



Institut für Biotechnologie

**Funktionalisierte Cyclohexadien-*trans*-1,2-diole:
Zugang durch Techniken des *metabolic
engineering* und Verwendung als Bausteine
in der Naturstoff- und Wirkstoffsynthese**

Dirk Franke

Funktionalisierte Cyclohexadien-*trans*-1,2-diole:
Zugang durch Techniken des *metabolic*
***engineering* und Verwendung als Bausteine**
in der Naturstoff- und Wirkstoffsynthese

Dirk Franke

Berichte des Forschungszentrums Jülich ; 3992

ISSN 0944-2952

Institut für Biotechnologie Jül-3992

D 5 (Diss., Bonn, Univ., 2002)

Zu beziehen durch: Forschungszentrum Jülich GmbH · Zentralbibliothek

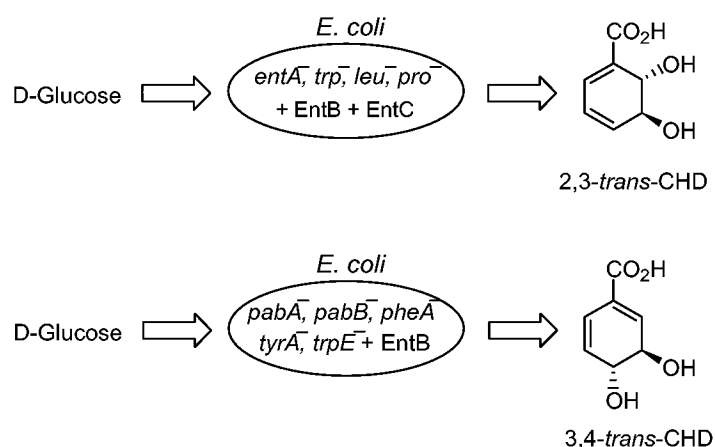
D-52425 Jülich · Bundesrepublik Deutschland

☎ 02461/61-5220 · Telefax: 02461/61-6103 · e-mail: zb-publikation@fz-juelich.de

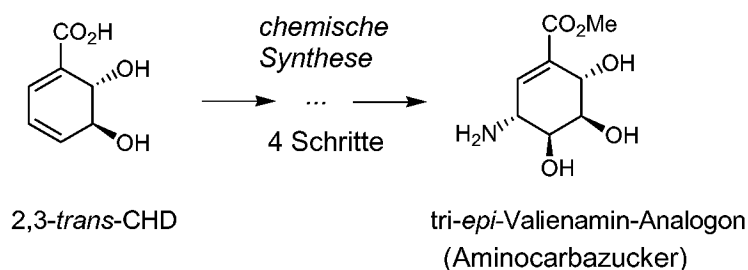
Funktionalisierte Cyclohexadien-*trans*-1,2-diole: Zugang durch Techniken des *metabolic engineering* und Verwendung als Bausteine in der Naturstoff- und Wirkstoffsynthese

Funktionalisierte Cyclohexadien-*trans*-1,2-diole (*trans*-CHD) wurden in den letzten Jahren als potentiell Ausgangsmaterial zur Synthese zahlreicher Natur- und Wirkstoffe, insbesondere in der Chemie der Kohlenhydratmimetika, diskutiert.

Durch homologe Expression der Gene für Isochorismatsynthase EntC und Isochorismatase EntB in *E.-coli*-Mutanten mit Defizienzen in den chorismatabhängigen Biosynthesewegen konnten mikrobielle Systeme erhalten werden, welche enantioselektiv die *trans*-CHD (2*S*,3*S*)-Dihydroxy-dihydrobenzoesäure (2,3-*trans*-CHD) und (3*R*,4*R*)-Dihydroxy-dihydrobenzoesäure (3,4-*trans*-CHD) aus Glucose und anderen erneuerbaren Kohlenstoff-Quellen herstellen.



Die mikrobiell erzeugten *trans*-CHD weisen im Gegensatz zu Chorismat und Isochorismat eine hohe Thermostabilität auf, da bei diesen keine Enolpyruvoylgruppe die Aromatisierung über pericyclische Übergangszustände ermöglicht. Durch Ausnutzung der Carbonsäurefunktion lassen sich die *trans*-CHD selektiv mit 96 % Reinheit und in 75 % Ausbeute durch Ionentauscherchromatographie oder alternativ durch Extraktion isolieren.



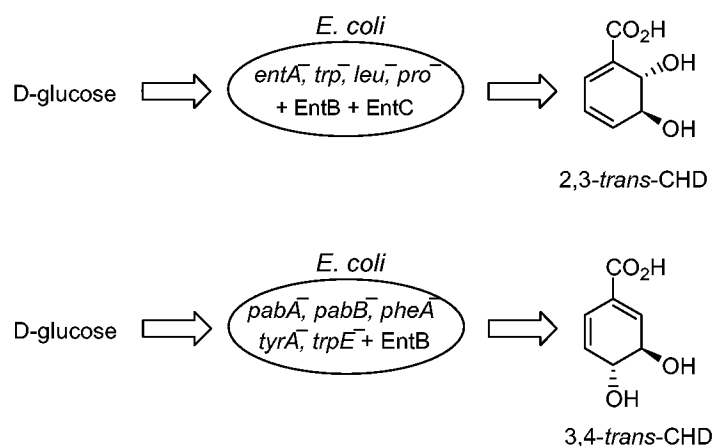
Ausgehend von enantiomerenreinem 2,3-*trans*-CHD wurden Synthesezugänge für Akzeptor- und Donorbausteinen zur Synthese von Pseudooligosacchariden mit Acarviosin-Substruktur erschlossen, einschließlich der erstmaligen Synthese eines Analogons des pharmakologisch interessanten Kohlenhydratmimetikums tri-*epi*-Valienamin und der formalen Synthese zu *ent*-Valienamin. Durch die Darstellung dieser Bausteine wurde die Verwendbarkeit der *trans*-CHD als Synthesebausteine in der Naturstoff- und Wirkstoffchemie beispielhaft demonstriert.

Functionalized Cyclohexadiene-*trans*-1,2-diols:

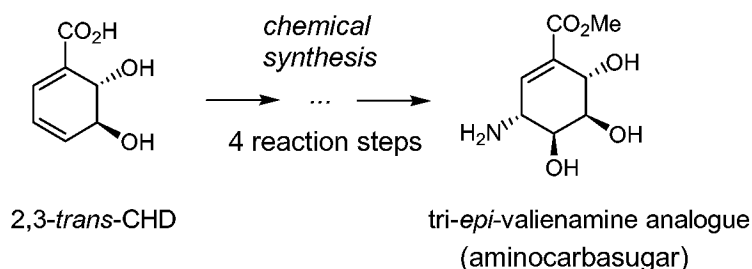
Access via Metabolic Engineering Techniques and Application as Building Blocks in Bioactive Substance Syntheses

Within the last years functionalized cyclohexadiene-*trans*-1,2-diols (*trans*-CHD) have been suggested to be potential starting material for the synthesis of a vast variety of bioactive substances, especially in the chemistry of carbohydrate mimetics.

By homologous expression of the genes encoding for isochorismate synthase EntC and isochorismatase EntB in *E. coli* mutants with deficiencies in the chorismate dependent pathways, microbial systems could be obtained, which enable the enantioselective production of two *trans*-CHD, (2*S*,3*S*)-dihydroxy-dihydrobenzoic acid (2,3-*trans*-CHD) and (3*R*,4*R*)-dihydroxy-dihydrobenzoic acid (3,4-*trans*-CHD), starting from glucose and other renewable carbon-sources.



Microbially produced *trans*-CHD have been characterized to be highly thermostable in contrast to chorismate and isochorismate, because no enolpyruvoyl residue enables the aromatization reaction via pericyclic transition states. Making use of the carboxylic acid functionality the *trans*-CHD can be isolated selectively with 96 % purity and 75 % yield by ion exchange chromatography or, alternatively, by extraction.



Starting from enantiomerically pure 2,3-*trans*-CHD synthetic routes towards acceptor and donor building blocks for the synthesis of pseudooligosaccharids with acarviosin substructure were developed, including the first synthesis of an analogue of the pharmacologically interesting carbohydrate mimetic tri-*epi*-valienamine and the formal synthesis of *ent*-valienamine. With the preparative access to these building blocks the applicability of *trans*-CHD as synthetic building blocks in bioactive substance syntheses has been demonstrated.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
2.	Ziel der Arbeit	3
3.	Allgemeiner Teil	6
3.1	Cyclohexadien-1,2-diole durch Biotransformation	6
3.1.1	Darstellung von Cyclohexadien- <i>cis</i> -1,2-diolen	6
3.1.2	Darstellung von Cyclohexadien- <i>trans</i> -1,2-diolen	8
3.2	Chemische Synthese von Cyclohexadien-1,2-diolen	9
3.2.1	Darstellung durch Totalsynthese	9
3.2.2	Darstellung durch Inversion eines Stereozentrums	14
3.2.3	Darstellung durch Hydrolyse von Enolpyruvoylverbindungen	16
3.3	Cyclohexadien- <i>trans</i> -1,2-diole im Enterochelin-Biosyntheseweg	16
3.4	Cyclohexadien-1,2-diole in der Naturstoff- und Wirkstoffsynthese	21
3.4.1	Verwendung von Cyclohexadien- <i>cis</i> -1,2-diolen	21
3.4.2	Verwendung von Cyclohexadien- <i>trans</i> -1,2-diolen	23
4.	Spezieller Teil	27
4.1	Chemische Darstellung der Referenzsubstanzen	27
4.1.1	Darstellung von racemischem 2,3- <i>trans</i> -CHD	27
4.1.2	Darstellung von racemischem 3,4- <i>trans</i> -CHD	29
4.1.3	Etablierung eines Analyseverfahrens zur <i>trans</i> -CHD-Quantifizierung	31
4.2	Mikrobieller Zugang zu 2,3- <i>trans</i> -CHD	35
4.2.1	Isolierung und Klonierung der Gene <i>entB</i> und <i>entC</i>	36
4.2.2	Untersuchungen zur Produktion und Aktivität von EntB und EntC	39
4.2.3	Mikrobielle Produktion von 2,3- <i>trans</i> -CHD	43
4.2.4	Zusammenfassung	49
4.3	Untersuchungen zur Isolierung von 2,3- <i>trans</i> -CHD	50
4.3.1	Isolierung durch Extraktion	52
4.3.2	Isolierung durch Reaktivextraktion	55
4.3.3	Isolierung durch Ionentauschchromatographie	59
4.3.4	Zusammenfassung	62
4.4	Mikrobieller Zugang zu 3,4- <i>trans</i> -CHD	63
4.5	Verwendung von <i>trans</i> -CHD in der Naturstoff- und Wirkstoffsynthese	67
4.5.1	Formaler synthetischer Zugang zu <i>ent</i> -Valienamin	68
4.5.2	Darstellung funktionalisierter Carbazucker	70
4.5.3	Synthese des 3,5,6-tri- <i>epi</i> -Valienamin-Analogons	79
4.5.4	Selektive Hydrierung von 2,3- <i>trans</i> -CHD	81
4.5.5	Zusammenfassung	82

5.	Diskussion und Ausblick	83
6.	Experimenteller Teil	95
6.1	Molekularbiologische Arbeiten	95
6.1.1	Verwendete <i>E.-coli</i> -Stämme und Plasmide	95
6.1.2	Verwendete Medien und Chemikalien	96
6.1.3	Klonierung der Gene <i>entB</i> und <i>entC</i>	97
6.2	Mikrobielle und separationstechnische Untersuchungen	102
6.2.1	Verwendete Geräte und Chemikalien	102
6.2.2	Verwendete Analytik	103
6.2.3	Untersuchungen zur Produktion und Aktivität von EntB und EntC	104
6.2.4	Untersuchung der <i>trans</i> -CHD-Bildung mit <i>E.-coli</i> -Mutanten	105
6.2.5	Produktion von 2,3- <i>trans</i> -CHD im pH-geregelten Rührkesselreaktor	107
6.2.6	Untersuchungen zur Produktisolierung	108
6.3	Chemische Synthesen	111
6.3.1	Verwendete Geräte und Chemikalien	111
6.3.2	Synthesevorschriften zur Darstellung von racemischem 3,4- <i>trans</i> -CHD	113
6.3.3	Synthesevorschriften zur Darstellung von racemischem 2,3- <i>trans</i> -CHD	117
6.3.4	Synthesevorschriften zur Folgechemie von 2,3- <i>trans</i> -CHD	120
7.	Röntgenstrukturanalyse	127
8.	Literaturverzeichnis	130
9.	Veröffentlichungen	147

Symbole für verwendete Einheiten

bp	Basenpaar(e)
cP	Centipoise
d	Tag(e)
Da	Dalton
h	Stunde(n)
min	Minute(n)
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
sec	Sekunde(n)
U	Unit

Symbole für verwendete Größen

c	[mol L ⁻¹]	Stoffkonzentration
de	[%]	Diastereomerenüberschuss (<i>diastereomeric excess</i>)
ε	[1]	Verteilungskoeffizient
ee	[%]	Enantiomerenüberschuss (<i>enantiomeric excess</i>)
η	[cP]	dynamische Viskosität
Φ	[1°]	Interplanarwinkel
Fl	[1]	Flasche(n) mit biotechnologisch hergestelltem Produkt
J	[s ⁻¹]	Kopplungskonstante
K _m	[mM]	Michaelis-Menten-Konstante
λ	[nm]	Wellenlänge
T	[°C]	Temperatur
μ	[h ⁻¹]	Wachstumsrate
t	[sec, min, h, d]	Zeit

Abkürzungen

AIBN	<i>a,a'</i> -Azabisisobutyronitril
ber.	berechnet
BTM	Biotrockenmasse
Bz	Benzoyl
CE	Kapillarzonenoelektrophorese
CHC	Cyclohexancarbonsäure
CoA	Coenzym A
DAD	Diodenarraydetektor
DAHP	3-Deoxy-D-arabino-heptulosonsäure-7-phosphat
dba	Dibenzylidenaceton

DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en(1,5-5)
DC	Dünnschichtchromatographie
DEAD	Diethylazodicarboxylat
dem.	demineralisiert
DHQ	3-Dehydrochinasäure
DHS	3-Dehydroshikimisäure
DIBAL	Di- <i>iso</i> -butylaluminiumhydrid
DMAP	4-Dimethylaminopyridin
DMPU	1,3-Dimethyl-3,4,5,6-tetrahydro-2(<i>1H</i>)-pyrimidinon
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E4P	Erythrose-4-phosphat
EE	Ethylacetat
EOF	Elektroosmotischer Fluss
EPSP	3-Enolpyruvoylshikimat-5-phosphat
GC	Gaschromatographie, -chromatogramm
gef.	gefunden
ges.	gesättigt
GRAS	als unbedenklich anerkannte Stoffe (<i>generally regarded as safe</i>)
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie, -chromatogramm
HMPT	Hexamethylphosphorsäuretriämid
HR-MS	Hochauflösende Massenspektroskopie; -spektrogramm
HTS	Hochdurchsatz-Screening (<i>high throughput screening</i>)
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
i. Vak.	im Vakuum
konz.	konzentriert
LOQ	Quantifizierungsgrenze (<i>limit of quantification</i>)
M ⁺	Molekülpeak
<i>m</i> -CPBA	<i>meta</i> -Chlorperbenzoesäure
MEM	2-Methoxyethoxymethyl
MS	Massenspektrometrie, -spektrum
NAD	Diphosphopyridinnucleotid
NBS	<i>N</i> -Bromsuccinimid
NMR	Kernspinresonanz (<i>nuclear magnetic resonance</i>)
OD	Optische Dichte
org.	organisch
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PEP	Phosphoenolpyruvat

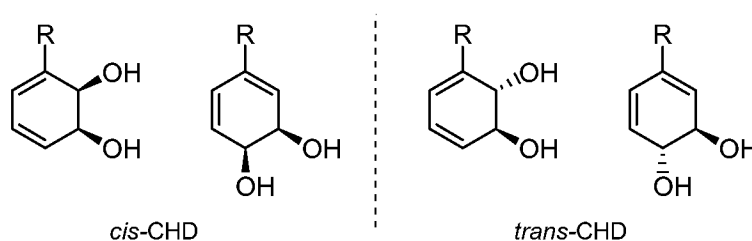
Ph	Phenyl
PTS	Phosphotransferasesystem
RBS	Ribosomale Bindestelle
R_f	Retentionsfaktor (<i>ratio of fronts</i>)
RP	Umkehrphase (<i>reversed phase</i>)
R_t	Retentionszeit
Schmp.	Schmelzpunkt
Sdp.	Siedepunkt
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SEM	2-(Trimethylsilyl)-ethoxymethyl
TBAF	Tetrabutylammoniumfluorid
TBS	<i>tert</i> -Butyldimethylsilyl
TBT	Tritbutylzinn
Tf	Trifluoromethansulfonyl
THF	Tetrahydrofuran
THS	Thexyldimethylsilyl
T_m	Schmelztemperatur (Oligonukleotide)
Tol	<i>para</i> -Toluyyl
TOMAC	Trioctylmethylammoniumchlorid
TMNO	Trimethylaminoxid
TPP	Triphenylphosphat
Ts	<i>para</i> -Toluensulfonyl
UV/Vis	Ultraviolett/ <i>Visible</i> ,-spektrum

1. Einleitung

Kohlenhydrate bilden in der belebten Natur oftmals einzigartige komplexe Strukturen, die als Schlüsselement in zahlreichen molekularen Erkennungsprozessen dienen.^[1] Substanzen, die beim Prozess der molekularen Erkennung von Kohlenhydraten interferieren, bergen aus diesem Grund ein großes Potential für biomedizinischen Anwendungen. Inhibitoren von kohlenhydratabbauenden oder -synthetisierenden Enzymen,^[2] Mimetika von Zelloberflächen-Kohlenhydraten,^[2b,3] und Kohlenhydratakzeptoren mit Polypeptidstrukturen^[4] stellen potentielle Kandidaten für neue, hochwirksame Pharmazeutika dar. Sie können unter anderem zur Behandlung von Entzündungen, Krebsmetastasen, bakteriellen und viralen Infektionen eingesetzt werden.

Da Mimetika von Kohlenhydraten ähnlich wie Kohlenhydrate meist durch eine hohe Anzahl funktioneller Gruppe mit chiraler Information gekennzeichnet sind, ist die Darstellung dieser Mimetika ausgehend von solchem Ausgangsmaterial günstig, welches den selektiven Aufbau von funktionellen Gruppen zulässt. Ausgangsmaterial, welches selber chirale Information trägt, kann durch chirale Induktion zur stereoselektiven Darstellung hochfunktionalisierter Strukturen verwendet werden.^[5]

In den letzten Jahren konnte durch die Arbeiten zahlreicher Syntheschemiker gezeigt werden, dass am Dien-System funktionalisierte Cyclohexadien-1,2-diole (CHD) als ideale Synthesebausteine in der Naturstoff- und Wirkstoffsynthese, insbesondere in der Chemie der Kohlenhydratmimetika, verwendet werden können (siehe Schema 1.1).^[6]



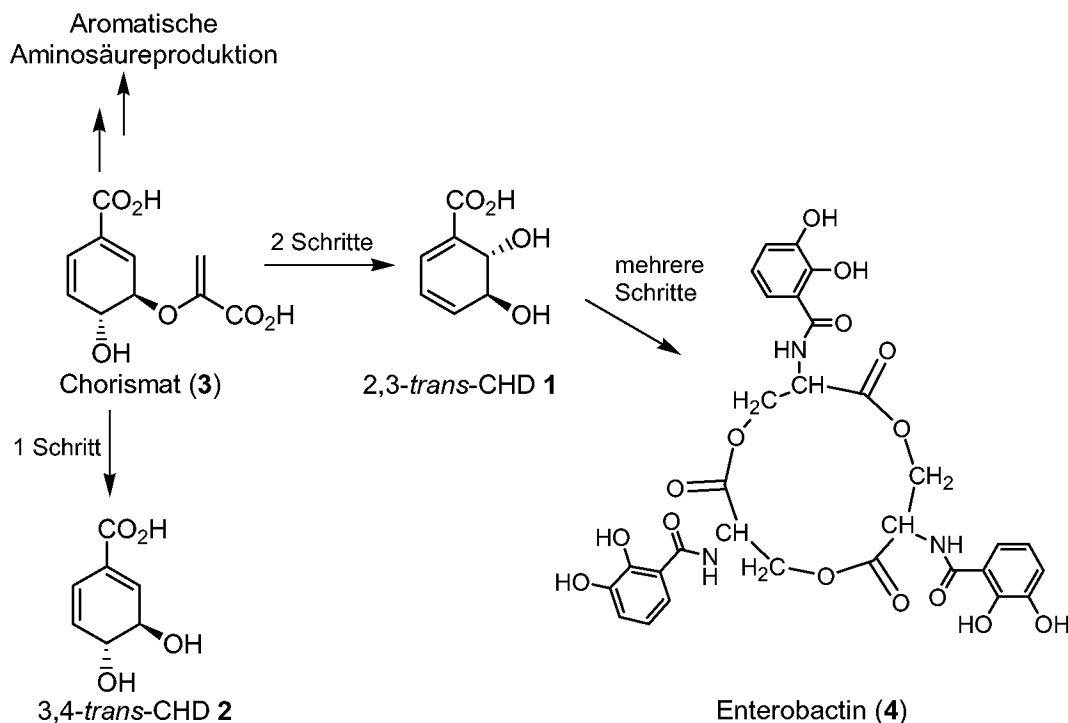
Schema 1.1: Funktionalisierte Cyclohexadien-1,2-diole (CHD). Dargestellt jeweils nur ein Enantiomer. *meso*-Verbindungen kommen bei zwei- und vierfacher Funktionalisierung von *cis*-CHD vor.

So konnten beispielsweise Synthesen zu zahlreichen Cyclitolen,^[7] einschließlich Conduritolen,^[8] Conduraminen,^[9] Inositolen,^[10] Aminoinositolen^[11] und zu Aminocarbazuckern^[12] aufgebaut werden.

Enantiomerenreine CHD können seit den Arbeiten von D. T. Gibson et al.^[13] im Jahre 1968 einfach und effizient durch mikrobielle Oxidation der entsprechenden Aromaten *via* Ganzzellbiotransformation erhalten werden. Die mikrobielle Synthese durch Dioxygenase-katalysierte Reaktion ist jedoch auf die selektive Produktion von CHD mit *cis*-ständiger vicinalen Diol-Einheit (*cis*-CHD) beschränkt, während am Dien-System funktionalisierte Cyclohexadiendiole mit *trans*-ständigen Alkoholfunktionen (*trans*-CHD) nicht über Dioxygenase-Katalyse produziert werden können. Alle chemischen Synthesen zu *trans*-CHD

sind durch aufwendige Reaktionsführung und geringe Selektivität gekennzeichnet. Zudem sind meist nur racemische *trans*-CHD auf diese Weise erhältlich.

trans-CHD, welche als funktionalisierendes Element eine Carbonsäuregruppe besitzen, kommen auch in der belebten Natur als Folgemetabolite des Chorismat-Biosyntheseweges vor, über welchen in Bakterien, Pflanzen und Pilzen (einschließlich Hefen) die aromatischen Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin synthetisiert werden. (5*S*,6*S*)-Dihydroxycyclohexa-1,3-dien-carbonsäure ((2*S*,3*S*)-Dihydroxy-2,3-dihydrobenzoesäure, 2,3-*trans*-CHD, **1**) ist in Enterobakterien ein aus Chorismat (**3**) in zwei Katalyseschritten gebildetes Intermediat auf dem Biosyntheseweg des Eisenchelators Enterobactin (**4**) (siehe Schema 1.3).



Schema 1.3: Vorkommen von *trans*-CHD als Folgemetabolite des Chorismat-Biosyntheseweges.

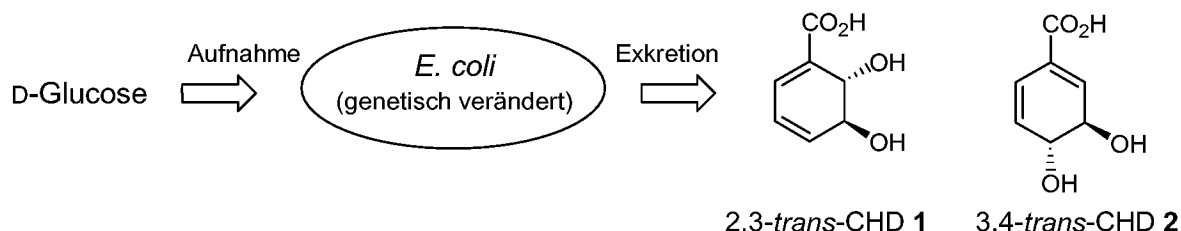
Dieses Siderophor löst extrazellulär Eisen aus seinen Salzen und spielt beim Transport von Schwermetallen in die Zelle eine Rolle.

Ein weiteres *trans*-CHD, (3*R*,4*R*)-Dihydroxycyclohexa-1,5-dien-carbonsäure ((3*R*,4*R*)-Dihydroxy-3,4-dihydrobenzoesäure, 3,4-*trans*-CHD, **2**), besitzt zwar keine gesicherte physiologische Bedeutung in lebenden Systemen, kann jedoch sowohl *in vitro*^[14] als auch *in vivo*^[15] durch enzymatische Spaltung mit in Bakterien vorkommenden Hydrolasen aus Chorismat (**3**) gebildet werden.

Da die aus Chorismat (**3**) ableitbaren *trans*-CHD in Bakterien, Pflanzen und Pilzen enantiomerenrein gebildet werden, stellen sie ideales Ausgangsmaterial für die Naturstoff- und Wirkstoffsynthese dar.

2. Ziel der Arbeit

Ziel der Arbeit ist es, einen mikrobiellen Zugang zu 2,3-*trans*-CHD **1** und 3,4-*trans*-CHD **2** mit Methoden der Stoffflussderegulation (*metabolic pathway engineering*) in *E.-coli*-Zellen zu schaffen und damit die Stoffklasse der *trans*-CHD als *chiral-pool*-Substanz für die synthetisch-organische Chemie verfügbar zu machen (siehe Schema 2.1).



Schema 2.1: Produktion von 2,3-*trans*-CHD **1** und 3,4-*trans*-CHD **2** mit *E.-coli*-Zellen.

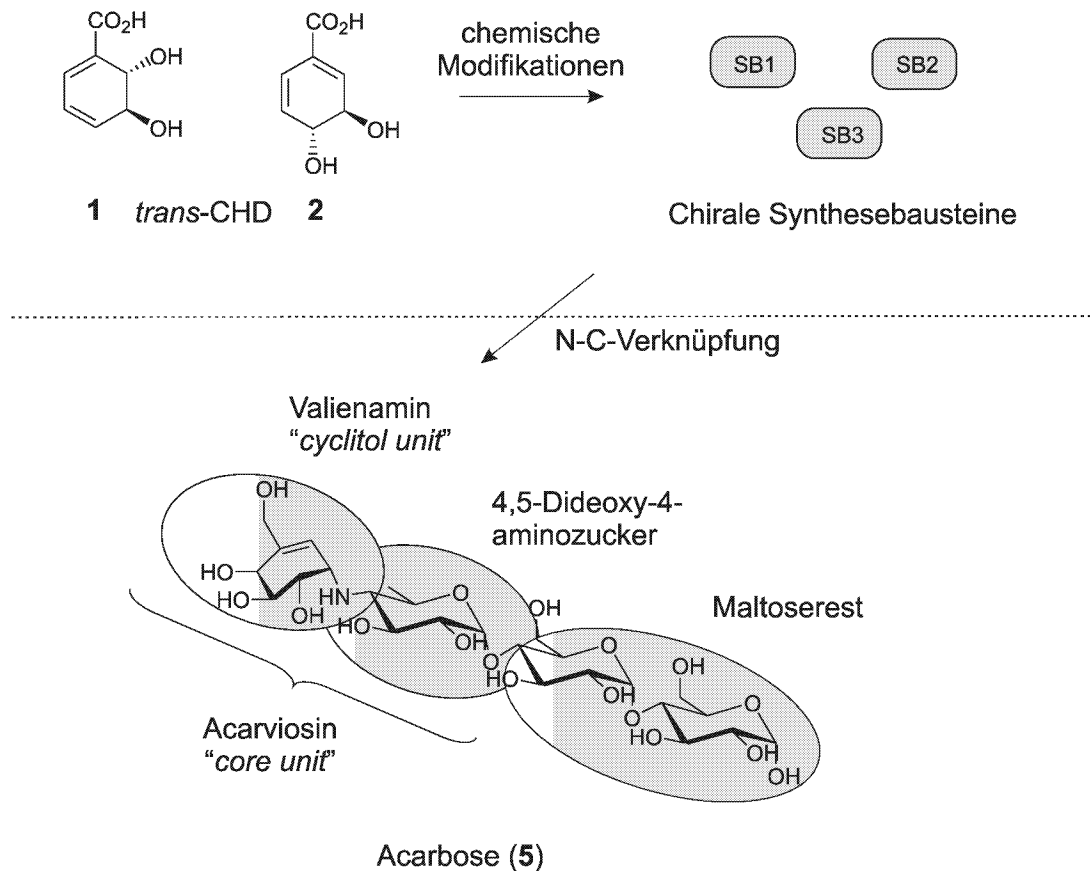
Zur Erreichung des mikrobiellen Zugang zu *trans*-CHD ist es entscheidend, dass durch Stoffflussveränderungen ein erhöhter Pool der Metabolite erreicht werden kann und ein Transport durch die Zellmembran stattfindet. In genetisch nicht veränderten *E.-coli*-Zellen wirkt Eisen im Medium repressorisch auf die *trans*-CHD-Biosynthese. Das mikrobielle System ist dagegen so zu gestalten, dass die zum Zellwachstum benötigte Eisenkonzentration nicht zu einer Repression der *trans*-CHD-Biosynthese führt. Dies kann nur erreicht werden, wenn der natürlich in *E.-coli*-Zellen vorhandene Regulationsmechanismus zur Kontrolle des Stoffflusses im Enterobactin-Biosyntheseweg ausgeschaltet oder umgangen wird. Eine Proteinsynthese zur Veränderung der Stoffflüsse in Richtung Biosynthese der *trans*-CHD, welche über einen induzierbaren, nicht über die Eisenkonzentration geregelten Promotor geregelt wird, sollte hier zum Ziel führen.

Da das in *trans*-CHD enthaltene Cyclohexadien-System durch Eliminierung von Wasser im allgemeinen leicht zur Aromatisierung neigt, ist eine weitere Fragestellung, ob die mikrobiell erzeugten *trans*-CHD eine genügend hohe Stabilität in wässriger Lösung besitzen, um sie mit guten Ausbeuten isolieren zu können.

Durch Verwendung des mikrobiellen Systems in einem Verfahren zur präparativen Darstellung und Isolierung der *trans*-CHD werden diese als *chiral-pool*-Substanz für die organische Synthese bereitgestellt.

Die Arbeit schließt die Aufgabenstellung ein, die Verwendbarkeit der mikrobiell erzeugten *trans*-CHD als Synthesebausteine in der Naturstoff- und Wirkstoffchemie zu testen. Obgleich die hohe Funktionalisierung durch zwei Alkoholgruppen, eine Carbonsäuregruppe sowie ein Dien-System eine ähnlich vielfältige Synthesechemie denkbar erscheinen lässt, wie in der Chemie der *cis*-CHD eingehend untersucht, ist das Synthesepotential der *trans*-CHD noch vergleichsweise ungewiß. Durch die Darstellung von Aminocarbazuckern und Cyclitol-einheiten, die als Bausteine zur Synthese von Pseudooligosacchariden verwendbar sind, soll

die Verwendbarkeit der *trans*-CHD als Ausgangsmaterial in der Chemie der Kohlenhydratmimetika demonstriert werden (siehe Schema 2.2).



Schema 2.2: Exemplarisch für die Verwendbarkeit von *trans*-CHD in der Naturstoff- und Wirkstoffsynthese werden Synthesebausteine (SB) für Pseudooligosaccharide mit Acarviosin-Unterstruktur dargestellt. Acarbose (5) ist ein Vertreter dieser Substanzklasse.

Pseudooligosaccharide mit Acarviosin-Unterstruktur inhibieren α -Glycosidasen und α -Amylasen, welche die glucosidische Spaltung von Oligo- und Polysacchariden im Darm (intestinal) katalysieren, und werden unter anderem bei der Behandlung von *Diabetes-mellitus*-Erkrankungen und Fettsucht eingesetzt.

Insbesondere die Synthese von Analoga des Aminocarbazuckers Valienamin ist von Interesse, da es als Cyclitoleinheit in Pseudooligosacchariden mit Acarviosin-Unterstruktur die Erkennungsfunktion für oligosaccharid-spaltende Enzyme, einschließlich α -Glycosidasen, bildet. Ziel ist die Bereitstellung von Valienaminanaloga, in denen eine Verknüpfung zu höheren Strukturen über eine schon vorhandene Aminogruppe erfolgen kann, sowie Analoga, bei denen eine reaktive Anbindestelle zur Einführung einer Aminogruppe vorhanden ist.

