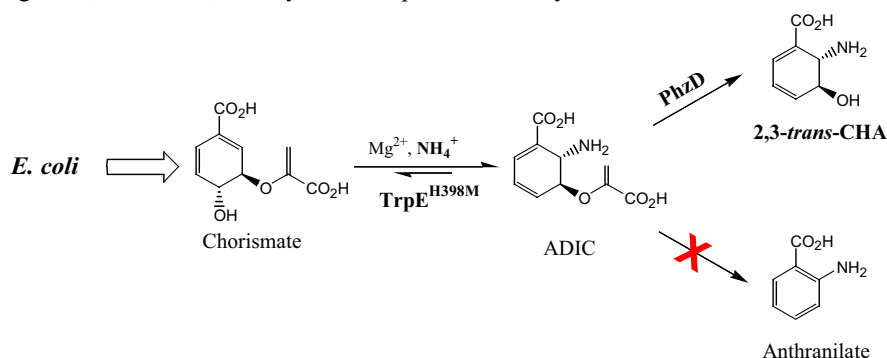
Alle Rechte vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf in irgendeiner Form (Druck, Fotokopie oder
in einem anderen Verfahren) ohne schriftliche Genehmigung des Verlages reproduziert oder
unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Chorismate Derived Functionalized Cyclohexadienes:

Usage as chiral building blocks and expansion of the microbial accessible products by an amino alcohol

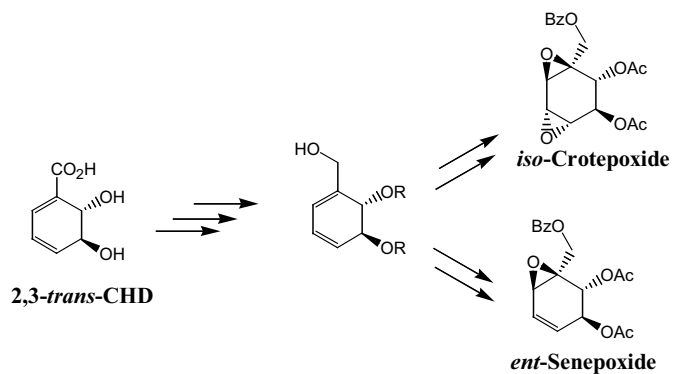
Nature is up to the present the most important source for chiral non-racemic building blocks (*chiral pool* compounds). Chorismate and related functionalized cyclohexadienes are interesting starting materials for chemical syntheses due to their high degree of functionalization.

Microbial access to the β -amino acid 2,3-*trans*-CHA was established by homologous expression of anthranilate synthase (TrpE^{H398M}), which was created by site-directed mutagenesis, and PhzD, an enzyme of the phenazine biosynthesis.



2,3-*trans*-CHA and other functionalized cyclohexadienes were isolated in gram scale and high purity by different methods.

The potential of functionalized cyclohexadienes for organic synthesis was predominantly demonstrated in the case of 2,3-*trans*-CHD by different reaction types as well as natural product syntheses.

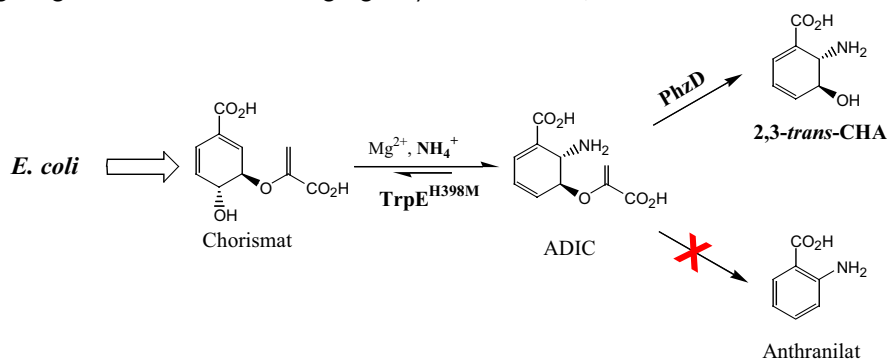


Von Chorismat abgeleitete funktionalisierte Cyclohexadiene:

Verwendung als chirale Synthesebausteine und Erweiterung der mikrobiell zugänglichen Produktpalette um einen Aminoalkohol

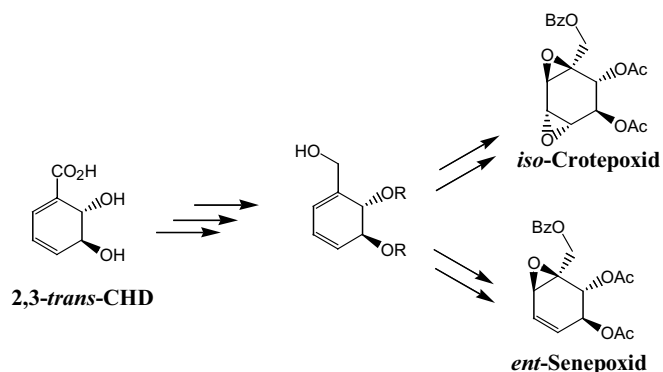
Die Natur ist bis heute die wichtigste Quelle für chirale, nicht-racemische Synthesebausteine (*Chiral-Pool* Verbindungen). Chorismat und verwandte funktionalisierte Cyclohexadiene sind aufgrund ihrer hohen Funktionalisierung interessante Ausgangsmaterialien für chemische Synthesen.

Durch homologe Expression einer durch ortsgerichtete Mutagenese gewonnenen Anthranilatsynthase ($\text{TrpE}^{\text{H398M}}$) und PhzD, einem Protein aus der Phenazinbiosynthese, ist es gelungen einen mikrobiellen Zugang zur β -Aminosäure 2,3-*trans*-CHA zu erarbeiten.



2,3-*trans*-CHA und weitere funktionalisierte Cyclohexadiene wurden durch verschiedene Isolierungsmethoden im Gramm-Maßstab in hoher Reinheit zugänglich gemacht.

Überwiegend am Beispiel von 2,3-*trans*-CHD wurde das synthetische Potential der funktionalisierten Cyclohexadiene anhand verschiedenster Reaktionen sowie Naturstoffsynthesen demonstriert.



Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Biotechnologie II der Forschungszentrum Jülich GmbH angefertigt

Mein Dank gilt

Herrn Prof. Dr. MICHAEL MÜLLER für die interessante Themenstellung, die anregenden Gespräche sowie die stets gewährte freundliche, hilfreiche und persönliche Betreuung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. CHRISTIAN WANDREY für Übernahme des Referats, die anregenden Gespräche sowie die stets gewährte freundliche, hilfreiche und persönliche Betreuung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. HEINRICH WAMHOFF für die freundliche Übernahme des Korreferats.

Herrn DIRK FRANKE, Herrn SIMON EBER, Herrn CHRISTIAN DOSE und Herrn CHRISTOPH GRONDAHL, die durch Ihre sehr gute und konstruktive Zusammenarbeit gezeigt haben, dass auch verwandte Themengebiete gleichzeitig von mehreren Personen erfolgreich behandelt werden können. Außerdem bei Herrn DIRK FRANKE und Herrn SIMON EBER für die zügige und anregend kritische Durchsicht dieser Arbeit.

Frau JUTTA JANIEL, Frau PETRA GEILENKIRCHEN und Frau LONI KRAUS für die Hilfe und Ausdauer bei der Durchführung von Synthesen und Aufarbeitungen.

Herrn Prof. Dr. GEORG A. SPRENGER und Frau ULRIKE DEGNER für die theoretische und praktische Unterstützung bei der Einarbeitung in die molekularbiologischen Arbeiten.

Herrn Dr. Martin Nieger, Universität Bonn, für die praktische Anfertigung der Röntgenstrukturanalysen.

Frau SUSANNE KREMER, Herrn ROBERT BUJNICKI sowie allen Mitarbeitern von DSM BIOTECH JÜLICH und des CHORUS-Projektes für die gute, vertrauensvolle und erfolgreiche Zusammenarbeit.

Den Mitarbeitern der analytischen Labors der Universität Bonn für die Anfertigung von Massenspektren und Elementaranalysen.

Herrn Prof. HEINZ G. FLOSS und Dr. TIN-WEIN YU, University of Washington, für die Möglichkeit meinen wissenschaftlichen und persönlichen Horizont zu erweitern.

Allen aktuellen und ehemaligen Kolleginnen und Kollegen der Bioorganischen Arbeitsgruppe, die durch das hervorragende Arbeitsklima für dauernde Motivation und Freude an der Arbeit gesorgt haben.

Besonders meiner Frau und meiner Familie für die moralische und logistische Unterstützung.

1	Einleitung	1
1.1	Zielsetzung der Arbeit	3
2	Allgemeiner Teil.....	5
2.1	Der Shikimat-Biosyntheseweg.....	5
2.1.1	Chorismat als Verzweigungspunkt in der Biosynthese.....	6
2.1.2	Von Chorismat abgeleitete funktionalisierte Cyclohexadiene	7
2.1.3	Biotechnologisch produzierte Synthesebausteine aus dem gemeinsamen Shikimat-Biosyntheseweg.....	9
2.2	Funktionalisierte Cyclohexadiendiole	11
2.2.1	Cyclohexadiendiole durch Biotransformation	11
2.2.2	Cyclohexadiendiole durch chemische Synthesen	15
2.2.3	Cyclohexadiendiole in der Natur- und Wirkstoffsynthese	19
2.3	Funktionalisierte Cyclohexadienaminoalkohole	26
2.3.1	Cyclohexadienaminoalkohole durch Biotransformation.....	26
2.3.2	Cyclohexadienaminoalkohole durch chemische Synthese.....	28
3	Spezieller Teil.....	33
3.1	Chemische Synthese von racemischen Referenzsubstanzen	33
3.1.1	Synthese von racemischem 2,3- <i>trans</i> -CHA	33
3.1.2	Synthetische Darstellung von racemischem 2,3- <i>trans</i> -CHD	35
3.1.3	Analyseverfahren zur Bestimmung von Cyclohexadienmetaboliten	38
3.2	Mikrobielle Darstellung von 2,3- <i>trans</i> -CHA.....	40
3.2.1	Mutation und Klonierung der <i>E. coli</i> Anthranilatsynthase TrpE	41
3.2.2	Klonierung des <i>E. coli</i> -Stammes F67 (LJ110- Δ trpE)	46
3.2.3	In vitro-Darstellung von ADIC	50
3.2.4	In vitro-Darstellung von 2,3- <i>trans</i> -CHA.....	51
3.2.5	In vivo-Produktion von 2,3- <i>trans</i> -CHA	54
3.3	Isolierung und Reinigung von mikrobiell gewonnenen Substanzen.....	57
3.3.1	Isolierung von 2,3- <i>trans</i> -CHD	57
3.3.2	Isolierung von Chorismat	60
3.3.3	Isolierung von 2,3- <i>trans</i> -CHA	61
3.4	Verwendung von funktionalisierten Cyclohexadienen als Synthesebausteine	64
3.4.1	Modifikation von 2,3- <i>trans</i> -CHD durch Veränderung und Einführung von funktionellen Gruppen.....	64
3.4.2	Verwendung von 2,3- <i>trans</i> -CHD in der Natur- und Wirkstoffsynthese	79

3.4.3	Verwendung von 2,3- <i>trans</i> -CHA in der organischen Synthese	84
3.4.4	Verwendung von 2,3- <i>trans</i> -CHA als Katalysator	88
4	Diskussion und Ausblick.....	91
4.1	Optimierung der Gewinnung von 2,3- <i>trans</i> -CHA.....	92
4.2	Verwendung von 2,3- <i>trans</i> -CHD und 2,3- <i>trans</i> -CHA in der Naturstoff und Wirkstoffsynthese.....	94
4.3	Verwendung 2,3- <i>trans</i> -CHA als β -Aminosäure	101
4.4	Verwendung als Katalysator	104
5	Experimenteller Teil.....	106
5.1	Molekularbiologische Arbeiten.....	106
5.1.1	Verwendete <i>E. coli</i> -Stämme und Plasmide	106
5.1.2	Verwendete Medien und Chemikalien	107
5.1.3	Allgemeine molekularbiologische Arbeitstechniken	108
5.1.4	Klonierung von F67 (Deletion von <i>trpE</i> im <i>E. coli</i> -Stamm LJ110).....	110
5.1.5	Klonierung von pC14.....	113
5.2	Untersuchungen zur mikrobiellen Produktion und Produktgewinnung	115
5.2.1	Allgemeine Arbeitstechniken.....	115
5.2.2	Verwendete Analytik.....	116
5.2.3	Untersuchungen zur Produktion von ADIC und 2,3- <i>trans</i> -CHA.....	117
5.2.4	Isolierung von Metaboliten aus Fermentationsüberständen von <i>E. coli</i>	118
5.3	Chemische Synthesen	123
5.3.1	Methoden und Materialien	123
5.3.2	Synthese von racemischem 2,3- <i>trans</i> -CHD	125
5.3.3	Synthese von racemischem 2,3- <i>trans</i> -CHA	130
5.3.4	Synthesen ausgehend von 2,3- <i>trans</i> -CHD (3).....	135
5.3.5	Synthesen ausgehend von 2,3- <i>trans</i> -CHA (2).....	154
5.3.6	Einsatz von 2,3- <i>trans</i> -CHA in der Katalyse.....	158
5.3.7	Röntgenkristallstrukturanalysen.....	159
6	Literaturverzeichnis	169

Abkürzungen

2,3-DH-2,3-DHB	2,3-Dihydroxy-2,3-dihydrobenzoesäure
2,3- <i>trans</i> -CHA	(5 <i>S</i> ,6 <i>S</i>)-6-Amino-5-hydroxycyclohexa-1,3-dien-carbonsäure
2,3- <i>trans</i> -CHD	(5 <i>S</i> ,6 <i>S</i>)-5,6-Dihydroxycyclohexa-1,3-dien-carbonsäure
3,4-DH-3,4-DHB	3,4-Dihydroxy-3,4-dihydrobenzoesäure
3,4- <i>trans</i> -CHA	(3 <i>R</i> ,4 <i>R</i>)-4-Amino-3-hydroxycyclohexa-1,5-dien-carbonsäure
3,4- <i>trans</i> -CHD	(3 <i>R</i> ,4 <i>R</i>)-3,4-Dihydroxycyclohexa-1,5-dien-carbonsäure
ACHC	2-Aminocyclohexancarbonsäure
ACPC	2-Aminocyclopentancarbonsäure
ADC	Aminodesoxychorismat
ADIC	Aminodesoxyisochorismat
AIBN	Azoisobuttersäurenitril
APC	3-Aminopyrrolidin-4-carbonsäure
AS	Aminosäure
Boc	<i>tert</i> -Butoxycarbonyl
BTM	Biotrockenmasse
Bz	Benzoyl
CHA	Cyclohexadienaminoalkohol
CHD	Cyclohexadiendiol
Cm	Chloramphenicol
DAD	Diodenarray-Detektor
DAHP	3-Deoxy-D-arabinoheptulose
dba	Dibenzylidenaceton
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en
DC	Dünnschichtchromatographie, -chromatogramm
DCHC	2,5-Diaminocyclohexancarbonsäure
dem.	demineralisiert
DHHA	Dihydrohydroxyanthranilat
DHQ	3-Dehydroquinat
DHS	3-Dehydroshikimat
DIBAL	Di- <i>iso</i> -butylaluminiumhydrid
DMAP	4-Dimethylaminopyridin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure

<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
E4P	Erythrose-4-phosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>ee</i>	Enantiomerenüberschuss
EE	Essigsäureethylester
EI	Elektronenstoß (<i>electron impact</i>)
EPSP	5-Enolpyruvyl-shikimat-3-phosphat
eq	Equivalent
GC	Gaschromatographie, -chromatogramm
ges.	gesättigt
Glc	Glucose
Gln	Glutamin
Glu	Glutamat
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie, -chromatogramm
HR-MS	Hochauflösende Massenspektrometrie, -spektrogramm
IBT	Institut für Biotechnologie
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
IR	Infrarot
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
<i>K. pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
konz.	konzentriert
LB	Luria-Bertani
LDH	Lactatdehydrogenase
max	maximal
<i>m</i> -CPBA	<i>meta</i> -Chlorperoxybenzoesäure
MM	Minimalmedium
MOM	Methoxymethyl
MS	Massenspektrometrie, -spektrum
NAD	Nicotin-adenin-dinukleotid (oxidierte Form)
NADH	Nicotin-adenin-dinukleotid (reduzierte Form)
NBS	<i>N</i> -Bromsuccinimid
NMR	Kernspinresonanz (<i>nuclear magnetic resonance</i>)
OD	Optische Dichte
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

<i>P. putida</i>	<i>Pseudomonas putida</i>
PAGE	Polyacrylamidgelelectrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PEP	Phosphoenolpyruvat
Ph	Phenyl
Phe	Phenylalanin
PLE	Schweineleberesterase (<i>pork liver esterase</i>)
Pyr	Pyridin
<i>rac</i>	racemisch
R_f	Retentionsfaktor
RP	Umkehrphase (<i>reversed phase</i>)
RT	Raumtemperatur
R_t	Retentionszeit
S3P	Shikimat-3-phosphat
Sac	Saccharose
Smp.	Schmelzpunkt
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
TASF	Tris(dimethylamino)sulfonium-difluortrimethylsilicat
TBAF	Tetrabutylammoniumfluorid
TBS	<i>tert</i> -Butyldimethylsilyl
TBS-OTf	<i>tert</i> -Butyldimethylsilyltriflat
TBT	Tributylzinn
TEOC	2-(Trimethylsilylethoxy)-carbonyl
TFA	Trifluoressigsäure
TFAA	Trifluoressigsäureanhydrid
THF	Tetrahydrofuran
THS	Thexyldimethylsilyl
T_m	Schmelztemperatur (Oligonukleotide)
TMS	Trimethylsilyl
TPP	Triphenylphosphat
Trp	Tryptophan
Tyr	Tyrosin
UV	Ultraviolett, -spektrum
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoyl- β -D-galactopyranosid

Symbole für verwendete Einheiten

bp	Basenpaar(e)
d	Tag(e)
Da	Dalton
Fd	Faraday
g	Gramm
h	Stunde(n)
Hz	Hertz
L	Liter
m	Meter
min	Minute(n)
rpm	Umdrehung pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
sec	Sekunde(n)
U	Unit

Symbole für verwendete Größen

α		Drehwert
c	[mol L ⁻¹]	Stoffkonzentration
J	[s ⁻¹]	Kopplungskonstante
λ	[nm]	Wellenlänge
T	[°C]	Temperatur
t	[sec, min, h, d]	Zeit

1 Einleitung

Bereits seit unseren ersten Erfahrungen mit Holzklötzen oder Legosteinen in unseren Kinderzimmern wissen wir, dass es oftmals einfacher und effizienter ist, ein komplexes Gebilde nicht als Ganzes zu erschaffen, sondern stattdessen zur Verfügung stehende kleinere Bausteine geschickt zu verknüpfen. In der Natur ist dieses Bausteinprinzip von zentraler Bedeutung. Aminosäuren beispielsweise dienen als Grundelemente für Proteine und Nukleinsäuren, und Monosaccharide werden zu Oligo- und Polysacchariden verbunden, die wiederum für den Aufbau von Zellwänden und Gewebestrukturen verwendet werden.

Auch in der organischen Synthesechemie ist das Zusammensetzen von vorgefertigten Elementen verbreitet. So werden bei Totalsynthesen von komplexen Verbindungen oftmals erst einzelne Bereiche des Zielmoleküls synthetisiert, ehe sie dann miteinander verknüpft werden. Besonders bei der Synthese von optisch aktiven Verbindungen ist das Zurückgreifen auf Substanzen aus dem *Chiral Pool* als Startverbindungen nicht wegzudenken (siehe Abbildung 1.1).

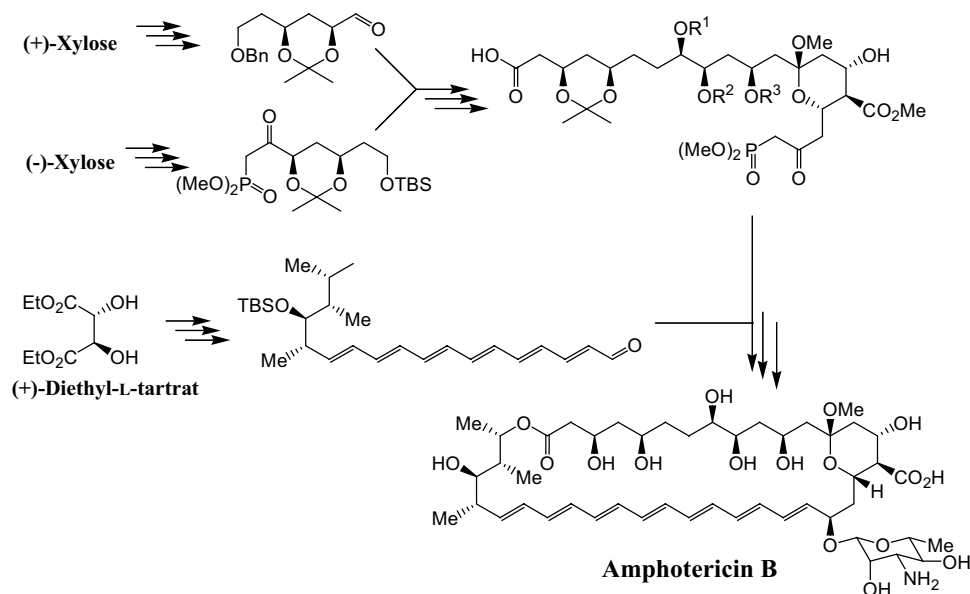


Abbildung 1.1: Totalsynthese von Amphotericin B als Beispiel für eine Naturstoffsynthese ausgehend von verschiedenen Synthesebausteinen des *Chiral Pool*.¹

So einfach dieses Prinzip auf den ersten Blick erscheinen mag, darf man eines nicht außer Acht lassen: Die Anwendbarkeit steht und fällt mit der Qualität und Verfügbarkeit von entsprechenden Bausteinen bzw. Startmaterialien.

Die Natur hat ihr Reservoir an Bauelementen im Zuge der Evolution zusammengestellt und ist beispielsweise in der Lage mit knapp zwei Dutzend chromosomal kodierter Aminosäuren eine Vielzahl von Biomolekülen mit unterschiedlichsten Funktionen herzustellen.

Da sich eine beachtliche Menge an Verbindungen aus natürlichen Quellen gewinnen lässt, bedient sich auch der Chemiker gerne dieser meist chiralen nicht racemischen Substanzen, um sie als Startmaterial in seinen Synthesen einzusetzen. Die Anzahl von kleinen, funktionalisierten Metaboliten, die als potentielle Synthesebausteine in Frage kommen, übersteigt aber bei weitem die Zahl der tatsächlich genutzten, da diese im Zellstoffwechsel sehr oft nur in geringen Konzentrationen auftreten und somit zunächst einmal nicht ohne weiteres in den benötigten Mengen zugänglich sind.

Enorme Fortschritte, insbesondere im Bereich der Molekularbiologie, haben in den letzten drei Dekaden neue Möglichkeiten eröffnet, enzymkatalysierte Umsetzungen für die Darstellung synthetisch schwer zugänglicher Verbindungen zu nutzen. Oft werden Biotransformationen als Werkzeug eingesetzt, wenn sie sich hinsichtlich ihrer Anwendbarkeit und Effizienz chemischen Umsetzungen als überlegen erweisen.² In anderen Fällen werden interessante Zellprodukte vollständig in genetisch veränderten Mikroorganismen hergestellt (*Metabolic Engineering*ⁱ).³ Auf diese Weise werden hochwertige Produkte, wie Aminosäuren, Vitamine oder pharmakologisch bedeutsame Proteine in industriellem Maßstab hergestellt.

Beim Einsatz einzelner, voneinander unabhängiger enzymatischer Schritte verzichtet man gänzlich auf die evolutive Optimierung von zusammenhängenden Biosyntheseschritten. Ein Nachteil der vollständigen Herstellung von Zielprodukten in genetisch veränderten Mikroorganismen liegt in der geringen Flexibilität des Produktspektrums. Welche Bedeutung diesem Punkt zuzuordnen ist, lässt sich einleuchtend am Beispiel der Antibiotika verdeutlichen. Verschiedenste Antibiotika wie zum Beispiel Aminoglykoside, Cephalosporine, Tetracycline und Penicilline werden durch biotechnologische Verfahren erzeugt. Nicht zuletzt durch die breite Anwendung der Mittel, sowohl im human- als auch im veterinärmedizinischen Bereich, wird das Auftreten von Resistenzstämmen in jüngster Zeit

ⁱ Der Begriff *Metabolic Engineering* wurde 1991 von J. E. Bailey eingeführt.^{3a} Dieses wissenschaftliche Arbeitsgebiet beschäftigt sich nach der ursprünglichen Definition mit der Verwendung von rekombinanter DNA zur Verbesserung der Enzym-, Regulations- und Transportaktivitäten in Zellen.

zu einem immer gravierenderen Problem und der Bedarf an neuen Medikamenten wächst. Sowohl für die Suche nach neuen Leitstrukturen, als auch für die spätere Produktion, bietet ein Bausteinsystem in diesem Fall eindeutige Vorteile hinsichtlich der Flexibilität, ohne dass auf die Vorteile von zusammenhängenden Biosynthesewegen verzichtet werden muss.

Durch eine Darstellung kleiner, hochfunktionalisierter und enantiomerenreiner Bausteine durch *Metabolic Engineering* und die anschließende Modifizierung und Verknüpfung dieser mit chemischen und biochemischen Methoden können synergistische Effekte beider Arbeitsgebiete aufgebaut und genutzt werden.

1.1 Zielsetzung der Arbeit

Die vorliegende Arbeit ist eingegliedert in das vom BMBF geförderte Projekt CHORUS (**Chor**ismat als **Un**iverseller **Syn**these**ba**ustein). Im Rahmen dieses Projektes sollen, durch Zusammenarbeit des Industriepartners DSM mit den Instituten IBT-1 und IBT-2 des Forschungszentrums Jülich, verschiedene funktionalisierte Cyclohexadiene (**2 - 5**),ⁱ die sich von Chorismat (**1**) ableiten, mikrobiell zugänglich gemacht und auf ihre Verwendbarkeit als chirale Synthesebausteine untersucht werden. Zusätzlich findet durch die Arbeitsgruppe von Dr. Sell (DECHEMA) eine Ökobilanzierung der Prozesse statt.



ⁱ Anmerkungen zur verwendeten Nomenklatur:

Im Folgenden werden die Verbindungen **2-5** nach einer vereinfachten Nomenklatur benannt, die nicht mit der IUPAC-Namensgebung übereinstimmt. Dabei werden die Aminoalkohole (5*S*,6*S*)-6-Amino-5-hydroxycyclohexa-1,3-dien-carbonsäure (**2**) und (3*S*,4*R*)-4-Amino-3-hydroxycyclohexa-1,5-dien-carbonsäure (**4**) als 2,3-*trans*-CHA bzw. 3,4-*trans*-CHA abgekürzt (CHA = Cyclohexadienaminoalkohol). Analog werden die Diole (5*S*,6*S*)-5,6-Dihydroxycyclohexa-1,3-dien-carbonsäure (**3**) und (3*S*,4*R*)-3,4-Dihydroxycyclohexa-1,5-dien-carbonsäure (**5**) als 2,3-*trans*-CHD bzw. 3,4-*trans*-CHD bezeichnet (CHD = Cyclohexadiendiol).

In der Literatur findet man **2** außerdem als Dihydrohydroxyanthranilat (DHHA) sowie **3** und **5** als 2,3-Dihydroxy-2,3-dihydrobenzoesäure (2,3-DH-2,3-DHB) bzw. 3,4-Dihydroxy-3,4-dihydrobenzoesäure (3,4-DH-3,4-DHB).

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es durch Stoffflussderegulierung (*Metabolic Engineering*)³ einen auf *Escherichia coli* basierenden mikrobiellen Zugang zum 2,3-*trans*-CHA (**2**) zu entwickeln, der eine Produktion ausgehend von Glucose als nachwachsendem Rohstoff ermöglicht. Im Anschluss daran soll die fermentativ gewonnene Substanz durch ein geeignetes Verfahren aus dem Produktionsmedium isoliert und bei Bedarf gereinigt werden.

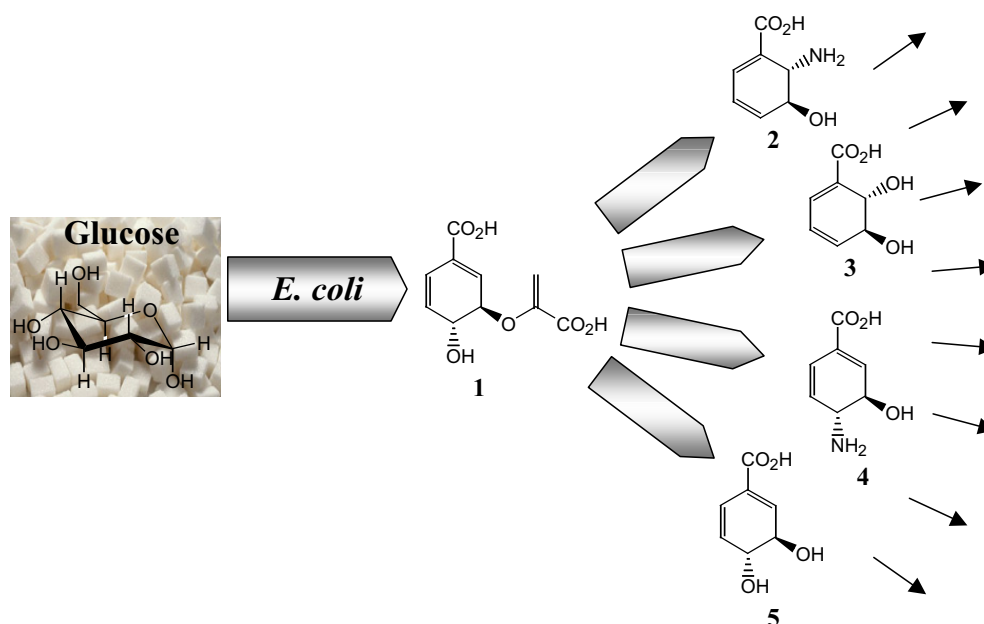


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung der Gewinnung von funktionalisierten Cyclohexadienen mit *E. coli* ausgehend von nachwachsenden Rohstoffen, wie Glucose.

Sowohl der so erhaltene Aminoalkohol **2**, als auch das entsprechende Diol **3**, für das in unserer Arbeitsgruppe bereits ein mikrobieller Zugang erarbeitet wurde, sollen exemplarisch für chemische Synthesen eingesetzt und ihre Nutzbarkeit als chirale nicht racemische Synthesebausteine demonstriert werden. Neben den Umsetzungen, die beispielhaft das Synthesepotenzial der funktionalisierten Cyclohexadiene in verschiedenen Reaktionstypen zeigen, sollen die Substanzen gezielt für Naturstoff- und Wirkstoffsynthesen eingesetzt werden.

Insgesamt soll mit dieser Arbeit die Grundlage geschaffen werden, mikrobiell dargestelltes **2** und **3** als *Chiral Pool*-Verbindungen in der organischen Synthese allgemein einzusetzen.

2 Allgemeiner Teil

2.1 Der Shikimat-Biosyntheseweg

Der Shikimat-Biosyntheseweg (siehe Abbildung 2.1) geht aus von der Synthese von 3-Deoxy-D-arabino-heptulosonat-7-phosphat (DAHP) aus Erythrose-4-phosphat (E4P) und Phosphoenolpyruvat (PEP) die katalysiert wird durch die DAHP-Synthase.

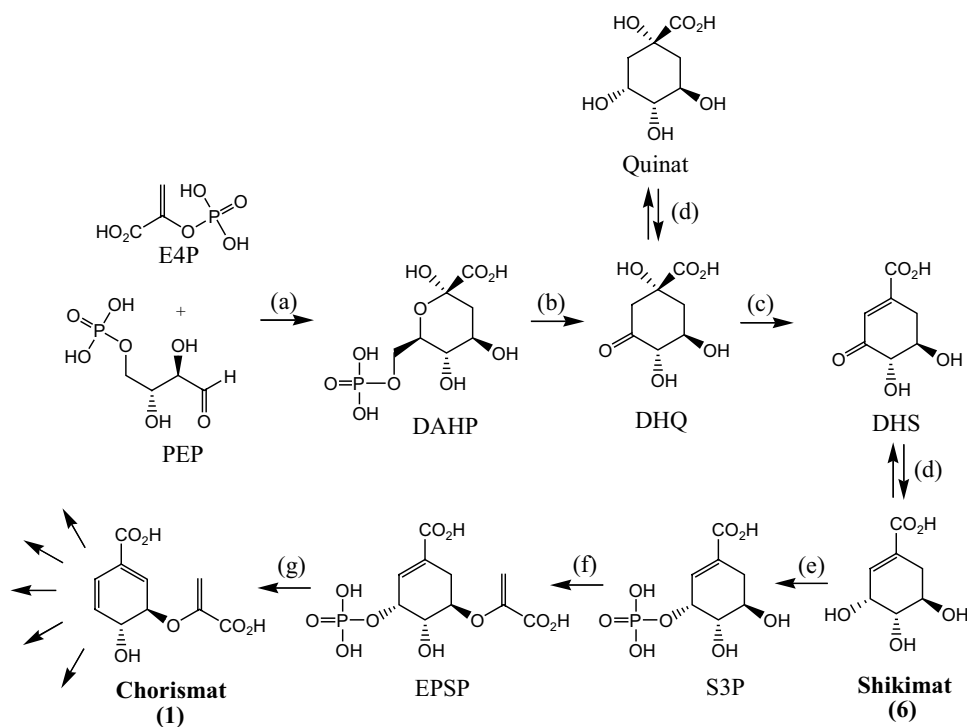


Abbildung 2.1: Hauptstrang des Shikimat-Biosyntheseweges in *E. coli*. Auftretende Metabolite: Erythrose-4-phosphat (E4P); Phosphoenolpyruvat (PEP); 3-Desoxy-D-arabino-heptulosonat-7-phosphat (DAHP), 3-Dehydroquinat (DHQ); 3-Dehydroshikimat (DHS); Shikimat (6); Shikimat-3-phosphat (S3P); 5-Enolpyruvyl-shikimat-3-phosphat (EPSP); Chorismat (1). Beteiligte Enzyme: (a) DAHP-Synthase; (b) DHQ-Synthase; (c) DHQ-Dehydratase; (d) Shikimatdehydrogenase; (e) Shikimatkinase; (f) EPSP-Synthase; (g) Chorismatsynthase.

In drei weiteren Biosyntheseschritten wird Shikimat (6) synthetisiert, welches als erstes Produkt dieses Stoffwechselweges aus Pflanzenmaterial (*Illicium religiosum*, auf japanisch:

Shikimi-no-ki) isoliert werden konnte und somit zu dessen Namensgeber wurde.⁴ Durch Phosphorylierung, Addition eines weiteren Pyruvatrestes und anschließende Dephosphorylierung wird Chorismat (**1**) erzeugt.

Dieser Biosyntheseweg besitzt in höheren Pflanzen und Mikroorganismen (Bakterien und Pilzen) eine Schlüsselrolle in der Synthese von aromatischen Verbindungen. Das Fehlen dieses Weges bei Menschen und Tieren macht ihn zu einem interessanten Ansatzpunkt für die Entwicklung von Herbiziden, Fungiziden und Antibiotika.⁵

2.1.1 Chorismat als Verzweigungspunkt in der Biosynthese

Insgesamt ist der Shikimat-Biosyntheseweg mehrfach verzweigt. Chorismat stellt dabei die letzte gemeinsame Vorstufe für eine Vielzahl von Primär- und Sekundärmetaboliten dar. Ausgehend von Chorismat (**1**) werden unter anderem die drei für den Menschen essentiellen, proteinogenen, aromatischen Aminosäuren Phenylalanin (Phe), Tyrosin (Tyr) und Tryptophan (Trp) dargestellt. Außerdem führen Stoffwechselwege zu Folaten, verschiedenen Chinonen und einer Fülle von meist aromatischen Sekundärmetaboliten (siehe Abbildung 2.2).^{5,6}

Die Verwertung von Chorismat (**1**) von fünf verschiedenen Enzymen im Primärmetabolismus und weiteren im Sekundärmetabolismus, sowie die sich daraus ergebende große Anzahl von Produkten zeigt eindeutig, dass **1** vom evolutiven Standpunkt aus gesehen nicht für die Synthese eines einzelnen Endproduktes bestimmt ist. Vielmehr dient es als vielseitig verwendbare Vorstufe, die einerseits zwar bereits eine hohe Funktionalisierung zeigt, andererseits aber auch noch die synthetische Flexibilität in ihrer Struktur aufweist, die es ermöglicht, unterschiedliche Reaktionen einzugehen und so zu der entsprechenden Produktvielfalt zu gelangen.

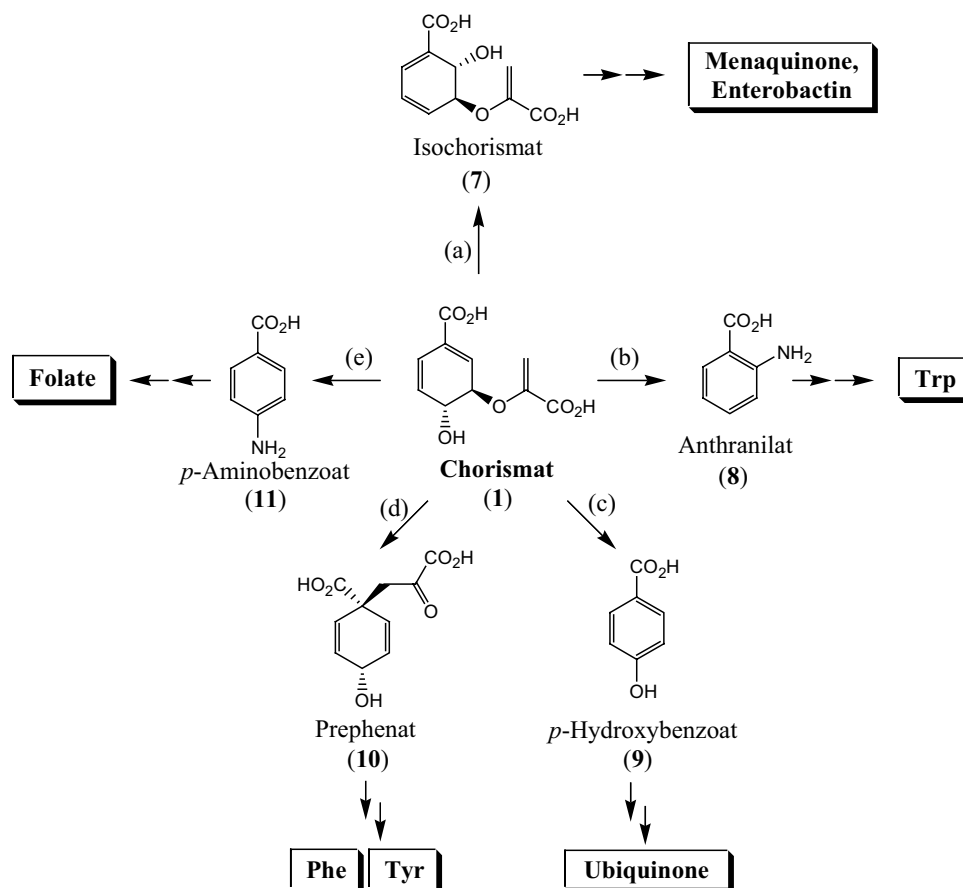


Abbildung 2.2: Enzyme im Primärmetabolismus von Mikroorganismen und Pflanzen, die Chorismat als Substrat akzeptieren: (a) Isochorismatsynthese, (b) Anthranilatsynthese, (c) Chorismatlyase, (d) Chorismatmutase und (e) *para*-Aminobenzoatsynthese.

2.1.2 Von Chorismat abgeleitete funktionalisierte Cyclohexadiene

Chorismat (1) stellt im Zellstoffwechsel eine Vorstufe zu vielen aromatischen Produkten dar.⁷ Die unmittelbaren Folgeprodukte in verschiedenen abzweigenden Biosynthesewegen sind jedoch oft strukturell verwandte Cyclohexadienderivate (siehe Abbildung 2.3).

Zu den von 1 abgeleiteten Metaboliten gehört beispielsweise Isochorismat (7), welches in Enterobakterien, zu denen auch *E. coli* gehört, als Intermediat in der Biosynthese des Eisenchelators (Siderophor) Enterobactin aus Chorismat gebildet wird. 7 selbst wird unter Spaltung des Enolpyruvylrestes zur (5*S*,6*S*)-Dihydroxycyclohexa-1,3-dien-carbonsäure (2,3-*trans*-CHD, 3) umgesetzt.

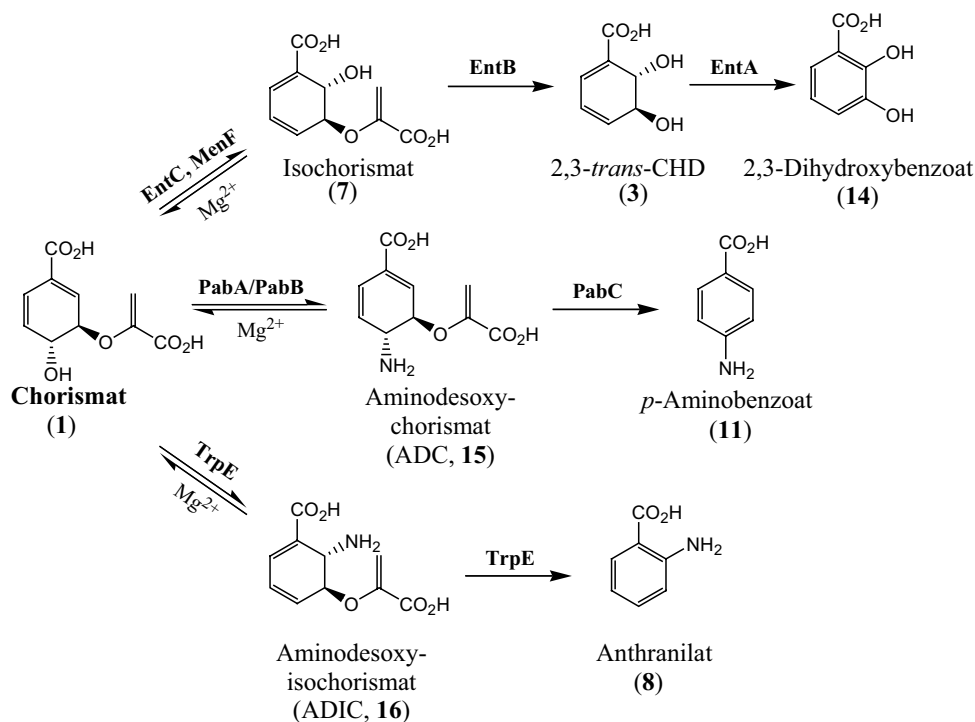


Abbildung 2.3: Von Chorismat (1) abgeleitete, funktionalisierte Cyclohexadiene im Stoffwechsel von *E. coli*. Beteiligte Enzyme: Isochorismatsynthase (EntC, MenF), Isochorismatase (EntB), 2,3-Dihydroxybenzoatsynthase (EntA), Glutaminamidotransferase (PabA), ADC-Synthase (PabB), ADC-Pyruvatlyase (PabC), Anthranilatsynthase (TrpE)

In der Biosynthese der Folate tritt als Vorstufe zum *para*-Aminobenzoat (11), Aminodesoxy-chorismat (ADC, 15) auf, welches formal durch Substitution der 4-ständigen Hydroxygruppe durch eine Aminogruppe aus 1 erhalten wird. Aminodesoxyisochorismat (ADIC, 16), welches das entsprechende Aminoanalogon zu Isochorismat (7) darstellt, wird ebenfalls direkt aus 1 gewonnen und stellt als Vorstufe zu Anthranilat (8) ein Intermediat in der Biosynthese von Tryptophan dar.

Durch formale Spaltung des Enolpyruvylrestes von Chorismat (1), Isochorismat (7), ADC (15) und ADIC (16) gelangt man zu einem Satz von funktionalisierten Cyclohexadienen, die die Basis für ein von M. Müller entwickeltes Konzept zur biotechnologischen Darstellung von chiralen Synthesebausteinen, ausgehend von 1 bilden, welches Grundlage für das CHORUS-Projekt ist (siehe Kapitel 1.1).⁸

2.1.3 Biotechnologisch produzierte Synthesebausteine aus dem gemeinsamen Shikimat-Biosyntheseweg.

Die strukturellen Eigenschaften, die die Intermediate des gemeinsamen Shikimatweges⁹ bis zum Chorismat aufweisen, machen sie als Ausgangsmaterial für chemische Synthesen interessant. Bis zum Shikimat-3-phosphat treten ausschließlich C7-Verbindungen auf, die auf einem sechsgliedrigen Ring als Grundelement basieren. Durch ihren hohen Grad an Hydroxylierungen am Ringsystem zeigen sie eine Verwandtschaft zu Zuckermolekülen und bieten sich daher beispielsweise für den Aufbau von Kohlenhydratmimetika an. Das wachsende synthetische Interesse an den Substanzen bedeutet gleichzeitig einen Bedarf an geeigneten Methoden der Darstellung.¹⁰ Durch Anwendung von Methoden des *Metabolic Engineering* konnten vor allem durch die Arbeiten von Frost *et al.*, auf genetisch veränderten *E. coli* basierende Verfahren zur Produktion dieser Materialien entwickelt werden, die die bis dahin verbreitete Isolierung aus Pflanzenmaterial in ihrer Bedeutung zurückdrängte.¹¹

Tabelle 2.1: Biotechnologische Produktion von Metaboliten des gemeinsamen Shikimatweges:

Produkt	maximale Endkonzentration [g·L ⁻¹]	Organismus	Arbeitsgruppe
DAHP	16	<i>E. coli</i>	Liao <i>et al.</i> (1994) ¹²
DHQ	12	<i>E. coli</i>	Frost <i>et al.</i> (2002) ¹³
Quinat	60	<i>E. coli</i>	Frost <i>et al.</i> (1999) ¹⁴
DHS	69	<i>E. coli</i>	Frost <i>et al.</i> (2003) ¹⁵
Shikimat	87	<i>E. coli</i>	Frost <i>et al.</i> (2003) ¹⁶

Der durch diese Prozesse deutlich verbesserte Zugang und die damit verbundene teilweise kommerzielle Verfügbarkeit¹⁷ ermöglichen den Einsatz in Naturstoff- und Wirkstoffsynthesen, sowohl im Labormaßstab, als auch im industriellen Maßstab. Zu den bedeutendsten Anwendungen gehören die Synthesen des Anti-Influenza Neuraminidase-inhibitors Oseltamivirphosphat (GS-4104-02, TamifluTM) sowie dessen Analoga (siehe Abbildung 2.4). Ausgehend von Quinat oder Shikimat (6) konnten verschiedene Syntheserouten erarbeitet werden, die mittlerweile als Grundlage für die großtechnische Produktion von TamifluTM bei der Firma ROCHE dienen.¹⁸

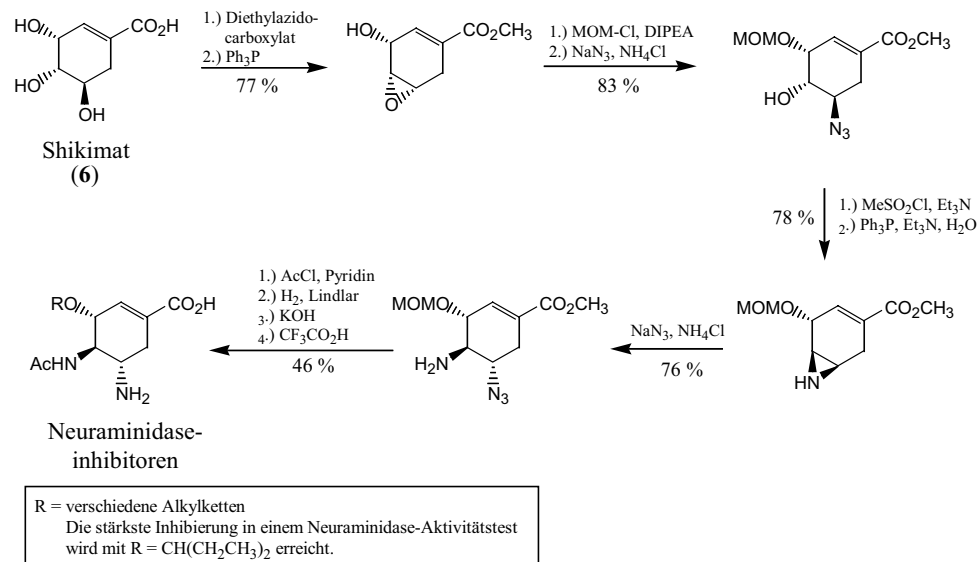


Abbildung 2.4: Synthese von Neuraminidaseinhibitoren nach Kim *et al.*^{18a,19}

Vor allem Quinat und Shikimat (**6**) wurden in verschiedenen Synthesen als chirale Startverbindungen eingesetzt.²⁰ Das Potenzial dieser Substanzen wird durch die Arbeiten von Schreiber *et al.* unterstrichen. Ausgehend von **6** konnte durch Festphasensynthese eine Produktbibliothek mit mehr als zwei Millionen Substanzen aufgebaut werden, die als Modell für das Konzept der diversitätsorientierten organischen Synthese gilt.²¹ Dass sogar über eine Verwendung solcher Bausteine bei der Darstellung von Massenchemikalien nachgedacht werden kann, zeigt eine Phenolsynthese von Frost *et al.* (siehe Abbildung 2.5).²² Dieses Beispiel demonstriert außerdem den an Bedeutung gewinnenden Aspekt der *grünen Chemie*, indem Cumol, als auf Rohöl basierende, giftige Chemikalie, die für die Hock'sche Phenolsynthese eingesetzt wird, durch Glucose als nachwachsende Rohstoffquelle ersetzt werden kann.

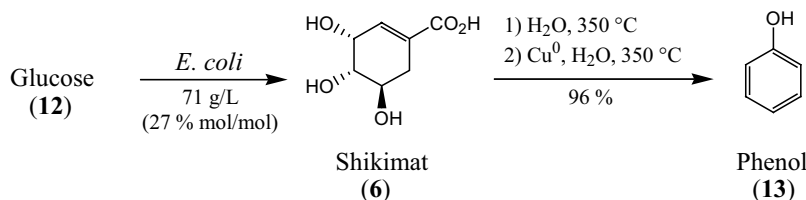


Abbildung 2.5: Phenolsynthese über Shikimat (**6**), als Beispiel für eine nachhaltige Darstellung von Massenchemikalien.

Vom organisch synthetischen Standpunkt aus gesehen zählt Chorismat (**1**) mit seinem hochfunktionalisierten Cyclohexadiensystem sicherlich zu den interessantesten Bausteinen des Shikimat-Biosyntheseweges. Bislang beschränkt sich die Verwendung jedoch nahezu ausschließlich auf biochemische Untersuchungen wie beispielsweise die Aufklärung von Biosynthesewegen.²³ Zurückzuführen ist das bislang fehlende synthetische Interesse an **1** auf die unzureichende Verfügbarkeit der Substanz. Zwar existiert bereits seit den 60er Jahren ein mikrobieller Zugang, allerdings weist dieser, genau wie alle weiteren bislang entwickelten biotechnologischen und chemischen Zugänge eine hohe Komplexität sowie geringe Ausbeuten und Reinheit auf.

Tabelle 2.2: Biotechnologische und chemische Zugänge zu Chorismat (**1**):

Arbeitsgruppe	Max. Konzentrationen bzw. Ausbeuten	Verfahren
Gibson ²⁴	0.4 g·L ⁻¹	mikrobiell (<i>Klebsiella pneumoniae</i>)
Turnbull ²⁵	0.9 g·L ⁻¹	mikrobiell (<i>Klebsiella pneumoniae</i>)
Hilvert ²⁶	0.6 g·L ⁻¹	mikrobiell (<i>E. coli</i>)
Berchtold ²⁷	7 %	chem. Synthese
Ganem ²⁸	8 %	chem. Synthese
Posner ²⁹	< 1 %	chem. Synthese (rac.)

Zwar ist Chorismat (**1**) auch kommerziell erhältlich, allerdings verhindert der bislang hohe Preis eine entsprechende Nutzung.³⁰

2.2 Funktionalisierte Cyclohexadiendiole

2.2.1 Cyclohexadiendiole durch Biotransformation

Cyclohexadiendiole treten im Stoffwechsel vor allem als Oxidationsprodukte von aromatischen Verbindungen auf. In Eukaryonten werden Aromaten durch Einfluss von Monooxygenasen zunächst zum Arenoxid oxidiert, ehe durch Reaktion mit Epoxidhydrolasen das entsprechende *trans*-CHD gebildet wird (siehe Abbildung 2.6). So konnten nach Injektion von Chlorbenzen in den Blutkreislauf von Kaninchen *trans*-CHD als deren Abbauprodukte in der Leber identifiziert werden.³¹ Eine Nutzung dieser Biosyntheseschritte für einen biotechnologischen Prozess ist jedoch bislang nicht möglich.

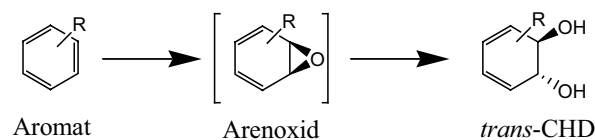


Abbildung 2.6: Oxidativer Abbau von Aromaten in Eukaryonten.

Im Gegensatz dazu stellt der oxidative Abbau von Aromaten in Prokaryonten die Grundlage für ein breit angewandtes Verfahren für die Gewinnung von enantiomerenreinen *cis*-CHD dar. Im Jahre 1968 veröffentlichte Studien von Gibson *et al.* zeigen, dass ein Stamm des Bodenbakteriums *Pseudomonas putida* (heute als F1-Stamm bezeichnet) aromatische Kohlenwasserstoffe als Kohlenstoffquelle zu verwerten in der Lage ist. Als Oxidationsprodukte wurden die entsprechenden Catechole und *cis*-CHD isoliert und als Intermediate im Stoffwechsel von *P. putida* identifiziert (siehe Abbildung 2.7).³²

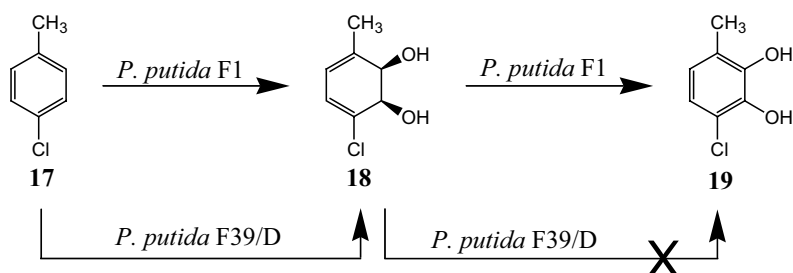


Abbildung 2.7: Abbau von *p*-Chlortoluen (**17**) zu **19** über das entsprechende *cis*-CHD **18** in *P. putida* F1. Eine fehlende Dehydrogenaseaktivität in *P. putida* F39/D verhindert eine Rearomatisierung von **18** zum Catechol **19** und führt zur Akkumulation des Metaboliten.

Weiterführende Studien zeigten, dass eine Mutante des F1-Stammes (F39/D) eine Defizienz der *cis*-Diol-Dehydrogenase aufweist, wodurch verschiedene *cis*-CHD mikrobiell gewonnen werden können. Auf dieser Grundlage konnten Biotransformationsprozesse entwickelt werden, die einen effizienten enantioselektiven Zugang zu unterschiedlich substituierten *cis*-CHD ermöglichen. Heute sind verschiedene, durch Ganzzellbiotransformation dargestellte *cis*-CHD kommerziell erhältlich und können als Synthesebausteine vielseitig eingesetzt werden.³³

Neben dem Auftreten von Cyclohexadiendiolen mit *trans*-ständigen Hydroxygruppen als Abbauprodukte von Aromaten in Säugetieren, Pflanzen und Pilzen konnten funktionalisierte

trans-CHD auch als Zwischenprodukte in der Aromatenbiosynthese von Bakterien identifiziert werden.

Young *et al.* konnten erstmals zeigen, dass **3** ein Intermediat in der Biosynthese von Siderophoren in *Klebsiella pneumoniae*-Stämmenⁱ ist.³⁴ Auch das entsprechende 3,4-*trans*-CHD (**5**) konnte durch Umsatz von Chorismat (**1**) mit Zellextrakt von *K. pneumoniae* erhalten werden.^{23a,35} Allerdings ist eine Funktion von **5** im Stoffwechsel weder bei *K. pneumoniae* noch in *E. coli* bekannt.

Nach Identifizierung und Charakterisierung der *E. coli* Gene und Enzyme des Enterobactin-Biosyntheseweges durch McIntosh *et al.*³⁶ und Walsh *et al.*^{23d,37} konnten Leistner *et al.*³⁸ erstmals eine Exkretion von 2,3-*trans*-CHD (**3**) und 3,4-*trans*-CHD (**5**) ins Kultivierungsmedium erreichen. Mit dem *K. pneumoniae*-Stamm 62-1, der Defizienzen in der Biosynthese der aromatischen Aminosäuren enthält, konnten **3** und **5**, bei Überexpression der entsprechenden Gene des Enterobactin-Biosyntheseweges, in Konzentrationen von 0.2 g·L⁻¹ bzw. 0.15 g·L⁻¹ im Fermentationsüberstand nachgewiesen und isoliert werden.

Aufbauend auf den Ergebnissen von Leistner *et al.* konnten Müller *et al.* ein Verfahren zur biotechnologischen Produktion sowohl von **3** als auch von **5** in *E. coli*-Stämmen etablieren.³⁹

Durch chromosomale Deletion des Gens *entA*, was für 2,3-Dihydroxybenzoat-Synthase kodiert, wurde im *E. coli*-Stamm AN193, der bereits Defekte in der Aromatenbiosynthese aufweist, der metabolische Fluss hinter **3** unterbrochen (siehe Abbildung 2.8). Bei gleichzeitiger Überexpression von plasmidisch kodiertem *entC* und *entB* konnte eine Produktkonzentration von **3** von 4.6 g·L⁻¹ (27 mM) bei einer maximalen Produktbildungsrate von 48 mg·h⁻¹·g(BTM)⁻¹ erreicht werden.

Zur mikrobiellen Herstellung des für *E. coli* nicht natürlichen **5** reicht eine plasmidische Überproduktion von EntB (siehe Abbildung 2.9), wenn ein genügend hoher Chorismat-Pool in den Zellen vorhanden ist. Weiterführende Arbeiten zeigen, dass bei Optimierung der Fermentationsbedingungen Produktkonzentrationen von mehr als 10 g·L⁻¹ für beide Produkte, ohne nennenswerte Anreicherung anderer Stoffwechselprodukte aus der Aromatenbiosynthese, unabhängig voneinander erreicht werden können.⁴⁰ Damit steht erstmals ein Verfahren zur Verfügung, dass es ermöglicht, größere Mengen von mikrobiell gewonnen *trans*-CHD zugänglich zu machen und für synthetische Zwecke einzusetzen.

ⁱ In den Veröffentlichungen aus dem Jahre 1969 wird *Klebsiella pneumoniae* noch als *Aerobacter aerogenes* bezeichnet.

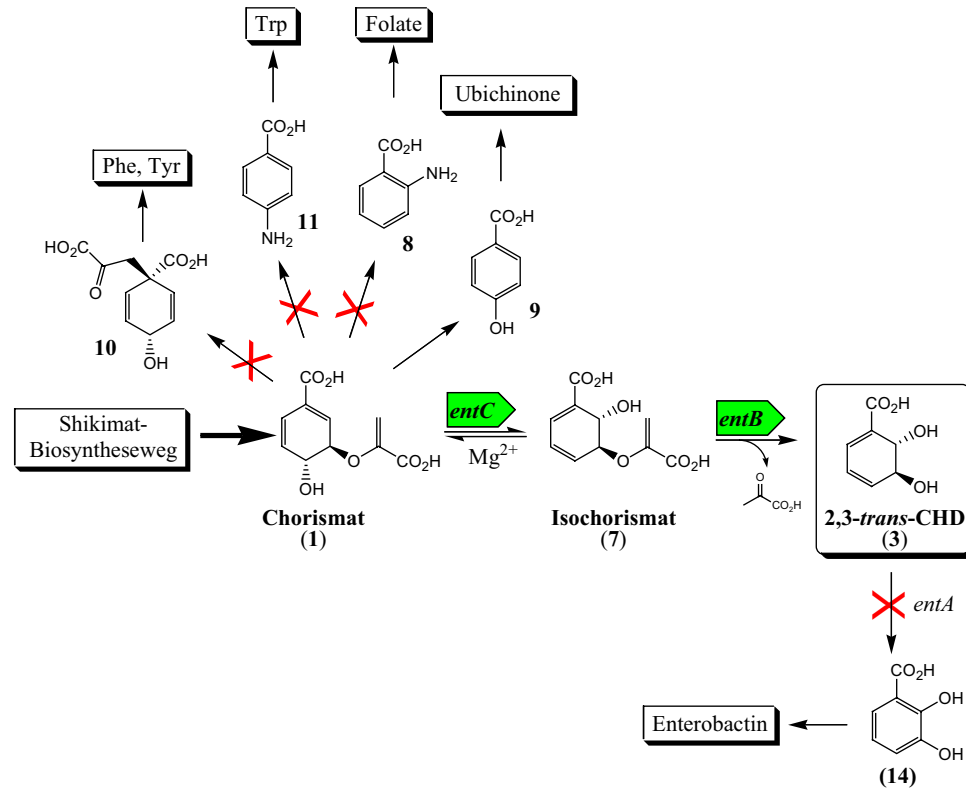


Abbildung 2.8: Strategie zur mikrobiellen Produktion von 2,3-trans-CHD (3); überproduzierte Enzyme: Isochorismatsynthase (EntC), Isochorismatase (EntB).

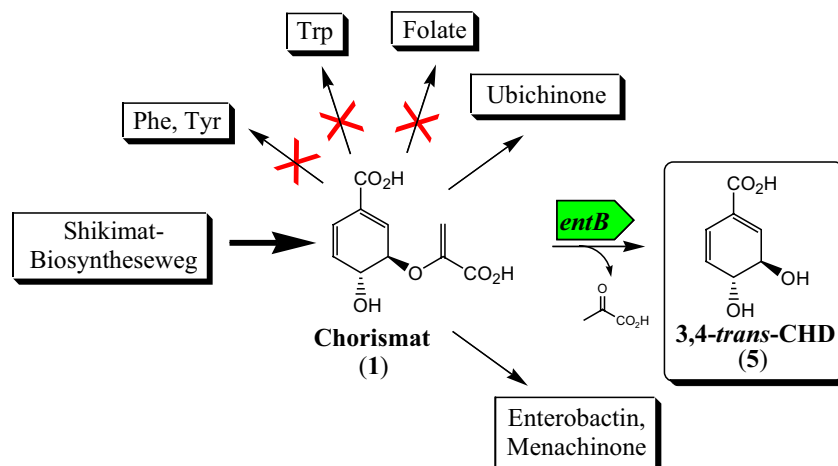


Abbildung 2.9: Strategie zur mikrobiellen Produktion von 3,4-trans-CHD (5); überproduzierte Enzyme: Isochorismatase (EntB).

2.2.2 Cyclohexadiendiole durch chemische Synthesen

Sowohl das synthetische Potenzial von enantiomerenreinen, funktionalisierten Cyclohexadiendiolen, als auch deren Vorkommen in der Biosynthese sorgen für einen erhöhten Bedarf an diesen Verbindungen. Durch den effizienten und lange etablierten mikrobiellen Zugang zu *cis*-CHD über Ganzzellbiotransformation, gibt es wenige Arbeiten zu deren synthetischer Darstellung.⁴¹

Im Gegensatz dazu gibt es verschiedene Ansätze zur Synthese von funktionalisierten Cyclohexadien-*trans*-diolen. Eine direkte Methode zur Darstellung beruht auf der Hydrolyse von Enolpyruvylverbindungen wie Chorismat (**1**) und Isochorismat (**7**), die in geringen Mengen aus biologischen Umsetzungen gewonnen werden können. Young *et al.* konnten bereits 1969 zeigen, dass **1** unter sauren Reaktionsbedingungen zu **5** hydrolysiert wird (siehe Abbildung 2.10).^{35a}

Obwohl Chorismat (**1**) kommerziell erhältlich ist, kommt dieser Methode der Darstellung keine große synthetische Bedeutung zu. Neben dem hohen Preis von Chorismat sind die geringe Ausbeute und die entstehenden aromatischen Nebenprodukte sowie die damit verbundene erschwerte Reinigung von Nachteil. Zwar ist es prinzipiell möglich den Enolpyruvylrest enzymatisch abzuspalten, jedoch erscheint es für diesen Fall sinnvoller, den Stofffluss eines Mikroorganismus so zu verändern, dass die Umsetzung von Chorismat direkt in der Zelle stattfindet.

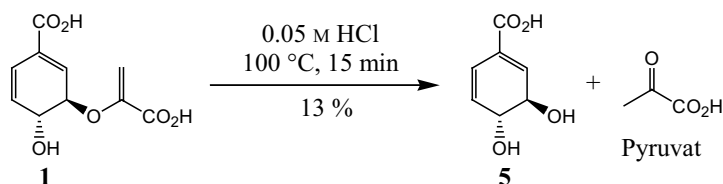


Abbildung 2.10: Hydrolyse von Chorismat (**1**) zur Darstellung von **5** nach Young.^{35a}

Ein weiteres, ebenfalls auf einen biologischen Prozess aufbauendes Verfahren ist die Herstellung von *trans*-Diolen aus mikrobiell gewonnenen *cis*-Verbindungen durch Inversion eines Stereozentrums. Dabei wird gezielt die Konfiguration an einem der beiden Stereozentren umgekehrt (*diastereomeric switch*). Der Vorteil von Synthesen die sich dieses Prinzip zu nutzen machen, ist die gut zugängliche Produktpalette von Ausgangsmaterialien auf die

zurückgegriffen werden kann und die chirale Information in den Startverbindungen, die genutzt werden kann, um die Syntheseschritte enantioselektiv durchzuführen.

Ausgehend von kommerziell erhältlichem *cis*-Diol **22** konnten Boyd *et al.* das Bromsubstituierte *trans*-CHD **25** durch Inversion eines Stereozentrums *via* Mitsunobu-Reaktion⁴² mit einer Gesamtausbeute von 48 % erhalten (siehe Abbildung 2.11a).⁴³

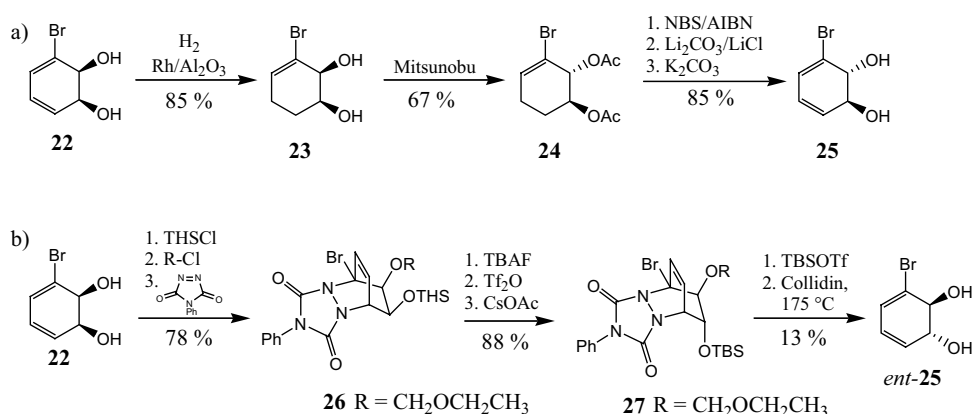


Abbildung 2.11: Darstellung von *trans*-CHD **25** und *ent*-**25** aus *cis*-CHD **22** durch Inversion eines Stereozentrums (*diastereomeric switch*). (a) Verfahren nach Boyd *et al.* (b) Synthese nach Hudlicky *et al.*⁴⁴

Mittels Schützung des Diensystems durch eine reversible Hetero-Diels-Alder-Reaktion konnten Hudlicky *et al.* in einer achtstufigen Synthese, ebenfalls ausgehend von **22**, zum Enantiomer von **25** mit einer Gesamtausbeute von 8 % gelangen (siehe Abbildung 2.11b).