Die Aufgabenstellung der Arbeit ist stark interdisziplinär ausgerichtet und schließt methodisch Teilbereiche ein, die der Molekularbiologie, der Mikrobiologie, der Verfahrenstechnik und der präparativen Synthesechemie zugeordnet sind. Aufgrund der Interdisziplinarität des Themas existieren zahlreiche Anknüpfungspunkte für

Zusammenarbeiten mit Forschungsgruppen, die über erforderliches Spezialwissen verfügen (siehe Abbildung 2.1).

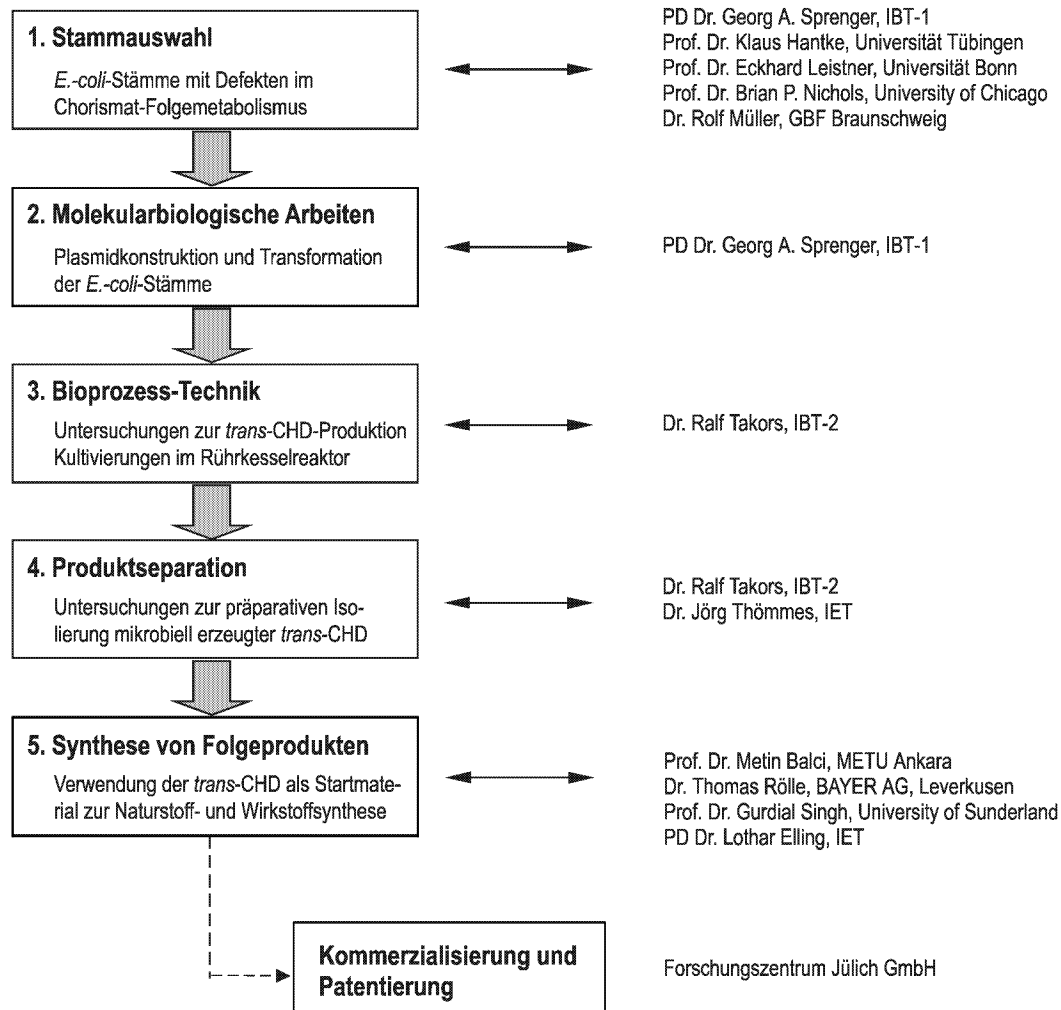


Abbildung 2.1: Der Zugang zu *trans*-CHD sowie deren Anwendung in der Naturstoff- und Wirkstoffsynthese erfolgt in enger Zusammenarbeit mit wissenschaftlichen und industriellen Einrichtungen aus den Bereichen Biologie, Verfahrenstechnik und Chemie.

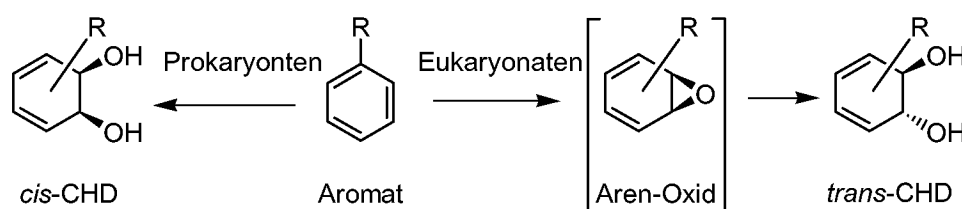
3. Allgemeiner Teil

Am Dien-System funktionalisierte Cyclohexadien-1,2-diole (CHD) sind sowohl enzymatisch als auch chemisch hergestellt worden, wenn auch mit unterschiedlicher Effizienz.

Während *cis*-CHD seit den Arbeiten von D. T. Gibson et al. im Jahre 1968^[16] durch mikrobielle Oxidation *via* Dioxygenase-Katalyse aus den Aromaten gewonnen werden, ist diese Strategie zur Darstellung von *trans*-CHD untauglich. In den letzten Jahren wurde das Anwendungspotential mikrobiell produzierter *cis*-CHD von zahlreichen Synthesechemikern, insbesondere von T. Hudlicky und M. Banwell, durch die Darstellung einer großen Anzahl pharmakologisch interessanter Natur- und Wirkstoffe eindrucksvoll demonstriert. Die Verwendung von *trans*-CHD in der Naturstoff- und Wirkstoffsynthese beschränkt sich auf nur wenige Einzelbeispiele, da bisher kein zu den *cis*-CHD vergleichbarer effizienter Zugang zu diesen chiralen Bausteinen vorhanden ist.

3.1 Cyclohexadien-1,2-diole durch Biotransformation

Sowohl *cis*-CHD als auch *trans*-CHD lassen sich durch Biotransformation aus den entsprechenden Aromaten gewinnen. Während in Prokaryonten durch Dioxygenase-Reaktion ausschließlich *cis*-CHD gebildet werden, entstehen in Eukaryonten durch Monooxygenasen und Epoxid-Hydrolasen ausschließlich *trans*-CHD über die entsprechenden Aren-Oxide (siehe Schema 3.1).^[17]



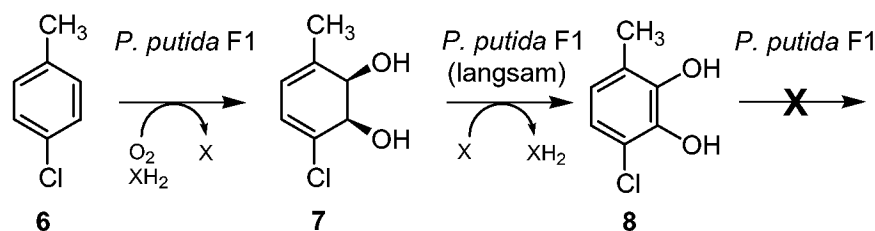
Schema 3.1: Darstellung von Cyclohexadien-1,2-diolen durch Biotransformationen aus Aromaten.

3.1.1 Darstellung von Cyclohexadien-*cis*-1,2-diolen

Die Anfänge der systematischen Studien des oxidativen Abbaus von Aromaten zu *cis*-CHD gehen bis auf einen Bericht von K. Störmer et al.^[18] zu Beginn des zwanzigsten Jahrhunderts zurück, der das Wachstum von *Bacillus hexacarbororum*-Stämmen auf Toluol und Xylen untersuchte. Die Oxidation von Benzen zu Catechol wurde daraufhin von verschiedenen Arbeitsgruppen berichtet.^[19]

1968 wurde erstmals in der Arbeitsgruppe von D. T. Gibson^[16] ein Stamm des Bodenbakteriums *Pseudomonas putida* beschrieben, der auf Benzen, Toluol und Ethylbenzen als einziger Kohlenstoffquelle wächst, also offensichtlich diese Aromaten aufzunehmen und zu katabolisieren vermag. Dieser Stamm wird heute als *P. putida* F1-Stamm bezeichnet. Die

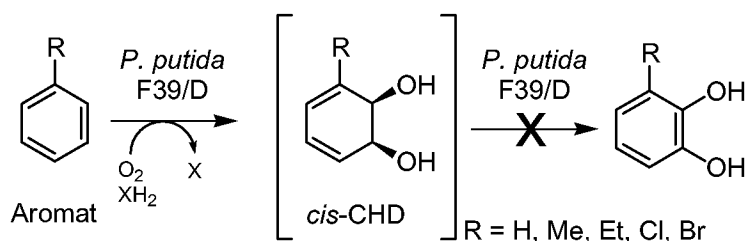
Frage nach den Zwischenprodukten des Aromaten-Katabolismus in *P. putida* F1 wurde von N. L. Söhngen et al. durch die Isolierung der Oxidationsprodukte von 4-Chlortoluen (**6**) aus *P. putida* F1-Kultivierungsüberstand teilweise gelöst.^[19a] **6** wird durch Dioxygenase-Reaktion in (+)-*cis*-4-Chlor-2,3-dihydroxy-1-methylcyclohexa-4,6-dien (**7**) überführt, danach über *cis*-Diol-Dehydrogenase zum 4-Chlorcatechol (**8**) oxidiert, welches im Gegensatz zu den analogen Oxidationsprodukten von Benzen, Toluol und Ethylbenzen in *P. putida* F1 nicht weiter oxidiert wird (Schema 3.2).



Schema 3.2: Oxidationsprodukte von 4-Chlortoluen (**6**) in *P. putida* F1.^[19a]

Das von N. L. Söhngen und Mitarbeiter im Kultivierungsüberstand nachgewiesene und aus diesem isolierte **7** kann somit als erstes mikrobiell erzeugtes *cis*-CHD gelten.

In einer Mutante des *P. putida* F1-Stammes, heute unter *P. putida* F39/D bekannt, fand D. T. Gibson et al.^[20] einen Abbruch der metabolischen Oxidation auf der Stufe der *cis*-CHD durch fehlende *cis*-Diol-Dehydrogenase-Aktivität. Die gebildeten *cis*-CHD werden stattdessen in das Kulturmedium exkretiert (Schema 3.3).



Schema 3.3: Darstellung von *cis*-CHD mit *P. putida* F39/D.^[20]

In den Jahren seit 1968 wurde von zahlreichen Arbeitsgruppen das Spektrum der durch Dioxygenase-Reaktion mit *P. putida*-Stämmen und anderen Stämmen erhältlichen *cis*-CHD auf mehrere hundert Substanzen erweitert.^[21] Neben den Dihydroxylierungsprodukten von Naphthalen und anderen polycyclischen aromatischen Systemen werden heute auch zahlreiche weitere *cis*-CHD im industriellen Maßstab produziert und sind kommerziell erhältlich. Von Sigma-Aldrich werden zwölf *cis*-CHD und von diesen abgeleitete Substanzen angeboten (siehe Abbildung 3.1).

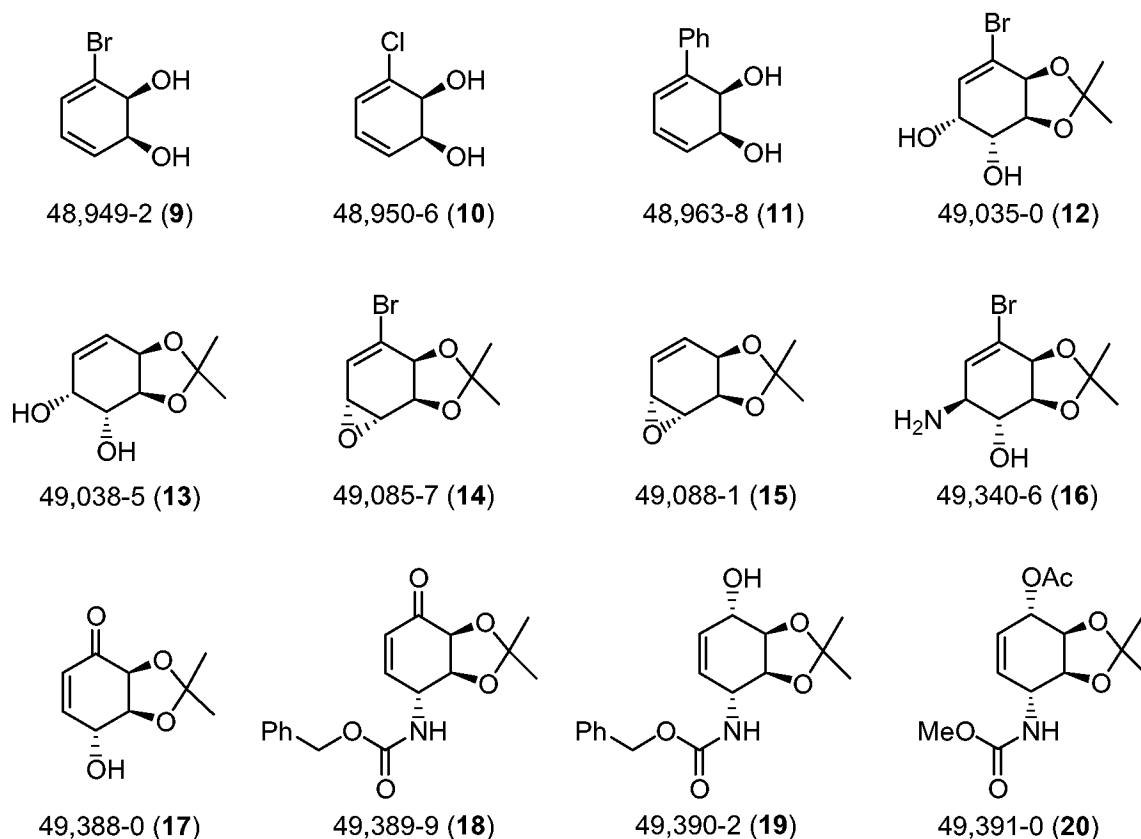
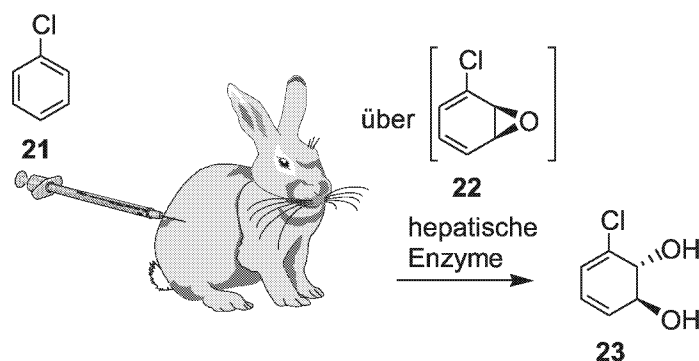


Abbildung 3.1: Von Sigma-Aldrich angebotene *cis*-CHD und Derivate aus mikrobieller Produktion.^[21]

3.1.2 Darstellung von Cyclohexadien-*trans*-1,2-diol

trans-CHD können *in vivo* über Aren-Oxide durch Katalyse mit eukaryontischen Enzymen enantioselektiv dargestellt werden. Bei Injektion von Chlorbenzen (21) und anderen Aromaten in den Blutkreislauf von Kaninchen wird eine hepatische Oxidation über Monooxygenase-Katalyse zum Epoxid 22, dann über Epoxidhydrolasen zum *trans*-CHD 23 festgestellt. 23 verbleibt in der Leber und kann extraktiv isoliert werden (siehe Schema 3.4).



Schema 3.4: Hepatischer Metabolismus von Chlorbenzen (21) liefert in Kaninchen *trans*-CHD 23.^[22]

Die Pionierarbeiten hierzu wurden in der Arbeitsgruppe von R. T. Williams durchgeführt^[22] und in den 60er und 70er Jahren von anderen Arbeitsgruppen, insbesondere von D. M. Jerina et al., aufgegriffen und die Monooxygenase-Reaktion für ein breites Spektrum von Aromaten untersucht.^[23]

Ein biotechnologischer Prozess zur Darstellung von *trans*-CHD als Feinchemikalien, der auf der Isolation des *trans*-CHD aus mit Aromaten intoxifizierter Kaninchenleber aufbaut, wird jedoch auch bei äußerst liberaler Auslegung bioethischer Grundsätze keine breite Akzeptanz der Produktnutznießer finden und wäre zudem aufgrund der geringen Biokompatibilität der Aromaten ineffizient.

Eine heterologe Produktion der hepatischen Enzyme in Prokaryonten oder auch Eukaryonten wäre ein gangbarer Weg zur *trans*-CHD-Produktion aus Aromaten. Über diesen Weg ist jedoch kein Beispiel in der Literatur bekannt.

3.2 Chemische Synthese von Cyclohexadien-1,2-diolen

Rein chemische Synthesen zu enantiomerenreinen *cis*-CHD sind in der Literatur wenig bekannt,^[24] da diese einfach und effizient durch Ganzzellbiotransformation über Dioxygenase-Reaktion mit genetisch veränderten Bakterienstämmen erhalten werden können (siehe Kapitel 3.1).

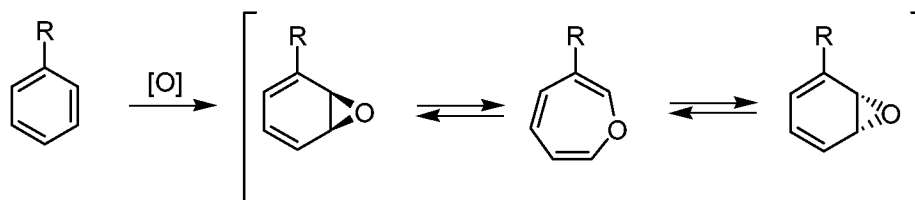
Die Darstellung von *trans*-CHD mit chemischen Methoden ist durch Totalsynthese aus kommerziell erhältlichen, einfachen Synthesebausteinen, aus *cis*-CHD durch Inversion eines Stereozentrums (*diastereomeric switch*)* oder durch Hydrolyse von mikrobiell erzeugten Enolpyruvylverbindungen möglich.

3.2.1 Darstellung durch Totalsynthese

Eine chemische Synthese durch Dihydroxylierung von Aromaten, analog der Ganzzellbiotransformation zur Gewinnung von *cis*-CHD, ist nicht effizient möglich. Hohe Selektivität bei Reaktionen an nicht-aktivierten Kohlenstoffatomen mit chemischen Reagentien ist auch allgemein schwierig zu erreichen.^[25]

Chemische Synthesen von *trans*-CHD, welche ausgehend von den entsprechenden Aromaten über Cyclohexadien-Epoxid-Strukturen führen, sind nur mit geringen Enantioselektivitäten durchzuführen. Grund hierfür ist, dass Arenepoxide sich in der Regel über eine Arenepoxid-Oxepin-Valenztautomerie^[26] umlagern, unter gleichzeitiger spontaner Racemisierung (siehe Schema 3.5).

* Zum Begriff „*diastereomeric switch*“ für die Umwandlung von *cis*-CHD zu *trans*-CHD siehe Arbeiten von T. Hudlicky.^[73c]

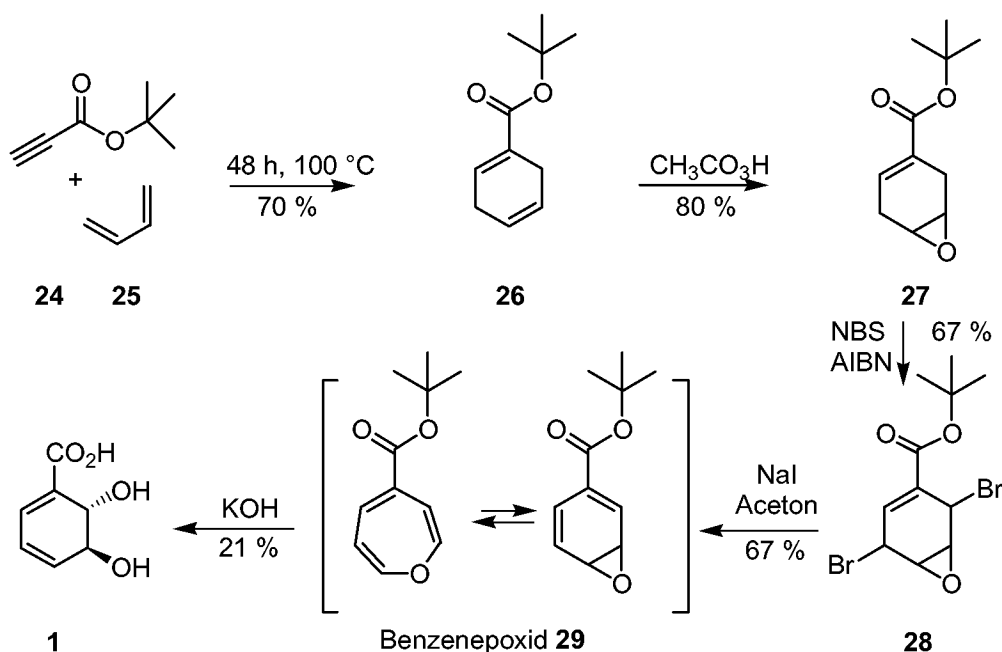


Schema 3.5: Arenepoxid-Oxepin-Umlagerung und Racemisierung der aus Arenen erhältlichen funktionalisierten Arenepoxide.^[26]

Eine weitere Schwierigkeit ist die regioselektive Öffnung der Arenepoxide. Durch eine kinetische Racematspaltung^[27] wäre die Öffnung zu nur einem von vier möglichen *trans*-CHD aus den Epoxiden denkbar. Ein Anwendungsbeispiel für eine kinetische Racematspaltung zur chemischen Synthese von *trans*-CHD ist nicht literaturbekannt.

Eine Ausnahme im Bezug auf spontane Racemisierung bildet das Brombenzen-Epoxid (Schema 3.6, R = Br), welches bei Raumbedingungen stabil ist und so prinzipiell als Synthesematerial zur Gewinnung von enantiomerenreinen *trans*-CHD verwendet werden könnte.^[28] Eine Totalsynthese über diese Strategie ist noch nicht untersucht worden.

Racemische *trans*-CHD können im Gegensatz zu enantiomerenreinen *trans*-CHD dagegen über funktionalisierte Benzen-Epoxide dargestellt werden. G. A. Berchtold et al. verwendeten funktionalisierte Benzen-Epoxide Anfang der 70er Jahre zur ersten Totalsynthese von 2,3-*trans*-CHD **1**,^[26,29] allerdings erfolgte der Zugang nicht über Oxidation von Aromaten sondern durch Aufbau eines Cyclohexadiensystems durch eine Diels-Alder-Cycloaddition und nachfolgende Funktionalisierung (siehe Schema 3.6).



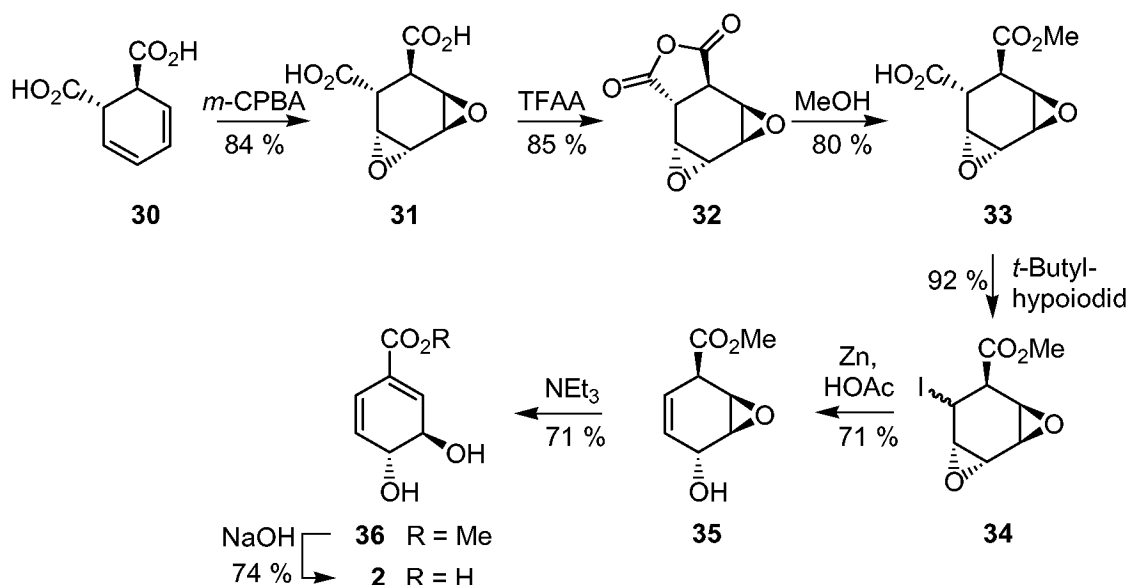
Schema 3.6: Erste chemische Synthese von racemischem 2,3-*trans*-CHD **1** nach G. A. Berchtold et al.^[29]

Nach weiteren regio- und stereoselektiven Reaktionen wird **1** in 5 % Ausbeute erhalten. Andere racemische oder enantioselektive Synthesen von 2,3-*trans*-CHD **1** sind nicht

literaturbekannt. Enantiomerenreine Derivate von **1**, welche durch eine Hydroxymethyl-Gruppe anstelle der Carbonsäuregruppe funktionalisiert sind, wurden sowohl durch Synthese aus nicht-chiralen Bausteinen^[30,31] als auch aus *chiral-pool*-Substanzen^[32] dargestellt. Die Stereochemie der *trans*-Dioleinheit ist in diesen Synthesen entweder entgegengesetzt zu der des in Bakterien vorkommenden 2,3-*trans*-CHD **1**,^[30,32] oder aber es wird ausschließlich racemisches Produkt erhalten.^[31] Eine Synthese von TBS-geschütztem Methylester von **1** über eine Diels-Alder-Cyclisierung ist sowohl racemisch als auch enantioselektiv von B. M. Trost beschrieben.^[33]

Zu 3,4-*trans*-CHD **2** sind insgesamt drei Syntheserouten bekannt, in denen jeweils racemisches Produkt erhalten wurde.

Die erste chemische Synthese von **2** gelang 1974 ebenfalls der Arbeitsgruppe von G. A. Berchtold (siehe Schema 3.7).^[34]

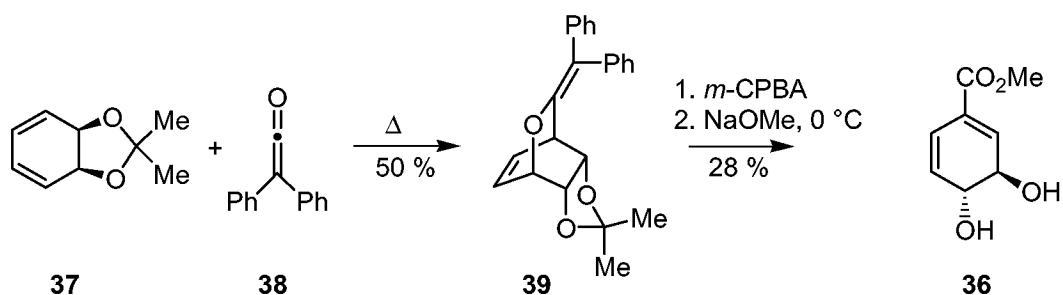


Schema 3.7: Chemische Synthese von racemischem 3,4-*trans*-CHD **2** nach G. A. Berchtold et al.^[34]

Racemisches **2** wird in dieser Synthese, ausgehend von *trans*-1,2-Dihydrophthalsäure (**30**), in sieben Reaktionsstufen mit 20 % Ausbeute dargestellt.

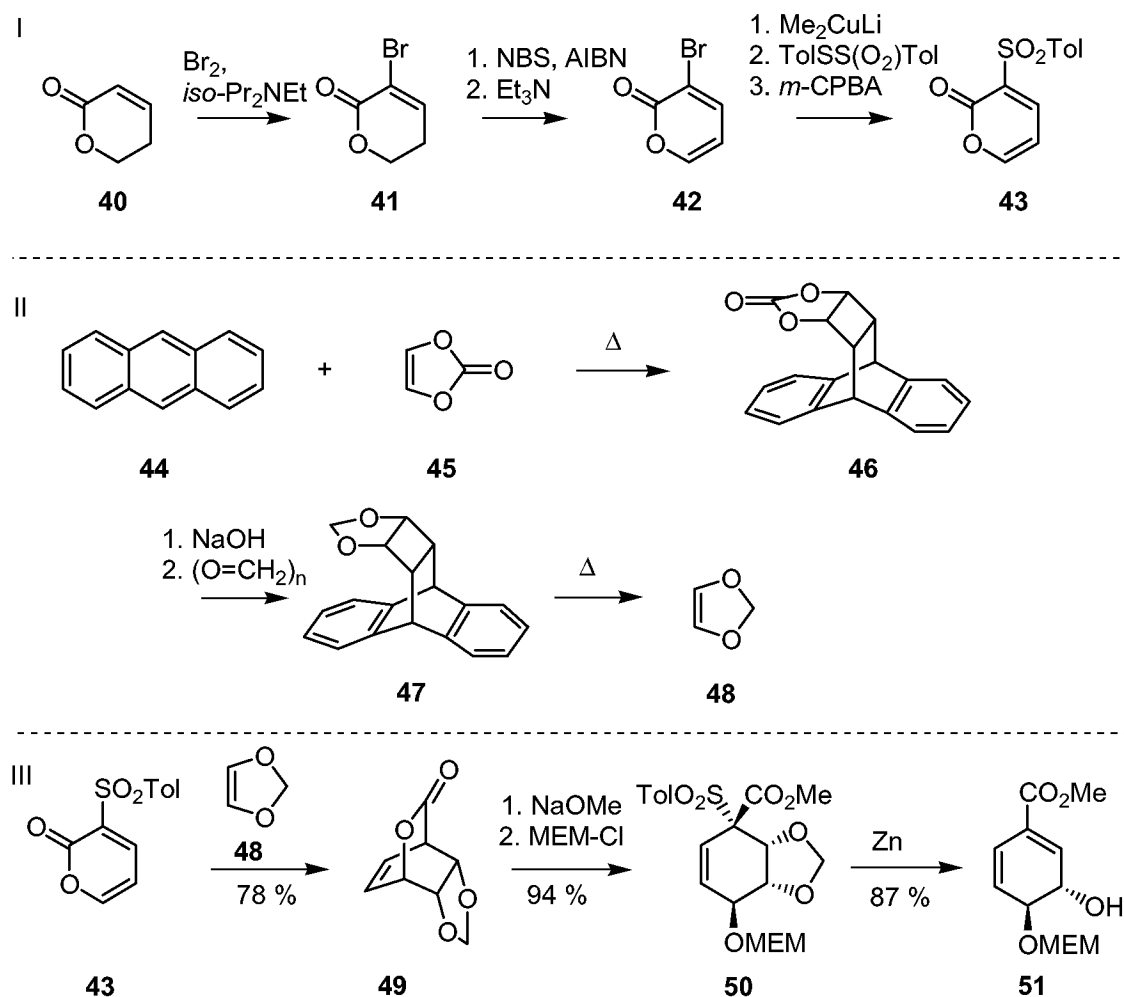
Eine Syntheseroute zu **2** von N. Ikota und B. Ganem verwendet Benzoesäure als Startmaterial.^[35] Über sechs Reaktionsstufen wird racemisches **2** mit 11 % Ausbeute erhalten. Ausgehend von acetonid-geschütztem Cyclohexadien-*cis*-diol **37** ohne Funktionalisierung und Diphenylketen (**38**) konnte in der Arbeitsgruppe um S. M. Roberts der Methylester **36** von 3,4-*trans*-CHD **2** dargestellt werden (siehe Schema 3.8).^[36]

Schlüsselschritt der Synthese ist wiederum eine [4+2]-Cycloadditions-Reaktion, in der das Keten **38** als Dienophil auftritt. In drei Reaktionsschritten wird racemisches **36** mit 14 % Gesamtausbeute dargestellt. Nachteilig ist, dass die Ausgangsverbindungen nicht kommerziell verfügbar sind und durch mehrere Reaktionsschritte synthetisiert werden müssen.^[37]



Schema 3.8: Chemische Synthese von racemischem 3,4-*trans*-CHD **2** nach S. M. Roberts et al.^[36]

G. H. Posner und Mitarbeiter konnten ebenfalls den MEM-geschützten Methylester **51** darstellen (siehe Schema 3.9).^[38]



Schema 3.9: Chemische Synthese von geschütztem 3,4-*trans*-CHD **51** nach G. H. Posner et al. über eine konvergente Synthesestrategie (Teilsynthesen I-III).^[38]

Schlüsselschritt der neunstufigen konvergenten Syntheseroute ist die ungewöhnliche Diels-Alder-Reaktion des 1,2-dioxygenierten Alkens **48** mit dem elektronenarmen 3-Sulfonyl-2-

pyron **43**.^{*} **43** wird in einer Teilsynthese (I) mit 13 % Ausbeute dargestellt, das 1,2-dioxygenierte Alken **48** in einer zweiten Teilsynthese (II) mit 30 % Ausbeute. Die Gesamtausbeute für die Darstellung von **51** ausgehend von **40** beträgt 8 % (I, III).

Auf der gleichen Route wurde von G. H. Posner et al. auch der TBS-Ether des Methylesters von **2** erhalten,^[38a] dem konstitutionsisomeren Pendant des von B. M. Trost synthetisierten TBS-geschützten Methylesters von **1**.^[33]

Ein Verfahren zur Überführung von racemischen *trans*-CHD in enantiomerenreine *trans*-CHD, beispielsweise unter Verwendung von Racematspaltung,^[40] wurde bisher nicht untersucht.

Kennzeichnend für alle chemischen Synthesen ist, dass sie geringe Gesamtausbeuten aufweisen. Die Darstellungen erfolgen durchweg in vielstufigen Synthesesequenzen. Es werden meistens racemische Produkte erhalten. Eine Zusammenfassung der Synthesen ist in Tabelle 3.1 dargestellt.

Tabelle 3.1: Chemische Syntheserouten zu *trans*-CHD (**1**, **2** und deren Derivate). Abkürzungen: *rac* = ausschließlich racemisches Produkt; *ent* = ausschließlich das *ent*-Produkt.

<i>trans</i> -CHD/ oder dessen Analoge	Schlüsselschritt oder – substanz	Anzahl der Reaktionsstufen (Ausbeute [%])	Arbeitsgruppe	Jahr, Referenz
1 (<i>rac</i>)	Diels-Alder-Reaktion	5 (5)	Berchtold	1974 ^[29]
1 (<i>rac</i>) ^d	Diels-Alder-Reaktion	7 (26)	Schlessinger	1981 ^[31]
1 (<i>ent</i>) ^d	über Bromlacton	7 (9)	Ogawa	1985 ^[30]
1 (<i>ent</i>) ^{b,d}	aus Chinasäure	12 (13)	Shing	1996 ^[32]
1 (<i>rac,ent</i>) ^{b,c}	Diels-Alder-Reaktion	4 (36)	Trost	1998 ^[33]
2 (<i>rac</i>)	über Cyclohexanbisepoxide	6 (7)	Berchtold	1974 ^[34]
2 (<i>rac</i>)	aus Benzoessäure	6 (11)	Ganem	1978 ^[35]
2 (<i>rac</i>) ^{b,c}	Diels-Alder-Reaktion	9 (8)	Posner	1987 ^[38]
2 (<i>rac</i>) ^{a,d}	[4+2]-Cycloaddition	3 (14)	Roberts	1996 ^[36]

^a Ausgangsverbindung nicht kommerziell erhältlich; ^b *trans*-Dioleinheit durch TBS-, MEM- oder andere Gruppen geschützt; ^c Carbonsäuregruppe als Ester geschützt; ^d Carbonsäuregruppe zum Alkohol reduziert.

* Das elektronenarme **43** (Dien) wirkt hier als Elektrophil, das elektronenreiche **48** (Dienophil) hingegen als Nukleophil. Da dies den normalen Eigenschaften der Diels-Alder-Komponenten konträr gegenübersteht, wird hier von einer Diels-Alder-Reaktion mit invertiertem Elektronenbedarf gesprochen.^[39]

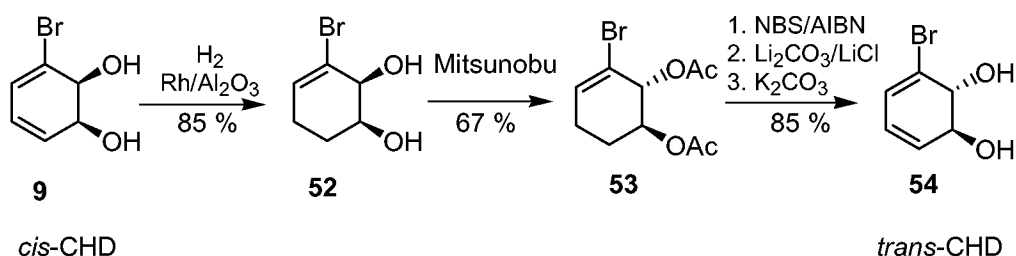
Der häufige Einsatz von giftigen, explosiven oder umweltgefährdenden Substanzen und die aufwendige Syntheseführung macht die chemische Darstellung der *trans*-CHD im präparativen Maßstab schwierig und unökonomisch.

3.2.2 Darstellung durch Inversion eines Stereozentrums

trans-CHD können ebenfalls aus den entsprechenden *cis*-CHD durch Inversion eines Stereozentrums (sogenanntem *diastereomeric switch*) dargestellt werden. Kennzeichnend für diese Operationen ist, dass die chirale Information einer der beiden Alkoholgruppen umgekehrt wird. Vorteilhaft beim *diastereomeric switch* ist, dass zum einen auf die Synthese und das Produktspektrum der mikrobiell erzeugten *cis*-CHD aufgebaut werden kann und zum anderen, dass während der Inversion des stereogenen Zentrums prinzipiell keine Chiralitätsinformation verlorengeht, es sich also um stereoselektive Routen handelt.

In der Literatur sind vier Beispiele bekannt, in denen *trans*-CHD durch *diastereomeric switch* aus den *cis*-CHD dargestellt wurden.

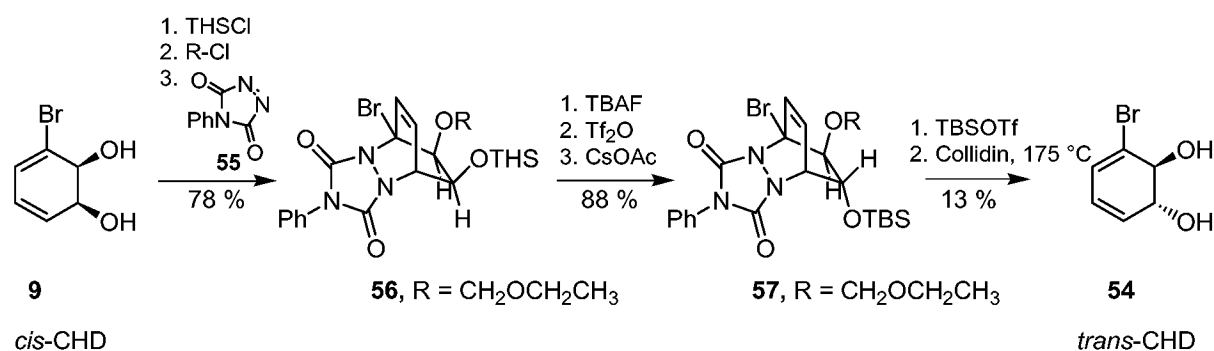
In einem Verfahren nach D. R. Boyd und Mitarbeitern^[28] wird die elektronenärmere Doppelbindung des Cyclohexadiens **9** reduziert, um Aromatisierung während der Inversionsreaktion des stereogenen Zentrums (der benachbarten Alkoholgruppe) zu verhindern. Die Inversion erfolgt durch Mitsunobu-Reaktion.^[41] Das Dien-System wird durch eine anschließende Bromierungs-Eliminierungs-Sequenz wiederhergestellt unter Bildung des *trans*-CHD **54** (siehe Schema 3.10).



Schema 3.10: Darstellung von *trans*-CHD aus *cis*-CHD durch *diastereomeric switch* nach D. R. Boyd et al.^[28] Reagentien für die Mitsunobu-Reaktion: 1. Diethylazodicarboxylat (DEAD), PPH₃, *p*-Nitrobenzoesäure, 2. K₂CO₃, 3. Ac₂O.

Die Gesamtausbeute der Synthese beträgt 48 %. Das von D. R. Boyd verwendete *cis*-CHD **9** ist auch kommerziell erhältlich.

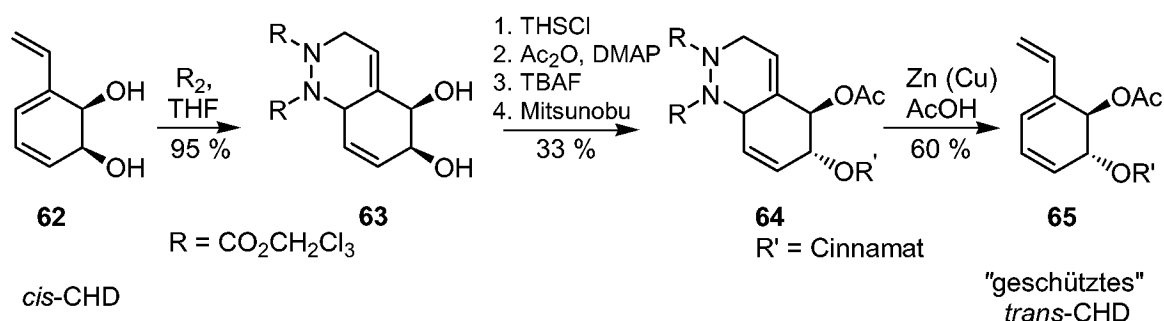
Unabhängig von diesen Arbeiten entwickelten T. Hudlicky und Mitarbeiter eine Methode zur Überführung der *cis*-CHD zu *trans*-CHD, bei der das Dien-System durch reversible Hetero-Diels-Alder-Reaktion geschützt wird.^[42] Ausgehend von *cis*-CHD **9** erfolgt eine Umsetzung mit 4-Phenyl-1,2,4-triazol-3,5-dion (**55**) als Dienophil (siehe Schema 3.11). Die Gesamtausbeute der achtfufigen Synthese beträgt 9 %.



Schema 3.11: Darstellung von *trans*-CHD aus *cis*-CHD durch *diastereomeric switch* nach T. Hudlicky et al.^[72c]

Während in der Syntheseroute nach D. R. Boyd die zum Substituenten *vicinal*-ständige Alkoholgruppe von **9** invertiert wird, bleibt diese in der Route von T. Hudlicky erhalten. Die beiden zueinander komplementären Verfahren können also dazu verwendet werden, beide Enantiomere von **54** selektiv zu darzustellen.

In einer anderen Route von T. Hudlicky et al. wird die Diengruppe durch Reaktion mit Diethylazodicarboxylat (DEAD) als Diazenring geschützt und so der Einsatz der Mitsunobu-Reaktion ermöglicht (siehe Schema 3.12).^[43] Die Gesamtausbeute der sechsstufigen Synthese beträgt 19 %.

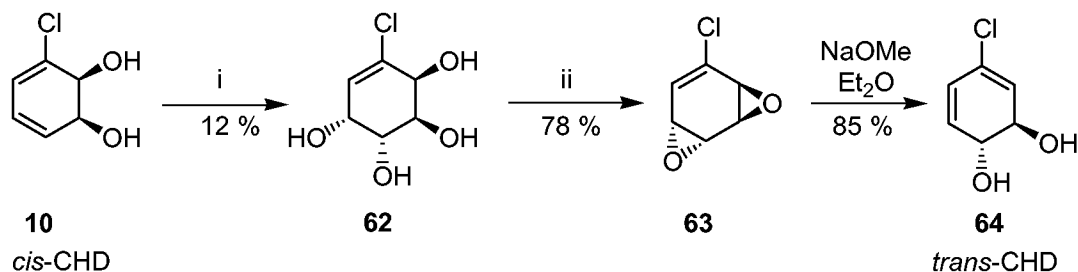


Schema 3.12: Mitsunobu-Route zur Darstellung von *trans*-CHD aus *cis*-CHD nach T. Hudlicky et al.^[43]
Reagentien für die Mitsunobu-Reaktion: 1. DEAD, PPH₃, *p*-Nitrobenzoesäure, 2. K₂CO₃ 3. Ac₂O.

Eine Modifikation des *diastereomeric switch* stellt die von D. R. Boyd vorgestellte Umwandlung eines *cis*-CHD zu einem *trans*-CHD unter formaler Verschiebung der funktionellen Gruppe dar (siehe Schema 3.13).^[44]

In drei Reaktionsstufen wird aus *cis*-2,3-Dihydro-2,3-dihydroxychlorbenzen (**10**), unter formaler Verschiebung des Chlorsubstituenten um eine Position, *trans*-3,4-Dihydro-3,4-dihydroxychlorbenzen (**64**) synthetisiert. Die Ausbeute beträgt für die Transformation 8 %, da die stereoselektive Dihydroxylierung von **10** nur mit 12 % Ausbeute erfolgt.

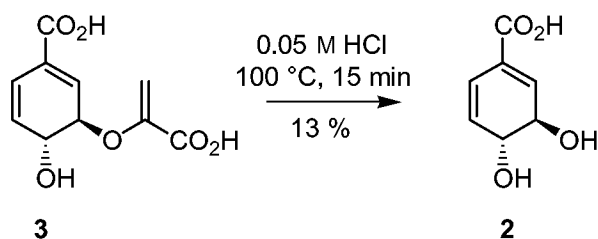
Alle literaturbekannten Routen zur Darstellung von *trans*-CHD aus *cis*-CHD sind durch mehrstufige Reaktionssequenzen und geringe Gesamtausbeuten gekennzeichnet.



Schema 3.13: Umwandlung des *cis*-CHD **10** in das *trans*-CHD **64** unter formaler Verschiebung der funktionellen Gruppe nach D. R. Boyd et al.^[44] Reagentien: i, OsO₄, CH₂Cl₂, TMNO; ii, AcOCMe₂COBr, MeCN.

3.2.3 Darstellung durch Hydrolyse von Enolpyruvoylverbindungen

Bereits seit den Arbeiten von I. G. Young 1969 ist bekannt, dass 3,4-*trans*-CHD **2** bei der sauren Hydrolyse von Chorismat (**3**) entsteht (siehe Schema 3.14).^[45]



Schema 3.14: Darstellung von 3,4-*trans*-CHD **2** durch Hydrolyse von Chorismat (**3**) nach I. G. Young et al.^[45]

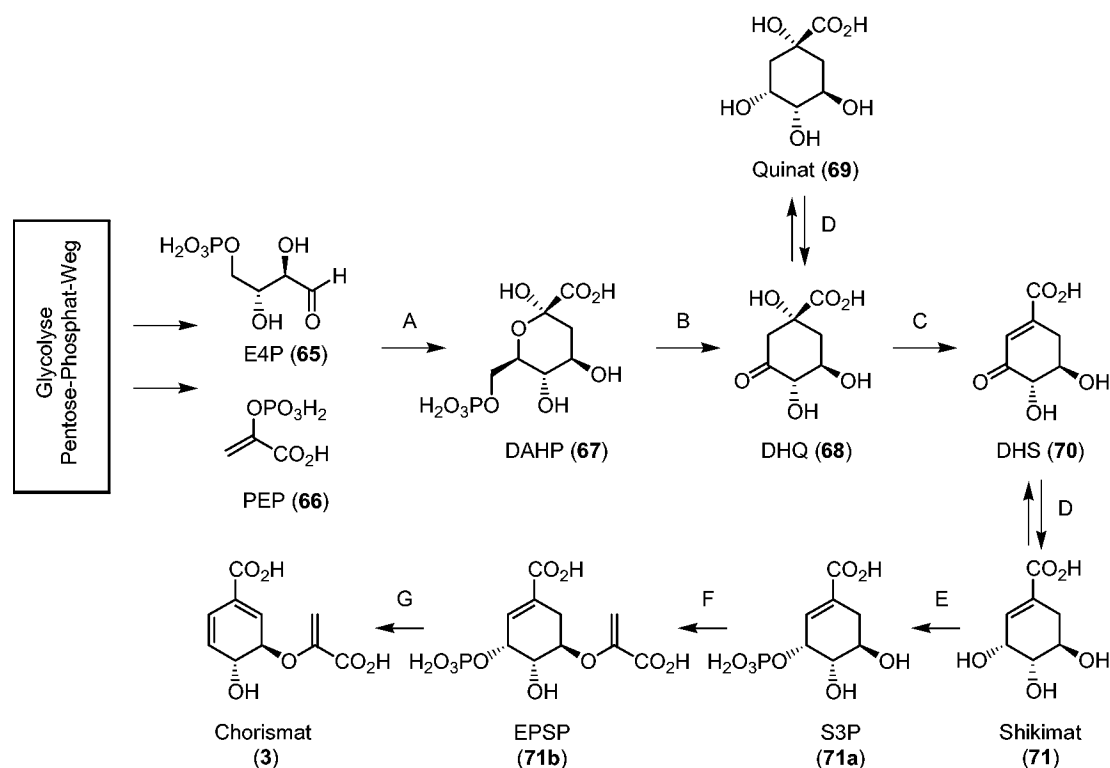
Bis zur Totalsynthese von **2** durch G. A. Berchtold^[34] war die Hydrolyse von **3** die einzige mögliche Darstellung dieser Verbindung. Obwohl Chorismat (**3**) als Substanz des *chiral pools* kommerziell erhältlich ist und enantiomerenreines **2** produziert wird, konnte sich die Darstellung von **2** aus **3** nicht durchsetzen. Eine Synthese von **2** aus **3** im präparativen Maßstab ist alleine aus dem Grund schon ineffizient, dass hohe Anteile an gleichzeitig entstehenden Nebenprodukten, 3-Hydroxybenzoat, 4-Hydroxybenzoat und Phenylpyruvat, die Isolation erschweren und die Ausbeute an **2** verschlechtern.

Eine Substitution der chemischen Hydrolysereaktion durch eine enzymatische Pyruvat-abbauung in Analogie zu den Arbeiten von I. G. Young^[46] ist prinzipiell denkbar. Es erscheint jedoch für diesen Fall günstiger, die enzymatische Chorismat-Umsetzung direkt in den bakteriellen Stofffluss zu integrieren, so dass die *trans*-CHD mikrobiell produziert werden.^[15]

3.3. Cyclohexadien-*trans*-1,2-diole im Enterochelin-Biosyntheseweg

Der Chorismat-Biosyntheseweg in Bakterien, Pflanzen und Pilzen beginnt mit der durch 3-Deoxy-D-arabino-heptulosonat-7-phosphat-Synthase (DAHP-Synthase) katalysierten Kondensation von Erythrose-4-phosphat (E4P, **65**) und Phosphoenolpyruvat (PEP, **66**) zu

DAHP (**67**) und dient der Produktion von Chorismat (**3**) (siehe Schema 3.15).^[47] Der Chorismat-Biosyntheseweg wird auch oft als „Shikimat-Biosyntheseweg“ bezeichnet, weil Shikimat (**71**) als erstes Intermediat identifiziert wurde.^[47]



Schema 3.15: Metabolische Umsetzungen im Chorismat-Biosyntheseweg in *E. coli*. DAHP: 3-Deoxy-D-arabino-heptulosonat-7-phosphat; DHQ: 3-Dehydroquinat; DHS: 3-Dehydroshikimat; S3P: Shikimat-3-phosphat; EPSP: 5-Enolpyruvyl-shikimat-3-phosphat. Involvierte Enzyme und Gene sind (A) DAHP-Synthase (Gene: *aroF*, *aroG*, *aroH*); (B) DHQ-Synthase (*aroB*); (C) DHQ-Dehydratase (*aroD*); (D) Shikimatdehydrogenase (*aroE*); (E) Shikimatkinase (*aroL*, *aroK*); (F) EPSP-Synthase (*aroA*); (G) Chorismatsynthase (*aroC*).

Die Intermediate des Chorismat-Biosyntheseweges sind, bis zum Shikimat (**71**), ausnahmslos C7-Bausteine mit einem hohen Grad an Funktionalisierungen. Aufgrund des wachsenden synthetischen Interesses an diesen Bausteinen sind in den letzten Jahren große Anstrengungen zur Etablierung mikrobieller Produktionsverfahren für Metabolite dieses Biosyntheseweges aufgewendet worden.

Durch Stoffflussderegulation insbesondere in *E.-coli*-Zellen konnten Verfahren zur labortech-nischen und kommerziellen Darstellung mit guten Endkonzentrationen entwickelt werden (siehe Tabelle 3.2). Die von J. W. Frost et al. beschriebenen Deregulationen in *E. coli* beruhen auf der Überexpression von *aro*-Genen sowie chromosomalen Deletionen der Gene *aroA* bis *aroL* für den Chorismat-Biosyntheseweg.

Kennzeichnend für die Bildung der Metabolite im Kultivierungsmedium ist jedoch, dass sie bei hoher Endkonzentration meist nicht rein erhalten werden, sondern in Gemischen mit

anderen Intermediaten des Chorismat-Biosyntheseweges vorliegen. Die maximal erreichbare

Tabelle 3.2: Mikrobielle Produktion von Metaboliten des Chorismat-Biosyntheseweges.

Metabolit	maximale Endkonzentration [mM] ([g L ⁻¹])	Organismus	Arbeitsgruppe	Jahr, Referenz
DAHP (67)	54 (16)	<i>E. coli</i>	Liao	1994 ^[48]
DHQ (68)	47 (9)	<i>E. coli</i>	Frost	1999 ^[49]
Quinat (69)	312 (60)	<i>E. coli</i>	Frost	1999 ^[50]
DHS (70)	401 (69)	<i>E. coli</i>	Frost	1999 ^[51]
Shikimat (71)	408 (71)	<i>E. coli</i>	Frost	2001 ^[52]
Chorismat (3)	4.4 (0.9)	<i>K. pneumoniae</i>	Turnbull	1996 ^[53]
	2.6 (0.6)	<i>E. coli</i>	Hilvert	1997 ^[54]

molare Ausbeute aus Glucose beträgt in *E. coli* durch den Verbrauch von einem Äquimol PEP (**66**) pro Glucose im Phosphotransferasesystem lediglich 43 %.^[49] Von J. W. Frost wurde für die *E. coli*-Produzenten zur Darstellung von Shikimat (**71**) aus Glucose eine molare Ausbeute von 14 % erreicht und für Quinat (**69**) aus Glucose eine molare Ausbeute von 23 %.^[50a]

Die mikrobiellen Verfahren zur Produktion von Shikimat (**71**) und Quinat (**69**) stellen eine Verbesserung gegenüber der Gewinnung dieser Substanzen aus Pflanzen dar. Shikimat (**71**) wird zur Zeit großtechnisch durch Isolation aus der Frucht von *Illicium*-Pflanzen dargestellt,^[55] Quinat (**69**) durch Isolation aus der Rinde von *Cinchona*-Pflanzen (Chinarinde).^[56]

Shikimat (**71**)^[57] und Quinat (**69**)^[57a-c,58] sind als Startmaterial zur Synthese zahlreicher Naturstoffe und biologisch aktiver Substanzen verwendet worden. Ausgehend von **69** wurde beispielsweise eine Synthese zum Immunsuppressivum FK506 entwickelt,^[59] **71** wurde als Startmaterial zur Generierung von großen kombinatorischen Molekülbibliotheken verwendet.^[60] Der Neuraminidaseinhibitor GS-4104 und dessen Derivate wurden ausgehend von **69**^[57a-c] und **71**^[57d,61] synthetisiert.

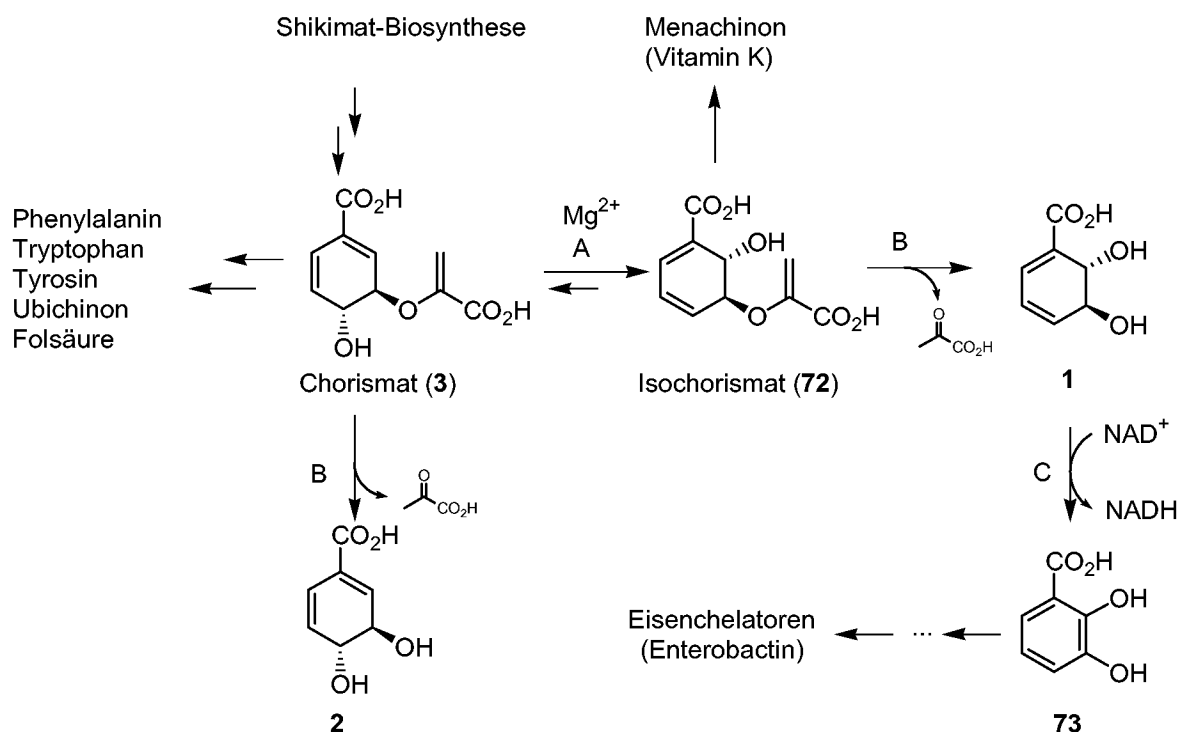
Kommerziell erhältlich sind zur Zeit neben **71** und **69** auch Chorismat (**3**) aus mikrobieller Produktion, welches jedoch bisher nicht für Synthesezwecke verwendet wurde (nach aktuellem Literaturstand), da die Handelspreise im Vergleich zu **71** und **69** höher liegen.*

Metabolite, welche sich von Chorismat (**3**) ableiten und in den Biosynthesewegen zu den aromatischen Aminosäuren, Ubichinonen, Menachinonen und Folaten auftreten, sind dagegen

* Handelspreise von Sigma-Aldrich sind: 100 mg (0.5 mmol) Quinat (**69**, freie Säure) 0.13 DM; 100 mg (0.6 mmol) Shikimat (**71**, freie Säure) 8.01 DM; 100 mg (0.4 mmol) Chorismat (**3**, freie Säure) 1.425,90 DM; Stand Juli 2001.

weitaus weniger gut als Synthesebausteine untersucht. Dies kann unter anderem darauf zurückgeführt werden, dass ebenso wie für **3** bislang keine mikrobiellen Verfahren zur Darstellung dieser Substanzen in Konzentrationen über 1 g L^{-1} (5 mM) bekannt waren und deshalb kein effizienter Zugang zu diesen Substanzen existierte.

2,3-*trans*-CHD **1** ist in *E. coli*, *K. pneumoniae* und allen anderen Enterobakterien ein Intermediat auf dem Biosyntheseweg zu Enterobactin (**4**) und analogen Eisenchelatoren (Siderophoren). **1** wird aus Chorismat (**3**) in zwei Katalyseschritten über Isochorismat (**72**) gebildet (siehe Schema 3.16).



Schema 3.16: Von Chorismat (**3**) ableitbare Metabolite sind Isochorismat (**72**), 2,3-*trans*-CHD **1**, 2,3-Dihydroxybenzoat (**73**) im Biosyntheseweg zu den Eisenchelatoren sowie 3,4-*trans*-CHD **2**. Beteiligte Enzyme und Gene sind (A) Isochorismatsynthase (*entC/menF*), (B) Isochorismatase (*entB*) und (C) 2,3-Dihydroxybenzoatsynthase (*entA*).

Hieran beteiligte Enzyme sind Isochorismatsynthase (kodiert durch die Gene *entC* und *menF*) und Isochorismatase (kodiert durch das Gen *entB*). Die beiden für Isochorismatsynthase kodierenden Gene *entC* und *menF* sind durch die Eisenkonzentration und den Sauerstoffgehalt in der Zelle reguliert.^[15,47a]

3,4-*trans*-CHD **2** wird selber nicht auf dem Biosyntheseweg zu Enterobactin (**4**) gefunden, kann aber *in vivo*^[15] und *in vitro*^[14] aus Chorismat (**3**) gebildet werden, wenn EntB in hoher enzymatischer Aktivität vorliegt. **2** besitzt keine gesicherte physiologische Bedeutung.

Die metabolischen Umsetzungen sowie die Intermediate **1**, **2**, **3** und **72** wurden erstmals 1969 von I. G. Young et al. in Stämmen von *Klebsiella pneumoniae** mit Deletionen auf diesem Biosyntheseweg untersucht.^[14,62] Die Gene und Enzyme des Enterobactin-Biosyntheseweges wurden in den Arbeitsgruppen von I. G. Young^[63], M. A. McIntosh^[64], C. Walsh,^[65] E. Leistner^[66] und R. Meganathan^[67] gut charakterisiert und beschrieben.

Wie bereits von E. Leistner et al.^[15] gezeigt, können Stämme von *K. pneumoniae* mit Defizienzen im Biosyntheseweg zu den aromatischen Aminosäure und überexprimierten Genen des Enterobactin-Biosyntheseweges, von Chorismat (**3**) ableitbare Metabolite im Kultivierungsmedium bilden (siehe Tabelle 3.3).

Tabelle 3.3: Mikrobielle Produktion von Metaboliten, welche von Chorismat (**3**) ableitbar sind.

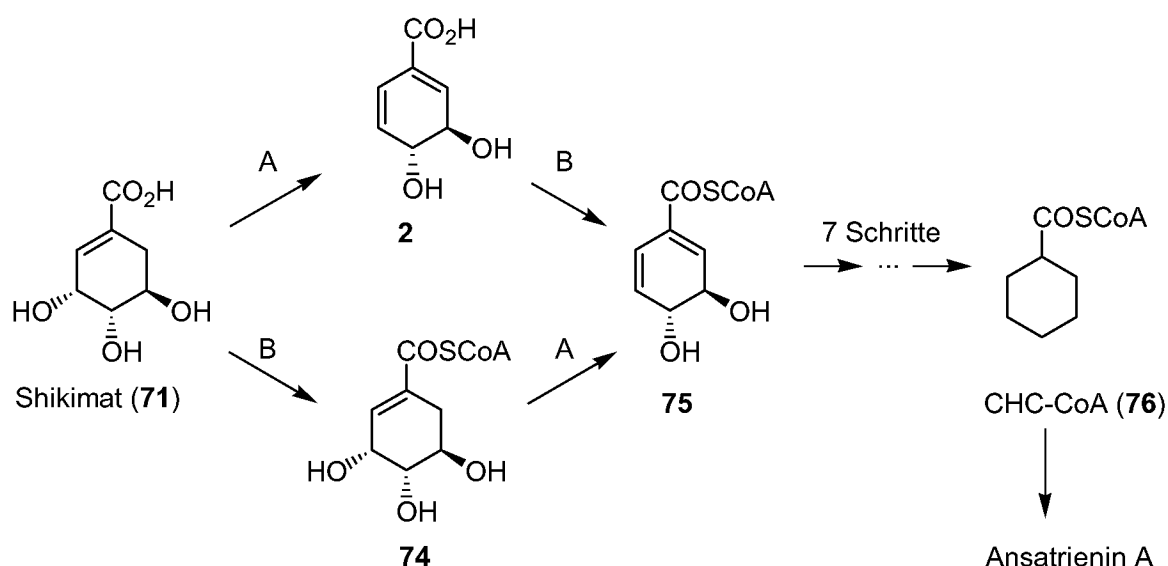
Metabolit	maximale Endkonzentration [mM] ([g L ⁻¹])	Organismus	Arbeitsgruppe	Jahr, Referenz
Chorismat (3)	4.4 (0.9)	<i>K. pneumoniae</i>	Turnbull	1996 ^[53]
	2.6 (0.6)	<i>E. coli</i>	Hilvert	1997 ^[54]
Isochorismat (72)	1.1 (0.25)	<i>K. pneumoniae</i>	Leistner	1995 ^[68]
2,3- <i>trans</i> -CHD 1	1.3 (0.2)	<i>K. pneumoniae</i>	Leistner	1996 ^[15]
3,4- <i>trans</i> -CHD 2	1.0 (0.15)	<i>K. pneumoniae</i>	Leistner	1996 ^[15]
4-Hydroxybenzoat (73)	0.9 (0.12)	<i>K. pneumoniae</i>	Leistner	1995 ^[69]

Die Stämme von Leistner sind insbesondere dadurch charakterisiert, dass die Überproduktion von EntB und EntC über einen plasmidischen *lac*-Promotor induziert werden kann. Dadurch wird eine Bildung der von **3** ableitbaren Metabolite unabhängig von einer Eisenlimitierung erreicht. Dennoch sind alle diese Produktionen mit *Klebsiella*-Stämmen im Gegensatz zu den mikrobiellen Prozessen zur Darstellung von Metaboliten des Chorismat-Biosynthesewegs mit *E. coli* durch vergleichsweise geringe Endkonzentrationen von maximal 0.9 g L⁻¹ (≤ 4.4 mM) Substanz im Überstand gekennzeichnet. Zusätzlich tritt bei Kultivierung der *Klebsiella*-Stämme Chorismat (**3**) als Koppelprodukt auf.^[15]

In *Streptomyces collinus* wurde von K. A. Reynolds eine metabolische Bildung von 3,4-*trans*-CHD **2** direkt aus Shikimat (**71**) postuliert.^[70] *S. collinus* produziert das Ansamycin-Antibiotikum Ansatrienin A aus Alanin und durch Coenzym A aktivierte Cyclohexancarbonsäure (CHC-CoA, **75**),^[71] welche aus Shikimat (**71**) in einer ungewöhnlichen neunstufigen, reduktiven Biosynthese aufgebaut wird (siehe Schema 3.17).^[70]

Es ist bislang nicht eindeutig bewiesen, ob das als Zwischenverbindung auftretende CoA-aktivierte *trans*-CHD **75** auf dem Weg zu CHC-CoA (**76**) aus Shikimat (**71**) über 3,4-*trans*-CHD **2** oder über Intermediat **74** gebildet wird.^[72]

* Zur Zeit der Veröffentlichungen von I. G. Young (1969) wurde *Klebsiella pneumoniae* noch als *Aerobacter aerogenes* bezeichnet.