Zu einem veränderten Substitutionsmuster gelangten Boyd *et al.* ausgehend von **28** durch formale Verschiebung des Chlorsubstituenten bei gleichzeitiger Inversion eines Stereozentrums (siehe Abbildung 2.12).⁴⁵

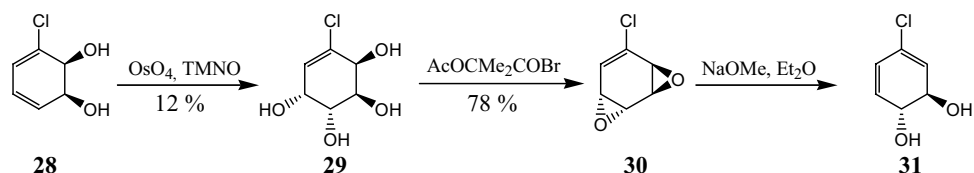


Abbildung 2.12: Darstellung von *trans*-CHD **31** unter formaler Verschiebung eines Chlorsubstituenten über eine Bisepoxid-Zwischenstufe nach Boyd.⁴⁵

Neben den auf biologischen Prozessen aufbauenden Synthesen wurden weitere Syntheserouten zur Darstellung von *trans*-CHD erarbeitet. Eine erste erfolgreiche Totalsynthese von racemischem **3** und **5** gelangten Berchtold *et al.* Anfang der 1970er Jahre (siehe Abbildung 2.13). Durch eine Diels-Alder-Reaktion und darauffolgende Funktionalisierung des entstehenden Cyclohexadiensystems kann racemisches **3** mit einer Gesamtausbeute von 5 % erhalten werden.⁴⁶

Eine enantioselektive Darstellung von *trans*-CHD ist jedoch über diese Route nicht möglich, da das als Zwischenstufe auftretende Arenepoxid **37** Valenztautomerie mit dem entsprechenden Oxepin **38** aufweist und es so zu spontaner Racemisierung kommt.

Eine Totalsynthese von racemischem 3,4-*trans*-CHD (*rac*-**5**) konnte in der gleichen Arbeitsgruppe ausgehend von *trans*-1,2-Dihydrophthalsäure (**38**) in sieben Reaktionsschritten und mit einer Ausbeute von 20 % dargestellt werden (siehe Abbildung 2.14).⁴⁷

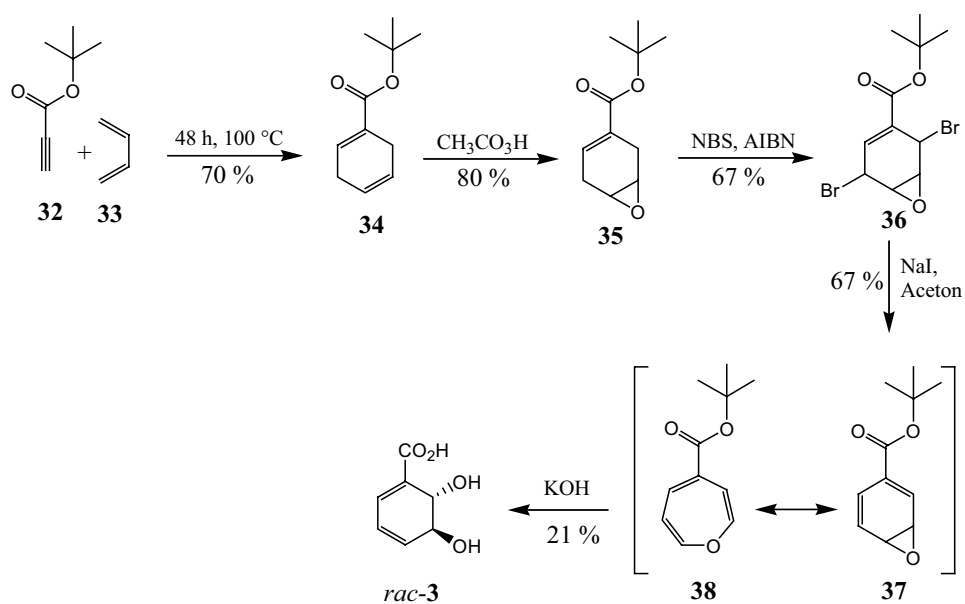


Abbildung 2.13: Synthese von *rac*-2,3-*trans*-CHD (*rac*-**3**) nach Berchtold *et al.*

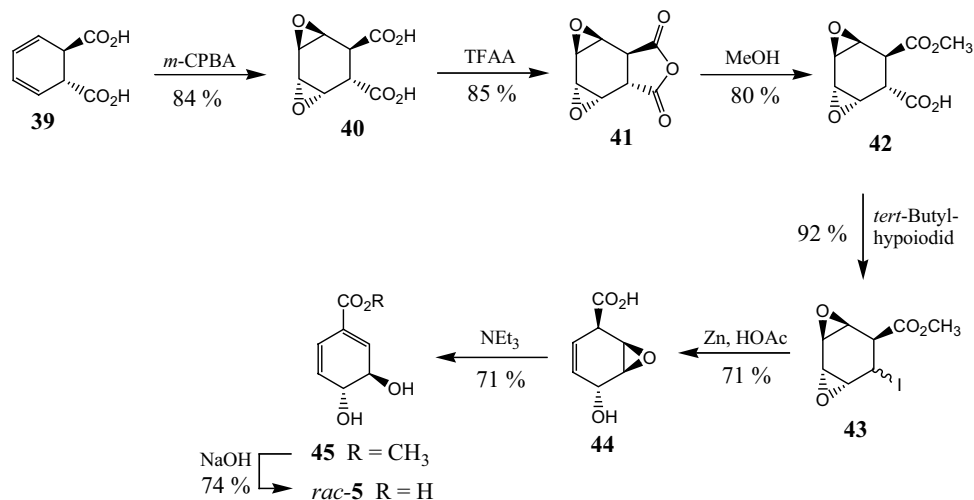


Abbildung 2.14: Totalsynthese von *rac*-3,4-*trans*-CHD (*rac*-5) nach Berchtold *et al.*

Weitere synthetische Zugänge zu **3** und **5** bzw. deren geschützten Derivaten wurden in verschiedenen weiteren Arbeitsgruppen erarbeitet (siehe Tabelle 2.3).

Tabelle 2.3: Totalsynthesen von *trans*-CHD und deren Derivaten. (*rac* = racemische Synthesen, *ent* = enantioselective Synthesen)

Produkt	Arbeitsgruppe		Reaktionsstufen (Ausbeute)
(<i>rac</i>) 2,3- <i>trans</i> -CHD	Berchtold	(1974)	5 (5 %)
(<i>rac</i>) 2,3- <i>trans</i> -CHD ^a	Schlessinger ⁴⁸	(1981)	7 (26 %)
(<i>ent</i>) 2,3- <i>trans</i> -CHD ^a	Ogawa ⁴⁹	(1985)	7 (9 %)
(<i>ent</i>) 2,3- <i>trans</i> -CHD ^{a,b}	Shing ^{20b}	(1996)	12 (13 %)
(<i>rac, ent</i>) 2,3- <i>trans</i> -CHD ^{b,c}	Trost ⁵⁰	(1998)	4 (36 %)
(<i>rac</i>) 3,4- <i>trans</i> -CHD	Berchtold	(1974)	6 (7 %)
(<i>rac</i>) 3,4- <i>trans</i> -CHD	Ganem ⁵¹	(1978)	6 (11 %)
(<i>rac</i>) 3,4- <i>trans</i> -CHD	Posner ^{29,52}	(1987)	9 (8 %)
(<i>rac</i>) 3,4- <i>trans</i> -CHD	Roberts ⁵³	(1996)	3 (14 %)

^a Carbonsäuregruppe ist zum Alkohol reduziert.

^b Hydroxylgruppen sind geschützt.

^c Carbonsäuregruppe liegt als Ester vor.

Alle bekannten synthetischen Methoden zur Darstellung funktionalisierter Cyclohexadien-*trans*-diole lassen eine breite Anwendung der Substanzen als chirale Synthesebausteine nicht zu. Durch komplizierte Mehrstufensynthesen, fehlende oder geringe Enantioselektivität und geringe Gesamtausbeuten ist ein einfacher Zugang, der Voraussetzung für eine breite Anwendung ist, nicht vorhanden.

2.2.3 Cyclohexadiendiole in der Natur- und Wirkstoffsynthese

Der effektive Zugang zu funktionalisierten homochiralen *cis*-CHD, sowie die kommerzielle Verfügbarkeit solcher Verbindungen haben zu einer vielseitigen Anwendung der Substanzen als Ausgangsmaterialien in verschiedenen Natur- und Wirkstoffsynthesen geführt. Arbeitsgruppen, wie die von Ley, Banwell, Carless und Hudlicky konnten in einer Vielzahl von Synthesen eindrucksvoll die Bandbreite der Einsetzbarkeit von *cis*-CHD unter Beweis stellen. In idealer Weise bieten sich *cis*-CHD für einen einfachen Zugang zu Cyclitolen an. Neben den Conduritolen A-F⁵⁴ konnten verschiedene Conduramine⁵⁵ und Inositol,⁵⁶ sowie Analoga⁵⁷ zugänglich gemacht werden (siehe Abbildung 2.15).^{33,58}

Neben den Synthesen der strukturell eng verwandten Cyclitole konnten mikrobiell gewonnene *cis*-CHD auch als Ausgangspunkt für Totalsynthesen von komplexen Strukturen eingesetzt werden. Hudlicky *et al.* konnten unter anderem die Alkaloide Trihydroxyheliotridan,⁵⁹ Lycoricidin,⁶⁰ Kifunensin,⁶¹ und Pancratistatin⁶² darstellen. In der gleichen Arbeitsgruppe wurde außerdem eine Syntheseroute zu dem ungewöhnlichen Naturstoff Zeylena (**49**)⁶³ entwickelt. Banwell *et al.* gelang ausgehend von *cis*-CHD die Darstellung des makrozyklischen Lactons Aspicilin⁶⁴, sowie des antifungal wirkenden Sesquiterpens Patchoulanon.⁶⁵ Eine Totalsynthese des Prostaglandins PGE₂ α konnte in der Arbeitsgruppe von Johnson erfolgreich durchgeführt werden (siehe Abbildung 2.16).⁶⁶

Neben wissenschaftlichen Interessen bei der Verwendung von *cis*-CHD werden auch wirtschaftliche verfolgt, wie die Aktivitäten verschiedener Unternehmen zeigen. Durch mikrobielle Oxidation von Benzen gewonnene unsubstituierte *cis*-CHD werden von ZENECA (ehemals ICI PLC) für die kommerzielle Synthese von Polyphenylen verwendet.⁶⁷ Die Firma MERCK zieht einen Einbau von *cis*-CHD-Derivaten in die biokatalytische Produktion des AIDS-Medikamentes Indanivir in Betracht⁶⁸ und GENENCOR nutzt die Kombination von *Metabolic Engineering* des Aromatenbiosyntheseweges und einer Indoloxidation zum entsprechenden *cis*-CHD für die Herstellung einer Indigovorstufe.⁶⁹ ENZYMATIX entwickelte

ein Verfahren zur Gewinnung antiviraler Komponenten aus von Toluol abgeleiteten *cis*-CHD.⁷⁰

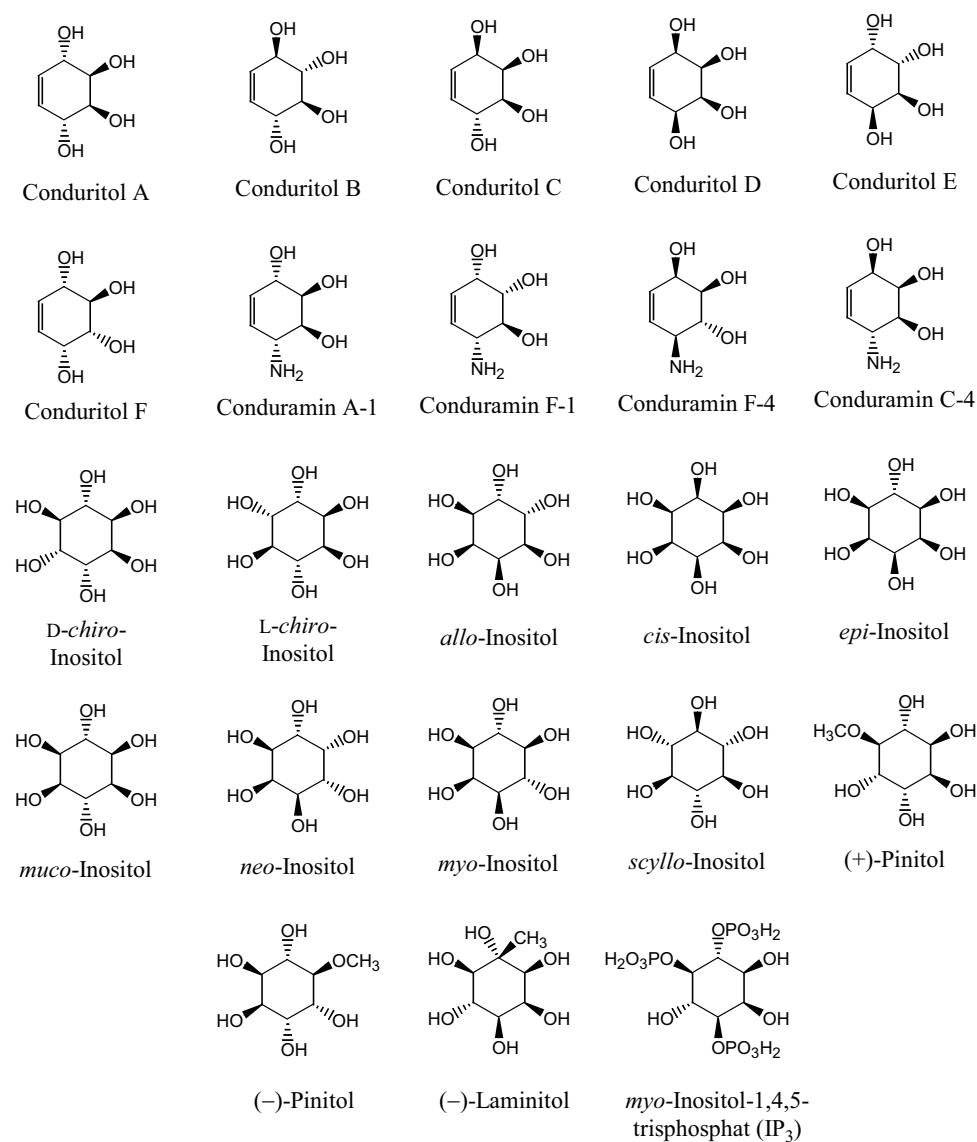


Abbildung 2.15: Auswahl verschiedener Cyclitole, die ausgehend von *cis*-CHD synthetisiert wurden.

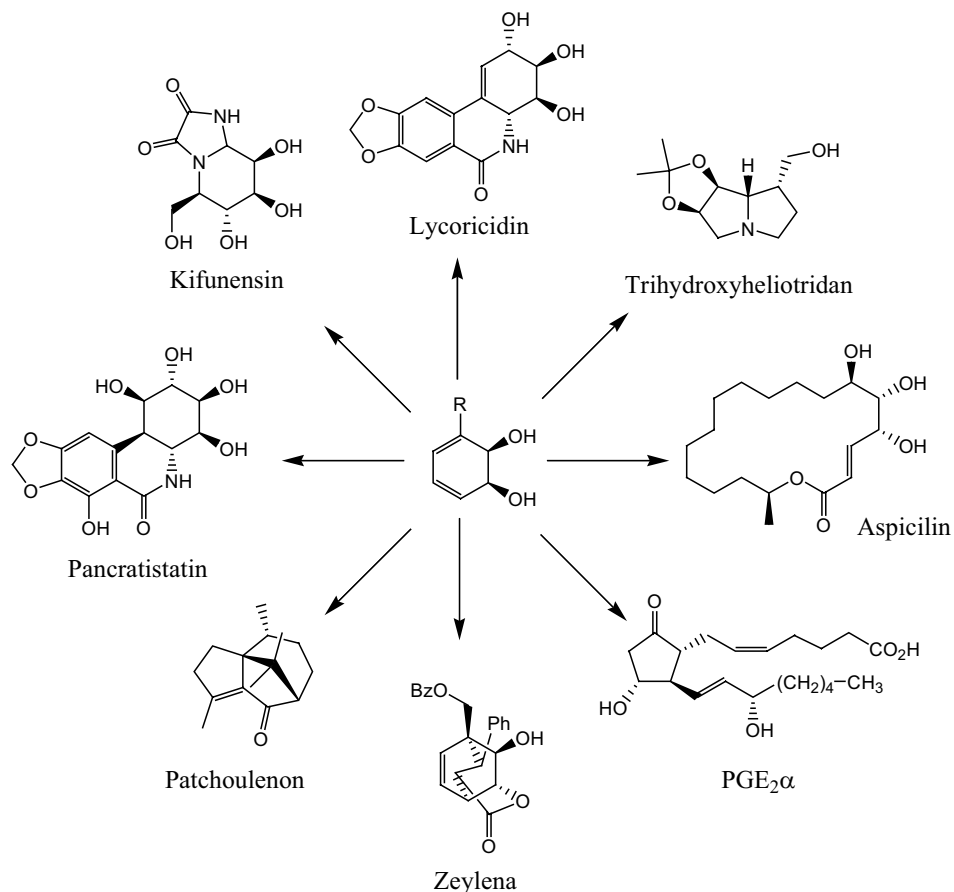


Abbildung 2.16: Beispiele für biologisch aktive, komplexe Verbindungen, die ausgehend von *cis*-CHD synthetisiert werden konnten.

Die Verwendung funktionalisierter *trans*-CHD als Synthesebausteine ist im Vergleich zu den *cis*-CHD deutlich reduziert, was nicht zuletzt auf den komplizierteren Zugang zurückzuführen ist. Dass bei den *trans*-CHD von einem vergleichbaren synthetischen Potenzial ausgegangen werden kann, wird durch verschiedene Beispiele gezeigt, in denen die *trans*-Diole trotz des erschwerten Zuganges als Syntheseintermediate genutzt wurden.

Hudlicky *et al.* nutzte die Umkehr eines Stereozentrums von **47** für die Synthese des *trans*-CHD-Derivates **48**, um so in fünf Syntheseschritten zum enantiomerenreinen Naturstoff Zeylena (**49**) zu gelangen (siehe Abbildung 2.17). Dabei wird die oxidative Dihydroxylierung von Styren unter Verwendung von *P. putida* als Startreaktion genutzt.

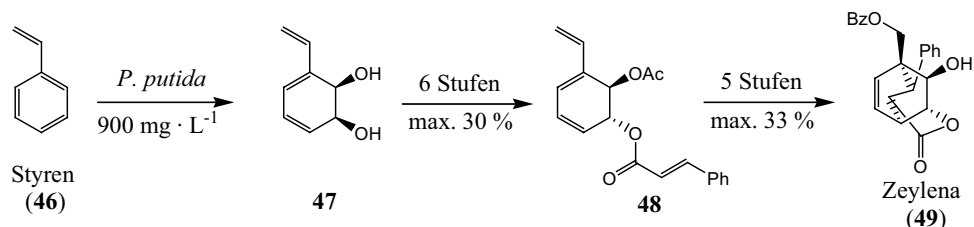


Abbildung 2.17: Darstellung von Zeylena (49) nach Hudlicky *et al.*

In der Arbeitsgruppe von Trost konnte der Glycosidaseinhibitor Valienamin (58) über das geschützte *trans*-CHD-Intermediat 52 sowohl in racemischer Form als auch enantioselektiv dargestellt werden (siehe Abbildung 2.18). Schlüsselschritt der Synthese ist die Öffnung des Cyclohexanepoxids 53 mit einem Stickstoffnukleophil unter Palladiumkatalyse.

Mehrfach fanden funktionalisierte *trans*-CHD Anwendung bei Synthesen von natürlich vorkommenden Cyclohexanepoxiden. Diese Familie von Pflanzenmetaboliten, deren bekannteste Vertreter Crotepoxid, Senepoxid, Pipoxid, Tingtanoxid und Boesenoxid sind, zieht aufgrund der vorhandenen biologischen Aktivität das Interesse von Synthesechemikern auf sich (siehe Abbildung 2.19).

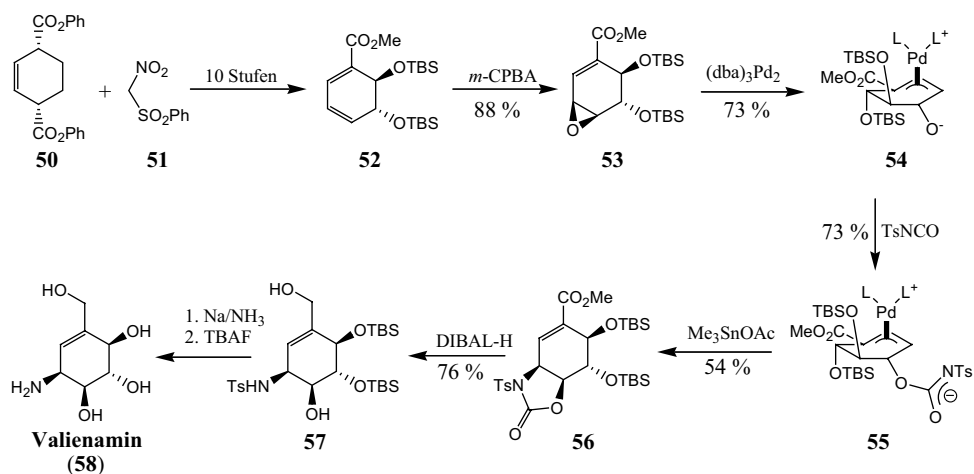


Abbildung 2.18: (+)-Valienaminsynthese nach Trost *et al.*⁵⁰

Obwohl wenig über die tatsächliche Biosynthese dieser Substanzen bekannt ist, wird vermutet, dass die Synthese über den Shikimat-Biosyntheseweg verläuft und Isochorismat als eine der Vorstufen angenommen.⁷¹ (+)-Crotepoxid (59) wurde 1968 erstmals in der

Arbeitsgruppe von Kupchan durch Isolierung aus Früchten von *Croton macrostachys* gewonnen⁷² und weist eine signifikante tumorhemmende Wirkung beim Lewis-Lungenkarzinom in Mäusen, sowie beim Walker intramuskulären Karzinosarkom in Ratten auf. Nahezu zur gleichen Zeit wurden die Cyclohexenepoxide (+)-Pipoxid (**67**) und (-)-Senepoxid (**63**) aus *Piper hookeri*⁷³ bzw. *Uvaria catocarpa*⁷⁴ isoliert und deren tumorhemmende, anti-leukämische und antibiotische Wirksamkeit festgestellt.

Ein erster synthetischer Zugang zu racemischem Crotepoxid (*rac*-**59**), sowie zwei Stereoisomeren wurde 1978 von White *et al.* veröffentlicht (siehe Abbildung 2.20). Als Schlüsselverbindung dient das *trans*-CHD-Derivat **73**.⁷⁵

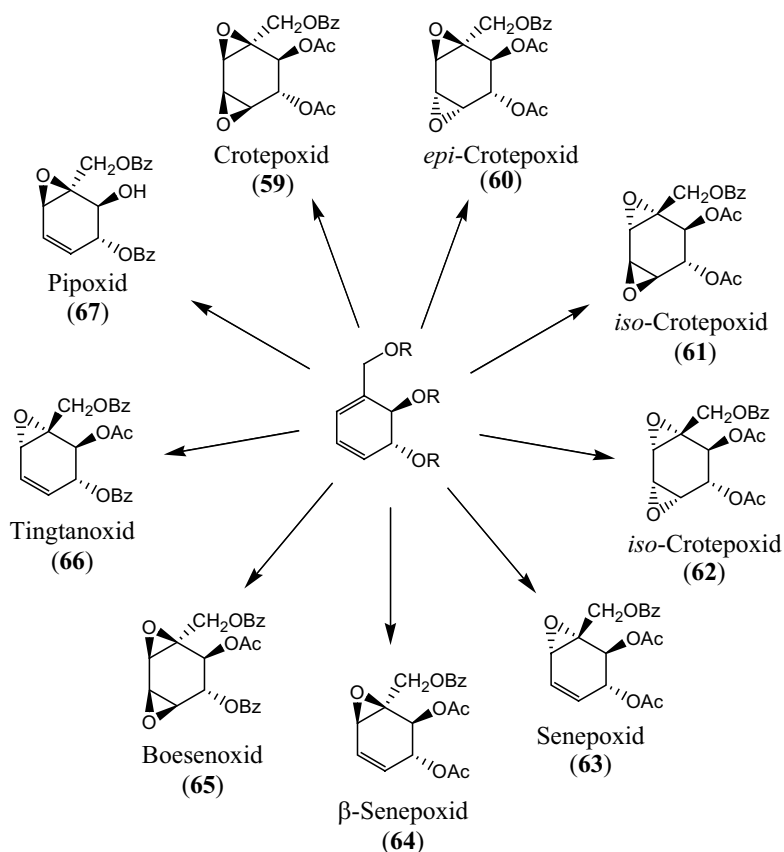


Abbildung 2.19: Über Cyclohexadien-*trans*-diol Zwischenstufen synthetisierte Cyclohexanepoxide.

In den folgenden Jahren wurden von den Arbeitsgruppen von Ganem,⁷⁶ Schlessinger, Ogawa^{49,77} und Shing^{20b,d} weitere Synthesen von Cyclohexanepoxiden publiziert, die das Auftreten von *trans*-CHD-Intermediaten gemeinsam haben. Shing *et al.* gewann (+)-Crotepoxid (**59**) gemeinsam mit (+)-Boesenoxid (**65**) in einer 16-stufigen Synthesesequenz mit einer Gesamtausbeute von 7 % (siehe Abbildung 2.21).

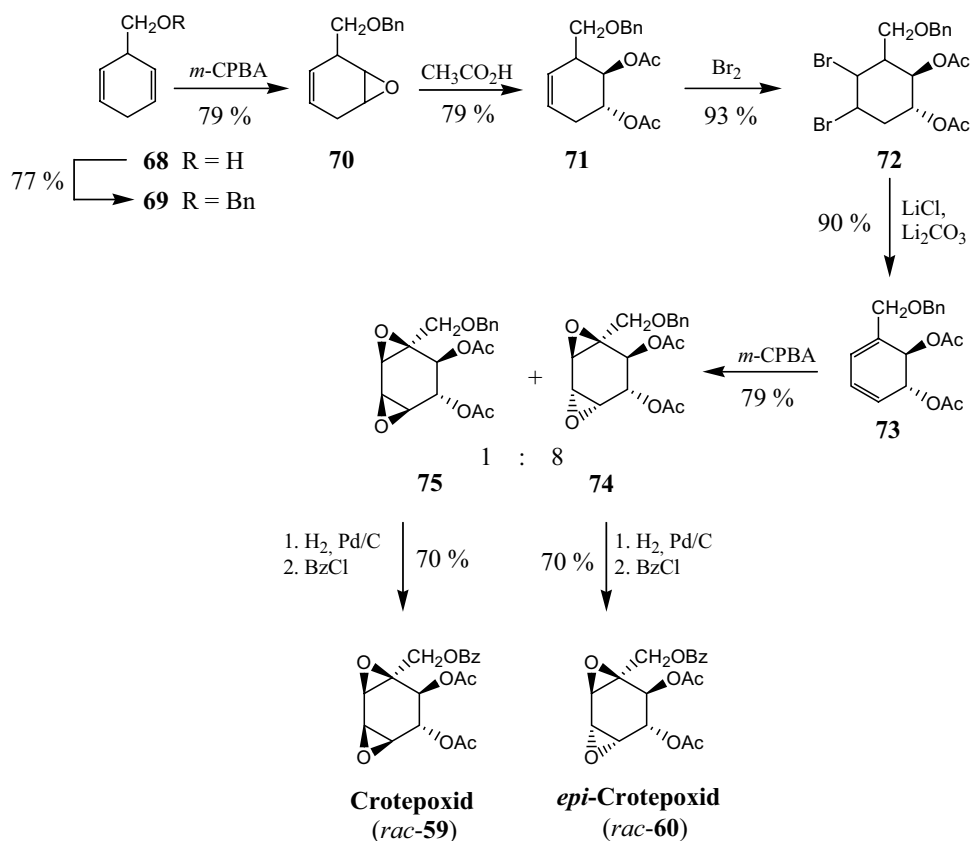


Abbildung 2.20: Synthese von *rac*-Crotepoxid (**59**) und *rac*-*epi*-Crotepoxid (**60**) über *trans*-CHD **73** nach White.

25

2.3 Funktionalisierte Cyclohexadienaminoalkohole

2.3.1 Cyclohexadienaminoalkohole durch Biotransformation

Wie die zuvor behandelten Cyclohexadiendiole sind auch Cyclohexadiene mit zueinander *trans*-ständiger Amino- und Hydroxygruppe bzw. deren Derivate als biosynthetische Zwischenstufen bekannt. Die meisten wissenschaftlichen Arbeiten, in denen *trans*-CHA auftreten, beschäftigen sich mit der detaillierten Untersuchung der Biosynthese von Anthranilat und *p*-Aminobenzoat als Intermediate bei der Biosynthese von Tryptophan und den Folaten.^{7b,78} So wurde erstmals von Sprinson⁷⁹ und Srinivasan⁸⁰ postuliert, dass Anthranilat (**8**) nicht unmittelbar aus Chorismat (**1**) gebildet wird, sondern die Synthese über eine weitere Cyclohexadienzwischenstufe verläuft, (siehe Abbildung 2.22). Nachdem Berchtold *et al.*^{78a} und Ganem *et al.* zeigen konnten, dass Aminodesoxyisochorismat (ADIC, **16**) ein geeignetes Substrat für die Anthranilatbildung ist, gelang Bauerle *et al.* erstmalig die Anreicherung und Isolierung dieses Isochorismat-Aminoanalogons unter Verwendung einer *Salmonella typhimurium*-Mutante.^{78e,81}

In analoger Weise tritt bei der Biosynthese der Folate Aminodesoxychorismat (ADC, **15**) als direktes Folgeprodukt von Chorismat auf (siehe Abbildung 2.22b).

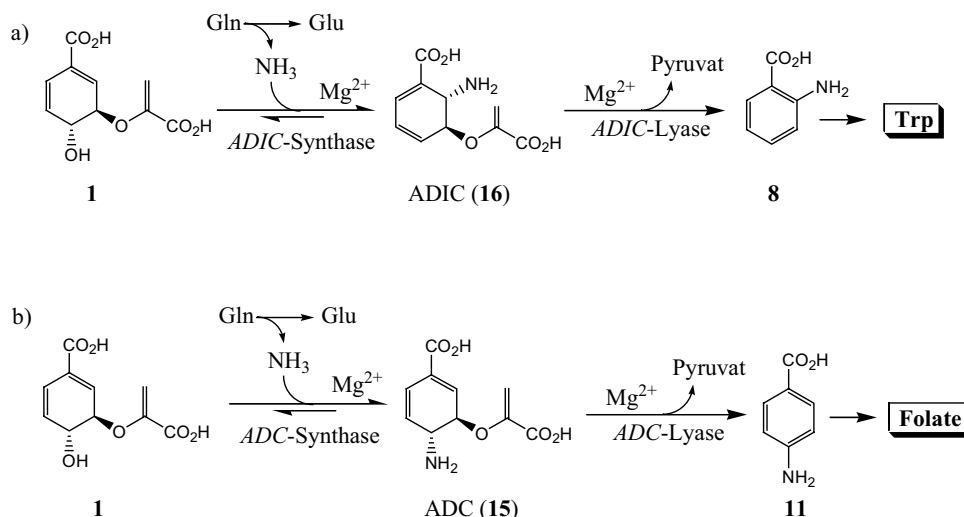


Abbildung 2.22: Biosynthese von Anthranilat und *p*-Aminobenzoat. a) Chorismat (**1**) wird in Gegenwart von Glutamin und Magnesium zu ADIC (**16**) umgesetzt, ehe unter Spaltung von Pyruvat Anthranilat (**8**) entsteht. b) Chorismat wird zunächst zu ADC (**15**) umgesetzt, ehe *para*-Aminobenzoat (**11**) entsteht.

Außerdem wurden weitere Biosynthesewege untersucht in denen CHA als Intermediate auftreten und die häufig zu biologisch aktiven und deshalb pharmazeutisch interessanten Verbindungen führen.^{5,82} Vor allem die Arbeiten von Floss *et al.* zeigen die Involvierung des Shikimat Biosyntheseweges in die Bildung von weitaus mehr Endprodukten als die gut untersuchten Primärmetabolite wie die aromatischen Aminosäuren.⁸³ Zu diesen gehören auch eine Vielzahl von Verbindungen mit Aminocyclohexaneinheit.⁸⁴

Ein Beispiel ist die Biosynthese von Phenazinen, einer Klasse von Antibiotika, die unter anderem von *Pseudomonaden* produziert wird und deren Verlauf Parallelen zu den frühen Stufen der Tryptophan-Biosynthese zeigen (siehe Abbildung 2.23). Arbeiten von Thomashow *et al.* und Floss *et al.* konnten zeigen, dass bei der Darstellung von Phenazin-1-carbonsäure (**96**) in *P. fluorescens* bzw. *P. aeruginosa* Chorismat von einem der Anthranilatsynthase ähnlichen Enzym zu ADIC (**16**) umgesetzt wird (siehe auch Kapitel 3.2.4).^{82a,b,85}

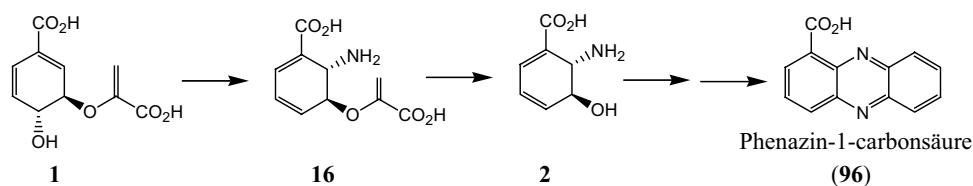


Abbildung 2.23: Biosynthese von Phenazin-1-carbonsäure (**96**).

Statt einer Pyruvatabspaltung unter Aromatisierung zu Anthranilat (**8**) wird 2,3-*trans*-CHA (**2**) mit der freien Hydroxygruppe unter Einfluss eines Enzyms gebildet, das eine Sequenzverwandtschaft mit der in der Enterobactin-Biosynthese auftretenden Isochorismatase besitzt. **2** wird weiterhin in mehreren, noch nicht vollständig aufgeklärten Reaktionsschritten zu **96** konvertiert.

Bemerkenswert erscheint, dass trotz des synthetischen Potenzials der CHA und der intensiven Erforschung der Verbindungen hinsichtlich ihrer Rolle in der Biosynthese eine Nutzung dieser Kenntnisse für einen biotechnologischen Produktionsprozess von universitären Forschungsgruppen anscheinend nicht verfolgt wurde. Und das, obwohl bereits im Jahre 1961 ein mikrobieller Zugang zum 2,3-*trans*-CHA (**2**) publiziert wurde.⁸⁶ Bei Untersuchungen von McCormick *et al.* zur Biosynthese von Tetracyclinen in *Streptomyces aureofaciens* wurde bei der Fermentation der Mutante S-652 eine Aminosäure mit einer

Produktkonzentration von ca. 10 g/L gebildet, die sich als 2,3-*trans*-CHAⁱ herausstellte. Durch Ionenaustauschchromatographie und Reinigung durch Umkristallisation konnte die freie β -Aminosäure **2** gewonnen werden.

Zwar wurde die von McCormick dargestellte Substanz später für die Herstellung von Biosyntheseintermediaten eingesetzt,⁸⁷ allerdings wurde eine weitere synthetische Nutzung zum Beispiel für die Darstellung von Enzyminhibitoren nicht verfolgt. Der Grund dafür kann in der erschwerten sicherheitstechnischen Handhabbarkeit von *Streptomyces*-Stämmenⁱⁱ liegen, die bei dieser mikrobiellen Produktion eingesetzt werden. Auch weitere industrielle Forschungsgruppen fanden mikrobielle Zugänge zu 2,3-*trans*-CHA und dessen Derivaten unter Einsatz von *Streptomyces*-Stämmen.⁸⁸

2.3.2 Cyclohexadienaminoalkohole durch chemische Synthese

In erster Linie zur Untersuchung von enzymatischen Prozessen wurden CHA auch durch chemische Synthese dargestellt. So synthetisierten Kishi *et al.* mehrere Derivate des 2,3-*trans*-CHA (**2**) während der Totalsynthese von Gliotoxin ausgehend 4-carbo-*t*-butoxyoxepin (**38**, siehe Abbildung 2.13, Kapitel 2.2.2). Biosynthetische Gesichtspunkte spielten bei den Arbeiten von Ganem, Campbell, Bartlett sowie Walsh und Berchtold eine entscheidende Rolle.

Für die Suche nach einem Intermediat der Anthranilat-Biosynthese stellten Walsh und Berchtold das Cyclohexadien **97** nach einer Methode von Overman mit einer Ausbeute von 10 % durch Diels-Alder-Reaktion dar.^{92,89} Epoxidierung und Isomerisierung führten mit 40 % Ausbeute zu **98**, das in mehreren Schritten durch Einführung der Seitengruppen zu **2** in Form seines Trifluoracetats überführt werden konnte (siehe Abbildung 2.24).

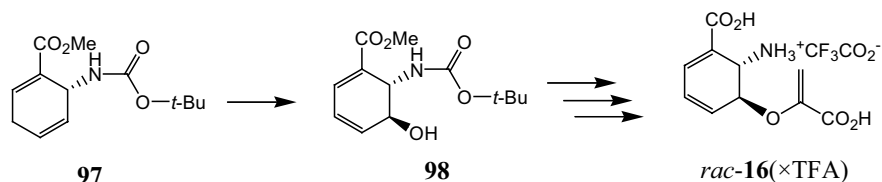
ⁱ 2,3-*trans*-CHA (**2**) wird in dieser Veröffentlichung als (+)-(2*S*,3*S*)- *trans*-2,3-dihydro-3-hydroxyanthranilsäure (DHAA) bezeichnet.

ⁱⁱ Stämme von *Streptomyces aureofaciens* gelten als potenziell pathogene Mikroorganismen und erfordern als sogenannte S2-Organismen besondere Sicherheitsauflagen bei ihrer Bearbeitung. Im Gegensatz dazu sind die meisten *E. coli*-Stämme der Sicherheitsstufe S1 angehörig.

Tabelle 2.4: Synthetische Zugänge zu *trans*-CHA und deren Derivaten

Produkt	Arbeitsgruppe	Reaktionsstufen (Ausbeute)
<i>rac</i> -2,3- <i>trans</i> -CHA-Derivate	Kishi ⁹⁰	(1981) 1 (36 %)*
<i>rac</i> -3,4- <i>trans</i> -CHA	Ganem ⁹¹	(1982) 4 (44 %)*
<i>rac</i> -ADIC	Walsh, Berchtold ^{78a}	(1984) 7 (0.4 %)*
ADIC	Ganem	(1984) 8 (13 %) [#]
<i>rac</i> -ADC	Ganem ⁹²	(1985) 7 (7 %)*
<i>rac</i> -ADC	Campbell ⁹³	(1993) 3 (80 %)*
<i>rac</i> -2,3- <i>trans</i> -CHA (geschützt)	Bartlett ⁹⁴	(1995) 3 (12 %)*
(+)-2,3- <i>trans</i> -CHA (geschützt)	Steel ⁹⁵	(2003) 8 (10 %)
(-)-2,3- <i>trans</i> -CHA (geschützt)	Steel ⁹⁵	(2003) 8 (9 %)

* Ausgangsverbindung wird über Mehrstufensynthese dargestellt.

[#] Mikrobiell gewonnenes **2** als Ausgangsverbindung.**Abbildung 2.24:** Synthese von racemischem ADIC (**16**) in Form seines Trifluoracetats nach Walsh und Berchtold.^{78a}

Eine ähnliche synthetische Vorgehensweise verfolgten Bartlett *et al.* bei Ihrer Untersuchung der inhibitorischen Wirkung von verschiedenen funktionalisierten Cyclohexenen auf die chorismatverwertenden Enzyme Isochorismatsynthase, Anthranilatsynthase und *p*-Aminobenzoatsynthase. Jeweils ausgehend von einer Cycloaddition wurden verschieden 2,3,4-funktionalisierte Cyclohexencarbonsäuren wie z.B. **107** dargestellt (siehe Abbildung 2.25) und in Enzymassays getestet.

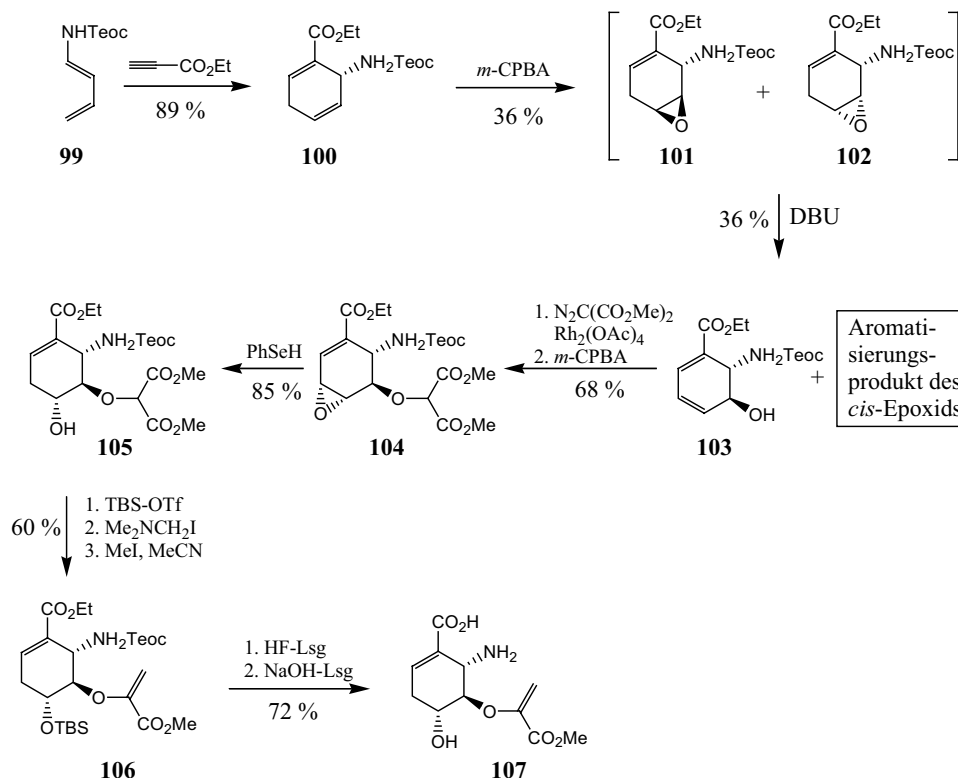


Abbildung 2.25: Synthese des potentiellen Enzyminhibitors für chorismatverwertende Enzyme **107** nach Bartlett *et al.*⁹⁴

Erst kürzlich wurden Beispiele von Steel *et al.* publiziert, in denen synthetisch dargestellte 2,3-*trans*-CHA-Derivate gezielt als Synthesebausteine zur Darstellung von hochfunktionalisierten Cyclohexancarbonsäuren genutzt wurden (siehe Abbildung 2.26). Ausgehend von einer Diels-Alder-Reaktion zwischen Furan und β -Nitroacrylat (**108**) wird das Cycloaddukt **109** erhalten, das zu dem geschützten *trans*-CHA **110** umgesetzt wird. Dieses wurde von Steel *et al.* als Ausgangsverbindung für die Synthese der von Umezawa *et al.* veröffentlichten Struktur von Oryzoxymycin (**111**),^{95,96,i} sowie der Darstellung von verschiedenen polyhydroxylierten Cyclohexyl- β -aminosäuren genutzt.⁹⁷

ⁱ Bei der Synthese des vermeintlichen Oryzoxymycins stellten Steel *et al.* fest, dass die analytischen Daten teilweise nicht mit denen übereinstimmen, die für das aus einem *Streptomyces*-Stamm isolierte Produkt angegeben sind. Die daraufhin erhobene Hypothese, dass der Lactatrest nicht mit der Carboxylgruppe, sondern mit der Ringhydroxygruppe verbunden ist, bleibt unbestätigt.

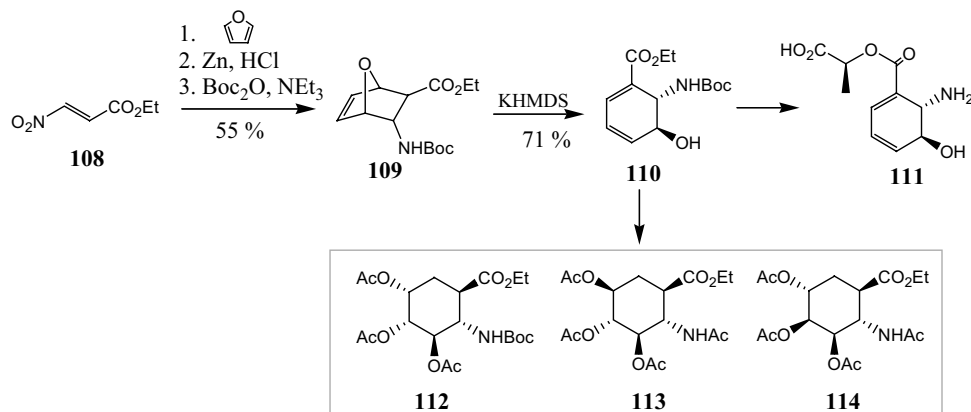
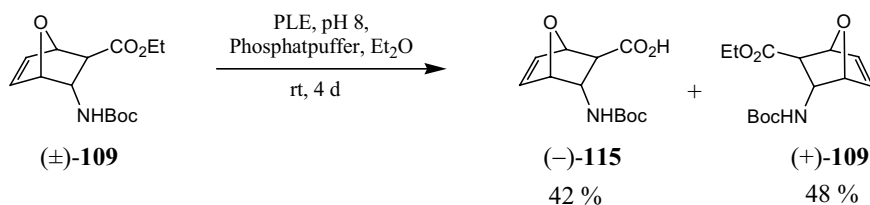


Abbildung 2.26: Synthese des geschützten *rac*-2,3-*trans*-CHA-Esters **110** und davon ausgehende Darstellung von verschiedenen Cyclohexyl- β -aminosäuren sowie der von Hashimoto *et al.* beschriebenen Struktur von Oryzoxymycin (**111**).

Gleichzeitig publizierten Steel *et al.* erstmals eine stereoselektive Synthese des CHA-Derivats **110**, die auf einer enzymatischen, kinetischen Racematspaltung des Bicyklus **109** beruht (siehe Abbildung 2.27).⁹⁵



PLE = Porc Liver Esterase

Abbildung 2.27: Kinetische Racematspaltung von **109** zur Darstellung enantiomerenreiner 2,3-*trans*-CHA.

Weitere synthetische Zugänge zu **2** bzw. **4**, sowie verwandten Verbindungen wurden von den Arbeitsgruppen von Ganem,^{87,91,92} Berchtold,^{78a} Bartlett und McLeish⁹³ erarbeitet.

Abgesehen von dem, von McCormick *et al.* publizierten mikrobiellen Zugang zu **2** mit *Streptomyces aureofaciens*, sowie ggf. den Arbeiten die den Patenten von Yoshimitsu und Meade zugrunde liegen, sind alle Arbeiten hinsichtlich **2** und **4** weder geeignet, noch darauf ausgelegt diese Substanzen in einer Größenordnung zugänglich zu machen, die deren Verwendung als synthetisches Ausgangsmaterial erlauben würde. Der von McCormick *et al.*

erarbeitete Zugang würde zwar prinzipiell eine Verwendung der Substanzen zulassen und tatsächlich diene das aus *Streptomyces* gewonnenen Material auch als Ausgangsmaterial für die Darstellung möglicher Substrate, allerdings ist durch die Verwendung eines S2-Organismus der Einsatz dieses Verfahren für andere Arbeitsgruppen nur erschwert, oder gar nicht möglich. Außerdem wurde bei dem Verfahren ein nicht definierter Stamm eingesetzt, bei dem über das Zustandekommen der Überproduktion von 2,3-*trans*-CHA nur spekuliert werden kann. Diese Tatsache würde eine weitere Optimierung des Stammes oder der Fermentationsbedingungen, zum Beispiel für eine kommerzielle bzw. industrielle Nutzung, deutlich erschweren. Außerdem ist mit einem solchen Stamm eine spätere Erweiterung des mikrobiellen Produktspektrums kaum möglich.

Ähnlich wie die synthetischen Darstellungsmethoden von funktionalisierten Cyclohexadiendiolen weisen die Methoden zur Darstellung der entsprechenden Aminoverbindungen ebenfalls meist lange und komplizierte Synthesesequenzen mit geringen Ausbeuten und fehlender oder geringer Enantioselektivität auf.

Die geringe Verwendung von **2** bzw. **4** als Synthesebausteine lässt sich deshalb wohl ausschließlich auf einen fehlenden geeigneten Zugang zurückführen, zumal die Einsatzmöglichkeiten und der Bedarf an chiralen, nicht proteinogenen Aminosäuren in jüngster Zeit enorm gewachsen ist (siehe auch Kapitel 4).

3 Spezieller Teil

3.1 Chemische Synthese von racemischen Referenzsubstanzen

Zur späteren Beurteilung der biochemischen Experimente muss ein analytisches System aufgebaut werden, welches es ermöglicht die mikrobiell gewonnenen Substanzen schnell und unzweifelhaft zu identifizieren. Aus diesem Grunde besteht die Notwendigkeit entsprechende Substanzen synthetisch herzustellen. Aufgrund der bisherigen Erkenntnisse zur Biosynthese von Chorismat und verwandten Cyclohexadienen kann zunächst einmal davon ausgegangen werden, dass die aus einem biotransformatorischen Prozess gewonnenen Substanzen enantiomerenrein sind. Zur Vereinfachung werden mögliche Zielverbindungen bei *in vitro* und *in vivo* Experimenten daher zunächst mit analytischen Methoden untersucht, mit denen eine Unterscheidung der Enantiomere nicht möglich ist und somit racemische Vergleichssubstanzen eingesetzt werden können, die synthetisch leichter zugänglich sind. Bei Bedarf kann außerdem mit Hilfe der racemischen Verbindungen der Enantiomerenüberschuss der mikrobiell produzierten Verbindungen z. B. über chirale HPLC kontrolliert werden.

3.1.1 Synthese von racemischem 2,3-*trans*-CHA

Als Grundlage für die Synthese von 2,3-*trans*-CHA (**2**) stehen verschiedene aus der Fachliteratur bekannte Methoden zur Darstellung von CHA-Derivaten zur Verfügung.^{78a,87,91,92,96}

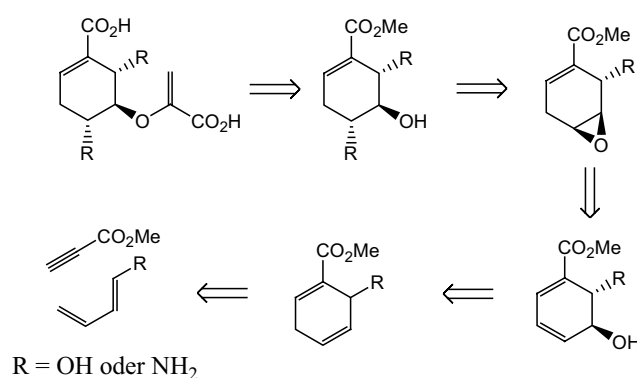


Abbildung 3.1: Retrosynthetischer Synthesepfad von Bartlett *et al.* für die Darstellung von funktionalisierten Cyclohexencarbonsäuren über eine Cyclohexadien-Zwischenstufe.⁹⁴

Aufgrund der relativ kurzen Synthese, sowie der offensichtlich recht einfachen Entschützung des beschriebenen CHA-Derivats **103** (siehe Abbildung 2.25) wird als Basis für die Herstellung der racemischen Referenzsubstanz die von Bartlett *et al.* zur Darstellung von potentiellen Enzyminhibitoren verwendete Route genutzt (siehe Abbildung 3.1 und 2.25).⁹⁴ Das von Bartlett als Ausgangsmaterial verwendete Butadien **99** wird in drei Reaktionsschritten erhalten. Kondensation von Malonsäure (**121**) mit Acrolein (**120**) liefert *trans*-2,4-Pentadiensäure (**122**) mit einer Ausbeute von 20 %, das mit Natriumazid in Aceton zum Säureazid **123** umgesetzt wird (siehe Abbildung 3.2a). Durch eine Curtius-Umlagerung (siehe Abbildung 3.2b) in Gegenwart von Trimethylsilylethanol wird aus **123** über ein intermediäres Isocyanat das TEOC-geschützte 1-Aminobutadien **99** gebildet (TEOC = 2-(trimethylsilyloxy)-carbonyl).

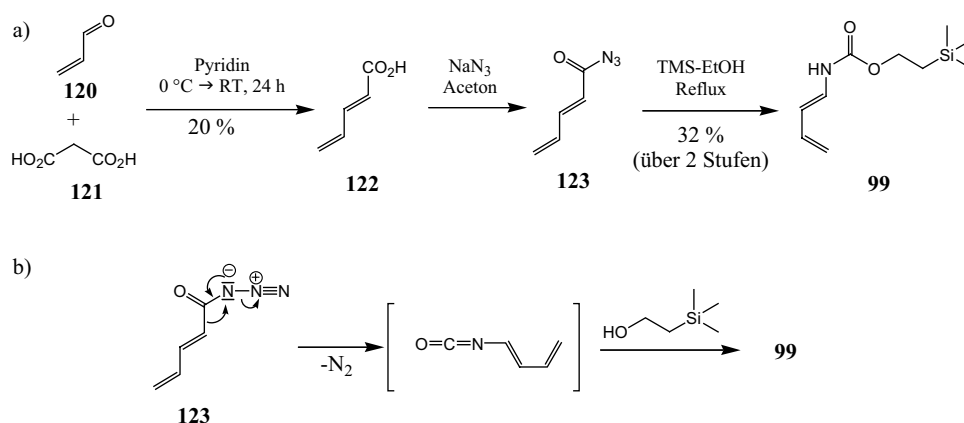


Abbildung 3.2: a) Darstellung des geschützten Aminobutadiens **99**, das als Ausgangsmaterial für die racemische Synthese von **2** verwendet wurde.
b) Curtius-Umlagerung über Isocyanat-Intermediat.

Diels-Alder-Reaktion von **99** mit Propinsäuremethylester führt mit 81 %iger Ausbeute zum Cyclohexadien **124** (siehe Abbildung 3.3). Die selektive Epoxidierung der unsubstituierten Doppelbindung ergibt eine Mischung der Cyclohexenepoxide **125** und **126** von denen, bei einer Eliminierung unter Verwendung von 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU) als sterisch anspruchsvoller, nicht nukleophiler starker tertiärer Base das *cis*-Isomer **125** aromatisiert und so von dem zum Cyclohexadien **127** umgesetzten *trans*-Isomer **126** zu trennen ist.

Zur Entfernung der Silylschutzgruppen wurden verschiedene Reagenzien getestet. Bei Verwendung einer 1 M TBAF-Lösung in THF bei 0 °C kommt es zur vollständigen

Aromatisierung von **127**. Mit 40 %iger wässriger Flusssäure in Acetonitril wird auch nach einer Reaktionszeit von 4 h kein Umsatz festgestellt und das Edukt konnte nach Aufarbeitung des Reaktionsansatzes wieder zurückgewonnen werden. Nach einer Reaktionszeit von 16 h werden mit dem gleichen Reagenz neben dem Edukt auch Anteile der aromatisierten Verbindung gefunden. Eine erfolgreiche Spaltung der Aminoschutzgruppe wird durch Einsatz von Trifluoressigsäure ohne den Zusatz von weiteren Lösungsmitteln bei einer Reaktionszeit von nicht mehr als 15 min bei Raumtemperatur erreicht. Anteile an aromatischen Nebenprodukten können chromatographisch abgetrennt werden. Die Hydrolyse des Methylesters **128** mit einer 2 M NaOH-Lösung, die zur racemischen freien Säure führt, wurde in analytischem Maßstab durchgeführt und die gewonnene Substanz *rac*-**2** als Referenz für analytische Untersuchungen verwendet.

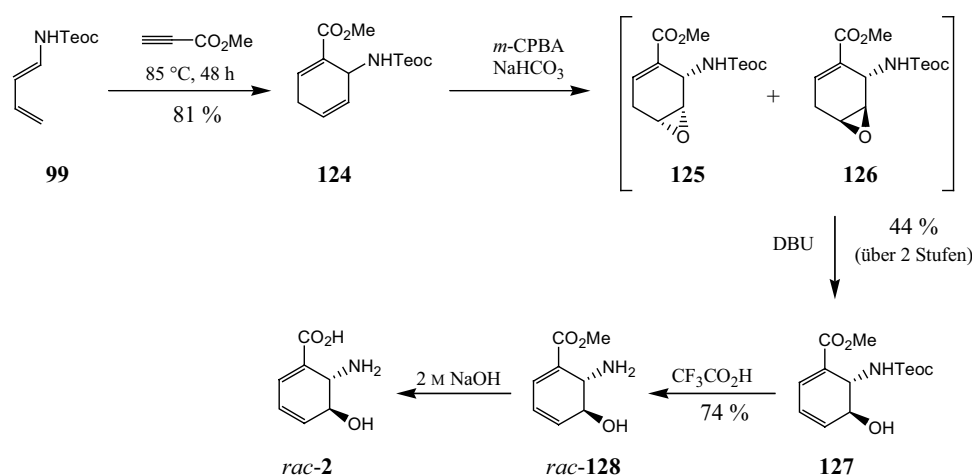


Abbildung 3.3: Fünfstufige Syntheseroute zu racemischem 2,3-*trans*-CHA (*rac*-**2**).

3.1.2 Synthetische Darstellung von racemischem 2,3-*trans*-CHD

Enzymatische Reaktionen bzw. Biotransformationen zeichnen sich in der Regel durch hohe Enantioselektivitäten aus. Dies gilt besonders für die natürlichen Substrate, also für biosynthetische Umsetzungen. Trotz dieser allgemeinen Tendenz ist die angenommene Enantiomerenreinheit für viele Metabolite nicht nachgewiesen. Gerade bei Verbindungen wie den von Chorismat (**1**) abgeleiteten Cyclohexadienen ist eine Überprüfung der Enantiomerenreinheit sinnvoll, denn diese Substanzen dienen in der Biosynthese als Vorstufen zu aromatischen Verbindungen in denen die im gemeinsamen Shikimatweg aufgebauten

Stereozentren nicht mehr vorhanden sind. Aus diesem Grund ist zumindest im Hinblick auf die biologischen Endprodukte eine asymmetrische Synthese der Cyclohexadiene nicht zwingend notwendig.

Zur Analyse der Enantiomerenverhältnisse von mikrobiell gewonnenem 2,3-*trans*-CHD (**3**) wurde die racemische Substanz auf chemischem Wege synthetisiert.

Als Grundlage für die Synthese dienten Arbeiten von Trost *et al.*, deren Zugang zu 2,3-*trans*-CHD-Derivaten im Zuge einer Route zu Valienamin (**58**) sich durch relativ hohe Ausbeuten und wenige Syntheseschritte auszeichnet.

Bei der ausgewählten Syntheseroute wird das Cyclohexangrundgerüst durch eine Diels-Alder-Reaktion zwischen dem Silylenolether **130** und Propinsäuremethylester aufgebaut. Das nach einer Methode von Sethi *et al.*⁹⁸ dargestellte Dien **130** wird durch Reaktion von Crotonaldehyd (**129**) mit *tert*-Butyldimethylsilyltriflat mit einer Ausbeute von 74 % gewonnen. Die anschließende Cycloaddition wird lösungsmittelfrei bei 80 °C mit einer Gesamtausbeute von 91 % durchgeführt. Da **131** zur Aromatisierung neigt wird auf eine Aufarbeitung verzichtet und das Rohprodukt für die folgende Epoxidierung eingesetzt.

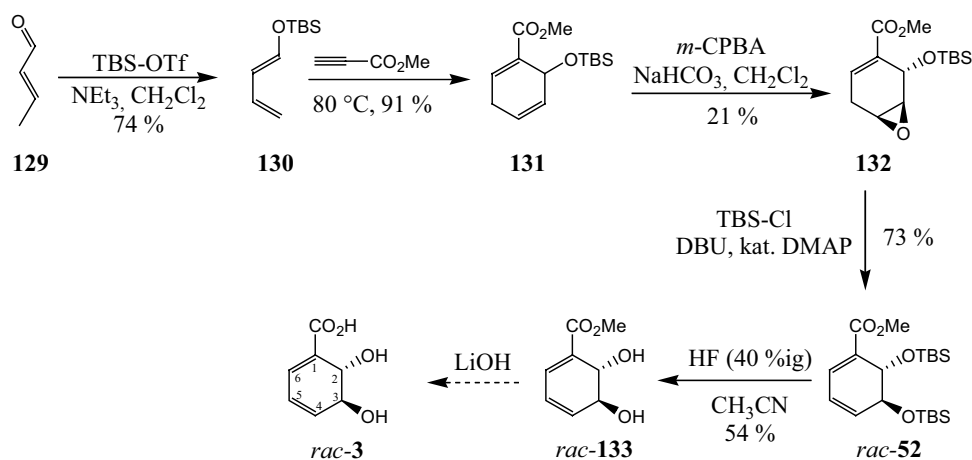


Abbildung 3.4: Synthese von *rac*-**3** bzw. dessen Methylester *rac*-**133** basierend auf einer Syntheseroute von Trost *et al.*^{1,50}

ⁱ Die in Abbildung 3.4 an Substanz **3** vorgenommene Nummerierung der Ringkohlenstoffatome wird zur Vereinfachung im Folgenden (soweit nicht anders angegeben) für alle analogen Cyclohexadiencarbonsäuren und daraus erhaltene Verbindungen verwendet. Diese Nummerierung steht nicht im Einklang mit der IUPAC-Nomenklatur, die im Experimentellen Teil (Kapitel 5) eingesetzt wird.

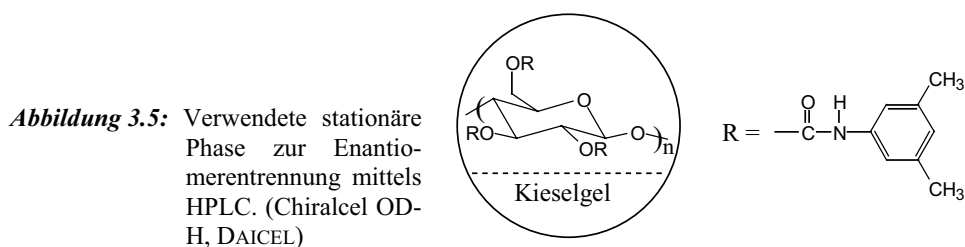
Wahrscheinlich gesteuert durch den sterischen Anspruch der TBS-Gruppe findet die Reaktion unter Verwendung von *m*-CPBA als Oxidationsmittel stereoselektiv *trans*-ständig zur Siloxygruppe statt. Die Regioselektivität dieses Angriffes wird durch die elektronischen Verhältnisse im Molekül beeinflusst, so dass die Einführung des Sauerstoffes selektiv an der elektronenreicheren Doppelbindung stattfindet.

Durch den Einsatz von DBU kann in einer Eliminierungsreaktion der Oxiranring selektiv durch ein Silylreagenz geöffnet werden. So bildet sich das geschützte 2,3-*trans*-CHD Derivat *rac*-**52**. Nach Aufarbeitung und chromatographischer Reinigung wird *rac*-**52** mit 73 % Ausbeute erhalten.

Für die Spaltung der Silylschutzgruppen wird eine 40 %ige wässrige Flusssäurelösung in Acetonitril verwendet.

Der so in 54 %iger Ausbeute erhaltene Methylester **133** kann mit Lithiumhydroxid verseift werden. Allerdings tritt eine Aromatisierung zur 3-Hydroxybenzoesäure bzw. deren Ester als Nebenreaktion auf und ein Produktgemisch wird erhalten, welches sich mit herkömmlichen chromatographischen Methoden nur schwer trennen lässt. Da der Methylester mit einfachen Methoden aus der mikrobiell gewonnenen freien Säure erhältlich ist, wird das Enantiomerenverhältnis auf der Stufe des Methylesters bestimmt.

Die Trennung der beiden Enantiomere des synthetisch dargestellten racemischen Gemisches *rac*-**133** wird mittels HPLC an chiraler Phase durchgeführt. Die stationäre Phase besteht dabei aus Cellulosederivaten, die auf einem Kieselgelgrundgerüst aufgebracht sind.



Als optimierte mobile Phase wurde ein Lösungsmittelgemisch aus Isohexan und 2-Propanol (90 : 10) verwendet. Unter diesen Bedingungen wurde eine vollständige Trennung der beiden Enantiomere erreicht. Die Untersuchung des veresterten mikrobiellen (+)-2,3-*trans*-CHD ergibt, dass nur eines der beiden Enantiomere detektiert werden kann und somit ein Enantiomerenüberschuss von über 99 % vorliegt.

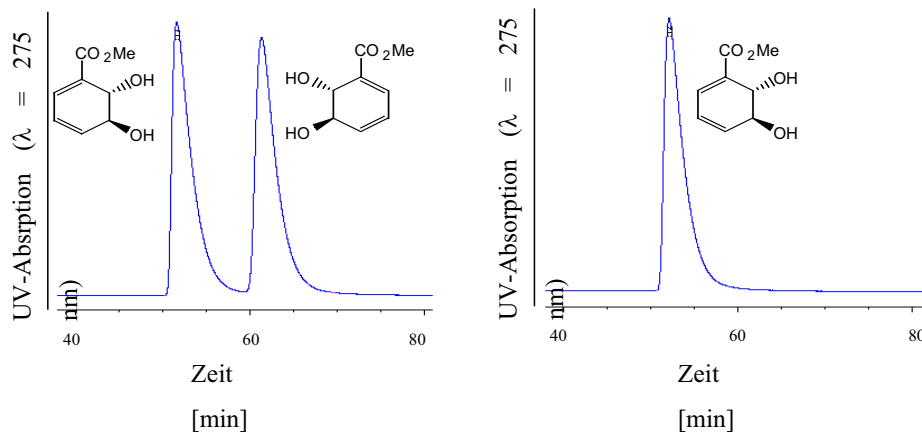


Abbildung 3.6: HPLC-Chromatogramme von synthetischem *rac*-133 und auf mikrobieller Basis gewonnenem 133.

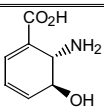
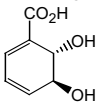
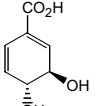
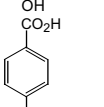
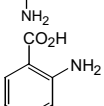
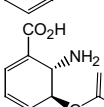
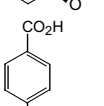
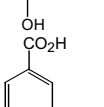
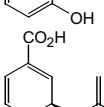
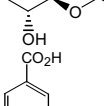
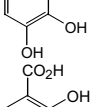
Die enantioselektive mikrobielle Bildung von 2,3-*trans*-CHD (**3**) lässt darauf schließen, dass auch andere von Chorismat abgeleitete Cyclohexadienmetabolite als einzelnes Enantiomer gebildet werden, zumal die katalysierenden Enzyme oft einen hohen Verwandtschaftsgrad besitzen und über den gleichen Mechanismus verlaufen.⁹⁹ Ein endgültiger Beweis muss allerdings für jede einzelne Verbindung erbracht werden.

3.1.3 Analyseverfahren zur Bestimmung von Cyclohexadienmetaboliten

Der Aufbau eines analytischen Systems zur Identifizierung von 2,3-*trans*-CHA (**2**) und anderen Cyclohexadienmetaboliten sowie deren biologischen und chemischen Abbauprodukten basiert auf einem HPLC-Assay, das von D. Franke zur Bestimmung von 2,3-*trans*-CHD (**3**) in Fermentationsüberständen verwendet wurde.^{39b}

Bei der verwendeten Methode wird eine C8-Phase als stationäre Phase verwendet und eine 0.1 %ige wässrige Trifluoressigsäure-Lösung, der über einen Gradienten bis zu 64 % Methanol zugesetzt werden, als mobile Phasen. Die Detektion der Substanzen geschieht über einen Diodenarray-Detektor (DAD) bei einer Wellenlänge von $\lambda = 275$ nm. Die Identifikation findet über die Retentionszeiten sowie den zugehörigen UV-Spektren statt.