Schema 3.17: Postulierte Bildung von 3,4-*trans*-CHD 2 im CHC-CoA-Biosyntheseweg von *S. collinus*. Involvierte Enzyme und Gene sind: (A) Shikimatdehydratase / S3P-Dehydratase (*ansJ*, homolog zur EPSP-Synthase), (B) Shikimat-CoA-Ligase/ 3,4-*trans*-CHD-CoA-Ligase (*ansK*, homolog zur Coumarat-CoA-Ligase).^[70]

3.4. Cyclohexadien-1,2-diole in der Naturstoff- und Wirkstoffsynthese

3.4.1 Verwendung von Cyclohexadien-*cis*-1,2-diol

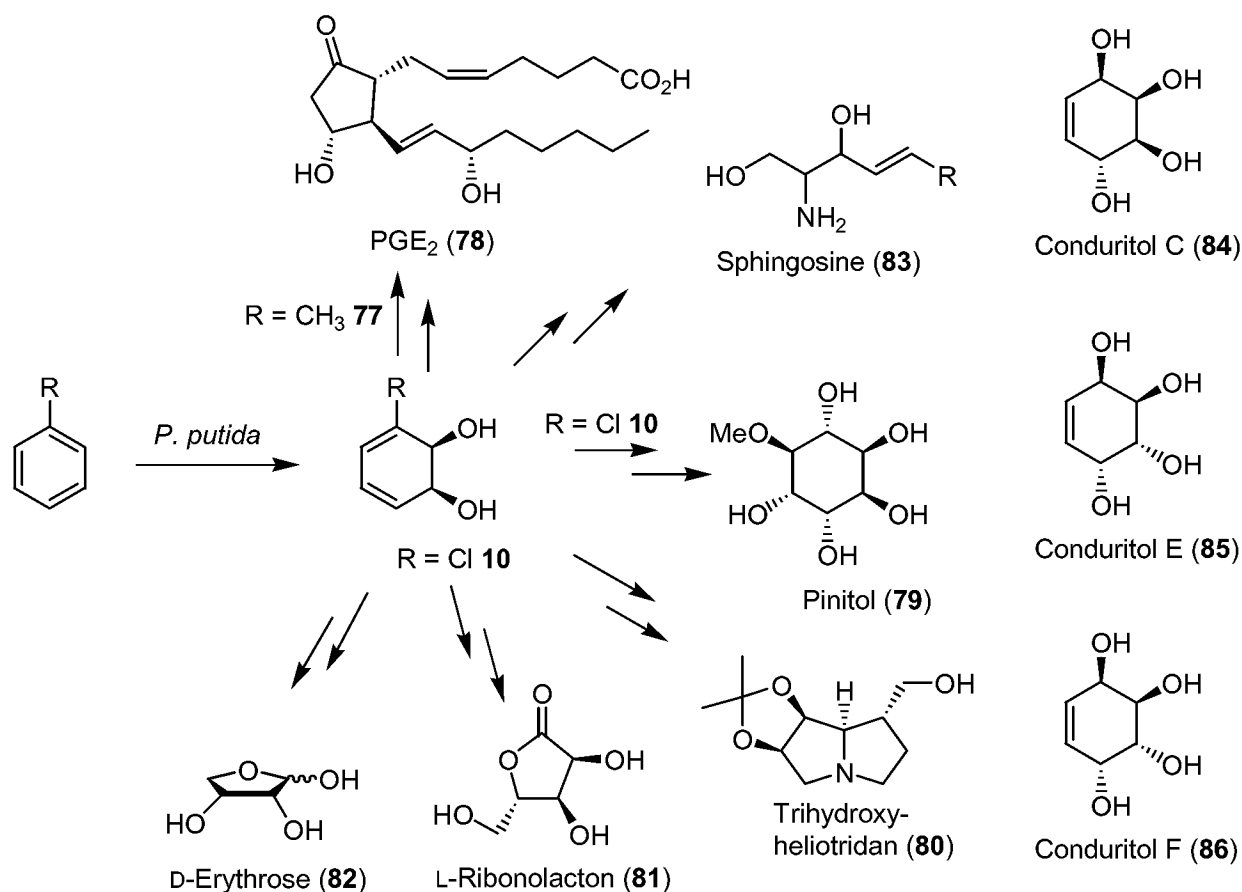
Aufgrund der guten Verfügbarkeit von funktionalisierten Cyclohexadien-*cis*-1,2-diol (cis-CHD) wurden diese Bausteine von nahezu 40 Arbeitsgruppen weltweit zur Synthese eines großen Spektrums an Natur- und Wirkstoffen eingesetzt.^[73] Speziell in enantioselektiven Synthesen wurde die universelle Vielseitigkeit der *cis*-CHD als Startmaterial eindrucksvoll demonstriert.

Synthesen zu Azazuckern,^[74] Inositolen,^[10] Glycosidaseinhibitoren^[75], Alkaloiden^[76] und weiteren Natur- und Wirkstoffen sind bislang in nahezu 300 Arbeiten beschrieben worden.

Einige Beispiele für natürlich vorkommende und pharmakologisch interessante Substanzen, welche ausgehend von den Aromaten in der Arbeitsgruppe von T. Hudlicky synthetisiert wurden, sind in Schema 3.18 zu sehen.

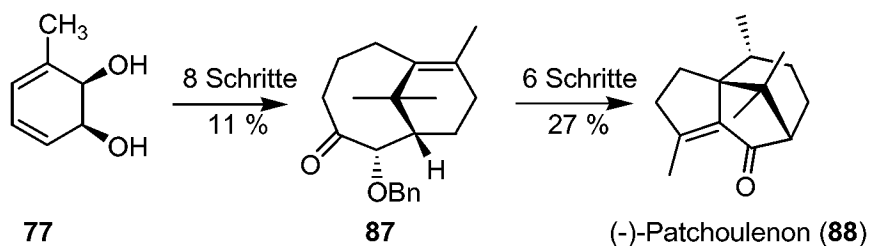
Neben den Conduritolen C (84),^[8] E (85),^[8] und F (86)^[8] und Pinitol 79^[77,7a] (selektiv beide Enantiomere) ist auch ein breites Spektrum weiterer Cyclitole,^[7a] einschließlich Inositolen,^[10] Aminoinsitolen^[11] und Conduraminen,^[9] ausgehend von *cis*-CHD synthetisiert worden.

Dass ausgehend von *cis*-CHD auch komplexere Strukturen, wie beispielsweise Alkaloide und Vitamine aufgebaut werden können, wurde ebenfalls mehrfach gezeigt. So wurden auch Synthesen zu den morphinähnlichen Amaryllidaceae-Alkaloid Narciclasin^[78] und Lycoricidin,^[76a-b] dem Indolizidin-Alkaloid Kifunensin^[75,79] und dem Pyrrolizidin-Alkaloid Trihydroxyhediotridan (80)^[80,76e] aus *cis*-CHD beschrieben.



Schema 3.18 : Synthese von Natur- und Wirkstoffen ausgehend von *cis*-CHD.^[73c,81]

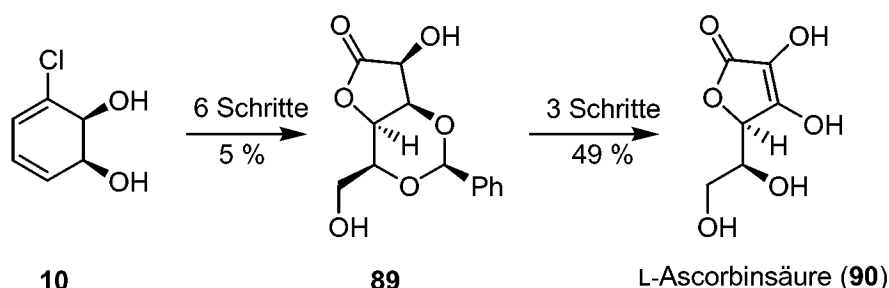
In der Arbeitsgruppe von M. Banwell wurde die Totalsynthese des Antifungals (-)-Patchoulenon (**88**), einem Sesquiterpen aus dem Knollenöl von *Cyperus rotundus* L.,^[82] ausgehend von mikrobiell erzeugtem *cis*-CHD **77** durchgeführt (siehe Schema 3.19).^[83]



Schema 3.: Chemoenzymatische Totalsynthese von (-)-Patchoulenon (**88**) nach M. Banwell.^[83]

Das intermediäre Bicyclo[5.3.1]undecenon **87**, welches durch achtsstufige Reaktionssequenz aus **77** erhältlich ist, kann ebenfalls als Ausgangsmaterial für Taxoidsynthesen verwendet werden.^[83b]

Von M. Banwell wurde 1998 die erste Syntheseroute zu L-Ascorbinsäure (**90**) (Vitamin C) vorgestellt, die nicht auf Glucose aufbaut, sondern von *cis*-CHD **10** als Ausgangsmaterial ausgeht (siehe Schema 3.20).^[84]

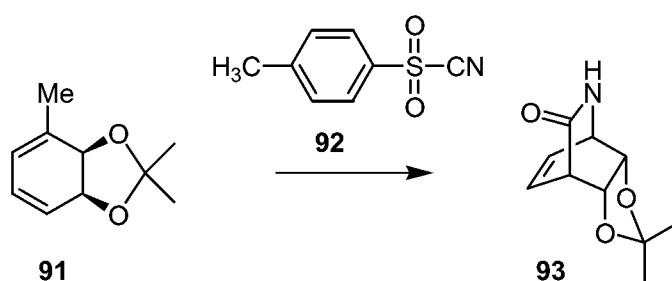


Schema 3.20: Chemoenzymatische Totalsynthese von L-Ascorbinsäure (90) nach M. Banwell.^[84]

cis-CHD haben auch in der synthetischen Industrie bereits diverse Anwendungen gefunden. Nachdem Zeneca erstmals nicht-funktionalisierte *cis*-Cyclohexadien-1,2-diole aus Benzen zur kommerziellen Synthese von Polyphenylen verwendete,^[85] wurden andere Unternehmen ebenfalls auf das große Anwendungspotential der *cis*-CHD aufmerksam. Merck plant die Inkorporation mikrobiell erzeugter *cis*-CHD-Derivate in den Produktionsprozess des Virostatikums Indinavir, welches in der AIDS-Therapie Bedeutung besitzt.^[73c,86]

Genencor produziert Indigo durch eine Kombination von „*metabolic engineering*“-Techniken angewendet auf den Aromatenbiosyntheseweg sowie einer Indol-Oxidation zu *cis*-Indol-2,3-dihydrodiol, welches zu Indoxyl, der Vorläufersubstanz von Indigo, dehydratisiert.^[87]

In einem Verfahren von Enzymatix zur Produktion von verschiedener Antiviralika wird in einer Zwischenstufe das als Acetonid geschützte *cis*-CHD 91 in einer Cycloadditionsreaktion mit 4-Toluensulfonylcyanid (92) zum bicyclischen Lactam 93 verwendet (siehe Schema 3.21).^[88]



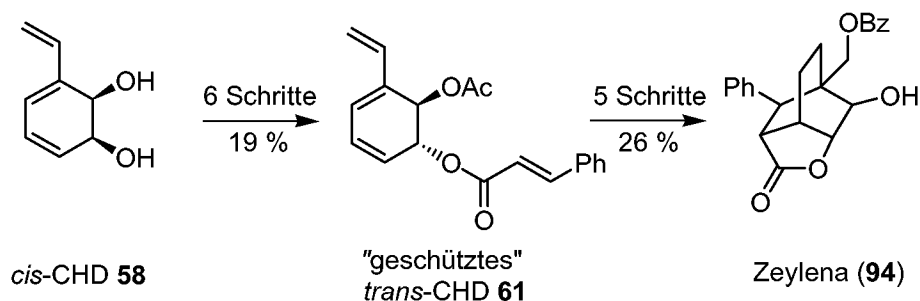
Schema 3.21: Verwendung eines *cis*-CHD zur kommerziellen Darstellung von Vorstufen für Antiviralika, angewendet von Enzymatix.^[88]

3.4.2 Verwendung von Cyclohexadien-*trans*-1,2-diolen

Im Gegensatz zu den *cis*-CHD sind bisher nur wenige Beispiele bekannt, in denen funktionalisierte Cyclohexadien-*trans*-1,2-diole (*trans*-CHD) zur Naturstoff- und Wirkstoffsynthese verwendet wurden.

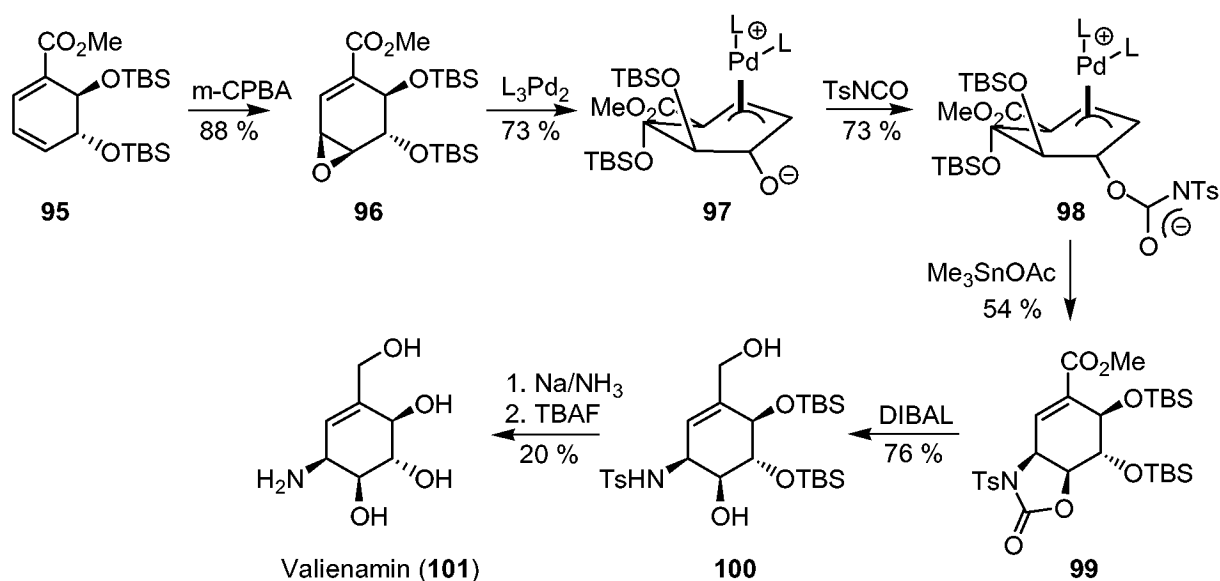
T. Hudlicky et al. verwendeten das *trans*-CHD 61, charakterisiert durch zwei Schutzgruppen an den Alkoholgruppen und funktionalisiert durch eine Vinylgruppe, zur Darstellung von Zeylena (94).^[89] 61 wurde in diesen Arbeiten durch „*diastereomeric switch*“-Techniken

(siehe Kapitel 3.2) aus mikrobiell hergestelltem *cis*-CHD **58** hergestellt, so dass Zeylena (**94**) enantiomerenrein dargestellt wird (siehe Schema 3.22).



Schema 3.22: Darstellung von Zeylena (**94**) nach T. Hudlicky et al.^[89]

Ein weiteres Beispiel ist die von B. M. Trost 1998 vorgestellte Verwendung des TBS-geschützten 2,3-*trans*-CHD-Analogen **95** zur Synthese des Aminocarbazuckers Valienamin (**101**), welches als Cyclitoleinheit in zahlreichen Pseudooligosacchariden auftritt (siehe Schema 3.23).^[12]



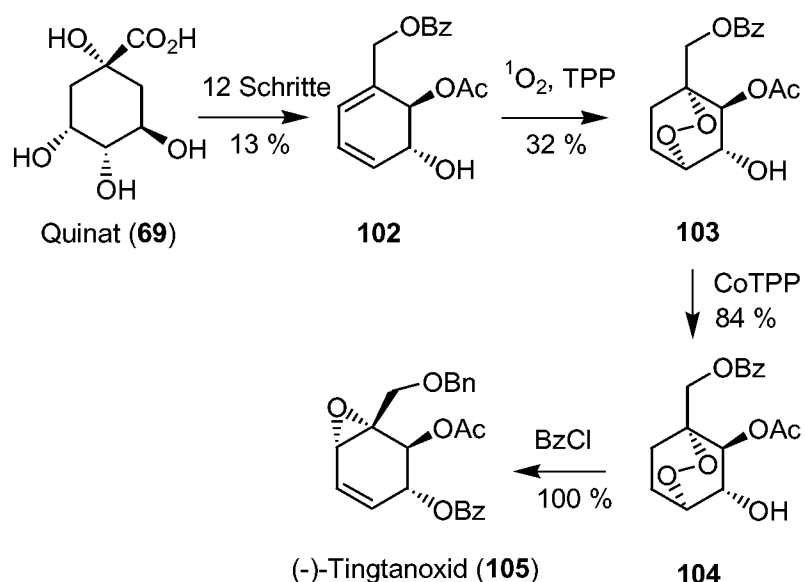
Schema 3.23: Darstellung von Valienamin (**101**) ausgehend von geschütztem *trans*-CHD **22** nach B. M. Trost et al.^[12] L ist Dibenzyldenacetone (dba).

Die Route nach B. M. Trost baut auf racemischem **95** als Ausgangsmaterial auf, welches chemisch synthetisiert wurde (siehe Kapitel 3.2). Die Synthese schließt die Verwendung von Palladium-Katalysatoren ein, welche den Stickstoffeinbau selektiv an der 3-Position ermöglicht. Gesamtausbeute der siebenstufigen Synthese ist 5 %. Auf einer modifizierten Route über Palladiumkatalyse konnte von B. M. Trost et al. die Gesamtausbeuten ausgehend von **95** auf 29 % gesteigert werden.^[12]

trans-CHD, welche durch eine Hydroxymethyl- oder durch eine Alkoxyethylgruppe funktionalisiert sind, wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen zur Totalsynthese von Pflanzenmetaboliten mit Dihydroxycyclohexylmethanol-Substruktur verwendet. Bekannteste

Vertreter dieser Substanzklasse sind Crotepoxid,^[90] Senepoxid,^[91] β -Senepoxid,^[92] Pipoxid,^[93] Cyclophellitol,^[94] Boesenoxid^[95] und Tingtanoxid,^[92] welche aus verschiedenen Pflanzen isoliert wurden. Synthetisch von Interesse sind die Substanzen seit ihrer Entdeckung Ende der 60er Jahre, da sie als Kohlenhydratmimetika inhibitorische Wirkung auf kohlenhydratmodifizierende Enzyme besitzen. Zahlreiche dieser Substanzen zeigen auch tumor-inhibierende, antileukämische oder antibiotische Eigenschaften.

Die enantioselektive Synthese von Tingtanoxid (**105**), sowie zahlreicher weiterer Pflanzenmetabolite mit dieser Substruktur gelangen T. K. M. Shing et al. ausgehend von *trans*-CHD **102**, welches aus Quinat (**69**) erhältlich ist (siehe Schema 3.24).^[96]

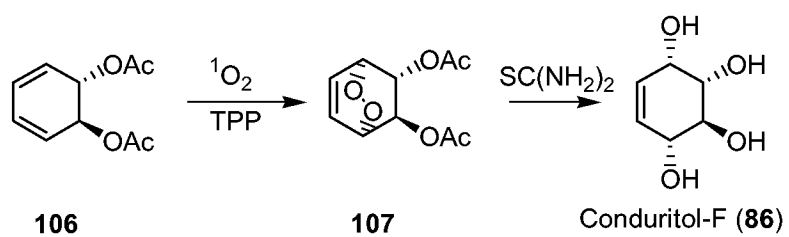


Schema 3.24: Darstellung von Tingtanoxid (**105**) nach T. K. M. Shing et al.^[96b]

Die Möglichkeit der Verwendung von mikrobiell produzierten 2,3-*trans*-CHD **1** zur Darstellung der epoxidischen Carbazucker *ent*-Senepoxid und *iso*-Crotepoxid wurde in auf diese Arbeit aufbauenden Untersuchungen demonstriert.^[97]

Weitere Synthesen von analogen Pflanzenmetaboliten, welche ebenfalls durch eine Hydroxymethyl- oder durch eine Alkoxymethylgruppe funktionalisierte *trans*-CHD als Startmaterial verwenden, wurden von J. D. White,^[98] G. W. Holbert,^[99] R. H. Schlessinger^[100] und S. Ogawa^[101] publiziert.

Aus nicht-funktionalisiertem Cyclohexadien-*trans*-1,2-diol **106** konnte durch Reaktion mit Singulett-Sauerstoff kürzlich auch Conduritoll-F (L-Leucanthemitol, **86**) synthetisiert werden,^[102] einem Cyclitol-Isomer aus *Crysanthemum leucanthemitol* (siehe Schema 3.25).^[103]



Schema 3.25: Darstellung von Conduritol-F (**86**) aus **106** nach M. Balci.^[102]

4. Spezieller Teil

4.1. Chemische Darstellung der Referenzsubstanzen

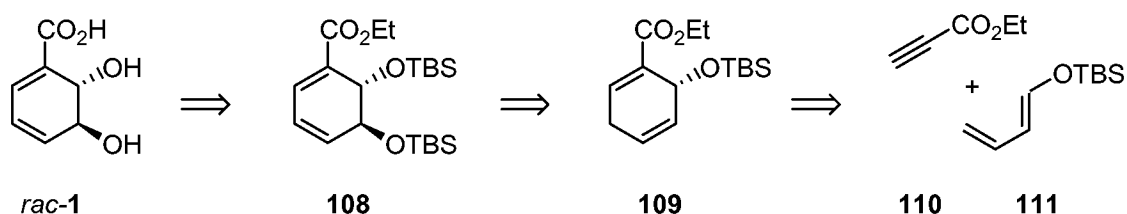
Racemisches 2,3-*trans*-CHD *rac*-1 und racemisches 3,4-*trans*-CHD *rac*-2 wurden für Referenzzwecke auf chemischem Wege synthetisiert.

Die Synthese von *rac*-1 erfolgt in Analogie zu den Arbeiten von B. M. Trost und Mitarbeitern.^[12] Im Vergleich zu anderen literaturbekannten Synthesen von S. Ogawa,^[30] T. K. M. Shing^[32] und G. A. Berchtold^[29] (siehe Kapitel 3.2.1, Tabelle 3.1) kann auf dieser Route das durch TBS-Gruppen und Methylester geschützte 2,3-*trans*-CHD-Analogon **108** in nur vier Reaktionsstufen erhalten werden. Die von B. M. Trost angegebene Ausbeute für **108** von 36 % übertrifft ebenfalls die angegebenen Ausbeuten aller anderen Syntheserouten.

Zur Darstellung von *rac*-2 sind die Syntheserouten von G. A. Berchtold,^[34] N. Ikota und B. Ganem,^[35] G. H. Posner^[38] und von S. M. Roberts^[36] bekannt. Nach S. M. Roberts ist *rac*-2 in drei Reaktionsstufen mit 14 % Ausbeute erhältlich, jedoch ist das Ausgangsmaterial, das acetonid-geschützte Cyclohexadien-*cis*-diol **37** (siehe Kapitel 3.2.1), nicht kommerziell erhältlich. Im Hinblick auf die Anzahl der Reaktionsstufen und Gesamtausbeute ist die Syntheseroute von N. Ikota und B. Ganem denen von G. H. Posner und G. A. Berchtold überlegen und wurde deshalb als Vorzugsvariante zur Darstellung von *rac*-2 verwendet.

4.1.1. Darstellung von racemischem 2,3-*trans*-CHD

Die Synthese des geschützten 2,3-*trans*-CHD-Derivats **108** in Analogie zu den Arbeiten von B. M. Trost und Mitarbeitern^[12] baut auf einer Diels-Alder-Cyclisierung von Silylenolether **111** mit Ethylpropiolat **110** auf (siehe Schema 4.1).

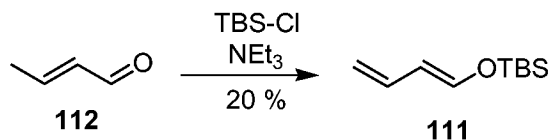


Schema 4.1: Retrosynthese von 2,3-*trans*-CHD *rac*-1.

2,3-*trans*-CHD *rac*-1 kann aus **108** durch Verseifung und TBS-Abspaltung gewonnen werden.

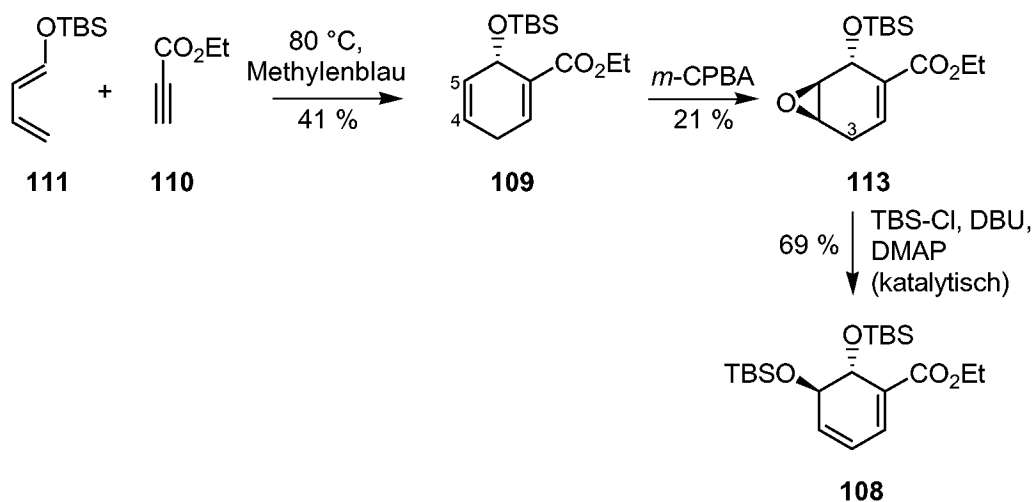
Der für die Diels-Alder-Reaktion benötigte Silylenolether **111** wurde aus Crotonaldehyd (**112**) über eine Mukaiyama-Präparation^[104] mit 20 % Ausbeute dargestellt (siehe Schema 4.2).

In auf diese Arbeit aufbauenden Untersuchungen^[105] konnte auch gezeigt werden, dass durch Silylierung mit TBS-Triflat^[106] anstelle TBS-Chlorid verbesserte Ausbeuten von 74 %



Schema 4.2: Darstellung des Diens **111** über Mukaiyama-Präparation.^[104]

erreichbar sind. Ausgehend von Silylenolether **111** und Ethylpropiolat **110** wird das Cyclohexadien **109** über eine Diels-Alder-Reaktion erhalten, wobei ohne Lösungsmittel gearbeitet werden muss, um Aromatisierung zu vermeiden (siehe Schema 4.3).



Schema 4.3: Synthese des geschützten racemischen 2,3-*trans*-CHD **108** in drei Reaktionsschritten und 6 % Gesamtausbeute nach R. H. Schlessinger (Synthese bis **113**)^[31] und B. M. Trost (Synthese bis **108**).^[12] Gezeigt ist jeweils ein Enantiomer der racemischen Substanzen.

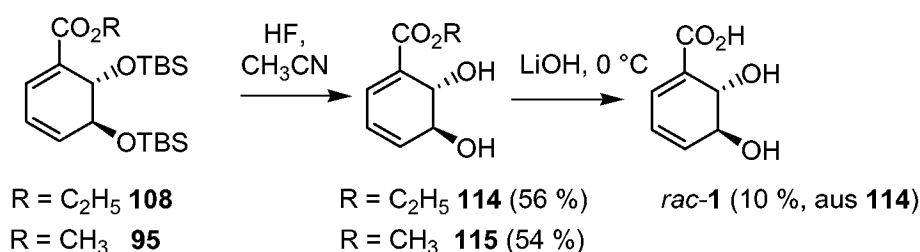
Die Diels-Alder-Reaktion zum Dien **109** wurde von P. A. Bartlett eingehend untersucht.^[107] **109** wird unter Verwendung von *m*-CPBA regioselektiv an der elektronenreicheren 4,5-Position epoxidiert.^[12,31,107] Durch den hohen sterischen Anspruch der TBS-Gruppe erfolgt die Addition *trans*-ständig zur Siloxygruppe mit *de* > 95 % (¹H-NMR, kein anderes Produkt). Aufgrund der Instabilität von **109**^[12] wurde dieses ohne weitere Reinigung für weitere Reaktionen verwendet.

Basenkatalysierte E₂-Eliminierung an 3-Position (DBU und DMAP), in vermutlich konzertierter Reaktion mit einer Oxiranöffnung und Silylierung der entstehenden Alkoholgruppe, führt zum geschützten 2,3-*trans*-CHD **108**. Nach säulenchromatographischer Reinigung wird **108** in 69 % Ausbeute ohne Nebenprodukte erhalten.

Im Rahmen von auf diese Arbeit aufbauenden Untersuchungen^[105] wurde die Syntheseroute weiter optimiert und in den Gramm-Maßstab übertragen. Das zu **108** entsprechende Methylesterderivat **95** wurde in analoger Synthese in 25 % Ausbeute aus Silylenolether **111** und Methylpropiolat dargestellt.^[105]

Beim Abspalten der TBS-Gruppen des geschützten 2,3-*trans*-CHD **108** ist darauf zu achten, dass stark saure oder auch basische Reaktionsbedingungen zur Dehydratisierung der vicinalen Dioleinheit und damit zur Aromatisierung des Cyclohexadien-Systems führen. Durch

Einwirken von Bortrifluor-Etherat^[108] als Desilylierungsreagenz entstehen ausschließlich Aromatisierungsprodukte, welche nicht charakterisiert wurden (¹H-NMR). Andererseits wird unter Verwendung von milden Hydrolysebedingungen mit Essigsäure,^[109] TBAF^[109,110] oder Alkalimetall- und Pseudoalkalimetallchloride^[111] unter Standardbedingungen keine vollständige Schutzgruppenabspaltung erreicht. Eine sowohl milde als auch effiziente Umsetzung führt dagegen mit wässriger Flusssäure in Acetonitril nach einer Vorschrift von R. F. Newton und S. M. Roberts^[112] zum Ziel. Das entschützte vicinale Glycol **114** wird in 56 % Ausbeute erhalten. Analog ist der Methylester **115** mit 54 % Ausbeute aus TBS-Ether **95** darstellbar. Die Verseifung von **114** mit Lithiumhydroxid^[113] führt direkt zum racemischen 2,3-*trans*-CHD *rac*-**1** (siehe Schema 4.4). Die analytischen Daten von *rac*-**1** stimmen mit den Literaturwerten des von I. G. Young und Mitarbeitern beschriebenen **1** aus mikrobieller Produktion mit *Klebsiella*-Stämmen überein.^[45,62b,114]

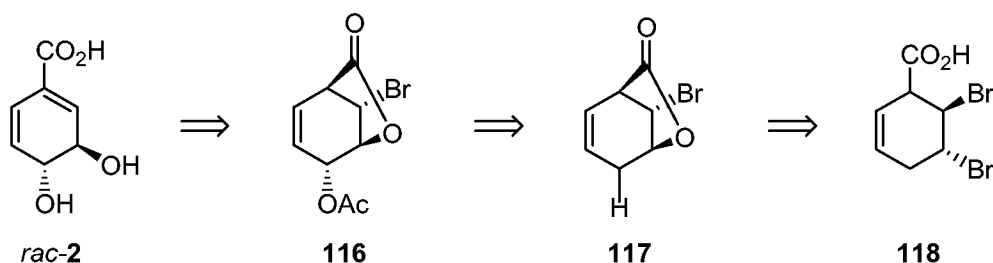


Schema 4.4: Darstellung von 2,3-*trans*-CHD *rac*-**1** aus **108** oder **95** in zwei Reaktionsschritten. Gezeigt ist jeweils ein Enantiomer der racemischen Substanzen.

Zusammenfassend wurde racemisches 2,3-*trans*-CHD *rac*-**1** in einer siebenstufigen Synthesesequenz, welche auf der Diels-Alder Route von B. M. Trost^[12] aufbaut erhalten. Die erreichbaren Ausbeuten bis zu **95** (25 %) sind mit den Werten von B. M. Trost vergleichbar.

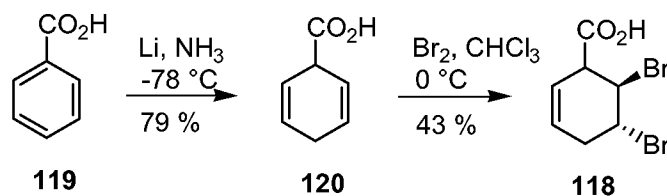
4.1.2. Darstellung von racemischem 3,4-*trans*-CHD

Die Syntheseroute zur Darstellung von 3,4-*trans*-CHD *rac*-**2** nach N. Ikota und B. Ganem^[35,115] geht von Dibromcyclohexencarbonsäure (**118**) als Startmaterial aus (siehe Schema 4.5).



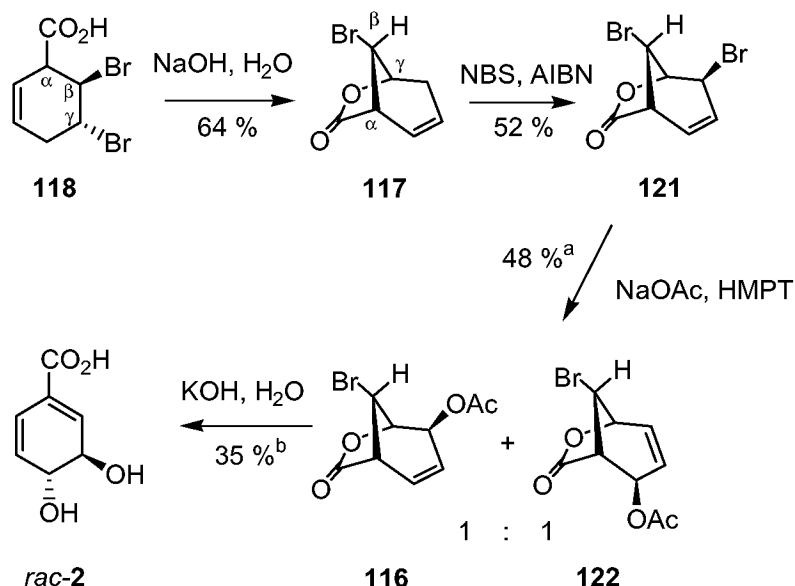
Schema 4.5: Retrosynthese von racemischem 3,4-*trans*-CHD *rac*-**2**. Gezeigt ist jeweils ein Enantiomer der racemischen Substanzen.

118 wird nach H. Plieninger^[116] aus Benzoesäure (**119**) durch Birch-Reduktion und anschließende Addition eines Equimols Brom in 32 % Ausbeute erhalten (siehe Schema 4.6). Die *trans*-Konfiguration (> 95 % *de*, ¹H-NMR) der Bromsubstituenten in **118** ist auf die intermediäre Bildung von Bromoniumionen zurückzuführen.^[116]



Schema 4.6: Darstellung von racemischem **118** aus **119** in zwei Reaktionsschritten.

Lactonisierung von **118** unter Baseneinwirkung ergibt den Bicyclus **117** in 64 % Ausbeute (siehe Schema 4.7).



Schema 4.7: Synthese von *rac*-**2** aus **118** nach N. Ikota und B. Ganem^[115] in vier Reaktionsschritten mit 6 % Gesamtausbeute. ^a Ausbeute der Konstitutionsisomeren **116** und **122** sind je 24 %. ^b Isolierte Ausbeute bezogen auf das Isomerengemisch (**116** und **122**). Gezeigt ist jeweils ein Enantiomer der racemischen Substanzen.

Aufgrund von Ringspannungseffekten des S_N2-Übergangszustandes wird dabei selektiv die γ -Position nucleophil angegriffen, während β -Substitution nicht beobachtet wird. **117** wird durch eine Wohl-Ziegler-Reaktion^[117] bromiert und somit an der Methylengruppe für nukleophile Substitutionsreaktionen aktiviert. Dibromid **121** wird mit 52 % Ausbeute erhalten. Allylische Substitution des generierten Bromids gegen Acetat in Hexamethylphosphorsäuretriamid (HMPT) führt zu Bicyclus **116** im 1:1-Gemisch mit Bicyclus **122** (je 24 % Ausbeute). Ein Austausch des cancerogenen HMPT gegen weniger toxische, polare, nichtprotische Lösungsmittel wie 1,3-Dimethyl-3,4,5,6-tetrahydro-2(*1H*)-pyrimidinon (DMPU)^[118] oder Tetrachlorkohlenstoff war nicht erfolgreich. Offensichtlich benötigt diese

allylische Substitutionsreaktion extrem polaren Bedingungen. Öffnung des Lactonrings in **116**, Verseifung der Essigsäureestergruppe und E₂-Eliminierung von HBr erfolgt unter basischen Bedingungen in einer Eintopfreaktion. Das freie 3,4-*trans*-CHD *rac*-**2** wird nach Abtrennung des nicht charakterisierten Reaktionsproduktes aus **122** mit 35 % Ausbeute erhalten.

Insgesamt wurde racemisches 3,4-*trans*-CHD *rac*-**2** in sechs Reaktionsschritten, ausgehend von Benzoesäure **119** mit einer Gesamtausbeute von 2 %, erhalten. Die Gesamtausbeute liegt somit unter der von G. A. Berchtold (5 %) [34] und B. Ganem (11 %) [35] angegebenen Ausbeuten, jedoch ist die Einfachheit der Synthese, sowie die gute Verfügbarkeit des Startmaterials vor Vorteil. Die analytischen Daten stimmen mit den von diesen Autoren angegebenen Werten sowie mit den Werten von I. G. Young und Mitarbeitern für **2** aus enzymatischer Zersetzung von Chorismat (**3**) überein. [45,119].

Eine Übertragung der Darstellung von 3,4-*trans*-CHD *rac*-**2** über diese Route in den höheren Gramm-Maßstab wird durch drei Faktoren erschwert.

Zum einen sind zahlreiche Zwischenverbindungen thermodynamisch metastabil. In einigen Reaktionsschritten (Darstellung von **118**, **117**, **116** und *rac*-**2**) werden die Ausbeuten durch auftretende Aromatisierung signifikant verschlechtert.

Bei der allylischen Substitutionsreaktion wird **116** nur im 1:1-Gemisch mit dem konstitutionsisomeren **122** gebildet. Dieses kann zwar prinzipiell zu **116** transformiert werden, wie von N. Ikota und B. Ganem gezeigt, [115] jedoch ist die dazu notwendige quantitative Abtrennung von **122** nur durch aufwendige Trenntechniken möglich. [105]

Schließlich sind einige verwendete Reagentien und Lösungsmittel (Ammoniak, Brom, HMPT) nur unter erhöhten Sicherheitsvorkehrungen in größeren Ansatzmengen handhabbar.

4.1.3. Etablierung eines Analyseverfahrens zur *trans*-CHD-Quantifizierung

Es wurden Analyseverfahren zur Identifizierung und Quantifizierung der chemisch synthetisierten *trans*-CHD (*rac*-**1** und *rac*-**2**) untersucht. Verfahren der Kapillarzonenelektrophorese (CE) zeigten keine befriedigende Trennleistung bei Verwendung von Borat-Puffern [120] und Citratpuffern [121] unter literaturbeschriebenen Bedingungen. Es wurde ebenfalls versucht, durch Inversion des elektroosmotischen Flusses (EOF) mittels verschiedener kationischer, oberflächenmodifizierender Substanzen (*Modifizieren*) die Trennleistung der CE-Verfahren zu steigern. Unter Verwendung von Myristyltrimethylammoniumbromid (MTAB), [122] Hexadimethrinbromid (HDB) [123] und Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) [124,123d-e] konnte der EOF unter den in der Literatur angegebenen Bedingungen invertiert werden. Obwohl die Systeme bereits zur Trennung ähnlich hydrophiler Substanzen wie Aminosäuren, [121,122] Carbonsäuren [123a-c] und

Phenolderivaten^[123d-e] etabliert sind, wurde die Trennleistung von *rac-1* und *rac-2* gegenüber den Verfahren mit nicht-invertiertem EOF nicht signifikant verbessert.

Aus diesem Grund wurde eine quantitative Analytik für *rac-1* und *rac-2* über RP-HPLC etabliert. Da die *trans*-CHD aufgrund der Alkohol-, und Carbonsäurefunktionalität stark polaren Charakter und damit Hydrophilie aufweisen, ist eine effiziente säulenchromatographischen Trennung an weitgehend unpolarer fester Phase nicht möglich. So wird mit RP-18-Material selbst mit Wasser als Eluent eine nur ungenügende Trennleistung erreicht. Von Vorteil ist die Verwendung von RP-8-Säulenmaterial, welches aufgrund der kürzerkettigen Octaoxysiloxan-Oberflächenbeschichtung für polare Substanzen längere Retentionen und bessere Trennung zeigt. Die Verwendung von Wasser als Elutionsmittel reicht zur Elution von *rac-1* und *rac-2* aus. Zur Erhöhung der Trennleistung werden 0.1 Vol.-% (13 mM) Trifluoressigsäure zugesetzt. Die Differenz der Retentionszeiten von *rac-1* (4.4 min) und *rac-2* (6.7 min) ist hinreichend groß um eine sichere Identifikation der Substanzen sowie Einzelquantifizierungen zuzulassen. Die Quantifizierung der Stoffkonzentrationen erfolgt durch Integration des Absorptionssignals eines Diodenarray-Detektors (DAD) bei einer gewählten Wellenlänge von $\lambda = 275$ nm, so dass die Absorptionsmaxima von *rac-1* ($\lambda_{\text{max}}(\text{H}_2\text{O}) = 278$ nm; $\epsilon_{\text{max}} = 8150$)^[62b] und *rac-2* ($\lambda_{\text{max}}(\text{H}_2\text{O}) = 272$ nm; $\epsilon_{\text{max}} = 2250^*$)^[45] gleichermaßen ausgenutzt werden. Dieser Absorptionsbereich ist gleichzeitig sehr charakteristisch für konjugierte Alkadien-Systeme,^[125] so dass Proteine und organische Säuren aus einem mikrobiellen Prozess nicht bei der *trans*-CHD-Quantifizierung interferieren. Durch Verwendung eines Gradientensystems mit Methanol wurden mit diesem Analyseverfahren neben 2,3-*trans*-CHD *rac-1*, 3,4-*trans*-CHD *rac-2*, Chorismat (**3**) und Isochorismat (**72**) auch gleichzeitig sieben weitere von **3** ableitbare Hydroxy-, Dihydroxy- und Aminobenzoesäurederivate nachgewiesen und quantifiziert (siehe Tabelle 4.1 und Abbildung 4.1).

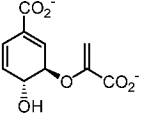
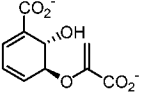
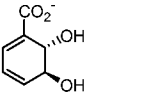
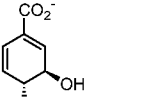
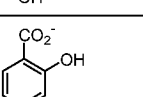
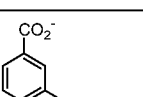
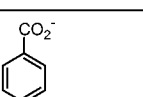
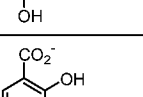
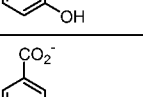
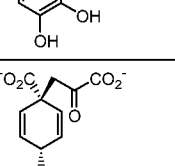
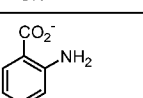
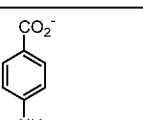
Die Quantifizierungsgrenzen sind für alle Substanzen $\leq 9 \text{ mg L}^{-1}$ ($\leq 40 \text{ }\mu\text{M}$). Die analytischen Grenzkonzentrationen (Nachweisgrenzen) liegen bei $\leq 1 \text{ mg L}^{-1}$ ($\leq 7 \text{ }\mu\text{M}$) für alle Substanzen. Das Verfahren ist zur Quantifizierung von *rac-1* und *rac-2* in Konzentrationen bis 2.5 g L^{-1} geeignet. In Konzentrationsbereichen zwischen 1.25 mg L^{-1} ($8 \text{ }\mu\text{M}$) und 2.5 g L^{-1} (16 mM) betragen die Korrelationskoeffizienten (Pearson)^[126] der Regressionsgleichung aus den gemessenen Flächenintegralen und den Konzentration reproduzierbar $\geq 99.9 \%$ (drei Messreihen mit je 13 Einzelkonzentrationen *rac-1*, *rac-2*).

Die verwendete HPLC-Methode lässt ebenfalls quantitative Aussagen über die Konzentrationen von Ampicillin ($R_t = 37.0$ min) und IPTG ($R_t = 13.7$ min) zu.

Die Regenerierung des Säulenmaterials erfolgt mit Methanol. Das Säulenmaterial zeigte nach über tausend Einzelanalysen konstant reproduzierbare Trennleistung.

* Der im Vergleich zu *rac-1* niedrigere Extinktionskoeffizient von *rac-2* ist gleichzeitig kennzeichnend für die Kreuzkonjugation des Dien-Systems mit der Carbonsäuregruppe.^[45]

Tabelle 4.1: Retentionszeiten sowie UV-Charakteristika und LOQ-Werte der Metabolitquantifizierung durch RP-HPLC.

Substanz		UV-Maxima [nm]	R _t [min]	LOQ ^a [mg L ⁻¹] ([μM])
Chorismat (3)		273	25.0	9 (40)
Isochorismat (72)		278	21.2	4 (19)
2,3- <i>trans</i> -CHD <i>rac</i> -1		278	4.4	5 (23)
3,4- <i>trans</i> -CHD <i>rac</i> -2		272	6.7	6 (43)
2-Hydroxybenzoat (123)		202 230 295	38.0	4 (29)
3-Hydroxybenzoat (124)		199 289	26.2	3 (22)
4-Hydroxybenzoat (125)		194 150	23.3	3 (22)
2,3-Dihydroxybenzoat (73)		206 238 305	27.8	2 (13)
3,4-Dihydroxybenzoat (126)		204 253 290	27.5	2 (13)
Prephenat (127)		nicht detektiert, da R _t > 40 min !		
Anthranilat (128)		192 211 315	19.5	0.8 (6)
4-Aminobenzoat (129)		193 275	10.2	1 (7)

^a Quantifizierungsgrenze (LOQ) gemessen bei λ = 275 nm.

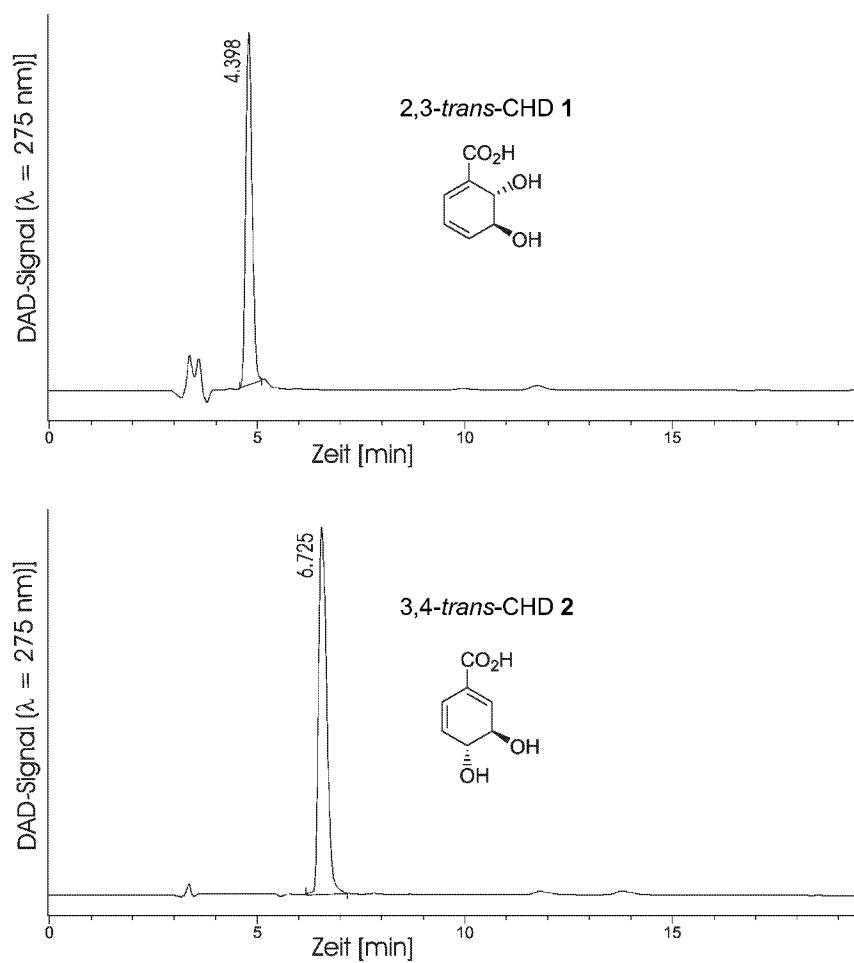


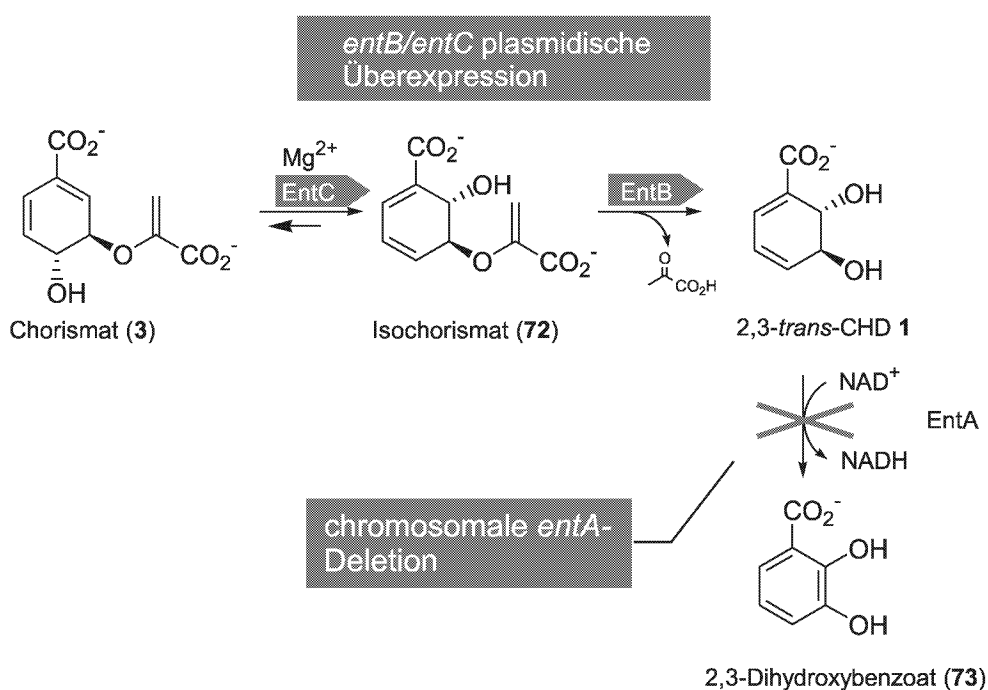
Abbildung 4.1: HPLC-Chromatogramm von *rac*-1 und *rac*-2 bei $\lambda = 275 \text{ nm}$.

4.2 Mikrobieller Zugang zu 2,3-*trans*-CHD

Als Wirt für die metabolischen Stoffflussderegulationen zur *trans*-CHD-Bildung wird *Escherichia coli* K12 gewählt. Zum einen sind *E. coli* K12-Stämme nicht-pathogen (S1-Klassifizierung) und mit diesen Stämmen produzierte Substanzen sind, sofern sie pyrogenfrei erhalten werden können, potentielle GRAS-Chemikalien. Zum anderen sind Mutanten mit Deletionen in den von Chorismat (**3**) ableitbaren Biosynthesewegen gut verfügbar. *E. coli* zeigt in ähnlichen Produktionssystemen (Shikimat-Produktion, Quinat-Produktion) schnelles Wachstum zu hohen Zellkonzentrationen und gute Produktbildung.^[50,52] Durch die Wahl homologer Expressionssysteme soll die Gefahr einer Bildung von proteinogener Einschlusskörpern (*Inclusionbodies*) in den Zellen minimiert werden.

Als Vektor für die Gentransformation wird das Plasmid pJF119EH1^[127] ausgewählt. Dieses ist charakterisiert als "high copy"-Plasmid (ColE1-Typ Replikon) mit Polylinker-Sequenz, flankiert und kontrolliert von einem IPTG-induzierbaren *tac*-Promotor^[128] und terminiert von zwei starken transkriptionalen Terminatoren. Zur Selektion transformierter Stämme trägt das Plasmid das Gen *bla*, kodierend für β -Lactamase. Die Genregulation erfolgt über den *tac*-Repressor *LacI*^Q. Das Plasmid pJF119EH1 gehört der *E. coli*-Inkompatibilitätsgruppe P an.^[127]

Die gewählte Strategie zur Herstellung von bakteriellen Stämmen zur Produktion von 2,3-*trans*-CHD **1** mit *E. coli* ist in Analogie zu den Arbeiten von Leistner und Mitarbeitern mit *Klebsiella pneumoniae* (siehe Schema 4.8).^[15]



Schema 4.8: Strategie zur Herstellung mikrobieller Produzenten von **1**.

Eine Verstärkung der intrazellulären Produktion von 2,3-*trans*-CHD **1** aus Chorismat (**3**) soll durch plasmidische Überexpression von *entC*, kodierend für Isochorismatsynthase, und *entB*,

kodierend für Isochorismatase, erreicht werden. *E.-coli*-Stämme werden dazu mit *entB/entC*-haltigen Plasmiden transformiert. Zur Verhinderung des metabolischen Abbaus und der Aromatisierung von **1** zu 2,3-Dihydroxybenzoat (**73**) sollen insbesondere auch *E.-coli*-Mutanten mit einer Deletion in *entA*, kodierend für Dihydroxybenzoatsynthase, transformiert werden.

4.2.1 Isolierung und Klonierung der Gene *entB* und *entC*

Zur Klonierung von *entB* und *entC* wurden diese Gene aus chromosomaler DNA des *E.-coli*-Wildstamms W3110^[129] isoliert. Gene, die für Enzyme der Eingangsbiosynthese des Enterobactins kodieren (*entA*, *entB*, *entE*, *entC*), sind in *E. coli* transkriptional mit dem Ende (rechtsläufig) des komplexen Enterobactin-Genclusters bei 13.5 min der chromosomalen Karte verbunden.^[130] Zwischen *entB* und *entC* ist ein weiteres Gen, *entE*, transkriptional verknüpft, welches zur katalytischen Darstellung von *trans*-CHD keine Bedeutung hat* und deshalb nicht zusammen mit *entB* und *entC* amplifiziert werden soll. Da das komplette Genom von *E.-coli* sequenziert vorliegt,^[131] können *entB* und *entC* über entsprechende Primer direkt aus diesem durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert werden.

Durch Reihung an die von M. A. McIntosh und Mitarbeiter bestimmte Sequenz für *entB* und *entC*^[132] erfolgt die Wahl der Primer für die PCR dabei so, dass gleichzeitig die Schnittstellen *Bam*HI und *Pst*II an *entB*, sowie *Sac*I und *Bam*HI an *entC* generiert werden. Über diese Schnittstellen ist eine Ligation in das Expressionsplasmid pJF119EH1 möglich (siehe Abbildung 4.2). Für die Vorwärtsprimer wird dabei jeweils ein Abstand von 20 bis 30 bp zu den ribosomalen Bindestellen eingehalten.

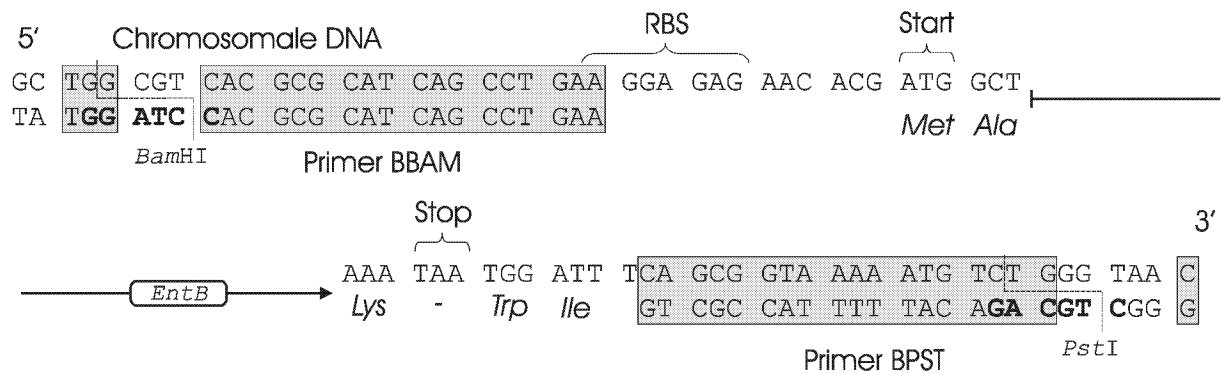
Zur Erhöhung der Selektivität der Amplifikation wurden die Schmelztemperaturen der Primerpaare durch Variation des GC-Gehaltes möglichst gut angepasst. Ein GC-Gehalt von mindestens 50 % sorgt gleichzeitig für eine gute Anlagerung (*Annealing*) der Primer und garantiert damit hohe Selektivität während der Amplifikation. Palindromische Muster wurden bei der Primerwahl vermieden.

EntB und *entC* konnten durch PCR unter Verwendung von *Taq* DNA-Polymerase als 900 bp (*entB*) und als 1200 bp Fragment (*entC*) amplifiziert werden. Da die Fehlerquote der *Taq* DNA-Polymerase bei günstigstenfalls 10^{-4} Fehler bp^{-1} liegt,^[133] betragen die Wahrscheinlichkeiten einer fehlerfreien Amplifikation^[134] $\leq 91\%$ für *entB* und $\leq 89\%$ für *entC*. Zur Erhöhung der Amplifikationssicherheit wurde die PCR-Reaktion mit *Pwo* DNA-Polymerase (aus *Pyrococcus woesei*)^[135] unter gleichen Amplifikationsbedingungen durchgeführt. Die *Pwo* DNA-Polymerase zeichnet sich durch eine $3' \rightarrow 5'$ *Proofreading* Exonuklease-Aktivität aus und erreicht somit eine niedrigere Fehlerquote von 10^{-6}

* EntE hat Bedeutung in der Aktivierung von 2,3-Dihydroxybenzoesäure im späten Enterobactin-Biosyntheseweg und bildet eine Substruktur des Multienzymkomplexes Enterobactinsynthase.

Fehler bp^{-1} .^[136] *EntB* und *entC* konnten auch mit dieser Polymerase als DNA-Fragmente der Größen 900 bp (*entB*) und 1200 bp (*entC*) amplifiziert werden. Die Wahrscheinlichkeiten der korrekten Amplifikation betragen für beide Fragmente rechnerisch mindestens 99.9 %.^[134]

A)



B)

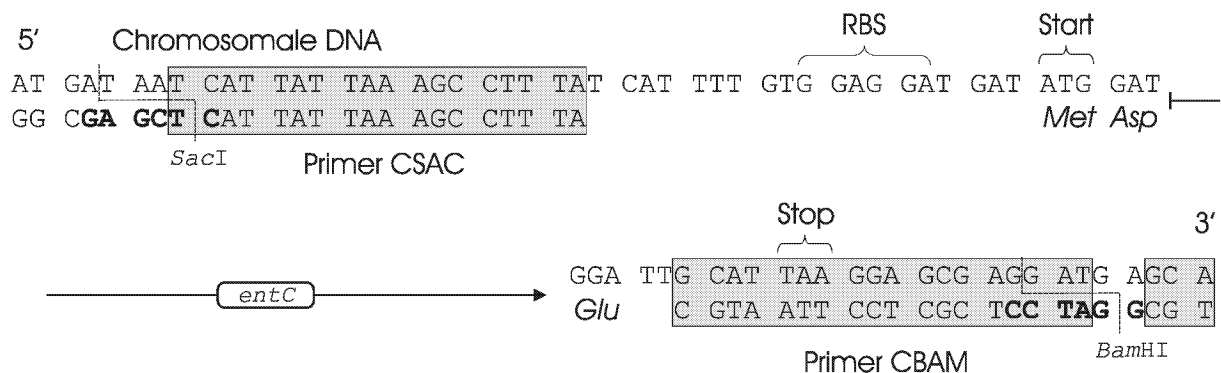


Abbildung 4.2: Primerwahl für die PCR-Amplifikation von *entB* und *entC* aus *E.-coli*-Wildstamm W3110.^[129] A) Amplifikation von *entB* mit den Primern BBAM und BPST unter gleichzeitiger Einführung der Schnittstellen *Bam*HI (Erkennungssequenz GGATCC) und *Pst*I (Erkennungssequenz GACGTC). B) Amplifikation von *entC* mit den Primern CSAC und CBAM unter gleichzeitiger Einführung der Schnittstellen *Sac*I (Erkennungssequenz GAGCTC) und *Bam*HI. Markierter Bereich gibt die Übereinstimmung der Primersequenz mit der chromosomalen DNA-Sequenz wider.

Beide Fragmente wurden über die generierten Schnittstellen in das Plasmid pJF119EH1 inseriert, je separat und in tandem (siehe Abbildung 4.3). Zellen des Klonierstamms DH5 α ^[137] wurden mit dem ligierten Plasmidprodukt transformiert. Plasmidhaltige Klone wurden auf Ampicillin-Platten selektiert. Identifikation der Inserts *entB*, *entC* und *entB/entC* wurde durch Restriktionsanalyse mit ausgewählten Endonukleasen durchgeführt, wobei insbesondere Restriktionsenzyme ausgewählt wurden, die Schnitte in den Insert-Sequenzen erzeugen. Plasmide mit korrektem Restriktionsmuster wurden über die Polylinker-Funktion sequenziert und die Insertsequenzen als *entB* und *entC* verifiziert.