Tabelle 3.1: Retentionszeiten und UV-Maxima verschiedener Metabolite, bestimmt durch RP-HPLC.

Verbindung	Struktur	Retentionszeit R _t [min]	UV-Maxima [nm]
2,3- <i>trans</i> -CHA (2)		4.5	278
2,3- <i>trans</i> -CHD (3)		5.0	278
3,4- <i>trans</i> -CHD (5)		7.7	272
4-Aminobenzoat (11)		11.2	194, 150
Anthranilat (8)		20.5	192, 211, 315
Aminodesoxy- isochorismat (16)		21.1	225, 278
4-Hydroxybenzoat (9)		23.3	194, 150
3-Hydroxybenzoat (134)		24.9	199, 289
Chorismat (1)		26.0	218, 280
3,4-Dihydroxybenzoat (135)		28.5	204, 253, 290
2,3-Dihydroxybenzoat (136)		28.8	206, 238, 305

Bei einer Messzeit von 37 min können mit diesem System neben den Cyclohexadienen 2,3-*trans*-CHA (**2**), 2,3-*trans*-CHD (**3**), 3,4-*trans*-CHD (**5**), Chorismat (**1**) und Aminodesoxyisochorismat (ADIC, **16**) auch sechs verwandte aromatische Produkte voneinander getrennt und identifiziert werden (siehe Tabelle 3.1 sowie Abbildung 3.7).

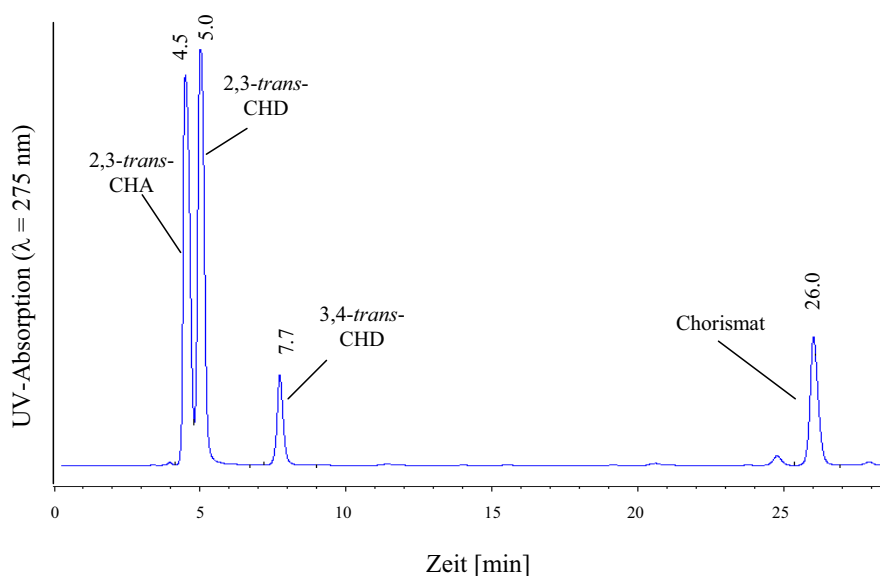


Abbildung 3.7 : HPLC-Chromatogramm von mikrobiell gewonnenen Cyclohexadienen zum Vergleich von Retentionszeiten.

3.2 Mikrobielle Darstellung von 2,3-*trans*-CHA

Genau wie das von Chorismat abgeleitete 3,4-*trans*-CHD (**5**) handelt es sich beim 2,3-*trans*-CHA (**2**) um einen Metaboliten, der im natürlichen Stoffwechsel von *E. coli* nicht bekannt ist. ADIC (**16**), die unmittelbare Vorstufe zu **2**, ist hingegen ein Intermediat in der Tryptophan-Biosynthese. 2,3-*trans*-CHA (**2**) ist allerdings ein nachgewiesenes Intermediat in der Phenazinsynthese, in der es unmittelbar aus **16** gebildet wird.¹⁰⁰ Phenazine sind Pigmente mit teilweise antibiotischer Wirkung, die zum Beispiel in verschiedenen Pseudomonaden, Streptomyceten und anderen Bakterien nachgewiesen wurden.¹⁰¹

Für eine Produktion von **2** mit *E. coli* sind somit Gene bzw. Enzyme dieser beiden Biosynthesewege von besonderem Interesse.

3.2.1 Mutation und Klonierung der *E. coli* Anthranilatsynthase TrpE

In der Biosynthese von Tryptophan wird in der ersten tryptophanspezifischen Umsetzung, aus Chorismat (**1**) Anthranilat (**8**) gebildet. Arbeiten von Bauerle *et al.* mit *Salmonella typhimurium* und aktuelle Arbeiten von Toney haben Vorhersagen zum katalytischen Mechanismus der Anthranilatsynthase, die eine weitere Cyclohexadienzwischenstufe prognostizieren, durch die Detektion von ADIC bei der Umsetzung von Chorismat, bestätigt (siehe Abbildung 3.8).^{81, 99}

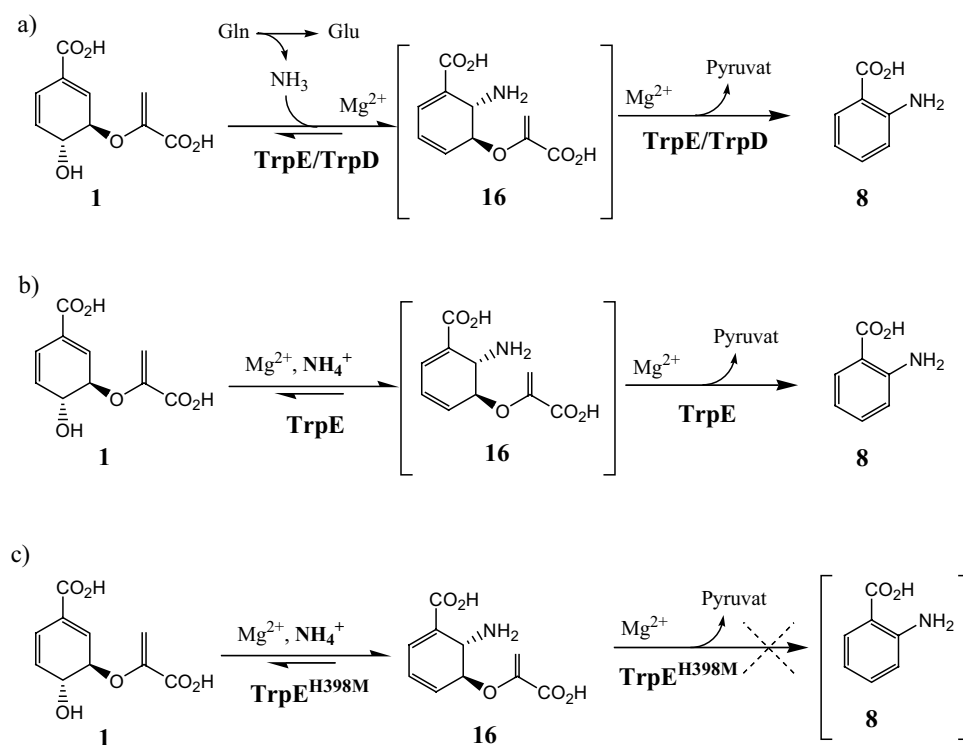


Abbildung 3.8: Umsetzung von Chorismat mit Enzymen aus *Salmonella typhimurium* in Gegenwart von Mg²⁺ als Cofaktor.

- a) Umsetzung mit TrpE/TrpD-Komplex in Anwesenheit von Glutamin.
- b) Umsetzung mit TrpE in Anwesenheit von Ammonium.
- c) Umsetzung mit TrpE^{H398M} in Anwesenheit von Ammonium.

Anthranilatsynthase besteht aus zwei Untereinheiten α und β , die sich als $\alpha\beta$ -Dimer oder $\alpha_2\beta_2$ -Tetramer zusammensetzen können.^{78g} Die α -Einheit, die sowohl in *S. typhimurium*, als auch in *E. coli* durch *trpE* kodiert wird, kann auch eigenständig die Reaktion von Chorismat (1) zu Anthranilat (8) katalysieren, wenn NH_3 als Stickstoffquelle zur Verfügung steht.^{7b,102,103} Die β -Einheit, in *S. typhimurium* und *E. coli* kodiert durch *trpD*, ist bifunktionell. Die aminoterminal Domäne ist eine Glutamin-Amidotransferase zur Gewinnung von Ammonium aus gebundenem Glutamin. Die carboxyterminale Domäne von TrpD ist eine Phosphoribosyl-Pyrophosphattransferase, die in einem späteren Schritt der Tryptophan-Biosynthese von Bedeutung ist.

Neben der Detektion von ADIC bei der Umsetzung von Chorismat mit Anthranilatsynthase wurden von Bauerle *et al.* Mutanten durch ortsgerichtete Mutagenese hergestellt, die eine verminderte Aktivität bei der ADIC-Lyase Reaktion zeigen. Durch Substitution von Histidin 398, das nach neueren Studien im Active Site von TrpE liegt und zur Koordination der Carboxylatgruppe beiträgt,^{78h} gegen Methionin konnte ein Enzym (H398M) generiert werden, welches die Bildung von ADIC weiterhin katalysiert. Für die folgende Umsetzung zu Anthranilat zeigt diese Mutante jedoch kaum noch Aktivität. Nach Spraggon *et al.* sind die basischen Eigenschaften von Histidin für eine Abstraktion des C2-Protons und somit für die Eliminierung notwendig.^{78h} Auf diese Weise gelang es Bauerle *et al.* ADIC in analytischen Mengen aus Chorismat zu gewinnen und als Biosyntheseintermediat zu identifizieren.

Die enge Verwandtschaft zwischen der Anthranilatsynthase aus *S. typhimurium* und der aus *E. coli* legt die Vermutung nahe, dass eine H398M-Mutation im *E. coli* TrpE einen weitgehenden Verlust der ADIC-Lyase Aktivität zur Folge hat.

Als Ausgangsmaterial für die Darstellung von plasmidisch überexprimiertem TrpE^{H398M} dient das Plasmid pJF119EH-trpE welches in der Arbeitsgruppe von Sprenger durch Klonierung von *trpE* aus *E. coli* in den Vektor pJF119EH1 hergestellt und freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurde. pJF119EH1 ist ein „high copy“-Vector, der unter anderem einen *tac*-Promotor enthält, welcher durch Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) induziert werden kann.¹⁰⁴ β -Lactamase, kodiert durch *bla* ist in der Lage den Lactamring in β -Lactam-Antibiotika zu spalten. Die daraus resultierende Ampicillinresistenz wird als Selektionskriterium eingesetzt.

Isolierte Plasmid-DNA von pJF119EH-trpE wurde durch zwei unterschiedliche Restriktionskontrollen überprüft (siehe Abbildung 3.9). Restriktion von pJF119EH-trpE mit *EcoRV* schneidet das 7026 bp große Plasmid in die erwarteten zwei Fragmente mit der Größe von

1539 bp bzw. 5487 bp. Die Restriktion mit *AsnI* ergibt vier Fragmente mit Größen von 59 bp, 1525 bp, 2597 bp und 2845 bp, wobei das kleinste Fragment in der Aufnahme in Abbildung 3.9 nicht zu erkennen ist. Die Expression des plasmidkodierten *trpE* wurde durch Untersuchung des zellfreien Extraktes von unter induktiven Bedingungen gewachsenen Zellen (LB-Medium, 0.1 mM IPTG) über Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) bestätigt. Die Enzymaktivität für den Zellrohextrakt wurde in einem gekoppelten Enzymtest abestimmt in dem das bei der Bildung von Anthranilat aus Chorismat freigesetzte Pyruvat per NADH-abhängigem Lactatdehydrogenase-Test bei 340 nm quantifiziert wird. Auf diese Weise wurde für das Zellrohextrakt eine Aktivität von $4 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ bestimmt. In einem Vergleichsansatz mit Zellrohextrakt von pJF119EH wurde keine Aktivität festgestellt.

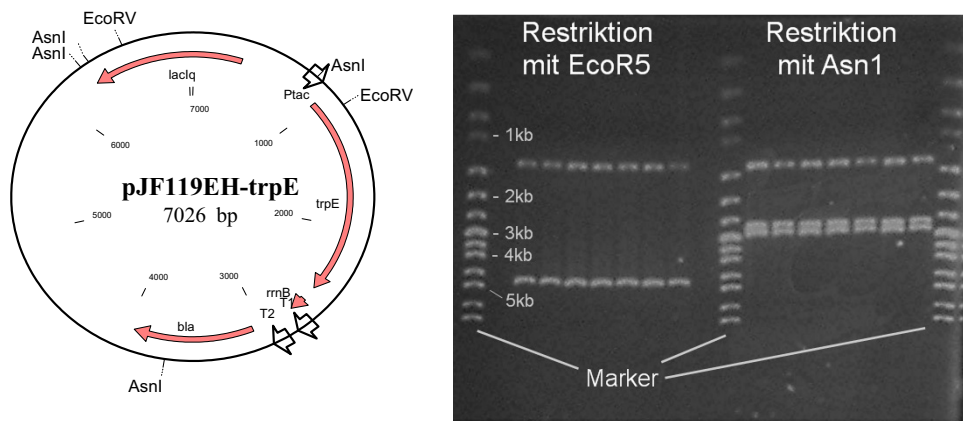


Abbildung 3.9: Restriktionsanalyse von pJF119EH-trpE. Die Restriktion mit *EcoRV* ergibt zwei Fragmente (ca. 1.5 kb und 5.5 kb), die Restriktion mit *AsnI* zeigt drei Fragmente (ca. 1.5 kb, 2.6 kb und 2.8 kb).

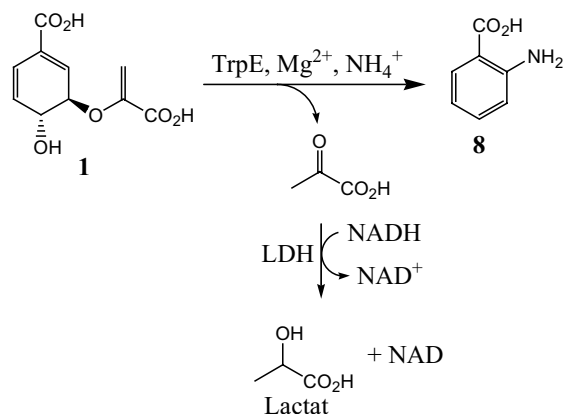


Abbildung 3.10: Enzymassay zur Bestimmung der Aktivität von TrpE.

Der H398M-Austausch in *trpE* wurde durch ortsgerichtete Mutagenese vorgenommen (siehe Abbildung 3.11). Bei dem gewählten Verfahren wird isolierte Plasmid-DNA denaturiert und mit Primern verschmolzen, die die gewünschte Mutation enthalten. Unter Verwendung von *PfuTurbo* DNA Polymerase, die sich durch eine 6-fach höhere Replikationsgenauigkeit als *Taq* DNA Polymerase auszeichnet, wird die DNA inklusive der in die Primer eingebauten Mutation durch Polymerase Kettenreaktion (PCR) vervielfältigt. Dabei entsteht Plasmid-DNA, deren Ringstruktur jeweils am 3'-Ende des verwendeten Primers unterbrochen ist. Durch die Behandlung mit der Endonuklease *DpnI*, die spezifisch methylierte und hemimethylierte DNA verdaut, wird nicht mutiertes Ausgangsplasmid abgebaut, so dass nur noch die mutierte DNA vorliegt. Durch Transformation in XL1-Blue superkompetente Zellen können die DNA-Stränge geschlossen werden und nach Vervielfältigung der Zellen kann intakte DNA des mutierten Plasmids pC14 (entspricht pJF119-*trpE*^{H398M}) gewonnen werden.

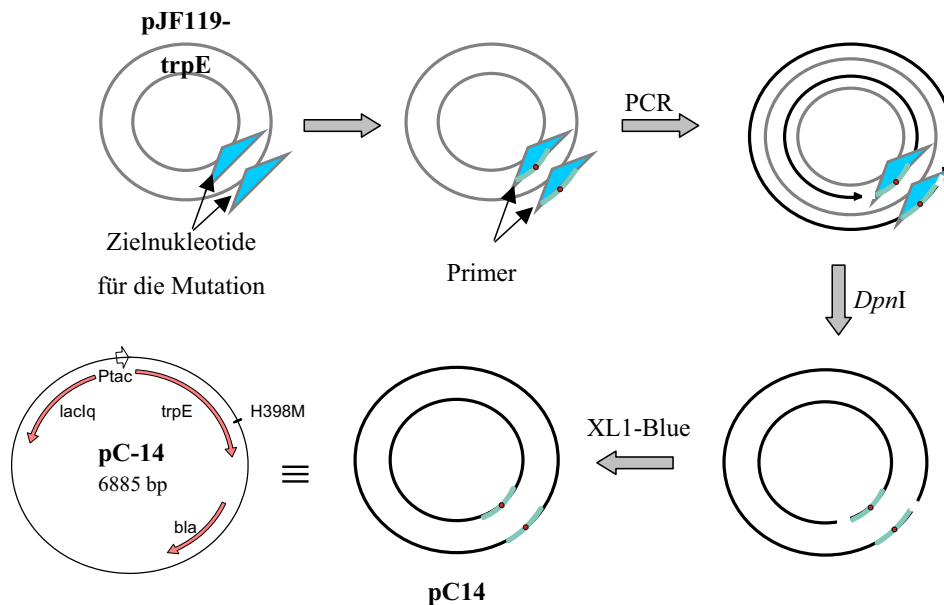


Abbildung 3.11: Darstellung von pC14 durch ortsgerichteten Mutagenese.

Kolonien, die ein erfolgreich mutiertes Gen enthalten, auf X-galⁱ enthaltenden Agarplatten eine typische Blaufärbung. Auf diese Weise wurde eine Mutationseffizienz von 94 % ermittelt. Durch Doppelstrangsequenzierung des isolierten Plasmids pC14 konnte die erwartete Basensequenz bestätigt werden.

Die Expression von TrpE^{H398M} wurde durch SDS-PAGE von zellfreiem Extrakt des *E. coli*-Stammes DH5 α untersucht (siehe Abbildung 3.13). Das verstärkte Erscheinen einer Bande bei etwa 57.5 kDa, was der Größe von TrpE bzw. TrpE^{H398M} entspricht, zeigt, dass das Expressionslevel der mutierten Form in der gleichen Größenordnung liegt, wie das des unveränderten TrpE.

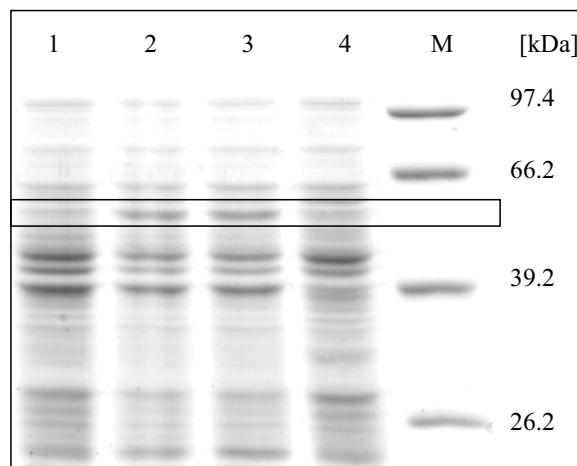


Abbildung 3.13: SDS-PAGE der zellfreien Extrakte von DH5 α (LB-Medium, 100 μ M IPTG).
Bahn1: DH5 α /pJF119EH1; Bahn 2: DH5 α /pJF119EH-trpE; Bahn 3: DH5 α /pC14; Bahn 4: DH5 α .

3.2.2 Klonierung des *E. coli*-Stammes F67 (LJ110- Δ trpE)

Sowohl zur Kontrolle der ADIC-Lyase-Aktivität von pC14, als auch als Basis für einen möglichen späteren Produktionsstamm wurde ein *E. coli*-Stamm mit fehlender *trpE*-Aktivität kloniert. Die Deletion des chromosomalen *trpE*-Gens in einem *E. coli*- LJ110-Stamm wurde nach einem Verfahren von Church *et al.* durchgeführt.¹⁰⁵

ⁱ 5-Brom-4-chlor-3-indoyl- β -D-galactopyranosid

Über eine sogenannte *Crossover-PCR* wurde zunächst ein DNA-Fragment konstruiert, das eine *in-frame*-Deletion von *trpE* trägt (siehe Abbildung 3.14). Dazu wurden die DNA-Bereiche, die das Gen *trpE* flankieren über PCR amplifiziert. Die beiden so erhaltenen Fragmente wurden über eine in den Primern enthaltene Ersatzsequenz verbunden und gemeinsam erneut vervielfältigt. In die Primer P1 und P4 sind *Bam*HI-Schnittstellen für weitere Klonierungen eingebaut. Die Primer P2 und P3 tragen zusätzlich zu der an die genomische DNA bindenden Sequenz nicht charakterisierende Nukleotidsequenzen, die in P2 und P3 komplementär zueinander sind und so die spätere Ersatzsequenz bilden.

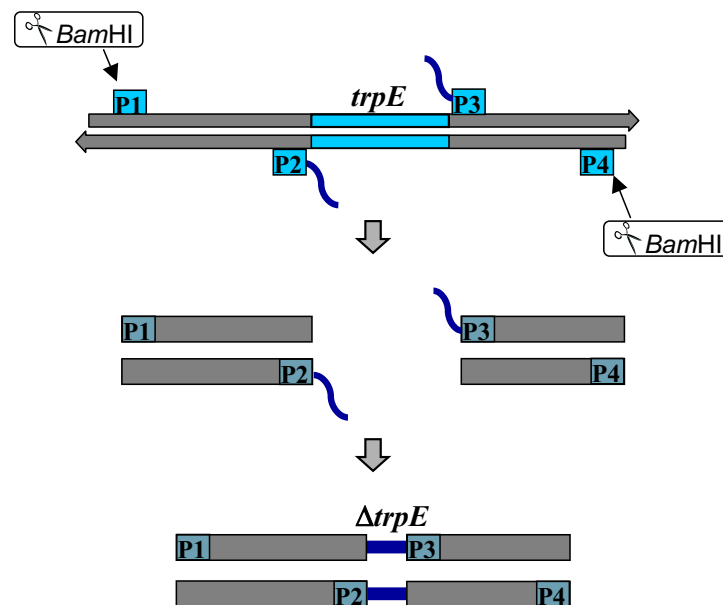
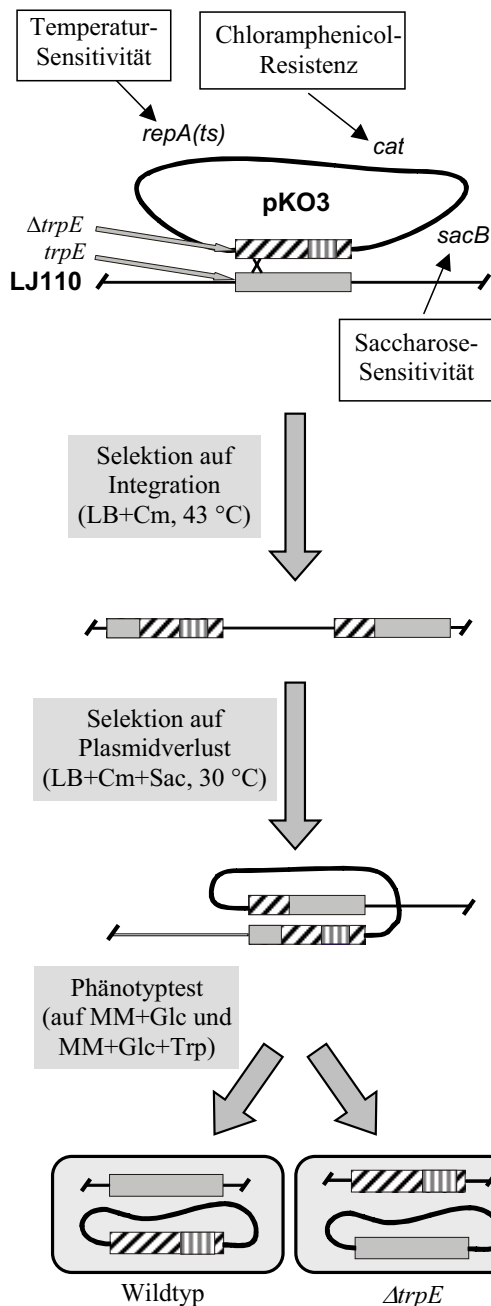


Abbildung 3.14: Prinzip der *Crossover-PCR* zur Darstellung einer *in-frame*-Deletion von *trpE*.

Um jederzeit auf das $\Delta trpE$ -Produkt zurückgreifen zu können wurde es in einen pBlue2KS⁻-Vektor zwischenkloniert. Dazu wurde dieser Vektor mit *Eco*RV linearisiert, mit alkalischer Shrimp-Phosphatase dephosphoryliert und $\Delta trpE$ mit Polynukleotid-Kinase phosphoryliert, ehe die beiden Teile mit T4-Ligase ligiert wurden. Aus dem so gewonnenen Plasmid pBlue2KS⁻- $\Delta trpE$ (pC11) kann $\Delta trpE$ leicht durch Restriktion über die in die Primer 1 und 4 eingebauten *Bam*HI-Schnittstellen isoliert werden. Die Integration der Deletion in das Genom

von *E. coli* LJ110 geschieht mit Hilfe eines pKO3-Vektors (siehe Abbildung 3.15). Die aus pC11 ausgeschnittene Deletionssequenz wird über eine *Bam*HI-Schnittstelle in den pKO3-Vektor eingesetzt. Der Zielstamm LJ110 wird mit dem so erhaltenen Vektor pC12 (pKO3-



$\Delta trpE$) transformiert und auf Chloramphenicol enthaltenden Agarplatten ausplattiert.

pKO3 enthält unter anderem das Gen *repA(ts)*, das zu einer Temperatursensitivität aller Zellen führt, die dieses Gen plasmidisch tragen. Bei Inkubation bei 43 °C, der sogenannten „nicht zugelassenen“ Temperatur für pKO3-Vektoren, sorgt der dadurch ausgeübte Selektionsdruck dafür, dass einige Zellen das Plasmid vollständig in die chromosomale DNA integrieren um so das *repA(ts)*-Gen zu inaktivieren.

Die im Vektor enthaltene Chloramphenicolresistenz, die durch das *cat*-Gen kodiert ist, wird durch die Integration in die chromosomale DNA nicht beeinflusst. Kolonien, die unter diesen Bedingungen wachsen, werden selektiert und auf Agarplatten mit einem 5 %igen Saccharoseanteil ausplattiert.

Abbildung 3.15: Einbau von $\Delta trpE$ in die chromosomale DNA von *E. coli* LJ110 mit Hilfe eines pKO3-Vektors.

Eine in pKO3 durch *sacB* kodierte Saccharosesensitivität übt erneut einen Selektionsdruck auf die Zellen aus, der zu einem Ausstoß des zuvor integrierten Plasmids führt. In den allermeisten Fällen wird dabei das Plasmid in der Form ausgeschieden, in der es aufgenommen wurde. In wenigen Ausnahmen kommt es jedoch zu einem DNA-Teilaustausch, so dass anstatt der *trpE*-Deletionssequenz das chromosomale *trpE*-Gen mit dem Vektor aus der Zelle entfernt wird.

Entsprechende Kolonien können durch einen Phänotypentest identifiziert werden. Während Kolonien, die pC12 in seiner ursprünglichen Form aus dem Genom entfernt haben, auf Minimalmedium wachsen, ist dies für solche, die nun statt *trpE* nur die kurze Ersatzsequenz tragen nur möglich, wenn dem Medium Tryptophan zugesetzt ist. Über diese Methode konnten von etwa 800 getesteten Kolonien drei identifiziert werden, die den entsprechenden Phänotyp aufweisen. Mit den Primern 1 und 4, die bei der Herstellung von $\Delta trpE$ eingesetzt wurden, wurde eine Kontroll-PCR durchgeführt. Die Bahnen 1-3 in Abbildung 3.16 zeigen den Stamm F67, der im Vergleich zum ursprünglichen LJ-110 ein etwa 1.6 kb kleineres PCR-Produkt liefert, was genau der Größe von *trpE* entspricht.

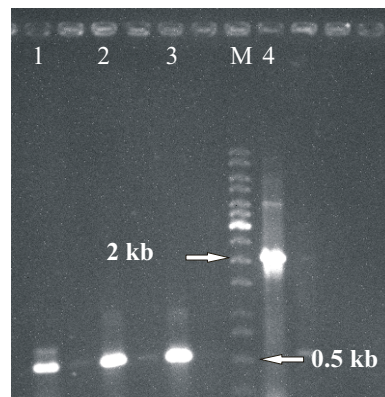


Abbildung 3.16: PCR-Analyse der chromosomalen Deletion von *trpE* in LJ-110.

Der so gewonnene Stamm F67ⁱ wird unmittelbar für Komplementierungsexperimente eingesetzt. Durch Transformation von pC14 in F67 soll die fehlende, oder reduzierte Anthranilatsynthaseaktivität von TrpE^{H398M} *in vivo* gezeigt werden. Ausplattieren von F67-pC14 auf Agarplatten mit Minimalmedium, Minimalmedium mit Tryptophanzusatz und

ⁱ Der LH110- $\Delta trpE$ -Stamm wird als F67 bezeichnet. Die Bezeichnung beruht auf der Fortsetzung der Nomenklatur, die in einem Vorgängerprojekt (FAME-Projekt) begonnen wurde.

Vollmedium (LB-Mediumⁱ) sowie Inkubation bei 37 °C zeigt nach 24 h sowohl auf LB-Medium, als auch auf Minimalmedium mit supplementiertem Tryptophan Wachstum der Kolonien, während auf Minimalmediumplatten ohne Tryptophan kein Wachstum erkennbar ist. Erst nach weiteren 48 h Inkubation bei 37 °C lässt sich auf diesen Platten Wachstum erkennen. Diese Resultate decken sich mit den Ergebnissen, die R. Bauerle *et al.* bei den Untersuchungen zum *S. typhimurium trpE*-Gen machte, denn auch dabei wurde kein vollständiger Verlust der Anthranilatsynthaseaktivität festgestellt, sondern lediglich eine deutliche Reduzierung der Aktivität bei einer Restaktivität von etwa 1 %.

3.2.3 In vitro-Darstellung von ADIC

Durch Überexpression von TrpE^{H398M} sollte die Möglichkeit bestehen, mit Zellrohextrakt aus Chorismat (**1**) ADIC (**16**) darzustellen. Zu diesem Zweck wurde DH5α mit pC14 transformiert und bei 37 °C inkubiert. DH5α/pJF119EH1 dient als Referenzstamm.

Bei einer optischen Dichte (OD) von 0.5 wird mit IPTG induziert und für weitere 4 h in LB-Medium mit Ampicillin bei 30 °C inkubiert, ehe die Zellen geerntet und per Ultraschall aufgeschlossen werden. Die von Zellresten befreiten Überstände werden in Gegenwart von Mg²⁺ (10 mM) und NH₄⁺ (100 mM) in Tricinpuffer (pH 8) mit Chorismat (**1**) (2.5 mM) versetzt und bei 30 °C inkubiert. Die HPLC-Untersuchung der Assays zeigt, dass nach 1 h Inkubationszeit in dem Ansatz eine neue Substanz gebildet wird, in dem der zellfreie Überstand von DH5α/pC14 eingesetzt wurde. Der zugehörige Peak hat eine Retentionszeit von 21.1 min und sein UV-Spektrum ist dem von Chorismat ähnlich (siehe Abbildung 3.17). Die Intensität des Peaks nimmt zunächst zu, ehe sie nach mehreren Stunden langsam wieder abnimmt. Durch Vergleich von Retentionszeit und UV-Spektrum mit einer ADIC-Probe¹⁰⁶ konnte das Signal ADIC (**16**) zugeordnet werden. Aufgrund der geringen Menge wurde die Substanz nicht isoliert und weiter analytisch charakterisiert. Im Kontrollansatz mit DH5α/pJF119EH1 kann ADIC nicht detektiert werden. Die nach mehreren Stunden beobachtete langsame Abnahme der ADIC-Konzentration ist wahrscheinlich auf eine Metabolisierung sowie einen thermischen Zerfall der Substanz zurückzuführen.

ⁱ Vollmedium nach Luria-Bertani bestehend aus Trypton, Hefeextrakt und NaCl.

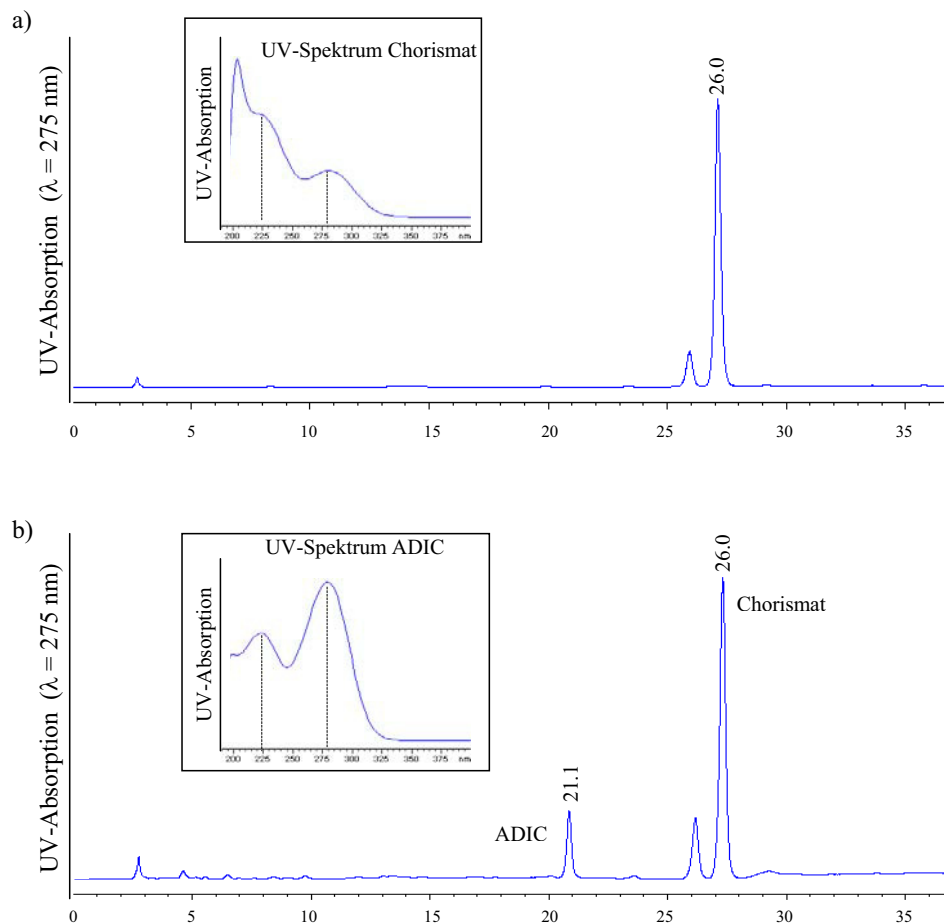


Abbildung 3.17: HPLC-Chromatogramm und UV-Spektren der Umsetzung von Chorismat (**1**) mit Zellrohextrakt. a) DH5α/pJF119EH1 nach 160 min Inkubation bei 30 °C; b) DH5α/pC14 nach 60 min Inkubation bei 30 °C.

3.2.4 In vitro-Darstellung von 2,3-*trans*-CHA

ADIC (**16**) stellt in der Biosynthese von Tryptophan die unmittelbare Vorstufe von Anthranilat dar, das durch Spaltung des Enolpyruvylrestes bei gleichzeitiger Aromatisierung durch Katalyse der Anthranilatsynthese gebildet wird. Die Abspaltung eines Pyruvatrestes unter Erhalt des Cyclohexadiensystems enzymatisch ist möglich, wie von analogen Cyclohexadiendiolen aus der Enterobactin-Biosynthese bekannt ist. Dabei wird zunächst Chorismat (**1**) durch den katalytischen Einfluss von EntC zu Isochorismat umgesetzt, das wiederum durch EntB-Katalyse zum 2,3-*trans*-CHD (**3**) überführt wird. Unter der Annahme,

dass analog zu Isochorismat auch ADIC als Substrat von EntB akzeptiert wird, würde durch Klonierung von *entB* in das Plasmid pC14 eine Möglichkeit zur Verfügung stehen, 2,3-*trans*-CHA in der Zelle unter ausschließlicher Verwendung von *E. coli*-Genen bzw. modifizierten *E. coli*-Genen herzustellen.

Von ADIC (**16**) ist bekannt, dass es außer in der Biosynthese der aromatischen Aminosäuren auch als Stoffwechselprodukt bei der Biosynthese von Phenazinen wie Pyocyanin (**140**) und Phenazin-1-carbonsäure (**96**) gebildet wird (siehe Abbildung 3.18 und Kapitel 2.3.1). Die bioaktiven Phenazine werden ebenfalls ausgehend von Chorismat (**1**) gebildet. Zwei Operons, die jeweils sieben Gene (*phzA-G*)^{82a,107} enthalten wurden in *P. aeruginosa* identifiziert und es wurde festgestellt, dass alle Gene für die Synthese von Phenazin-1-carbonsäure, ausgehend von Chorismat notwendig sind.^{82b} Weitere Untersuchungen haben eine große Ähnlichkeit der Aminosäuresequenzen von Proteinen aus der Aromatenbiosynthese und der verschiedener Phenazingene gezeigt.¹⁰⁸ So ist das 400-Aminosäuren Protein PhzC von *P. fluorescens* 2-79 zu 39.1% übereinstimmend und zu 46 % ähnlich mit der DAHP-Synthase AroG von *Lycopersicon esculentum* genauso wie mit anderen Pflanzen-DAHP-Synthasen. Das Protein PhzD des gleichen *Pseudomonas*-Stammes besitzt bei seinen 207 Aminosäuren 46.9 % Übereinstimmung und 59.9 % Ähnlichkeit mit der Isochorismatase EntB von *E. coli* und katalysiert die Umsetzung von ADIC (**16**) zum 2,3-*trans*-CHA (**2**).¹⁰⁸ PhzE erwies sich bei einer BLAST-Analyse¹⁰⁹ zu 45.9 % identisch und 33.2 % ähnlich mit der Anthranilatsynthase von *Streptomyces venezuelae* und hat weiterhin Homologien zu anderen bakteriellen Anthranilatsynthasen, *p*-Aminobenzoatsynthasen und menachinonspezifischen Isochorismatsynthasen. Genau wie TrpE katalysiert PhzE die Reaktion von Chorismat zu ADIC. Im Falle von PhzE wird die Folgereaktion von ADIC zu Anthranilat jedoch nicht katalysiert. Damit stellt PhzE eine Alternative zum modifizierten TrpE^{H398M} aus *E. coli* dar.

Beide in Abbildung 3.18 dargestellten Synthesewege eignen sich somit prinzipiell für eine mikrobielle Produktion von ADIC bzw. 2,3-*trans*-CHA.

Aus diesem Grund wurde *phzD* von DSM Biotech im Rahmen des CHORUS-Projektes aus genomischer DNA des Stammes *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 17933 amplifiziert, das 667 Basenpaar große PCR-Produkt mit *Hind*III geschnitten (647 bp) und in die *Hind*III-Schnittstelle des Plasmids pJF119EH1 kloniert (Plasmid pC26). Außerdem wurde *phzD* in

pC14 kloniert (Plasmid pC30) und *phzE* gemeinsam mit *phzD* auf einen pF113-Vektorⁱ kloniert (pC27).

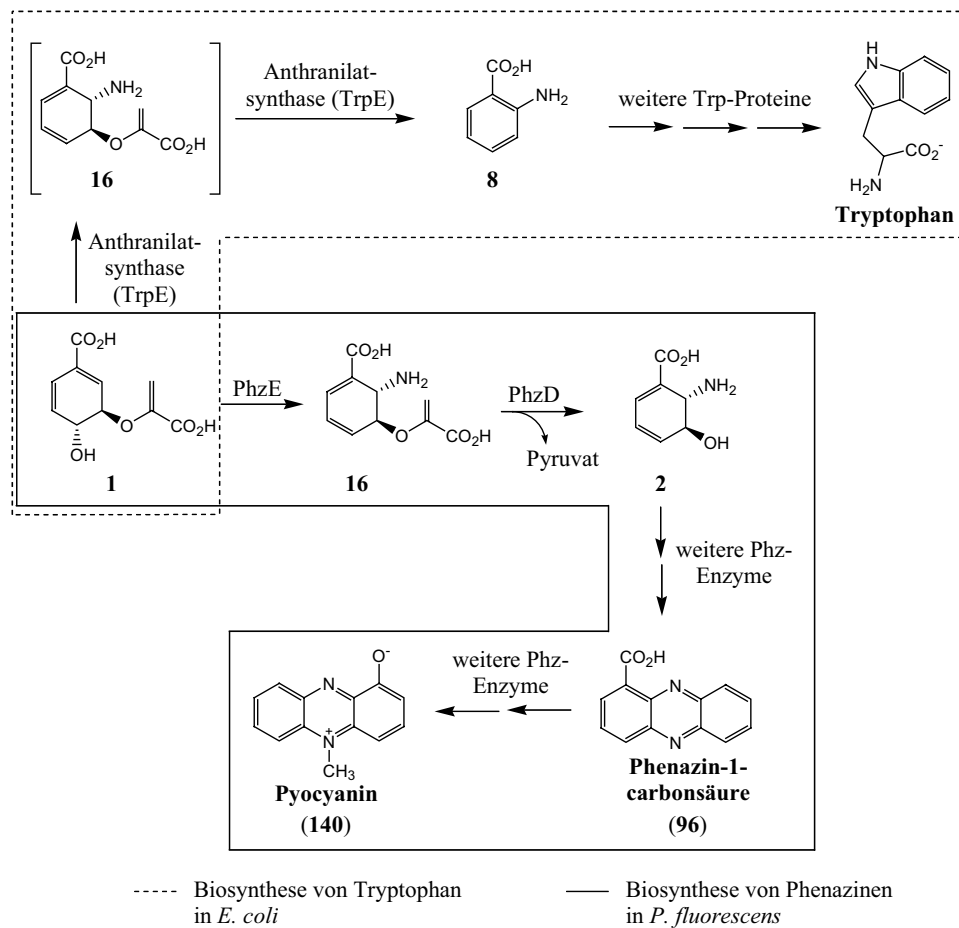


Abbildung 3.18: Von Chorismat (1) ausgehende Biosynthesewege zu Tryptophan und Phenazinen.

ⁱ pF113 = pJF119EH1 mit zusätzlich eingebrachter *NorI*-Schnittstelle.

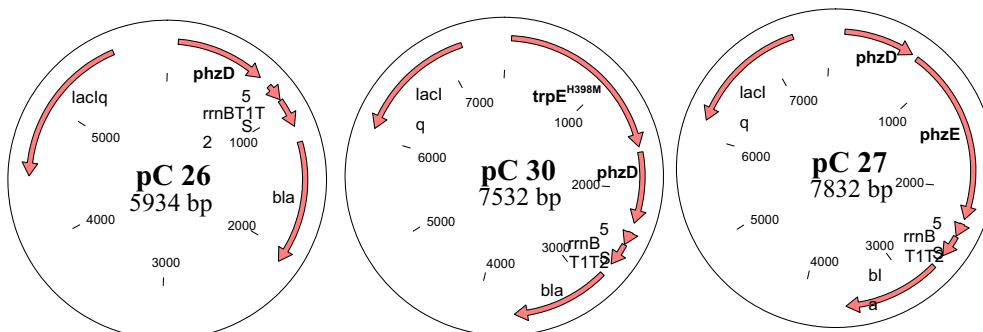


Abbildung 3.19: Plasmide zur Darstellung von 2,3-*trans*-CHA (**2**) die Phenazingene enthalten.

Zur Verdeutlichung, dass das aus *P. aeruginosa* klonierte *phzD* für eine Umsetzung von **16** zu **2** verwendbar ist, wurden die *in vitro* Experimente, die zuvor zur Darstellung von **16** durchgeführt wurden, mit Zellrohextrakt von DH5 α /pC30 wiederholt. Im Vergleich zu den als Kontrollen durchgeführten Ansätzen mit Zellrohextrakt von DH5 α /pJF119EH1 und DH5 α /pC14 wird mit pC30 in den ersten Stunden ein neues Produkt gebildet, das bei der verwendeten HPLC-Methode eine Retentionszeit von 4.5 min hat. Durch Koinjektion des synthetisch dargestellten racemischen 2,3-*trans*-CHA (**2**) konnte dieser Peak als erwartetes Produkt identifiziert werden. 2,3-*trans*-CHA (**2**) wurde bei den untersuchten Ansätzen nahezu ausschließlich gebildet, abgesehen von 3-Hydroxybenzoesäure (**106**), welches auch in Abwesenheit von Proteinlösung durch thermischen Zerfall von Chorismat (**1**) entsteht. Das bedeutet, dass der Abbau von ADIC (**16**) zum CHA **2** durch PhzD bei den gewählten Bedingungen schneller verläuft, als dessen Bildung durch TrpE^{H398M}, wobei keine Aussage darüber getroffen werden kann, ob dies auf das Expressionslevel oder die k_{cat} -Werte der Enzyme zurückzuführen ist.

3.2.5 In vivo-Produktion von 2,3-*trans*-CHA

Mit den Plasmiden pC27 und pC30 stehen biologische Werkzeuge zur Verfügung, die eine mikrobielle Produktion von **2** möglich erscheinen lassen. Durch die zuvor etablierte HPLC-Analytik ist es möglich, Fermentationsüberstände von potentiellen 2,3-*trans*-CHA-Produzenten auf das gewünschte Produkt hin zu untersuchen.

In einem Schüttelkolbenexperiment wurde der mit pC30 transformierte Stamm F4, der basierend auf einem LJ110-Stamm Deletionen von *pheA*, *tyrA* und *aroF* enthält, unter nicht

pH-geregelten Bedingungen im Batch-Ansatz kultiviert und der Fermentationsüberstand auf **2** untersucht. F4/pC30 wurde zunächst in LB-Medium bis zu einer OD von 1.8 bei 37 °C kultiviert. Nach Beendigung der Anzuchtphase wurden die Zellen bei 4 °C geerntet, in einem Minimalmedium nach Tanaka,¹¹⁰ das unter anderem IPTG (Endkonzentration 100 µM) enthält, resuspendiert und weiter bei 37 °C inkubiert.

Beim Wechsel der Fermentationsmedien konnte **2** im zuerst verwendeten Vollmedium nicht nachgewiesen werden. Dies lässt sich durch eine hohe Regulierung der Produktion der aromatischen Aminosäuren erklären. In *E. coli* ist die Chorismatsynthese und dadurch auch die Synthese der Folgeprodukte durch die Konzentration der aromatischen Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin reguliert. Dabei werden die drei Isoenzyme der DAHP-Synthase beeinflusst. DAHP-Synthase^{Trp} (kodiert durch *aroH*) unterliegt einer Feedbackinhibierung durch Tryptophan, DAHP-Synthase^{Tyr} (kodiert durch *aroF*) unterliegt einer Feedbackinhibierung durch Tyrosin und DAHP-Synthase^{Phe} (kodiert durch *aroG*) unterliegt einer Feedbackinhibierung durch Phenylalanin. Weiterhin greifen Regulierungsmechanismen sowohl auf enzymatischer als auch auf genetischer Ebene bei den Chorismat verwendenden Biosyntheseschritten. So wird bei einer entsprechend hohen Konzentration der aromatischen Aminosäuren, wie sie im LB-Medium gegeben ist, die Bildung von Chorismat über den Shikimat-Biosyntheseweg unterdrückt und demnach **2** nicht gebildet.

Nach dem Wechsel in das Minimalmedium stehen der Zelle keine Aminosäuren aus dem Medium mehr zur Verfügung. Diese müssen deshalb von der Zelle über den Shikimat-Biosyntheseweg aus der vorhandenen Glucose dargestellt werden. Unterstützt durch die Deletionen von *pheA*, *tyrA* und *aroF* steht intrazellulär gebildetes Chorismat in ausreichender Menge zur Verfügung und kann von den in der ersten Phase gebildeten Enzymen, wie TrpE^{H398M} und PhzD, als Substrat metabolisiert werden.

In den ersten fünf Stunden nach dem Medienwechsel werden stündlich Proben entnommen und auf Produktbildung untersucht. Nach zwei Stunden tritt neben weiteren Peaks bei etwa 4.5 min ein Signal auf. Außerdem erscheint ein Peak bei etwa 26.0 min, der auf Chorismat (**1**) hindeutet. In den folgenden Messungen wachsen beide Peaks stetig. Durch Koinjektion von synthetisch dargestelltem 2,3-*trans*-CHA (*rac*-**2**) und der Überlagerung der entsprechenden UV-Spektren (siehe Abbildung 3.20c) konnte der Peak 2,3-*trans*-CHA (**2**) zugeordnet werden.

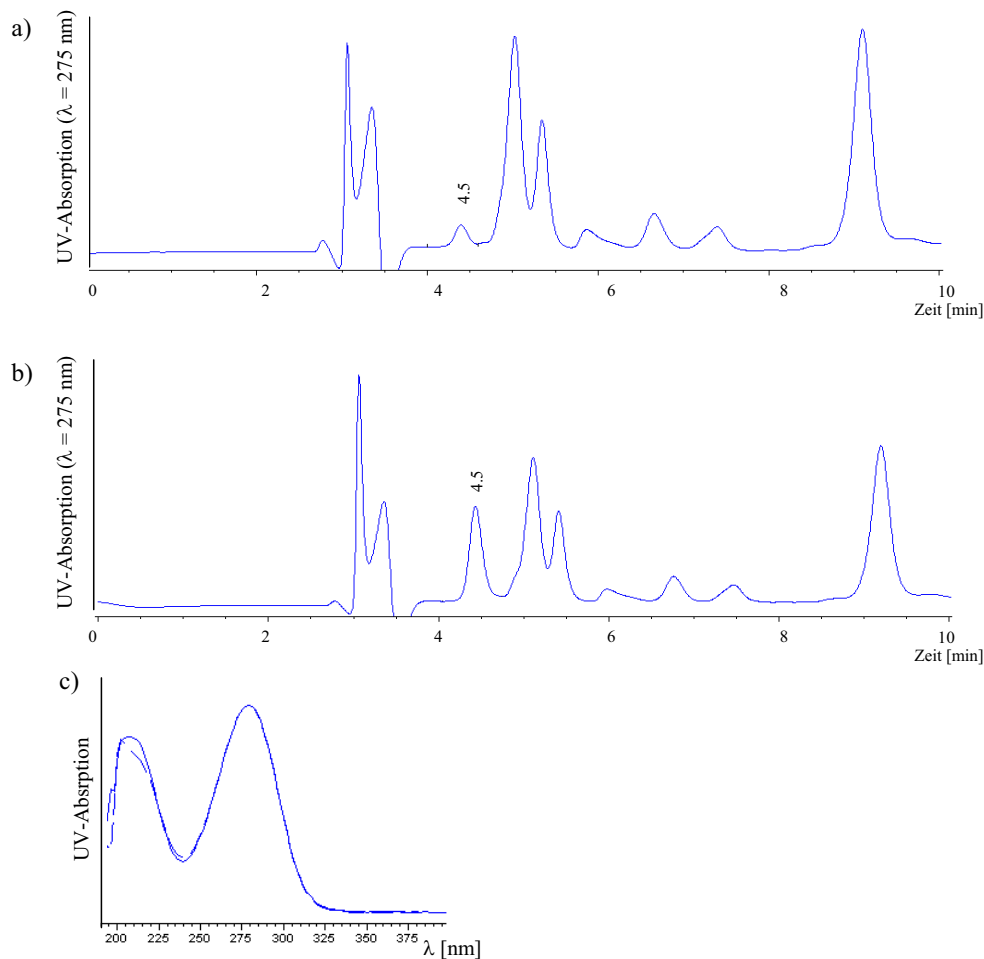


Abbildung 3.20: Chromatogramme und Spektrum aus der Kultivierung in Minimalmedium.
a) Medium nach 6 h; b) Medium mit Koinjektion von synthetischen *rac*-2;
c) Überlagerung der UV-Spektren.

Die gebildete Menge an **2** ist jedoch äußerst gering, weshalb weitere analytische Nachweise nicht durchgeführt wurden. Nach 2 h konnte eine Konzentration von $0.21 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ bestimmt werden, was knapp über der Quantifizierungsgrenze von **2** ($0.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, $1.2 \mu\text{M}$) liegt. Nach 5 h lag die Konzentration bei $0.75 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ($4.8 \mu\text{M}$) und nach 24 h wurde eine Konzentration von $1.15 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ($7.4 \mu\text{M}$) bestimmt. Gleichzeitig wurde eine Vielzahl von nicht identifizierten Produkten gebildet. Die Tatsache, dass neben 2,3-*trans*-CHA (**2**) auch Chorismat (**1**) im Fermentationsüberstand gefunden wird, nicht aber ADIC (**16**), zeigt, dass anscheinend die Bildung von **16** durch $\text{TrpE}^{\text{H398M}}$ der limitierende Schritt ist.

Im Rahmen von CHORUS wurde zeitgleich von DSM-Biotech das Plasmid pC27 (pF113-phzD-phzE) in Schüttelkolbenexperimenten gentechnisch veränderten *E. coli*-Stamm getestet. Bei diesen Experimenten wurde **2** (bis zu $0.8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) neben **1** (bis zu $0.4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) nachgewiesen während beim gleichen Wirtstamm mit pC30 kein **2** nachgewiesen werden konnte.

Aufgrund der vielversprechenderen Ergebnisse wurden daraufhin von DSM BIOTECH Fermentationen im 2 Liter Maßstab mit einem pC27 tragenden gentechnisch veränderten *E. coli*-Stamm durchgeführt. Auf Anheb konnten dort Produktkonzentrationen von $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ nach 26 h bzw. $12 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ nach 50 h erreicht werden, ohne einer nennenswerten Bildung von Nebenprodukten.

3.3 Isolierung und Reinigung von mikrobiell gewonnenen Substanzen

Neben der Isolierung und Reinigung von 2,3-*trans*-CHA (**2**) sollen auch weitere, durch Biotransformation gewonnene Verbindungen aus *E. coli* Fermentationsüberständen gewonnen werden. Das *trans*-Diol **3** dient bei den synthetischen Arbeiten als Startverbindung für chemische Umsetzungen und wird daher in größerem Maßstab benötigt. Weiterhin wurde Chorismat (**1**) für biochemische Zwecke wie beispielsweise den *in vitro* Umsetzungen bei der Darstellung von ADIC (**16**) und **2** eingesetzt. Zwar ist Chorismat (**1**) kommerziell erhältlich, jedoch ist aus wirtschaftlichen Gründen eine eigene Herstellung von Vorteil.

3.3.1 Isolierung von 2,3-*trans*-CHD

D. Franke gelang es im Rahmen seiner Dissertation 2,3-*trans*-CHD (**3**) durch Überexpression von EntB und EntC mit *E. coli* zu produzieren und weiterhin das Produkt chromatographisch zu isolieren. Basierend auf diesen Arbeiten ist **3** eines der Produkte, die innerhalb des CHORUS-Projektes durch Ganzzellbiotransformation produziert werden sollen. Fermentationstechnische Verbesserungen wurden in der Gruppe von R. Takors untersucht und führten dazu, dass das Cyclohexadiendiol **3** gegenwärtig mit einer Konzentration von mehr als 15 Gramm pro Liter Fermentationsüberstand mikrobiell produziert werden kann. Dabei enthalten die Überstände neben dem gewünschten 2,3-*trans*-CHD (**3**) bei

entsprechender Fermentationsführung keine anderen Produkte aus dem Shikimat-Biosyntheseweg. Je nach Prozessführung kann es zu einer Anreicherung von Acetat im Überstand kommen.

Bei Untersuchungen zur Isolierung von **3** aus Fermentationsüberständen konnten von D. Franke zwei Verfahren etabliert werden. Einerseits ist es möglich das Cyclohexadiendiol durch Extraktion bzw. Reaktivextraktion zu isolieren. Alternativ lässt es sich durch Ionenaustauschchromatographie aus dem Fermentationsüberstand gewinnen.^{39b} Aufgrund der geringen Extraktionsleistung aller getesteter Lösungsmittel und der damit verbundenen geringen wirtschaftlichen und zeitlichen Effizienz wurde zur Gewinnung von **3** die chromatographische Methode bevorzugt.

Das verwendete Harz, Dowex 1x8, ist ein stark basischer Anionentauscherharz, das auf einem Polystyrengrundgerüst beruht. Als Bindungsstellen dienen eingebaute quartäre Ammoniumsalzderivate, an die **3** mit hoher Selektivität über die Carboxylatgruppe bindet (siehe Abbildung 3.21).

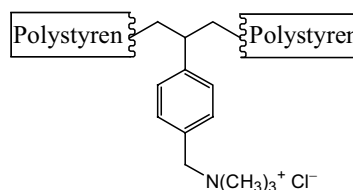


Abbildung 3.21: Bindestelle des basischen Anionentauscher Harzes Dowex 1x8.

Nach einer Equilibrierung des Harzes mit 50 mM Phosphatpuffer (pH 8) wird der zellfreie Überstand auf die Säule aufgetragen. Dabei bindet **3** an das Harz während andere Medienbestandteile wie Glucose und Proteine nicht adsorbieren. Eine quantitative Desorption wird durch Elution mit 50 mM Ameisensäure (pH 2.3) bei Erreichen eines $\text{pH} < 3$ erzielt. Dabei wird die Carboxylatgruppe von **3** protoniert und die Bindung gelöst. Durch Behandlung mit 2 M Natriumchloridlösung wird das Harz für den nächsten Isolierungszyklus regeneriert.

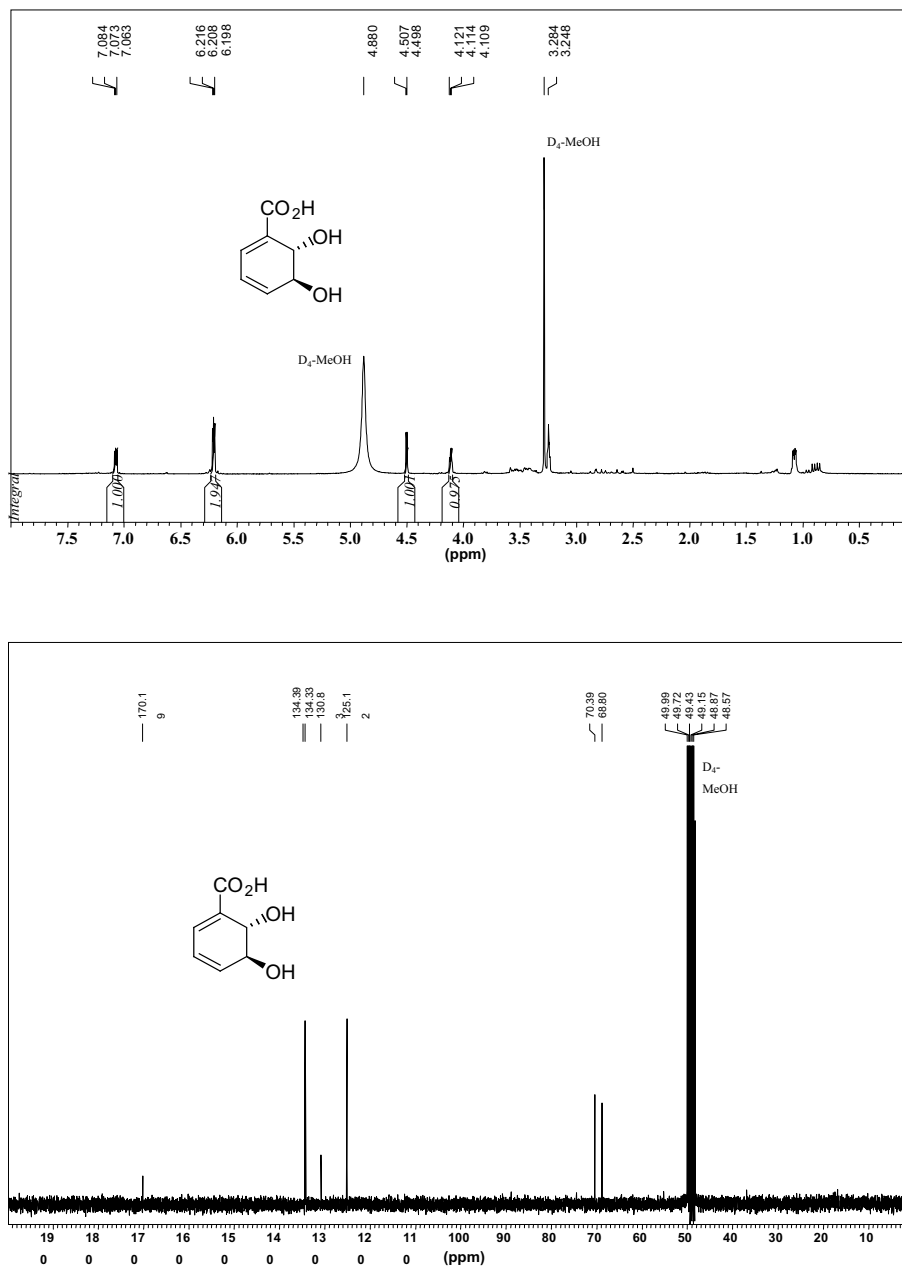


Abbildung 3.22: ¹H- und ¹³C-NMR-Spektren (D₄-MeOH, 300 bzw. 75 MHz) von 2,3-trans-CHD (3) nach Isolierung durch Ionenaustauschchromatographie.

Ein typischer Isolierungsvorgang wurde mit einer Chromatographiesäule mit 2 L sedimentiertem Harz durchgeführt. Die Kapazität des Harzes beträgt etwa $16 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, was zu einer maxiamle Produktmenge von etwa 32 g pro Chromatographiezyklus, gelöst in ca. 10 L Elutionslösung, führt. Das Eluat wird durch Rotationsverdampfung bei $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$ im Vakuum auf etwa 10 % des Ausgangsvolumens eingengt. Dabei ist darauf zu achten, dass das Volumen nicht um mehr als 90 % reduziert wird, da bei höheren Konzentrationen und erhöhter Temperatur eine Dimerisierung des Produktes stattfindet (siehe Kapitel 3.4.1). Durch Lyophilisation kann das restliche Eluat schonend entfernt und die Bildung von Nebenprodukten vermieden werden.

Durch HPLC, ^1H - und ^{13}C -NMR können keine Nebenprodukte detektiert werden. Allerdings ist ein nicht bestimmter Anteil an anorganischen Salzen nicht auszuschließen.

3.3.2 Isolierung von Chorismat

Im Rahmen von CHORUS zur Verfügung gestellte Fermentationsüberstände besaßen durchweg Produktkonzentrationen von über $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ **1**.

Als Grundlage für die Isolierung von **1** dienen Arbeiten von D. Hilvert *et al.*, bei denen eine Isolierung im Milligramm-Maßstab durch Ionenaustauschchromatographie beschrieben wird.

Als Adsorptionsmedium wird ebenfalls das Anionentauscherharz Dowex 1x8 eingesetzt. Der zellfreie Überstand wird aufgrund der thermischen Instabilität von Chorismat entweder unmittelbar nach der Fermentation, oder nach Zwischenlagerung bei $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$, durch Zugabe von Natronlauge auf pH 8.5 gebracht und auf die Chromatographiesäule aufgetragen. Unspezifisch gebundene Verbindungen, insbesondere Glucose und Proteine werden durch Spülen mit vollentsalztem Wasser entfernt. **1** wird schließlich mit 2 M Ammoniumchloridlösung (pH 8.5) als sein Ammoniumsalz eluiert. Das Eluat wird fraktioniert gesammelt und die einzelnen Fraktionen per HPLC auf ihren Produktgehalt untersucht. Die chorismathaltigen Fraktionen werden vereinigt, mit konzentrierter Salzsäure auf pH 1.5 angesäuert und das Produkt in seiner protonierten Form mit Diethylether extrahiert. Nach Volumenreduktion und Zugabe von Isohexan fällt Chorismat (**1**) bei $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ als weißer Niederschlag aus.

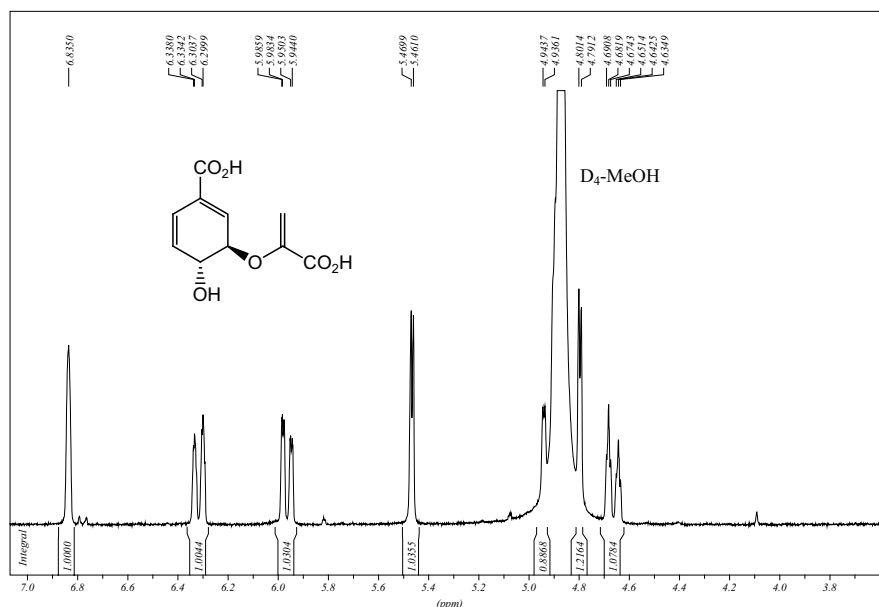


Abbildung 3.23: ¹H-NMR-Spektrum (D₄-MeOH, 300 MHz) von Chorismat (**1**) aus *E. coli* nach Aufreinigung.

Auf diese Weise kann **1** mit einer Reinheit von > 90 % und mit einer Ausbeute von etwa 50 - 70 % gewonnen werden. Dabei hängt die Ausbeute stark von der Aufarbeitungsgeschwindigkeit ab, da es bei Durchführung der verschiedenen Arbeitsschritte bei Raumtemperatur zum teilweisen thermischen Zerfall von **1** kommt. Da jedoch keine nennenswerten Verunreinigungen im Endprodukt auftreten, wurde auf eine kontinuierliche Kühlung trotz geringfügig erniedrigter Ausbeute verzichtet.

3.3.3 Isolierung von 2,3-*trans*-CHA

Im Gegensatz zum 2,3-CHD **3** und zu Chorismat (**1**) handelt es sich beim 2,3-CHA **2** um eine Aminosäure. DasSo ist, anders als bei den zuvor beschriebenen Verbindungen eine Adsorption an einen Kationentauscher über die Aminogruppe möglich. Daher wurde zur chromatographischen Isolierung das Kationentauscher Harz Dowex 50Wx8 (H⁺) verwendet (siehe Abbildung 3.24). Die zur Verfügung stehenden Fermentationsüberstände besitzen Produktkonzentrationen, die zwischen 0.8 und 12 g·L⁻¹ **2** liegen.

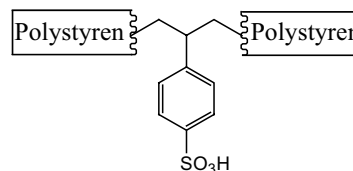


Abbildung 3.24: Bindestelle des Kationentauscher Harzes Dowex 50Wx8.

In einem typischen Isolierungszyklus wird der zellfreie Überstand mit gleichem Volumen 2 M Natronlauge verdünnt. Da bei dieser pH-Wert Erhöhung oft noch im Medium befindliche Proteine ausflocken empfiehlt sich eine erneute Zentrifugation, um ein Verstopfen der Säule zu verhindern. Die basische Lösung wird auf die Säule aufgetragen, unspezifisch gebundene Substanzen werden durch Spülen mit vollentsalztem Wasser von der Säule entfernt und das Produkt mit 0.5 M Ammoniaklösung eluiert. Das Eluat wird dabei fraktioniert gesammelt und die einzelnen Fraktionen auf ihren Produktgehalt untersucht. Produkthaltige Fraktionen werden auf etwa 10 % des Ausgangsvolumens bei 60 °C im Vakuum eingeeengt und das Produkt bei 4 °C aus der wässrigen Lösung auskristallisiert. Durch mehrfaches Umkristallisieren wird **2** in Form von farblosen Nadeln mit einer Reinheit > 95 % und einer Ausbeute von 60 % erhalten.