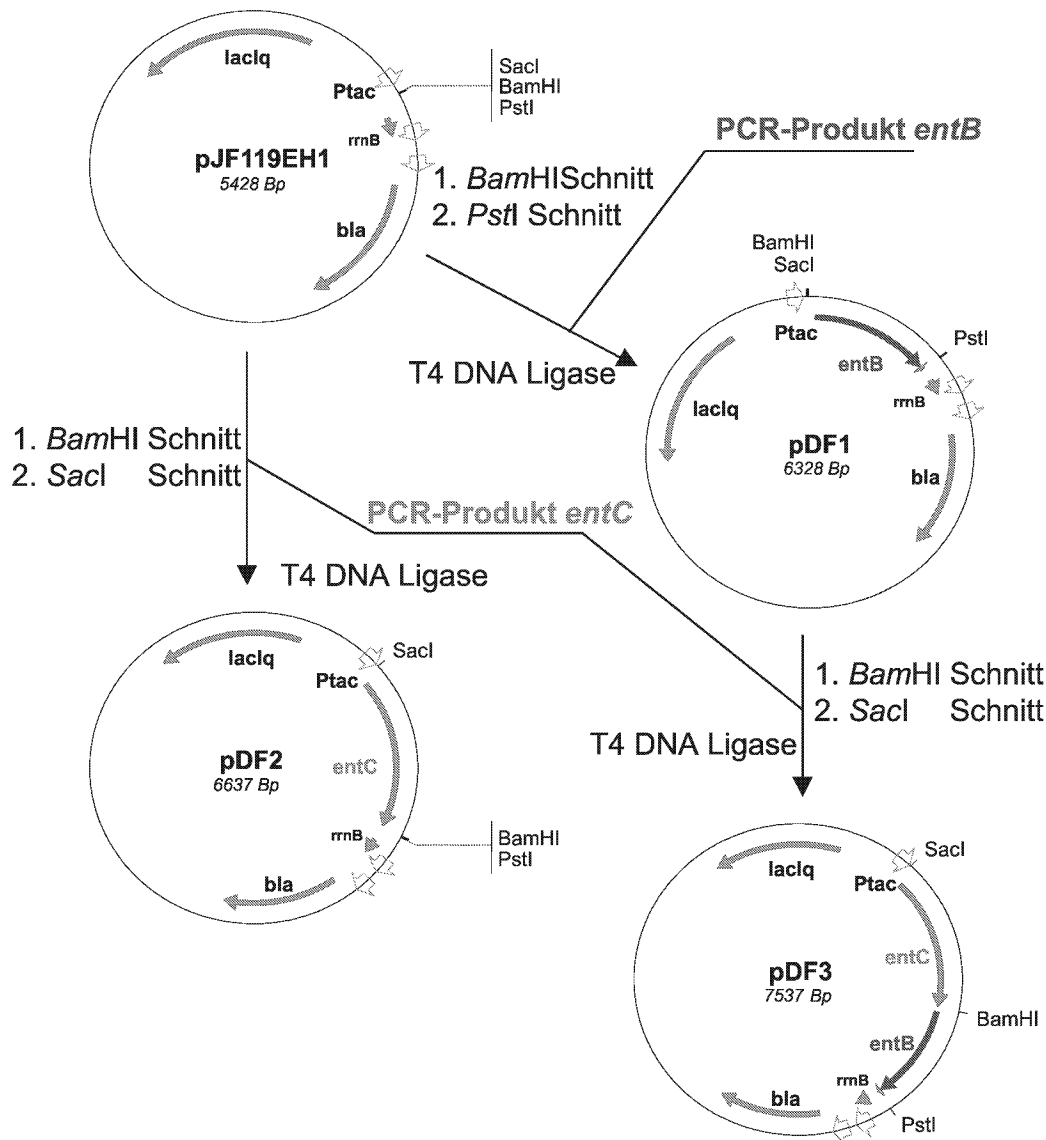


Abbildung 4.3: Konstruktion der Plasmide pDF1, pDF2 und pDF3. Ausgehend vom Plasmid pJF119EH1 wurde pDF1 durch Insertion des Genfragmentes *entB* über Restriktionsseiten *BamHI* und *PstI* generiert. Analog wurde pDF2 aus pJF119EH1 durch Insertion von *entC* über Restriktionsseiten *BamHI* und *SacI* kloniert. pDF3 wurde aus pDF1 durch Insertion von *entC* über Restriktionsseiten *BamHI* und *SacI* generiert und trägt *entB* und *entC* in tandem.

DNA-Sequenzierung der klonierten Fragmente zeigte Übereinstimmung mit den Originaldaten der Arbeitsgruppe um M. A. McIntosh,^[132] ausgenommen einer Punktmutation in *entB* bei bp 525 (gcg → gct). Beide Codons kodieren für Alanin, so dass ein Einfluss auf die Proteinebene ausgeschlossen ist (stille Mutation). Da die Wahrscheinlichkeit eines Basenpaar-Austauschs während der PCR-Reaktion für das gesamte Fragment *entB* bei nur 0.09 % (*Pwo* DNA-Polymerase)^[134] liegt und die Punktmutation in pDF1 und pDF3 auftritt, bleibt ungeklärt, ob es sich hier um eine Mutation durch gentechnische Arbeiten (ein Artefakt), oder möglicherweise um eine stammspezifische Mutation handelt. Ein Fehler in den Sequenzdaten

von M. A. McIntosh^[132a] ist unwahrscheinlich, da diese Sequenz mit den Daten von F. R. Blattner^[131] übereinstimmt.

Auch Zellen des *E.-coli*-Wildstammes W3110,^[129] der *E. coli entA*-Stämme H1882^[138] und AN193,^[139,140] des *E. coli entC/menF*-Stammes PBB8,^[141] sowie des multideletierten *E.-coli*-Stammes BN117^[142] wurden mit den Plasmiden pDF1, pDF2 und pDF3, sowie zusätzlich dem Leerplasmid pJF119EH1 transformiert und die Transformanten über die Antibiotikaresistenz selektiert.

4.2.2 Untersuchungen zur Produktion und Aktivität von EntB und EntC

Die Expression der plasmidkodierten Gene *entB* und *entC* wurde durch Untersuchung des zellfreien Extraktes von unter induktiven Bedingungen gewachsenen Zellen (LB-Medium, 100 μ M IPTG) über Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) bestätigt (siehe Abbildung 4.4).

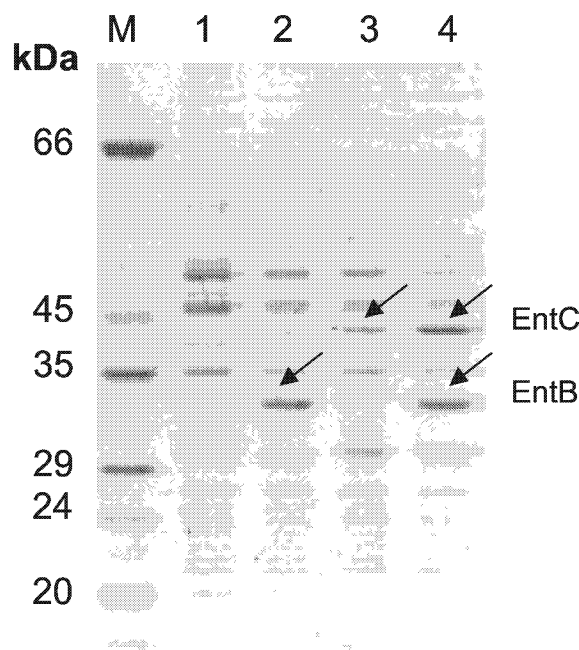


Abbildung 4.4: SDS-PAGE des zellfreien Extraktes des *E.-coli*-Stammes DH5 α (LB-Medium, 100 μ M IPTG) mit Plasmiden pJF119EH1 (Bahn 1), pDF1 (Bahn 2), pDF2 (Bahn 3) und pDF3 (Bahn 4). Genprodukt von *entC* (42 kDa) ist in Bahn 3 und 4 zu sehen, Genprodukt von *entB* (35 kDa) in Bahn 2 und 4. Keine überexprimierten Gen-Produkte von *entB* oder *entC* sind in Zellen nachweisbar, die nur das leere Plasmid enthalten. Die injizierte Proteing Gesamtmenge beträgt 310 ng pro Bahn.

EntC wird in Stämmen mit Plasmiden pDF2 und pDF3 in Form eines 41 kDa-Proteins (berechneter Wert für EntC: 42 kDa), EntB in Stämmen mit Plasmiden pDF1 und pDF3 in Form eines 34 kDa-Proteins (berechneter Wert für EntB: 35 kDa) nachgewiesen. Die Abweichungen der (durch logarithmische Intrapolation der Retentionswerte der Proteine)

experimentell ermittelten Proteinmassen von den aus der Summenformel berechneten Proteinmassen sind nach Herstellerangaben auf unterschiedliche Wechselwirkungen der Proteine mit dem Puffer zurückzuführen.^[143] In nicht-induzierten oder nicht-transformierten Stämmen wird weder EntB noch EntC nachgewiesen. Die Enzymaktivität von EntB wurde im zellfreien Extrakt von unter induktiven Bedingungen gewachsenen Zellen (100 μ M IPTG, LB-Medium) anhand des enzymatischen Abbaus von Chorismat (**3**) zu 3,4-*trans*-CHD **2** bestimmt. Analog wurde über eine Zwei-Enzym-Kinetik die Aktivität EntC durch Umsetzung von **3** über Isochorismat (**72**) zu 2,3-*trans*-CHD **1** (EntC und EntB) bestimmt.

Die Umsetzungen durch EntB und EntC in zellfreiem Extrakt wurden in Tris-HCl-(200 mM)-gepufferter 4 mM Lösung von **3** bei pH 8.5 und 20 °C über eine Zeitdauer von 400 Minuten HPLC-chromatographisch bei einer Wellenlängen von 275 nm verfolgt. Die Analyse des *entA*⁻-Stammes AN193 ist gezeigt (siehe Abbildung 4.5).

Im Extrakt von Zellen, die nur das leere Plasmid pJF119EH1 enthalten oder plasmidfrei sind, wird nur eine langsame Bildung von Isochorismat (**72**) und 2,3-*trans*-CHD **1** beobachtet (Abbildung 4.5A). Nichtsdestoweniger wird ein Zerfall von Chorismat (**3**) mit nahezu konstanter Geschwindigkeit festgestellt. Dieser ist nicht alleine auf nicht-enzymatische (thermale) Zersetzungsreaktionen zurückzuführen, wie bereits von F. Gibson beschrieben,^[144,145] da in Zerfallsstudien in gepufferter wässriger Lösung und in zellfreiem Extrakt, in welchem die Proteine durch Erhitzen denaturiert wurden, unter gleichen Bedingungen eine wesentlich geringere Zersetzung beobachtet wird (Halbwertszeit $t_{1/2}$ = 28 h). Von D. Hilvert et al.^[54] wurde eine ähnlich hohe Zersetzungstendenz für Chorismat (**3**) bei 25 °C gefunden (Halbwertszeit $t_{1/2}$ = 24 h).

Durch Eliminierung der thermalen Zersetzung in der Enzymaktivitäts-Bilanz konnte eine Gesamtaktivität der enzymatischen Chorismatzersetzung von 21 mU mg(Protein)⁻¹ bestimmt werden. Aus der Zunahme der Konzentrationen von Isochorismat (**72**) und 2,3-*trans*-CHD **1** ist zu schließen, dass die enzymatische Chorismatzersetzung zu circa 25 % auf Isochorismatsynthase-Aktivität und circa 75 % auf die Aktivitäten anderer Enzyme zurückzuführen ist. Obwohl eine quantitative Aktivitätszuordnung der 75 %-Aktivität zu einzelnen Enzymen nicht getroffen werden kann, erklärt sich dieser Wert qualitativ dadurch, dass Chorismat (**3**) außer von Isochorismatsynthase von vier weiteren in *E. coli* beschriebenen Enzymen, Chorismatmutase, Anthranilatsynthase, *p*-Aminobenzoatsynthase und Chorismat-lyase, als natürliches Substrat akzeptiert wird.^[146]

Zellfreier Extrakt von Zellen mit Plasmid pDF1, welches *entB* enthält, zeigen einen nahezu linearen Anstieg der Konzentration von 3,4-*trans*-CHD **2** als Hauptprodukt und 2,3-*trans*-CHD **1** als Nebenprodukt (Abbildung 4.5B). Isochorismat (**72**) wird zu keiner Zeit gefunden. Die Bildung von **2** bestätigt, dass EntB plasmidisch überproduziert wird und enzymatisch aktiv ist. Die Bildung von **1** in geringen Konzentrationen weist auf eine

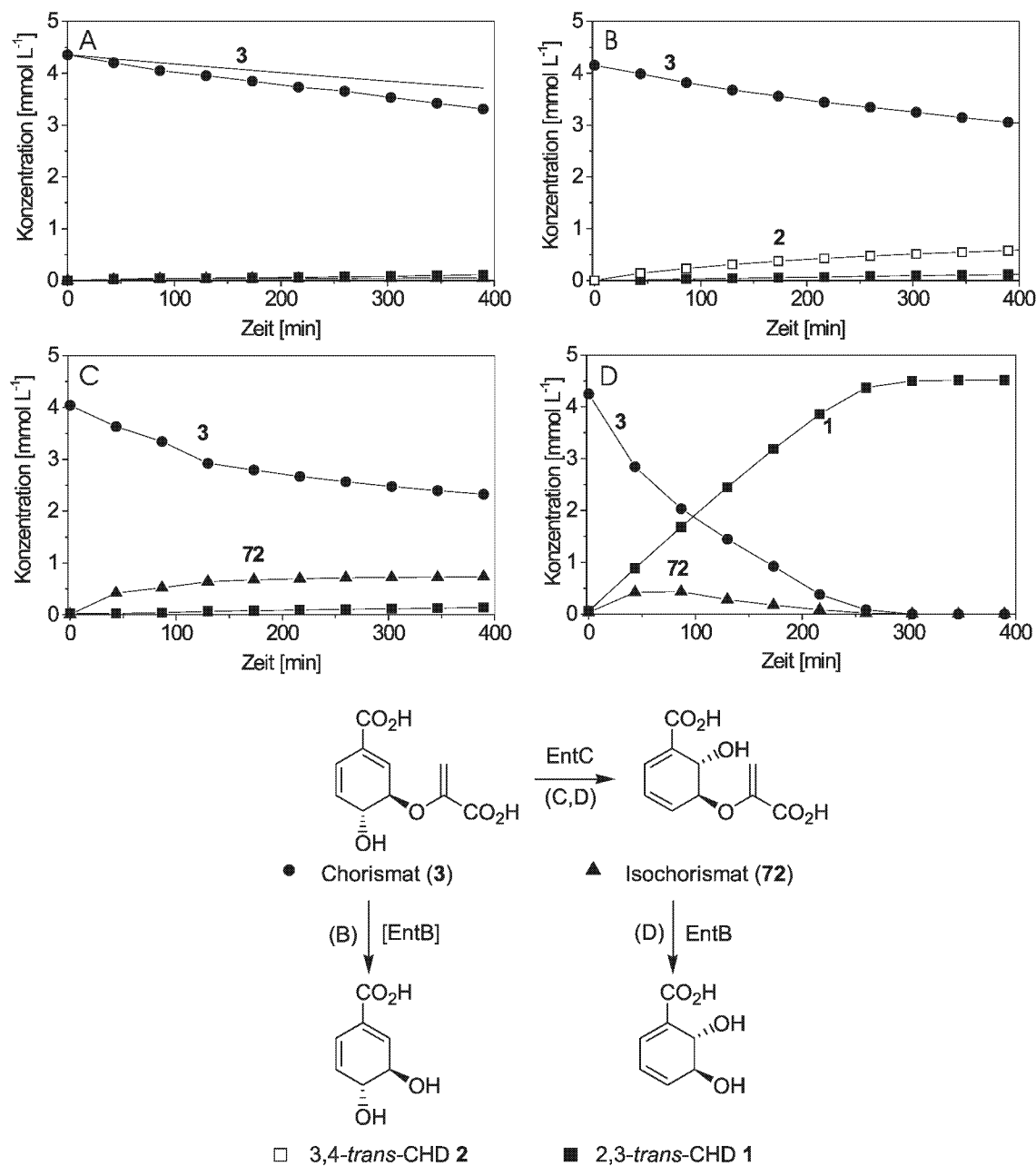


Abbildung 4.5: Bestimmung der Enzymaktivitäten im zellfreien Extrakt des *E.-coli*-Stammes AN193 bei 20 °C. Die Änderung der Konzentrationen von Reaktanden und Produkten wurde über HPLC verfolgt. (A) Transformanten mit Plasmid pJF119EH1 katalysieren den langsamen Abbau von Chorismat (3) (●). Die Produkte sind 2,3-trans-CHD 1 (■) und Isochorismat (72) (▲) in etwa gleichen Teilen. Die Referenz, der thermische (nicht-enzymatische) Zerfall von 3 in gepufferter Lösung, ist unter gleichen Bedingungen langsamer (—). (B) Transformanten mit Plasmid pDF1 (*entB* überexprimiert) katalysieren hauptsächlich die Reaktion von 3 zu 3,4-trans-CHD 2 (□) und geringen Mengen 1. (C) Transformanten mit Plasmid pDF2 (*entC* überexprimiert) katalysieren die Reaktion zu 72 und geringen Mengen 1. (D) Transformanten mit Plasmid pDF3 (*entB* und *entC* überexprimiert) überführen 3 vollständig zu 1 und 72 als kurzzeitig auftretendes Intermediat.

schwache Isochorismatsynthase-Aktivität durch chromosomal kodiertes *entC* und/oder *menF* hin.* In Stämmen mit *entC*⁻/*menF*⁻-Defizienz (PBB8) wird auch mit überproduziertem EntB keine Bildung von **1** beobachtet.

Mit zellfreiem Extrakt von Stämmen mit Plasmid pDF2, welches *entC* enthält, wird die Reaktion von Chorismat (**3**) zu Isochorismat (**72**) als Hauptprodukt und 2,3-*trans*-CHD **1** als Nebenprodukt katalysiert (Abbildung 4.5C). Die nahezu konstant bleibende, langsame Bildung von **1** ist auf Isochorismatase-Aktivität durch chromosomal kodiertes *entB* zurückzuführen.

Eine Analyse des zellfreien Extraktes von Stämmen, in denen *entB* und *entC* gleichzeitig überexprimiert wurden (pDF3), bestätigen die zu erwartende Reaktion von Chorismat (**3**) zu 2,3-*trans*-CHD **1** über Isochorismat (**72**) als intermediäres Produkt (Abbildung 4.5D). Die Linearität der zeitlichen Zunahme der Konzentration an **1** und das intermediär entstehende **72** sind dadurch zu erklären, dass die EntB-Umsetzung hier als *bottle-neck*-Reaktion der zweistufigen enzymatischen Umsetzung auftritt.

Analoge Experimente mit den Stämmen H1882, W3110 und DH5 α zeigten, innerhalb der analytischen Messgenauigkeit, ähnliche Enzymaktivitäten für chromosomal und plasmidisch kodiertes EntB und EntC. Eine Zersetzung von 2,3-*trans*-CHD **1** und 3,4-*trans*-CHD **2** aufgrund chromosomal kodierter EntA-Aktivität in den Stämmen W3110 und DH5 α wurde nicht beobachtet. Nach Zugabe von 8 mM (Endkonzentration) β -NAD als Cofaktor für die EntA-Katalyse wurde ebenfalls im zellfreiem Extrakt dieser beiden Stämme keine Zersetzung von **1** und **2** beobachtet.

Das zellfreie Extrakt von *E.-coli*-Stamm PBB8 (*entC*⁻/*menF*⁻-Mutation) zeigte keine Aktivität für chromosomal kodierte Isochorismatsynthase (LOQ(**72**) = 19 μ M), allerdings waren in diesem Stamm alle katalytischen Aktivitäten, auch für plasmidkodierte Enzyme, deutlich niedriger.

Aus der Abnahme der Konzentration von Chorismat (**3**) und der Zunahme der Konzentrationen der sekundären Metabolite **72**, **1** und **2** können die absolute Aktivitäten von EntB und EntC/MenF, bezogen auf die Gesamtproteinkonzentration im zellfreien Extrakt, errechnet werden (Tabelle 4.2 und Tabelle 4.3). Mindestaktivitäten für EntB bezogen auf die Umsetzung von Isochorismat (**72**) wurden über Zwei-Enzym-Kinetiken bestimmt, für den Fall, dass die EntC-Reaktion für die Umsetzung von **3** zu **1** geschwindigkeitsbestimmend war. Wenn im Gegensatz dazu die EntB-Katalyse geschwindigkeitsbestimmend war, wurden absolute Aktivitäten für EntB in der Zwei-Enzym-Kinetik aus der Zunahme von **1** bestimmt.

* Sowohl *entC* als auch *menF* kodieren für Enzyme mit Isochorismatsynthase-Aktivität. MenF ist jedoch primär ein Enzym des von Isochorismat (**72**) abgehenden Menaquinon-Biosyntheseweges.

Tabelle 4.2. Enzymaktivitäten bei 20 °C in Abhängigkeit von den überexprimierten Genen in *E.-coli*-Stamm AN193 (*entA*⁻-Mutant).

Stamm		plasmid-kodierte Gene	Enzymaktivität [mU mg(Protein) ⁻¹]		
			EntC/MenF	EntB	
				(Chorismat)	(Isochorismat)
AN193	/pJF119EH1	—	5	< 0.25	3
	/pDF1	<i>entB</i>	7	77	n.d. ^a
	/pDF2	<i>entC</i>	224	n.d. ^a	> 7
	/pDF3	<i>entB, entC</i>	212	n.d. ^a	442

^a n.d. = nicht bestimmt.Tabelle 4.3. Enzymaktivitäten bei 20 °C in Abhängigkeit von den überexprimierten Genen in *E.-coli*-Stamm PBB8 (*entC*⁻/*menF*⁻-Mutant).

Stamm		plasmid- kodierte Gene	Enzymaktivität [mU mg(Protein) ⁻¹]		
			EntC/MenF	EntB	
				(Chorismat)	(Isochorismat)
PBB8	/pJF119EH1	—	< 0.25	< 0.25	n.d. ^a
	/pDF1	<i>entB</i>	< 0.25	40	n.d. ^a
	/pDF2	<i>entC</i>	34	< 0.25	< 0.25
	/pDF3	<i>entB, entC</i>	74	32	> 74

^a n.d. = nicht bestimmt.

Durch plasmidische Überproduktion von EntC wurde die natürliche Enzymaktivität im *E.-coli*-Stamm AN193 im Minimum um den Faktor 30 auf über 210 mU mg(Protein)⁻¹ gesteigert. Die natürliche EntB-Aktivität wurde um den Faktor 150 auf 442 mU mg(Protein)⁻¹, bezogen auf 72 als Substrat, gesteigert. Die Aktivitätssteigerung in den *E.-coli*-Stämmen H1882, DH5α und W3110 waren ähnlich, während im *E.-coli*-Stamm PBB8 niedrigere Aktivitäten (74 mU mg(Protein)⁻¹ für EntB/EntC) gemessen wurden.

4.2.3 Mikrobielle Produktion von 2,3-*trans*-CHD

Die mit den Plasmiden pDF1, pDF2 und pDF3 transformierten Stämme W3110, DH5α, AN193, H1882 und PBB8 wurden unter nicht pH-geregelten Bedingungen im Batch-Ansatz kultiviert und die mikrobielle Produktion von 2,3-*trans*-CHD 1 im Überstand HPLC-chromatographisch untersucht.

Erste Untersuchungen zur Bildung von 1 wurden in dem von E. Leistner et al. beschriebenen Puffermedium^[15] durchgeführt (im folgenden als Mineralsalzmedium 1 bezeichnet), welches zur Produktion von *trans*-CHD mit Stämmen *K. pneumoniae* verwendet wurde. Mineralsalzmedium 1 ist ein reines Produktionsmedium (Phosphat-Puffer, zusätzlich

Ammonium, Kalium, Magnesium, Eisen, Sulfat, Chlorid), welches weder für *K. pneumoniae*^[15] noch für *E. coli** wachstumsgeeignet ist.

Nach Resuspension in LB-Medium gewachsener Zellen in Mineralsalzmedium 1 (100 μM IPTG) zeigt sich, dass alle untersuchten Stämme mit plasmidkodiertem *entB/entC* (pDF3-Transformanten) 2,3-*trans*-CHD **1** bilden, während **1** nicht in den Zellsuspensionen der Transformanten der anderen Plasmide (pDF1, pDF2 oder Leerplasmid), der nicht-transformierten Stämme oder der nicht-induzierten Stämme detektiert wird. Eine Bildung der Intermediate des Enterobactin-Biosyntheseweges Chorismat (**3**) und Isochorismat (**72**), oder 3,4-*trans*-CHD **2** wird bei keinem Stamm beobachtet (Nachweisgrenzen $\leq 1 \text{ mg L}^{-1}$ ($\leq 7 \mu\text{M}$)). Der Nachweis des mikrobiell produzierten **1** erfolgte nach präparativer HPLC-Auftrennung des Konzentrats des Kultivierungsüberstands NMR-spektroskopisch. Die analytischen Daten stimmen mit denen des chemisch synthetisierten racemischen **1** überein ($^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, RP-HPLC/UV).

Die Produktbildungsrate (**1**) in Mineralsalzmedium 1 (siehe Abbildung 4.6) sind am größten bei Kultivierung der *entA*⁻-Mutanten AN193 (29 $\text{mg L}^{-1} \text{ g(BTM)}^{-1}$) und H1882 (26 $\text{mg L}^{-1} \text{ g(BTM)}^{-1}$), moderat beim *entC*⁻/*menF*⁻-Stamm PBB8 (17 $\text{mg L}^{-1} \text{ g(BTM)}^{-1}$) und niedrig beim Klonierstamm DH5 α , sowie dem Wildstamm W3110 (beide 9 $\text{mg L}^{-1} \text{ g(BTM)}^{-1}$).

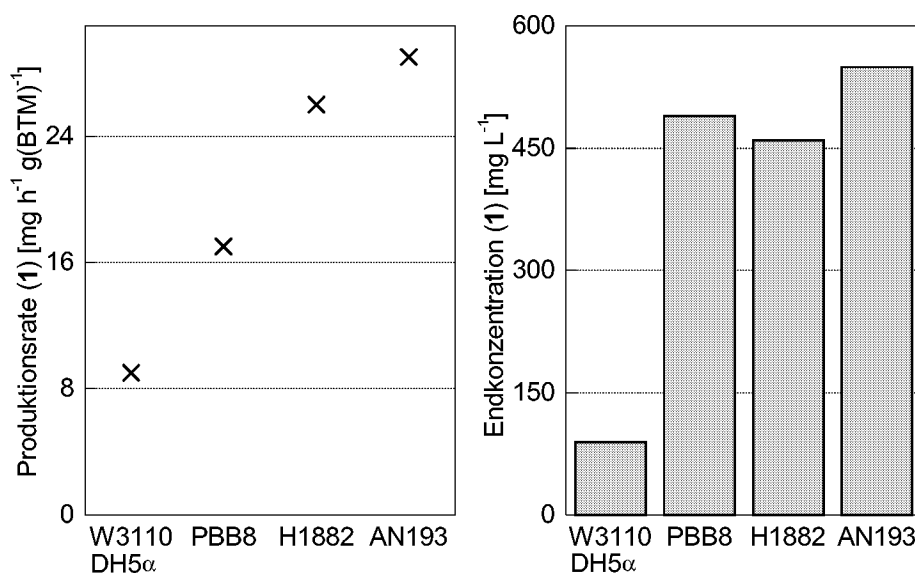


Abbildung 4.6: Zellmassenspezifische Produktionsraten (**1**), gemessen 2 h nach Induktion, und Endkonzentrationen (**1**) nach 14 h in Mineralmedium 1 bei Überexpression der Gene *entB* und *entC*.

Die Bildungsrate (**1**) sind also in *entA*⁻-Stämmen (AN193 und H1882) circa um den Faktor drei höher als im Wildstamm mit chromosomal kodiertem *entA* (W3110). Die

* In Mineralsalzmedium 1 (100 mL, 10 g L^{-1} Glucose) suspendierte *E.-coli*-Zellen (W3110/pDF1, 20 μL Glycerinkultur) übersteigen nach 10 h Inkubation (150 rpm, 37 °C) Zelldichten von $0.2 \text{ g(BTM)} \text{ L}^{-1}$ nicht.

Endkonzentration (1) nach 14 h Kultivierungszeit ist ebenfalls signifikant höher bei Verwendung der Stämme AN193/pDF3, PBB8/pDF3 und H1882/pDF3 als in dem transformierten Wildstamm W3110/pDF3. Maximale Endkonzentrationen von 550 mg L^{-1} (3.5 mM) 1 wurden in Mineralsalzmedium 1 mit Stamm AN193/pDF3 erreicht. Die nach Kultivierung des Stamms PBB8/pDF3 unter Kenntnis der maximalen Produktbildungsrate unerwartet hohe erreichte Endkonzentration von 470 mg L^{-1} (3.0 mM) 1 ist vermutlich auf eine höhere Langzeitstabilität der Produktbildung (1) während des Kultivierungszeitraums von 14 h zurückzuführen. Die Enzymaktivitäten für EntB und EntC nach Überexpression der entsprechenden Gene waren in diesem Stamm ebenfalls geringer (siehe Kapitel 4.2.2). Möglicherweise gilt für diesen Stamm der Schluss, dass aufgrund veränderter Proteinproduktion und den daraus sich ergebenden veränderten metabolischen Stoffflüsse auch die Langzeitstabilität der Produktbildung (1) resultiert.

Ein Abnahme der Konzentration von 2,3-*trans*-CHD 1 wurde innerhalb des Kultivierungszeitraums bei keinem Stamm, einschließlich der Stämme mit chromosomal kodiertem *entA* (PBB8/pDF3, W3110/pDF3, DH5 α /pDF3) gefunden. Unter der Annahme, dass der Transport (1) durch die Membran unspezifisch und reversibel erfolgt,* führt dies zu dem Schluss, dass die intrazelluläre Konzentration (1) während des Kultivierungszeitraums immer größer als die Konzentration im Überstand war.

Um eine mikrobielle Produktion von 1 zu ermöglichen, die ohne einen Zellernte- und Resuspensionsschritt zwischen Zellwachstums- und Produktionsphase auskommt, bei der die Biosynthese von 1 jedoch auch nicht durch inhibierende oder repressorische Einflüsse komplexer Medienbestandteile beeinträchtigt wird, wurde für den Stamm AN193/pDF3 ein synthetisches Mineralsalzmedium, bestehend aus Mineralsalzlösung, Puffer und definierter Kohlenstoffquelle, verwendet. Ausgehend von einem von J. G. Pan und Mitarbeitern^[147] beschriebenen Medium zur *E.-coli*-K12-Kultivierung (Mineralsalzmedium 2) wurden Zellwachstumsraten und erreichbare Zelldichten dadurch gesteigert, dass die Ammoniumkonzentration† erhöht und zusätzlich 2,3-Dihydroxybenzoesäure (wegen des *entA*-Defektes) supplementiert wurde. Die Substanzen, für den der *E.-coli*-Stamm AN193 Auxotrophien besitzt (Thiamin, Leucin, Prolin, Tryptophan), mussten ebenfalls zugesetzt werden, um Wachstum zu ermöglichen.

* Spezifische Transporter für *trans*-CHD, für Chorismat (3) oder für Isochorismat (72) sind nicht literaturbekannt. Es sind auch keine Gründe formuliert worden, die eine Postulation spezifischer Transporter für eine *trans*-CHD-Exkretion rechtfertigen würden.

† In der Vorschrift von J. G. Pan et al.^[147] wird Ammonium nicht in definierten Mengen zugesetzt, sondern Ammoniak zur Regulierung des pH-Wertes verwendet. Durch Verwendung definierter Ammoniumkonzentrationen im Batch-Ansatz sind in den Kultivierungsversuchen reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten.

In dem auf diese Weise veränderten Medium (Mineralsalzmedium 3) wurden unter nicht pH-geregelten Bedingungen mit dem Stamm AN193/pDF3 maximale Wachstumsraten (Phase logarithmischen Wachstums bei OD 2; umgangssprachlich „semilogarithmische Phase“) von $\mu = 0.46 \text{ h}^{-1}$ und maximale End-Zelldichten von 3 g L^{-1} unter nicht pH-geregelten Batch-Bedingungen erreicht. Die in Mineralsalzmedium 3 erreichten Produktbildungs- und Produktendkonzentrationen (1) entsprechen denen der Kulturen, welche in LB-Medium gewachsen und in Mineralsalzmedium 1 resuspendiert und kultiviert wurden. Das Mineralsalzmedium 3 wurde zur Untersuchung aller weiteren Produktionsparameter verwendet.

Sowohl Zellwachstum als auch Produktbildung (1) waren im Mineralsalzmedium 3 maximal bei einer Temperatur von 37°C und pH 7. Durch Erhöhung der Temperatur auf 40°C wurde die Produktbildung (1) nicht beschleunigt, es wurde bereits nach drei Stunden Inokulation Zell-Lyse festgestellt (gelblicher Trübung des Überstandes; lichtmikroskopisch anhand der Zellfragmente). Bei Temperaturen unter 37°C (bei 33°C , 30°C , 25°C) wurden sowohl niedrigere Wachstumsraten als auch Produktbildungs- und Produktendkonzentrationen erhalten. Kultivierungen bei verschiedenen pH-Werten in Mineralsalzmedium 3 ($4 \leq \text{pH} \leq 8.5$, mit 1 N NaOH -Lösung, 1 N HCl -Lösung, vor Kultivierung eingestellt) ergaben bei *E. coli*-Stamm AN193/pDF3 im Bereich pH 6 bis pH 7 optimale Produktbildungs- und Produktendkonzentrationen (1) von $29 \text{ mg h}^{-1} \text{ g(BTM)}^{-1}$, während bei $\text{pH} < 5$ oder $\text{pH} > 8$ die Produktbildungs- und Produktendkonzentrationen (1) deutlich niedriger waren ($< 9 \text{ mg h}^{-1} \text{ g(BTM)}^{-1}$).

Eine Produktion von 1 ist außer aus Glucose auch aus anderen Kohlenstoffquellen möglich, einschließlich Galactose, Fructose, Glycerin, Acetat oder Lactat (Tabelle 4.4).