Aufgrund der hohen Reinheit und Produktkonzentrationen von über 10 g·L⁻¹ in den Überständen, sowie der guten Kristallisationsfähigkeit von **2** ist es möglich, dass **2** direkt aus dem zellfreien Fermentationsmedium gewonnen wird. Durch Waschen des sich bildenden Feststoffes mit eiskaltem Methanol können störende organische Bestandteile entfernt werden. Erneute Kristallisation aus Wasser liefert mit einer Ausbeute von 80 % das Produkt.

Neben dem geringeren Arbeitsaufwand zeichnet sich die Produktisolierung durch Kristallisation dadurch aus, dass sie voraussichtlich gut in einen größeren Maßstab übertragen werden und in einem technischen Prozess genutzt werden kann.

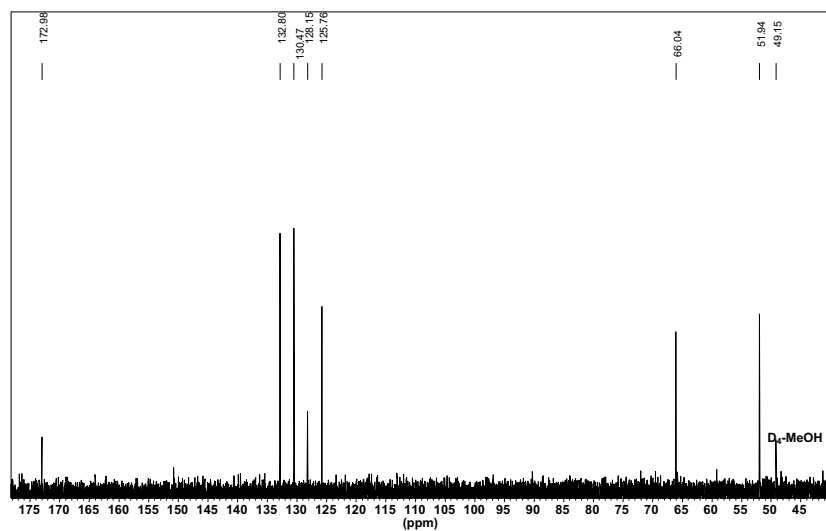
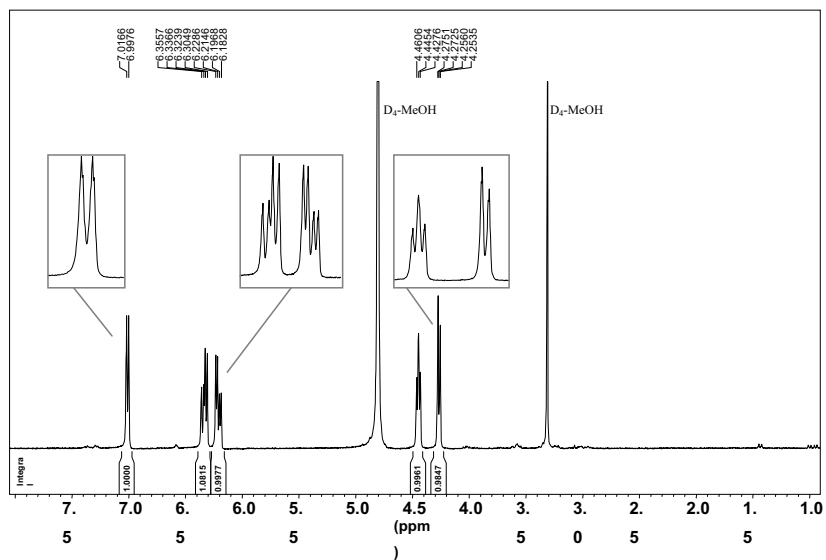


Abbildung 3.25: ^1H - und ^{13}C -NMR ($\text{D}_4\text{-MeOH}$, 300 bzw. 75 MHz) von 2,3-*trans*-CHA (**2**) nach Ionenaustauschchromatographie und Kristallisation.

3.4 Verwendung von funktionalisierten Cyclohexadienen als Synthesebausteine

Durch den von D. Franke im Rahmen seiner Dissertation erarbeiteten mikrobiellen Zugang zum Cyclohexadiendiol **3** steht eines der von Chorismat abgeleiteten funktionalisierten Cyclohexadiene für Untersuchungen der synthetischen Verwendbarkeit zur Verfügung. Die ionenchromatographische Produktisolierung sowie die von R. Bujnicki behandelte Optimierung der Fermentationsbedingungen ermöglichen eine effektive Produktion von **3** im Multigramm-Maßstab.

Das 2,3-*trans*-CHA (**2**) ist ebenfalls entsprechend der zuvor beschriebenen Arbeiten leicht im Multigramm-Maßstab zugänglich. Da die Darstellung von **2** allerdings erst im Laufe dieser Arbeit entwickelt wurde, konzentrieren sich die synthetischen Untersuchungen hauptsächlich auf das schon länger zur Verfügung stehende Diol **3**.

3.4.1 Modifikation von 2,3-*trans*-CHD durch Veränderung und Einführung von funktionellen Gruppen

Auch aus chemischer und biochemischer Sicht sind **1** und verwandte Cyclohexadiene von großem Interesse. Im Gegensatz zu den biologischen Umsetzungen im Zellmetabolismus spielen in diesem Fall Aromatisierungsreaktionen allerdings nur eine untergeordnete Rolle. Aus der Sicht des Chemikers zeichnen sich diese Verbindungen durch ihre Vielzahl an verschiedenen Funktionalitäten in einem kleinen Molekül aus. Außerdem besteht ein grundsätzlicher Bedarf an neuen Zugängen zu chiralen (enantiomerenreinen) Verbindungen zur Erweiterung des *Chiral Pool*.

Hinzu kommt, dass der gesamte Shikimat-Biosyntheseweg nur bei Bakterien, Pilzen und Pflanzen auftritt, nicht aber bei Menschen und Tieren. Diese Tatsache macht ihn zu einem geeigneten Angriffspunkt für potentielle Antibiotika, Fungizide und Herbizide, für deren Darstellung sich die Cyclohexadiene und Derivate als mögliche Enzyminhibitoren anbieten.⁵ Der hohe Funktionalisierungsgrad beispielsweise von **3** eröffnet die Möglichkeit zu einer Vielzahl von chemischen Modifizierungen und der Einführung neuer funktioneller Gruppen (siehe Abbildung 3.26).

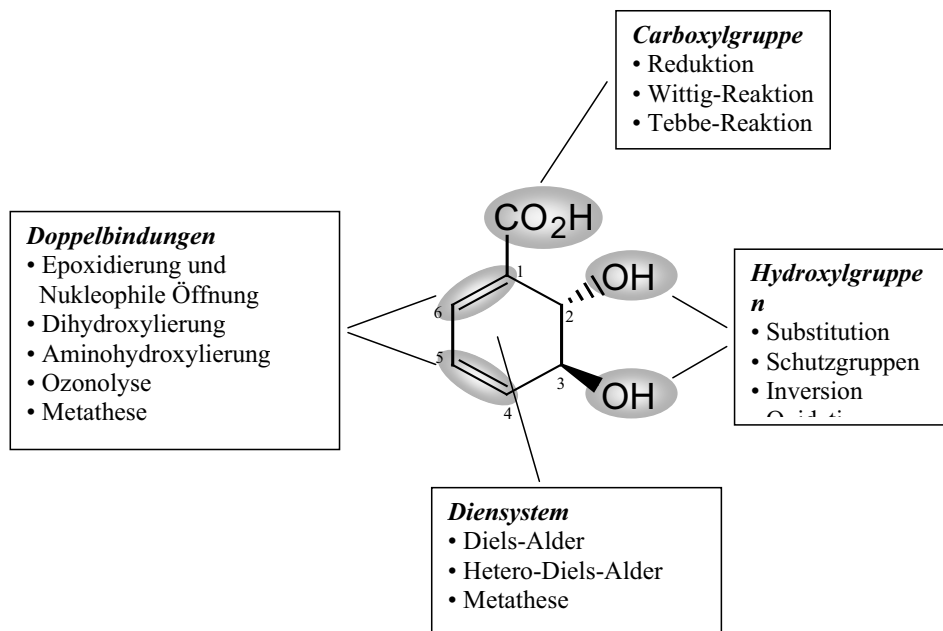


Abbildung 3.26: Exemplarischer Überblick über verschiedene Reaktionsmöglichkeiten des *trans*-CHD 3.

Dabei dienen die beiden gesättigten Ringkohlenstoffatome als Träger der chiralen Information, die bei vielen Umsetzungen durch Induktion der stereochemischen Information zur Generierung neuer Chiralitätszentren genutzt werden können. Dennoch kann es auch sinnvoll sein, die Hydroxylgruppen in chemischen Umsetzungen zu nutzen. Durch Einführung von Schutzgruppen wird beispielsweise die Polariät des gesamten Moleküls beeinflusst. Durch Oxidation einer Hydroxylgruppe zum entsprechenden Keton geht zwar an dieser Position ein chirales Zentrum verloren, da sich die beiden Hydroxylgruppen aber in ihrer chemischen Umgebung unterscheiden besteht die Möglichkeit einer regioselektiven Reaktionsführung, die den Erhalt eines Stereozentrums und somit der Asymmetrie im Molekül sichert.¹¹¹

Die Carboxylgruppe bietet sich für Reduktionen an. Die dadurch zugänglichen Alkohole und Aldehyde lassen sich weiter nutzen, beispielsweise für die Knüpfung von neuen C-C-Bindungen.

Besonders vielfältig einsetzbar sind die beiden konjugierten Ringdoppelbindungen. Auch hier gilt, dass sie sich in ihren chemischen Eigenschaften beeinflusst durch die angrenzenden Gruppen unterscheiden. So ist im Cyclohexadiensystem von 3 die Doppelbindung C4-C5

elektronenreicher als die benachbarte C1-C6-Bindung und somit gegenüber einem elektrophilen Reaktionspartner reaktiver.

Die ungesättigten Kohlenstoffbindungen bieten sich an für Additionsreaktionen wie Dihydroxylierungen, Aminohydroxylierungen und Epoxidierungen, wobei letztere durch nachfolgende nukleophile Öffnung einen Weg zu einer Vielzahl neuer Verbindungen darstellt. Außerdem können die einzelnen Doppelbindungen wie auch das 1,3-Diensystem für Reaktionen mit anderen Doppelbindungssystemen eingesetzt werden.

Schutzgruppenchemie und Redoxreaktionen

Wie bei der unter 3.3.1 beschriebenen Isolierung von 2,3-*trans*-CHD (**3**) erwähnt kann das aufgearbeitete mikrobielle Produkt einen gewissen Anteil an anorganischen Salzen enthalten. Um eine bessere Aufreinigung und eine erhöhte Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln zu erreichen, die weitere Umsetzungen erleichtert, wird eine Veresterung der Säurefunktion durchgeführt (siehe Abbildung 3.27). Als besonders milde, da nahezu neutrale Methode ist die Bildung des Methylesters unter Verwendung von Trimethylsilyldiazomethan bekannt.¹¹² Bei Einsatz von salzfreiem **3** kann so bei Raumtemperatur in einer Hexan/Methanol-Mischung der Methylester **133** gebildet werden und mit 81 % Ausbeute isoliert werden, ohne dass es zur Aromatisierung kommt. Der Nachteil dieses Verfahrens liegt in den hohen Kosten des Reagenzesⁱ und der geringen Atomökonomie. Im Hinblick auf die Übertragung der Reaktion in einen technischen Maßstab und darauf aufbauende Syntheserouten sind diese Aspekte besonders bei frühen Umsetzungen einer Reaktionsfolge nicht zu vernachlässigen. Mögliche Alternativen wurden in parallel laufenden bzw. aufbauenden Arbeiten entwickelt. D. Franke verwandte das deutlich kostengünstigere Trimethylsilylchlorid in Methanol.^{39b} Allerdings ist in diesem Fall die Aromatisierung zu 3-Hydroxybenzoesäure (**134**) bzw. zu deren Methylester als signifikante Nebenreaktion festzustellen, was zu einer erschwerten Reinigung und einer reduzierten Ausbeute führt.

Als vorteilhaft hat sich in Folgearbeiten ein von S. Eßer etabliertes Verfahren unter Einsatz von ca. 0.4 M methanolischer Chlorwasserstofflösung erwiesen. Bei geeigneter Reaktionsführung wird mit diesem Reagenz eine Aromatisierung nur in sehr geringem Ausmaß beobachtet und die freie Säure **3** kann mit mehr als 90 % zum Ester umgesetzt werden (Umsatzbestimmung per HPLC).

ⁱ Katalogpreis für 100 mL einer 2 M TMS-diazomethanolösung (in Hexan): 389.00 €, Aldrich-Katlog 2003 - 2004.

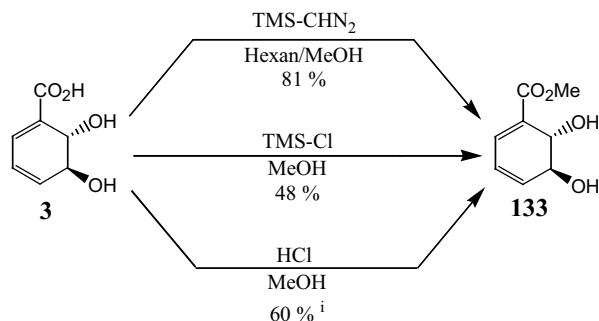


Abbildung 3.27: Verschiedene Methoden zur Veresterung von 3.ⁱ

Zur Einführung von Schutzgruppen für beide Hydroxylgruppen und zur Erhöhung der Löslichkeit auch in unpolaren Reaktionsmedien wurden *tert*-Butyldimethylsilylgruppen eingeführt. Der Gebrauch von TBS-Triflat als Silylierungsreagenz zeichnet sich als mildes Verfahren mit hohen Ausbeuten aus.

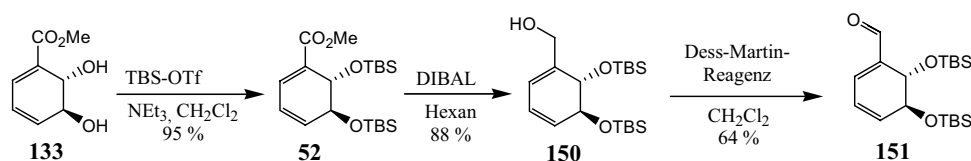


Abbildung 3.28: Einführung von TBS-Schutzgruppen sowie die Reduktion zum Alkohol und der anschließenden Oxidation zum Aldehyd.

Ausgehend vom geschützten CHD **52** wurde die Reduktion der Carboxylgruppe untersucht. Das auf Karl Ziegler zurückgehende Reagenz Diisobutylaluminiumhydrid (DIBAL) ist ein weit verbreitetes Reduktionsmittel.¹¹³ Die kommerzielle Verfügbarkeit von DIBAL in Lösung ermöglicht eine sichere und leichte Handhabbarkeit. Die Reduktion von **52** mit zwei Äquivalenten DIBAL zum entsprechenden Alkohol verläuft auch bei 0 °C rasch und mit guter Ausbeute (siehe Abbildung 3.28).¹¹⁴ Die Reduktion des Esters zum Aldehyd ist dagegen deutlich schwieriger zu kontrollieren. Auch bei langsamer Zugabe von nur einem Äquivalent des Hydrids bei –78 °C wird neben dem Edukt mit hohem Anteil der Alkohol **150** gebildet. Zwar deuten dünnschichtchromatographische Reaktionskontrollen auf eine

ⁱ Die angegebene Ausbeute bei Verwendung von HCl/MeOH als Reagenz bezieht sich auf die Umsetzung von **3** mit einem nicht genau bekannten Salzgehalt. Der durch HPLC bestimmte Umsatz liegt bei >90 %.

intermediäre Bildung des Aldehyds **123** hin, allerdings erscheint eine präparative Nutzung der Reaktion nicht sinnvoll.

Obwohl es sich ausgehend vom Ester **52** um eine zweistufige Synthese handelt ist die Darstellung des Aldehyds **151** durch Oxidation der Hydroxylgruppe des primären Alkohols sehr effizient.

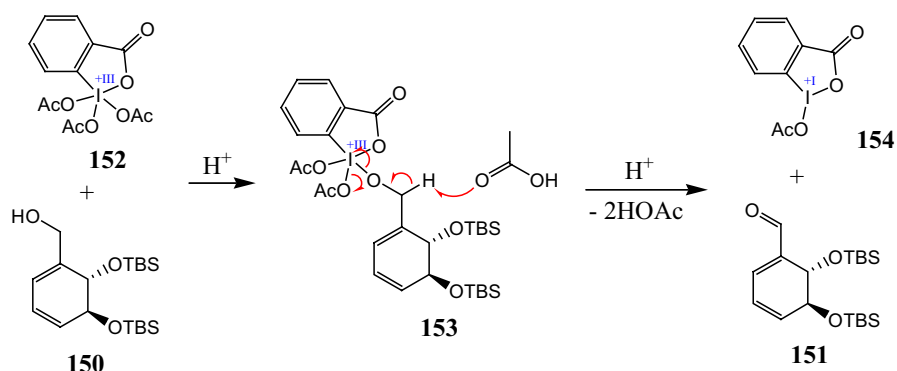


Abbildung 3.29: Mechanismus der Dess-Martin-Oxidation von **150**. Aus dem Dess-Martin-Periodinan (**152**) und **150** entsteht der Aryliodid(III)säureester **153**, der über eine zweistufige β -Eliminierung zum Aldehyd **151** und zum Iod(I)-Derivat **154** reagiert.

Während unter Swern-Bedingungen mit Oxalylchlorid, DMSO und Triethylamin nur Umsätze von unter 10 % festgestellt werden konnten, stellt sich der Einsatz des Dess-Martin-Reagenzes als geeigneter dar und die Reaktion kann mit 64 % Ausbeute durchgeführt werden (siehe Abbildung 3.28 und 3.29).¹¹⁵ Aus dem Dess-Martin-Periodinan **152** und **150** entsteht der Aryliodid(III)säureester **153**, der über eine zweistufige β -Eliminierung zum Aldehyd **151** und zum Iod(I)-Derivat **154** reagiert.

Cycloaddition bzw. Dimerisierung

Das 1,3-Diensystem eröffnet die Möglichkeit *trans*-CHD in perizyklischen Reaktionen wie Diels-Alder- oder Hetero-Diels-Alder-Reaktionen einzusetzen und so neue C-C-Bindungen zu knüpfen und den Zugang zu völlig neuen Strukturen zu schaffen. Generell ist beim 2,3-*trans*-CHD (**3**) und dessen Methylester **133** eine Tendenz zur Dimerisierung festzustellen, die grundsätzlich bei der Verarbeitung dieser Verbindungen nicht außer Acht gelassen werden darf (siehe Abbildung 3.30). Insbesondere in hochkonzentrierten wässrigen Lösungen bei erhöhter Temperatur kommt es zur Cycloaddition der CHD. Bei Verwendung von TBS

geschützten CHD wie **52** wird die Dimerisierung nicht beobachtet, was vermutlich auf die sterische Abschirmung der Moleküle in diesem Fall zurückzuführen ist.

Das Cycloaddukt **155** des Esters **133** lässt sich gezielt durch Erhitzen einer hochkonzentrierten (2.2 M) wässrigen Lösung für 24 h auf 50 °C bilden.

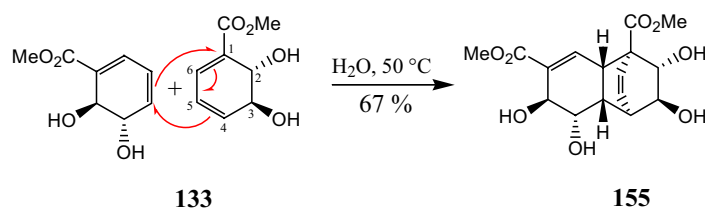


Abbildung 3.30: Cycloaddition von **133** unter selektiver Bildung des Dimers **155**.

Trotz zahlreicher theoretischer Reaktionsmöglichkeiten kann im ^1H -NMR-Spektrum nur ein einziges Produkt nachgewiesen werden. Signale für drei Doppelbindungsprotonen zeigen, dass nicht die Doppelbindung C1-C6 als Dienophil reagiert, sondern die Doppelbindung zwischen C4 und C5. Die Sensitivität von Diels-Alder-Reaktionen gegenüber sterisch anspruchsvollen Substituenten am Dienophil wird ein Grund für die beobachtete Regioselektivität sein. Die elektronischen Verhältnisse mit der elektronenziehenden Carboxylgruppe an C1 des Diensystems und der konjugierten Doppelbindung in Nachbarschaft zur Dienophildoppelbindung lassen auf eine Diels-Alder-Reaktion mit inversem Elektronenbedarf schließen. Dabei kommt die bindende Wechselwirkung zwischen dem höchsten besetzten Molekülorbital (HOMO, *highest occupied molecule orbital*) des Dienophils und dem niedrigsten unbesetzten Molekülorbital (LUMO, *lowest unoccupied molecule orbital*) des elektronenarmen Diens zustande. Die in Abbildung 3.30 dargestellte Regio- und Stereochemie von **155** beruht auf theoretischen Überlegungen und Analogieschlüssen.

Die Regiochemie bezüglich der Orientierung des als Dienophil reagierenden CHD ist in Literaturbeispielen analog der in Abbildung 3.30 dargestellten Ausrichtung, also mit beiden Carboxylgruppen in der „Nordhälfte“ des Moleküls (siehe Abbildung 3.31a).¹¹⁶ Unter der Annahme, dass die konjugierte Doppelbindung mit der anhängenden Carboxylgruppe der einflussreichere Substituent an der Dienophildoppelbindung ist, stimmt dies auch mit den Vorhersagen überein, die aufgrund der Wechselwirkungen zwischen den Grenzorbitalen gemacht werden können. Danach bilden Diene mit elektronenziehenden Substituenten in 1-

Position grundsätzlich *ortho*-substituierte Cyclohexenringe unabhängig von den elektronischen Eigenschaften des Dienophils.¹¹⁷

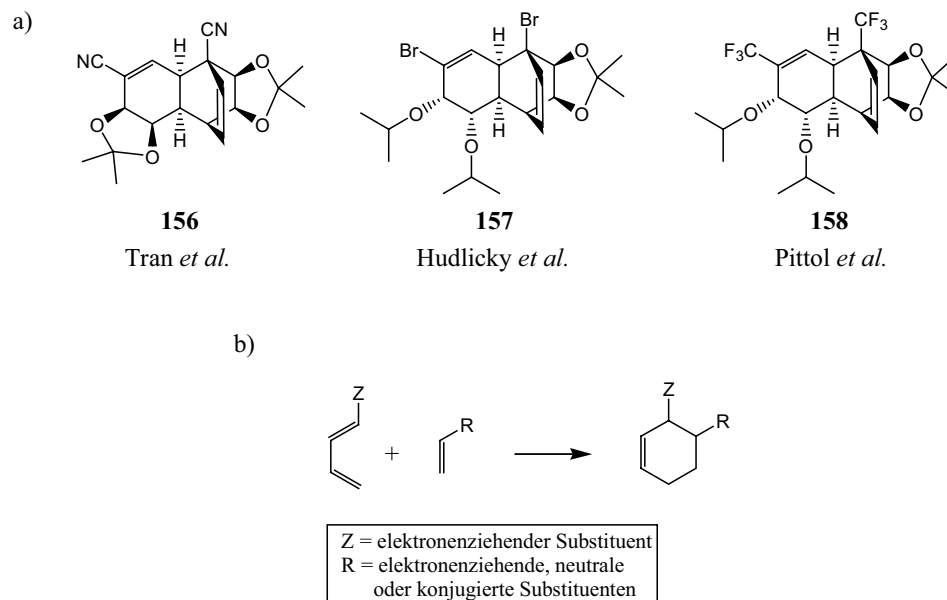


Abbildung 3.31: a) Dimerisierungsprodukte von verwandten *cis*-CHD.^{116a,d,e}

b) *ortho*-dirigierender Einfluss von elektronenziehenden Substituenten in 1-Position des Diens.

Während bei Beispielen mit geschützten *cis*-Diolen (siehe Abbildung 3.31a) der Angriff des Dienophils von der Seite stattfindet, die der geschützten Diolgruppe abgewandt ist und somit durch den sterischen Anspruch dieser Einheit erklärt werden kann, lässt sich eine Vorhersage beim ungeschützten *trans*-Diol **155** nicht machen. Anzunehmen ist vielmehr ein Reaktionsverlauf analog zur Dimerisierung des 2,3-*trans*-CHA (**2**) (siehe Kapitel 3.4.3, Abbildung 3.48), so dass die bei **155** und **159** dargestellte Struktur entsteht.

Für einen endgültigen Beweis der Struktur des selektiv gebildeten Dimerisierungsproduktes **155** ist eine Röntgenstrukturanalyse notwendig, für die bislang geeignete Kristalle nicht gewonnen werden konnten. Auch das tetra-acetylierte Produkt **159**, das durch Umsetzung mit Essigsäureanhydrid in Pyridin erhalten wurde, konnte nicht kristallin gewonnen werden (siehe Abbildung 3.32).

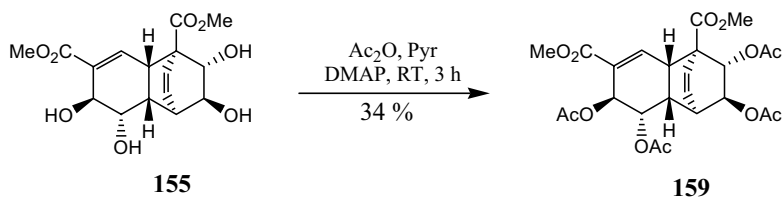


Abbildung 3.32: Acetylierung von **155** zum Erreichen einer besseren Kristallisierbarkeit.

Nähere Untersuchungen zur Verwendung von funktionalisierten Cyclohexadienen in Diels-Alder-Reaktionen werden derzeit von C. Grondal durchgeführt.¹¹⁸

Epoxidierung und nukleophile Öffnung

Die Doppelbindungen in **3** unterscheiden sich in ihrer chemischen Umgebung und in ihren elektronischen Eigenschaften. So können beispielsweise in Additionsreaktionen bei geeigneter Reaktionsführung unterschiedliche Reaktivitäten der Doppelbindungen und somit eine Regioselektivität eines Angriffes erwartet werden. Als Beispiel für eine solche Reaktion wurde die Epoxidierung von **3** eingehend untersucht.

Die aus diesen Reaktionen erhaltenen Epoxidringe stellen selbst wieder vielseitig einsetzbare funktionelle Gruppen dar, insbesondere durch die Möglichkeit den Ring durch Nukleophile zu öffnen. Die gängigsten chemischen Reagenzien für die Umwandlung von Alkenen in Epoxide sind Peroxycarbonsäuren. Der Einsatz von *m*-Chlorperbenzoesäure (*m*-CPBA), welches kommerziell erhältlich, relativ stabil und gut zu handhaben ist, verspricht außerdem eine dirigierende Wirkung von freien Hydroxygruppen.¹¹⁹ Die Umsetzung des TBS-geschützten Esters **52** mit *m*-CPBA führt unter Standardbedingungen (CH_2Cl_2 , NaHCO_3 , Raumtemperatur) zur selektiven Bildung eines einzelnen Produktes. Mit Hilfe des ^1H -NMR-Spektrums kann der selektive Angriff des Oxidationsmittels an der Doppelbindung C4-C5 belegt werden.

Durch die Konjugation der Doppelbindung C1-C6 mit der benachbarten elektronenziehenden Estergruppe ist die Reaktivität dieser Bindung gegenüber der elektrophilen Persäure im Vergleich zur C4-C5-Bindung verringert. Grundsätzlich ist bekannt, dass für eine Reaktion mit elektronenarmen Doppelbindungen stark oxidierende Persäuren, wie zum Beispiel Trifluorperessigsäure benötigt werden.¹²⁰

Mit Hilfe der ^1H -NMR-Daten kann außerdem gezeigt werden, dass mit einer Selektivität $> 95\%$ nur eines der beiden möglichen Diastereomere gebildet wird und somit die Reaktion regio- und stereoselektiv verläuft.

Die beobachtete Enantioselektivität wird dabei wahrscheinlich durch die sterisch anspruchsvollen TBS-Substituenten gesteuert (siehe Abbildung 3.33). Der abschirmende Einfluss des Silylrestes an C3 bewirkt einen Angriff von *m*-CPBA ausschließlich von der entgegengesetzten Seite (antarafacial) und die Bildung von Epoxid **130**.

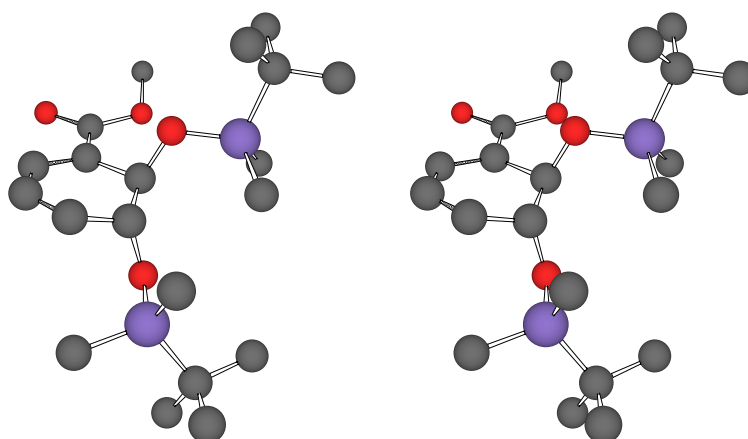


Abbildung 3.33: Modell des TBS-geschützten Esters **52** (Stereobild).

Die trans-diaxiale Stellung der Siloxygruppen von **160** in Lösung wird durch die 2.1 Hz Kopplung der beiden vicinalen Wasserstoffatome an C2 und C3 bestätigt.

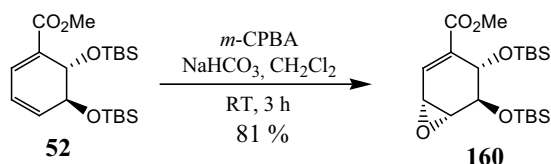


Abbildung 3.34: Regio- und stereoselektive Epoxidierung des geschützten Diols **52**. Der Angriff erfolgt *anti* zur Siloxygruppe an C3.

Bewiesen werden konnte die relative Konfiguration von **160** durch weiterführende Arbeiten von D. Franke. Dabei wurde die Abspaltung der Silylreste mit Flusssäure erreicht und das erhaltene **161** konnte mit dem durch suprafaciale Oxidation von **133** erhaltenen Diastereomer **162** verglichen werden (siehe Abbildung 3.35a). Die *cis*-Konfiguration des Epoxides relativ

zur benachbarten Alkoholgruppe wurde von D. Franke durch Kristallisation von **162** und Anfertigung einer Röntgenstrukturanalyse bestätigt.

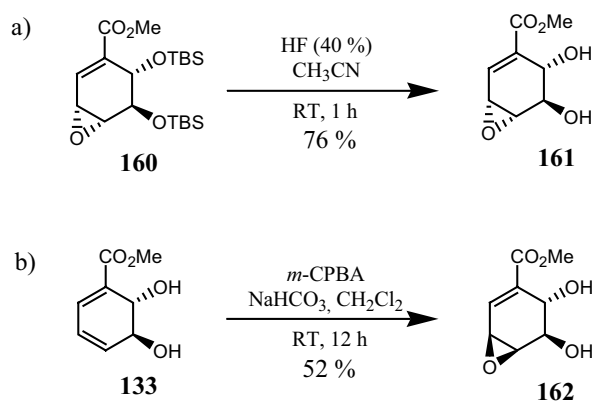


Abbildung 3.35: a) Spaltung der Silylgruppen von **160** mit Flusssäure.^{39b} b) Epoxidierung von **133** führt zur enantioselektiven Bildung von **162**.^{39b}

Bei der Umsetzung von **133** mit *m*-CPBA unter Standardbedingungen gelten zwar nahezu die zuvor beschriebenen elektronischen Verhältnisse, die die Regioselektivität bestimmen, allerdings fehlt eine dirigierende Wirkung durch den sterischen Einfluss von raumerfüllenden Substituenten. Statt dessen enthält **133** eine allylische freie Hydroxylgruppe.

Aus mechanistischen Untersuchungen von Henbest und Wilson sowie darauf aufbauenden Arbeiten ist bekannt, dass es zur Koordination der Persäure an die freie Hydroxygruppe unter Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen kommt.¹²¹ Dadurch findet der Angriff von der gleichen Seite statt auf der sich auch die Hydroxylgruppe befindet. Es wird enantioselektiv das Produkt mit den C3/C4 *syn*-ständigen Sauerstofffunktionalitäten gebildet (siehe Abbildung 3.36a).

Abbildung 3.36b zeigt die unterschiedlichen Kopplungskonstanten, die aufgrund der verschiedenen Interplanarwinkel im Molekül in Abhängigkeit von der relativen Konfiguration auftreten.

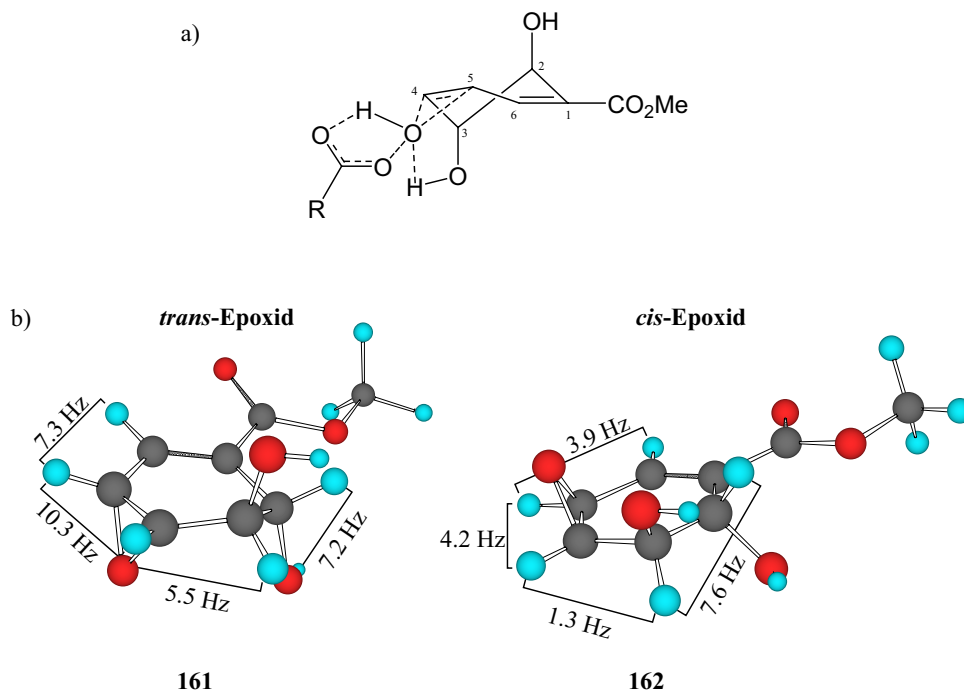


Abbildung 3.36: a) Modell des Übergangszustandes bei der Epoxidierung von Doppelbindungen mit allylständiger freier Hydroxygruppe (Spiro-Übergangszustand nach Sharpless *et al.*).^{122, 121c}
 b) Kopplungskonstanten der beiden diastereomeren Epoxide **161** und **162** (in D₄-MeOH). Die dargestellten Abbildungen zeigen energieminierte Modelle.

Eine selektive Epoxidierung der Doppelbindung C1-C6 von **133** ist aufgrund der ungünstigen elektronischen Verhältnisse weder mit *m*-CPBA noch mit anderen bekannten Methoden möglich. Eine veränderte Situation stellt sich dar, wenn sich anstatt der Estergruppe an C1 ein nicht-elektronenziehender Substituent befindet (siehe Abbildung 3.37). Setzt man den durch Reduktion der Carboxylgruppe erhaltenen Alkohol **150** ein, kann bei Reaktion mit *m*-CPBA unter Standardbedingungen selektiv **163** mit 91 % Ausbeute isoliert werden. Energieminimierte Modelle¹²³ der beiden möglichen Diastereomere der Monoepoxidierung zeigen, dass nur bei der Bildung des zur C2-Silylgruppe *trans*-ständigen Epoxidrings die energetisch günstigere diaxiale Stellung der Silylgruppen ergibt.

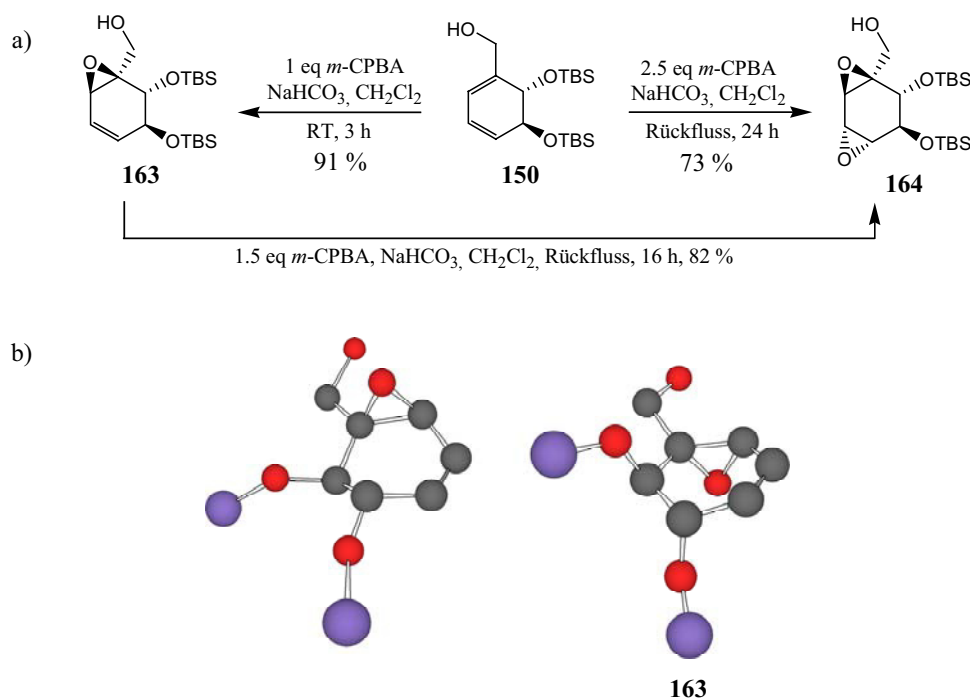


Abbildung 3.37: a) Regio- und stereoselektive Epoxidierung von **150**. b) Energieminimierte Modelle der beiden möglichen Diastereomere, die bei der Monoepoxidierung von **150** entstehen können. (Zur Wahrung der Übersichtlichkeit werden einige Atome und Atomgruppen in der Abbildung nicht wiedergegeben.)

Die Konfiguration des Oxiranringes relativ zur benachbarten Siloxygruppe wurde durch Überführung von **150** in das Enantiomer eines bekannten Naturstoffes und Anfertigung einer Röntgenstrukturanalyse eindeutig bestimmt (siehe Kapitel 4.4.3). Wird die Umsetzung unter drastischeren Bedingungen bei erhöhter Reaktionstemperatur, Überschuss an Oxidationsmittel und längerer Reaktionszeit durchgeführt, kann auch eine Reaktion mit der zweiten Doppelbindung erreicht werden. Dies ist sowohl in einem Reaktionsschritt, als auch in zwei Schritten über die Zwischenstufe des Monoepoxids **163** möglich. In beiden Fällen erfolgt die Addition stereospezifisch zu dem gleichen Produkt **164**.

Eine vergleichbare Regio- und Stereoselektivität relativ zur OTBS-Gruppe konnte bei in der Fachliteratur beschriebenen Reaktionen von strukturell verwandten Substanzen oft nicht beobachtet werden. So erhielten Ogawa *et al.* bei der Reaktion des Cyclohexadiens **165** mit *m*-CPBA ein Produktgemisch aus den Regio- und Stereoisomeren **166**, **167** und **168** (siehe Abbildung 3.38). White *et al.* fanden heraus, dass bei der Umsetzung von **169** mit *tert*-

Butylhydroperoxid in Gegenwart von Bis-(acetylacetonato)-oxo-vanadium(IV) als Katalysator das Bisepoxid **170** stereospezifisch mit geringer Ausbeute gebildet wird. Ausgehend von der diacetylierten Verbindung **171** wurde nach einer Methode von Kishi *et al.*¹²⁴ mit *m*-CPBA eine Mischung der beiden Bisepoxide **172** und **173** erhalten, wobei **172** bevorzugt gebildet wird.

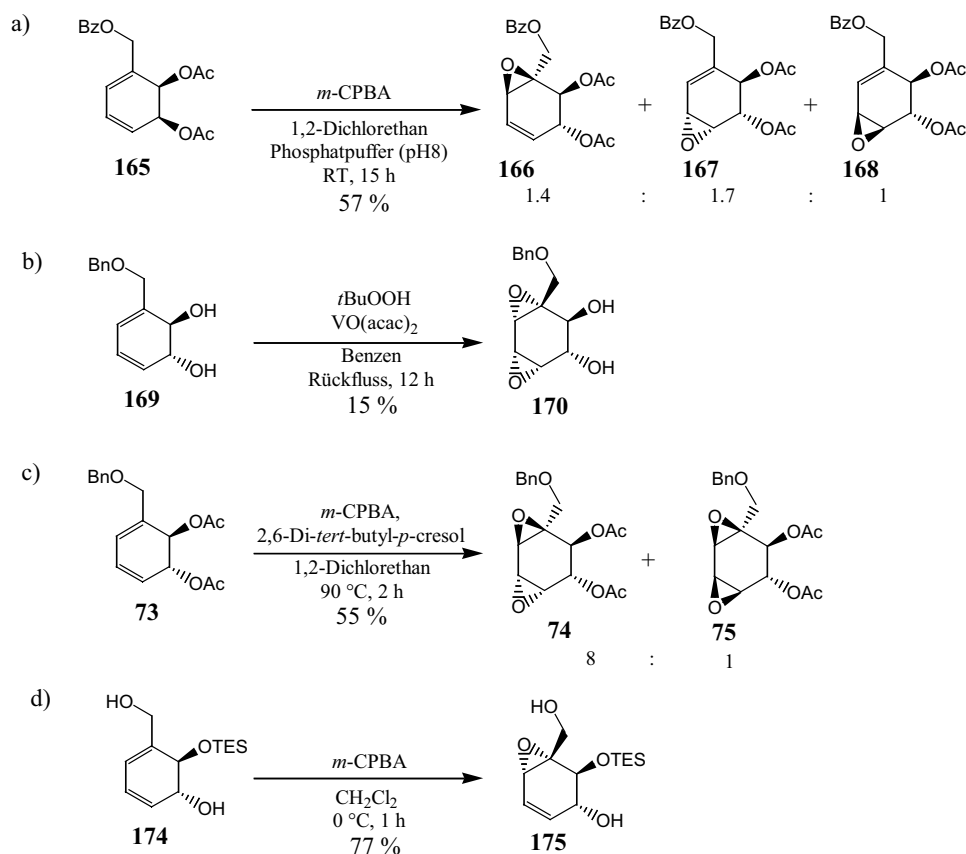


Abbildung 3.38: Epoxidierung von Cyclohexadienen mit einer substituierten Alkoholfunktion in 1-Position aus Naturstoffsynthesen von Ogawa *et al.*⁴⁹ (a), White *et al.*⁷⁵ (b, c) und Schlessinger *et al.* (d).

Der Vergleich der Reaktionen aus Abbildung 3.37 und 3.38 lässt darauf schließen, dass das Substitutionsmuster aller Alkoholfunktionen für die Regio- und Stereoselektivität von entscheidender Bedeutung ist. Vermutlich ermöglicht die freie Hydroxygruppe in **150** eine Koordination der Persäure, so dass es zunächst selektiv zum Angriff auf die C1-C6-Doppelbindung kommt, wobei die Seite des Angriffes durch die TBS-Gruppe an C2

beeinflusst wird (siehe Abbildung 3.37b). Diese These wird durch die Ergebnisse von Schlessinger *et al.* gestärkt (siehe Abbildung 3.38d). Bei den übrigen gezeigten Beispielen ist weder eine dirigierende Funktion einer freien Hydroxygruppe noch eines sterisch anspruchsvollen Substituenten an C2 vorhanden.

Epoxide lassen sich auf unterschiedliche Weise für eine breite Palette von Folgeprodukten verwenden. Die hohe Reaktivität des Epoxidrings kann genutzt werden, um zusätzliche funktionelle Gruppen einzuführen. So können beispielsweise durch Epoxidierung und anschließende nukleophile Öffnung Substitutionsmuster aus Alkenen gewonnen werden, die durch einstufige Reaktionen nicht oder nur schwer zu verwirklichen sind.

Zur Demonstration des Potentials dieser Synthesefolge wurden die Epoxide exemplarisch mit verschiedenen Nukleophilen umgesetzt. Experimente zur Verwendung von Aziden als nukleophile Reagenzien haben gezeigt, dass Epoxid **160** eine überraschend hohe Stabilität gegenüber einem nukleophilen Angriff zeigt. So konnten Standardverfahren zur Einführung der Azidgruppe, wie die Verwendung von Natriumazid, nicht erfolgreich angewendet werden.¹²⁵ Auch die Zugabe von Lewis-Säuren zur Erhöhung der Reaktivität oder der Einsatz von Trimethylsilylazid (TMS-N₃) führt nicht zur gewünschten Reaktion.^{126, 127} Eine Öffnung des Oxiranrings von **160** konnte durch den Einsatz von Tributylzinnazid (TBT-Azid) ohne die Zugabe von Lösungsmittel nach einer Reaktionszeit von 36 h bei 55 °C mit 33 % Ausbeute erreicht werden (siehe Abbildung 3.39).¹²⁸ Die erhöhte Reaktivität von Tributylzinnazid im Vergleich zu entsprechenden Silylreagenzien lässt sich auf den fehlenden π -Bindungsanteil der Sn-N-Bindung im Gegensatz zur Si-N-Bindung zurückführen.¹²⁹ Die Verwendung von Dibutylzinnazid verspricht bei dieser Synthese bessere Ergebnisse. Aufgrund der aufwendigen Synthese des Reagenzes und der ökologischen Bedenklichkeit von Organozinnverbindungen wurde auf eine Optimierung hinsichtlich dieser Reagenzien verzichtet.

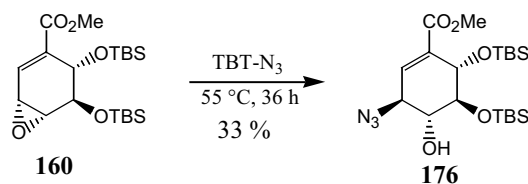


Abbildung 3.39: Die Öffnung von Epoxid **160** kann durch den Einsatz von Tributylzinnazid erreicht werden.

Weiterführende Arbeiten von C. Dose¹³⁰, S. Eßer haben gezeigt, dass Epoxid **162** außer mit TBT-N₃ auch mit TMS-N₃ reagiert wenn Ytterbiumtri-*iso*-propoxid als Katalysator eingesetzt wird.¹³¹

Auch die Reaktion des C1-C6-Epoxides **163** mit TBT-N₃ zum Azidohydrin **178** konnte durchgeführt werden (siehe Abbildung 3.40), wobei ein Beweis für die angegebene Struktur, beispielsweise durch eine Röntgenstrukturanalyse, aussteht.

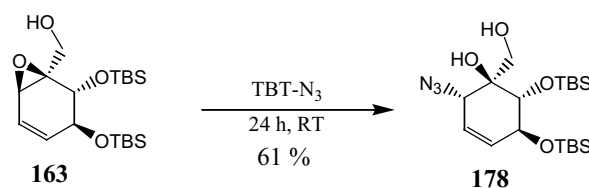


Abbildung 3.40: Nukleophile Öffnung des C1-C6-Oxiranringes von **163** mit TBT-N₃.

Neben der Verwendung von Aziden als Nukleophile, die sich für die Darstellung von Aminocarbazuckern und Aminocyclitolen anbieten (siehe Kapitel 3.4.3), wurden Halogenidverbindungen zur Öffnung der C4-C5-Epoxide eingesetzt. Epoxidöffnungen an ähnlichen Systemen sind bereits in verschiedenen Arbeitsgruppen untersucht und durchgeführt worden.¹³² Erste Experimente mit **160** zeigten, dass eine Substitution am Oxiranring bei Verwendung von reaktiven Metallhalogeniden möglich ist (siehe Abbildung 3.41) und nur eines der möglichen Konstitutionsisomere gebildet wird. Der Einsatz von Dilithiumtetrachlorocuprat geht auf ein Verfahren von Bell *et al.* zurück und liefert das Chlorhydrin **179** mit 10 % Ausbeute.¹³³

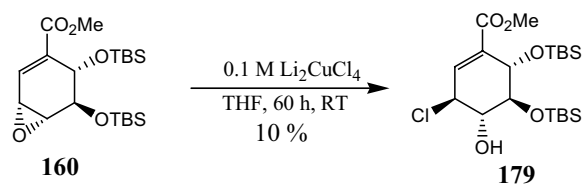


Abbildung 3.41: Nukleophile Öffnung von **160** mit Metallhalogeniden.

Höhere Ausbeuten konnten in fortführenden Arbeiten von D. Franke ausgehend von **162** sowohl mit Dilithiumtetrachlorocuprat (60 %), als auch mit dem entsprechenden Bromreagenz (78 %) erzielt werden.^{39b} Die beobachtete hohe Regioselektivität (> 95 %) der

Oxiranringöffnung lässt sich wahrscheinlich auf die Aktivierung des C5-Kohlenstoffs durch die allylische Doppelbindung zurückführen.

3.4.2 Verwendung von 2,3-*trans*-CHD in der Natur- und Wirkstoffsynthese

Die im vorigen Abschnitt dargestellten Reaktionen zeigen, dass sich 2,3-*trans*-CHD (**3**) leicht in vielseitiger Weise modifizieren lässt und so neue Stoffklassen zugänglich sind, die selbst wieder als Startverbindungen für bestimmte Zielverbindungen eingesetzt werden können. Dass sich die in den 2,3-CHD enthaltene Grundstruktur des Dihydroxycyclohexans in einer Vielzahl von Naturstoffen bzw. deren Derivaten oder Analoga wiederfinden lässt, wurde in Kapitel 2.2.3 am Beispiel der Conduritole und Inositole gezeigt. Eine Anwendbarkeit von **3** und der davon abgeleiteten Substanzen in der Naturstoff- und Wirkstoffsynthese soll zusätzlich am Beispiel zweier Naturstofffamilien demonstriert werden.

Cyclohexanepoxide

Die Epoxide **163** und **164**, die durch einfache Synthesefolgen aus dem mikrobiell gewonnenen Synthesebaustein **3** erhalten werden können, stellen direkte Vorstufen zu Stereoisomeren von Crotepoxid (**59**) und Senepoxid (**63**) dar. Diese Naturstoffe sind aufgrund ihrer vielfältigen biologischen Eigenschaften von Interesse und gehören zu einer Familie von Pflanzenmetaboliten mit mehrfach oxidiertem Cyclohexanring. Synthesen wurden bereits von Shing *et al.*,^{20b,d} Ogawa *et al.* und verschiedenen anderen Arbeitsgruppen^{48,75,76} durchgeführt (siehe auch Kapitel 2.2.3).

Auch wenn diese Synthesen teilweise ebenfalls von Metaboliten des Shikimat-Biosyntheseweges ausgehen, handelt es sich im Fall der enantioselektiven Darstellungen doch um aufwendige Vielstufensynthesen mit geringer Gesamtausbeute (siehe Kapitel 2.2.3 Abbildung 2.21).^{20b,d, 134}

163 und **164** können dagegen durch einfache Schutzgruppenchemie mit hohen Ausbeuten in entsprechende Naturstoffisomere überführt werden.

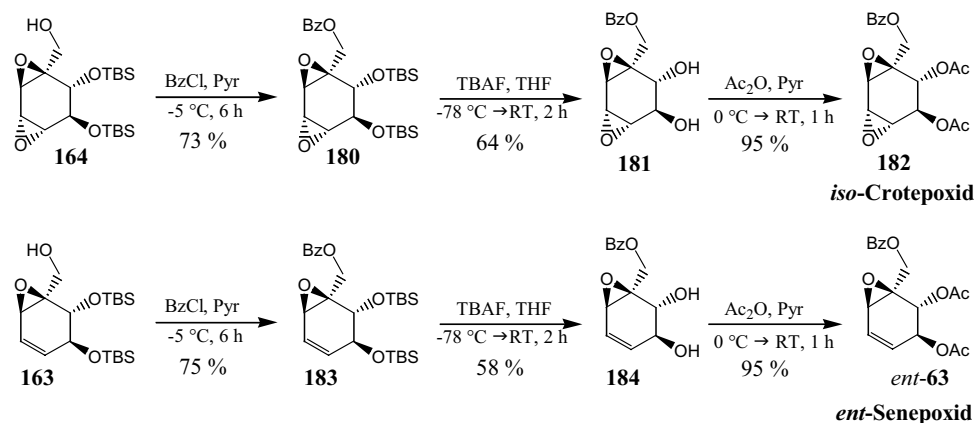


Abbildung 3.42: Synthese von *iso*-Crotopoxid (**182**) und *ent*-Senepoxid (*ent*-**63**) ausgehend von den Epoxiden **164** und **163**.

Die Veresterung der freien Alkoholgruppen von **163** und **164** wird mit Benzoylchlorid in Pyridin bei $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ durchgeführt und die Spaltung der Silylgruppen mit Tetrabutylammoniumfluorid (TBAF) erreicht. Anschließende Acetylierung der freien Alkoholgruppen mit Essigsäureanhydrid führt im Falle des Bisepoxid **181** zum *iso*-Crotopoxid (2,3,4,5-tetra-*epi*-Crotopoxid, **182**) und im Falle der monoepoxidierten Ausgangsverbindung **184** zum *ent*-Senepoxid (*ent*-**63**).

Die erhaltenen analytischen Daten für *ent*-Senepoxid stimmen abgesehen vom Vorzeichen des Drehwertes mit den literaturbekannten Angaben für das entsprechende Enantiomer überein.^{20d} Obwohl die Beschreibung von 2,3,4,5-tetra-*epi*-Crotopoxid aus der Literatur noch nicht bekannt ist, stimmen die NMR-Daten von **182** mit Werten überein, die White *et al.* für ein racemisches Gemisch von 1,4,5,6-tetra-*epi*-Crotopoxid und 2,3-di-*epi*-Crotopoxid (*rac*-**60**) ermittelt hat (siehe auch Abbildung 2.20, Kapitel 2.2.3). Andererseits stimmen White's Daten nicht mit denen überein, die später Shing *et al.* für eines der beiden Enantiomere erhielt.^{20d} Der auftretende Widerspruch konnte durch Kristallisation von **181** aus einem Ethylacetat/Pentan-Gemisch und anschließender Anfertigung einer Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt werden (siehe Abbildung 3.43). Damit konnte die dargestellte relative Konfiguration von **182** bestätigt werden. Außerdem ist damit gezeigt, dass es sich bereits bei White's racemischer Darstellung von *iso*-Crotopoxid um **182** und dessen Enantiomer gehandelt hat.

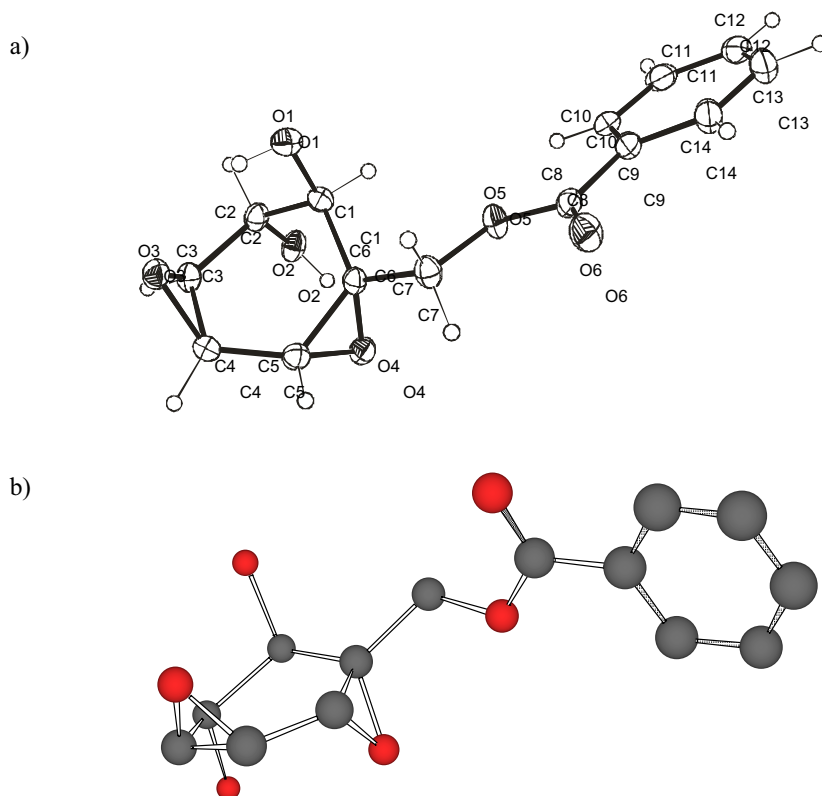


Abbildung 3.43: a) Röntgenstruktur von **181**.
b) Energieminimiertes Modell von **181**.

182 und *ent*-**63** sind nicht literaturbekannt und somit wahrscheinlich erstmals synthetisiert worden. In beiden Fällen ist sowohl die Gesamtausbeute, die bei 31 % für das Senepoxid- und 29 % für das Crotepoxidisomer liegt ausgehend vom Methylester des mikrobiellen Produktes, als auch die Anzahl der benötigten Reaktionsschritte im Vergleich zu bekannten Syntheserouten verwandten Verbindungen, deutlich verbessert.

Neben den beiden dargestellten Verbindungen sollte es auch möglich sein, weitere Verbindungen dieser Substanzfamilie in einfachen Syntheserouten darzustellen. Durch die Einführung unterschiedlicher Schutzgruppen für die beiden Hydroxyfunktionen im 2,3-CHD sollte beispielsweise der Zugang zu Stereoisomeren von Pipoxidacetat und Boesenoxid möglich sein. Durch die intermediäre Bildung des monosilylierten Produktes bei der Einführung der TBS-Gruppen wird belegt, dass prinzipiell eine Differenzierung zwischen den beiden Hydroxygruppen möglich ist. Diese wurde durch DC- und ^1H -NMR-Untersuchungen nachgewiesen.

Aminocyclitole

Eine zweite Substanzfamilie, zu der 2,3-*trans*-CHD (**3**) sowie die übrigen funktionalisierten Cyclohexadiene des CHORUS-Projektes eine strukturelle Verwandtschaft aufweisen, ist eine Gruppe von C₇N Aminocyclitolen.^{84b}

Valienamin (**58**) ist eines dieser Aminocyclitole und stellt eine Grundeinheit des α -Glucosidaseinhibitors Acarbose (**185**) dar (siehe Abbildung 3.44).¹³⁵ Die wirksame kompetetive Inhibierungsaktivität gegenüber menschlichen intestinalen α -Glucosidasen führte zur Anwendung dieser Substanz als Arzneimittel zur Behandlung von Diabetes mellitus (Glucobay, BAYER AG).

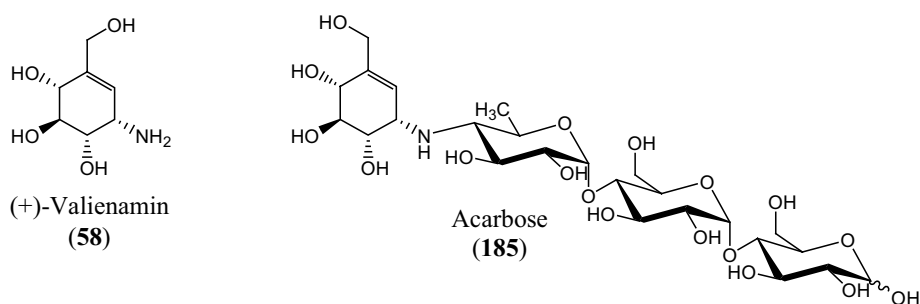


Abbildung 3.44: α -Glucosidaseinhibitor Acarbose (**185**) und die C₇N-Aminocyclitoleinheit Valienamin (**58**) als Basiselement.

Entsprechend der Bedeutung von Valienamin (**58**) und dessen Analoga ist die Anzahl der in der Vergangenheit publizierten synthetischen Zugänge zu diesen Substanzen groß. Allein für die enantiospezifische Synthese von (+)-**58** gibt es mehr als ein Dutzend Beispiele.^{84b}

Durch das C₇ Grundgerüst in Einheit mit den vorhandenen Sauerstofffunktionalitäten sind Cyclohexadiendiole ideale Ausgangsverbindungen für diese Verbindungsklasse. Durch die vorhandenen Doppelbindungen ist es durch geeignete Reaktionssequenzen möglich, **3** in eine Vielzahl von Valienaminanaloga oder Stereoisomere des natürlich vorkommenden (+)-**58** zu überführen (siehe Abbildung 3.45). Ideale Vorstufen für die Darstellung von gesättigten und ungesättigten Carba- und Aminocarbazuckern sind beispielsweise die Epoxide **160**, **162** und **163**, die durch Öffnung mit Aziden direkt zu Vorstufen von Valienaminanaloga umgesetzt werden können.

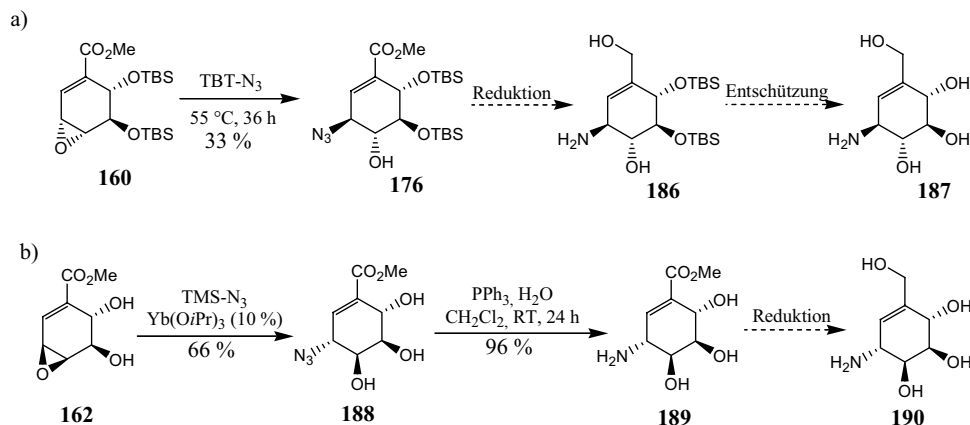


Abbildung 3.45: Synthesansätze für die Valienaminisomere **187** und **190** ausgehend von den Epoxiden **160** und **162**.

Ausgehend von Azid **176** kann formal durch Reduktion von Esterfunktion und Azidogruppe sowie anschließender Entfernung der Silylgruppen das Valienaminisomer **187** zugänglich gemacht werden (siehe Abbildung 3.45a). In weiterführenden Arbeiten wurde von D. Franke und C. Dose am Beispiel von **162** der Versuch unternommen möglichst ohne den Einsatz von Schutzgruppen eine effektive Syntheseroute zu *iso*-Valienamin (2,3,5-tri-*epi*-Valienamin, **190**) zu entwickeln. Dabei konnte die Epoxidöffnung mit Azidionen zur Einführung der Stickstoffgruppe verwendet werden. Durch Reduktion der Estergruppe und der Azidofunktion sollte **190** zugänglich sein. Die Reduktion der Estergruppe und der Azidofunktion sollte mit hoher Ausbeute mit Triphenylphosphin erreicht werden. Anschließende Experimente zur Reduktion der Estergruppe erwiesen sich als überraschend schwierig. Die hohe Hydrophilie des Cyclitols **189** erfordert den Einsatz von polaren Lösungsmitteln, die häufig nicht mit gängigen Reduktionsmitteln in Einklang zu bringen sind. Die Umsetzung des Carbonsäureesters **189** mit DIBAL bei 0 °C führt zwar zu einer Umsetzung der Substanz, nach anschließender basenkatalysierten Acetylierung, die eine deutlich vereinfachte Reinigung verspricht, konnte jedoch nur ein Produktgemisch gewonnen werden, aus dem die von Shing *et al.* für das Enantiomer angegebenen ¹H-NMR-Daten nicht identifiziert werden konnten.

Dennoch bleibt festzuhalten, dass mit **176** und **189** ein Valienaminanalog in einer kurzen und effektiven Synthesesequenz ausgehend vom Ester **133** zugänglich sind.

3.4.3 Verwendung von 2,3-*trans*-CHA in der organischen Synthese

Aufgrund der ähnlichen Funktionalisierung sind die Einsatzmöglichkeiten von 2,3-*trans*-CHA (**2**) in der organischen Synthese prinzipiell vergleichbar mit denen des entsprechenden Diols **3** (siehe auch Abbildung 3.26). Wie die Erfahrung zum Beispiel beim Vergleich von 2,3-*trans*-CHD (**3**) und 3,4-*trans*-CHD (**5**) zeigt, sind Vorhersagen über einzelne Reaktionen basierend auf Analogieschlüssen allerdings nur bedingt möglich.¹³⁶

Die in **2** enthaltene Aminofunktion bietet zusätzliche Reaktionsmöglichkeiten, wie zum Beispiel die selektive Einführung neuer Schutzgruppen oder Substitutionsreaktionen. Außerdem handelt es sich beim 2,3-*trans*-CHA (**2**) um eine β -Aminosäure. Diese Substanzklasse hat gerade in jüngster Zeit durch ihre Einsatzmöglichkeiten in der Peptidsynthese großes Interesse auf sich gezogen (siehe auch Kapitel 4.3).¹³⁷

Um die Verwendbarkeit der Substanz als chiraler Synthesebaustein beispielhaft zu belegen, wurden einige Umsetzungen ausgehend von mikrobiell gewonnenem 2,3-*trans*-CHA (**2**) durchgeführt. Analog zu den Arbeiten mit dem 2,3-CHD (**3**) wurden dabei zunächst Umsetzungen durchgeführt, die die polaren, hydrophilen Gruppen modifizieren, um so eine erhöhte Löslichkeit der Verbindung in unpolaren organischen Lösungsmitteln zu erreichen.

Zur Veresterung der Carbonsäuregruppe wird der Aminoalkohol **2** in einer 1.25 M methanolischen Chlorwasserstoffsäure gelöst und für mehrere Tage bei Raumtemperatur gerührt (siehe Abbildung 3.46). Nach einer Reaktionszeit von sechs Tagen zeigt die Reaktionskontrolle (HPLC) nahezu vollständige Umsetzung zum Methylester **128**. Mittels HPLC kann ein nicht näher untersuchtes, wahrscheinlich aromatisches Nebenprodukt in Spuren nachgewiesen werden. Diese Reaktion zeigt, dass **2** unter diesen Bedingungen relativ stabil ist und die Tendenz zur Aromatisierung im sauren nur relativ schwach ausgeprägt ist.

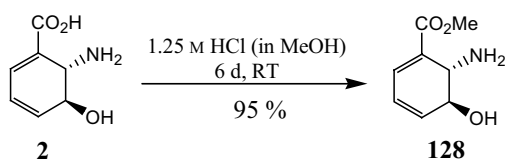


Abbildung 3.46: Veresterung von 2,3-*trans*-CHA (**2**) mit einer methanolischen Chlorwasserstoffsäurelösung.

Da **2** im Gegensatz zum entsprechenden Diol **3** in kristalliner und hochreiner Form eingesetzt wird und die Reaktion nahezu vollständig und ohne nennenswerte Bildung von Nebenprodukten abläuft, wurde das von Lösungsmitteln befreite **128** direkt für weitere Synthesen

eingesetzt. Zum Schützen der Aminofunktion wurde sowohl die freie Säure **2** als auch der Methylester **128** mit Di-*tert*-butyldicarbonat zur Einführung einer Boc-Gruppe (*tert*-Butyloxycarbonyl) umgesetzt (siehe Abbildung 3.47).

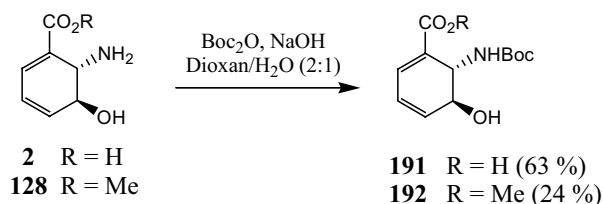


Abbildung 3.47: Einführung der *N*-Boc-Schutzgruppe in 2,3-*trans*-CHA (**2**) bzw. dessen Methylester **128**.

Die erhaltenen geringen Ausbeuten sind vermutlich auf Verluste bei der chromatographischen Reinigung zurückzuführen. Die vor der Reinigung durchgeführten HPLC-Reaktionskontrollen zeigen in beiden Fällen Umsätze zum Boc-geschützten Cyclohexadien von > 90 %.

Durch gezielte Dimerisierung der mikrobiell gewonnenen Säure wurde gezeigt, dass auch beim 2,3-*trans*-CHA (**2**) das Diensystem für Reaktionen genutzt werden kann (siehe Abbildung 3.48).

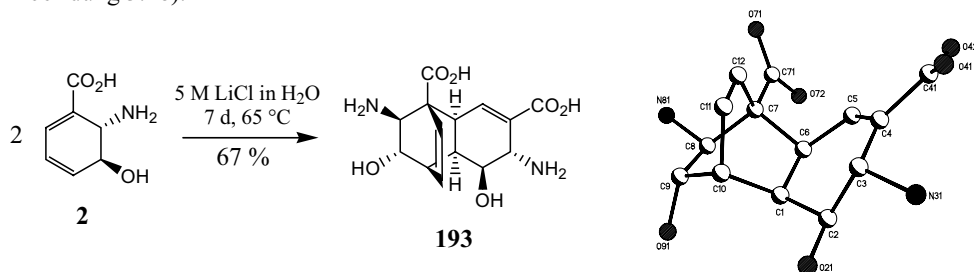


Abbildung 3.48: Homomolekulare Diels-Alder-Reaktion von **2** zum Dimer **193** dessen Struktur durch Röntgenkristallanalyse belegt wurde.

Dabei zeigte sich, dass im Gegensatz zu den entsprechenden Diolen deutlich drastischere Bedingungen notwendig sind. So konnte beispielsweise eine Cycloaddition auch in hochkonzentrierten Lösungen und bei mehreren Stunden Reaktionszeit bei einer Temperatur von 40 °C nicht beobachtet werden. Bei Erhöhung der Temperatur auf 65 °C ist nach 14-tägiger Reaktionszeit das Edukt hingegen vollständig umgesetzt, wobei neben dem Dimer **193** im ¹H-NMR zu etwa 20 % ein aromatisches Nebenprodukt detektiert wird. Wird anstelle

von reinem Wasser eine 5 M Lithiumchloridlösung als Reaktionsmedium eingesetzt, verkürzt sich die Reaktionszeit auf sieben Tage und der Anteil des aromatischen Nebenproduktes kann auf unter 5 % gesenkt werden. Damit stehen die Ergebnisse grundsätzlich mit den Beobachtungen von Umezawa *et al.* in Einklang, die eine Dimerisierung des mit **2** verwandten Oryzoxymycin (**111**) beschrieben haben. Im Falle des Oryzoxymycins reicht allerdings eine Reaktionszeit von 3 Tagen bei Raumtemperatur aus, um zum entsprechenden Homo-Diels-Alder-Produkt **194** zu gelangen. Zu beachten ist, dass die von Umezawa postulierte Struktur des Antibiotikums, das aus dem Kultivierungsmedium von *Streptomyces venezuelae* var. *oryzoxymyceticus* isoliert wurde, durch die neueren Arbeiten von Steel *et al.* in Frage gestellt wird (siehe Abbildung 3.49).

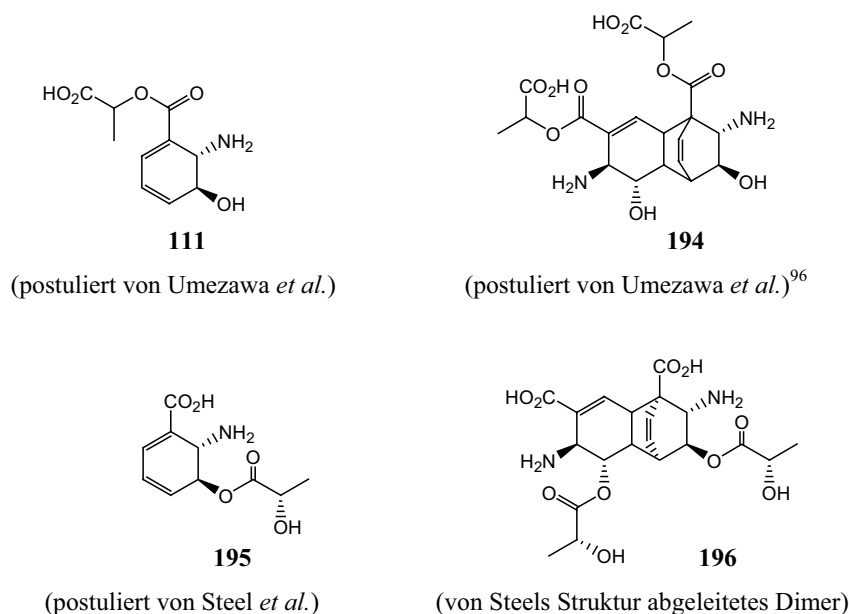


Abbildung 3.49: Postulierte Strukturen des Antibiotikums Oryzoxymycin und dessen Dimerisierungsprodukt.

Steel *et al.* stellten fest, dass die analytischen Daten der von ihm synthetisierten Substanz **111**, nicht identisch sind mit denen, des natürlichen Produktes.^{95, 96a} Als Konsequenz schlägt Steel die in **195** gezeigte Struktur für das natürliche Oryzoxymycin vor, was für das Dimer die Struktur **196** bedeuten würde. Die dargestellte regio- und stereochemische Anordnung von **193**, **194** bzw. **196** beruht auf den gleichen theoretischen Überlegungen, die für das Diolcycloaddukt **155** gilt (siehe Kapitel 3.4.1). Außerdem konnte die Struktur des CHA-

Dimers **193** durch Kristallisation des Produktes aus einem Wasser/Ethanol-Gemisch und anschließender Röntgenstrukturanalyse gesichert werden (siehe Abbildung 3.48).

Der Aminoalkohol **2** lässt sich ebenso vielseitig für weitere Umsetzungen einsetzen wie das Diol **3**, wie weitere aktuelle Arbeiten von Steel *et al.* zeigen. Dabei wurde der synthetisch dargestellte racemische Ester *rac*-**110** (Synthese siehe Abbildung 2.26) erfolgreich in Epoxidierungs- und Dihydroxylierungsreaktionen eingesetzt (siehe Abbildung 3.50).

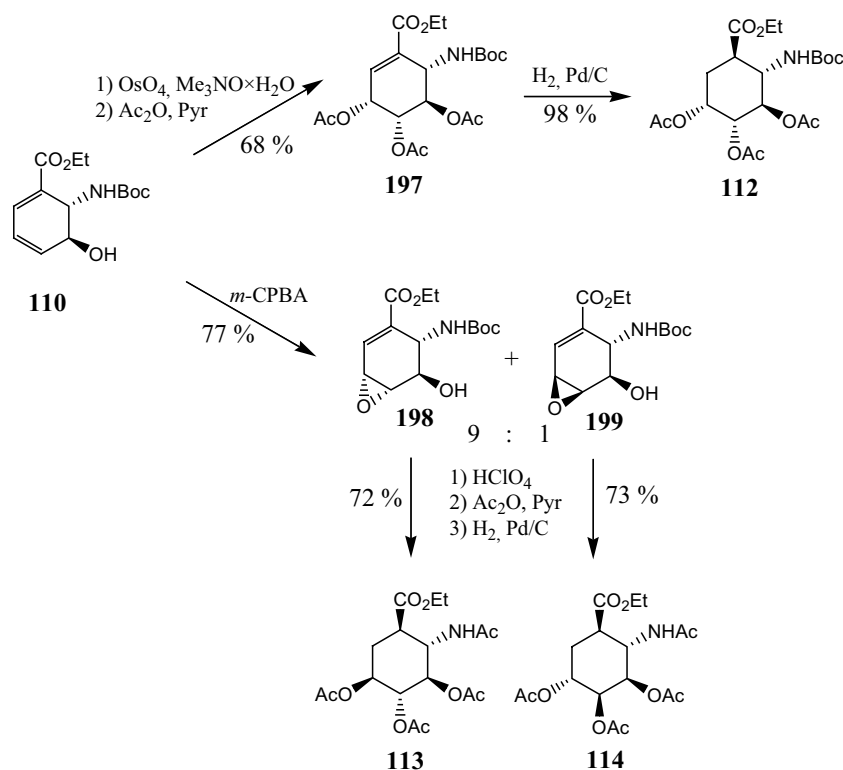


Abbildung 3.50: Stereoselektive Epoxidierung und Dihydroxylierung von racemischem **110** nach Steel *et al.*⁹⁷

Bemerkenswert bei diesen Ergebnissen ist die beobachtete Regio- und Stereoselektivität. Bei der Osmiumtetroxid katalysierten Dihydroxylierung von **110** wird stereospezifisch nur das Diastereomer **197** gebildet, das die eingefügte Dioleneinheit auf der gleichen Seite wie die Carbamatgruppe trägt. Einen dirigierenden Einfluss scheint die Boc-Gruppe auch bei der Epoxidierung zu besitzen. Bei der Umsetzung mit *m*-CPBA wird trotz benachbarter freier Alkoholgruppe mit einem Verhältnis von 9:1 überwiegend der Oxiranring auf der Seite

gebildet, auf der sich auch die Boc-Gruppe befindet. Wird die Hydroxygruppe zuvor acetyliert, so entsteht sogar ausschließlich dieses Produkt.

Da eine Racemisierung bei den Substanzen nicht anzunehmen ist, kann davon ausgegangen werden, dass auch die enantiomerenreinen Verbindungen durch analoge Reaktionsführung ausgehend von **2** zugänglich sind.

3.4.4 Verwendung von 2,3-*trans*-CHA als Katalysator

Neben dem Einsatz von **2** unmittelbar als Startmaterial, kann **2** auch als Katalysator für verschiedene Reaktionstypen eingesetzt werden.

Von chiralen Aminosäuren wie Prolin und Lysin ist der Einsatz als enantioselektive Katalysatoren bekannt.¹³⁸ So katalysiert L-Prolin (**200**) die direkte Aldoladdition von Aceton mit verschiedenen Aldehyden.¹³⁹ Die Anwendung von L-Prolin (**200**) als Katalysator in der direkten Aldolreaktion beruht auf einem Enamin-Mechanismus (siehe Abbildung 3.51), der eine hohe Analogie zum Reaktionsmechanismus von Aldolasereaktionen aufweist. Aus diesem Grund wird **200** auch als Enzymmimetikum bezeichnet.

Für die Katalyse der direkten Aldolreaktion mit Lewissäuren werden Metallkomplexe mit chiralen Liganden, wie zum Beispiel Shibasakis Zink-BINOL-Komplex, verwendet.¹⁴⁰ Diese Reaktionen müssen jedoch wegen der Feuchtigkeitssensitivität der Metallkomplexe unter wasserfreien Bedingungen in organischen Lösungsmitteln durchgeführt werden.

Jüngste Arbeiten von Darbre *et al.* zeigen, dass die Vorteile der wassertoleranten Organokatalyse und der effizienten Metallkomplekkatalyse kombiniert werden können.¹⁴¹ So wurden Zinkkomplexe von Prolin und anderen Aminosäuren synthetisiert und als Katalysator für die Aldolreaktion zwischen Aceton (**201**) und 4-Nitrobenzaldehyd (**202**) in wässrigen Systemen getestet. Dabei zeigten Prolin-, Lysin- und Argininkomplexe bei Einsatz von 5 mol % des jeweiligen Katalysators nach 24 h Umsätze von 100 % und ee-Werte von 24 - 54 %. Auch bei vielen anderen Zink-Aminosäure-Komplexen konnten Umsetzungen mit einer gewissen Enantioselektivität beobachtet werden. Erhöhter Umsatz und Selektivität bei Verwendung des Zn-Prolin-Komplexes **203** im Vergleich zu Prolin alleine deuten an, dass der Enaminmechanismus in wässrigem Medium nur eingeschränkt greift.

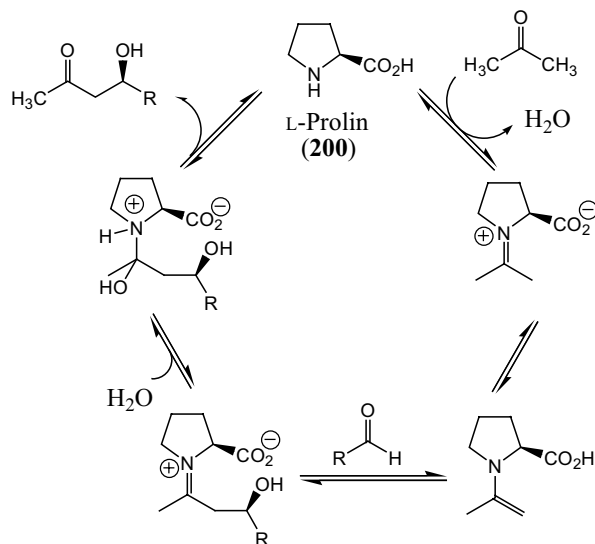


Abbildung 3.51: Mechanismus der Prolin katalysierten direkten Aldolreaktion.^{139a}

Zur Überprüfung, ob auch **2** katalytische Aktivität zeigt wurde, analog der Arbeiten on Darbre *et al.* ein Zink-CHA-Komplex **204** synthetisiert und dieser als Katalysator für die Aldolreaktion zwischen Aceton (**201**) und 4-Nitrobenzaldehyd (**202**) getestet (siehe Abbildung 3.53).

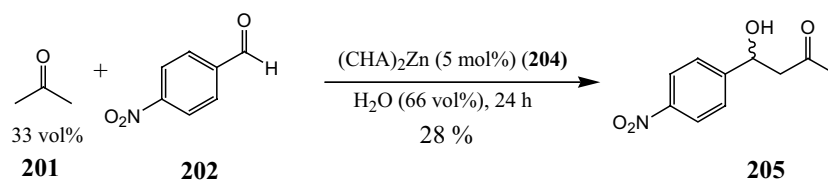


Abbildung 3.53: Di-(2,3-*trans*-CHA) Zinkat II (**204**) katalysierte direkte Aldolreaktion in wässrigem Medium.

Das Di-(2,3-*trans*-CHA) Zinkat II (**204**) wurde durch Reaktion von Zinkacetat und **2** in Methanol erhalten. Unter Verwendung dieses Katalysators konnte der Benzaldehyd **202** in einem Aceton/ Wasser-Gemisch in 24 h zu 28 % zum Aldolprodukt **205** umgesetzt werden. Damit liegt der erzielte Umsatz zwar niedriger als bei der Verwendung von Prolin- oder Argininkomplexen, aber höher als bei verschiedenen anderen Aminosäuren (Cystein 3 %, Glutamin < 1%, Histidin 4 %, Serin 5 %, Isoleucin 10 % und *t*-Leucin 15 %). Kontrollversuche schließen eine katalytische Aktivität von reinem Zinkacetat sowie reinem 2,3-*trans*-

CHA aus und mit reinem Prolin wird kaum Umsatz erreicht. Da erste Ergebnisse bezüglich des mit **204** erzielten Enantiomerenüberschusses widersprüchlich sind, werden an dieser Stelle keine Angaben diesbezüglich gemacht. Für stichhaltige Ergebnisse sind genauere Untersuchungen notwendig.

Insgesamt bleibt festzuhalten, dass eine eingehendere Untersuchung von 2,3-*trans*-CHA (**2**) als katalytisch wirksame Aminosäure von großem Interesse ist, zumal aufgrund der vielseitigen Folgechemie verschiedene strukturelle Modifizierungen möglich sind, die auch auf die katalytischen Eigenschaften Einfluss haben werden.

4 Diskussion und Ausblick

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimente und erzielten Ergebnisse sollen eine Grundlage für fortführende Arbeiten sein, die zum Teil bereits begonnen bzw. durchgeführt wurden. So dienten die mikrobiologischen Arbeiten, die die Bildung von ADIC (**16**) und 2,3-*trans*-CHA (**2**) ermöglichten und die damit einhergehende Etablierung eines geeigneten analytischen Systems als Grundlage für die im Rahmen von CHORUS durchgeführten Arbeiten mit Phenazingenen, die letztlich einen Zugang zu **2** im Gramm-Maßstab ermöglichten.

Bei der Nutzung der in Abbildung 4.1 dargestellten mikrobiell zugänglichen Cyclohexadiene als chirale Synthesebausteine wurde schwerpunktmäßig mit dem von Beginn der Arbeiten an zur Verfügung stehenden Diol **3** gearbeitet.

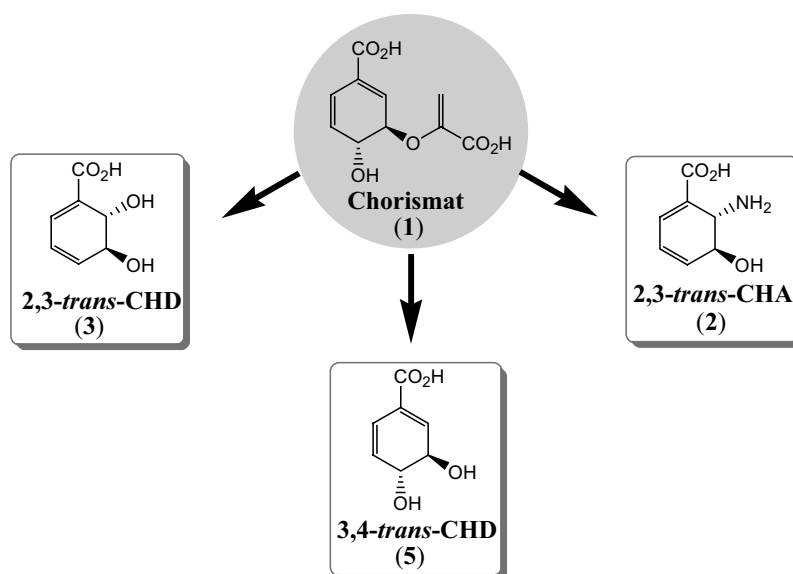


Abbildung 4.1: Mikrobiell in *E. coli* im Gramm-Maßstab produzierbare funktionalisierte Cyclohexadiene.

Ergebnisse und Erkenntnisse, die in dieser Arbeit erzielt wurden, flossen unmittelbar in parallel laufende und aufbauende Arbeiten von D. Franke,^{39b} C. Dose und S. Eßer^{111,136} ein. Umgekehrt wurden die dort erzielten Ergebnisse zur optimalen Durchführung der vorliegenden Arbeit berücksichtigt.

Die mit **3** und **2** durchgeführten Synthesen dienen zur Demonstration des Potenzials der Substanzen und können als Ausgangspunkt für neue synthetische Ansätze angesehen werden. Im folgenden sollen die erzielten Ergebnisse, sowie mögliche Optimierungen und Ziele der Darstellung und Nutzung der von Chorismat abgeleiteten Cyclohexadiene diskutiert werden.

4.1 Gewinnung von 2,3-*trans*-CHA

Für einen mikrobiellen Zugang zum 2,3-*trans*-CHA (**2**) in *E. coli* wurde im Rahmen dieser Arbeit zunächst die Darstellung von **2** mit Genen aus *E. coli* verfolgt. Bei der Modifikation der Anthranilatsynthase wurde dabei eine Mutation in der *Active Site* des Proteins eingesetzt, die bei *S. typhimurium* zu einem weitgehenden Verlust der ADIC-Lyase Aktivität bei gleichzeitigem Erhalt der ADIC-Synthase Aktivität führte. Die Anreicherung von ADIC im Überstand konnte bei Überexpression des veränderten Proteins nachgewiesen werden.

Worauf die geringe Menge des gebildeten ADIC zurückzuführen ist, wurde an dieser Stelle nicht weiter untersucht. Auch die Frage, ob eine Veränderung von TrpE, wie allgemein angenommen, tatsächlich notwendig ist, oder ob eine Anreicherung von ADIC bei geeigneten Fermentationsbedingungen auch mit dem Wildtypenzym möglich ist, wurde nicht weiter verfolgt.

Der zweite entscheidende Schritt zur Herstellung von **2**, die Abspaltung des Pyruvatrestes unter Erhalt der Cyclohexadienstruktur, wurde mit Hilfe des aus der Phenazinbiosynthese stammenden Enzyms PhzD durchgeführt. Mit Plasmid pC30 wurde **2** erstmals *in vitro* und *in vivo* in *E. coli* zugänglich gemacht und somit ein mikrobieller Zugang zu **2** erarbeitet.

Auf dieser Basis wurden in einer Arbeitsgruppe von DSM BIOTECH innerhalb des CHORUS-Projektes eine Produktion von **2** mit PhzD und PhzE (pC27) in *E. coli* im Gramm-Maßstab ermöglicht.

Trotz der bereits recht hohen Produkttiter in den Überständen, ist es aus ökonomischer Sicht von Interesse, die bestehenden mikrobiellen Produktionsprozesse weiterhin zu optimieren. Dabei können mikrobiologische und fermentationstechnische Methoden angewandt werden.

Für das in der vorliegenden Arbeit behandelte 2,3-*trans*-CHA (**2**) werden bisher Stämme eingesetzt, die sich durch eine hohe Produktionsleistung im Shikimat-Biosyntheseweg auszeichnen und die plasmidisch kodierten Gene *phzE* und *phzD* enthalten, die für die Umsetzung von Chorismat zu **2** verantwortlich sind. In den Überständen der durchgeführten

Fermentationen wurden Verbindungen aus dem gemeinsamen Shikimatweg, wie zum Beispiel Chorismat, gefunden. Diese erscheinen allerdings in deutlich geringeren Mengen im Überstand als das gewünschte CHA **2**.

Das bedeutet, dass das angewandte System aus biologischer Sicht in einem optimierten Bereich liegt, also in etwa soviel Chorismat produziert wird, wie durch chorismatverbrauchende Enzyme umgesetzt werden kann. Demnach muss für eine Erhöhung der Produktionsleistung sowohl die Bildung von **1** als auch dessen Verstoffwechslung zu **2** verbessert werden. Geschehen kann dies beispielsweise durch das Einbringen zusätzlicher plasmidisch oder chromosomal kodierter Gene was zu einer Erhöhung der intrazellulären Konzentration der entsprechenden Proteine führt. Dabei können Gene wie *phzE* und *phzD* oder verschiedene *aro*-Gene aus der Aromatenbiosynthese auch mehrfach zum Einsatz kommen. Arbeiten in diese Richtung werden derzeit im Rahmen von CHORUS durchgeführt.¹⁴²

Weiterhin kann eine Erhöhung der Enzymkonzentrationen gegebenenfalls durch eine Änderung bzw. Optimierung des Promotorsystems im jeweiligen Plasmid erreicht werden. Zu beachten ist generell bei solchen molekularbiologischen Eingriffen, dass es sich beim Zellmetabolismus um ein komplexes System handelt und Veränderungen an einer bestimmten Stelle möglicherweise Einfluss auf andere Bereiche im System haben können. Ein unmittelbarer Erfolg ist also nicht zwingend.

Die Optimierung der Fermentationsbedingungen wird ebenfalls im Rahmen von CHORUS zur Zeit von R. Takors und R. Bujnicki *et al.* bearbeitet.

Aus mikrobiologischer Sicht ist es außerdem interessant, zu untersuchen, welche Phänomene dafür verantwortlich sind, dass bei einer Überexpression von TrpE^{H398M} bislang keine annähernd hohen Produkttiter erreicht werden konnten bzw. ob durch weitere gezielte Mutationen eine Verbesserung der Produktionseigenschaften erreicht werden kann. Auch bleibt zu untersuchen, ob PhzD durch plasmidisch kodiertes EntB ersetzt werden kann.

Mit einer Produktisolierung durch Kristallisation konnte ein Prozess etabliert werden, der effektiv und einfach zu einem sehr sauberen Produkt führt und auch auf technischen Maßstab hervorragend anzupassen ist. Zu beachten ist allerdings, dass die Produktisolierung durch Veränderungen im Produktionsprozess beeinflusst wird und jeweils neu angepasst werden muss. So ist bei einer Erhöhung der intrazellulären Proteinkonzentration auch eine Erhöhung der Proteinbelastung im zellfreien Überstand abzusehen, was einen Kristallisationsprozess nachteilig beeinflussen kann.

Im Vergleich zur Darstellung von **2** nach McCormick *et al.* ist der hier gezeigte Ansatz systematisch und daher flexibler und breiter anwendbar. Dies beonders im Hinblick auf Optimierung der Produktion von **2** und der Erweiterung des Produktspektrums auf weitere funktionalisierte Cyclohexadiene oder ähnliche Verbindungen.

4.2 Verwendung von 2,3-*trans*-CHD und 2,3-*trans*-CHA in der Natur- und Wirkstoffsynthese

Durch die in dieser Arbeit gezeigten chemischen Umsetzungen ausgehend von 2,3-*trans*-CHD (**3**) konnte gezeigt werden, dass es sich bei der Verbindung um einen vielseitig einsetzbaren, flexiblen Baustein handelt. Damit ist die Grundlage für einen weiter reichenden Einsatz von **3** zum Beispiel in der Natur- und Wirkstoffsynthese geschaffen.

Die durchgeführten Synthesen stellen nur eine exemplarische Auswahl dar. Diese demonstriert jedoch die Stabilität der Cyclohexadiene unter verschiedensten Reaktionsbedingungen. So konnten Oxidations- und Reduktionsmittel gezielt eingesetzt werden und selektiv die gewünschten Produkte erhalten werden. Eine Aromatisierung der Substanzen konnte durch geeignete Reaktionsführung in den meisten Fällen weitgehend vermieden werden. Einzig bei der Entfernung der TBS-Schutzgruppen und bei der Verseifung der Carbonsäureester war eine Aromatisierung verstärkt zu beobachten. In diesem Zusammenhang kann festgestellt werden, dass die überwiegend gewählten TBS-Schutzgruppen zwar eine gute Wahl hinsichtlich der Stabilität unter verschiedenen Bedingungen waren, allerdings erscheint es sinnvoll in Abhängigkeit von der angestrebten Zielverbindung auch andere Schutzgruppen in Erwägung zu ziehen. Der dirigierende Effekt, der den sterisch anspruchsvollen TBS-Resten zugesprochen wird darf jedoch bei der Suche nach Alternativen nicht außer Acht gelassen werden.

Auch die Vorstufen zu **2**, **3**, **4** und **5** in der Biosynthese, ADIC (**16**), Isochorismat (**7**), ADC (**15**) und Chorismat (**1**) können als selektiv geschützte Synthesebausteine angesehen werden, zumal durch die in dieser Arbeit vorgestellte Isolierung von **1** im Gramm-Maßstab zumindest dieser Baustein in geeigneter Menge zur Verfügung gestellt werden kann.

Überraschend stabil zeigten sich im Rahmen der durchgeführten Synthesen die epoxidierten Cyclohexanderivate gegenüber nukleophilen Angriffen. In vielen Fällen konnte erst durch

Einsatz von stark lewissauren metallorganischen Reagenzien eine Öffnung der Oxirane in hinreichend guten Ausbeuten erreicht werden.

Bei den verschiedenen Einführungen der Epoxidgruppen ist davon auszugehen, dass sowohl koordinative Effekte zwischen Reagenz und zum Beispiel Hydroxygruppen des Eduktes, als auch sterische Einflüsse, insbesondere durch vorhandene TBS-Gruppen, von entscheidender Bedeutung für die beobachtete Stereoselektivität sind. Welche Einflüsse im Einzelfall entscheidend sind lässt sich bislang nur schwer vorhersagen. So scheint zwar oft eine freie Hydroxygruppe in Nachbarschaft zur angegriffenen Doppelbindung einen dirigierenden Einfluss zu besitzen, eine Grundsätzlichkeit wird aber schon durch die Arbeiten von Steel wiederlegt (siehe Abbildung 3.50). So wird bei der Epoxidierung des geschützten 2,3-*trans*-CHA **110** mit einer freien Hydroxygruppe in 3-Position nicht wie erwartet überwiegend **199** gebildet mit dem Epoxidring in *cis*-Stellung zur Hydroxygruppe, sondern das zu dieser *trans*-ständige und zur an 2-Position befindlichen BOC-Gruppe *cis*-ständige Produkt **198** wird in deutlichem Überschuss gebildet.

Durch die Verschiedenartigkeit der in **3** erhaltenen, sowie der in den Umsetzungen eingeführten funktionellen Gruppen, sind die Möglichkeiten zur weiteren Veränderung der Struktur groß. Potenzielle Reaktionen zur Modifizierung von **3** lassen sich in zwei Kategorien einteilen. Zum einen können Veränderungen unter Erhalt des Cyclohexandiol-Grundgerüsts erfolgen. In diesem Fall ist es aufgrund der geleisteten Vorarbeit sinnvoll zielgerichtet auf ausgewählte Strukturen hinzuarbeiten. Ein Beispiel für eine solche Vorgehensweise ist die von S. Eßer im Rahmen seiner Diplomarbeit durchgeführte Synthese von *ent*-Streptol (**212**) (siehe Abbildung 4.2).

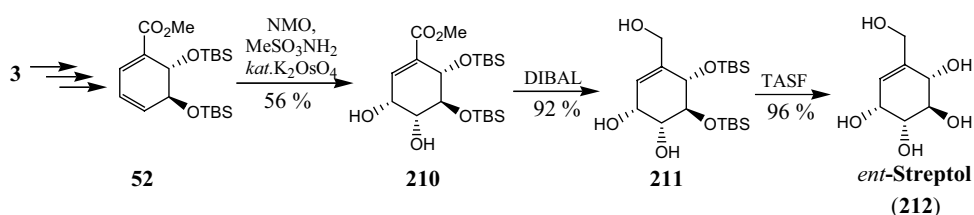


Abbildung 4.2: Synthese von *ent*-Streptol (**212**) ausgehend von 2,3-*trans*-CHD (**3**).

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Synthesen von *ent*-Senepoxid (*ent*-**63**) und *iso*-Crotepoxid **182** fallen ebenfalls in diese Kategorie.

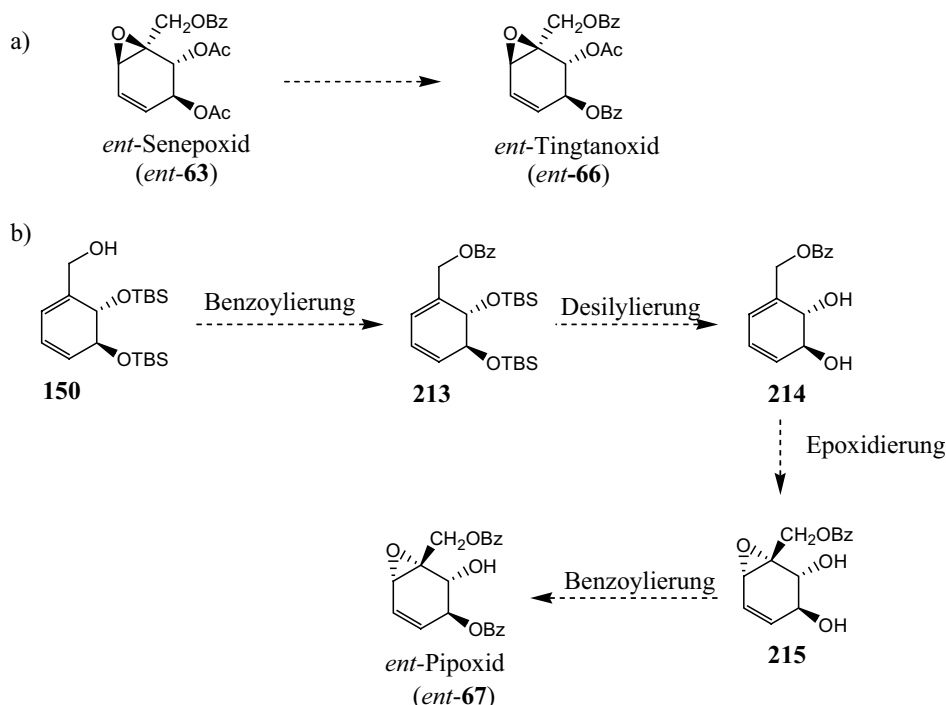


Abbildung 4.3: Syntheserouten zu (a) *ent*-Tingtanoxid (*ent*-66) und (b) *ent*-Pipoxid (*ent*-67).

Durch gezielte Arbeiten sollten beispielsweise weitere Epoxidnaturstoffe wie sie in Abbildung 2.19 aufgeführt sind bzw. deren Stereoisomere zugänglich sein. In einigen Fällen können die Substanzen allein durch Variation der Schutzgruppen erhalten werden. So ist *ent*-Tingtanoxid (*ent*-66) durch formalen Austausch einer Acetylgruppe gegen eine Benzoylgruppe aus *ent*-Senepoxid (*ent*-63) erhältlich (siehe Abbildung 4.3a). Eine Synthese von *ent*-Pipoxid (*ent*-67) sollte ausgehend von **150** in wenigen Schritten möglich sein (siehe Abbildung 4.3 b), wobei die Syntheseschritte ab **214** bereits von B. Ganem *et al.* am Enantiomer erfolgreich durchgeführt wurden.^{76b}

Auch verschiedene die C₇N-Aminocyclitole sollten ausgehend von **3** in relativ kurzen Synthesefolgen effektiv zugänglich sein. Durch Reduktion des Valienaminanalogons **189**, das in drei Reaktionsschritten mit einer Ausbeute von 33 % ausgehend vom Methyl ester **133** zugänglich ist würde man zum 2,3,5-tri-*epi*-Valienamin (**190**) gelangen. Als Alternative zu gängigen metallorganischen Reagenzien könnten für die Reduktion der Esterfunktion von **189** chemoenzymatische Methoden wie der Einsatz von den noch wenig synthetisch eingesetzten Carbonsäure-Reduktasen¹⁴³ erfolgreich einsetzbar sein. Auch die Verwendung

von Schutzgruppen wie Benzoyl- oder verschiedene Silylgruppen zur Erhöhung der Löslichkeit in unpolaren Lösungsmitteln kann gegebenenfalls zum Erfolg führen.

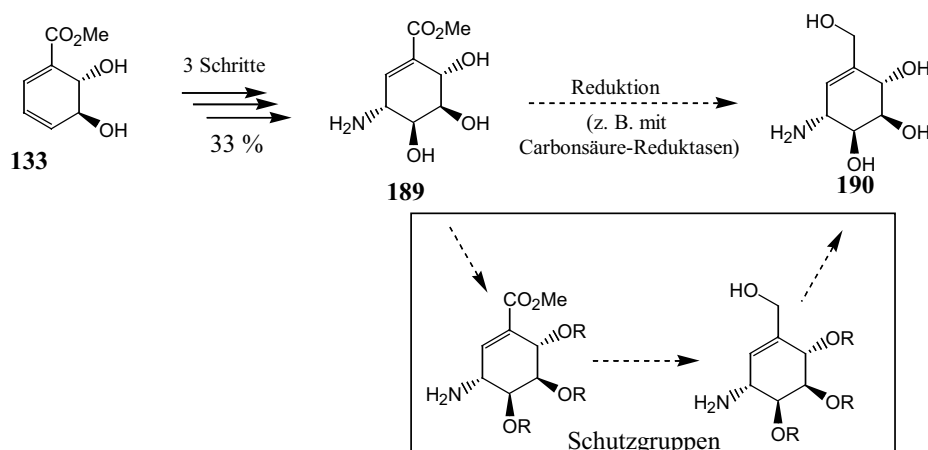


Abbildung 4.4: Syntheserouten zu 2,3,5-tri-*epi*-Valienamin (**190**).

Durch Variation der Regio- und Stereochemie bei der Einführung der Aminogruppe sind von **3** noch weitaus mehr pharmakologisch interessante Substanzen zugänglich. Aminocyclitole stellen die Basiseinheit von Verbindungen wie Acarbose (**185**) (siehe Abbildung 3.44), Adiposinen, Amylostatinen, Oligostatinen und Trestatinen dar (siehe Abbildung 4.5), die bekannt sind für ihre glycosidaseinhibitorische Wirksamkeit.

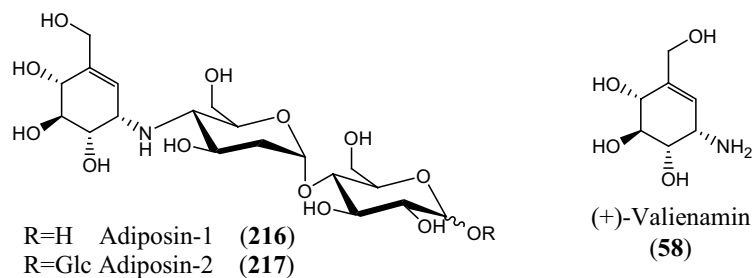
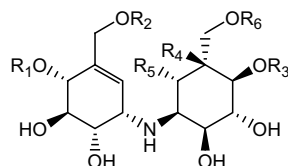


Abbildung 4.5: Adiposine als Substanzen mit glycosidaseinhibitorischer Wirkung und Valienamin (**58**) Core-Einheit.

Unter diesen aktiven Metaboliten, die aus der Biosynthese verschiedener Mikroorganismen, wie Streptomyceten und Actinoplanes-Stämmen bekannt sind, ist Acarbose (**174**) die Substanz, die am eingehendsten untersucht wurde. Dabei wurde eine ausgeprägte

inhibitorische Wirkung auf eine Reihe von α -Glucosidasen von Bakterien, Pilzen und Säugetieren inklusive der humanen intestinal α -Glucosidasen, wie Saccherase, Maltase und Glucoamylase festgestellt.^{135c}



Validamycin-
Grundstruktur

		R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆
220	Validamycin A	H	H	β -D-Glc	H	H	H
221	Validamycin B	H	H	β -D-Glc	H	OH	H
222	Validamycin C	H	α -D-Glc	β -D-Glc	H	H	H
223	Validamycin D	H	H	H	H	H	α -D-Glc
224	Validamycin E	H	H	α -D-Glc(1-4)- β -D-Glc	H	H	H
225	Validamycin F	α -D-Glc	H	β -D-Glc	H	H	H
226	Validamycin G	H	H	β -D-Glc	OH	H	H
227	Validamycin H	H	H	α -D-Glc(1-4)- β -D-Glc	H	H	H

Abbildung 4.6: Struktur von Validamycin A-H.

Entscheidend für die Wirksamkeit ist das enthaltene Aminocyclitol Valienamin (**58**), das selbst bereits biologische Aktivität zeigt und in den meisten Glycosidaseinhibitoren zu finden ist. Weiterhin zeigen C₇N-Aminocyclitol enthaltende Substanzen wie Validamycine, Salbostatin und Suidatrestin antifungale und antibiotische Wirksamkeit. Validamycin A (**220**) wird beispielsweise im Nahen Osten zur Bekämpfung von Pilzbefall (*Rhizoctonia solani*) an Reispflanzen eingesetzt.¹⁴⁴

Zwar ist der Zugang zum natürlichen (+)-Valienamin (**58**) aufgrund der vorgegebenen Stereochemie nicht trivial, allerdings können 2,3-*trans*-CHD (**3**) und verwandte Verbindungen einen Zugang zu verschiedenen Stereoisomeren ermöglichen, die für systematische Untersuchungen der Wirkungsweise interessant sind. Eine Erweiterung der Palette an Aminocyclitolen kann zusätzlich durch Arbeiten mit 2,3-*trans*-CHA (**2**) erzielt werden. In diesem Fall ist die Aminofunktion bereits im Ausgangsmolekül enthalten und die formale Einführung einer Dioleinheit liefert Isomere von Valienamin. Synthetisch ist dies

zum Beispiel durch Dihydroxylierung und durch Epoxidierung mit anschließender Ringöffnung zu erreichen. Gerade die Epoxidierung kann wiederum die Basis für eine Vielzahl von Produkten sein (siehe Abbildung 4.7).

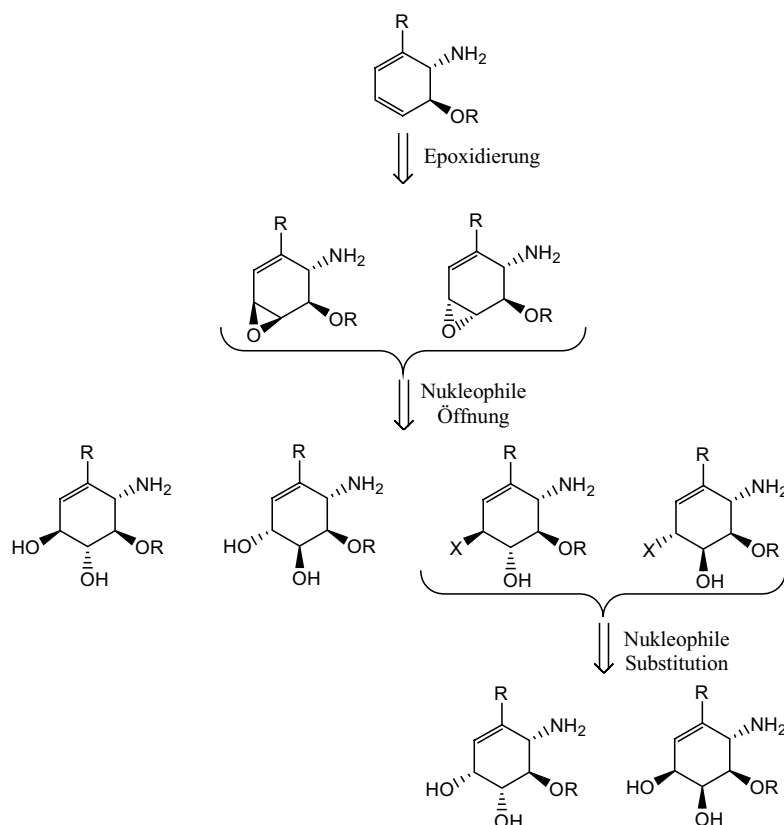


Abbildung 4.7: Synthesestrategie für Valienaminisomere beginnend mit der Epoxidierung eines Cyclohexadienaminoalkohols.

Weitere potenzielle Zielmoleküle sind die in Abbildung 4.8 dargestellten Verbindungen sowie deren Stereoisomere.

So handelt es sich beispielsweise bei den Rancinamycinen **228** - **231** um Substanzen mit antibiotischer Aktivität, deren Hauptstruktureinheit eng mit dem 2,3-CHD **3** verwandt ist.¹⁴⁵

FR65814 (**232**) ist ein Sesquiterpen, dass aus dem Kultivierungsüberstand von *Penicillium*stämmen isoliert wurde und immunosuppressive Aktivität zeigt.¹⁴⁶ Substanzen mit dieser Eigenschaft sind von großer pharmazeutischer Bedeutung und werden

beispielsweise in der medikamentösen Begleitbehandlung von Transplantationspatienten eingesetzt.

Simmondsin (**233**) sowie davon abgeleitete Verbindungen kommen in Jojobapflanzen (*Simmondsia chinensis*) vor, die in vielen ariden und semiariden Gebieten auf der ganzen Welt kultiviert werden.¹⁴⁷ Während das Öl der Pflanzen für die Kosmetikindustrie genutzt werden kann, scheiterte die Verwendung des entölten Rückstandes als Viehfutter an dessen Toxizität. Untersuchungen haben gezeigt, dass **233** und dessen Derivate Auslöser der toxischen Reaktion sind und vermutlich eine Glycosidaseinhibition eintritt. Eine enantioselektive Synthese von **233** ist bislang nicht bekannt.

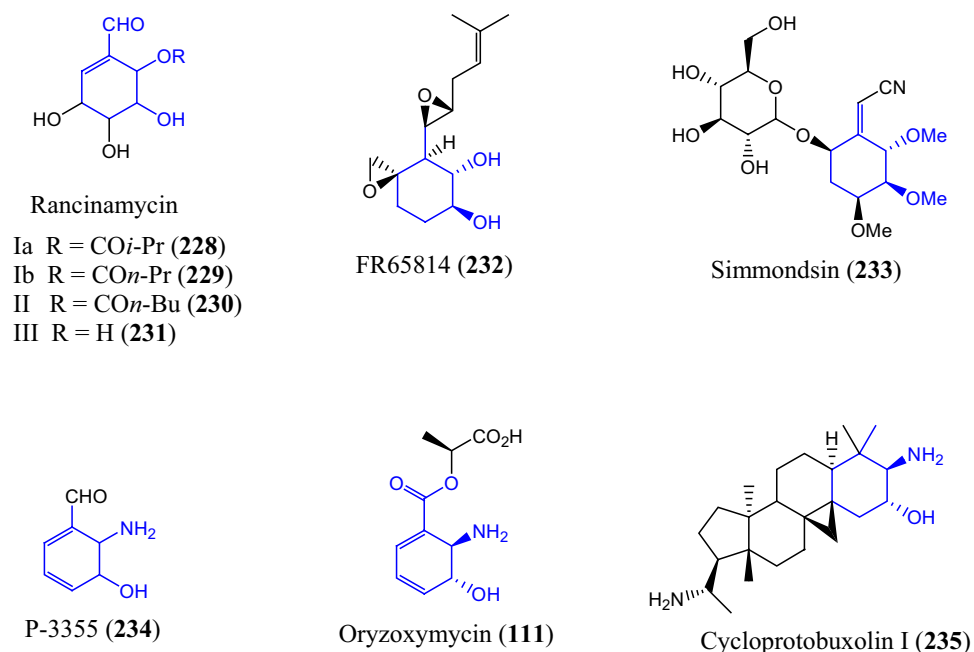


Abbildung 4.8: Natur- und Wirkstoffe, die als Leitstrukturen für Synthesen ausgehend von 2,3-*trans*-CHD (**3**) oder 2,3-*trans*-CHA (**2**) dienen können.

Vom 2,3-CHA **2** leiten sich die Antibiotika Oryzoxymycin (**111**) und P-3355 (**234**) unmittelbar ab. P-3355 wurde aus dem Kultivierungsüberstand von *Streptomyces amylovorus* isoliert und zeigt ein breites antibakterielles Spektrum (z. B. gegen *Staphylococcus aureus* oder *Aspergillus fumigatus*). Cycloprotobuxolin (**235**) ist ein alkaloider Naturstoff aus *Buxus sempervirens* (Buxaceae).

Im Gegensatz zu Synthesen die auf eine spezielle Zielsubstanz gerichtet sind, sind Umsetzungen, die das Cyclohexangrundgerüst nachhaltig verändern von grundlegenderem Interesse. Vor allem C-C-Bindungs- und C-C-Spaltungsreaktionen wie Diels-Alder-Reaktionen, Metathese-Reaktionen oder die Ozonolyse (siehe Abbildung 4.9) würden Wege zu völlig verschiedenen Substanzgruppen eröffnen.

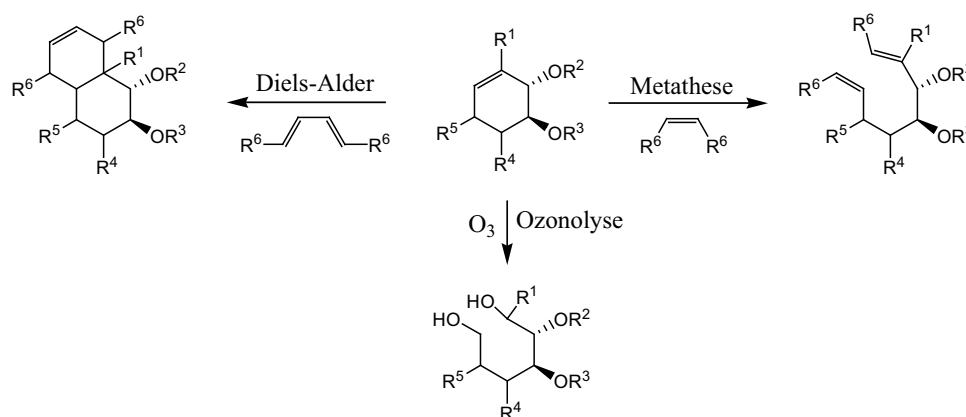


Abbildung 4.9: Reaktionstypen die eine nachhaltige Veränderung des Cyclohexanringes bewirken.

Über solche Reaktionstypen gelangt man zu substituierten Kohlenstoffketten mit mindestens zwei definierten Stereozentren oder zu den durch Diels-Alder-Reaktion zugänglichen Bicyklen. Durch die Dimerisierungsreaktionen im Rahmen dieser Arbeit ist die grundsätzliche Durchführbarkeit von Diels-Alder-Reaktionen gezeigt worden. In aufbauenden oder alternativen Synthesen kann das Potenzial der Reaktionen mit nachhaltiger Veränderung des Cyclohexangerüsts weiter belegt und ausgeschöpft werden.

4.3 Verwendung 2,3-*trans*-CHA als β -Aminosäure

Zusätzlich zu den zuvor diskutierten synthetischen Möglichkeiten bieten sich für 2,3-*trans*-CHA (**2**) Potenziale, die für die von Chorismat abgeleiteten Cyclohexadiene einzigartig sind. Bei **2** handelt es sich um eine konformativ stabile β -Aminosäure. Diese Verbindungsklasse hat in jüngster Zeit aus verschiedenen Gründen das Interesse von Wissenschaftlern auf sich gezogen.^{148,153-155} Sowohl natürlich vorkommende β -Aminosäuren, die meist von den entsprechenden α -Aminosäuren abgeleitet sind, als auch nicht natürliche Verbindungen

spielen als Bausteine in Peptiden eine Rolle. Die biologische Aktivität, die bei den sogenannten β -Peptiden vielfach zu beobachten ist,^{137,149} lässt sich im wesentlichen auf die proteolytische Stabilität solcher Peptide gegenüber Peptidasen und auf die Änderung der konformativen Eigenschaften sowie der Tertiärstruktur durch Einbau und Verwendung von β -Aminosäuren zurückführen.¹⁵⁰

So synthetisierten Gellman *et al.* ein β -Aminosäuren-Oligomer (β -Peptid) **240**, das ein Mimik für eine Klasse von natürlichen Antibiotika (Magainine)¹⁵¹ darstellt (siehe Abbildung 4.10).^{150a} Dieses β -17 Oligomer ist aus (3*R*,4*S*)-*trans*-4-aminopyrrolidin-3-carbonsäure (*trans*-APC, **242**) und (*R,R*)-*trans*-2-aminocyclopentancarbonsäure (*trans*-ACPC, **244**) aufgebaut (siehe Abbildung 4.11).

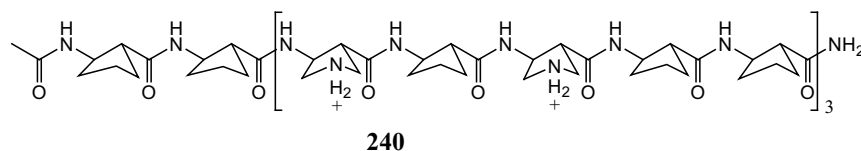


Abbildung 4.10: Magainin-Mimetikum **240** aufgebaut aus *trans*-ACPC (**244**) und *trans*-APC (**242**).^{150a}

Im allgemeinen lassen sich β -Aminosäuren einteilen in solche, die von den natürlichen proteinogenen α -Aminosäuren abgeleitet sind (siehe Arbeiten von Seebach *et al.*)¹⁵² und solche, die nicht mit den natürlichen α -Aminosäuren verwandt sind. Bei den β -Peptiden unterscheidet man Verbindungen, die im wesentlichen aus α -Aminosäuren bestehen und nur einzelne β -Aminosäuren bzw. β -Aminosäurenoligomere enthalten und solche, die ausschließlich aus β -Aminosäuren aufgebaut sind. Vor allem die Arbeiten von Gellman *et al.* haben gezeigt, dass β -Peptide, die vollständig aus synthetisch gewonnenen β -Aminosäuren aufgebaut sind (siehe Abbildung 4.11), teilweise in der Lage sind in Lösung eine definierte Tertiärstruktur (z. B. Helix, Schleife, Faltblatt) einzunehmen.^{149b,150b,153} Solche β -Peptide werden auch als „Foldamere“ bezeichnet. Die verwendeten Monomere zeigen häufig eine strukturelle Verwandtschaft mit 2,3-*trans*-CHA (**2**) und dessen Derivaten und sind¹⁵⁴

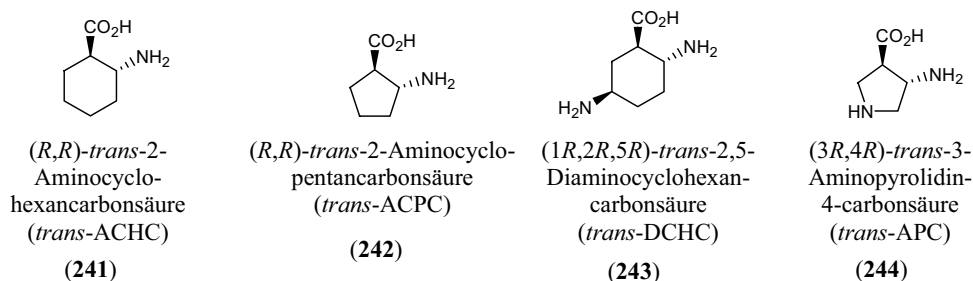


Abbildung 4.11: Konformativ stabile β -Aminosäuren, die zur Darstellung von Foldameren verwendet wurden.

Enantioselektive Zugänge zu 2-Aminocycloalkancarbonsäuren wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen entwickelt.¹⁵⁵ Eine flexible und relativ kurze Synthese von Homologen der $(1S,2S)$ -*trans*-2-Aminocyclohexancarbonsäure (*ent*-241) wurde beispielsweise von D. Enders *et al.* durchgeführt (siehe Abbildung 4.12).¹⁵⁶

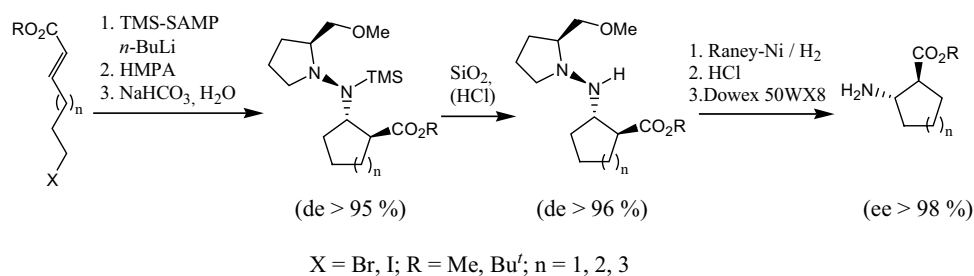


Abbildung 4.12: Synthese von *trans*-ACHC und Homologen nach Enders *et al.*

Einfluss auf die Entstehung von Foldameren, also auf die Bildung einer Tertiärstruktur, haben bestimmte konformative Eigenschaften des Monomers. Zum einen muss eine gewisse konformative Stabilität gegeben sein, die im Falle von **2** durch das Cyclohexangrundgerüst gegeben ist und im Falle des intakten Diensystems noch verstärkt wird. Weiterhin hat der Torsionswinkel zwischen Säure- und Aminofunktion einen entscheidenden Einfluss auf die Bildung einer Tertiärstruktur. So wird durch eine *gauche*-Konformation bevorzugt eine Helix oder eine Schleife gebildet, während bei einer *anti*-Konformation in der Regel eine Faltblattstruktur entsteht.

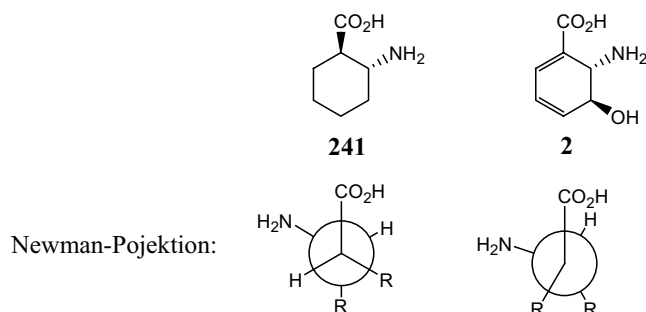


Abbildung 4.13: Die Newman-Projektion zeigt die *gauche*-Stellung der Säurefunktion zur Aminofunktion in **241** und die *gauche*-ähnliche Stellung in **2**.

Das CHA **2** weist im Modell (Minimierung der Energie in der Gasphase) eine *gauche*-ähnliche Konformation auf. Aufgrund der Verwandtschaft von 2,3-*trans*-CHA (**2**) zu *trans*-ACHA (**241**) kann die begründete Vermutung angestellt werden, dass auch **2** für die Synthese von Foldameren und β -Peptide geeignet ist. Durch das gegebene Cyclohexadiensystem besteht durch gezielte Funktionalisierung (z. B. Hydrierung) außerdem die Möglichkeit die Konformation des Moleküls und somit die Torsionswinkel zu verändern, was zu veränderten Eigenschaften der potenziellen β -Peptide führen sollte.

4.4 Verwendung als Katalysator

Unter dem Begriff „Organokatalyse“ versteht man die Katalyse von Reaktionen durch den Einsatz von kleinen metallfreien organischen Molekülen. Die bekannteste organokatalytisch aktive Substanz ist Prolin, das in dieser Funktion auf die Pionierarbeiten in den 1970er Jahren von Hajos und Parrish^{138b} sowie von Wiechert, Sauer und Eder^{138a} zurückgeht. Aktuelle Arbeiten haben das Anwendungsspektrum von Prolin deutlich erweitert.^{138c-e,139} Auch wenn andere Aminosäuren bislang nicht an die Bedeutung von Prolin herankommen gibt es Anzeichen, dass die katalytische Aktivität nicht auf Prolin beschränkt ist und sogar, dass vom Enaminmechanismus (siehe Abbildung 3.52, Kapitel 3.4.3) abweichende Katalysmechanismen möglich sein können.

Die Experimente mit einem Zink-CHA-Komplex haben die prinzipielle katalytische Funktion von **2** gezeigt, wobei eine enantioselektive Katalyse noch nicht durchgeführt werden konnte. Durch die vielfältigen Modifikationsmöglichkeiten von **2** bietet es sich jedoch für systematische Untersuchungen hinsichtlich der katalytischen Aktivität an.

Abgesehen von der Organokatalyse bietet sich **2**, genau wie alle anderen von Chorismat abgeleiteten Cyclohexadiene, für den Einsatz in der Synthese neuer Liganden für die Metallkomplekkatalyse an.

5 Experimenteller Teil

5.1 Molekularbiologische Arbeiten

5.1.1 Verwendete *E. coli*-Stämme und Plasmide

Es wurden die in Tabelle 5.1 angegebenen *E. coli*-Stämme und die in Tabelle 5.2 angegebenen Plasmide verwendet.

Tabelle 5.1: Verwendete und konstruierte *E. coli*-Stämme.

Stamm	Relevanter Genotyp	Referenz
DH5 α	<i>supE44 ΔlacU169 (ϕ80lacZΔM15) hsdR17</i> <i>recA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	Hanahan ¹⁵⁷
LJ110	W3110 <i>fnr</i> ⁺ prototroph	Jahreis ¹⁵⁸
F67	LJ110 <i>ΔtrpE</i>	diese Arbeit
XL1-Blue MRF ⁺	<i>Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1</i> <i>supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac[F' proAB</i> <i>lacI^qZΔM15 Tn10 (Tet^R)]</i>	STRATAGENE
NST37	<i>F⁻ aroF(FBI^R) aroG(FBI^R) tyrR-pheA(FBI^R)</i> <i>pheO^c tyrA trpE</i>	Tribe ¹⁵⁹
F4	LJ110 <i>Δ(pheA tyrA aroF)</i>	Sprenger ¹⁶⁰

Tabelle 5.2: Verwendete und konstruierte Plasmide.

Plasmid	Größe [bp]	Relevante Merkmale	Referenz
pJF119EH1	5428	<i>Amp^R, lacI^q, Ptac, ori colE1</i>	Fürste
pJF119EH-trpE	6885	<i>pJF119EH1-trpE</i>	Sprenger
pBlue2 KS ⁻	2961	<i>P_{T7}P_{T3}P_{lac} lacZ' Amp^R ori colE1</i>	Short ¹⁶¹
pKO3	5681	<i>RepA(pSC101-ts) Cm^R oriM13 sacB</i> <i>aus B. subtilis</i>	Church
pC11	4580	<i>pBlue2 KS⁻-Δ(trpE)</i>	diese Arbeit
pC12	7290	<i>pKO3-Δ(trpE)</i>	diese Arbeit

pC14	6885	pJF119EH1-trpE ^{H398M}	diese Arbeit
pC26	5934	pJF119EH1-phzD	DSM BIOTECH ¹⁶²
pC27	7832	pF113-phzD-phzE	DSM BIOTECH
pC30	7532	pJF119EH1-trpE ^{H398M} -phzD	DSM BIOTECH

Stammhaltung

Zur Stammhaltung werden *E. coli*-Zellen bis zur mittellogarithmischen Phase (OD 2.5) angezogen. Die Zellsuspension wird mit gleichem Volumen einer 87 %igen Glycerinlösung versetzt und die Mischung bei –80 °C gelagert. Für Zeiträume von bis 4 Wochen werden die *E. coli*-Kulturen auf Agarplatten bei 4 °C aufbewahrt.

5.1.2 Verwendete Medien und Chemikalien

Chemikalein wurden, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen ALDRICH, FLUKA und MERCK in p.a.-Qualität bezogen.

Zur Kultivierung der *E. coli*-Stämme werden die folgenden Mineralsalzmedien verwendet:

LB-Medium (Luria-Bertani-Medium, nach Sambrook *et al.*)¹⁶³

Das LB-Medium enthält: 10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 5 g Natriumchlorid, H₂O_{dem.} ad 1 L.

Zur Herstellung von Kultivierungsplatten werden 15 g Agar zugegeben.

SOC-Medium (nach Gassen *et al.*)¹⁶⁴

Das SOC-Medium enthält: 1 g Hefeextrakt, 2 g Trypton, 58.4 g NaCl, 18.6 g KCl, 97 mL H₂O. Nach dem Autoklavieren werden 1 mL MgCl₂-Lösung (1 M), 1 mL MgSO₄-Lösung (1 M) und 1 mL Glucose-Lösung (2 M) steril zugegeben.

Minimalmedium (MM) (nach Tanaka *et al.*)

Das Mineralsalzmedium A wird aus mehreren vorgefertigten Einzellösungen hergestellt.

Lösung A besteht aus: 53.13 g NaH₂PO₄·2H₂O (oder 46.99 g NaH₂PO₄·1H₂O), 150.6 g K₂HPO₄·3H₂O (oder 115 g K₂HPO₄), 26.4 g (NH₄)₂SO₄, H₂O_{dem.} ad 1 L.

Lösung B besteht aus: 7.4 g MgSO₄·7H₂O, 147 mg CaCl₂·2H₂O, 13.5 mg ZnCl₂, 28 mg FeSO₄·7H₂O, 1 mL HCl, H₂O_{dem.} ad 1 L.

Für 100 mL Medium werden 87 mL H₂O_{dem.} mit 1 mL der Lösung B autoklaviert und anschließend 10 mL Lösung A, sowie 1 mL 20 %ige (w/v) Glucoselösung und 1 mL Thiaminlösung (Konz. 10 mg/mL) steril zugegeben.

In den Fällen, in denen weitere Medienbestandteile notwendig sind (z. B. Aminosäuren, Antibiotika) werden diese ebenfalls in Lösung steril zugegeben. Das Volumen des zu Lösung B gegebenen Wassers wird in diesen Ansätzen entsprechend reduziert.

Zur Herstellung von Kultivierungsplatten werden 1.5 % (w/v) Agar hinzugegeben.

Kohlenstoffquellen, Aminosäuren, Antibiotika, Induktoren

Falls nicht anders angegeben enthalten Stammlösungen folgende Konzentrationen:

Glucose	20 % (w/v)	(10 x)
Thiamin (Vit. B1)	10 mg/mL	(10 x)
Tyrosin	4 mg/mL	(10 x)
Tryptophan	4 mg/mL	(10 x)
Ampicillin	10 mg/mL	(100 x)
Chloramphenicol	2.5 mg/mL (in 50 %iger Ethanollösung)	(100 x)
IPTG	23.8 mg/mL	(100 mM)

Alle Lösungen werden solange nicht anders angegeben durch Filtration sterilisiert.

5.1.3 Allgemeine molekularbiologische Arbeitstechniken

Standardtechniken für das Arbeiten mit Nukleinsäuren

Alle molekularbiologischen Arbeiten werden in sterilen Gefäßen durchgeführt. Die Auftrennung und Größenbestimmung sowie die Grobabschätzung der DNA-Konzentrationen erfolgt durch elektrophoretische Auftrennung in 0.8 % (w/v) Agarosegel in 1 x TAE-Puffer (40 mM Tris-HCL, 20 mM Essigsäure, 1 mM EDTA [pH 8]). Ethidiumbromid dient als Färbereagenz. Als molekularer Größenmarker wird der GeneRuler™ (1000 bp Leitermarker) der Firma MBI FERMENTAS verwendet.

Isolierung von Plasmid-DNA und chromosomaler DNA aus *E. coli*

Plasmid-DNA wird unter Verwendung eines „QIAPrep Spin Miniprep Kit“ oder des „QIAGEN Plasmid Midi Kit“ der Firma QIAGEN nach Herstellerangaben isoliert. Genomische DNA des *E. coli*-Stammes LJ110 wird unter Verwendung von „Genomic-tip 500“-Säulen der Firma QIAGEN nach Herstellerangaben gereinigt.

Restriktionsanalyse

Restriktionen von Plasmid-DNA erfolgt mit Enzymen der Firmen ROCHE, PROMEGA und NEW ENGLAND BIOLABS nach Herstellerangaben. Die Restriktionsansätze umfassen, wenn nicht anders angegeben, ein Volumen von 10 μL . Für einen Restriktionsansatz werden ca. 1 μg DNA eingesetzt. Die Menge an eingesetztem Enzym beträgt 2-5 U μg^{-1} DNA. Der Ansatz wird soweit nicht anders angegeben 2 h bei 37 °C inkubiert. Nach Auftrennung durch Agarosegel-Elektrophorese wird die korrekte Insertion anhand des charakteristischen Fragmentierungsmusters verifiziert.

Reinigung von PCR- und Restriktionsansätzen

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wird mit dem „QIAquick Gel Extraction Kit“ der Firma QIAGEN nach Herstellerangaben durchgeführt.

Transformation von *E. coli*

Für die Transformation von *E. coli* Zellen mit Plasmid-DNA werden zwei unterschiedliche Methoden angewandt. Falls nicht anders angegeben werden kompetente Zellen nach der Rubidiumchlorid-Methode¹⁶⁵ hergestellt und sofort verwendet. Zur Transformation von 200 μL Suspension kompetenter Zellen werden ca. 250 ng DNA verwendet. Ein entsprechender Ansatz wird für 30 min auf Eis inkubiert und anschließend für 2 min auf 42 °C erhitzt. Nach dem Hitzeschritt werden die Zellen in 800 μL LB-Medium resuspendiert, für 60 min bei 37 °C inkubiert, geerntet und in 200 μL LB-Medium resuspendiert. Je 20 und 180 μL der Zellsuspension werden auf entsprechenden Agarplatten ausgestrichen und über Nacht kultiviert.

Für eine Transformation durch Elektroporation werden *E. coli*-Zellen in der logarithmischen Phase ($\text{OD} = 0.4 - 0.7$) geerntet und durch mehrfache Resuspendierung in eiskaltem $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ gewaschen. Anschließend werden die Zellen in 10 %iger Glycerinlösung ($\frac{1}{100}$ des ursprünglichen Volumens) resuspendiert und in 40 μL Portionen aliquotiert. Die Zellen können bei Bedarf über mehrere Monate bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert werden. Zur Transformation werden 40 μL der Zellsuspension mit 10 - 100 ng DNA versetzt, 2 - 5 min auf Eis inkubiert und bei einer Spannung von 2.5 kV (200 Ω , 25 μFd) elektroporiert. Anschließend werden die Zellen in 1 mL SOC-Medium aufgenommen, 2 h bei 30 °C inkubiert, geerntet und in 200 μL LB-Medium resuspendiert. Je 20 und 180 μL der Zellsuspension werden auf entsprechenden Agarplatten ausgestrichen und über Nacht kultiviert.