Tabelle 4.4: Zellen des *E. coli*-Stamms AN193/pDF3 aus LB-Medium ($100 \mu\text{M IPTG}$, OD 2) wurden in Mineralsalzmedium 3 (pH 7) mit 10 g L^{-1} der Kohlenstoffquelle resuspendiert und die zellmassenspezifische Produktbildungs- und Produktendkonzentrationen (1) der Zellen 2 h nach Inkubation (150 rpm , 37°C) HPLC-chromatographisch im Überstand bestimmt.

C-Quelle	Produktbildungs- und Produktendkonzentrationen (1) [$\text{mg h}^{-1} \text{ g(BTM)}^{-1}$]
Glycerol	48
Galactose	45
Lactat	38
Fructose	37
Glucose	27
Acetat	13
Hefeextrakt	7

Ausgehend von Kohlenstoffquellen, die nicht wie Glucose über das Phosphotransferase-System (PTS-System) von der Zelle aufgenommen werden, sondern durch Permease-Katalyse und Phosphorylierung (Galactose), beziehungsweise Glp-Facilitatoren (Glycerol), werden

teilweise sogar signifikant bessere Produktbildungsrate (1) von bis $48 \text{ mg h}^{-1} \text{ g(BTM)}^{-1}$ erreicht, als mit Glucose ($27 \text{ mg h}^{-1} \text{ g(BTM)}^{-1}$). Als Grund für diese Unterschiede kann angenommen werden, dass Glucose einen inhibitorischen Einfluss auf zahlreiche Biosynthesewege in *E.-coli* besitzt (Katabolit-Repression),^[148] wenn auch für den Chorismat-Biosyntheseweg, als Teil des Anabolismus-Systems in Bakterien, kein Glucose-Effekt erwartet werden sollte und noch nicht beobachtet wurde. Entscheidender für die unterschiedlichen Produktionsleistungen ist vielmehr, dass für die Aufnahme und Phosphorylierung von Glucose und Fructose durch das PTS-System bereits 1 Äquimol PEP benötigt wird,^[149] während bei den anderen C-Quellen (Glycerol, Galactose, Lactat, Fructose) eine direkte Phosphorylierung durch ATP möglich ist. Dieses Äquimol PEP steht somit bei Verwendung von Glucose und Fructose für die Biosynthese von Chorismat (3) nicht zur Verfügung.^[150] Mit induktiven Effekten von C-Quellen auf den Tac-Promotor darf nicht argumentiert werden. Eine solche Diskussion wäre aber im Fall einer Induktion über einen schwächeren Lac-Promotor (insbesondere mit Lactose) für EntB/EntC-Überproduktion sinnvoll.

Zur Untersuchung des Einflusses der Induktorkonzentrationen auf die Produktbildung (1) wurden *E.-coli*-Zellen AN193/pDF3 aus LB-Medium (mit IPTG) in Mineralsalzmedium 3 (gleiche IPTG-Konzentration) resuspendiert und die Produktbildungsrate (1) 2 h nach Inkubationsbeginn (37°C , pH 7) gemessen. Ab einer Induktorkonzentration von $40 \mu\text{M}$ IPTG kann die Produktbildung (1) durch Erhöhung der Induktorkonzentration nicht mehr signifikant gesteigert werden (siehe Abbildung 4.7).

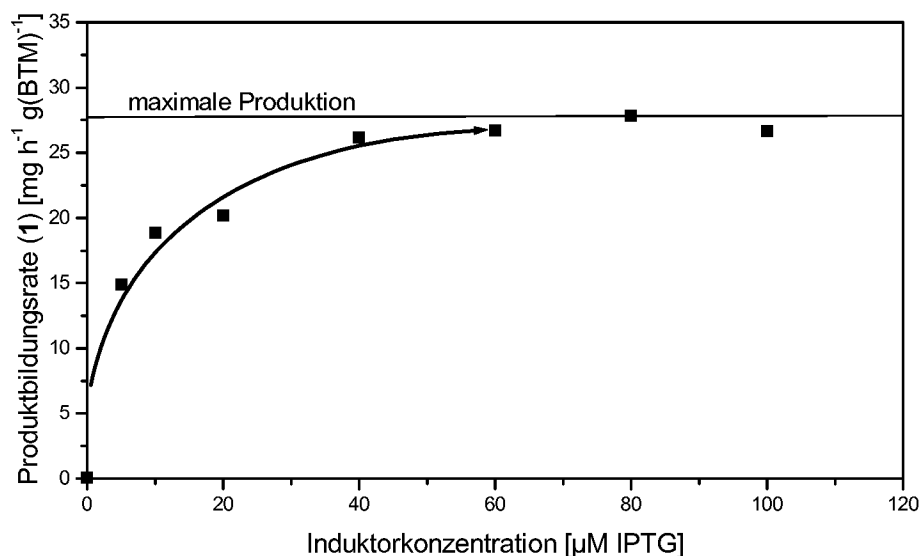


Abbildung 4.7: Zellmassenspezifische Produktbildungsrate (1) in Mineralsalzmedium 3 in Abhängigkeit von der Induktorkonzentration.

Schon bei Zugabe von $5 \mu\text{M}$ Induktor wird 1 mit einer zellmassenspezifischen Bildungrate von $15 \text{ mg h}^{-1} \text{ g(BTM)}^{-1}$ (55 % der maximalen Leistung) gebildet. Ohne Induktorzugabe wird keine Bildung von 1 beobachtet. Experimente, bei denen IPTG ($100 \mu\text{M}$) während der lag-

Phase oder der logarithmische Phase des Zellwachstums in LB-Medium oder Mineralsalzmedium 3 zugegeben wurde, zeigten, dass nach Induktion für eine Zeit von vier bis fünf Stunden kein Zellwachstum stattfindet. Wird die Kultivierung der Zellen in IPTG-haltigem (100 μM) LB-Medium oder IPTG-haltigem (100 μM) Mineralsalzmedium 3 gestartet, so tritt keine Reduktion der Wachstumsrate, der End-Zelldichte oder der maximalen Produktbildungsrate (**1**) im Vergleich zur Kultivierung in induktorfreen Medien auf. Eine Abnahme der Konzentration von IPTG im zellfreien Überstand wurden auch nach längeren Inkubationszeiten (24 h) nicht festgestellt (HPLC-Analyse). Die Thermostabilität des Induktors in wässriger Lösung wurde bereits in anderen Arbeiten untersucht.^[151] Bildung von **1** setzt in allen Fällen unmittelbar nach der Induktorzugabe ein und wurde sowohl in wachsenden Kulturen als auch in stationären Kulturen beobachtet. Der Produktionsprozess ist somit vollständig wachstumsentkoppelt. Nach der ersten Induktion (100 μM) führten weitere Induktionsversuche nicht zu einer weiteren Steigerung der Produktbildungsrate (**1**).

Unter nicht pH-geregelten Bedingungen im Batch-Ansatz wiesen die *entA*⁻-Stämme AN193/pDF3 und H1882/pDF3 bezüglich der Produktion von 2,3-*trans*-CHD **1** eine hohe Langzeitstabilität bei gleichzeitig hohen Produktbildungsraten auf. Langzeitstabilität der mikrobiellen Produzenten ist eine wichtige Voraussetzung für hohe Raum-Zeit-Ausbeuten bei kontinuierlicher Prozessführung. Die Bildungsraten (**1**) lagen noch 10 h nach Inkubationsbeginn bei 13 mg h⁻¹ g(BTM)⁻¹ für Stamm AN193/pDF3 und 12 mg h⁻¹ g(BTM)⁻¹ für Stamm H1882/pDF3. Dies entspricht 45 % der maximalen Bildungsrate nach 2 h. Erst nach 16 h halbierte sich in beiden Stämmen die Bildungsrate (**1**) ein zweites Mal.

Alle Versuche, intrazelluläre Konzentrationen von 2,3-*trans*-CHD **1** durch HPLC-Analyse des zellfreien Extraktes (Ultraschall-Aufschluss) der induzierten Zellen zu bestimmen, zeigten, dass die Konzentrationen immer unterhalb der analytischen Grenzkonzentration von 1 mg L⁻¹ (7 μM) lagen, selbst in Extrakten von hoch-konzentrierten Zellsuspensionen (Zelldichte > 21 g(BTM) L⁻¹). Chorismat (**3**), Isochorismat (**72**) oder 3,4-*trans*-CHD **2** wurden ebenfalls nicht nachgewiesen. Die auf die Zellmasse bezogene Konzentration von **1** im Zellaufschluss beträgt $\leq 45 \mu\text{g g(BTM)}^{-1}$ in allen Stämmen. Unter der Annahme, dass 70 % der unter günstigen Bedingungen kultivierten Zellen aus flüchtigen Bestandteilen bestehen^[152] und dass **1** unter den gegebenen Trocknungsbedingungen (24 h, 65 °C) weder flüchtig noch thermisch instabil ist,^[153] beträgt die intrazelluläre Konzentration von **1** in den untersuchten Stämmen maximal 14 mg L(Zellvolumen)⁻¹ (86 $\mu\text{mol L(Zellvolumen)}^{-1}$). Da die Konzentrationen im Kultivierungsüberstand höhere Konzentrationen erreichen, kann angenommen werden, dass die Methode des Ultraschallaufschluß zur Bestimmung der Konzentrationen von **1**, **2**, **3**, und **72** in der Zelle ungeeignet ist oder aber ein aktiver Transport bei der Exkretion der Metabolite gegen den Konzentrationsgradienten stattfindet. Intrazelluläre Konzentrationen der Metabolite **1**, **2**, **3**, und **72** in Prokaryonten sind nach aktuellem Literaturstand nicht beschrieben. Perchlorsäureaufschluss und anschließende

Silikonölzentrifugation wurde als Aufschlussmethode nicht getestet, da unter extrem sauren Bedingungen die Metabolite **1**, **2**, **3**, und **72** der Aromatisierung unterliegen.

Zur Produktion von **1** in Gramm-Mengen wurde der Stamm AN193/pDF3 in pH-geregelten Rührkesselreaktoren mit 5, 20 und 100 L Arbeitsvolumen in den Mineralsalzmedien (1,2 bzw. 3) kultiviert (siehe Tabelle 4.5). In Mineralsalzmedium 3 (Glucose als Kohlenstoffquelle) wird **1** reproduzierbar in Konzentrationen von 4.6 g L^{-1} (29 mM) erhalten. Maximale Produktbildungsrate von $58 \text{ mg h}^{-1} \text{ g(BTM)}^{-1}$ wurden 3 h nach Induktion erreicht.

Tabelle 4.5: Batch-Fermentationen des *E.-coli*-Stamms AN193/pDF1 im pH-geregelten Rührkesselreaktor bei 37 °C. Prozesszeit war jeweils 50 h. Induktion erfolgte mit 100 μM IPTG bei einer Zelldichte von 5 $\text{g(BTM)} \text{ L}^{-1}$ (Nr. 3, 4, 5) oder zu Beginn des Prozesses (Nr. 1, 2).

Nr.	Volumen [L]	pH [1]	Endzell-dichte [$\text{g(BTM)} \text{ L}^{-1}$]	Endkonzentration (1) [g L^{-1}] ([mM])	Mineralsalz-medium
1	5	7.0	2.3	0.6 (4)	1 ^[15]
2	5	7.0	1.9	0.9 (6)	2 ^[147]
3	5	7.0	10.5	3.6 ^a (23)	3 ^[153]
4	20	7.0	12.0	4.6 (29)	3 ^[153]
5	100	6.8	16.3	4.6 (29)	3 ^[153]

^a Fermentation wurde aus technischen Schwierigkeiten frühzeitig (30 h nach Induktion) abgebrochen.

Die Produktion von **1** konnte in der Regel (Tabelle 4.5, Nr. 1,2,4,5) über einen Zeitraum von 40 h nach Induktion aufrecht erhalten werden. Nach diesem Zeitraum ist auch durch Nachdosierung von IPTG-Lösung (100 μM) oder Erhöhung der Glucosekonzentration auf 10 g L^{-1} keine Erhöhung der Produktkonzentration (**1**) mehr zu erreichen.

In einem 20 L-Kultivierungsansatz (Tabelle 4.5, Nr. 4) wurden bei einer Zellkonzentration von $12 \text{ g(BTM)} \text{ L}^{-1}$ aus 690 g (3.48 mol) Glucose-Monohydrat 92 g (0.56 mol) 2,3 *trans*-CHD **1** erhalten. Dies entspricht einer molaren Ausbeute von 17 %. Bezogen auf die maximal erreichbare theoretische Ausbeute von 43 %^[49] durch Verbrauch von PEP im Eingangsbiosyntheseweg zu Chorismat (**3**), beträgt die relative molare Ausbeute 40 %. Die durchschnittliche Raumzeitausbeute (**1**) für den Produktionszeitraum von 40 h beträgt $115 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ($737 \mu\text{mol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$).

Um eine Ausfällung von anorganischen Salzen, insbesondere von $\text{Mg}(\text{NH}_4)\text{PO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$,^[154] zu vermeiden, erweist es sich als günstig, bei einem gesenkten pH-Wert von 6.8 zu kultivieren. Wachstumsraten und Produktbildungsrate werden dadurch nicht nachweisbar beeinflusst.

4.2.4 Zusammenfassung

Die *E.-coli*-Gene *entB* und *entC* wurden in *E.-coli*-Stämme mit und ohne *entA*-Deletion transformiert und erfolgreich exprimiert. Eine 30-fache Steigerung der entsprechenden Enzymaktivitäten EntB und EntC bewirkt eine Bildung von 2,3-*trans*-CHD **1** im

Kultivierungsmedium. Das gebildete **1** ist dabei nicht durch Chorismat (**3**) oder andere metabolische Intermediate verunreinigt. Kultivierung des *E.-coli*-Stamms AN193/pDF3 im pH-kontrollierten Rührkesselreaktor zeigte, dass 2,3-*trans*-CHD **1** aus Glucose reproduzierbar in Konzentrationen bis 4.6 g L⁻¹ (29 mM) erhalten wird. Maximale Produktbildungsraten von 58 mg h⁻¹ g(BTM)⁻¹ werden drei Stunden nach Induktion erreicht.

Die molare Ausbeute der Produktion aus Glucose beträgt 17 %, entsprechend 40 % der theoretisch maximal erreichbaren molaren Ausbeute.

4.3 Untersuchungen zur Isolierung von 2,3-*trans*-CHD

Es werden Methoden zur Isolierung des mikrobiell erzeugten 2,3-*trans*-CHD **1** von den anorganischen Salzen, den Proteinen und anderen organischen Komponenten des zellfreien Überstands untersucht.

Eine Schwierigkeit ist die Instabilität von **1** gegenüber extremen pH-Werten (stark saure oder basische Bedingungen) oder Wärmeeinwirkung. Unter sauren Bedingungen (pH 0.5, 80 °C) zerfällt **1** zu 23 % 2-Hydroxybenzoesäure (**123**) und 77 % 3-Hydroxybenzoesäure (**124**), während unter basischen Bedingungen (pH 14, 80 °C) Zerfall zu 97 % **124** und 3 % 2,3-Dihydroxybenzoesäure (**73**) zu beobachten ist (Identifizierung und Quantifizierung über HPLC). **1** ist in wässriger Lösung bei moderaten pH-Werten (pH-Intervall: 3 ≤ pH ≤ 11) und 23 °C sehr stabil, wie an den Zerfallskonstanten von unter 0.1 d⁻¹ zu erkennen ist (siehe Abbildung 4.8).

Bei pH < 3 und pH > 11 tritt schon bei niedrigen Temperaturen (30 °C) rasche Aromatisierung von **1** ein, so dass bei allen Isolierungsmethoden und chemischen Modifikationen die pH-Grenzen 3 ≤ pH ≤ 11 möglichst nicht überschritten werden dürfen.

Die Enolpyruvoylverbindung Chorismat (**3**) hat bei pH 7 und 23 °C eine Zerfallskonstante von 0.6 d⁻¹, zerfällt also signifikant schneller als **1**. Dies liegt daran, dass in **1** im Gegensatz zu **3** keine Zersetzungsreaktionen stattfinden können, welche nach konzertiertem Reaktionsmechanismus über pericyclische Übergangszustände verlaufen (siehe Schema 4.9).

Da an diesen sechs Elektronen beteiligt sind, verlaufen die Reaktionen über aromatische Systeme nach Hückel,^[155] sind also thermisch kontrolliert. Die beobachteten Zersetzungsreaktionen von **1** bei Temperaturen über 70 °C sollten über andere Mechanismen ablaufen.

Hohe Anforderungen an einen Isolierungsprozess stellt insbesondere auch die hohe Hydrophilie von **1**. Zahlreiche Medienbestandteile, insbesondere Proteine, anorganische Salze und Restglucose, besitzen ebenfalls hydrophilen Charakter und sind deshalb schwierig abzutrennen.

Es ist daher günstiger, die Carbonsäurefunktion von **1** als Diskriminierungssystem zur Trennung auszunutzen, beispielsweise die unterschiedlichen physikalischen Eigenschaften von **1** im protonierten (unter sauren Bedingungen) und nicht-protonierten Zustand (unter neutralen und basischen Bedingungen).

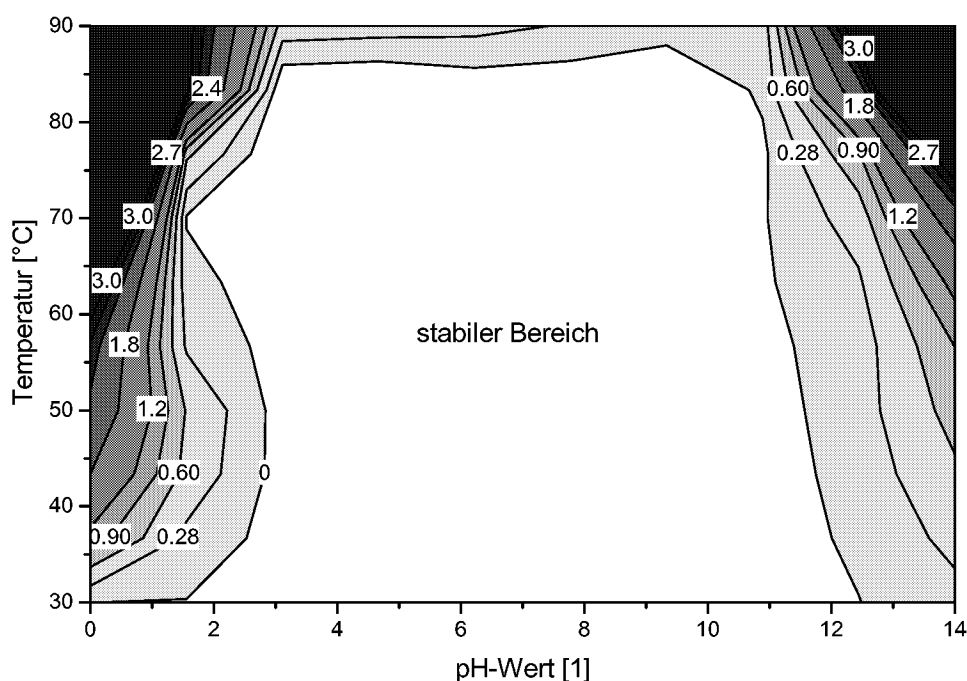
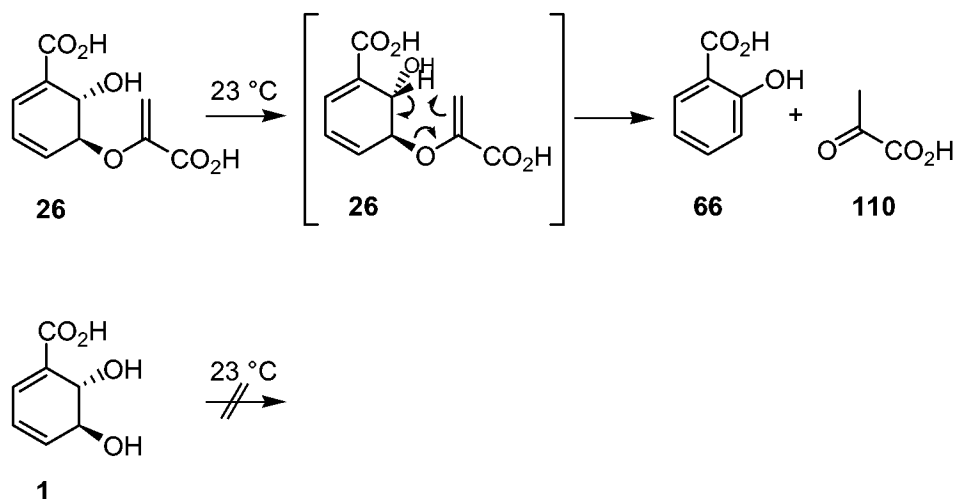


Abbildung 4.8: Zerfallskonstanten von **1** in wässriger Lösung in Abhängigkeit vom pH-Wert und der Temperatur (Zahlen im Diagramm in d^{-1}). Die Berechnung der Konturflächen basiert auf der Auswertung von fünf Messreihen konstanter Temperatur (30 °C bis 90 °C) zu je neun Messungen mit konstantem pH-Wert (pH 0 bis pH 14, mit 6 N NaOH bzw. 6 N HCl). Der Messzeitraum beträgt 24 h (HPLC-Analyse).



Schema 4.9: Im Gegensatz zu **1** sind bei **3** Zersetzungsreaktionen mit aromatischen Übergangszuständen möglich, die zu thermischer Instabilität führen.

In wässriger Lösung wurde der pK_S -Wert der Carbonsäurefunktion in **1** durch Messung der Pufferkapazität einer 44 mM **1** in Wasser bestimmt (siehe Abbildung 4.9). Ein lokales Maximum wird bei $\text{pH } 4.2 \pm 0.2$ (zwei Einzelmessungen) gefunden (pK_S -Wert von **1**).

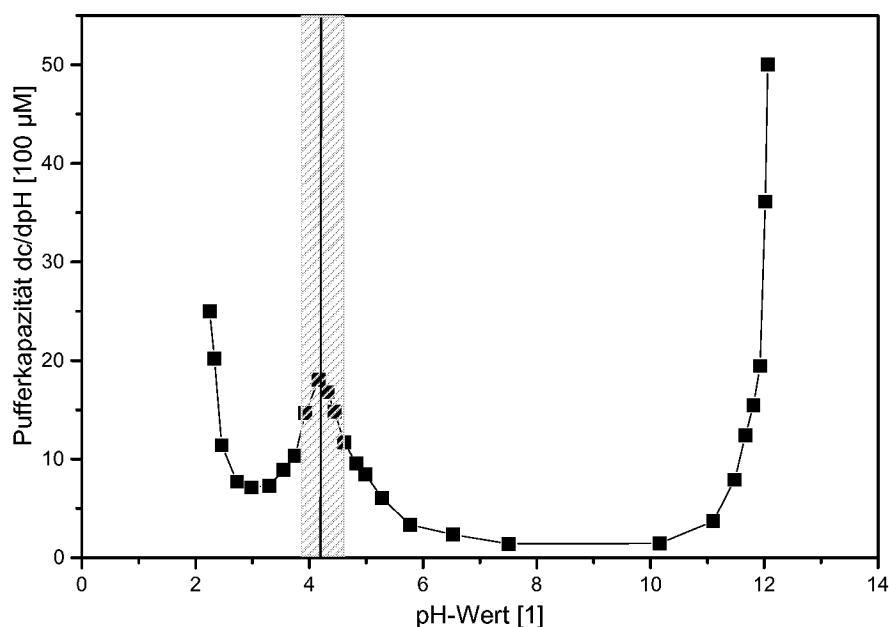


Abbildung 4.9: pH-Abhängigkeit der Pufferkapazität einer 44 mM wässrigen Lösung von **1**. Das lokale Maximum bei pH 4.2 gibt den pK_S -Wert von **1** an. Die Grenzen des Puffergebietes liegen zwischen pH 3.7 und pH 4.6 (straffierter Bereich).

Eine Isolierung der protonierten Form von **1** hat daher in pH-Bereichen von ≤ 4.2 zu erfolgen. Dabei darf jedoch pH 3 wegen der Instabilität von **1** nicht wesentlich unterschritten werden. Zur Isolierung von **1** werden drei Verfahren untersucht: Isolierung durch Extraktion, durch Reaktivextraktion und durch Ionentauschchromatographie.

4.3.1 Isolierung durch Extraktion

1 ist mit verschiedenen organischen Lösungsmitteln aus dem Konzentrat des auf pH 7 titrierten zellfreien Überstandes extrahierbar. Bei Bestimmung der maximalen Löslichkeiten (**1**) in unterschiedlichen Solventien wurde eine Abhängigkeit der Sättigungskonzentrationen (**1**) von der Polarität des Solvents nachgewiesen. Als Maß für die Polarität kann dabei der $\log P$ -Wert* herangezogen werden.^[156] Andere stoffspezifische Konstanten, die ebenfalls als Kriterium für die Polarität eines Lösungsmittels gebräuchlich sind (Dielektizitätskonstanten u. a.), sagen die Eigenschaften des Lösungsmittels unter Solvationsbedingungen weniger gut voraus. Lösungsmittel mit geringer Polarität ($\log P > 1$) zeigen eine Sättigungskonzentration (**1**) von unter 0.2 g L^{-1} (1.2 mM) (siehe Abbildung 4.10) und sind daher als Extraktionsphase wenig geeignet. Höhere Sättigungskonzentrationen bis 70 g L^{-1}

* Der $\log P$ -Wert eines Lösungsmittels ist definiert als der Logarithmus des Verteilungskoeffizienten in einem standardisierten Zwei-Phasen-Gemisch aus 1-Octanol und Wasser:

$$\log P = \log \frac{c(\text{Lösungsmittel})^{\text{1-Octanol}}}{c(\text{Lösungsmittel})^{\text{H}_2\text{O}}}.$$

(0.45 M) werden mit kurzkettigen Alkoholen und anderen polarerer Lösungsmitteln ($-1 < \log P < 1$) erreicht. Diese Lösungsmittel zeigen jedoch schon gute Mischbarkeit mit Wasser. Im zellfreien Überstand enthaltene polare Substanzen (Glucose, anorganische Salze) werden ebenfalls in der Extraktionsphase gefunden (quantitative HPLC, $^1\text{H-NMR}$). Wasser ist mit **1** bei 25 °C ohne Mischungslücke mischbar.*

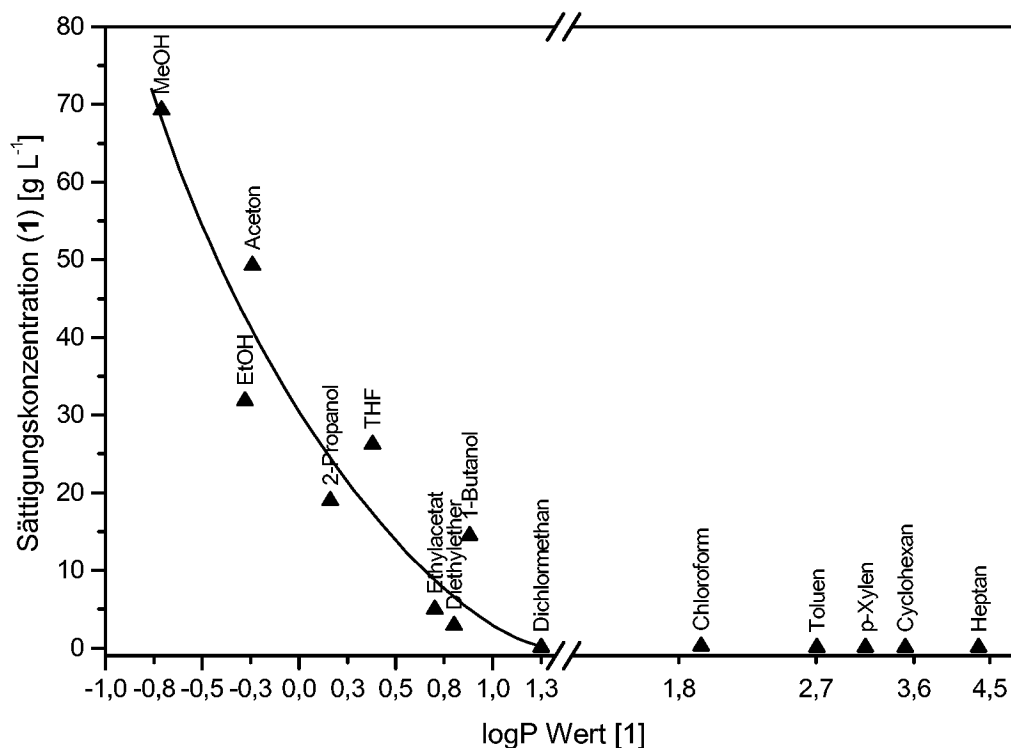


Abbildung 4.10: Sättigungskonzentration von **1** in verschiedenen organischen Lösungsmitteln in Abhängigkeit vom logP-Wert^[156] des Lösungsmittels bei 25 °C (HPLC-Analyse).^[157]

Bei Zugabe polarer Lösungsmittel (2-Propanol, 1-Butanol) zu dem stark aufkonzentrierten zellfreien Überstand fallen anorganische Salze aus und gleichzeitig nimmt die Konzentration von **1** im Überstand stark ab. **1** wird dabei vermutlich durch Okklusion- oder Adsorptionsprozesse an der ebenfalls polaren Oberfläche eines der Salze der Einwirkung des Lösungsmittels entzogen. Durch Spülen des ausgefallenen Feststoffs mit weiterem Lösungsmittel ist eine Extraktion und Rückgewinnung von **1** nicht möglich.

Bei den weiteren Extraktionen wurde daher darauf geachtet, dass ein Auskristallisieren von anorganischen Salzen nicht stattfindet.

Bestimmungen der Verteilungskoeffizienten (**1**) in einem Zwei-Phasen-System, bestehend aus wässriger Lösung und verschiedenen organischen Lösungsmitteln ergab, dass bei Lösungsmitteln niedriger Polarität ($\log P > 1$) bei neutralen pH-Werten eine Extraktion von 10 % **1**

* Ein Auskristallisieren von **1** aus wässriger Lösung gelingt selbst bei sehr hohen Konzentrationen von 1 g mL^{-1} (6.4 M) nicht. **1** ist stark hygroskopisch und kann nur durch Lyophilisation (10^{-3} mbar) nahezu wasserfrei erhalten werden.

nicht überschritten wurde. Durch weiteres Herabsetzen des pH-Wertes der wässrigen Phase konnte die Extraktionsleistung des Systems nicht signifikant erhöht werden. Mit Diethylether wurde erst bei pH 1 ein Verteilungskoeffizient der Extraktion (**1**) von 0.13 erreicht (siehe Abbildung 4.11).

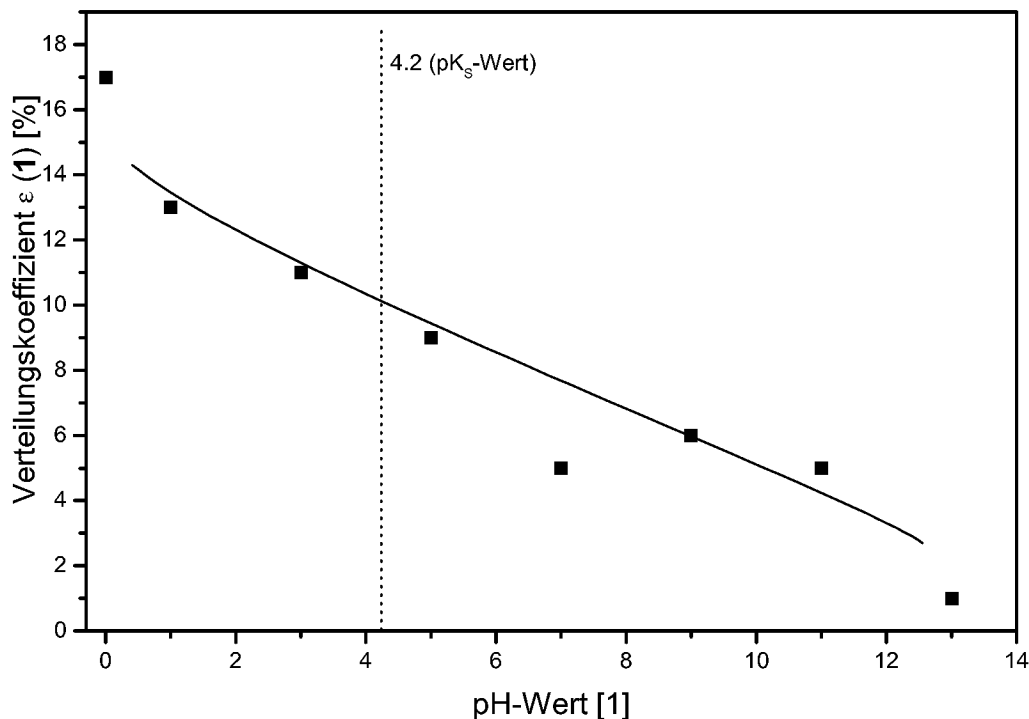


Abbildung 4.11: Einfluss des pH-Wertes auf den Verteilungskoeffizienten ε der Extraktion von **1** mit Diethylether aus wässriger Lösung im Bereich $0 \leq \text{pH} \leq 13$.