DNA-Ligation

Ligationen von DNA-Fragmenten erfolgt mit dem „rapid ligation kit“ der Firma ROCHE über einen Zeitraum von 14 h bei 16 °C mit T4-DNA-Ligase. Dabei wird die 3-fache Menge an DNA-Fragment im Verhältnis zum Vektor eingesetzt. Die Phosphorylierung von DNA-Fragmenten wird falls notwendig mit Hilfe der Polynukleotid-Kinase 3'-phosphatasefrei der Firma BOEHRINGER MANNHEIM nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten wird falls nötig mit Hilfe der alkalischen Shrimp Phosphatase der Firma BOEHRINGER MANNHEIM ebenfalls nach Herstellerangaben durchgeführt.

DNA-Sequenzierung

Die Kontrollsequenzierung des Gens *trpE* auf dem Plasmid pJF119EH-trpE erfolgt nach der Didesoxynukleotid-Terminationsmethode von Sanger *et al.*¹⁶⁶ Die Sequenzierungsreaktionen werden mit einem „AutoRead Sequencing Kit“ der Firma PHARMACIA durchgeführt. Es werden die für den Vektor pJF119EH1 passenden Primer verwendet. Die Reaktionsansätze werden nach Denaturierung in einem Polyacrylamid-Gel „Long Ranger Single from Pharmacia“ der Firma BIOZYM DIAGNOSTIK mit einem LI-COR 4200 DNA-Sequenziergerät der Firma MWG BIOTECH analysiert. Die Sequenz wurde mit Hilfe des Programms „Data Collection Modell 4200 Single Dye DEV7“ Version 4.1 der Firma MWG BIOTECH aufgezeichnet und mit Hilfe des Programms „Image Analysis“, Version 4.1 der Firma MWG BIOTECH ausgewertet.

Eine DNA-Doppelstrang-Sequenzierung des Plasmids pC14 wurde von der Firma AGOWA durchgeführt (Auftragsnummer: 810-243).

5.1.4 Klonierung von F67 (Deletion von *trpE* im *E. coli*-Stamm LJ110)

Allgemeine Vorgehensweise

Die Deletion des chromosomalen *trpE*-Gens wurde nach einer Methode von Church *et al.* durchgeführt. Diese Vorgehensweise ermöglicht eine präzise Deletion unter Verwendung eines speziellen Austauschvektors (pKO3). Dabei wird mit Hilfe einer *crossover*-PCR ein DNA-Fragment konstruiert, welches die flankierende Sequenz des zu deletierenden Gens enthält, bei dem aber das Gen selbst gegen eine kurze Ersatzsequenz ausgetauscht ist. Dieses Fragment wird in den Vektor pKO3 kloniert und mit Hilfe dessen phänotypischer Eigenschaften wie Temperatur- und Saccharose Sensitivität sowie Chloramphenicolresistenz gegen das zu deletierende chromosomale Gen ausgetauscht.

Darstellung des *ΔtrpE*-Fragments

Das *crossover*-PCR-Produkt wird in zwei Schritten konstruiert (siehe Abbildung 3.14). Im ersten Schritt werden mit Hilfe der Primer P1 und P2 bzw. P3 und P4 zwei PCR-Produkte (PCR1 und PCR2) generiert, die die DNA-Sequenz links und rechts der chromosomalen *trpE*-Sequenz von LJ110 darstellen. Im zweiten Schritt werden die beiden Fragmente, über die in den Primern P2 und P3 enthaltene Ersatzsequenz, verschmolzen und durch eine weitere PCR gemeinsam amplifiziert (PCR3).

Die in den PCR verwendeten Oligonukleotid-Primer wurden von der Firma MWG BIOTECH synthetisiert. Diese werden als salzfreie Proben ohne weitere Reinigung eingesetzt. Die Sequenz der Primer P1 – P4 sind in der Tabelle 5.3 aufgeführt.

Die DNA-Amplifikation wird unter Verwendung eines „*Pwo* DNA Polymerase Kit“ der Firma ROCHE DIAGNOSTICS in einem Thermocycler „Peltier Thermal Cycler PTC 200“ der Firma MJ RESEARCH nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Das Synthesevolumen beträgt 50 μL . Die eingesetzte Konzentration an chromosomaler DNA (*E. coli*-Stamm LJ110) beträgt 0.1 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$. Es werden 0.6 $\text{pmol}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ der verwendeten Primer eingesetzt.

Tabelle 5.3: Primer für die *crossover* PCR zur Deletion von *trpE*. (Die Ersatzsequenz ist in Kleinbuchstaben dargestellt, eingebaute *Bam*HI-Schnittstellen sind fett geschrieben).

Name	Sequenz 5' → 3'	T _m [°C]	eingefügte Schnittstelle
P 1	ATG GAT CCT GCT GCC GT	59.4	<i>Bam</i> HI
P 2	ggt ata aat ttg gag ggt tat tgc gtg TGA TGG CTG ACA TTC TGC TGC	74.7	
P 3	cac gca ata acc ttc aca ctc caa att tat aac CAT TGT TAT TCT CTA ATT TTG TTC	71.8	
P 4	AAG GAT CCG CGC AAA ATG ACC	59.8	<i>Bam</i> HI

Die Reaktionsmischung wird einem anfänglichen Denaturierungsschritt (94 °C) von 2 min unterworfen, gefolgt von 12 Zyklen von: 15 sec Denaturieren (94 °C), 15 sec Anlagern (56 °C), 1 min Prolongieren (72 °C). Es schließen sich weitere 15 Zyklen an von: 15 sec Denaturieren (94 °C), 15 sec Anlagern (56 °C) und 1 min (+ 5 sec pro Zyklus) Prolongieren

(72 °C). Danach wird die Temperatur für weitere 7 min bei 72 °C gehalten ehe zum Ende der Reaktion auf 4 °C gekühlt wird.

Die Produkte PCR1 und PCR2 werden mittels Agarosegel-Elektrophorese von auftretenden Nebenprodukten getrennt und aus dem Gel extrahiert. Die PCR-Produkte PCR1 und PCR2 werden durch einfaches Mischen der isolierten DNA über die Ersatzsequenz miteinander verbunden und sofort in einer dritten PCR mit analoger Temperaturführung amplifiziert. Das erhaltene Produkt PCR3 wird durch Agarosegel-Elektrophorese und anschließende Extraktion gereinigt.

Klonierung von pC11 und pC12

Ehe das *ΔtrpE*-DNA-Fragment in den pKO3-Vektor kloniert werden wird eine Zwischenklonierung in einen pBlue2KS⁻-Vektor vorgenommen, um einen erleichterten Zugang zur *ΔtrpE*-DNA zu ermöglichen. Dazu wird der mit *EcoRV* linearisierte (blunt end) und anschließend dephosphorylierte Vektor zusammen mit dem phosphorylierten Produkt PCR3 ligiert. Nach Transformation in DH5α können auf LB-Platten, denen X-Gal zugesetzt wurde (zu 100 mL LB-Medium werden nach dem autoklavieren 1.33 mL einer 4 %igen (w/v) X-Gal-Lösung in DMF sowie 0.33 mL einer 100 mM IPTG-Lösung steril zugegeben), durch Farbindikation die Kolonien identifiziert werden, bei denen eine Insertion des *ΔtrpE*-DNA-Fragments stattgefunden hat. Durch Restriktion des Vektors und anschließende gelelektrophoretische Reinigung kann das konstruierte DNA-Stück mit Hilfe der eingebauten *Bam*HI-Schnittstellen leicht in größeren Mengen gewonnen werden.

Zur Klonierung der so gewonnenen DNA in einen pKO3-Vektor wird dieser mit *Bam*HI linearisiert, dephosphoryliert und gemeinsam mit *ΔtrpE* ligiert. Potentielle Kolonien werden durch Restriktionsanalyse mit *Bam*HI auf Insertion überprüft. Plasmid-DNA wird im folgenden von positiv getesteten Ansätzen isoliert (pC12).

Austausch des chromosomalen Gens *trpE* gegen das *ΔtrpE*-Fragment in LJ110

Zum Austausch des chromosomalen *trpE*-Gens in LJ110 gegen das konstruierte *ΔtrpE*-Fragment wird zunächst pC12 in LJ110 durch Elektroporation transformiert und der Transformationsansatz 24 h auf LB+Cm-Agarplatten bei 43 °C inkubiert. Dabei ist zu beachten, dass die Temperatur bei der Inkubation in SOC-Medium nach der Elektroporation 30 °C beträgt. Einzelne Kolonien werden gepickt, in 1 mL LB resuspendiert, seriell $\frac{1}{10}$ - $\frac{1}{10.000}$ verdünnt, auf LB+5% Saccharose-Agarplatten ausplattiert und bei 30 °C für 24 h

inkubiert. Insgesamt werden ca. 700 Kolonien gepickt und auf MM-Agarplatten phänotypisch auf Verlust der *trpE*-Funktion getestet. Es können zwei Klone identifiziert werden, die auf Mineralsalzmedium nicht wachsen, bei Supplementierung von Tryptophan jedoch wachsen. Eine Kontroll PCR des chromosomalen Bereiches von *trpE* zeigt, dass mit F67 ein etwa 1.6 kb kleineres PCR-Produkt erhalten wird als mit LJ110, was der Größe von *trpE* entspricht. Für die Kontroll PCR werden die Primer TrpE-Kontrolle-A (5'-cca cgc aag cgg gtg agg-3') und TrpE-Kontrolle-B (5'-gct caa ggc gca ctc ccg-3') eingesetzt, die von der Firma MWG BIOTECH synthetisiert wurden.

5.1.5 Klonierung von pC14

In der Aminosäuresequenz des *trpE*-Gens des Vektors pJF119EH-*trpE* wird durch Austausch von drei Basenpaaren eine ortsgerichtete Mutation durchgeführt. Dabei wird die Sequenz für Histidin398 (kodiert durch *cac*) gegen ein Methioninkodon (*atg*) ausgetauscht. Die Mutation erfolgt mit Hilfe eines „Site-Directed Mutagenesis Kit“ der Firma STRATAGENE nach Angaben des Herstellers.

Die verwendeten Primer sind in Tabelle 5.4 dargestellt und wurden von der Firma MWG BIOTECH synthetisiert.

Tabelle 5.4: Primer für die ortsgerichtete Mutagenese in *trpE*. (Eingebaute Mutationen sind fett dargestellt.)

Name	Sequenz 5' → 3'	T _m [°C]
TrpE-H398M-A	CCG TTA TTC CTA TGT GAT GAT GCT CGT CTC TCG CGT AGT CGG	79.8
TrpE-H398M-B	CCG ACT ACG CGA GAG ACG AGC ATC ATC ACA TAG GAA TAA CGG	79.8

PCR-Ansätze zur Amplifizierung des mutierten Vektors werden zunächst 30 sec bei 95 °C denaturiert und anschließend 16 mal einem Zyklus aus 30 sec Denaturieren (95 °C), 1 min Anlagern (55 °C) und 14 min Prolongieren (68 °C) unterworfen. Nach Beendigung der Reaktion wird auf 4 °C gekühlt. Als DNA-Polymerase wird die im Kit enthaltene *PfuTurbo*-Polymerase eingesetzt.

Anhand einer Farbindikation des Kontrollansatzes mit pWhitescript kann auf eine Mutationsquote von ca. 94 % geschlossen werden. Eine der erhaltenen Kolonien wird zur

Experimenteller Teil

Isolierung der Plasmid-DNA von pC14 verwendet. Die erfolgreiche Mutation wird durch Doppelstrangsequenzierung (Firma AGOWA, Auftragsnummer 810-243) belegt.

Sequenzierung *trpE*^{H398M} in pC14:

```
1      CTGTATCAGG CTGAAAATCT TCTCTCATCC GCCAAAACAG CCAAGCTTAT CGAGCAGCAG
61     AATGTACAGC ATCAGAAAGT CTCCTGTGCA TGATGCGCGG TGGCAATAGC GCGCAGTACA
121    GCGCGGGCTT TGTTACGGGT TTCGTCGGCT TCCGACTGCG GAACAGAATC AAGGACTACA
181    CCAGCACCCG CTTGCACGGT GCGGATACCG TTTTCCACCA GCGCCGAGCG GATCACAATG
241    CAGGTGTCGA GATCGCCATG CGCGGTGAAA TAACCTACCG CGCCGCCGTA GCTGCCGCGG
301    CGACGACCTT CCGCCTCGGC AATTAAGTGC ATAGCGCGTA CTTTCGGCGC ACCGCTTAAC
361    GTCCCCATAT TCATACAGGC GCGATAAGCG TGCAGGGCGT CAAGATCGTG ACGCAGTTCG
421    CCGACTACGC GAGAGACGAG CATCATCACA TAGGAATAAC GGTCAACTTT GGTGAGATCG
481    GCGACGTAGC GGCTGCCGGG GGTGCAAATG CGTGCCAGAT CATTACGGGC GAGATCAACC
541    AGCATCAGAT GTTCAGACAG CTCTTTATGA TCGGTACGCA TTTCCAGTTC AATACGGCTG
601    TCGAGATCTC TGTCCAGTGA ACCATCGGCG CGACGACCGC GTGGGCGTGT TCCGGCAATC
661    GGGTAGATCT CAATCTGGCG GCTGGTGGCA TCATACTTGA GCGAGCTTTC CGGCGACGCG
721    CCAAATAGGG TGAAATCATT ATCCTGCATA AAAAACATGT ACGGGCTGGG ATTACTCTTT
781    TTCAGACAGT AATAGGCCGC CAGCGGTGAC GGGCAGGGCA GAGAGAAACG GCGAGATGGC
841    ACCACCTGGA AAATTTCTCC AGCGCGAATC GCTTTTGTGA ACAAACGCAC TACGCCACCG
901    AACTCTTCAT CGCTCTGATT ACATTCACAA CGCATATGCG GCACGGAAAC CACTGGCAGC
961    GGCGGCGCGG CTTTCGGTCAG TTGCTGACGT AGTTCGTTCA GGCGAGCAGT GAGACGTTGT
1021   TTTTCTTCTT CATTTCGAGC AAACAGGCTG GCCTGAATAC GGGTGCTTTT TTTCTGATGG
1081   TCAATCACCA TCAGCGTTTC AGCGAGATAA AAACAGAAAT CAGGGCAGTT ATTTTCCGCT
1141   GACAGTTGCG GTAAATCTTC AAATCCCGCC ACAAGGTCAT AAGAGAACAG GCCGCCGAAG
1201   AACATGGCTT CTCGTCTTTC CTTTCGGTACA TTCAACAGAT TCTGCAATAA ACGGAAAGCG
1261   TCAAAAACCG AAAGGGAGCA TAAGCGGGCG TCTTCATCCA GCAGTGGACT GACAGGGGGG
1321   AAGCGCAGCA CACGGCAGTT TGGTGATTGT TCACTTTCCA CACCCGCAGG CAGGGCGTTA
1381   TCCAGTAGTG CCAGGAGGGC TTCGCCGTTG CCGGAAAGTG CCTGGATTGT GACAGTGTC
1441   CCTAAAGCTG TAATGCGCAG CGCACTGTCT ACCAGCAGCA GGCTTTTTAA ATCATCTTTG
1501   CTGTCGATAT CTGCGGATTC CAGCAGCAGC GTTGCCGGAC GATCCCCACA CAACTGGTGA
1561   AAAAGCGCGG TGGGATTGTC GCGATAAGCG CCTTCGCAGG TTAGCAGTTC GAGAGTCGGT
1621   TTTTGTGTTT GCATGTTAT TCTCTAATTT TGTTCAAAAA AAAGCCCGCT CATTAGGCGG
1681   GCTGGGTATC TG
```

Komplementierung von F67 mit pC14

Durch Transformation von pC14 in F67 wird das Komplementierungspotenzial von *trpE*^{H398M} für die in F67 vorhandene Deletion von *trpE* untersucht. Dazu wird F67/pC14 auf MM-, LB- und MM+Trp-Agarplatten ausplattiert und bei 37 °C kultiviert. Nach 24 h ist auf den LB-

114

und MM+Trp-Platten deutliches Zellwachstum zu erkennen, während auf MM-Platten kein Zellwachstum sichtbar ist. Erst nach weiteren 48 h Kultivierung bei 37 °C ist auf MM-Agarplatten ebenfalls in geringem Maße Zellwachstum zu erkennen.

5.2 Untersuchungen zur mikrobiellen Produktion und Produktgewinnung

5.2.1 Allgemeine Arbeitstechniken

Herstellung von zellfreiem Extrakt

Zur Herstellung einer zellfreien Proteinlösung einer *E. coli*-Kultur werden 1 mL einer Vorkultur aus 5 mL LB-Medium (kultiviert für 16 h bei 37 °C und 150 rpm) als Inokulum für 100 mL LB-Medium verwendet, die in einem 500 mL Kolben mit Schikane bei 37 °C und 150 rpm kultiviert werden. Bei einer OD $\approx$ 1 (nach ca. 2.5 - 3.5 h) wird mit 1 mL einer IPTG-Lösung (100 mM) induziert und bis zu einer Gesamtkultivierungszeit von 8 h weiter inkubiert. Anschließend werden die Zellen durch Zentrifugation geerntet (20 min, 5000 g, 4 °C), in 1 mL 0.7 %iger NaCl-Lösung resuspendiert und aufgeschlossen. Der Zellaufschluss erfolgt mit Ultraschall in einem „Sonifier 250“ der Firma BANSON bei 20 % Arbeitszyklus und Beschallungsstufe 2 über einen Zeitraum von 6 x 30 sec mit jeweils 30 sec Pause unter Eiskühlung. Zur Entfernung der Zellbruchstücke wird das Zellhomogenat für 20 min zentrifugiert (19 000 g, 4 °C) und die Proteinlösung abpipettiert. Der Überstand kann für 1 - 2 Tage bei 4 °C gelagert werden.

Konzentrationsbestimmungen von Protein-Lösungen

Die Proteinkonzentration von zellfreien Extrakten oder anderen Proteinlösungen werden nach der Methode von Bradford¹⁶⁷ bei einer Wellenlänge von 595 nm bestimmt. Die Kalibrierung der Bradford-Lösung erfolgt mit BSA-Standardlösungen (25 - 100 $\mu\text{g L}^{-1}$).

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur elektrophoretischen Auftrennung von Proteinlösungen wird die Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Lämmli¹⁶⁸ angewandt. Dabei wird Proteinlösung mit einem Gesamtproteingehalt von 20 oder 40 μg (bestimmt nach Bradford) mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dem}}$ auf ein

Volumen von 10 bzw. 20 μL gebracht und mit dem gleichen Volumen SDS-Probenpuffer (120 mM Tris-HCl, pH 6.8, 20 % [v/v] Glycerin, 6 % [w/v] SDS, 10 % β -Mercaptoethanol, 50 ppm [w/v] Bromphenolblau) versetzt. Die Proben werden für 6 min bei 98 °C denaturiert und auf ein 4 %iges Polyacrylamid-Sammelgel mit sofort anschließendem 10 %igen Trenngel aufgetragen und in einer „Protean Mini Cell“ der Firma BIORAD elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wird das Gel mit Coomassie Brilliantblau R-250 der Firma SERVA ELECTROPHORESIS nach Herstellerangaben gefärbt. Als Molekulargewichtsstandard werden sowohl ein „High-Range-Marker“ (39.2 - 200 kDa) als auch ein „Low-Range-Marker“ (14.4 - 97.4 kDa) der Firma SIGMA je nach Bedarf eingesetzt.

5.2.2 Verwendete Analytik

Die Identifizierung von Metaboliten wird, falls nicht anders angegeben, durch HPLC-Messungen und Vergleich der Retentionszeiten und UV-Spektren durchgeführt. Dafür werden die Kultivierungsüberstände zunächst zentrifugiert (10 min, 5000 g, 4 °C) ehe sie chromatographisch aufgetrennt werden. Dabei kommt das HPLC-System „HP Series 1100“ der Firma HEWLETT PACKARD in Kombination mit einer Lichrospher® C8 Chromatographiesäule (25 cm x 3 mm, 5 μm Korngröße) der Firma CS CHROMATOGRAPHIE SERVICE zum Einsatz. Als Vorsäule wird eine Lichrospher® 100 RP-8-5EC Säule (20 mm x 3 mm, 5 μm Partikelgröße) der Firma CS CHROMATOGRAPHIE SERVICE verwendet. Die Säulentemperatur beträgt 23 °C. Die Metabolite werden über einen Photodiodenarraydetektor (DAD) detektiert und falls möglich durch Integration der Peaks bei $\lambda = 275 \text{ nm}$ quantifiziert. Das Injektionsvolumen der angewandten Elutionsmethode beträgt 5 μL . Bei einer konstanten Flussrate von 0.45 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ besteht die mobile Phase bei Injektion aus einer 0.1 %igen wässrigen Trifluoressigsäurelösung. Nach 5 min wird Methanol bis zu einem Anteil von 64 % und bis $t = 30 \text{ min}$ über einen linearen Gradienten zugegeben. Die mobile Phase bleibt bis $t = 35 \text{ min}$ unverändert auf 64 % Methanol, ehe sie dann innerhalb 1 min zurück auf 100 % Wasser (mit 0.1 % Trifluoressigsäure) gefahren wird und diese bis zum Methodenende bei $t = 37 \text{ min}$ unverändert bleibt. Nach jedem Lauf wird die Säule für 10 min mit 0.1 %iger Trifluoressigsäure gespült ehe weitere Messungen gestartet werden.

5.2.3 Untersuchungen zur Produktion von ADIC und 2,3-*trans*-CHA

Überexpression von TrpE, TrpE^{H398M} und PhzD

Frisch transformierte Zellen DH5 α /pJF119EH-trpE, DH5 α /pC14 und DH5 α /pC30 werden bis zu einer OD von 0.4 - 0.5 kultiviert, IPTG-Lösung wird bis zu einer Gesamtkonzentration von 0.1 mM zugegeben und es wird für weitere 4 h bei 37 °C inkubiert. Von den Suspensionen wird eine zellfreie Lösung hergestellt, die durch SDS-PAGE auf gebildetes lösliches Protein untersucht wird. In den Ansätzen mit pJF119EH-trpE und pC14 tritt eine verstärkte Proteinbande mit einer Größe von etwa 57.5 kDa auf, die in entsprechenden Negativkontrollen (DH5 α und DH5 α /pJF119EH1) nicht zu finden sind. Die Größe der überexprimierten Proteine entspricht der Größe von TrpE und TrpE^{H398M} (je 1563 bp, 521 AS). Das Expressionslevel der beiden Proteine ist vergleichbar. Auf eine Überexpression von PhzD durch pC30 kann anhand des Gels nicht geschlossen werden. Allerdings ist aufgrund der deutlich geringeren Größe von PhzD eine Detektion erschwert.

Bestimmung der Enzymaktivität von Zellrohextrakt von DH5 α /pJF119EH-trpE

Die Aktivität des Zellrohextraktes wurde spektrophotometrisch in einem gekoppelten Enzymassay bestimmt. Es wird Chorismat zu Anthranilat umgesetzt und das bei der Reaktion frei werdende Pyruvat durch NADH-abhängige Lactatdehydrogenase zum Lactat reduziert. Dabei wird die Abnahme der UV-Absorption bei $\lambda = 340$ nm gemessen, die durch die Umsetzung von NADH zu NAD⁺ entsteht. Eine Reaktionslösung besteht aus Tricin-Puffer (50 mM, pH 8), MgCl₂ (10 mM), Ammoniumsulfat (50 mM), NADH (0.2 mM), Lactatdehydrogenase (0.02 mg·mL⁻¹, Aktivität = 550 U·mg⁻¹), Chorismat (0.1 mM) und 20 μ L zellfreie Proteinlösung (Proteinkonz. = 1.77 mg·mL⁻¹). Es wurde eine Aktivität von 4 U·mL⁻¹ ermittelt. In einem Vergleichsansatz mit DH5 α /pJF119EH konnte keine Aktivität festgestellt werden.

In vitro Experimente zur Bildung von ADIC (16) und 2,3-*trans*-CHA (2)

Die Proteinlösungen von DH5 α /pC14 und DH5 α /pC30 werden verwendet um die *in vitro* Bildung von ADIC (16) und 2,3-*trans*-CHA (2) nachzuweisen. Für die *in vitro*-Assays werden 2 μ L (entspricht ca. 7 μ g Proteingesamtmenge) der jeweiligen Proteinlösung, 20 μ L Tricin-Puffer (0.5 M, pH 8), 20 μ L MgCl₂-Lösung (100 mM), 20 μ L (NH₄)₂SO₄ (0.5 M), 5 μ L Chorismatlösung (100 mM) und 133 μ L H₂O_{Bidest.} eingesetzt. Die Reaktionslösung wird für 18 h bei 30 °C geschüttelt und es werden mehrere Proben für HPLC-Messungen entnommen.

Im Falle des Ansatzes mit pC14 bildet sich neben dem aromatischen Zerfallsprodukt von Chorismat ein neues Produkt, das bei der verwendeten HPLC-Methode mit einer Retentionszeit von 21.1 min eluiert wird. Anhand des UV-Spektrums und durch Koinjektion von enzymatisch hergestelltem **16** kann das Produkt als dieses identifiziert werden.

Im Falle des Ansatzes mit pC30 bildet sich neben einer aromatischen Verbindung ein neues Produkt, das bei der verwendeten HPLC-Methode mit einer Retentionszeit von 4.5 min eluiert wird. Anhand des UV-Spektrums und durch Koinjektion von synthetisch dargestelltem *rac*-2,3-*trans*-CHA (*rac*-**2**) kann das Produkt als **2** identifiziert werden. In einem Kontrollexperiment mit DH5 α /pJF119EH1 wird weder **16** noch **2** detektiert.

***In vivo* Experimente zur Produktion von 2,3-*trans*-CHA (2)**

Frisch transformierte Zellen F4/pC30 werden in 100 mL LB-Medium mit 100 μ L der IPTG-Stammlösung bis zu einer OD $\approx$ 1.6 bei 37 °C kultiviert, bei 4 °C geerntet (10 min, 5000 g) und in 100 mL eines Produktionsmediums, bestehend aus Minimalmedium mit MgCl₂- (10 mM), Ampicillin- (0.1 mg·mL⁻¹), (NH₄)₂SO₄- (100 mM) und IPTG-Zusatz (0.1 mM), resuspendiert. Die Zellsuspension wird für weitere 24 h bei 37 °C kultiviert und stündlich werden Proben für HPLC-Messungen entnommen. Die Untersuchung der nach 3 h entnommenen Probe zeigt erstmals die Bildung einer Substanz mit einer Retentionszeit von 4.5 min, das in den folgenden Proben bis zum Ende des Experiments nach 24 h an Intensität zunimmt. Der Peak bei 4.5 min kann durch Koinjektion von *rac*-**2** und einer Überlagerung der UV-Spektren als **2** identifiziert werden. Die Konzentration liegt nach 24 h bei 1.2 mg·L⁻¹.

5.2.4 Isolierung von Metaboliten aus Fermentationsüberständen von *E. coli*

Isolierung von 2,3-*trans*-CHD (3)

Die Isolierung von 2,3-*trans*-CHD (**3**) aus zellfreien *E. coli*-Fermentationsüberständen wird unter Anwendung von Ionenaustauschchromatographie durchgeführt. Für einen typischen Reinigungszyklus werden 2 kg des DOWEX®-Harz 1x8 (Cl⁻, 100 - 200 mesh) in eine INdEX-Säule 100 (Innendurchmesser 10 cm, max. Bettvolumen 3.5 L) der Firma AMERSHAM PHARMACIA gefüllt. Die Säulenfüllung wird mit 50 L K₂HPO₄-Lösung (50 mM, pH 8) equilibriert und 8 L zellfreier Kultivierungsüberstand mit einer Konzentration von 4.5 g·L⁻¹

werden mit einer Flussrate von $100 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ aufgetragen. Elution erfolgt mit 50 mM Ameisensäure bei einer Flussrate von $60 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. Die UV-Absorption der Elutionslösung wird über einen UV/Vis-Durchflussdetektor der Firma KNAUER bei einer Wellenlänge von 280 nm kontinuierlich gemessen und aufgezeichnet. Die Elutionslösung wird fraktioniert gesammelt und zur Kontrolle nochmals durch HPLC-Messungen auf **3** untersucht. Produkt enthaltende Elutionslösung (ca. $8 - 12 \text{ L}$) lässt sich außerdem anhand einer signifikanten UV-Absorption bei $\lambda = 280 \text{ nm}$ detektieren. Das produktthaltige Eluat wird bei maximal $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$ im Vakuum auf etwa $\frac{1}{8}$ des ursprünglichen Volumens eingeengt. Da **3** zur Dimerisierung neigt ist darauf zu achten, dass die Lösung nicht länger als notwendig einer erhöhten Temperatur ausgesetzt ist und dass es nicht zu einer weiteren Aufkonzentration der Lösung unter diesen Bedingungen kommt. Die Lösung wird mit einer Lyovac GT 20 der Firma LEYBOLD-HERAEUS bei $5 \cdot 10^{-2} \text{ mbar}$ bis zur Trockene lyophilisiert. Pro Reinigungszyklus werden ca. 27 g **3** ($73 \text{ } \%$ isolierte Ausbeute) in Form eines hellbraunen, hygroskopischen Pulvers erhalten. ^1H -NMR-Untersuchungen des Produktes zeigen eine Reinheit von $96 \text{ } \%$, allerdings deuten weiterführende synthetische Arbeiten auf einen geringeren Reinheitsgrad hin, der ggf. auf Salzreste zurückzuführen ist, die weder durch NMR- noch durch HPLC-Messungen detektiert werden können.¹⁶⁹

Das Ionentauscherharz kann nach Regeneration mit 2 M NaCl-Lösung erneut verwendet werden. Eine Langzeitlagerung der Säulenfüllung ohne bakteriellen Bewuchs kann unter Verwendung einer $50 \text{ } \%$ igen Ethanollösung erfolgen.

Analytische Daten für 2,3-*trans*-CHD (**3**)

^1H -NMR ($[\text{D}_4]\text{-MeOH}$): $\delta = 4.10 \text{ (d, } J = 2.5 \text{ Hz, } 1 \text{ H)}$, $4.50 \text{ (d, } J = 2.5 \text{ Hz, } 1 \text{ H)}$, $6.20 \text{ (m, } 2 \text{ H)}$, $7.06 \text{ (dd, } J = 3.3, 3.2 \text{ Hz, } 1 \text{ H)}$.

^{13}C -NMR ($[\text{D}_4]\text{-MeOH}$): $\delta = 68.8 \text{ (CH)}$, 70.4 (CH) , 125.1 (CH) , 130.8 (CH) , 134.3 (CH) , $134.4 \text{ (C}_q\text{)}$, 170.2 (C=O) .

MS (EI): $m/z \text{ (}\% \text{)} = 156 \text{ (6) } [\text{M}]^+$, $138 \text{ (100) } [\text{M} - \text{H}_2\text{O}]^+$, 110 (63) , 93 (10) , 82 (29) , 65 (13) .

HR-MS: berechnet: 156.0423 , gefunden: 156.0424

Drehwert: $[\alpha]_D^{20} = + 3.8$ (in EtOH, $c = 0.6$)
(Lit: $[\alpha]_D^{20} = + 3.89$, $c = 0.1$, H₂O)

C₇H₈O₄ 156.14

Isolierung von Chorismat (1)

Die Isolierung von Chorismat (1) aus zellfreien *E. coli*-Fermentationsüberständen (Chorismatproduzenten auf Basis eines gentechnisch veränderten *E.coli*-Stammes) wird unter Anwendung von Ionenaustauschchromatographie durchgeführt. Für einen typischen Reinigungszyklus werden 630 mL DOWEX®-Harz 1x8 (Cl⁻, 200 mesh) in eine INdEX-Säule (Innendurchmesser 5 cm, Höhe 100 cm, Füllhöhe 32 cm) der Firma AMERSHAM PHARMACIA gefüllt. Das Harz wird vor Gebrauch mit 1 L HCl-Lösung (1 M), 1 L H₂O_{dem.}, 1 L NaOH-Lösung (1 M) und nochmals mit 1 L H₂O_{dem.} gewaschen. 1 L des chorismathaltigen Kultivierungsüberstandes (Chorismatkonzentration = 22 g·L⁻¹) werden mit H₂O_{dem.} auf ein Gesamtvolumen von 5 L verdünnt und mit NaOH ein pH-Wert von 8.5 eingestellt. Die Lösung wird mit einer Flussgeschwindigkeit von 100 mL·min⁻¹ auf das Säulenbett aufgetragen, mit 1 L H₂O_{dem.} werden nicht gebundene Bestandteile vom Harz entfernt und das Produkt mit einer 2 M NH₄Cl-Lösung (pH 8.5) eluiert. Das Eluat wird fraktioniert gesammelt, die einzelnen Fraktionen per HPLC-Messung auf ihren Chorismatgehalt untersucht und die produkthaltigen Fraktionen vereinigt. Die wässrige Lösung wird mit HCl_{konz.} auf pH 1.5 gebracht, dreimal mit dem gleichen Volumen Diethylether extrahiert und die vereinigten organischen Phasen bei 30 °C im Vakuum auf ein Volumen von ca. 50 mL eingeeengt. Anschließend wird solange Isohexan zugegeben bis sich ein dauerhafter weißer Niederschlag bildet. Weitere Fällung von Chorismat geschieht bei -20 °C. Das Lösungsmittel wird von dem sich bildenden Niederschlag abdekantiert und dieser im Vakuum getrocknet. Es werden 10 g (45 %) Chorismat in Form eines gelblichen Feststoffes mit einer Reinheit von > 90 % (¹H-NMR) erhalten.

Da Chorismat thermisch instabil ist sollte eine unnötig lange Bearbeitung bzw. Lagerung der entsprechenden Lösungen bei über 0 °C vermieden werden. Während der HPLC-Untersuchungen werden die Eluatfraktionen bei -20 °C gelagert.

Analytische Daten für Chorismat (1)

$^1\text{H-NMR}$ (MeOH): $\delta = 4.66$ (d't', $J = 11.8, 2.5$ Hz, 1 H), 4.80 (d, $J = 2.8$ Hz, 1 H), 4.94 (dd, $J = 11.8, 2.5$ Hz, 1 H), 5.47 (d, $J = 2.8$ Hz, 1 H), 5.96 (dd, $J = 10.0, 2.0$ Hz, 1 H), 6.32 (dd, $J = 10.0, 1.3$ Hz, 1 H), 7.21 (s, 1 H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (MeOH): $\delta = 71.4$ (CH), 82.0 (CH), 97.3 (CH₂), 122.9 (CH), 131.0 (CH), 133.6 (C_q), 134.7 (CH), 151.1 (C=O), 166.6 (C=O), 167.7 (C=O).

$\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_6$ 226.18

Isolierung von 2,3-*trans*-CHA (2)

Für die Isolierung von 2,3-*trans*-CHA (2) aus zellfreien Kultivierungsüberständen mit einer Produktkonzentration $< 2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ und einem Restgehalt an Glucose und anderen organischen Bestandteilen von $> \text{ca. } 2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ empfiehlt sich die Verwendung von Ionenaustauschchromatographie. Dabei werden in einer typischen Prozedur 180 mL Überstand mit dem gleichen Volumen 2 M NaOH versetzt und auf ein Säulenbett aus 500 mL des Harzes DOWEX® 50Wx8 (H⁺-Form) (6 cm Säulendurchmesser, 20 cm Füllhöhe), das vor Gebrauch mit 2 L HCl (2 M) gereinigt wurde, aufgetragen. Ungebundene Bestandteile werden durch Waschen mit 500 mL H₂O_{dem.} entfernt. Es wird mit 0.5 M NH₃-Lösung eluiert und das Eluat fraktioniert gesammelt. Durch Auftragen des Eluats auf SiO₂-DC-Platten können produktthaltige Fraktionen durch ein UV-Signal bei 254 nm und durch Anfärben mit Ninhydrin-Sprühlösung identifiziert werden. Produktthaltige Fraktionen werden vereinigt und im Vakuum bei 60 °C auf etwa 20 mL eingeeengt und 2 bei 4 °C aus dieser Lösung kristallisiert. In Fällen, in denen während der Fermentation noch weitere Aminosäuren den Überstand abgegeben werden ist eine vollständige Reinigung mit dem zuvor beschriebenen Verfahren nicht möglich. Eine Produktanreicherung ist dann mit Hilfe von weiteren chromatographischen Schritten möglich (SiO₂, H₂O + 0.1% Trifluoressigsäure sowie RP18, H₂O + 0.1% Trifluoressigsäure).

Für eine Isolierung von 2 aus zellfreiem Überstand von Fermentationen mit einer Produktkonzentration $\geq 10 \text{ g}\cdot\text{L}$ kann auf eine chromatographische Reinigung verzichtet werden. In diesem Fall wird der zellfreie Überstand bei 60 °C im Vakuum getrocknet, der

Experimenteller Teil

Rückstand mit kaltem Methanol gewaschen und aus H₂O bei 4 °C umkristallisiert. Auf diese Weise wird **2** mit einer Reinheit > 95 % (¹H-NMR, HPLC) und einer isolierten Ausbeute von 80 % erhalten.

Analytische Daten für 2,3-*trans*-CHA (**2**)

¹H-NMR (CDCl₃): δ = 4.28 (d, *J* = 5.7 Hz, 1 H), 4.46 (dd, *J* = 5.7, 4.6 Hz, 1 H), 6.22 (dd, *J* = 9.5, 4.6 Hz, 1 H), 6.34 (dd, *J* = 9.5, 5.7 Hz, 1 H), 7.01 (d, *J* = 5.7 Hz, 1 H).

¹³C-NMR (CDCl₃): δ = 51.9 (CH), 66.0 (CH), 125.7 (CH), 128.1 (C_q), 130.5 (CH), 132.8 (CH), 173.0 (C=O)

MS (EI): *m/z* (%) = 155 (24) [M]⁺, 138 (57) [M – OH]⁺, 126 (26), 119 (28), 108 (100), 92 (29), 80 (92), 70 (54), 65 (46).

HR-MS: berechnet: 155.0582, gefunden: 155.0588

Elementaranalyse: berechnet (für 2,3-*trans*-CHA × 1 H₂O):

C = 48.55 % H = 6.40 %
N = 8.09 % O = 36.96 %

gefunden:

C = 48.0 % H = 6.14 %
N = 8.20 % O = 36.6 %

Drehwert: $[\alpha]_D^{20} = +437.7$ (in H₂O, *c* = 1.1)
(Lit: $[\alpha]_D^{22} = +445$, *c* = 0.5, H₂O)^{86b}

Schmelzpunkt: 185 - 188 °C (Zersetzung)

C₇H₉NO₃ 155.15

5.3 Chemische Synthesen

5.3.1 Methoden und Materialien

NMR-Spektroskopie

^1H -NMR-Spektren wurden bei 20 °C und mit einer Messfrequenz von 300 MHz aufgenommen (AMX-300-Spektrometer, BRUKER AG). Als interner Standard diente der undeuterte Anteil des verwendeten Lösungsmittels (CDCl_3 : δ_{H} 7.27 ppm, $[\text{D}_4]\text{-MeOH}$: δ_{H} 4.87 ppm, D_2O : δ_{H} 4.81 ppm).

^{13}C -NMR-Spektren wurden bei 20 °C und mit einer Messfrequenz von 75.5 MHz aufgenommen (AMX-300-Spektrometer, BRUKER AG). Als interner Standard diente das verwendete Lösungsmittel (CDCl_3 : δ_{C} 77.2 ppm, $[\text{D}_4]\text{-MeOH}$: δ_{C} 49.2 ppm). Die ^{13}C -NMR-Spektren wurden unter ^1H -Breitband-Entkopplung gemessen (WALTZ16). Zur Unterstützung der Signalzuordnung wurden zusätzlich 135DEPT-Experimente durchgeführt.

Abkürzungen der Multiziplicitäten: s (Singulett), d (Dublett), t (Triplett), 't' (Pseudotriplett), q (Quartett), m (Multipllett), br (breit).

GC-MS-Analyse

GC-MS-Spektren wurden mit dem HP 6890 Series GC-System sowie dem HP 5973 Mass Selective Detector der Firma HEWLETT PACKARD aufgenommen. Es wurde die Säule HP-5MS (5 % Phenyl Methyl Siloxan / Kapillare 30.0 m $\times$ 250 μm) der Firma HEWLETT PACKARD verwendet; Trägergas Helium (1.0 mL $\cdot\text{min}^{-1}$, konstanter Fluss), Injektor im Split Modus (50:1, 250 °C), $T_{\text{GC}}(\text{Injektor}) = 250$ °C, Zeitprogramm (Ofen): $T_{0\text{min}} = 60$ °C, $T_{3\text{min}} = 60$ °C, $T_{14\text{min}} = 280$ °C (Aufheizrate: 20 °C $\cdot\text{min}^{-1}$), $T_{19\text{min}} = 280$ °C. MS-Parameter: EI (70 eV), Ionenquelle 200 °C, Quadrupol 106 °C, Transfer Line 300 °C, detektierter Massenbereich 50 - 550 amu. Bei MS-Signalen mit Isotopenmuster wird jeweils das Isotopensignal mit der stärksten Intensität angegeben.

IR-Spektroskopie

IR-Spektren wurden mit dem Avatar 360 FT-Infrarot-Spektrometer der Firma NICOLET aufgenommen.

Polarimetrie

Spezifische Drehungen $[\alpha]_D^T$ wurden mit einem Polarimeter P-1020 der Firma JASCO in einer 1 dm Küvette bestimmt. Die Wellenlänge „D“ bezieht sich auf die Natrium D-Linie ($\lambda = 589 \text{ nm}$). Die Konzentration c der Messlösung wird in $\text{g} \cdot (100 \text{ mL})^{-1}$ angegeben.

Elementaranalyse und Massenspektrometrie

Elementaranalysen wurden mit einem „Vario EL“, der Firma HERAEUS, und massenspektroskopische Analysen mit einem „AEI MS50“ der Firma KRATOS (EI, 70 eV) in der Analysenabteilung des KEKULÉ Institut für Organische Chemie und Biochemie der Universität Bonn durchgeführt.

Schmelzpunktbestimmung

Schmelzpunktbestimmungen erfolgten in Glaskapillaren mit der Apparatur „B-540“ der Firma BÜCHI.

Einkristall-Röntgenstrukturanalyse

Einkristall-Röntgenstrukturanalysen wurden mit einem Vierkreisdiffraktometer „Kappa CCD“ der Firma NONIUS, am Institut für Anorganische Chemie der Universität Bonn durchgeführt.

Säulen- und Dünnschichtchromatographie

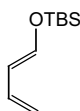
Präparative Trennungen durch Säulenchromatographie (Flashchromatographie) wurden an Kieselgel 60 (40 - 63 μm) der Firma MERCK vorgenommen. Analytische Dünnschichtchromatographie wurde mit DC-Alufolien Kieselgel 60 F₂₅₄ der Firma MERCK durchgeführt. Für präparative Dünnschichtchromatographie wurden DC-Glasplatten Kieselgel 60 F₂₅₄ (Schichtdicke 1.0 mm) der Firma MERCK eingesetzt.

Die Anfärbung der Analyten erfolgte durch Fluoreszenzlöschung (254 nm), besprühen der Folien mit Ninhydrin-Sprühareagenz (Fa. MERCK) oder durch Eintauchen der Folie in eine Kaliumpermanganat-Lösung (3 g KMnO_4 , 20 g K_2CO_3 , ad 300 mL Wasser) und anschließendem Erhitzen mit einer Heißluftpistole.

Chemikalien und Lösungsmittel

Chemikalien wurden von den Firmen ALDRICH, FLUKA oder MERCK bezogen und falls nicht anders angegeben, ohne weitere Reinigung eingesetzt.

Lösungsmittel wurden von den Firmen ALDRICH, FLUKA, HOESCH oder MERCK in analytischer Qualität bezogen und bei Bedarf mit literaturüblichen Methoden getrocknet.

5.3.2 Synthese von racemischem 2,3-*trans*-CHD**Buta-1,3-dienyloxy-*tert*-butyldimethylsilan (130)**

5.04 g (71.9 mmol) frisch destilliertes Crotonaldehyd und 10.0 g (98.8 mmol) Triethylamin werden in 30 mL Dichlormethan gelöst. Zu dieser Lösung werden bei 0 °C 15 mL (65.3 mmol) *tert*-Butyldimethylsilyltriflat zugetropft. Es wird 36 h unter Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen wird mit 60 mL Diethylether verdünnt, zweimal mit je 30 mL einer gesättigten NaHCO₃-Lösung und einmal mit 5 mL einer gesättigten NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wird über MgSO₄ getrocknet, das Lösungsmittel bei vermindertem Druck entfernt und der Rückstand destilliert (Sdp. 80 - 90 °C, 16 mbar). Es werden 10.8 g (90 %) **130** in Form einer farblosen, viskosen Flüssigkeit erhalten.

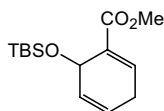
¹H-NMR (CDCl₃): δ = 0.17 (s, 6 H, CH₃), 0.93 (s, 9 H, C(CH₃)₃), 4.82 (dd, *J* = 10.3, 1.9 Hz, 1 H), 4.99 (d, *J* = 16.8 Hz, 1 H), 5.74 ('t', *J* = 11.8 Hz, 1 H), 6.23 (m, 1 H), 6.58 (d, *J* = 11.8 Hz, 1 H).

¹³C-NMR (CDCl₃): δ = -5.3 (2×CH₃), 18.3 (C(CH₃)₃), 25.6 (C(CH₃)₃), 111.8 (CH₂), 114.1 (CH), 133.3 (CH), 145.3 (CH).

GC-MS: *R*_t = 5.86 min; *m/z* (%) = 184 (28) [M]⁺, 127 (100), 111 (15), 99 (31), 73 (28), 59 (15).

C₁₀H₂₀OSi 184.35

***rac*-6-(*tert*-Butyldimethylsilanyloxy)-cyclohexa-1,4-dien-carbonsäuremethylester (131)**



Eine Mischung von 10.8 g (58.6 mmol) des Silylenolethers **130**, 6.2 g (73.3 mmol) Propinsäuremethylester und einem Kristall Methylenblau wird einem dreifachen Gefrier-Auftau-Zyklus bei vermindertem Druck unterworfen. Die Reaktionsmischung wird unter vermindertem Druck für 5 Tage auf 80 °C erhitzt. Flüchtige Bestandteile werden im Vakuum entfernt. Es werden 14.3 g (91 %) einer gelben Flüssigkeit erhalten, die ohne weitere Aufreinigung für weitere Synthesen eingesetzt wird.

DC (SiO₂): $R_f = 0.66$ (Hexan/EE = 7:3)

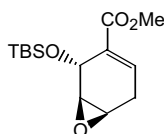
¹H-NMR (CDCl₃): $\delta = 0.10$ (s, 3 H, CH₃), 0.13 (s, 3 H, CH₃), 0.86 (s, 9 H, C(CH₃)₃), 2.76 (m, 1 H), 2.93 (m, 1 H), 3.76 (s, 3 H, OCH₃) 5.08 (d't', $J = 5.4$, 2.6 Hz, 1 H), 5.87 (s, 1 H), 5.88 (s, 1 H), 7.02 ('t', $J = 3.9$ Hz, 1 H).

¹³C-NMR (CDCl₃): $\delta = -3.4$ (2×CH₃), 18.2 (C(CH₃)₃), 25.8 (C(CH₃)₃), 27.4 (CH₂), 52.3 (CH₃), 61.5 (CH), 128.6 (CH), 129.78 (CH), 130.3 (C_q), 133.1 (CH), 167.0 (C=O).

GC-MS: $R_t = 10.12$ min; m/z (%) = 268 (7) [M]⁺, 237 (5) [M – CH₃]⁺, 209 (11) [M – CO₂CH₃]⁺, 137 (4) [M – OTBS]⁺, 105 (100) [C₇H₅O]⁺, 77 (18) [C₆H₅]⁺.

C₁₄H₂₄O₃Si 268.42

***rac*-2-(*tert*-Butyldimethylsilyloxy)-7-oxabicyclo[4.1.0]hept-3-en-3-carbonsäuremethylester (132)**



Zu einer Lösung von 14.3 g (53.3 mmol) Diels-Alder-Produkt **131** und 13.4 g (159.9 mmol) NaHCO₃ in 300 mL Dichlormethan werden portionsweise, über einen Zeitraum von 15 min, 27 g (109.5 mmol) 70 %ige *m*-CPBA (in H₂O) gegeben. Die Lösung wird 6 h bei Raumtemperatur gerührt, die ausgefallene *m*-Chlorbenzoesäure wird abfiltriert und mit 50 mL Dichlormethan gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen werden mit je 20 mL ges. Na₂SO₄-Lösung, ges. NaHCO₃-Lösung und ges. NaCl-Lösung gewaschen. Nach Trocknen über MgSO₄ und Filtration wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der gelbe Rückstand säulenchromatographisch (SiO₂, Hexan/Diethylether = 5:1) gereinigt. Es werden 5.5 g (36 %) **132** in Form eines farblosen Öls erhalten.

DC (SiO₂): $R_f = 0.23$ (Hexan/Diethylether = 5:1)

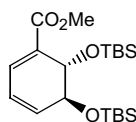
¹H-NMR (CDCl₃): $\delta = 0.09$ (s, 3 H, CH₃), 0.18 (s, 3 H, CH₃), 0.86 (s, 9 H, C(CH₃)₃), 2.73 (m, 2 H), 3.24 (m, 1 H), 3.31 (m, 1 H), 3.73 (s, 3 H, OCH₃), 5.02 (d, $J = 1.8$ Hz, 1 H), 6.74 (ddd, $J = 5.0, 3.1, 1.8$ Hz, 1 H).

¹³C-NMR (CDCl₃): $\delta = -4.5$ (CH₃), -4.4 (CH₃), 18.3 (C(CH₃)₃), 26.0 (C(CH₃)₃), 26.1 (CH₂), 49.6 (CH), 51.8 (CH), 54.5 (CH₃), 63.0 (CH), 129.4 (C_q), 135.7 (CH), 166.8 (C=O).

GC-MS: $R_t = 10.72$ min; m/z (%) = 284 (2) [M]⁺, 269 (5) [M – CH₃]⁺, 227 (100) [M – C₄H₉]⁺, 167 (15) [M – C₆H₁₇Si]⁺, 151 (14) [M – C₆H₁₇OSi]⁺, 89 (51) [C₇H₅]⁺, 75 (22) [C₂H₇OSi]⁺, 59 (13) [C₂H₃O₂]⁺.

C₁₄H₂₄O₄Si 284.42

***rac*-5,6-Bis-(*tert*-butyldimethylsilanyloxy)-cyclohexa-1,3-dien-carbonsäuremethyl-ester (*rac*-52)**



Zu einer Lösung von 3.0 g (10.5 mmol) des Epoxids **132**, 1.9 g (12.6 mmol) *tert*-Butyldimethylsilylchlorid und 127 mg (105 μ mol) 4-Dimethylaminopyridin (DMAP) in

Experimenteller Teil

30 mL Dichlormethan wird eine Lösung von 2.2 g (14.4 mmol) 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU) in 5 mL Dichlormethan gegeben. Anschließend wird über einen Zeitraum von 24 h bei Raumtemperatur gerührt, wobei sich die Lösung dunkel färbt. Die Reaktionsmischung wird in 50 mL Diethylether aufgenommen, mit ges. NaHCO₃-Lösung und ges. NaCl-Lösung gewaschen, die organische Phase über Magnesiumsulfat getrocknet und nach Filtration die Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der zurückbleibende gelbliche Feststoff wird säulenchromatographisch gereinigt (SiO₂, Isohexan/EE = 19:1). Es werden 3.4 g (82 %) eines farblosen Öls erhalten.

DC (SiO₂): $R_f = 0.33$ (Isohexan/EE = 19:1)

¹H-NMR (CDCl₃): $\delta = 0.05$ (s, 3 H, CH₃), 0.09 (s, 3 H, CH₃), 0.12 (s, 3 H, CH₃), 0.17 (s, 3 H, CH₃), 0.83 (s, 9 H, C(CH₃)₃), 0.87 (s, 9 H, C(CH₃)₃), 3.78 (s, 3 H, OCH₃), 4.11 (dd, $J = 4.8, 1.5$ Hz, 1 H), 4.56 (br s, 1 H), 6.19 (m, 2 H), 7.11 (dd, $J = 5.1, 1.5$ Hz, 1 H).

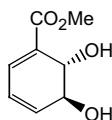
¹³C-NMR (CDCl₃): $\delta = -4.6$ (CH₃), -4.3 (CH₃), -4.2 (CH₃), -4.0 (CH₃), 18.3 (2×C(CH₃)₃), 26.0 (2×C(CH₃)₃), 51.8 (CH₃), 68.2 (CH), 70.1 (CH), 123.8 (CH), 129.5 (C_q), 133.1 (CH), 133.2 (CH), 167.5 (C=O).

GC-MS: $R_t = 11.58$ min; m/z (%) = 398 (10) [M]⁺, 341 (100) [M – C₄H₉]⁺, 326 (18) [M – C₅H₁₂]⁺, 267 (3) [M – OTBS]⁺, 209 (30), 105 (10) [C₇H₅O]⁺, 89 (15) [C₇H₅]⁺.

Elementaranalyse: berechnet: C = 60.25 % H = 9.61 %
gefunden: C = 60.48 % H = 9.81 %

HR-MS: berechnet: 398.2309, gefunden: 398.2310

C₂₀H₃₈O₄Si₂ 398.68

***rac*-5,6-Dihydroxycyclohexa-1,3-dien-carbonsäuremethylester (*rac*-133)**

470 mg (1.18 mmol) des Silylethers *rac*-**52** werden in 10 mL absolutem THF gelöst und bei $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ langsam mit 4.72 mL (4.72 mmol) einer 1 M Tetrabutylammoniumfluorid-Lösung (in THF) (TBAF-Lsg.) versetzt und gerührt, bis die Reaktionsmischung sich auf Raumtemperatur erwärmt hat. Es wird mit 50 mL EE verdünnt, mit ges. NaCl-Lösung gewaschen, die organische Phase über MgSO_4 getrocknet und nach Filtration das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der gelbliche Feststoff wird säulenchromatographisch gereinigt (SiO_2 , EE). Es werden 96 mg (48 %) *rac*-**133** als blassgelber Feststoff erhalten.

DC (SiO_2): $R_f = 0.51$ (EE/MeOH = 4:1)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 3.82$ (s, 3 H, OCH_3), 4.57 (ddd, $J = 9.3, 3.3, 1.9$ Hz, 1 H), 4.76 (dd, $J = 9.3, 1.3$ Hz, 1 H), 6.08 (ddd, $J = 9.6, 5.4, 1.9$ Hz, 1 H), 6.29 (ddd, $J = 9.6, 3.3, 0.9$ Hz, 1 H), 6.99 (d, $J = 5.4$ Hz, 1 H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 52.3$ (OCH_3), 72.5 (CH), 72.7 (CH), 122.9 (CH), 129.4 (C_q), 133.4 (CH), 136.4 (CH), 167.9 (C=O).

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 2954, 1701 (C=O), 1281, 1009.

GC-MS: $R_t = 9.17$ min; m/z (%) = 170 (18) $[\text{M}]^+$, 152 (34) $[\text{M} - \text{H}_2\text{O}]^+$, 138 (64), 121 (58), 110 (100), 93 (30), 82 (61), 65 (43), 53 (35).

HR-MS: berechnet: 170.0579 gefunden: 170.0580

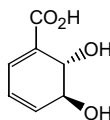
Schmelzpunkt: $79 - 80\text{ }^{\circ}\text{C}$

$\text{C}_8\text{H}_{10}\text{O}_4$ 170.17

Enantiomerentrennung:

Die Trennung der beiden Enantiomere des racemischen Gemisches wird auf einer OD-H HPLC-Säule der Firma DAICEL mit einer mobilen Phase aus Isohexan und 2-Propanol (90 : 10) bei einer Temperatur von 10 °C durchgeführt. Unter diesen Bedingungen besitzt (5*S*,6*S*)-5,6-Dihydroxy-cyclohexa-1,3-dien-carbonsäuremethylester (**133**) eine Retentionszeit von 52 min das Enantiomer (5*R*,6*R*)-5,6-Dihydroxy-cyclohexa-1,3-dien-carbonsäuremethylester eine Retentionszeit von 61 min.

***rac*-5,6-Dihydroxycyclohexa-1,3-dien-carbonsäure (*rac*-3)**

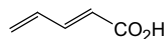


Zu einer Lösung von 78 mg (458 µmol) des Esters *rac*-**133** in 3 mL Methanol werden bei 0 °C 2.5 mL einer 0.25 M LiOH-Lösung getropft. Die gelbe Reaktionslösung wird 24 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend mit 6 M HCl-Lösung auf pH 7 gebracht. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (SiO₂, Gradient EE → MeOH) gereinigt. Es werden 32 mg (45 %) *rac*-**3** in Form eines blassgelben Feststoffes erhalten.

Die Analytischen Daten (¹H-NMR, ¹³C-NMR, MS) der racemischen Verbindung sind abgesehen vom Drehwert identisch mit denen des enantiomerenreinen Produktes.

5.3.3 Synthese von racemischem 2,3-*trans*-CHA

***trans*-2,4-Pentadiensäure (**122**)**



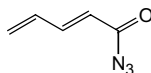
In einen Dreihalskolben mit Rückflusskühler und Trockenrohr werden 41.2 g (520 mmol) Pyridin und 41.6 g (400 mmol) Malonsäure gegeben. Über einen Tropftrichter werden bei 0 °C 25.2 g (450 mmol) frisch destilliertes Acrolein langsam zugetropft. Unter Erwärmung auf Raumtemperatur wird das Reaktionsgemisch 24 h gerührt, anschließend auf 500 mL Eis gegeben und mit 26 mL konz. H₂SO₄ angesäuert. Die wässrige Phase wird viermal mit je 60 mL Dichlormethan extrahiert, die organische Phase über MgSO₄ getrocknet und nach 130

Filtration auf etwa ein Drittel des Volumens eingengt. Nach Kristallisation bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ werden 7.8 g (20 %) der Säure **122** in Form eines weißen Pulvers erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 5.57$ (d, $J = 9.9$ Hz, 1 H), 5.68 (d, $J = 16.5$ Hz, 1 H), 5.93 (d, $J = 15.1$ Hz, 1 H), 6.50 (dt, $J = 16.5, 11.1$ Hz, 1 H), 7.37 (dd, $J = 15.1, 11.1$ Hz, 1 H).

$\text{C}_5\text{H}_6\text{O}_2$ 98.10

***trans*-2,4-Pentadiencarbonsäureazid (**123**)**

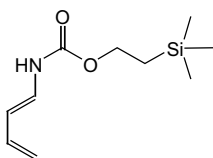


Unter Stickstoffatmosphäre werden 3.36 g (26 mmol) *N,N*-Diisopropylethylamin und 2.14 g (21.8 mmol) der Säure **122** in 30 mL trockenem Aceton gelöst. Bei $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ wird eine Lösung von 2.43 g (22.4 mmol) Chlorameisensäureethylester in 10 mL trockenem Aceton zugetropft und die Reaktionsmischung für 30 min bei $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ gerührt ehe eine gekühlte Lösung von 2.83 g (43.6 mmol) Natriumazid in 6 mL Wasser langsam zugegeben wird. Nach weiteren 15 min Rühren wird das Gemisch auf 20 mL Eiswasser gegeben, sechsmal mit je 20 mL Toluol extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über MgSO_4 getrocknet und nach Filtration auf ca. 25 mL eingengt.

Das in Toluol gelöste Produkt wird ohne weitere Reinigungsschritte für weitere Umsetzungen eingesetzt. Das Entstehen des Säureazids wurde durch das Auftreten einer IR-Bande bei 2140 cm^{-1} nachgewiesen.

$\text{C}_5\text{H}_5\text{N}_3\text{O}$ 123.11

Buta-1,3-dienylcarbaminsäure-(2-trimethylsilyl)ethyl-ester (99**)**



2.87 mL (20 mmol) 2-Trimethylsilyl ethanol und 25 mg (0.15 mmol) 4-*tert*-Butylcatechol werden in einem Dreihalskolben mit Tropftrichter und Destillationsbrücke in 60 mL Toluol

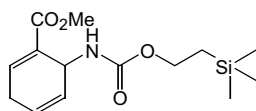
gelöst. Einige mL Toluol werden destillativ entfernt, um Spuren von Wasser zu entfernen. Anschließend wird die Destillationsbrücke durch einen Rückflusskühler mit Stickstoffeinlass ersetzt. Das in ca. 25 mL Toluol gelöste Carbonsäureazid **123** wird unter Stickstoffatmosphäre und unter Rückfluss über einen Zeitraum von etwa 30 min zugegeben. Anschließend wird für weitere 20 min gerührt, dann mit einem Eisbad gekühlt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das zurückbleibende Öl wird säulenchromatographisch (SiO₂, Isohexan/EE = 12:1) gereinigt. Es werden 1.5 g (32 % über zwei Stufen) einer farblosen viskosen Flüssigkeit erhalten.

¹H-NMR (CDCl₃): δ = 0.03 (s, 9 H), 0.99 (t, *J* = 7.2 Hz, 2 H), 4.20 (t, *J* = 7.2 Hz, 2 H), 4.88 (d, *J* = 10.3 Hz, 1 H), 5.00 (d, *J* = 16.8 Hz, 1 H), 5.70 ('t', *J* = 11.5 Hz, 1 H), 6.26 (dt, *J* = 16.8, 10.3 Hz, 1 H), 6.74 ('t', *J* = 11.5 Hz, 1 H).

¹³C-NMR (CDCl₃): δ = -1.4 (Si(CH₃)₃), 17.8 (CH₂), 64.1 (CH₂), 111.8 (CH), 113.2 (CH₂), 127.5 (CH), 134.8 (CH), 154.0 (C=O).

C₁₀H₁₉NO₂Si 213.35

***rac*-6-(2-Trimethylsilanyloxyethylamino)-cyclohexa-1,4-dien-carbonsäuremethylester (*rac*-124)**



530 mg (2.48 mmol) des Diens **99** und 522 mg (6.21 mmol) Propionsäuremethylester werden unter Argonatmosphäre für 48 h unter Rückfluss auf 85 °C erhitzt. Nach Abkühlen der Reaktionsmischung auf Raumtemperatur wird mit wenig Hexan verdünnt und säulenchromatographisch (SiO₂, Gradient Isohexan/EE = 6:1 → EE) gereinigt. Es werden 596 mg (81 %) des Cyclohexadiens **124** in Form einer blassgelben viskosen Flüssigkeit erhalten.

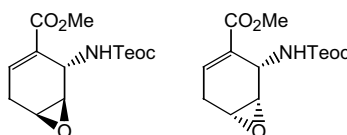
¹H-NMR (CDCl₃): δ = 0.03 (s, 9 H), 0.98 (t, *J* = 8.4 Hz, 2 H), 2.87 (m, 2 H), 3.76 (s, 3 H), 4.17 (t, *J* = 8.4 Hz, 2 H), 4.61 (br s, 1 H), 5.08 (m, 1 H), 5.86 (d, *J* =

1.1 Hz, 2 H), 7.14 ('t', $J = 3.1$ Hz, 1 H).

^{13}C -NMR (CDCl_3): $\delta = -1.3$ ($\text{Si}(\text{CH}_3)_3$), 17.9 (CH_2), 27.4 (CH_2), 43.8 (CH), 52.0 (CH_3), 63.0 (CH_2), 124.7 (CH), 126.7 (CH), 128.9 (C_q), 139.8 (CH), 156.5 ($\text{C}=\text{O}$), 166.0 ($\text{C}=\text{O}$).

$\text{C}_{14}\text{H}_{23}\text{NO}_4\text{Si}$ 297.42

***rac*-2-(2-Trimethylsilanylethoxycarbonylamino)-7-oxabicyclo[4.1.0]hept-3-en-3-carbonsäuremethylester (125, 126)**

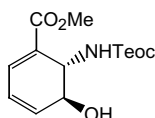


Zu einer Lösung von 596 mg (2.0 mmol) des Cyclohexadiens **124** und 420 mg (5.0 mmol) NaHCO_3 in 30 mL Dichlormethan wird unter Rückflusserhitzung eine Lösung von 674 mg (3.0 mmol) 80 %iger *m*-CPBA in 20 mL Dichlormethan langsam zugetropft und für weitere 4 h refluxiert. Unter Abkühlung auf Raumtemperatur wird für weitere 16 h gerührt. Anschließend wird die Reaktionsmischung auf 0 °C gekühlt und 10 %ige NaHSO_3 -Lösung solange zugegeben, bis ein Stärke/KI-Indikator keinen Überschuss an *m*-CPBA mehr anzeigt. Die organische Phase wird mit 5 mL einer 1:1 Mischung von ges. NaHCO_3 -Lösung und Wasser, sowie einer ges. NaCl -Lösung gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und nach Filtration auf etwa die Hälfte des ursprünglichen Volumens eingeeengt.

Diese Lösung wird ohne weitere Reinigung und analytische Untersuchungen für weitere Umsetzungen eingesetzt.

$\text{C}_{14}\text{H}_{23}\text{NO}_5\text{Si}$ 313.42

***rac*-5-Hydroxy-6-(2-trimethylsilanylethoxycarbonylamino)-cyclohexa-1,3-dien-carbonsäuremethylester (**127**)**



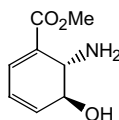
Zu der Lösung der Epoxide **125** und **126** werden 0.6 mL (4.0 mmol) DBU gegeben und für 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, der Rückstand in 25 mL EE aufgenommen, zweimal mit 20 mL einer 1:1 Mischung von ges. NaHCO₃-Lösung und Wasser, sowie einmal mit 10 mL einer ges. NaCl-Lösung gewaschen. Nach Trocknung über MgSO₄ und Filtration wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (SiO₂, Isohexan/EE = 3:1) gereinigt. Es werden 276 mg **127** (44 % über 2 Stufen) in Form einer farblosen hochviskosen Flüssigkeit erhalten.

¹H-NMR (CDCl₃): δ = 0.03 (s, 9 H), 0.97 (t, *J* = 8.0 Hz, 2 H), 3.79 (s, 3 H), 4.16 (t, *J* = 8.0 Hz, 1 H), 4.37 (br s, 1 H), 4.59 (d br, *J* = 8.0 Hz, 1 H), 4.83 (dd, *J* = 8.0, 2.4 Hz, 1 H), 6.30 (m, 2 H), 7.21 (dd, *J* = 4.6, 1.8 Hz, 1 H).

¹³C-NMR (CDCl₃): δ = -1.3 (Si(CH₃)₃), 17.9 (CH₂), 50.4 (CH), 52.3 (CH₃), 63.8 (CH₂), 67.8 (CH), 124.8 (CH), 126.8 (C_q), 132.9 (CH), 134.2 (CH), 156.6 (C=O), 165.6 (C=O).

C₁₄H₂₃NO₅Si 313.42

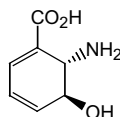
***rac*-6-Amino-5-hydroxy-cyclohexa-1,3-dien-carbonsäuremethylester (*rac*-**128**)**



Zu 35 mg (0.11 mmol) **127** werden 500 µL Trifluoressigsäure gegeben und die Lösung wird für 45 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird zu der Lösung Na₂CO₃ bis zur pH-Neutralität zugegeben und die flüchtigen Bestandteile im Vakuum entfernt. Der verbleibende Rest wird durch präparative Dünnschichtchromatographie (SiO₂, MeOH/EE = 2:1) gereinigt. Es werden 14 mg (74 %) *rac*-**128** erhalten.

DC (SiO ₂):	$R_f = 0.45$ (BuOH/AcOH/H ₂ O = 4:1:5)
¹ H-NMR (D ₂ O):	$\delta = 3.76$ (s, 3 H), 4.33 (d, $J = 2.7$ Hz, 1 H), 4.38 (dd, $J = 4.5, 2.7$ Hz, 1H), 6.40 (m, 2 H), 7.39 (dd, $J = 5.1, 1.1$ Hz, 1 H).
¹³ C-NMR ([D ₄]-MeOH):	$\delta = 51.3$ (CH), 53.0 (CH ₃), 66.3 (CH), 124.1 (C _q), 125.4 (CH), 134.9 (CH), 137.7 (CH), 167.4 (C=O).
C ₈ H ₁₁ NO ₃	169.18

***rac*-6-Amino-5-hydroxycyclohexa-1,3-dienecarbonsäure (*rac*-2)**

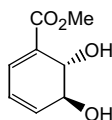


14 mg (0.08 mmol) des Methylesters **128** werden in 1 mL 2 M NaOH gegeben und bei Raumtemperatur 3 h gerührt. Die Reaktionslösung wird zur Reinigung über eine SiO₂-Kartusche gegeben. Es werden analytische Mengen der freien Säure gewonnen.

Die analytischen Daten (¹H-NMR, ¹³C-NMR, MS, Smp.) sind abgesehen vom Drehwert identisch mit denen des mikrobiell gewonnenen Produkts **2**.

5.3.4 Synthesen ausgehend von 2,3-*trans*-CHD (3)

(5*S*,6*S*)-5,6-Dihydroxy-cyclohexa-1,3-dienecarbonsäuremethylester (133)



a) Verwendung von Trimethylsilyldiazomethan

Zu einer Lösung von 255 mg (1.6 mmol) 2,3-*trans*-CHD (**3**) in 5.4 mL Methanol und 11 mL Isohexan werden tropfenweise 4 mL einer 2 M Lösung von Trimethylsilyldiazomethan in Hexan gegeben. Das Reaktionsgemisch wird für 24 h bei Raumtemperatur gerührt, alle flüchtigen Bestandteile werden im Vakuum entfernt und das Rohprodukt

säulenchromatographisch (SiO₂, EE) gereinigt. Es werden 224 mg (81 %) des Methylesters **133** als blassgelber Feststoff erhalten.

b) Verwendung von Trimethylsilylchlorid

Zu einer Lösung von 930 mg (6.0 mmol) **3** in wasserfreiem Methanol werden langsam 1.4 mL (11.3 mmol) Trimethylsilylchlorid gegeben. Das Reaktionsgemisch wird für 18 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend mit gesättigter NaHCO₃-Lösung neutralisiert. Die Lösung wird filtriert, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (SiO₂, EE) gereinigt. Es werden 490 mg (48 %) des Methylesters **133** erhalten.

c) Verwendung von MeOH/HCl

Zu einer Lösung von 2.07 g (13.4 mmol) **3** in Methanol werden langsam 65 mL einer 1.25 M methanolischen Chlorwasserstofflösung gegeben. Das Reaktionsgemisch wird für 48 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend mit 7.0 g NaHCO₃ gequentscht. Das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, das entstandene Produkt mit EE aus dem entstandenen Feststoffgemisch herausgelöst, das Lösungsmittel erneut entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (SiO₂, EE/MeOH = 4:1) gereinigt. Es werden 1.35 g (60 %) des Methylesters **133** erhalten.

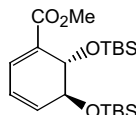
Die analytischen Daten (¹H-NMR, ¹³C-NMR, MS) sind, abgesehen vom Drehwert identisch mit denen des racemischen Produktes *rac*-**133**.

Drehwert: $[\alpha]_D^{20} = -17.7$ (in CHCl₃, *c* = 0.9)

Schmelzpunkt: 79 - 80 °C

C₈H₁₀O₄ 170.16

(5*S*,6*S*)-5,6-Bis-(*tert*-butyldimethylsilanyloxy)-cyclohexa-1,3-dien-carbonsäuremethylester (52)



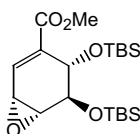
Zu einer Lösung aus 1.6 g (9.4 mmol) des Methylesters **133** und 4.3 mL (31 mmol) Triethylamin in 200 mL Dichlormethan werden langsam 6.2 g (23.5 mmol) *tert*-Butyldimethylsilyltriflat gegeben. Das Reaktionsgemisch wird für 16 h bei Raumtemperatur gerührt und mit 30 mL kalter gesättigter NaHCO₃-Lösung gequenscht. Die organische Phase wird über MgSO₄ getrocknet und nach Filtration das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch (SiO₂, Isohexan/EE = 19:1) gereinigt. Es werden 3.56 g (95 %) **52** in Form eines farblosen Öls erhalten.

Die analytischen Daten sind, abgesehen vom Drehwert identisch mit denen des racemischen Produktes *rac*-**52**.

Drehwert: $[\alpha]_D^{20} = +305$ (in CH₂Cl₂, $c = 3.3$)

C₂₀H₃₈O₄Si₂ 398.68

(1*R*,4*S*,5*S*,6*R*)-4,5-Bis-(*tert*-butyldimethylsilanyloxy)-7-oxabicyclo[4.1.0]hept-2-en-3-carbonsäuremethylester (160)



Zu einer Mischung von 842 mg (2.11 mmol) des silylierten Methylesters **104** und 532 mg (6.33 mmol) NaHCO₃ in 50 mL Dichlormethan werden portionsweise, über einen Zeitraum von 15 min, 740 mg (3.00 mmol) 70 %ige *m*-CPBA (in H₂O) gegeben. Nach 3 h Rühren bei Raumtemperatur wird die Lösung filtriert, mit 50 mL Diethylether verdünnt, die organische Phase mit je 5 mL ges. NaHCO₃-Lösung, ges. NaSO₄-Lösung und ges. NaCl-Lösung gewaschen. Nach Trocknung über MgSO₄ und Filtration wird das Lösungsmittel im Vakuum

Experimenteller Teil

entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (SiO₂, Isohexan/EE = 12:1) gereinigt. Es werden 713 mg (81 %) **160** in Form einer viskosen, farblosen Flüssigkeit erhalten.

DC (SiO₂): R_f = 0.31 (Isohexan/EE = 12:1)

¹H-NMR (CDCl₃): δ = 0.01 (s, 3 H, CH₃), 0.12 (s, 3 H, CH₃), 0.14 (s, 3 H, CH₃), 0.17 (s, 3 H, CH₃), 0.87 (s, 18 H, C(CH₃)₃), 3.43 ('t', J = 4.0 Hz, 1 H), 3.54 (m, 1 H), 3.77 (s, 3 H, CH₃), 4.26 ('t', J = 2.1 Hz, 1 H), 4.56 ('t', J = 2.1 Hz, 1 H), 7.29 (d, J = 4.2 Hz, 1 H).

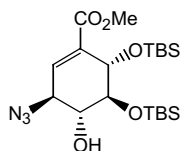
¹³C-NMR (CDCl₃): δ = -4.8 (CH₃), -4.5 (CH₃), -4.4 (CH₃), -4.1 (CH₃), 18.1 (C(CH₃)₃), 18.2 (C(CH₃)₃), 25.9 (2 x C(CH₃)₃), 45.4 (CH), 52.1 (CH₃), 58.3 (CH), 68.3 (CH), 69.5 (CH), 134.1 (C_q), 137.7 (CH), 166.7 (C=O).

GC-MS: R_t = 12.28 min; m/z (%) = 414 (1) [M]⁺, 399 (2) [M - CH₃]⁺, 357 (100) [M - C₄H₉]⁺, 325 (3) [M - C₄H₇O₂]⁺, 131 (6) [C₆H₁₅OSi]⁺, 73 (52).

HR-MS: C₁₆H₂₉O₅Si₂ ([M - C₄H₉]⁺, Basispeak)
berechnet: 357.1554 gefunden: 357.1551

C₂₀H₃₈O₅Si₂ 414.68

(3*S*,4*R*,5*S*,6*S*)-3-Azido-5,6-bis-(*tert*-butyldimethylsilanyloxy)-4-hydroxy-cyclohex-1-encarbonsäuremethylester (**146**)



Eine Mischung aus 51 mg (0.12 mmol) des Epoxids **130** und 100 mg (0.30 mmol) Tributylzinnazid wird 24 h bei 55 °C gerührt. Anschließend werden 2 mL Diethylether und 1 mL H₂O zugegeben, für weitere 30 min bei Raumtemperatur gerührt, die beiden Phasen getrennt und die organische Phase im Vakuum eingengt. Das Gemisch wird

säulenchromatographisch (SiO₂, Isohexan/EE = 12:1) gereinigt. Es werden 18 mg (33 %) in Form eines farblosen Öls erhalten.

DC (SiO₂): R_f = 0.30 (Isohexan/EE = 12:1)

¹H-NMR (CDCl₃): δ = 0.10 (s, 3 H, CH₃), 0.11 (s, 3 H, CH₃), 0.15 (s, 3 H, CH₃), 0.25 (s, 3 H, CH₃), 0.85 (s, 9 H, C(CH₃)₃), 0.89 (s, 9 H, C(CH₃)₃), 3.83 (s, 3 H), 3.99 (m, 2 H), 4.09 (d, J = 10.3 Hz, 1 H), 4.17 (pt, J = 3.0 Hz, 1 H), 4.61 (dd, J = 3.0, 1.4 Hz, 1 H) 7.03 (dd, J = 4.2, 1.4 Hz, 1 H).

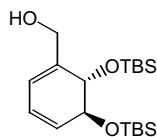
¹³C-NMR (CDCl₃): δ = -4.80 (2 x CH₃), -4.7 (2 x CH₃), 18.1 (C(CH₃)₃), 18.5 (C(CH₃)₃), 25.8 (C(CH₃)₃), 25.9 (C(CH₃)₃), 52.4 (CH₃), 59.2 (CH), 67.5 (CH), 69.1 (CH), 72.1 (CH), 132.9 (C_q), 134.0 (CH), 166.2 (C=O).

MS: m/z (%) = 442 (2) [M - CH₃]⁺, 400 (100) [M - C₄H₉]⁺, 372 (10) [M - C₄H₉N₂]⁺, 357 (22), 345 (8), 240 (14), 225 (13), 198 (14), 89 (10) [C₇H₅]⁺, 73 (60) [C₃H₅O₂]⁺.

HR-MS: C₁₆H₃₀N₃O₅Si₂, ([M - C₄H₉]⁺, Basispeak)
berechnet: 400.1724 gefunden: 400.1723

C₂₀H₃₉N₃O₅Si₂ 457.71

(5*S*,6*S*)-5,6-Bis-(*tert*-butyldimethylsilyloxy)-1-hydroxymethyl-cyclohexa-1,3-dien (150)



Zu einer Lösung von 1.73 g (4.3 mmol) des silylierten Methylesters **52** in 50 mL Hexan werden bei 0 °C 9 mL (9 mmol) einer 1 M Diisobutylaluminiumhydrid-Lösung (DIBAL) (in Hexan) getropft und 3 h bei 0 °C gerührt. Anschließend wird die Reaktion mit 10 mL

Experimenteller Teil

Methanol und 10 mL 2 M Salzsäure gequentscht, die ausfallenden Salze werden abfiltriert und die wässrige Phase zweimal mit je 30 mL Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO₄ getrocknet, nach Filtration im Vakuum getrocknet und säulenchromatographisch (SiO₂, Isohexan/EE = 3:1) gereinigt. Es werden 1.3 g (82 %) eines farblosen Öls erhalten.

DC (SiO₂): $R_f = 0.62$ (Isohexan/EE = 3:1)

¹H-NMR (CDCl₃): $\delta = 0.08$ (s, 3 H, CH₃), 0.11 (s, 3 H, CH₃), 0.13 (s, 3 H, CH₃), 0.15 (s, 3 H, CH₃), 0.89 (s, 9 H, C(CH₃)₃), 0.90 (s, 9 H, C(CH₃)₃), 4.11 (dd, $J = 13, 7.3$ Hz, 1 H), 4.30 (m, 3 H), 5.83 (dd, $J = 9.0, 3.7$ Hz, 1 H), 5.97 (m, 2 H).

¹³C-NMR (CDCl₃): $\delta = -4.2$ (CH₃), -3.8 (CH₃), -3.8 (CH₃), -3.6 (CH₃), 18.3 (C(CH₃)₃), 18.4 (C(CH₃)₃), 26.1 (C(CH₃)₃), 26.2 (C(CH₃)₃), 64.8 (CH₂), 72.5 (CH), 73.5 (CH), 120.5 (CH), 124.1 (CH), 129.7 (CH), 140.2 (C_q).

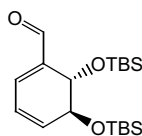
GC-MS: $R_t = 11.63$ min; m/z (%) = 370 (48) [M]⁺, 355 (1) [M - CH₃]⁺, 339 (2) [M - OCH₃]⁺, 313 (15) [M - C₄H₉]⁺, 89 (18) [C₇H₅]⁺, 75 (92) [C₂H₇OSi]⁺, 73 (100) [C₃H₅O₂]⁺, 57 (14) [C₄H₉]⁺.

HR-MS: berechnet: 370.2359 gefunden: 370.2358

Drehwert: $[\alpha]_D^{20} = +269.47$ (in CDCl₃, $c = 1.1$)

C₁₉H₃₈O₃Si₂ 370.67

**(5*S*,6*S*)-5,6-Bis-(*tert*-butyldimethylsilanyloxy)-cyclohexa-1,3-dien-carbaldehyd
(151)**



Zu einer Lösung von 28 mg (0.08 mmol) des Alkohols **150** in 2 mL CH₂Cl₂ werden 280 mg (0.1 mmol) einer 15 %igen Dess-Martin-Periodinan-Lösung (in CH₂Cl₂) (1,1,1-Triacetoxy-1,1-dihydro-1,2-benziodoxol-3(1H)-one) gegeben. Nach 20 min wird die Reaktionsmischung mit 5 mL Diethylether verdünnt. Natriumthiosulfat reduziert das verbrauchte Reagenz in gesättigter NaHCO₃-Lösung in weniger als 10 min zu einem wasserlöslichen Natriumsalz der 2-Iodobenzoesäure. Die wässrige Phase wird mit Diethylether extrahiert und die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO₄ getrocknet. Nach Filtration wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch (SiO₂, Isohexan/EE = 12:1) gereinigt. Es werden 19 mg (64 %) eines gelblichen Öls erhalten.

DC (SiO₂): $R_f = 0.34$ (Isohexan/EE = 12:1)

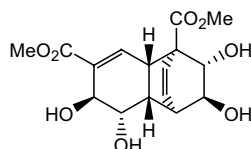
¹H-NMR (CDCl₃): $\delta = 0.05$ (s, 3 H, CH₃), 0.09 (s, 3 H, CH₃), 0.11 (s, 3 H, CH₃), 0.19 (s, 3 H, CH₃), 0.82 (s, 9 H, C(CH₃)₃), 0.85 (s, 9 H, C(CH₃)₃), 4.12 (m, 1 H), 4.56 (br s, 1 H), 6.33 (m, 2 H), 6.85 (m, 1 H), 9.57 (s, 1 H).

¹³C-NMR (CDCl₃): $\delta = -4.6$ (CH₃), -4.6 (CH₃), -4.3 (CH₃), -4.0 (CH₃), 18.2 (C(CH₃)₃), 18.3 (C(CH₃)₃), 25.9 (C(CH₃)₃), 26.1 (C(CH₃)₃), 65.2 (CH), 69.6 (CH), 123.8 (CH), 135.8 (C_q), 136.1 (CH), 141.9 (CH), 192.8 (C=O).

GC-MS: $R_t = 12.04$ min; m/z (%) = 368 (5) [M]⁺, 353 (1) [M – CH₃]⁺, 339 (1) [M – CHO]⁺, 325 (1) [M – C₂H₃O]⁺, 311 (15) [M – C₄H₉]⁺, 283 (4), 179 (50), 151 (100), 73 (76) [C₃H₅O₂]⁺.

C₁₉H₃₆O₃Si₂ 368.66

(1*R*,2*R*,5*S*,6*S*,7*S*,8*R*,11*S*,12*S*)-5,6,11,12-Tetrahydroxy-tricyclo[6.2.2.0^{2,7}]dodeca-3,9-diene-1,4-dicarbonsäuredimethylester (155)



380 mg (2.2 mmol) des Methylesters **133** werden in 5 mL Wasser gelöst und für 24 h auf 50 °C erwärmt. Anschließend wird nach Filtration das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (SiO₂, EE/MeOH = 7:1) gereinigt. Es werden 254 mg (67 %) einer zähen schwachgelben Substanz erhalten.

DC (SiO₂): $R_f = 0.36$ (EE/MeOH = 7:1)

¹H-NMR (CDCl₃): $\delta = 2.89$ (m, 1 H), 3.05 (m, 1 H), 3.14 (dd, $J = 9.5, 1.2$ Hz, 1 H), 3.45 (t, $J = 3.0$ Hz, 1 H), 3.75 (s, 3 H), 3.85 (s, 3 H), 3.89 (t, $J = 6.0$ Hz, 2 H), 4.31 (d, $J = 5.6$ Hz, 1 H), 6.27 (m, 2 H), 6.51 (d, $J = 2.7$ Hz, 1 H).

¹³C-NMR (CDCl₃): $\delta = 34.5$ (CH), 41.4 (CH), 44.4 (CH), 52.4 (CH), 52.9 (CH), 57.5 (C_q), 68.3 (CH), 72.5 (CH), 79.5 (CH), 80.4 (CH), 128.9 (CH), 134.1 (CH), 135.4 (C_q), 141.6 (CH), 174.5 (2 x C=O).

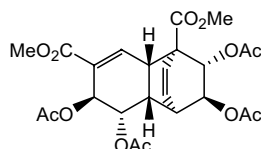
MS: m/z (%) = 340 (1) [M]⁺, 322 (2) [M – H₂O]⁺, 304 (3) [M – 2 x H₂O]⁺, 290 (15) [M – 2 x H₂O, OH]⁺, 272 (35) [M – 2 x H₂O, 2 x OH]⁺, 244 (20), 231 (20), 213 (20), 199 (20), 179 (19), 170 (33), 153 (100), 138 (83), 121 (47), 110 (67).

HR-MS: C₁₆H₁₈O₇, ([M – H₂O]⁺)
berechnet: 322.1053 gefunden: 322.1054

Drehwert: $[\alpha]_D^{20} = +55.1$ (in H₂O, $c = 1.3$)

C₁₆H₂₀O₈ 340.33

(1*R*,2*R*,5*S*,6*S*,7*S*,8*R*,11*S*,12*S*)-5,6,11,12-Tetraacetoxy-tricyclo[6.2.2.0^{2,7}]dodeca-3,9-dien-1,4-dicarbonsäuredimethylester (159**)**



112 mg (0.33 mmol) des Dimers **155** werden in 3 mL einer 2 :1 Mischung aus Pyridin und Essigsäureanhydrid gelöst und für 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird mit 15 mL EE verdünnt, das Pyridin mit 5 mL HCl (2 M) Salzsäure ausgeschüttelt, die organische Phase über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel nach Filtration im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch (SiO₂, Gradient Isohexan/EE = 4:1 → EE) gereinigt. Es werden 60 mg (34 %) des acetylierten Produktes **159** in Form eines gelblichen Öls erhalten.

¹H-NMR (CDCl₃): δ = 1.97 (s, 3 H), 2.02 (s, 6 H), 2.10 (s, 3 H), 2.96 (dd, *J* = 6.7, 3.2 Hz, 1 H), 3.11 (dd, *J* = 8.3, 7.2 Hz, 1 H), 3.32 (ddd, *J* = 9.2, 2.7, 1.1 Hz, 1 H), 3.72 (s, 3 H), 3.80 (s, 3 H), 4.52 (pt, *J* = 3.0 Hz, 1 H), 5.23 (m, 2 H), 5.61 (d, *J* = 6.8 Hz, 1 H), 6.28 (dd, *J* = 8.3, 6.9 Hz, 1 H), 6.51 (d, *J* = 8.3 Hz, 1 H), 6.59 (d, *J* = 2.9 Hz, 1 H).

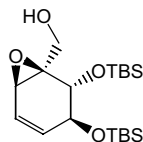
¹³C-NMR (CDCl₃): δ = 20.8 (CH₃), 21.0 (CH₃), 21.1 (CH₃), 21.2 (CH₃), 32.1 (CH), 36.7 (CH), 41.8 (CH), 52.3 (CH), 53.0 (CH), 53.5 (C_q), 65.8 (CH), 70.5 (CH), 77.1 (2×CH), 130.1 (CH), 130.7 (CH), 131.8 (C_q), 140.4 (CH), 165.0 (C=O), 169.8 (C=O), 169.9 (C=O), 170.2 (C=O), 170.3 (C=O), 170.9 (C=O).

MS: *m/z* (%) = 508 (1) [M]⁺, 477 (1) [M – OCH₃]⁺, 449 (1) [M – CO₂CH₃]⁺, 406 (10) [M – CO₂CH₃, CH₃CO]⁺, 389 (3), 375 (3), 347 (5), 213 (20), 152 (100).

HR-MS: berechnet: 508.1581 gefunden: 508.1598

C₂₄H₂₈O₁₂ 508.47

(1*R*,2*R*,3*S*,6*R*)-[2,3-Bis-(*tert*-butyldimethylsilanyloxy)-1-hydroxymethyl]-7-oxa-bicyclo[4.1.0]hept-4-en (163)



Zu einer Lösung von 117 mg (0.32 mmol) des Alkohols **150** in 15 mL Dichlormethan werden 155 mg (1.0 mmol) Natriumhydrogencarbonat und portionsweise 180 mg 50-80 %ige *m*-CPBA gegeben. Die Reaktionslösung wird mit je 5 mL gesättigter NaHCO₃-, NaSO₄- und NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und nach Filtration im Vakuum getrocknet. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch (SiO₂, Isohexan/EE = 7:3) gereinigt und es werden 113 mg (91 %) eines farblosen Öls erhalten.

DC (SiO₂): $R_f = 0.47$ (Isohexan/EE = 7:3)

¹H-NMR (CDCl₃): $\delta = 0.09$ (s, 3 H, CH₃), 0.10 (s, 3 H, CH₃), 0.13 (s, 3 H, CH₃), 0.17 (s, 3 H, CH₃), 0.85 (s, 9 H, C(CH₃)₃), 0.87 (s, 9 H, C(CH₃)₃), 3.33 (d, $J = 3.1$ Hz, 1 H), 3.69 (d, $J = 12.3$ Hz, 1 H), 3.91 (d, $J = 5.5$ Hz, 1 H), 4.02 (d, $J = 12.3$, 1 H), 4.26 (ddd, $J = 5.5, 3.6, 1.2$ Hz, 1 H), 5.89 (ddd, $J = 9.8, 3.6, 0.9$ Hz, 1 H), 6.03 (ddd, $J = 9.8, 3.1, 1.2$ Hz, 1 H).

¹³C-NMR (CDCl₃): $\delta = -4.6$ (CH₃), -4.2 (CH₃), -4.1 (CH₃), -4.0 (CH₃), 18.2 (C(CH₃)₃), 18.3 (C(CH₃)₃), 26.0 (C(CH₃)₃), 26.1 (C(CH₃)₃), 51.5 (CH), 62.5 (CH₂), 64.2 (C_q), 71.0 (CH), 74.0 (CH), 125.2 (CH), 137.7 (CH).

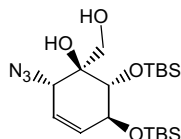
GC-MS: $R_t = 12.13$ min; m/z (%) = 386 (2) [M]⁺, 370 (2) [M – O]⁺, 339 (2) [M – O, OCH₃]⁺, 329 (5) [M – C₄H₉]⁺, 311 (18) [M – C₄H₁₁O]⁺, 299 (17) [M – C₆H₁₅]⁺, 271 (2) [M – C₆H₁₅Si]⁺, 89 (10) [C₇H₅]⁺, 73 (100) [C₃H₅O₂]⁺.

HR-MS: berechnet: 386.2309 gefunden: 386.2315

Drehwert: $[\alpha]_D^{20} = +109.4$ (in CHCl₃, $c = 1.1$)

C₁₉H₃₈O₄Si₂ 386.67

(1*S*,2*S*,5*S*,6*R*)-2-Azido-5,6-bis-(*tert*-butyldimethylsilanyloxy)-1-hydroxymethylcyclohex-3-enol (178)



Eine Mischung aus 27 mg (0.07 mmol) des Epoxids **163** und 33 mg (0.10 mmol) Tributylzinnazid wird 24 h bei 55 °C gerührt. Anschließend werden 2 mL Diethylether und 1 mL H₂O zugegeben und weitere 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Die organische Phase wird über MgSO₄ getrocknet und nach Filtration das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch (SiO₂, Isohexan/EE = 12:1) gereinigt und es werden 18 mg (61 %) eines farblosen Öls erhalten.

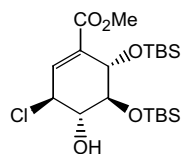
DC (SiO₂): $R_f = 0.14$ (Isohexan/EE = 12:1)

¹H-NMR (CDCl₃): $\delta = 0.14$ (s, 3 H, CH₃), 0.16 (s, 3 H, CH₃), 0.17 (s, 3 H, CH₃), 0.18 (s, 3 H, CH₃), 0.90 (s, 9 H, C(CH₃)₃), 0.91 (s, 9 H, C(CH₃)₃), 2.24 (dd, $J = 9.5, 4.0$ Hz, OH), 3.65 (m, 2 H), 3.86 (dd, $J = 10.6, 1.6$ Hz, 1 H), 3.93 (dd, $J = 2.8, 1.1$ Hz, 1 H), 4.16 (dd, $J = 4.6, 2.8$ Hz, 1 H), 4.66 (d, $J = 1.3$ Hz, OH), 5.93 (dd, $J = 10.2, 4.3$ Hz, 1 H), 6.09 (tdd, $J = 10.2, 4.6, 1.3$ Hz, 1 H).

¹³C-NMR (CDCl₃): $\delta = -4.5$ (2 x CH₃), -4.3 (2 x CH₃), 18.0 (C(CH₃)₃), 18.4 (C(CH₃)₃), 25.8 (C(CH₃)₃), 26.0 (C(CH₃)₃), 60.0 (CH), 64.2 (CH₂), 69.5 (CH), 69.8 (C_q), 74.7 (CH), 124.8 (CH), 130.3 (CH).

C₁₉H₃₉N₃O₄Si₂ 429.70

(3*S*,4*S*,5*S*,6*S*)-5,6-Bis-(*tert*-butyldimethylsilanyloxy)-3-chloro-4-hydroxycyclohex-1-en-carbonsäuremethylester (179)



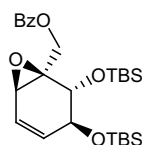
12 mL einer 0.1 M Dilithiumtetrachlorocuprat(II)-Lösung werden unter Rühren in Stickstoffatmosphäre zu einer Lösung aus 34 mg (0.08 mmol) des Epoxids **160** in 5 mL trockenem THF gegeben. Das Reaktionsgemisch wird 48 h bei Raumtemperatur gerührt, einige mL Phosphatpuffer (pH 7) zugegeben und mit Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO₄ getrocknet und nach Filtration im Vakuum bis zur Trockene eingeeengt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch über eine Kieselgelkartusche gereinigt und es werden 4 mg (10 %) eines öligen, gelben Produktes erhalten.

¹H-NMR (CDCl₃): δ = 0.10 (s, 3 H, CH₃), 0.11 (s, 6 H, 2 x CH₃), 0.24 (s, 3 H, CH₃), 0.85 (s, 9 H, C(CH₃)₃), 0.87 (s, 9 H, C(CH₃)₃), 3.82 (s, 3 H), 3.97 (m, 1 H), 4.22 (d, *J* = 10.0 Hz, 1 H), 4.44 (m, 1 H), 4.86 (m, 1 H), 6.88 (pt, *J* = 1.8 Hz, 1 H).

¹³C-NMR (CDCl₃): δ = -4.5 (2 x CH₃), -4.3 (2 x CH₃), 18.0 (C(CH₃)₃), 18.4 (C(CH₃)₃), 25.8 (2 x C(CH₃)₃), 38.9 (CH), 52.3 (CH₃), 57.5 (CH), 67.7 (CH), 70.8 (CH), 129.0 (C_q), 138.6 (CH), 164.4 (C=O).

C₂₀H₃₉ClO₅Si₂ 451.14

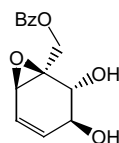
(1*R*,2*R*,3*S*,6*R*)-Benzoessäure-2,3-bis-(*tert*-butyldimethylsilanyloxy)-7-oxa-bicyclo[4.1.0]hept-4-en-1-ylmethylester (183)



275 mg (0.7 mmol) von **163** werden bei -5 °C in Pyridin gelöst und mit 120 µL (1.0 mmol) Benzoylchlorid versetzt. Das Reaktionsgemisch wird für 6 h gerührt und dabei langsam auf Raumtemperatur erwärmt. Anschließend wird mit 80 mL EE verdünnt und mit je 10 mL 1 M Salzsäure, gesättigter NaHCO₃-Lösung und Wasser gewaschen. Die organische Phase wird über MgSO₄ getrocknet und nach Filtration im Vakuum bis zur Trockene eingeeengt. Die erhaltene gelbe Rohsubstanz wird säulenchromatographisch (SiO₂, Isohexan/EE = 12:1) gereinigt und es werden 258 mg (75 %) eines farblosen Öls erhalten.

DC (SiO ₂):	$R_f = 0.34$ (Isohexan/EE = 12:1)
¹ H-NMR (CDCl ₃):	$\delta = 0.09$ (s, 3 H, CH ₃), 0.12 (s, 6 H, 2 x CH ₃), 0.13 (s, 3 H, CH ₃), 0.91 (s, 9 H, C(CH ₃) ₃), 0.92 (s, 9 H, C(CH ₃) ₃), 3.34 (d, $J = 3.3$ Hz, 1 H), 4.09 (d, $J = 4.4$ Hz, 1 H), 4.25 (t, $J = 4.4$ Hz, 1 H), 4.45 (d, $J = 12.2$ Hz, 1 H), 4.75 (d, $J = 12.2$, 1 H), 5.92 (dd, $J = 9.8, 4.4$ Hz, 1 H), 6.08 (dd, $J = 9.8, 3.3$ Hz, 1 H), 7.45 (t, $J = 7.7$ Hz, 2 H), 7.59 (t, $J = 7.3$ Hz, 1 H), 8.07 (d, $J = 7.3$ Hz, 2 H).
¹³ C-NMR (CDCl ₃):	$\delta = -4.7$ (CH ₃), -4.2 (CH ₃), -4.1 (CH ₃), -4.0 (CH ₃), 18.2 (C(CH ₃) ₃), 18.3 (C(CH ₃) ₃), 26.0 (C(CH ₃) ₃), 26.1 (C(CH ₃) ₃), 50.4 (CH), 63.2 (C _q), 64.3 (CH ₂), 70.2 (CH), 72.3 (CH), 125.5 (CH), 128.5 (CH), 128.6 (CH), 128.8 (C _q), 129.9 (CH), 130.0 (CH), 133.3 (CH), 136.5 (CH), 166.3 (C=O).
GC-MS:	$R_t = 16.48$ min; m/z (%) = 490 (7) [M] ⁺ , 461 (5), 433 (25) [M – C ₄ H ₉] ⁺ , 311 (36), 237 (8), 209 (8), 179 (94), 105 (100), 73 (71).
HR-MS:	berechnet: 490.2571 gefunden: 490.2574
Drehwert:	$[\alpha]_D^{20} = +102.2$ (in CHCl ₃ , $c = 1.0$)
C ₂₆ H ₄₂ O ₅ Si ₂	490.78

(1*S*,2*R*,3*S*,6*R*)-Benzoessäure-2,3-dihydroxy-7-oxa-bicyclo[4.1.0]hept-4-en-1-ylmethylester (184)



Zu einer Lösung von 85 mg (0.17 mmol) des silylierten Epoxids **183** in 25 mL trockenem THF werden bei -78 °C 0.75 mL einer 1 M TBAF-Lösung (in THF) gegeben. Das Reaktionsgemisch wird unter Rühren langsam auf Raumtemperatur erwärmt, mit 20 mL EE

Experimenteller Teil

verdünnt und mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wird über MgSO_4 getrocknet und nach Filtration im Vakuum bis zur Trockene eingengt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch (SiO_2 , Gradient Isohexan/EE = 1:1 $\rightarrow$ EE) gereinigt. Es werden 26 mg (64 %) einer farblosen zähen Flüssigkeit erhalten.

DC (SiO_2): $R_f = 0.14$ (Isohexan/EE = 1:1)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 2.21$ (d, $J = 12.0$ Hz, OH), 2.72 (d, $J = 7.0$ Hz, OH), 3.51 (m, 1 H), 4.12 (ddd, $J = 12.0, 5.4, 2.4$, 1 H), 4.18 (d, $J = 12.6$ Hz, 1 H), 4.33 (d, $J = 7.0$ Hz, 1 H), 5.25 (d, $J = 12.6$ Hz, 1 H), 6.31 (m, 2 H), 7.46 (t, $J = 7.6$ Hz, 2 H), 7.61 (t, $J = 7.6$ Hz, 1 H), 8.09 (d, $J = 7.8$ Hz, 2 H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 51.5$ (CH), 64.8 (CH_2), 65.0 (C_q), 66.6 (CH), 68.0 (CH), 127.3 (CH), 128.8 ($2\times\text{CH}$), 129.4 (C_q), 130.2 ($2\times\text{CH}$), 133.9 (CH), 134.4 (CH), 167.2 (C=O).

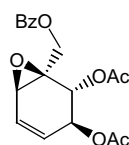
GC-MS: $R_t = 13.68$ min; m/z (%) = 263 (1) $[\text{M} + 1 \text{ H}]^+$, 244 (1) $[\text{M} - \text{H}_2\text{O}]^+$, 215 (10), 140 (27), 105 (100), 77 (41).

HR-MS: berechnet: 262.0841 gefunden: 262.0839

Drehwert: $[\alpha]_D^{20} = +197.2$ (in CH_2Cl_2 , $c = 0.9$)

$\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{O}_5$ 262.26

(1*R*,2*R*,3*S*,6*R*)-Benzoessäure-2,3-diacetoxy-7-oxa-bicyclo[4.1.0]hept-4-en-1-yl-methylester (*ent*-Senepoxid, *ent*-63)



Bei 0°C werden zu 90 mg (0.34 mmol) des Diols **184** 4 mL einer 2:1 Mischung aus Pyridin und Essigsäureanhydrid gegeben. Nach Zugabe von 10 mg DMAP wird für 1 h gerührt und

dabei auf Raumtemperatur erwärmt. Anschließend wird mit 50 mL EE verdünnt und mit 15 mL 1 M Salzsäure ausgeschüttelt. Die organische Phase wird über MgSO_4 getrocknet, filtriert, im Vakuum das Lösungsmittel entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (SiO_2 , n -Hexan/EE = 1:1) gereinigt. Es werden 112 mg (95 %) eines farblosen Öls erhalten.

DC (SiO_2): $R_f = 0.42$ (n -Hexan/EE = 1:1)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 2.06$ (s, 3 H, CH_3), 2.08 (s, 3 H, CH_3), 3.46 (d, $J = 4.1$, 1 H), 4.23 (d, $J = 12.4$ Hz, 1 H), 4.84 (d, $J = 12.4$ Hz, 1 H), 5.18 (dd, $J = 5.7$, 2.2 Hz, 1 H), 5.57 (d, $J = 1.0$ Hz, 1 H), 6.07 (dd, $J = 9.9$, 4.1 Hz, 1 H), 6.37 (dd, $J = 9.9$, 4.1 Hz, 1 H), 7.45 (t, $J = 6.4$ Hz, 2 H), 7.58 (t, $J = 7.2$ Hz, 1 H), 8.05 (d, $J = 7.2$ Hz, 2 H).

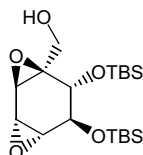
$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 20.9$ (CH_3), 21.2 (CH_3), 49.8 (CH), 61.8 (CH), 64.2 (CH_2), 67.0 (CH), 67.5 (C_q), 128.7 ($2\times\text{CH}$), 128.9 (CH), 129.2 (CH), 129.5 (C_q), 130.0 ($2\times\text{CH}$), 133.6 (CH), 166.2 (C=O), 169.5 (C=O), 170.3 (C=O).

GC-MS: $R_t = 14.25$ min; m/z (%) = 346 (1) $[\text{M}]^+$, 304 (2) $[\text{M} - \text{COCH}_3]^+$, 287 (1) $[\text{M} - \text{CO}_2\text{CH}_3]^+$, 244 (4) $[\text{M} - \text{CO}_2\text{CH}_3, \text{COCH}_3]^+$, 141 (18) $[\text{C}_7\text{H}_9\text{O}_3]^+$, 122 (12) $[\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_2]^+$, 105 (100).

Drehwert: $[\alpha]_D^{20} = +196.7$ (in CHCl_3 , $c = 2.2$)
(Lit: $[\alpha]_D^{25} = -197$, $c = 1.2$, CHCl_3 , für (–)-**63**)

$\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{O}_7$ 346.33

(1*S*,2*R*,3*S*,4*R*,5*R*,6*R*)-[5,6-Bis-(*tert*-butyl-dimethylsilanyloxy)-4-hydroxymethyl]-3,8-dioxo-tricyclo[5.1.0.0^{2,4}]octan (164)



Zu einer Lösung von 106 mg (0.29 mmol) des Alkohols **150** in 20 mL Dichlormethan werden 300 mg (1.9 mmol) Natriumhydrogencarbonat und portionsweise 400 mg 50-80 %ige wässrige *m*-CPBA gegeben. Die Reaktionslösung wird mit je 10 mL gesättigter NaHCO₃-, NaSO₄- und NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und nach Filtration im Vakuum getrocknet. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch (SiO₂, Isohexan/EE = 7:3) gereinigt und es werden 84 mg (73 %) eines farblosen Öls erhalten.

DC (SiO₂): $R_f = 0.53$ (Isohexan/EE = 7:3)

¹H-NMR (CDCl₃): $\delta = 0.12$ (s, 3 H, CH₃), 0.13 (s, 3 H, CH₃), 0.15 (s, 3 H, CH₃), 0.17 (s, 3 H, CH₃), 0.92 (s, 9 H, C(CH₃)₃), 0.94 (s, 9 H, C(CH₃)₃), 3.08 (d, $J = 3.8$ Hz, 1 H), 3.40 (d, $J = 3.8$ Hz, 1 H), 3.48 (dd, $J = 12.5, 7.5$ Hz, 1 H), 3.50 (s, 1 H), 3.70 (m, 2 H), 3.96 (dd, $J = 12.5, 6.7$ Hz, 1 H).

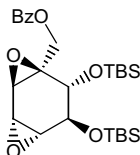
¹³C-NMR (CDCl₃): $\delta = -4.63$ (CH₃), -4.60 (CH₃), -4.13 (CH₃), -4.06 (CH₃), 18.2 (C(CH₃)₃), 18.4 (C(CH₃)₃), 26.0 (C(CH₃)₃), 26.1 (C(CH₃)₃), 49.6 (CH), 54.3 (CH), 57.9 (CH), 61.6 (C_q), 62.0 (CH₂), 72.2 (CH), 74.1 (CH).

GC-MS: $R_t = 13.76$ min; m/z (%) = 368 (1) [M – 2 x OH]⁺, 311 (5) [M – 2 x OH, C₄H₉]⁺, 299 (1), 288 (1), 231 (7), 167 (10), 147 (36), 73 (100) [C₃H₅O₂]⁺.

Drehwert: $[\alpha]_D^{20} = +13.02$ (in CHCl₃, $c = 0.8$)

C₁₉H₃₈O₅Si₂ 402.67

(1*S*,2*R*,3*S*,4*R*,5*R*,6*R*)-Benzoessäure-5,6-bis-(*tert*-butyldimethylsilanyloxy)-3,8-dioxa-tricyclo[5.1.0.0^{2,4}]-oct-4-yl-methylester (180)



84 mg (0.21 mmol) des Bisepoxids **164** werden bei $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ in 2 mL Pyridin gelöst und mit 50 μL (0.36 mmol) Benzoylchlorid versetzt. Das Reaktionsgemisch wird für 6 h gerührt und dabei langsam auf Raumtemperatur erwärmt. Anschließend wird mit 20 mL EE verdünnt und mit je 5 mL 1 M Salzsäure, gesättigter NaHCO_3 -Lösung und Wasser gewaschen. Die organische Phase wird über MgSO_4 getrocknet und nach Filtration im Vakuum bis zur Trockene eingengt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch (SiO_2 , Isohexan/EE = 12:1) gereinigt und es werden 78 mg (73 %) eines farblosen Öls erhalten.

DC (SiO_2): $R_f = 0.21$ (Isohexan/EE = 12 : 1)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 0.13$ (s, 3 H, CH_3), 0.14 (s, 3 H, CH_3), 0.16 (s, 3 H, CH_3), 0.17 (s, 3 H, CH_3), 0.94 (s, 9 H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 0.95 (s, 9 H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 3.12 (m, 1 H), 3.43 (d, $J = 3.7$ Hz, 1 H), 3.57 (s, 1 H), 3.77 (dd, $J = 15.4, 7.8$ Hz, 2 H), 4.52 (dd, $J = 21.1, 12.6$ Hz, 2 H), 7.44 (t, $J = 7.6$ Hz, 2 H), 7.56 (t, $J = 7.6$ Hz, 1 H), 8.01 (d, $J = 7.8$ Hz, 2 H).

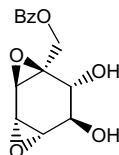
$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = -4.6$ (CH_3), -4.5 (CH_3), -4.2 (CH_3), -4.1 (CH_3), 18.3 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 18.4 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 26.13 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 26.15 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 49.5 (CH), 53.5 (CH), 58.0 (CH), 60.3 (C_q), 62.6 (CH_2), 71.7 (CH), 73.5 (CH), 128.6 (2 x CH), 129.8 (2 x C_H , 1x C_q), 133.4 (CH), 166.0 ($\text{C}=\text{O}$).

GC-MS: $R_t = 17.81$ min; m/z (%) = 491 (1) $[\text{M} - \text{O} + \text{H}]^+$, 474 (1) $[\text{M} - 2 \times \text{O}]^+$, 449 (13) $[\text{M} - \text{C}_4\text{H}_9]^+$, 327 (9), 253 (6), 231 (5), 179 (35), 147 (20), 105 (100).

Drehwert: $[\alpha]_D^{20} = +48.08$ (in CHCl_3 , $c = 0.5$)

$\text{C}_{26}\text{H}_{42}\text{O}_6\text{Si}_2$ 506.78

(1*S*,2*R*,3*S*,4*S*,5*R*,6*R*)-Benzoessäure-5,6-dihydroxy-3,8-dioxa-tricyclo[5.1.0.0^{2,4}]-oct-4-ylmethylester (181)



Zu einer Lösung von 250 mg (0.49 mmol) des silylierten Bisepoxids **180** in 25 mL trockenem THF werden bei $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1.2 mL einer 1 M TBAF-Lösung (in THF) gegeben. Das Reaktionsgemisch wird unter Rühren langsam auf Raumtemperatur erwärmt, mit 50 mL EE verdünnt und mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wird über MgSO_4 getrocknet und nach Filtration im Vakuum bis zur Trockene eingeeengt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch (SiO_2 , $n\text{-Hexan/EE} = 1:2$) gereinigt und es werden 91 mg (64 %) einer farblosen zähen Flüssigkeit erhalten.

DC (SiO_2): $R_f = 0.58$ ($n\text{-Hexan/EE} = 1:2$)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 2.65$ (d, $J = 12.5$ Hz, OH), 2.76 (d, $J = 12.5$ Hz, OH), 3.51 (br s, 1 H), 3.73 (m, 2 H), 4.24 (m, 2 H), 4.26 (d, $J = 12.5$ Hz, 1 H), 4.90 (d, $J = 12.5$ Hz, 1 H), 7.45 (t, $J = 7.7$ Hz, 2 H), 7.59 (t, $J = 7.3$ Hz, 1 H), 8.04 (d, $J = 7.7$ Hz, 2 H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 51.6$ (CH), 54.7 (CH), 55.5 (CH), 62.0 (C_q), 63.7 (CH_2), 67.4 (CH), 67.5 (CH), 128.7 (2 x CH), 129.5 (C_q), 129.9 (2 x CH), 133.6 (CH), 166.1 (C=O).

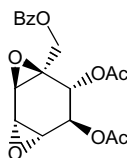
GC-MS: $R_t = 13.92$ min; m/z (%) = 281 (1) $[\text{M} + 3 \text{ H}]^+$, 267 (1), 253 (1), 231 (2), 156 (3), 123 (16), 105 (100), 77 (36).

Elementaranalyse:	berechnet:	C: 60.43	H: 5.07	O: 34.5
	gemessen:	C: 59.53	H: 5.719	

Drehwert: $[\alpha]_D^{20} = +11.17$ (in CHCl_3 , $c = 1.1$)

$\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{O}_6$ 278.26

(1*S*,2*R*,3*S*,4*R*,5*R*,6*R*)-Benzoessäure-5,6-diacetoxy-3,8-dioxatricyclo[5.1.0.0^{2,4}]oct-4-yl-methylester (*iso*-Crotepoxid, **182)**



Bei 0 °C werden zu 23 mg (0.08 mmol) des Diols **181** 0.7 mL einer 2:1 Mischung aus Pyridin und Essigsäureanhydrid gegeben. Nach Zugabe von 3 mg DMAP wird für 1 h gerührt und dabei auf Raumtemperatur erwärmt. Anschließend wird mit 20 mL EE verdünnt und mit 5 mL 1 M Salzsäure ausgeschüttelt. Die organische Phase wird über MgSO₄ getrocknet, im Vakuum das Lösungsmittel entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (SiO₂, *n*-Hexan/EE = 1:1) gereinigt. Es werden 28.5 mg (95 %) eines farblosen Öls erhalten.

DC (SiO₂): $R_f = 0.38$ (*n*-Hexan/EE = 1:1)

¹H-NMR (CDCl₃): $\delta = 2.10$ (s, 3 H, CH₃), 2.16 (s, 3 H, CH₃), 3.28 (s, 1 H), 3.62 (dd, $J = 3.8, 1.9, 1$ H), 3.66 (s, 1 H), 4.10 (d, $J = 12.6$ Hz, 1 H), 4.72 (d, $J = 12.6$ Hz, 1 H), 5.18 (s, 1 H), 5.41 (s, 1 H), 7.46 (t, $J = 7.3$ Hz, 2 H), 7.59 (t, $J = 7.3, 1$ H), 8.03 (d, $J = 8.4$ Hz, 2 H).

¹³C-NMR (CDCl₃): $\delta = 20.7$ (CH₃), 20.9 (CH₃), 49.7 (CH), 50.9 (CH), 53.8 (CH), 57.3 (CH), 64.2 (CH₂), 66.8 (CH), 67.1 (Cq), 128.5 (2 x CH), 129.2 (Cq), 129.8 (2 x CH), 133.4 (CH), 165.8 (C=O), 169.3 (C=O), 169.6 (C=O).

GC-MS: $R_t = 14.80$ min; m/z (%) = 362 (1) [M]⁺, 345 (2) [M – OH]⁺, 319 (1) [M – COCH₃]⁺, 303 (2) [M – CO₂CH₃]⁺, 260 (4) [M – CO₂CH₃, COCH₃]⁺, 231 (6), 138 (10), 105 (100), 77 (20).

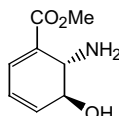
HR-MS: berechnet: 362.1002 gefunden: 362.09964

Drehwert: $[\alpha]_D^{20} = +4.58$ (in CHCl₃, $c = 1.0$)

C₁₈H₁₈O₈ 362.33

5.3.5 Synthesen ausgehend von 2,3-*trans*-CHA (2)

(5*S*,6*S*)-6-Amino-5-hydroxy-cyclohexa-1,3-dien-carbonsäuremethylester (128)



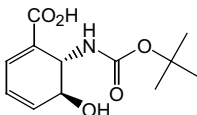
200 mg 2,3-*trans*-CHA (2) werden in 50 mL einer 1.25 M methanolischen Chlorwasserstoffsäurelösung gelöst und für 6 Tage bei Raumtemperatur gerührt. Nach dieser Zeit ist mittels HPLC-Reaktionskontrolle kein Edukt mehr zu sehen und die Reaktionslösung wird durch Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum aufgearbeitet. Dabei werden 208 mg (95 %) eines festen gelblichen Schaums erhalten, der das Produkt mit einer Reinheit > 90 % enthält.

Die analytischen Daten ($^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$) sind, abgesehen vom Drehwert, identisch mit denen der racemischen Verbindung *rac*-128.

Drehwert: $[\alpha]_D^{20} + 131.2$ (in MeOH, $c = 1.0$)

$\text{C}_8\text{H}_{11}\text{NO}_3$ 169.18

(5*S*,6*S*)-6-*tert*-Butoxycarbonylamino-5-hydroxy-cyclohexa-1,3-dien-carbonsäure (191)



200 mg (1.29 mmol) 2,3-*trans*-CHA (2) werden in 12 mL einer Dioxan-Wasser-Mischung gelöst und auf 0 °C gekühlt. Unter Rühren werden zunächst 4 mL 1 M NaOH-Lösung und danach 309 mg (1.42 mmol) Di-*tert*-butyldicarbonat zugegeben. Das Reaktionsgemisch wird für 16 h gerührt und dabei langsam auf Raumtemperatur erwärmt. Anschließend wird zweimal mit je 5 mL Petrolether das überschüssige Reagenz entfernt, die wässrige Phase

unter Eiskühlung mit 10 mL EE versetzt, mit gesättigter KHSO₄-Lösung auf pH 3 angesäuert und die wässrige Phase zweimal mit EE extrahiert. Die organische Phase wird einmal mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Nach Filtration wird im Vakuum das Lösungsmittel entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (RP18, MeOH/H₂O = 1:1) gereinigt. Es werden 346 mg (63 %) eines gelblichen Feststoffs erhalten.

DC (SiO₂): $R_f = 0.66$ (MeOH/H₂O = 1:1)

¹H-NMR (CDCl₃): $\delta = 1.36$ (s, 9 H, C(CH₃)₃), 4.05 (dd, $J = 4.7, 1.7$ Hz, 1 H), 4.59 (s, 1 H), 6.21 (m, 2 H), 7.10 (dd, $J = 5.0, 1.1$ Hz, 1 H).

¹³C-NMR (CDCl₃): $\delta = 28.9$ (C(CH₃)₃), 50.6 (CH), 68.3 (CH), 80.4 (C(CH₃)₃), 126.0 (CH), 128.6 (C_q), 133.5 (CH), 135.2 (CH), 158.0 (C=O), 169.6 (C=O).

MS: m/z (%) = 255 (1) [M]⁺, 237 (1) [M – H₂O]⁺, 199 (50) [M – C₄H₈]⁺, 155 (29) [M – C₅H₈O₂]⁺, 138 (52) [M – C₅H₁₀NO₂]⁺, 108 (24), 88 (31), 59 (100).

HR-MS: berechnet: 255.1107 gefunden: 255.1107

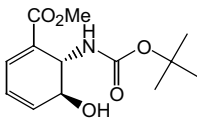
HPLC: $R_t = 35.4$ min

Drehwert: $[\alpha]_D^{20} = +231.6$ (in MeOH, $c = 0.6$)

Schmelzpunkt 188 °C

C₁₂H₁₇NO₅ 255.27

(5*S*,6*S*)-6-*tert*-Butoxycarbonylamino-5-hydroxy-cyclohexa-1,3-dien-carbonsäure-methylester (192)



150 mg (0.89 mmol) des Methylesters **128** werden in 9 mL einer Dioxan-Wasser-Mischung gelöst und auf 0 °C gekühlt. Unter Rühren werden zunächst 3 mL 1 M NaOH-Lösung und danach 214 mg (0.98 mmol) Di-*tert*-butyldicarbonat zugegeben. Das Reaktionsgemisch wird für 72 h gerührt und dabei langsam auf Raumtemperatur erwärmt. Anschließend wird die wässrige Phase unter Eiskühlung mit 10 mL EE versetzt, mit gesättigter KHSO₄-Lösung auf pH 3 angesäuert und die wässrige Phase zweimal mit EE extrahiert. Die organische Phase wird einmal mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Nach Filtration wird im Vakuum das Lösungsmittel entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (SiO₂, Isohexan/EE = 1:2) gereinigt. Es werden 58 mg (24 %) eines zähen Öls erhalten.

DC (SiO₂): $R_f = 0.31$ (Isohexan/EE = 1:2)

¹H-NMR (CDCl₃): $\delta = 1.42$ (s, 9 H, C(CH₃)₃), 3.75 (s, 3 H), 4.32 (br s, 1 H (OH)), 4.49 (d, $J = 8.0$ Hz, 1 H), 4.74 (dd, $J = 8.0, 2.1$ Hz, 1 H), 6.26 (m, 2 H), 7.17 (d, $J = 4.6$ Hz, 1 H).

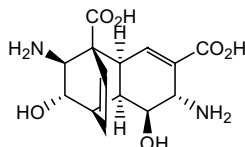
¹³C-NMR (CDCl₃): $\delta = 28.3$ (C(CH₃)₃), 49.8 (CH), 52.0 (CH₃), 67.3 (CH), 80.1 (C(CH₃)₃), 124.5 (CH), 126.8 (C_q), 132.7 (CH), 133.9 (CH), 155.5 (C=O), 166.4 (C=O).

GC-MS: $R_t = 12.26$ min; m/z (%) = 269 (1) [M]⁺, 253 (1) [M – O]⁺, 213 (57) [M – C₄H₈]⁺, 169 (43) [M – C₅H₈O₂]⁺, 152 (75) [M – C₅H₁₀NO₂]⁺, 108 (37), 59 (100).

Drehwert: $[\alpha]_D^{20} = +352.4$ (in CHCl₃, $c = 1.1$)

C₁₃H₁₉NO₅ 352.4

(1*R*,2*R*,5*S*,6*S*,7*S*,8*R*,11*S*,12*S*)-5,11-Diamino-6,12-dihydroxy-tricyclo[6.2.2.0^{2,7}]deca-3,9-dien-1,4-dicarbonsäure (193**)**



170 mg (1.0 mmol) des Methylesters **128** werden in 3 mL Wasser gelöst und für 14 Tage auf 75 °C erwärmt. Nach dieser Zeit ist durch HPLC-Messung kein monomeres Edukt mehr zu erkennen. Die Reaktionslösung wird bis zur Trockene eingeeengt, mit kaltem Methanol gewaschen und aus wässriger Lösung bei 4 °C kristallisiert. Es werden 114 mg **193** in Form von dünnen Nadeln erhalten. Erneute Umkristallisation aus einem Ethanol/Wasser-Gemisch ergibt größere Kristalle, die für eine Röntgenstrukturanalyse genutzt werden können. Diese Kristalle zerfallen allerdings beim Trocknen im Vakuum.

Alternativ kann die Reaktion in einer 5 M Lithiumchloridlösung durchgeführt werden. Dabei verkürzt sich die Reaktionszeit auf 7 Tage bei einer Reaktionstemperatur von 65 °C.

DC (SiO₂): $R_f = 0.36$ (EE/MeOH = 7:1)

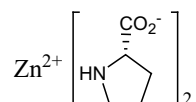
¹H-NMR (D₂O): $\delta = 2.96$ (t, $J = 7.6$ Hz, 1 H), 3.02 (m, 1 H), 3.24 (m, 1 H), 3.35 (d, $J = 4.4$ Hz, 1 H), 3.60 (m, 2 H), 4.03 (dd, $J = 9.8, 6.5$ Hz, 1 H), 6.32 (m, 2 H), 6.59 (m, 1 H).

¹³C-NMR (D₂O): $\delta = 34.2$ (CH), 38.4 (CH), 45.9 (CH), 52.0 (C_q), 55.0 (CH), 59.7 (CH), 70.0 (CH), 74.7 (CH), 132.1 (CH), 133.1 (CH, C_q), 140.1 (CH), 172.7 (C=O), 177.5 (C=O).

C₁₄H₁₈N₂O₆ 310.30

5.3.6 Einsatz von 2,3-*trans*-CHA in der Katalyse

Diprolin Zinkat II

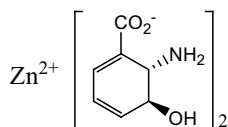


Zu einer Mischung von 500 mg (4.34 mmol) L-Prolin in 10 mL Methanol werden 0.6 mL Triethylamin gegeben. Die Reaktionsmischung wird für 10 min gerührt und 476 mg Zinkacetat-2H₂O (2.17 mmol) werden zugegeben. Nach 45 min wird der sich bildende weiße Niederschlag durch Filtration vom Lösungsmittel getrennt und im Vakuum getrocknet. Es werden 500 mg (78 %) des Zink-Prolin-Komplexes in Form eines weißen Feststoffes gewonnen.

¹H-NMR (D₂O): δ = 1.87 (br s, 3 H), 2.29 (br m, 1 H), 3.04 (br s, 1 H), 3.19 (br m, 1 H), 3.92 (br s, 1 H).

C₁₀H₁₈N₂O₄Zn 295.65

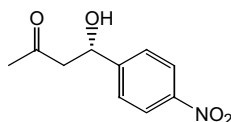
Di-(2,3-*trans*-CHA)-Zinkat II (204)



Zu einer Mischung von 134 mg (0.87 mmol) 2,3-*trans*-CHA in 6 mL Methanol wird soviel Wasser zugegeben, dass sich die Aminosäure gerade vollständig löst. Nach Zugabe von 0.12 mL Triethylamin wird die Reaktionsmischung für 10 min gerührt und 96 mg Zinkacetat-2H₂O (0.435 mmol) werden zugegeben. Nach 45 min wird der sich bildende weiße Niederschlag durch Filtration vom Lösungsmittel getrennt und im Vakuum getrocknet. Es werden 103 mg (63 %) des Zink-Komplexes **204** in Form eines weißen Feststoffes erhalten.

¹H-NMR (D₂O): δ = 3.98 (br s, 1 H), 4.33 (br s, 1 H), 6.22 (br m, 1 H), 6.34 (br m, 1 H), 6.92 (br m, 1 H).

C₁₄H₁₈N₂O₆Zn 375.69

4-Hydroxy-4-(4-nitrophenyl)-butan-2-on (205)

Zu einer Mischung von 15.1 mg (0.1 mmol) 4-Nitrobenzaldehyd in 0.5 mL Aceton wird eine Lösung von 5 μ mol des jeweiligen Zink-Aminosäuren-Komplexes in 1 mL Wasser zugegeben. (In Reaktionen in denen freie Aminosäuren als Katalysator eingesetzt werden beträgt deren Konzentration 10 μ M.) Die Reaktionsmischung wird für 24-96 h unter Stickstoff gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und CDCl_3 zugegeben. Durch Filtration wird der unlösliche Katalysator abgetrennt und das Filtrat wird per NMR-Messung analysiert.

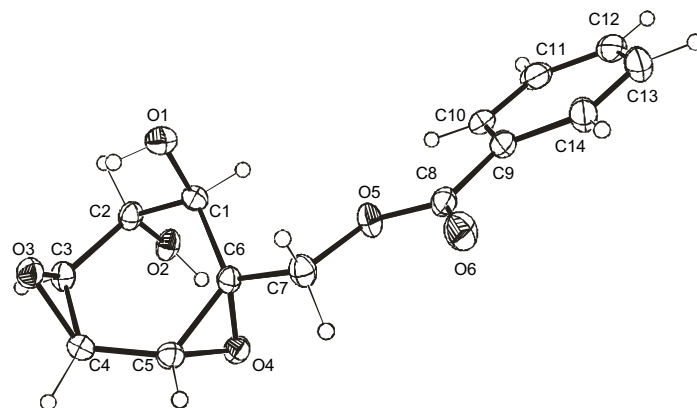
$^1\text{H-NMR}$ (D_2O): δ = 2.23 (s, 3 H), 2.86 (m, 2 H), 3.61 (br s, 1 H, OH), 5.28 (dd, J = 7.7, 4.6 Hz, 1 H), 7.55 (d, J = 9.1 Hz, 2 H), 8.22 (d, J = 9.1 Hz, 2 H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (D_2O): δ = 30.9 (CH_3), 51.7 (CH_2), 69.1 (CH), 124.0 ($2\times\text{CH}$), 126.6 ($2\times\text{CH}$), 150.1 ($2\times\text{C}_q$), 208.8 (C=O).

$\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{NO}_4$ 209.20

5.3.7 Röntgenstrukturanalysen**(1*S*,2*R*,3*S*,4*S*,5*R*,6*R*)-Benzoessäure-5,6-dihydroxy-3,8-dioxa-tricyclo[5.1.0.0^{2,4}]oct-4-ylmethylester (181)**

Geeignete Kristalle zur Anfertigung einer Röntgenstrukturanalyse werden durch Umkristallisieren in EE/*n*-Hexan erhalten.



Identification code	mm02
Empirical formula	C ₁₄ H ₁₄ O ₆
Formula weight	278.25
Temperature	123(2) K
Wavelength	0.71073 Å (MoKα)
Crystal system, space group	Orthorhombic, P2(1)2(1)2(1) (No.19)
Unit cell dimensions	a = 8.8867(2) Å α = 90° b = 11.7119(2) Å β = 90° c = 12.0177(3) Å γ = 90°
Volume	1250.80(5) Å ³
Z, Calculated density	4, 1.478 Mg/m ³
Absorption coefficient	0.117 mm ⁻¹
F(0,0,0)	584
Crystal size	0.60 x 0.50 x 0.40 mm
Diffractometer	Nonius KappaCCD
Theta range for data collection	3.34 to 24.99°
Limiting indices	-10 ≤ h ≤ 10, -13 ≤ k ≤ 13, -14 ≤ l ≤ 14
Reflections collected / unique	24670 / 2206 [R(int) = 0.0309]
Completeness to theta = 24.99	99.7 %
Absorption correction	None
Refinement method	Full-matrix least-squares on F ²
Data / restraints / parameters	2206 / 2 / 187

Goodness-of-fit on F^2	1.041
Final R indices [$I > 2\sigma(I)$]	$R_1 = 0.0214$, $wR_2 = 0.0559$
R indices (all data)	$R_1 = 0.0221$, $wR_2 = 0.0563$
Absolute structure parameter	-0.1(6); cannot be determined reliabl. but known from C(6)
Largest diff. peak and hole	0.143 and -0.138 $e\text{\AA}^{-3}$

Table 2. Atomic coordinates ($\times 10^4$) and equivalent isotropic displacement parameters ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) for mm02. $U(\text{eq})$ is defined as one third of the trace of the orthogonalized U_{ij} tensor.

	x	y	z	$U(\text{eq})$
O(1)	8367(1)	5379(1)	4087(1)	24(1)
H(10)	8748(16)	5341(13)	3454(12)	36
O(2)	4583(1)	4341(1)	3331(1)	22(1)
H(20)	4147(15)	4973(11)	3327(13)	33
O(3)	7965(1)	5176(1)	1742(1)	22(1)
O(4)	4947(1)	6748(1)	2954(1)	20(1)
O(5)	6241(1)	7483(1)	5290(1)	21(1)
O(6)	7320(1)	9145(1)	5767(1)	27(1)
C(1)	6770(1)	5459(1)	3943(1)	18(1)
C(2)	6169(1)	4488(1)	3210(1)	19(1)
C(3)	6526(1)	4655(1)	1989(1)	20(1)
C(4)	6585(1)	5813(1)	1528(1)	20(1)
C(5)	6313(1)	6801(1)	2279(1)	19(1)
C(6)	6404(1)	6641(1)	3489(1)	16(1)
C(7)	6868(1)	7641(1)	4184(1)	21(1)
C(8)	6618(1)	8300(1)	6023(1)	19(1)
C(9)	6086(1)	8046(1)	7174(1)	22(1)
C(10)	5211(1)	7088(1)	7416(1)	22(1)
C(11)	4702(1)	6913(1)	8499(1)	29(1)
C(12)	5088(2)	7685(1)	9331(1)	33(1)
C(13)	5991(2)	8620(1)	9100(1)	33(1)
C(14)	6480(1)	8804(1)	8018(1)	28(1)

Table 3. Bond lengths [$\text{\AA}$] and angles [$^\circ$] for mm02.

O(1)–C(1)	1.4329(14)
O(1)–H(10)	0.834(13)
O(2)–C(2)	1.4277(14)
O(2)–H(20)	0.836(13)
O(3)–C(3)	1.4473(14)
O(3)–C(4)	1.4582(13)
O(4)–C(6)	1.4513(13)
O(4)–C(5)	1.4617(14)
O(5)–C(8)	1.3423(14)
O(5)–C(7)	1.4532(13)
O(6)–C(8)	1.2099(15)
C(1)–C(6)	1.5230(15)

C (1) –C (2)	1.5341 (15)
C (2) –C (3)	1.5135 (15)
C (3) –C (4)	1.4660 (15)
C (4) –C (5)	1.4872 (16)
C (5) –C (6)	1.4694 (15)
C (6) –C (7)	1.4962 (15)
C (8) –C (9)	1.4911 (16)
C (9) –C (14)	1.3935 (17)
C (9) –C (10)	1.3962 (18)
C (10) –C (11)	1.3937 (18)
C (11) –C (12)	1.3898 (19)
C (12) –C (13)	1.386 (2)
C (13) –C (14)	1.3880 (18)
C (1) –O (1) –H (10)	107.2 (11)
C (2) –O (2) –H (20)	110.5 (10)
C (3) –O (3) –C (4)	60.60 (7)
C (6) –O (4) –C (5)	60.59 (7)
C (8) –O (5) –C (7)	114.46 (8)
O (1) –C (1) –C (6)	108.31 (9)
O (1) –C (1) –C (2)	111.45 (9)
C (6) –C (1) –C (2)	113.21 (9)
O (2) –C (2) –C (3)	108.74 (9)
O (2) –C (2) –C (1)	111.99 (9)
C (3) –C (2) –C (1)	112.85 (9)
O (3) –C (3) –C (4)	60.07 (7)
O (3) –C (3) –C (2)	115.97 (9)
C (4) –C (3) –C (2)	119.50 (9)
O (3) –C (4) –C (3)	59.33 (7)
O (3) –C (4) –C (5)	115.35 (9)
C (3) –C (4) –C (5)	119.07 (9)
O (4) –C (5) –C (6)	59.36 (7)
O (4) –C (5) –C (4)	115.97 (9)
C (6) –C (5) –C (4)	119.46 (10)
O (4) –C (6) –C (5)	60.06 (7)
O (4) –C (6) –C (7)	115.20 (9)
C (5) –C (6) –C (7)	117.88 (9)
O (4) –C (6) –C (1)	115.29 (9)
C (5) –C (6) –C (1)	118.82 (9)
C (7) –C (6) –C (1)	116.96 (9)
O (5) –C (7) –C (6)	107.76 (8)
O (6) –C (8) –O (5)	122.95 (10)
O (6) –C (8) –C (9)	124.25 (10)
O (5) –C (8) –C (9)	112.80 (10)
C (14) –C (9) –C (10)	120.05 (11)
C (14) –C (9) –C (8)	117.95 (11)
C (10) –C (9) –C (8)	122.00 (10)
C (11) –C (10) –C (9)	119.55 (11)
C (12) –C (11) –C (10)	119.77 (12)
C (13) –C (12) –C (11)	120.86 (11)
C (12) –C (13) –C (14)	119.44 (12)
C (13) –C (14) –C (9)	120.30 (13)

Table 4. Torsion angles [°] for mm02.

O (1) –C (1) –C (2) –O (2)	162.03 (9)
C (6) –C (1) –C (2) –O (2)	–75.57 (11)
O (1) –C (1) –C (2) –C (3)	–74.87 (11)
C (6) –C (1) –C (2) –C (3)	47.52 (13)
C (4) –O (3) –C (3) –C (2)	–110.59 (11)

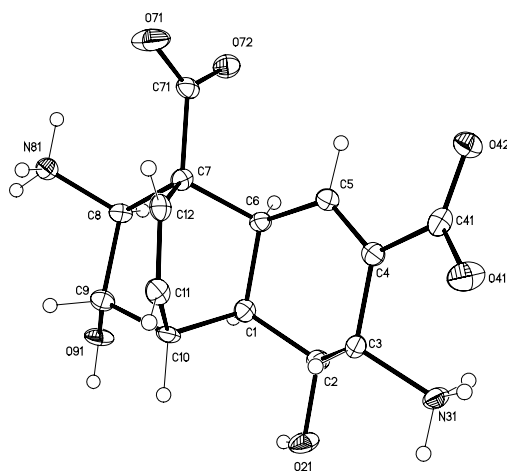
O(2)-C(2)-C(3)-O(3)	160.64(9)
C(1)-C(2)-C(3)-O(3)	35.76(13)
O(2)-C(2)-C(3)-C(4)	91.87(12)
C(1)-C(2)-C(3)-C(4)	-33.01(15)
C(3)-O(3)-C(4)-C(5)	110.13(10)
C(2)-C(3)-C(4)-O(3)	104.76(11)
O(3)-C(3)-C(4)-C(5)	-103.87(11)
C(2)-C(3)-C(4)-C(5)	0.89(16)
C(6)-O(4)-C(5)-C(4)	110.32(11)
O(3)-C(4)-C(5)-O(4)	-118.77(10)
C(3)-C(4)-C(5)-O(4)	-51.26(14)
O(3)-C(4)-C(5)-C(6)	-50.86(14)
C(3)-C(4)-C(5)-C(6)	16.66(16)
C(5)-O(4)-C(6)-C(7)	108.99(10)
C(5)-O(4)-C(6)-C(1)	-110.07(10)
C(4)-C(5)-C(6)-O(4)	-104.47(11)
O(4)-C(5)-C(6)-C(7)	-104.55(10)
C(4)-C(5)-C(6)-C(7)	150.98(10)
O(4)-C(5)-C(6)-C(1)	104.23(10)
C(4)-C(5)-C(6)-C(1)	-0.24(15)
O(1)-C(1)-C(6)-O(4)	160.42(8)
C(2)-C(1)-C(6)-O(4)	36.30(12)
O(1)-C(1)-C(6)-C(5)	92.15(11)
C(2)-C(1)-C(6)-C(5)	-31.98(14)
O(1)-C(1)-C(6)-C(7)	-59.34(12)
C(2)-C(1)-C(6)-C(7)	176.54(9)
C(8)-O(5)-C(7)-C(6)	177.46(9)
O(4)-C(6)-C(7)-O(5)	86.29(10)
C(5)-C(6)-C(7)-O(5)	154.26(9)
C(1)-C(6)-C(7)-O(5)	-53.98(12)
C(7)-O(5)-C(8)-O(6)	5.64(15)
C(7)-O(5)-C(8)-C(9)	-174.07(9)
O(6)-C(8)-C(9)-C(14)	-3.01(17)
O(5)-C(8)-C(9)-C(14)	176.70(10)
O(6)-C(8)-C(9)-C(10)	176.52(11)
O(5)-C(8)-C(9)-C(10)	-3.78(15)
C(14)-C(9)-C(10)-C(11)	1.71(17)
C(8)-C(9)-C(10)-C(11)	-177.80(10)
C(9)-C(10)-C(11)-C(12)	-0.91(18)
C(10)-C(11)-C(12)-C(13)	-0.86(19)
C(11)-C(12)-C(13)-C(14)	1.82(19)
C(12)-C(13)-C(14)-C(9)	-1.00(19)
C(10)-C(9)-C(14)-C(13)	-0.76(18)
C(8)-C(9)-C(14)-C(13)	178.77(11)

Table 5. Hydrogen bonds for mm02 [$\text{\AA}$ and $^\circ$].

D-H...A	d(D-H)	d(H...A)	d(D...A)	<(DHA)
O(1)-H(10)...O(3)	0.834(13)	2.180(15)	2.8502(12)	137.4(13)
O(2)-H(20)...O(4)	0.836(13)	2.242(14)	2.8728(11)	132.4(13)
O(2)-H(20)...O(6) #1	0.836(13)	2.211(14)	2.8926(12)	138.8(14)

Symmetry transformations used to generate equivalent atoms:
 #1 x-1/2, -y+3/2, -z+1

(1*R*,2*R*,5*S*,6*S*,7*S*,8*R*,11*S*,12*S*)-5,11-Diamino-6,12-dihydroxy-tricyclo[6.2.2.0^{2,7}]deca-3,9-dien-1,4-dicarbonsäure (193)



Identification code	mm15
Empirical formula	C ₁₆ H ₂₈ N ₂ O ₉
Formula weight	392.40
Temperature	123(2) K
Wavelength	0.71073 Å
Crystal system, space group	Monoclinic, P2(1) (No.4)
Unit cell dimensions	a = 9.9777(3) Å alpha = 90° b = 8.3437(2) Å beta = 92.165(2)° c = 10.4999(3) Å gamma = 90°
Volume	873.50(4) Å ³
Z, Calculated density	2, 1.492 Mg/m ³
Absorption coefficient	0.122 mm ⁻¹
F(000)	420
Crystal size	0.60 x 0.40 x 0.20 mm
Diffractometer	Nonius KappaCCD
Theta range for data collection	3.12 to 25.02°
Limiting indices	-11 ≤ h ≤ 11, -9 ≤ k ≤ 9, -12 ≤ l ≤ 12

Reflections collected / unique	7971 / 3068 [R(int) = 0.0320]
Completeness to theta = 25.02	99.5 %
Absorption correction	None
Refinement method	Full-matrix least-squares on F ²
Data / restraints / parameters	3068 / 33 / 258
Goodness-of-fit on F ²	1.053
Final R indices [I>2sigma(I)]	R1 = 0.0479, wR2 = 0.1290
R indices (all data)	R1 = 0.0504, wR2 = 0.1314
Absolute structure parameter	-0.2(15), cannot be determined reliabl.
Largest diff. peak and hole	0.810 and -0.352 e.Å ⁻³

Table 2. Atomic coordinates ($\times 10^4$) and equivalent isotropic displacement parameters ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) for mm15.
U(eq) is defined as one third of the trace of the orthogonalized
U_{ij} tensor.

	x	y	z	U(eq)
C(1)	2995(3)	5325(4)	3010(3)	14(1)
C(2)	1960(3)	5803(4)	3982(3)	16(1)
O(21)	2068(3)	7434(3)	4348(2)	22(1)
C(3)	2084(3)	4809(4)	5191(3)	14(1)
N(31)	981(3)	5307(4)	6057(3)	17(1)
C(4)	1988(3)	3050(4)	4875(3)	14(1)
C(41)	1635(3)	1883(4)	5896(3)	15(1)
O(41)	1743(3)	2385(3)	7023(2)	24(1)
O(42)	1287(2)	488(3)	5573(2)	18(1)
C(5)	2358(3)	2501(4)	3734(3)	15(1)
C(6)	2906(3)	3519(4)	2687(3)	14(1)
C(7)	4354(3)	2907(4)	2395(3)	14(1)
C(71)	4329(3)	1201(4)	1815(3)	15(1)
O(71)	5262(3)	262(3)	2114(3)	30(1)
O(72)	3356(2)	856(3)	1049(2)	21(1)
C(8)	4919(3)	4133(4)	1435(3)	14(1)
N(81)	6179(3)	3558(4)	863(3)	15(1)
C(9)	5215(3)	5766(4)	2117(3)	15(1)
O(91)	4805(3)	7030(3)	1285(2)	19(1)
C(10)	4469(3)	5762(4)	3378(3)	14(1)
C(11)	5173(3)	4485(4)	4173(3)	16(1)
C(12)	5179(3)	3038(4)	3633(3)	14(1)
O(1W)	1600(3)	8210(3)	7353(2)	19(1)
O(2W)	1203(3)	9103(4)	2131(3)	27(1)
O(1E)	695(5)	7704(6)	9752(5)	24(1) s.o.f.= 0.50
C(1E)	1400(9)	6483(10)	10004(9)	39(2) s.o.f.= 0.50
C(2E)	2257(10)	5380(11)	9249(10)	33(1) s.o.f.= 0.50
O(2E)	1422(5)	2090(6)	9498(5)	24(1) s.o.f.= 0.50
C(3E)	2079(9)	3279(9)	9519(9)	39(2) s.o.f.= 0.50
C(4E)	2324(11)	4965(9)	9160(11)	33(1) s.o.f.= 0.50

Table 3. Bond lengths [Å] and angles [°] for mm15.

C(1)–C(2)	1.532(5)
C(1)–C(6)	1.547(5)
C(1)–C(10)	1.550(4)
C(2)–O(21)	1.417(4)
C(2)–C(3)	1.517(5)
O(21)–H(21)	0.84(2)
C(3)–C(4)	1.507(5)
C(3)–N(31)	1.512(4)
C(4)–C(5)	1.348(5)
C(4)–C(41)	1.500(5)
C(41)–O(41)	1.257(5)
C(41)–O(42)	1.257(5)
C(5)–C(6)	1.508(5)
C(6)–C(7)	1.574(4)
C(7)–C(12)	1.516(5)
C(7)–C(71)	1.548(5)
C(7)–C(8)	1.556(5)
C(71)–O(71)	1.248(4)
C(71)–O(72)	1.270(4)
C(8)–N(81)	1.493(4)
C(8)–C(9)	1.562(5)
C(9)–O(91)	1.420(4)
C(9)–C(10)	1.543(4)
O(91)–H(91)	0.82(2)
C(10)–C(11)	1.511(5)
C(11)–C(12)	1.335(5)
O(1W)–H(1W1)	0.84(2)
O(1W)–H(1W2)	0.85(2)
O(2W)–H(2W1)	0.83(2)
O(2W)–H(2W2)	0.85(2)
O(1E)–C(1E)	1.260(7)
C(1E)–C(2E)	1.503(8)
O(2E)–C(3E)	1.189(7)
C(3E)–C(4E)	1.479(7)
C(2)–C(1)–C(6)	111.4(3)
C(2)–C(1)–C(10)	115.5(3)
C(6)–C(1)–C(10)	109.3(3)
O(21)–C(2)–C(3)	107.2(3)
O(21)–C(2)–C(1)	112.6(3)
C(3)–C(2)–C(1)	112.3(3)
C(2)–O(21)–H(21)	101(2)
C(4)–C(3)–N(31)	111.0(3)
C(4)–C(3)–C(2)	110.2(3)
N(31)–C(3)–C(2)	108.3(3)
C(5)–C(4)–C(41)	119.6(3)
C(5)–C(4)–C(3)	120.6(3)
C(41)–C(4)–C(3)	119.3(3)
O(41)–C(41)–O(42)	125.1(3)
O(41)–C(41)–C(4)	116.3(3)
O(42)–C(41)–C(4)	118.6(3)
C(4)–C(5)–C(6)	125.1(3)
C(5)–C(6)–C(1)	114.1(3)
C(5)–C(6)–C(7)	108.7(3)
C(1)–C(6)–C(7)	108.3(3)
C(12)–C(7)–C(71)	113.8(3)
C(12)–C(7)–C(8)	108.1(3)
C(71)–C(7)–C(8)	110.5(3)
C(12)–C(7)–C(6)	106.4(3)

C(71)-C(7)-C(6)	111.9(3)
C(8)-C(7)-C(6)	105.7(3)
O(71)-C(71)-O(72)	124.2(3)
O(71)-C(71)-C(7)	118.5(3)
O(72)-C(71)-C(7)	117.3(3)
N(81)-C(8)-C(7)	112.4(3)
N(81)-C(8)-C(9)	108.5(3)
C(7)-C(8)-C(9)	110.1(3)
O(91)-C(9)-C(10)	113.1(3)
O(91)-C(9)-C(8)	108.7(3)
C(10)-C(9)-C(8)	107.6(3)
C(9)-O(91)-H(91)	106(2)
C(11)-C(10)-C(9)	104.3(3)
C(11)-C(10)-C(1)	112.9(3)
C(9)-C(10)-C(1)	105.7(3)
C(12)-C(11)-C(10)	114.4(3)
C(11)-C(12)-C(7)	114.8(3)
H(1W1)-O(1W)-H(1W2)	107(5)
H(2W1)-O(2W)-H(2W2)	101(5)
O(1E)-C(1E)-C(2E)	135.1(8)
O(2E)-C(3E)-C(4E)	152.3(9)

Table 4. Torsion angles [°] for mm15.

C(6)-C(1)-C(2)-O(21)	176.7(3)
C(10)-C(1)-C(2)-O(21)	51.4(4)
C(6)-C(1)-C(2)-C(3)	55.7(4)
C(10)-C(1)-C(2)-C(3)	-69.7(4)
O(21)-C(2)-C(3)-C(4)	-179.6(3)
C(1)-C(2)-C(3)-C(4)	-55.5(4)
O(21)-C(2)-C(3)-N(31)	58.8(3)
C(1)-C(2)-C(3)-N(31)	-177.1(3)
N(31)-C(3)-C(4)-C(5)	147.3(3)
C(2)-C(3)-C(4)-C(5)	27.3(4)
N(31)-C(3)-C(4)-C(41)	-40.1(4)
C(2)-C(3)-C(4)-C(41)	-160.1(3)
C(5)-C(4)-C(41)-O(41)	156.7(3)
C(3)-C(4)-C(41)-O(41)	-16.0(4)
C(5)-C(4)-C(41)-O(42)	-21.8(5)
C(3)-C(4)-C(41)-O(42)	165.5(3)
C(41)-C(4)-C(5)-C(6)	-171.7(3)
C(3)-C(4)-C(5)-C(6)	0.9(5)
C(4)-C(5)-C(6)-C(1)	-1.2(5)
C(4)-C(5)-C(6)-C(7)	119.7(3)
C(2)-C(1)-C(6)-C(5)	-26.5(4)
C(10)-C(1)-C(6)-C(5)	102.2(3)
C(2)-C(1)-C(6)-C(7)	-147.7(3)
C(10)-C(1)-C(6)-C(7)	-18.9(3)
C(5)-C(6)-C(7)-C(12)	-58.5(3)
C(1)-C(6)-C(7)-C(12)	66.0(3)
C(5)-C(6)-C(7)-C(71)	66.4(3)
C(1)-C(6)-C(7)-C(71)	-169.2(3)
C(5)-C(6)-C(7)-C(8)	-173.2(3)
C(1)-C(6)-C(7)-C(8)	-48.8(3)
C(12)-C(7)-C(71)-O(71)	-23.2(4)
C(8)-C(7)-C(71)-O(71)	98.6(4)
C(6)-C(7)-C(71)-O(71)	-143.8(3)
C(12)-C(7)-C(71)-O(72)	157.5(3)
C(8)-C(7)-C(71)-O(72)	-80.7(4)
C(6)-C(7)-C(71)-O(72)	36.9(4)

Experimenteller Teil

C(12)-C(7)-C(8)-N(81)	77.6(3)
C(71)-C(7)-C(8)-N(81)	-47.5(4)
C(6)-C(7)-C(8)-N(81)	-168.8(2)
C(12)-C(7)-C(8)-C(9)	-43.4(4)
C(71)-C(7)-C(8)-C(9)	-168.5(3)
C(6)-C(7)-C(8)-C(9)	70.2(3)
N(81)-C(8)-C(9)-O(91)	97.5(3)
C(7)-C(8)-C(9)-O(91)	-139.2(3)
N(81)-C(8)-C(9)-C(10)	-139.7(3)
C(7)-C(8)-C(9)-C(10)	-16.4(4)
O(91)-C(9)-C(10)-C(11)	-172.9(3)
C(8)-C(9)-C(10)-C(11)	67.0(3)
O(91)-C(9)-C(10)-C(1)	67.9(3)
C(8)-C(9)-C(10)-C(1)	-52.2(3)
C(2)-C(1)-C(10)-C(11)	87.2(4)
C(6)-C(1)-C(10)-C(11)	-39.3(4)
C(2)-C(1)-C(10)-C(9)	-159.5(3)
C(6)-C(1)-C(10)-C(9)	74.0(3)
C(9)-C(10)-C(11)-C(12)	-57.4(4)
C(1)-C(10)-C(11)-C(12)	56.8(4)
C(10)-C(11)-C(12)-C(7)	-6.3(4)
C(71)-C(7)-C(12)-C(11)	-177.6(3)
C(8)-C(7)-C(12)-C(11)	59.2(4)
C(6)-C(7)-C(12)-C(11)	-53.9(4)

Table 5. Hydrogen bonds for mm15 [$\text{\AA}$ and $^\circ$].

D-H...A	d(D-H)	d(H...A)	d(D...A)	<(DHA)
O(21)-H(21)...O(2W)	0.84(2)	2.03(3)	2.820(4)	158(5)
N(31)-H(31A)...O(41)	0.91	2.08	2.737(4)	127.7
N(31)-H(31B)...O(42)#1	0.91	1.93	2.789(4)	156.4
N(31)-H(31C)...O(1W)	0.91	1.99	2.835(4)	154.0
N(81)-H(81A)...O(72)#2	0.91	1.94	2.827(4)	165.7
N(81)-H(81B)...O(91)#3	0.91	2.02	2.741(4)	134.8
N(81)-H(81C)...O(1W)#4	0.91	1.96	2.862(4)	170.4
O(91)-H(91)...O(71)#5	0.82(2)	2.08(2)	2.865(4)	161(4)
O(1W)-H(1W1)...O(1E)	0.84(2)	2.04(4)	2.740(6)	140(4)
O(1W)-H(1W2)...O(42)#5	0.85(2)	1.83(2)	2.676(3)	172(4)
O(2W)-H(2W1)...O(72)#5	0.83(2)	2.04(3)	2.869(4)	171(5)
O(2W)-H(2W2)...O(1E)#6	0.85(2)	1.96(3)	2.787(6)	163(5)
O(2E)-H(2E)...O(72)#7	0.84	2.06	2.683(6)	130.1

Symmetry transformations used to generate equivalent atoms:

#1 -x,y+1/2,-z+1 #2 -x+1,y+1/2,-z #3 -x+1,y-1/2,-z
#4 -x+1,y-1/2,-z+1 #5 x,y+1,z #6 x,y,z-1
#7 x,y,z+1

6 Literaturverzeichnis

- 1) Nicolaou, K. C.; Vourloumis, D.; Wissinger, N.; Baran, P. S. *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 46 - 126.
- 2) Als Beispiel für diese Strategie: Shaw, N. M.; Robins, K. T.; Kiener, A. *Adv. Synth. Catal.* **2003**, *345*, 425 - 435; zit. Ref.
- 3) Dieser Strategie liegt die Ursprüngliche Idee des *metabolic engineering* von J. E. Bailey zugrunde. Als Beispiel für diese Strategie: a) Burkart, M. D. *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 1 - 4; zit. Ref.; b) Nielsen, J. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2001**, *55*, 263 - 283; zit. Ref.; c) Bailey, J. E. *Science* **1991**, *252*, 1668 - 1675.
- 4) a) Eykmann, J. F. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1891**, *24*, 1278 - 1303; b) Haslam, E. *The Shikimate Pathway*; Halstead Press, Wiley: New York, 1974.
- 5) Floss, H. G. *Nat. Prod. Rep.* **1997**, *14*, 433 - 452.
- 6) a) Floss, H. G. *Rec. Adv. in Phytochem.* **1986**, *20*, 13 - 55; zit. Ref.
- 7) a) Dewick, P. M. *Nat. Prod. Rep.* **1998**, *15*, 17 - 58; zit. Ref.; b) Dosselaere, F.; Vanderleyden, J. *Critical Reviews in Microbiology* **2001**, *27*, 75 - 131; zit. Ref.
- 8) Müller, M. Habilitationsschrift *Universität Bonn*, **2003**.
- 9) In der Literatur kommt es zu unterschiedlichen Auslegungen bezüglich der zum Shikimat-Biosyntheseweg gehörigen Biosyntheseschritte. In vielen Fällen werden ausschließlich die Umsetzungen bis zum Chorismat diesem Biosyntheseweg zugerechnet. Diese Arbeit folgt der Auslegung, die beispielsweise auch von J. Vanderleyden vertreten wird, dass auch die auf Chorismat folgenden Biosyntheseschritte zum Shikimatweg gehören. (Dosselaere, F.; Vanderleyden, J. *Critical Reviews in Microbiology* **2001**, *27*, 75 - 131.)
Die Schritte bis zum Chorismat werden als gemeinsamer Shikimatweg bezeichnet, da sie die gemeinsame Grundlage für alle Endprodukte darstellen.
- 10) *Carbohydrate mimics*; Chapleur, Y., Ed.; Wiley: Weinheim, 1998.
- 11) Shikimat wird aus Pflanzenmaterial von *Illicium religiosum* (auf japanisch: shikimi-no-ki) gewonnen. Quinat wird aus der Rinde der *Cinchona*-Pflanze (Chinarinde) isoliert.
- 12) Patnaik, R.; Liao, J. C. *Appl. Environ. Microbiol.* **1994**, *60*, 3903 - 3908.
- 13) a) Li, K.; Frost, J. W. *Biotechnol. Prog.* **1999**, *15*, 876 - 883; b) Yi, J.; Li, K.; Draths, K. M.; Frost, J. W. *Biotechnol. Prog.* **2002**, *18*, 1141 - 1148.

- 14) a) Draths, K. M.; Knop, D. R.; Frost, J. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 1603 - 1604;
b) Draths, K. M.; Ward, T. L.; Frost, J. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 9725 - 9726.
- 15) a) Li, K.; Mikola, M. R.; Draths, K. M.; Worden, R. M.; Frost, J. W. *Biotechnol. Bioeng.* **1999**, *64*, 61 - 73; b) Yi, J.; Draths, K. M.; Li, K.; Frost, J. W. *Biotechnol. Prog.* **2003**, *19*, 1450 - 1459.
- 16) Chandran, S. S.; Yi, J.; Draths, K. M.; Daeniken, R. v.; Weber, W.; Frost, J. W. *Biotechnol. Prog.* **2003**, *19*, 808 - 814.
- 17) Preise für Produkte des gemeinsamen Shikimat-Biosyntheseweges: Shikimat (€ 43,00, 1 g); Quinat (€ 72,50, 100 g).
- 18) a) Kim, C. U.; Lew, W.; Williams, M. A.; Liu, H.; Zhang, L.; Swaminathan, S.; Bischofberger, N.; Chen, M. S.; Mendel, D. B.; Tai, C. Y.; Laver, W. G.; Stevens, R. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 681 - 690; b) Kim, C. U.; Lew, W.; Williams, M. A.; Wu, H.; Zhang, L.; Chen, X.; Escarpe, P. A.; Mendel, D. B.; Laver, G.; Stevens, R. C. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 2451 - 2460; c) Rohloff, J. C.; Kent, K. M.; Postich, M. J.; Becker, M. W.; Chapman, H. H.; Kelly, D. E.; Lew, W.; Louie, M. S.; McGee, L. R.; Prisbe, E. J.; Schultze, L. M.; Yu, R. H.; Zhang, L. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 4545 - 4550; d) Federspiel, M.; Fischer, R.; Henning, M.; Mair, H. J.; Oberhauser, T.; Rimpler, G.; Albiez, T.; Bruhin, J.; Estermann, H.; Gandert, C.; Göckel, V.; Götzö, S.; Hoffmann, U.; Huber, G.; Janatsch, G.; Lauper, S.; Röckel-Stäbler, O.; Trussardi, R.; Zwahlen, A. G. *Org. Process Res. Dev.* **1999**, *3*, 266 - 274; e) Karpf, M.; Trussardi, R. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 2044 - 2051.
- 19) McGowan, D. A.; Berchtold, G. A. *J. Org. Chem.* **1981**, *46*, 2381 - 2383.
- 20) a) Meier, R.-M.; Tamm, C. *Helv. Chim. Acta* **1991**, *74*, 807 - 818; b) Shing, T. K. M. *Tetrahedron: Asymmetry* **1996**, *7*, 353 - 356; c) Barco, A.; Benetti, S.; Risi, C. D.; Marchetti, P.; Pollini, G. P.; Zanirato, V. *Tetrahedron: Asymmetry* **1997**, *8*, 3515 - 3545; zit. Ref.; d) Shing, T. K. M.; Tam, E. K. W. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 1547 - 1554; e) Schulz, J.; Beaton, M.; Gani, D. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **2000**, 943 - 954.
- 21) a) Tan, D. S.; Foley, M. A.; Shair, M. D.; Schreiber, S. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 8565 - 8566; b) Schreiber, S. L. *Science* **2000**, *287*, 1964 - 1969.
- 22) Gibson, J. M.; Thomas, P. S.; Thomas, J. D.; Barker, J. L.; Chandran, S. S.; Harrup, M. K.; Draths, K. M.; Frost, J. W. *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 1999 - 2002.
- 23) zum Beispiel: a) Young, I. G.; Gibson, F.; MacDonald, C. G. *Biochim. Biophys. Acta* **1969**, *177*, 62 - 72; b) Young, I. G.; Langman, L.; Luke, R. K. J.; Gibson, F. *J.*

- Bacteriol.* **1971**, *106*, 51 - 57; c) Tummuru, M. K. R.; Brickman, T. J.; McIntosh, M. A. *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 20547 - 20551; siehe auch: d) Walsh, C. T.; Liu, J.; Rusnak, F.; Sakaitani, M. *Chem. Rev.* **1990**, *90*, 1105 - 1129; zit. Ref.
- 24) Gibson, F. *Biochem Prep.* **1968**, *12*, 94 - 97.
- 25) Rieger, C. E.; Turnbull, J. L. *Prep. Biochem. Biotech.* **1996**, *26*, 67 - 76.
- 26) Grisostomi, C.; Kast, P.; Pulido, R.; Huynh, J.; Hilvert, D. *Bioorg. Chem.* **1997**, *25*, 297 - 305.
- 27) a) Hoare, J. H.; Policastro, P. P.; Berchtold, G. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 6264 - 6267; b) Pawlak, J. L.; Berchtold, G. A. *J. Org. Chem.* **1987**, *52*, 1765 - 1771; siehe auch: Lesuisse, D.; Berchtold, G. A. *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 888 - 890.
- Außerdem wurden von Berchtold *et al.* Synthesen von racemischem Chorismat durchgeführt: c) McGowan, D. A.; Berchtold, G. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 1153 - 1154; d) McGowan, D. A.; Berchtold, G. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 7036 - 7041.
- 28) a) Wood, H. B.; Ganem, B. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 8907 - 8909. Außerdem synthetisierten Ganem *et al.* *rac.*-Chorismat: b) Ganem, B.; Ikota, N.; Muralidharan, V. B.; Wade, W. S.; Young, S. D.; Yukimoto, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 6787 - 6788.
- 29) Posner, G. H.; Haces, A.; Harrison, W.; Kinter, C. M. *J. Org. Chem.* **1987**, *52*, 4836 - 4841.
- 30) Preis für Chorismat (ALDRICH, 2003): € 844.40 (100 mg, aus *K. Pneumoniae*).
- 31) a) Sato, T.; Fukuyama, T.; Suzuki, T.; Yoshikawa, H. *J. Biochem.* **1963**, *53*, 23 - 27; b) Jerina, D. M.; Ziffer, H.; Daly, J. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92*, 1056 - 1060.
- 32) a) Gibson, D. T.; Koch, J. R.; Kallio, R. E. *Biochemistry* **1968**, *7*, 2653 - 2662; b) Gibson, D. T.; Koch, J. R.; Schuld, C. L.; Kallio, R. E. *Biochemistry* **1968**, *7*, 3795 - 3802; c) Gibson, D. T.; Hensley, M.; Yoshioka, H.; Mabry, T. J. *Biochemistry* **1970**, *9*, 1626 - 1630.
- 33) Hudlicky, T.; Gonzalez, D.; Gibson, D. T. *Aldrichimica Acta* **1999**, *32*, 35 - 62; zit. Ref.
- 34) a) Young, I. G.; Gibson, F. *Biochim. Biophys. Acta* **1969**, *177*, 348 - 350; b) Young, I. G.; Jackman, L. M.; Gibson, F. *Biochim. Biophys. Acta* **1969**, *177*, 381 - 388; c) Young, I. G.; Batterham, T. J.; Gibson, F. *Biochim. Biophys. Acta* **1969**, *177*, 389 - 400; d) Young, I. G.; Gibson, F. *Biochim. Biophys. Acta* **1969**, *177*, 401 - 411.
- 35) Young, I. G.; Gibson, F. *Biochim. Biophys. Acta* **1969**, *177*, 182 - 183.

- 36) a) Ozenberger, B. A.; Brickman, T. J.; McIntosh, M. A. *J. Bacteriol.* **1989**, *171*, 775 - 783; b) Nahlik, M. S.; Brickman, T. J.; Ozenberger, B. A.; McIntosh, M. A. *J. Bacteriol.* **1989**, *171*, 784 - 790.
- 37) Liu, J.; Quinn, N.; Berchtold, G. A.; Walsh, C. T. *Biochemistry* **1990**, *29*, 1417 - 1425.
- 38) Müller, R.; Breuer, M.; Wagener, A.; Schmidt, K.; Leistner, E. *Microbiology* **1996**, *142*, 1005 - 1012.
- 39) a) Franke, D.; Sprenger, G. A.; Müller, M. *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 578 - 581 (*Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 555 - 557); b) Dissertation D. Franke, Univ. Bonn, Juli **2001**; c) Franke, D.; Sprenger, G. A.; Müller, M. *ChemBioChem* **2003**, *4*, 775 - 777.
- 40) R. Bujnicki, R. Takors, unveröffentlichte Ergebnisse.
- 41) Nakajima, M.; Tomida, I.; Takei, S. *Chem. Ber.* **1959**, *92*, 163 - 172.
- 42) Mitsunobu, O. *Synthesis* **1981**, 1 - 28.
- 43) Boyd, D. R.; Sharma, N. D.; Dalton, H.; Clarke, D. A. *Chem. Comm.* **1996**, 45 - 46.
- 44) McKibben, B. P.; Barnosky, G. S.; Hudlicky, T. *Synlett* **1995**, 806 - 808.
- 45) Boyd, D. R.; Sharma, N. D.; O'Dowd, C. R.; Hempenstall, F. *Chem. Commun.* **2000**, 2151 - 2152.
- 46) DeMarinis, R. M.; Filer, C. N.; Waraszkiewicz, S. M.; Berchtold, G. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, *96*, 1193 - 1197; zit. Ref.
- 47) Chiasson, B. A.; Berchtold, G. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, *96*, 2898 - 2900.
- 48) Schlessinger, R. H.; Lopes, A. *J. Org. Chem.* **1981**, *46*, 5252 - 5253.
- 49) Ogawa, S.; Takagaki, T. *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 2356 - 2359.
- 50) Trost, B. M.; Chupak, L. S.; Lübbers, T. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 1732 - 1740.
- 51) Ikota, N.; Ganem, B. *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 351 - 352.
- 52) Posner, G. H.; Nelson, T. D. *Tetrahedron* **1990**, *46*, 4573 - 4586.
- 53) Roberts, S. M.; Sutton, P. W.; Wright, L. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1996**, 1157 - 1165.
- 54) a) Balci, M.; Sütbeyaz, Y.; Secen, H. *Tetrahedron* **1990**, *46*, 3715 - 3742; b) Carless, H. A. J.; Oak, O. Z. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1991**, 61 - 62; c) Carless, H. A. J. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1992**, 234 - 235; d) Billington, D. C.; Perron-Sierra, F.; Picard, I.; Beaubras, S.; Duhault, J.; Espinal, J.; Challal, S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1994**, *4*, 2307 - 2312; e) Kara, Y.; Balci, M.; Bourne, S. A.; Watson, W. H. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 3349 - 3352; f) Hudlicky, T.; Entwistle, D. A.; Pitzer, K. K.; Thorpe, A. *J. Chem. Rev.* **1996**, *96*, 1195 - 1220; g) Balci, M. *Pure Appl. Chem.* **1997**, *69*, 97 - 104.

- 55) Johnson, C. R.; Ple, P. A.; Su, L.; Heeg, M. J.; Adams, J. P. *Synlett* **1992**, 388 - 390; zit. Ref.
- 56) a) Hudlicky, T.; Nutchus, M. G.; Nugent, T. C. *Synth. Commun.* **1992**, 22, 151 - 157; b) Mandel, M.; Hudlicky, T.; Kwart, L. D.; Whited, G. M. *J. Org. Chem.* **1993**, 58, 2331 - 2333; c) Mandel, M.; Hudlicky, T. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1993**, 741 - 743; d) Hudlicky, T.; Mandel, M.; Rouden, J.; Lee, R. S.; Bachmann, B.; Dudding, T.; Yost, K. J.; Merola, J. S. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1994**, 1553 - 1567; e) Desjardins, M.; Brammer, L. E.; Hudlicky, T. *Carbohydr. Res.* **1997**, 304, 39 - 42; f) Brammer, L. E.; Hudlicky, T. *Tetrahedron: Asymmetry* **1998**, 9, 2011 - 2014; g) Hudlicky, T.; Restrepo-Sánchez, N.; Kary, P. D.; Jaramilo-Gómez, L. M. *Carbohydr. Res.* **2000**, 324, 200 - 203.
- 57) a) Ley, S. V.; Sternfeld, F.; Taylor, S. *Tetrahedron Lett.* **1987**, 28, 225 - 226; b) Ley, S. V.; Sternfeld, F. *Tetrahedron Lett.* **1988**, 29, 5305 - 5308; c) Ley, S. V. *Tetrahedron* **1989**, 45, 3463 - 3476; d) Hudlicky, T.; Price, J. D.; Rulin, F.; Tsunoda, T. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 9439 - 9440; e) Carless, H. A. J.; Oak, O. Z. *Tetrahedron Lett.* **1991**, 32, 1671 - 1674.
- 58) Weitere Übersichtsartikel zur Verwendung von *cis*-CHD als Synthesebasteine: a) Carless, H. A. J. *Tetrahedron: Asymmetry* **1992**, 3, 795 - 826. zit. Ref.; b) Hudlicky, T.; Cebulak, M. *Cyclitols and Their Derivatives: A Handbook of Physical, Spectral, and Synthetic Data*; VCH Publisher: Weinheim, 1993; zit. Ref.
- 59) a) Hudlicky, T.; Luna, H.; Price, J. D.; Rulin, F. *J. Org. Chem.* **1990**, 55, 4683 - 4687; b) Hudlicky, T.; Seoane, G.; Price, J. D.; Gadamasetti, K. G. *Synlett* **1990**, 433 - 440.
- 60) a) Hudlicky, T.; Olivio, H. F. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 9694 - 9696; b) Hudlicky, T.; Olivio, H. F.; McKibben, B. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 5108 - 5115.
- 61) a) Rouden, J.; Hudlicky, T. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1993**, 1095 - 1097; b) Hudlicky, T.; Rouden, J.; Luna, H.; Allen, S. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 5099 - 5107.
- 62) Tian, X.; Hudlicky, T.; Königsberger, K. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 3643 - 3644.
- 63) Hudlicky, T.; Seoane, G.; Pettus, T. *J. Org. Chem.* **1989**, 54, 4239 - 4243.
- 64) Banwell, M. G.; McRae, K. *J. Org. Lett.* **2000**, 2, 3583 - 586.
- 65) a) Banwell, M.; McLeod, M. *Chem. Commun.* **1998**, 1851 - 1852; b) Banwell, M. G.; Darnos, P.; Hockless, D. C.; McLeod, M. D. *Synlett* **1998**, 897 - 902.

- 66) a) Johnson, C. R.; Plenning, T. D. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 5655 - 5656; b) Johnson, C. R.; Penning, T. D. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 4726 - 4735.
- 67) a) Ballard, D. G. H.; Courtis, A.; Shirly, I. M.; Taylor, S. C. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1983**, 954 -955; b) Ballard, D. G. H.; Courtis, A.; Shirley, I. M.; Taylor, S. C. *Macromolecules* **1988**, *21*, 294 - 304.
- 68) a) Davies, I. W.; Senanayake, C. H.; Castonguay, L.; Larsen, R. D.; Verhoeven, T. R.; Reider, P. J. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 7619 - 7622; b) Davies, I. W.; Reider, P. J. *Chem. Ind. (London)* **1996**, 412 - 415.
- 69) a) Ensley, B. D.; Ratzkin, B. J.; Osslund, T. D.; Simon, M. J.; Wackett, L. P.; Gibson, D. T. *Science* **1983**, *222*, 167 - 169; b) Whited, G. *Proc. Biotrans '95* (Warwick) **1995**.
- 70) Evans, C. T.; Ribbons, D. W.; Thomas, S. D.; Roberts, S. M. (Enzymatix Ltd.), WO 9012798, **1990** [*Chem. Abstr.* **1991**, *115*, 90684w].
- 71) a) Ganem, B.; Holbert, G. W. *Bioorganic Chem.* **1977**, *6*, 393 - 396; b) Ganem, B. *Tetrahedron* **1978**, *34*, 3353 - 3383.
- 72) a) Kupchan, S. M.; Hemingway, R. J.; Coggon, P.; McPhail, A. T.; Sim, G. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, *90*, 2982 - 2983; b) Kupchan, S. M.; Hemingway, R. J.; Smith, R. M. *J. Org. Chem.* **1969**, *34*, 3898 - 3902.
- 73) Singh, J.; Dhar, K. L.; Atal, C. K. *Tetrahedron* **1970**, *26*, 4403 - 4406.
- 74) Hollands, R.; Becher, D.; Gaudemer, A.; Polonsky, J. *Tetrahedron* **1968**, *24*, 1633 - 1650.
- 75) Demuth, M. R.; Garrett, P. E.; White, J. D. *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, *98*, 634 - 635.
- 76) a) Holbert, G. W.; Ganem, B. *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 352 - 353; b) Holbert, G. W.; Ganem, B.; Engen, D. V.; Clardy, J. *Tetrahedron Lett.* **1979**, 715 - 718.
- 77) Ogawa, S.; Takagaki, T. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1987**, *60*, 800 - 802.
- 78) a) Policastro, P. P.; Au, K. G.; Walsh, C. T.; Berchtold, G. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 2443 - 2444; b) Walsh, C. T.; Erion, M. D.; Walts, A. E.; III, J. D. D.; Berchtold, G. A. *Biochemistry* **1987**, *26*, 4734 - 4745; c) Ye, Q. Z.; Liu, J.; Walsh, C. T. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1990**, *87*, 9391 - 9395; d) Anderson, K. S.; Kati, W. M.; Ye, Q.-Z.; Liu, J.; Walsh, C. T.; Benesi, A. J.; Johnson, K. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 3198 - 3200; e) Morollo, A. A.; Finn, M. G.; Bauerle, R. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 816 - 817; f) Viswanathan, V. K.; Green, J. M.; Nichols, B. P. *J. Bacteriol.* **1995**, *177*, 5918 - 5923; g) Romero, R. M.; Roberts, M. F.; Phillipson, J. D. *Phytochemistry* **1995**,

- 39, 263 – 276; h) Spraggon, G.; Kim, C.; Nguyen-Huu, X.; Yee, M.-C.; Yanofsky, C.; Mills, S. E. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2001**, *98*, 6021 – 6026.
- 79) Levin, J. G.; Sprinson, D. B. *J. Biol. Chem.* **1964**, *239*, 1142 - 1150.
- 80) Srinivasan, P. R. *Biochemistry* **1965**, *4*, 2860 - 2865.
- 81) Morollo, A. A.; Bauerle, R. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 9983 - 9987.
- 82) a) Mavrodi, D. V.; Ksenzenko, V. N.; Bonsall, R. F.; Cook, R. J.; Boronin, A. M.; Thomashow, L. S. *J. Bacteriol.* **1998**, *180*, 2541 – 2548; b) McDonald, M.; Mavrodi, D. V.; Thomashow, L. S.; Floss, H. G. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 9459 - 9460; c) Parsons, J. F.; Calabrese, K.; Eisenstein, E.; Ladner, J. E. *Biochemistry* **2003**, *42*, 5684 - 5693.
- 83) Floss, H. G.; Kim, C.-G.; Moore, B. S. in *Sekundärmetabolismus bei Mikroorganismen*; Kuhn, W., Fiedler, H.-P., Eds.; S. 91 – 97; Attempo Verlag Tübingen: Tübingen, 1995; zit. Ref.
- 84) a) Dong, H.; Mahmud, T.; Tornus, I.; Lee, S.; Floss, H. G. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 2733 - 2742; b) Mahmud, T. *Nat. Prod. Rep.* **2003**, *20*, 137 - 166; zit. Ref.
- 85) Mavrodi, D. V.; Bonsall, R. F.; Delaney, S. M.; Soule, M. J.; Phillips, G.; Thomashow, L. S. *J. Bacteriol.* **2001**, *183*, 6454 - 6465.
- 86) a) McCormick, J. R. D.; Reichenthal, J.; Hirsch, U.; Sjolander, N. O. *J. Am. Chem. Soc.* **1961**, *83*, 4104 - 4105; b) McCormick, J. R. D.; Reichenthal, J.; Hirsch, U.; Sjolander, N. O. *J. Am. Chem. Soc.* **1962**, *84*, 3711 - 3714; c) Lederle Laboratories, American Cyanamid Company; J. R. McCormick; US: 3038005, **1962**.
- 87) Teng, C.-Y. P.; Ganem, B. *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 2463 - 2464.
- 88) a) Yamanouchi Pharmaceut Co Ltd.; Yoshimitsu, I.; JP: 56121488, **1981**; b) General Electric Company, Meade, T. J.; US: 5340913, **1994**; EU: 0615998A2, **1994**.
- 89) Jessup, P. J.; Petty, C. B.; Roos, J.; Overman, L. E. *Org. Synth.* **1979**, *59*, 1 - 9.
- 90) Fukuyama, T.; Nakatsuka, S.-I.; Kishi, Y. *Tetrahedron* **1981**, *37*, 2045 - 2078.
- 91) Teng, C.-Y. P.; Ganem, B. *Tetrahedron Lett.* **1982**, *23*, 313 - 316.
- 92) Teng, C.-Y. P.; Ganem, B.; Doktor, S. Z.; Nichols, B. P.; Bhatnagar, R. K.; Vining, L. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 5008 - 5009.
- 93) Campbell, M.; McLeish, M. J. *J. Chem. Research* **1993**, 148 - 149.
- 94) Kozlowski, M. C.; Tom, N. J.; Seto, C. T.; Seffler, A. M.; Bartlett, P. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 2128 - 2140.

- 95) Bunnage, M. E.; Ganesh, T.; Masesane, I. B.; Orton, D.; Steel, P. G. *Org. Lett.* **2003**, *5*, 239 - 242.
- 96) a) Hashimoto, T.; Kondo, S.; Takita, T.; Hamada, M.; Takeuchi, T.; Okami, Y.; Umezawa, H. *J. Antibiot.* **1968**, *21*, 653 - 658; b) Hashimoto, T.; Takahashi, S.; Naganawa, H.; Takita, T.; Maeda, K.; Umezawa, H. *J. Antibiotics* **1972**, *25*, 350 - 355; c) Hashimoto, T.; Kondo, S.; Naganawa, H.; Takita, T.; Maeda, K.; Umezawa, H. *J. Antibiotics* **1974**, *27*, 86 - 87.
- 97) Masesane, I. B.; Steel, P. G. *Synlett* **2003**, 735 - 737.
- 98) Mander, L. N.; Sethi, S. P. *Tetrahedron Lett.* **1984**, *25*, 5953 - 5956.
- 99) He, Z.; Stigers Lavoie, K. D.; Bartlett, P. A.; Toney, M. D. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 2378 - 2385.
- 100) McDonald, M.; Mavrodi, D. V.; Thomashow, L. S.; Floss, H. G. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 9459 - 9460 [Lit. 82b]; zit. Ref.
- 101) Turner, J. M.; Messenger, A. J. *Adv. Microb. Physiol.* **1986**, *27*, 211 - 275; zit. Ref.
- 102) Zalkin, H. *Methods Enzymol.* **1985**, *113*, 287 - 292.
- 103) Romero, R. M.; Roberts, M. F.; Phillipson, J. D. *Phytochemistry* **1995**, *39*, 263 - 276 [Lit. 78g, zit. Ref].
- 104) Fürste, J. P.; Pansegrau, W.; Frank, R.; Blöcker, H.; Scholz, P.; Bagdasarian, M.; Lanka, E. *Gene* **1986**, *48*, 119 - 131.
- 105) Link, A. J.; Phillips, D.; Church, G. M. *J. Bacteriol.* **1997**, *179*, 6228 - 6237.
- 106) ADIC als Vergleichssubstanz wurde während eines Gastaufenthaltes an der University of Washington, Seattle/USA im Arbeitskreis von Prof. H. G. Floss durch Umsetzung von Chorismat mit isoliertem PhzE hergestellt und durch präp. HPLC gereinigt.
- 107) Pierson, L. S., III; Thomashow, L. S. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **1992**, *5*, 330 - 339.
- 108) Mavrodi, D. V.; Ksenzenko, V. N.; Bonsall, R. F.; Cook, R. J.; Boronin, A. M.; Thomashow, L. S. *J. Bacteriol.* **1998**, *180*, 2541 - 2548 [Lit. 82a]; zit. Ref.
- 109) Altschul, S. F.; Madden, T. L.; Schaffer, A. A.; Zhang, J.; Zhang, Z.; Miller, W.; Lipman, D. J. *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25*, 3389 - 3402.
- 110) Tanaka, S.; Lerner, S. A.; Lin, E. C. C. *J. Bacteriol.* **1967**, *93*, 642 - 648.
- 111) Diplomarbeit S. Eßer, Universität Bonn, **2001**.
- 112) a) Hashimoto, N.; Aoyama, T.; Shioiri, T. *Chem. Pharm. Bull.* **1981**, *29*, 1475 - 1478; b) Fields, S. C.; Dent III, W. H.; Green III, F. R.; Tromiczak, E. G. *Tetrahedron Letters*

- 1996**, 37, 1967 - 1970; c) Marcovici-Mizrahi, D.; Gottlieb, H. E.; Marks, V.; Nudelman, A. *J. Org. Chem.* **1996**, 61, 8402 - 8406.
- 113) Winterfeld, E. *Synthesis* **1975**, 617 - 630; zit. Ref.
- 114) Yoon, N. M.; Gyoung, Y. S. *J. Org. Chem.* **1985**, 50, 2443 - 2450.
- 115) Dess, D. B.; Martin, J. C. *J. Org. Chem.* **1983**, 48, 4155 - 4156.
- 116) a) Pittol, C. A.; Pryce, R. J.; Roberts, S. M.; Ryback, G.; Sik, V.; Williams, J. O. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1989**, 1160 - 1162; b) Boyd, D. R.; Dorrity, M. R. J.; Hand, M. V.; Malone, J. F.; Sharma, N. D. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 666 - 667; c) Tsuji, T.; Ohkita, M.; Nishida, S. *J. Org. Chem.* **1991**, 56, 997 - 1003; d) Hudlicky, T.; Boros, E. E.; Olivio, H. F.; Merola, J. S. *J. Org. Chem.* **1992**, 57, 1026 - 1028; e) Tran, C. H.; Crout, D. H. G.; Errington, W. *Tetrahedron: Asymmetry* **1996**, 7, 691 - 698.
- 117) Fleming, I. *Grenzorbitale und Reaktionen organischer Verbindungen*; Verlag Chemie: Weinheim, 1979.
- 118) C. Grondal, aktuelle Arbeiten im Rahmen der Diplomarbeit, Universität Bonn.
- 119) McDonald, R. N.; Steppel, R. N.; Dorsey, J. E. *Org. Synth.* **1970**, 50, 15 - 16.
- 120) Emmons, W. D.; Pagano, A. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, 77, 89 - 92.
- 121) a) Henbest, H. B.; Wilson, R. A. L. *J. Chem. Soc.* **1959**, 1958 - 1965; b) Adam, W.; Wirth, T. *Acc. Chem. Res.* **1999**, 32, 703 - 710; c) Freccero, M.; Gandolfi, R.; Sarzi-Amadè, M.; Rastelli, A. *J. Org. Chem.* **2000**, 65, 8948 - 8959; zit. Ref.
- 122) Sharpless, K. B.; Verhoeven, T. R. *Aldrichimica Acta* **1979**, 12, 63 - 85.
- 123) Energieminimierte Modelle wurden mit der Software „Chem 3D Ultra – Molecular Modelling and Analysis“, Version 7.0.0 der Firma CAMBRIDGESOFT DURCHGEFÜHRT.
- 124) Kishi, Y.; Aratani, A.; Tanino, H.; T. Fukuyama; Goto, T. *J. Chem. Soc., Chem. Comm.* **1972**, 64 - 65.
- 125) McManus, M. J.; Berchtold, G. A.; Jerina, D. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, 107, 2977 - 2978.
- 126) Banwell, M. G.; Haddad, N.; Hudlicky, T.; Nugent, T. C.; Mackay, M. F.; Richards, S. L. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1997**, 1779 - 1791.
- 127) a) Blandy, C.; Choukroun, R.; Gervais, D. *Tetrahedron Letters* **1983**, 24, 4189 - 4192; b) Sinou, D.; Emziane, M. *Tetrahedron Lett.* **1986**, 27, 4423 - 4426.
- 128) a) Lorberth, J.; Krapf, H.; Nöth, H. *Chem. Ber.* **1967**, 100, 3511 - 3519; b) Saito, S.; Yamashita, S.; Nishikawa, T.; Yokoyama, Y.; Inaba, M.; Morikawa, T. *Tetrahedron*

- Lett.* **1989**, 30, 4153 - 4156; c) Saito, S.; Nishikawa, T.; Yokoyama, Y.; Morikawe, T. *Tetrahedron Lett.* **1990**, 31, 221 - 224.
- 129) Thayer, J. S. *Organomet. Chem. Rev.* **1966**, 1, 157 - 159.
- 130) Diplomarbeit C. Dose, FH Aachen/Jülich, **2001**.
- 131) Meguro, M.; Asao, N.; Yamamoto, Y. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1995**, 1021 - 1022.
- 132) a) Guo, Z.-X.; Haines, A. H.; Taylor, R. J. K. *Synlett* **1993**, 607 - 608; b) Bonini, C.; Righi, G. *Synthesis* **1994**, 225 - 238; zit. Ref.
- 133) Ciaccio, J. A.; Address, K. J.; Bell, T. W. *Tetrahedron Lett.* **1986**, 27, 3697 - 3700.
- 134) a) Shing, T. K. M.; Tang, Y. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1990**, 748 - 749; b) Shing, T. K. M.; Tang, Y. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1990**, 312; c) Shing, T. K. M.; Ting, Y. *Tetrahedron* **1990**, 46, 6575 - 6584; d) Shing, T. K. M.; Cui, Y.; Tang, Y. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1991**, 756 - 757; e) Shing, T. K. M.; Tang, Y. *Tetrahedron* **1991**, 47, 4571 - 4578; f) Shing, T. K. M.; Cui, Y.; Tang, Y. *Tetrahedron* **1992**, 48, 2349 - 2358.
- 135) a) Schmidt, D. D.; Frommer, W.; Junge, B.; Müller, L.; Wingender, W.; Truscheit, E.; Schäfer, D. *Naturwissenschaften* **1977**, 64, 535 - 536; b) Puls, W.; Keup, U.; Krause, H. P.; Thomas, G.; Hoffmeister, F. *Naturwissenschaften* **1977**, 64, 536 - 537; c) Truscheit, E.; Frommer, W.; Junge, B.; Müller, L.; Schmidt, D. D.; Wingender, W. *Angew. Chem.* **1981**, 93, 738 - 755; d) Mahmud, T.; Tornus, I.; Egekrout, E.; Wolf, E.; Uy, C.; Floss, H. G.; Lee, S. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 6973 - 6983.
- 136) S. Eßer, persönliche Mitteilungen, **2003**. Verschiedene Beispiele haben gezeigt, dass eine Übertragung von Reaktionen und Reaktionsbedingungen auf regioisomere Cyclohexadiendiole zu unterschiedlichen Ergebnissen führen kann.
- 137) DeGrado, W. F.; Schneider, J. P.; Hamuro, Y. *J. Peptide Res.* **1999**, 54, 206 - 217; zit. Ref.
- 138) a) Eder, U.; Sauer, G.; Wiechert, R. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1971**, 10, 496 - 497; b) Hajos, Z. G.; Parrish, D. R. *J. Org. Chem.* **1974**, 39, 1615 - 1621; c) Gröger, H.; Wilken, J. *Angew. Chem.* **2001**, 13, 545 - 548, zit. Ref.; d) List, B.; Pojarliev, P.; Castello, C. *Org. Lett.* **2001**, 3, 573 - 575; e) Bahmanyar, S.; Houk, K. N. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 12911 - 12912; f) Chowdari, N. S.; Ramachary, D. B.; Córdova, A.; Barbas, C. F. III *Tetrahedron Lett.* **2002**, 43, 9591 - 9595.

- 139) a) List, B.; Lerner, R. A.; Barbas, C. F. III *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 2395 - 2396; b) Notz, W.; List, B. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 7386 - 7387.
- 140) a) Shibasaki, M.; Suzuki, T.; Ohshima, T.; Moll, G.; Matsunaga, S.; Kumagai, N.; Yoshikawa, N. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 2466 - 2467; b) Shibasaki, M.; Ohshima, T.; Yoshikawa, N.; Matsunaga, S.; Kumagai, N. *Org. Lett.* **2001**, *3*, 1539 - 1542; c) Shibasaki, M.; Yoshikawa, N. *Tetrahedron* **2001**, *57*, 5269 - 5279.
- 141) Darbre, T.; Machuqueiro, M. *Chem. Commun.* **2003**, 1090 - 1091.
- 142) G. A. Sprenger *et al.* sowie DSM BIOTECH, Jülich unveröffentlichte Ergebnisse im Rahmen von CHORUS.
- 143) a) Drauz, K. Waldmann, H. (Editors) in *Enzyme catalysis in organic synthesis: a comprehensive handbook*, 2.d ed., **2002**, Wiley-VCH, New York. b) He, A.; Li, T.; Daniels, L.; Fotheringham, I. Rosazza, J. P. N. *Appl. Environ. Microbiol.* **2004**, *70*, 1874 - 1881.
- 144) Iwasa, T.; Higashide, E.; Yamamoto, H.; Shibata, M. *J. Antibiot.* **1971**, *24*, 107 - 113.
- 145) a) Argoudelis, A. D.; Pike, T. R.; Sprague, R. W. *J. Antibiot.* **1976**, *29*, 777 - 786; b) Argoudelis, A. D.; Sprague, R. W.; Mizsak, S. A. *J. Antibiot.* **1976**, *29*, 787 - 796.
- 146) a) Hatanaka, H.; Kino, T.; Hashimoto, M.; Tsurumi, Y.; Kuroda, A.; Tanaka, H.; Goto, T.; Okuhara, M. *J. Antibiot.* **1988**, *41*, 999 - 1008; b) Amano, S.; Ogawa, N.; Ohtsuka, M.; Ogawa, S.; Chida, N. *Chem. Commun.* **1998**, 1263 - 1264.
- 147) a) Elliger, C. A.; Waiss, A. C.; Lundin, R. E. *Phytochem. Rep.* **1974**, *13*, 2319 - 2320; b) Cokelaere, M. M.; Dangreau, H. D.; Arnouts, S.; Kühn, E. R.; Decuypere, E. M.-P. *J. Agric. Food. Chem.* **1992**, *40*, 1839 - 1842; c) Boven, M. V.; Daenens, P.; Tytgat, J. *J. Agric. Food. Chem.* **1996**, *44*, 2239 - 2243.
- 148) Ausgewählte Beispiele: a) Juaristi, E.; López-Ruiz, H. *Curr. Med. Chem.* **1999**, *6*, 983 - 1004; b) Abdel-Magid, A. F.; Cohen, J. H.; Maryanoff, C. A. *Curr. Med. Chem.* **1999**, *6*, 955 - 970; c) Bolm, C.; Schiffrers, I.; Dinter, C. L.; Defrére, L.; Gerlach, A.; Raabe, G. *Synthesis* **2001**, *11*, 1719 - 1730; d) Berkessel, A.; Glaubitz, K.; Lex, J. *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, 2948 - 2952; e) Chippindale, A. M.; Davies, S. G.; Iwamoto, K.; Parkin, R. M.; Smethurst, C. A. P.; Smith, A. D.; Roriguez-Solla, H. *Tetrahedron* **2003**, *59*, 3253 - 3265; f) Koglin, N.; Zorn, C.; Beumer, R.; Cabrele, C.; Bubert, C.; Sewald, N.; Reiser, O.; Beck-Sickinger, A. G. *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 212 - 215.
- 149) a) Seebach, D.; Matthews, J. L. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1997**, 2015 - 2022; b) Gellman, S. H. *Acc. Chem. Res.* **1998**, *31*, 173 - 180.

- 150) a) Porter, E. A.; Wang, X.; Lee, H.-S.; Weisblum, B.; Gellman, S. H. *Nature* **2000**, *404*, 565; b) Raguse, T. R.; Porter, E. A.; Weisblum, B.; Gellman, S. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 12774 - 12785.
- 151) Zasloff, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1987**, *84*, 5449 - 5453.
- 152) a) Gademann, K.; Ernst, M.; Hoyer, D.; Seebach, D. *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 1302 - 1304; b) Gademann, K.; Häne, A.; Rueping, M.; Jaun, B.; Seebach, D. *Angew. Chem.* **2003**, 1573 - 1575.
- 153) a) Appella, D. H.; Christianson, L. A.; Klein, D. A.; Powell, D. R.; Huang, X.; Jr, J. J. B.; Gellman, S. H. *Nature* **1997**, *387*, 381 - 384; b) Cheng, R. P.; Gellman, S. H.; DeGrado, W. F. *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 3219 - 3232; c) Fisk, J. D.; Gellman, S. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 343 - 344; d) Schinnerl, M.; Murray, J. K.; Langenhan, J. M.; Gellman, S. H. *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, 721 - 726.
- 154) Woll, M. G.; Fisk, J. D.; LePlae, P. R.; Gellman, S. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 12447 - 12452.
- 155) Fülöp, F. *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 2181 - 2204; zit. Ref.
- 156) a) Enders, D.; Wiedemann, J.; Bettray, W. *Synlett* **1995**, 369 - 371; b) Enders, D.; Wiedemann, J. *Liebigs Ann.* **1997**, 699 - 706.
- 157) Hanahan, D. *J. Mol. Biol.* **1983**, *166*, 557 - 580.
- 158) Zeppenfeld, T.; Larisch, C.; Lengeler, J. W.; Jahreis, K. *J. Bacteriol.* **2000**, *182*, 4443 - 4452.
- 159) Tribe, D. E.; Austgen-Biojet International Pty, Ltd. (Melbourne, Au): US Pat.: 4681852, **1987**.
- 160) G. A. Sprenger, J. Bongaerts, persönliche Mitteilungen, **2003**.
- 161) Altling-Mees, A.; Short, J. M. *Nucleic Acids Res.* **1989**, *17*, 9494.
- 162) J. Bongaerts *et al.*, DSM BIOTECH, unveröffentlichte Arbeiten im Rahmen des CHORUS-Projektes.
- 163) Sambrook, J.; Fritsch, E. F.; Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2; 2. Aufl.; Cold Spring Harbor, NY, **1989**.
- 164) Gassen, H. G.; Schimpf, G. *Gentechnische Methoden*; 2. Aufl.; Spektrum Akademischer Verlag: Heidelberg - Berlin, **1999**.
- 165) Hanahan, D. *DNA Cloning, Vol. 1*; IRL Press Oxford, Washington, **1985**.
- 166) Sanger, F.; Nickeln, S.; Coulson, A. R. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1977**, *74*, 5463 - 5467.

- 167) Bradford, M. M. *Anal. Biochem.* **1976**, 72, 248 - 254.
- 168) Lämmli, U. K. *Nature* **1970**, 227, 680 - 685.
- 169) Weiterführende Untersuchungen zu dieser Fragestellung werden von S. Eßer im Rahmen seiner Arbeiten zur Dissertation durchgeführt.

1. **Toxizitätsprüfungen in Zellkulturen für eine Vorhersage der akuten Toxizität (LD50) zur Einsparung von Tierversuchen**
von W. Halle (1998), 92 Seiten
ISBN: 978-3-89336-221-9
2. **Die Rolle der Reaktionstechnik in der mikrobiellen Verfahrensentwicklung**
von D. Weuster-Botz (1999), II, 320 Seiten
ISBN: 978-3-89336-245-5
3. **Cell Culture Models as Alternatives to Animal Experimentation for the Testing of Neuroprotective Compounds in Stroke Research**
Practical Handbook of Methods
edited by A. J. Carter, H. Kettenmann (1999), 144 pages
ISBN: 978-3-89336-250-9
4. **Action and Visuo-Spatial Attention**
Neurobiological Bases and Disorders
Book of Abstracts
collected by P. H. Weiss (2000), XIV, 56 pages
ISBN: 978-3-89336-272-1
5. **Genomweite Genexpressionsanalysen mit DNA-Chips zur Charakterisierung des Glucose-Überflussmetabolismus von *Escherichia coli***
von T. Polen (2003), 100 Seiten
ISBN: 978-3-89336-337-7
6. **Auslegung des Detektorsystems für einen hochauflösenden Positronen-Emissions-Tomographen mit hoher Sensitivität**
von U. Heinrichs (2003), IV, 238 Seiten
ISBN: 978-3-89336-340-7
7. **Biological Principles Applied to Technical Asymmetric Catalysis**
by A. Liese (2003), VI, 206 pages
ISBN: 978-3-89336-344-5
8. **Designstudie eines μ CT-Zusatzes für einen hochauflösenden Positronen-Emissions-Tomographen: Beispiel für ein multimodales bildgebendes System**
von M. Khodaverdi (2004), III, 162 Seiten
ISBN: 978-3-89336-360-5
9. **Bioprocess Development for the Generation of Monocyte-Derived Dendritic Cells: Applicability in Breast Cancer Immunotherapy**
by H.R. Bohnenkamp (2004), XLII, 128 pages
ISBN: 978-3-89336-364-3

10. **Regulation der *clp*-Genexpression durch ClgR und Definition des ClgR-Regulons aus *Corynebacterium glutamicum***
von S. Engels (2004), V, 125 Seiten
ISBN: 978-3-89336-379-7
11. **Metabolomanalyse zur Untersuchung der Dynamik im Aromatenbiosyntheseweg in L-Phenylalanin Produzenten von *Escherichia coli***
von M. Oldiges (2005), XVI, 181 Seiten
ISBN: 978-3-89336-380-3
12. **Identifizierung und Charakterisierung eines Transkriptionsregulators der Aconitase von *Corynebacterium glutamicum***
von A. Krug (2005), VI, 122 Seiten
ISBN: 978-3-89336-382-7
13. **Prozessentwicklung der elektroenzymatischen Sulfoxidation mit Chloroperoxidase**
von S. Lütz (2005), XIV, 178 Seiten
ISBN: 978-3-89336-387-2
14. **Export von Proteinen mit Zwillingsarginin-Signalsequenzen über den Tat-Weg in *Escherichia coli***
von P. J. Kreutzenbeck (2005), 118 Seiten
ISBN: 978-3-89336-388-9
15. **Untersuchungen zur Fettsäure- und Zellwandsynthese sowie zur Glutamatbildung mit *Corynebacterium glutamicum***
von E. Radmacher (2005), 130 Seiten
ISBN: 978-3-89336-389-6
16. **Monomodale und multimodale Registrierung von autoradiographischen und histologischen Bilddaten**
von A. Vieten (2005), 116 Seiten
ISBN: 978-3-89336-390-2
17. **Biosynthese von Phosphonaten: Charakterisierung des rekombinanten Enzyms Phosphonopyruvat-Decarboxylase aus *Streptomyces viridochromogenes* Tü494**
von S. Johnen (2005), 128 Seiten
ISBN: 978-3-89336-400-8
18. **Ex-vivo Generierung von neutrophilen Zellen zur Prävention und Therapie der Sepsis**
von R. Herbold (2005), 202 Seiten
ISBN: 978-3-89336-407-7

19. **Entwicklung eines Donor/Akzeptor-Konzeptes für die asymmetrische Synthese unsymmetrischer Benzoine mit Hilfe ThDP-abhängiger Enzyme**
von P. Dünkelfmann (2005), 222 Seiten
ISBN: 978-3-89336-408-4
20. **Analyse der Bindungsspezifität der humanen Lck-SH3-Domäne anhand artifizieller und physiologischer Peptid-Liganden und strukturelle Charakterisierung dieser Peptide im Komplex mit SH3-Domänen**
von T. T. Tran (2005), 155 Seiten
ISBN: 978-3-89336-412-1
21. **Modeling Based Process Development of Fed-Batch Bioprocesses: L-Valine Production by *Corynebacterium glutamicum***
by M. Brik Ternbach (2005), 202 pages
ISBN: 978-3-89336-413-8
22. **Charakterisierung der Ausscheidung von L-Glutamat bei *Corynebacterium glutamicum***
von K. C. Stansen (2005), 151 Seiten
ISBN: 978-3-89336-416-9
23. **Metabolic and Bioprocess Engineering – a Fruitful Symbiosis**
by R. Takors (2005), 399 pages
ISBN: 978-3-89336-420-6
24. **Reaktionstechnische Untersuchungen zur enzymatischen *de novo* Synthese von GDP- β -L-Fucose und der *in situ* Fucosylierung von Oligosacchariden**
von C. Hoh (2005), 240 Seiten
ISBN: 978-3-89336-423-7
25. **Humane Primärzellen als Feederzellen für die Kokultur mit hämatopoetischen Stammzellen aus Nabelschnurblut**
von A. S. Magin (2006), 206 Seiten
ISBN: 978-3-89336-424-4
26. **Vergleichende Analyse der Sec- und Tat-abhängigen sekretorischen Proteingewinnung mit Gram-positiven Bakterien als Wirtsorganismen**
von D. Meißner (2006), 140 Seiten
ISBN: 978-3-89336-427-5
27. **Energie- und Redoxstoffwechsel von *Corynebacterium glutamicum***
von A. Kabus (2006), VI, 115 Seiten
ISBN: 978-3-89336-439-8
28. **NMR-Lösungsstruktur der humanen Hck SH3-Domäne im Komplex mit einem artifiziellen, hochaffinen Peptid-Liganden**
von H. Schmidt (2006), XII, 115 Seiten
ISBN: 978-3-89336-441-1

29. **Entwicklung und Untersuchung eines Verfahrens zur integrierten Aufreinigung von Plasmid DNA mittels wässriger Zweiphasenextraktion**
von A. Frerix (2006), VII, 127 Seiten
ISBN: 978-3-89336-442-8
30. **Advanced Methods in Multiplexing Multi-Pinhole Imaging**
Design and Implementation of a High-Resolution and High-Sensitivity Small-Animal SPECT Imaging System
by C. Lackas (2006), XX, 176 pages
ISBN: 978-3-89336-451-0
31. **Enantioselektive C-C Knüpfung mit Enzymen**
Charakterisierung und reaktionstechnische Bearbeitung der Benzaldehydlyase aus *Pseudomonas fluorescens* Biovar I
von T. Stillger (2006), XIV, 146 Seiten
ISBN: 978-3-89336-457-2
32. **Echtzeitsystem für Phasenrücksetzanalysen und Neuro-Rückkopplungen am MEG**
von H. Rongen (2006), 176 Seiten
ISBN: 978-3-89336-461-9
33. **Analyse des Mechanismus der Phosphatregulation in *Corynebacterium glutamicum***
von U. Sorger-Herrmann (2006), 117 Seiten
ISBN: 978-3-89336-466-4
34. **Enantioselective Reduction of Hydrophobic Keto Compounds in Multiphase Bioreactor**
by M. Villela Filho (2007), XVI, 196 pages
ISBN: 978-3-89336-470-1
35. **Untersuchung der Sec2-abhängigen Proteintranslokation in nicht-pathogenen Gram-positiven Bakterien**
von M. Caspers (2007), 164 Seiten
ISBN: 978-3-89336-488-6
36. **Regulation der Phosphatmangelgene von *Corynebacterium glutamicum* durch das Zweikomponenten-System PhoRS**
von S. Schaaf (2007), VI, 114 Seiten
ISBN: 978-3-89336-496-1
37. **Bioprozessentwicklung und in-situ Produktgewinnung von trans-Cyclohexadien-Derivaten**
von R. Bujnicki (2007), II, VIII, 163 Seiten
ISBN: 978-3-89336-498-5

38. **Metabolic Engineering of the Valine Pathway in *Corynebacterium glutamicum* – Analysis and Modelling**

by J. B. Magnus (2007), XIX, 178 pages
ISBN: 978-3-89336-499-2

39. **Von Chorismat abgeleitete funktionalisierte Cyclohexadiene**

Verwendung als chirale Synthesebausteine und Erweiterung der mikrobiell zugänglichen Produktpalette um einen Aminoalkohol
von V. Lorbach (2007), 181 Seiten
ISBN: 978-3-89336-500-5

Forschungszentrum Jülich
in der Helmholtz-Gemeinschaft



Band / Volume 39
ISBN 978-3-89336-500-5

Lebenswissenschaften
Life Sciences