Bei einer weiteren Absenkung des pH-Wertes weist **1** bereits starke Aromatisierungstendenz auf. Eine quantitative Extraktion von **1** ist deshalb mit diesen Lösungsmitteln nur durch zeitaufwendige kontinuierliche Trennprozesse möglich. **1** wurde auch analog zur Isolation von *trans*-4,5-Dihydroxycyclohex-1-en-1-carbonsäure^[158] durch Rotationsperforation des auf pH 3 titrierten zellfreien Überstandes unter Verwendung von Dichlormethan über drei Tage in 40 % Ausbeute erhalten.

Wesentlich bessere Extraktionsleistungen werden mit Lösungsmitteln mittlerer Polarität und Protizität erreicht, bei denen noch keine unbegrenzte Mischbarkeit mit Wasser vorliegt. **1** wird durch 1-Butanol ($\log P$ -Wert = 0.88) aus dem zellfreien Überstand bei pH 3 zu 30 % extrahiert (bei pH 2 zu 48 %). Dieses System kann auch zur präparativen Isolierung von **1** genutzt werden. Durch dreifache Extraktion des auf pH 2 titrierten zellfreien Überstandes wird **1** mit 85 % Ausbeute (quantitative HPLC) extrahiert (siehe Abbildung 4.12).

Der Gewichtsanteil von **1** in den vereinigten Extraktphasen beträgt nach Trocknung 61 % (quantitative HPLC). Restliche Anteile sind ausnahmslos anorganische Salze (HPLC, ^1H -NMR, keine anderen Produkte).

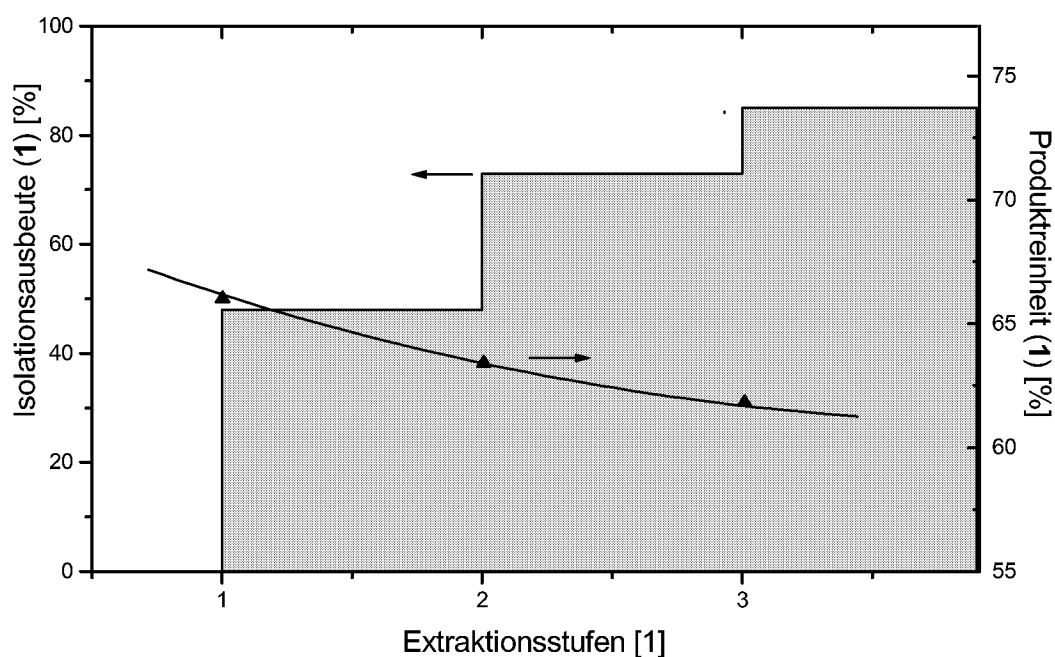


Abbildung 4.12: Isolationsausbeute (1) und Produktreinheit (1) (▲) der getrockneten vereinigten Phasen einer stufenweisen Isolierung von 3.9 g (25 mmol) **1** durch dreifache Extraktion von 200 mL Konzentrat des zellfreien Überstandes (23 g L^{-1} (0.5 M) **1**) mit je 200 mL 1-Butanol bei pH 2.

Eine Abtrennung von den Restanteilen anorganischer Salze ist durch einen säulenchromatographischen Reinigungsschritt an Kieselgel möglich. Die isolierten Ausbeuten (**1**) reduzieren sich dadurch auf 62 %, bezogen auf die gesamte Isolation, unter gleichzeitiger Verbesserung der Reinheit (**1**) auf 95 % (quantitative HPLC).

4.3.2 Isolierung durch Reaktivextraktion

Die Extraktionsleistung organischer Lösungsmittel zur Isolierung von **1** kann durch Zugabe von Löslichkeitsvermittlern gesteigert werden. Prinzip der Reaktivextraktion ist es, die zu extrahierende Substanz an einen geladenen Extraktionsmediator (Carrier) zu binden und eine Extraktion des entstehenden insgesamt ungeladenen Ionenpaares zu ermöglichen.^[159] Durch Verwendung von unpolaren Carriern ist dabei auch die Extraktion von hydrophilen, ionischen Substanzen durch organische Lösungsmittel zu erreichen.

In pH-Bereichen, in denen **1** durch Protonierung der Alkohol oder Alkenfunktion oder zweifache Protonierung der Carboxylat-Funktion (alle $pK_s \ll 0$) kationisch vorliegen sollte, ist **1** instabil (Zerfallskonstanten $\gg 0.6 \text{ d}^{-1}$). Aus diesem Grund wurde auf die Untersuchung von Isolierungstechniken verzichtet, die auf Anbindung an anionische Carrier aufbauen, wie sie beispielsweise zur Isolierung der ähnlich polaren Substanzen Lysin^[160] und Phenylalanin^[161] sowie anderer Aminosäuren^[161b] eingesetzt werden. Analog den Arbeiten zur Aufreinigung von Cephalosporin- und β -Lactam-Antibiotika^[162] und von Aminosäuren^[163] konnte das Anion von **1** jedoch bereits bei neutralen pH-Werten an kationische Extraktionsmediatoren reversibel gebunden werden. Von den untersuchten Carriern Trioctylmethylammoniumchlorid

(TOMAC, **130**) und den alkylierten Aminen Dehyquart F9030 und Dehyquart F75 zeigte nur **130** unbegrenzte Löslichkeit in zehn verschiedenen Lösungsmitteln ($3 < \log P < 4.7$) und hohe Affinität zu **1**. Eine 30 %ige Extraktion von **1** wird unter Verwendung von 1-Octanol/TOMAC **130** (9:1) beobachtet (siehe Abbildung 4.13).

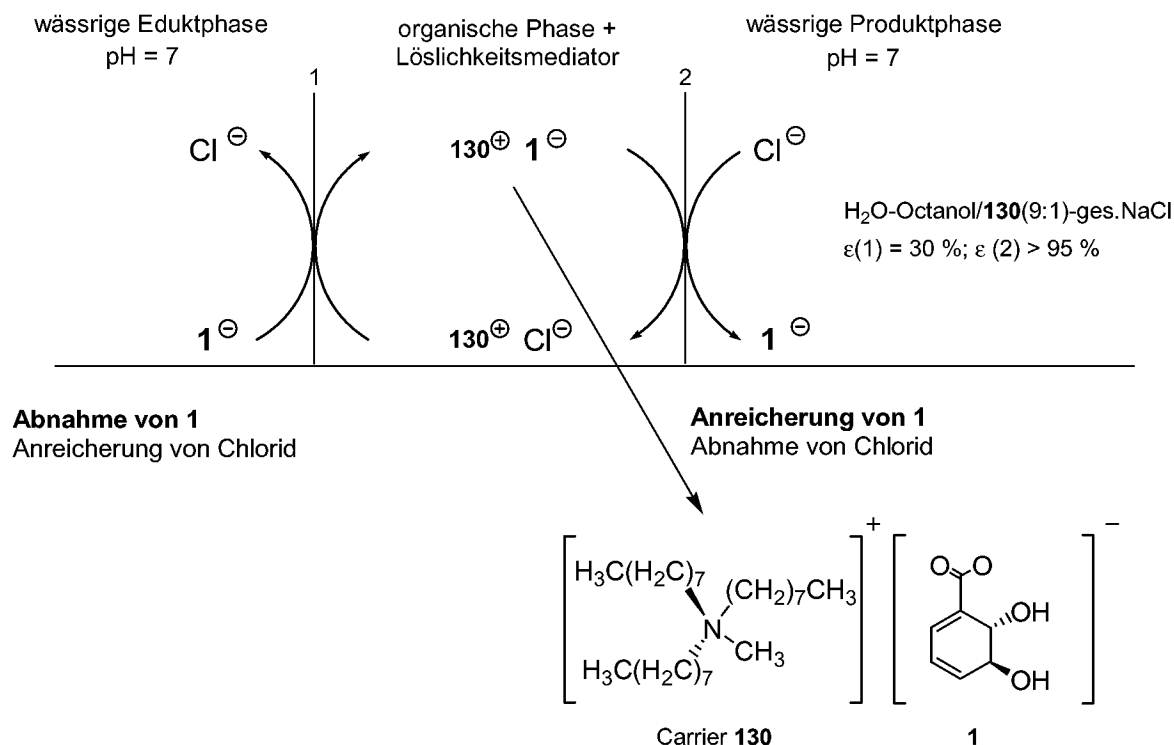


Abbildung 4.13: Reaktivextraktion von **1** mit dem Extraktionsmediator TOMAC **130**.

Bei pH 7 wurde dabei eine proportionale Abhängigkeit der Verteilungskoeffizienten der Extraktion ϵ vom Gehalt (**130**) im Lösungsmittel gefunden. Der Anstieg der Extraktionsleistung ist dabei weitgehend unabhängig von der Polarität des Lösungsmittels (siehe Abbildung 4.14).

Eine Extraktion von **1** wurde mit 1-Octanol/TOMAC **130** (9:1) bei pH 7 mit 30 % Ausbeute durchgeführt. In pH-Bereichen, in denen **1** in protonierter Form vorliegt ($pH < 4.2$) werden signifikant niedrigere Verteilungskoeffizienten der Extraktion ϵ gefunden. ϵ beträgt für 1-Octanol/TOMAC **130** (9:1) bei pH 2 nur 17 %. Durch Erhöhung des pH-Wertes ($pH > 7$) werden ebenfalls keine höheren Extraktionsleistungen erreicht.

Die untersuchten Bedingungen der Extraktion von **1** aus zellfreiem Überstand (4.6 g L^{-1} (29 mM) **1**) sind weit entfernt von Bedingungen, bei denen mit maximaler Beladung von **1** an den Extraktionsmediator **130** gerechnet werden kann. Bei einem Carriergehalt (**130**) von 10 Vol.-% beträgt die theoretisch erreichbare Extraktion von **1** bei äquimolarer Anbindung

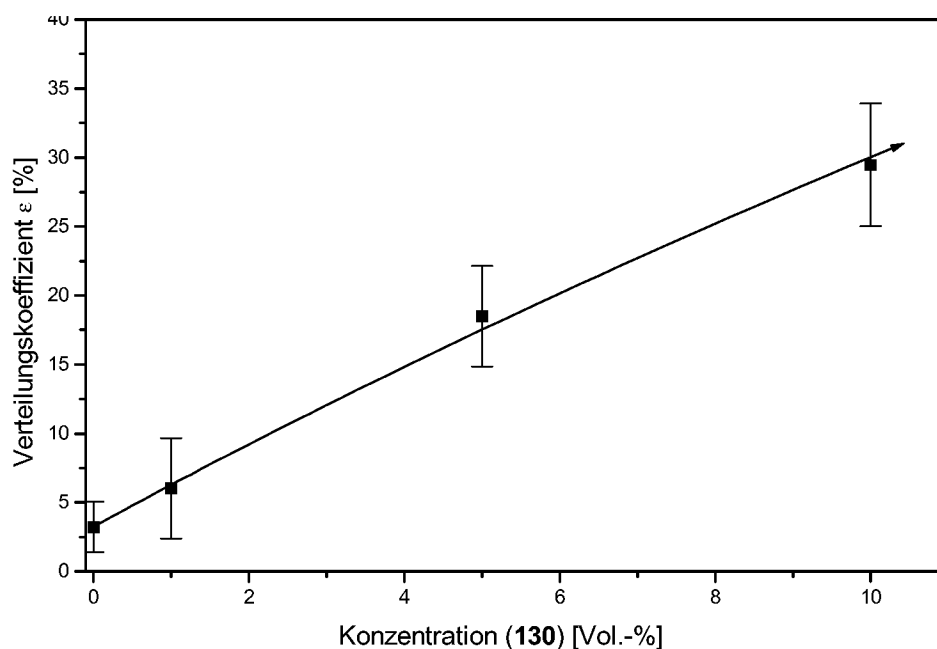


Abbildung 4.14: Einfluss der Konzentration des Löslichkeitsvermittlers TOMAC **130** in org. Lösungsmitteln auf den Verteilungskoeffizienten der Extraktion ϵ von **1** aus wässriger Phase bei pH 7 und 23 °C. Aufgetragen sind der Mittelwert und die Standardabweichungen aus Messungen mit zehn verschiedenen unpolaren organischen Lösungsmitteln (logP-Werte zwischen 3.0 und 4.7).

$3.86 \text{ g mL(Extraktorphase)}^{-1}$ ($25 \text{ mmol mL(Extraktorphase)}^{-1}$).^{*} Die tatsächlichen Beladungen (**1**) liegen also rund drei Zehnerpotenzen unter der maximal möglichen Beladung. Sinnvoller ist daher unter den untersuchten Bedingungen mit Modellen zu arbeiten, die dem Nernst-Verteilungssatz gerecht werden.

Nach der Reaktivextraktion wurde **1** mit verschiedenen Mineralsalzlösungen aus der organischen Phase nahezu quantitativ rückextrahiert (siehe Abbildung 4.15). Da die Rückextraktion ausschließlich durch den Anionenkonzentrationsgradienten bewirkt wird, wurde **1** unter milden Bedingungen und ohne Verluste durch Aromatisierung isoliert. Während bei reinem Wasser der Verteilungskoeffizient der Rückextraktion ϵ nur 8 % beträgt, werden bei Verwendung von ges. NaCl-Lösung (pH 7) oder ges. NaHCO₃-Lösung (pH 8.5) Verteilungskoeffizienten ϵ von 98 % erreicht. Unter alkalischen Bedingungen (Na₂CO₃-Lösung, pH 11.5) oder sauren Bedingungen (1 N HCl-Lösung, pH = 0; 6 N HCl-Lösung, pH < 0) sind die Verteilungskoeffizienten der Rückextraktion ϵ niedriger, da unter diesen Bedingungen bereits Aromatisierungsreaktionen einsetzen.

^{*} Bei äquimolarer Anbindung ergibt sich aus der Dichte ρ von **130**, dem Volumenanteil VA von **130** in der organischen Phase, sowie den Molekulargewichten M für **130** und **1** die maximale Konzentration $c(\mathbf{1})$ in der Extraktorphase aus der Gleichung:

$$c(\mathbf{1}) = \frac{\rho(\mathbf{130})}{M(\mathbf{130})} \cdot VA(\mathbf{130}) \cdot M(\mathbf{1}) .$$

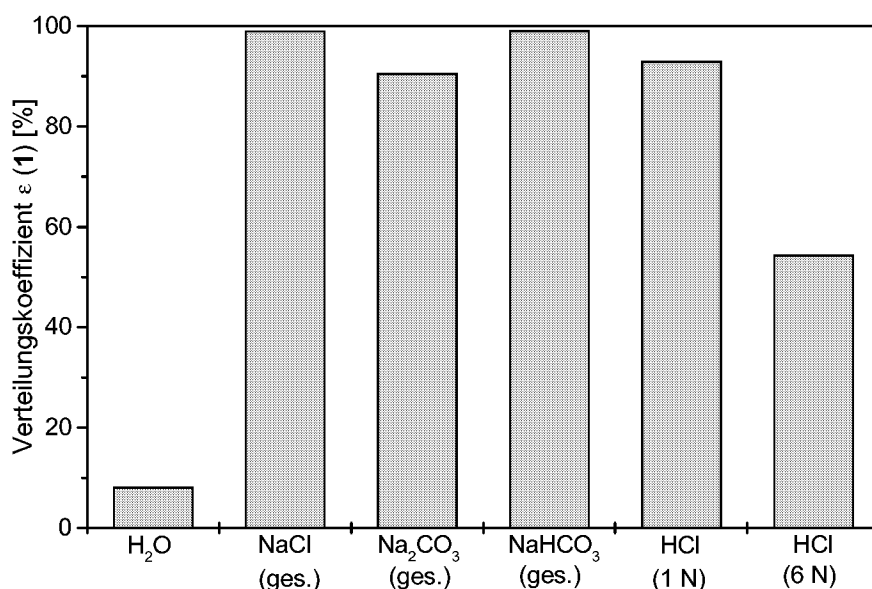


Abbildung 4.15: Verteilungskoeffizienten ϵ der Rückextraktion von **1** aus 1-Octanol/TOMAC **130** (9:1) bei 23 °C (HPLC-Analyse).

Der Extraktionsmediator **130** in der organischen Phase wird durch die Beladung mit anorganischen Anionen gleichzeitig regeneriert. Nach der Regeneration wurde die organische Phase (1-Octanol/TOMAC **130** (9:1), regeneriert mit ges. NaCl-Lösung) ein weiteres Mal zur Extraktion von **1** aus dem zellfreien Überstand verwendet, wobei der Verteilungskoeffizient ϵ wie bei der ersten Extraktion 30 % beträgt. Es findet also keine messbare irreversible Bindung von **1** an **130** unter Verbrauch des Carriers in der organischen Phase statt. **130** wurde auch nicht in einer der wässrigen Phasen (extrahierter Kultivierungsüberstand, wässrige Rückextraktionsphase) nachgewiesen (¹H-NMR).

Prinzipiell ist eine technische Aufreinigung von **1** somit auch durch einen Zwei-Kreislauf-Prozess denkbar, wobei ein Anionenkonzentrationsgradienten als treibende Kraft zum Transport von **1** in die Produktphase verwendet werden kann. **130** zeigte für den Stamm AN193 hohe molekulare Toxizität ($c_{\text{tox}}(\mathbf{130}) \ll 500 \text{ mg L}^{-1}$ (1.2 mM)), so dass dies bei einem in den Produktionsprozess integrierten Isolationsprozess durch Reaktivextraktion zu berücksichtigen wäre. Solventien mit einer Polarität von $\log P > 2.8 \pm 0.2$ sind für den Stamm AN193 bei pH 7 bis zur jeweiligen Sättigungskonzentration in Wasser unbegrenzt biokompatibel.

Die Produktphase ist frei von Glucose, organische Säuren und Proteine und enthält außer den anorganischen Salzen in wässriger Lösung ausschließlich **1** (¹H-NMR, kein anderes Produkt). Eine Separation von der Salzfracht und dem Wasser ist durch eine weitere Extraktion mit 1-Butanol bei pH 2, wie in Kapitel 4.3.1 beschrieben, möglich. **1** wird nach destillativem Entfernen des Lösungsmittels mit 90 % Reinheit erhalten (quantitative HPLC-Analyse). Alternativ kann **1** durch Aufkonzentrieren i. Vak. und chromatographische Trennung an Kieselgel in ähnlicher Reinheit isoliert werden.

4.3.3 Isolierung durch Ionentauschchromatographie

Polystyrolharze mit anionenselektiver Oberfläche (Aminogruppen, quartäre Ammoniumsalzderivate) binden *trans*-CHD mit hoher Selektivität, wie bereits in anderen Arbeiten für die Isolierung von **1**^[15,164] und **2**^[15,35,45,165] in analytischen Mengen gezeigt. Bei Adsorptionsversuchen mit dem Anionentauscherharz DOWEX 1×8 (Cl⁻) zeigte sich, dass **1** bei pH 7 und 23 °C bis zu einer dynamischen Kapazität von 16 g L⁻¹ sedimentiertem Harz gebunden wird. Gleichzeitige Anbindung von Proteinen oder anderen Nebenprodukten der mikrobiellen Produktion wurde nicht beobachtet (Proteinquantifizierung, HPLC). Eine quantitative Desorption erfolgt dagegen unter sauren Bedingungen bei pH < 3. Grund hierfür ist, dass **1** in protonierter Form nicht an die kationischen Bindungsstellen des Harzes bindet. Unter Bedingungen hoher Anionenkonzentrationen in konz. NaCl-Lösung bindet **1** nicht nachweisbar an das Harz. Die Bindungseigenschaften von **1** in unterschiedlichen pH-Umgebungen können dazu genutzt werden, **1** von allen anderen Bestandteilen zu trennen. Zur präparativen Reingewinnung von **1** wurde ein Isolierungsprozess mit 2 kg DOWEX 1×8 (Cl⁻)-Harz entwickelt (siehe Abbildung 4.16).

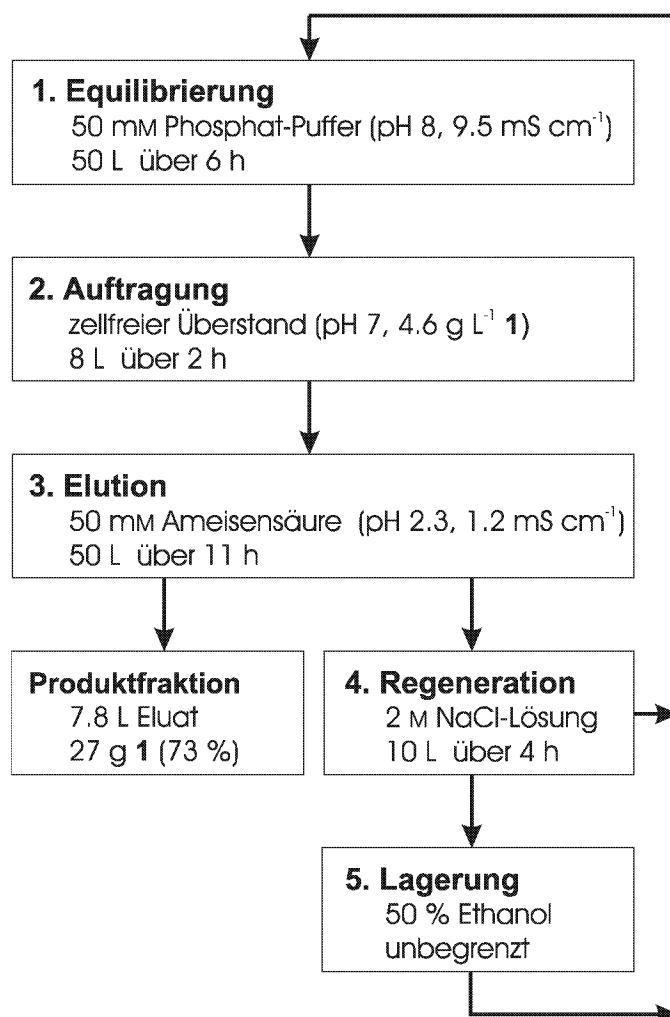


Abbildung 4.16: Verfahren zur Aufreinigung von **1** unter Verwendung von Anionentauscherharz (2 kg).

Das Harz wird in Phosphat-Puffer equilibriert (1). Die Anbindung (2) von 36.8 g (0.24 mol) **1** aus 8 L zellfreiem Überstand (4.6 g L^{-1} (29 mM) **1**) an 2 kg Harz bestätigten die in Adsorptionsversuchen ermittelten dynamischen Beladungskapazitäten. Elution von **1** (3) erfolgt direkt (ohne Waschcyclus) mit verdünnter Ameisensäure bei pH 2.8. Nicht-bindende anorganische Salze, Proteine und sonstige organische Medienbestandteile werden sofort eluiert. Bei pH 2.8 (Eluatbedingungen) werden 27 g (0.17 mol) **1** in 7.8 L wässriger Fraktion eluiert (quantitative HPLC-Analyse). Aus 7.8 L Eluat werden nach Aufkonzentrieren i. Vak. und Lyophilisation (10^{-3} mbar, 3 d) 27 g (0.17 mol) **1** rein erhalten. Die Reinheit (**1**) beträgt 96 % (quantitative HPLC-Analyse, ^1H -NMR, ^{13}C -NMR) mit geringen Spuren Wasser und Ameisensäure (siehe Abbildung 4.17). Aromatisierung tritt unter den Lyophilisationsbedingungen nicht ein. Durch Behandlung mit 2 M NaCl-Lösung wird das Harz für den nächsten Isolierungszyklus regeneriert (4). Zeitlich nicht begrenzte Lagerung des Harzes (5) erfolgt in Wasser/Ethanol (1:1).

Die Verwendung von 50 mM Ameisensäurelösung erwies sich als vorteilhaft, da diese durch Lyophilisation vollständig entfernt wird. Aromatisierung von **1** tritt unter den Lyophilisationsbedingungen nicht ein (^1H -NMR, HPLC-Analyse). Die Ausbeute, bezogen auf den gesamten Isolierungsschritt, beträgt 73 %.

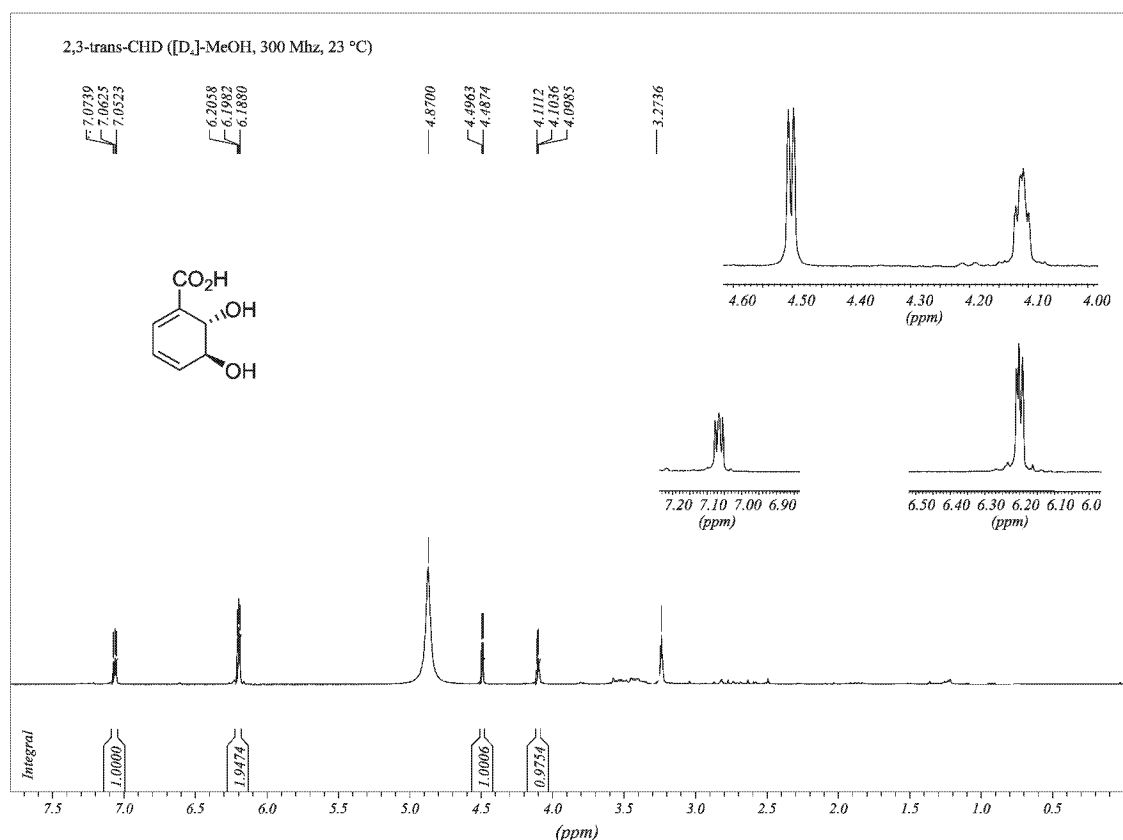


Abbildung 4.17A: ^1H -NMR-Spektrum von **1** nach Isolierung durch Ionentauschchromatographie. Messung einer 25 mM Lösung von **1** in $[\text{D}_4]\text{-MeOH}$.

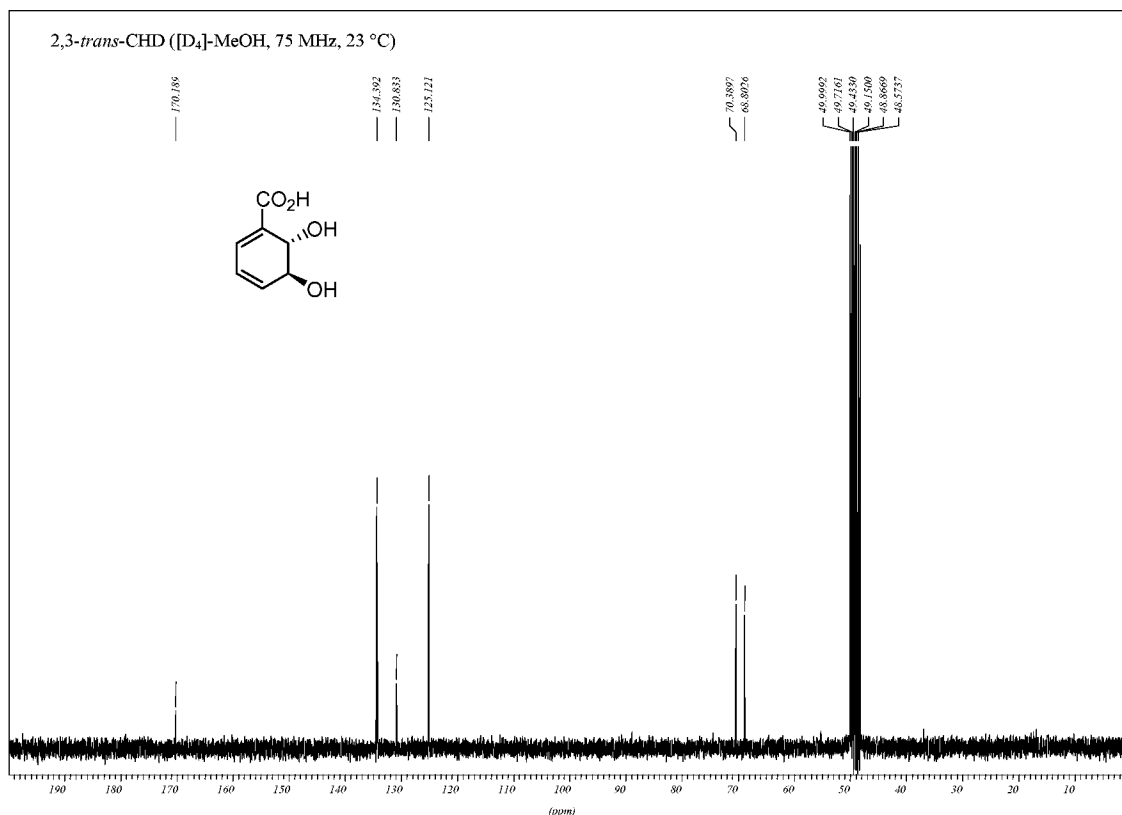


Abbildung 4.17B: ^{13}C -NMR-Spektrum von **1** nach Isolierung durch Ionentauschchromatographie. Messung einer 25 mM Lösung von **1** in [D₄]-MeOH.

Zum Verbleib der restlichen 27 % von **1** können keine Aussagen gemacht werden. **1** wurde in keiner der verworfenen Eluatfraktionen oder im Regenerierungseluat in nachweisbaren Mengen gefunden. Es kann gegebenenfalls von einer Kombination aus Verlust durch Aromatisierungsprozessen auf der festen Phase sowie Verdünnungseffekten ausgegangen werden.

4.3.4 Zusammenfassung

2,3-*trans*-CHD **1** zeigt, im Gegensatz zu Chorismat (**3**) und Isochorismat (**72**), gute Stabilität in moderaten pH-Bereichen ($3 \leq \text{pH} \leq 11$) und Temperaturen unter 70 °C. Durch Ausnutzung der unterschiedlichen physikalischen Eigenschaften der protonierten und nichtprotonierten Carbonsäurefunktion von **1** in pH-Bereichen unter und oberhalb des pK_s -Wertes 4.2 wird eine selektive Isolierung aus dem zellfreien Kultivierungsüberstand erreicht. Es wurden drei Isolierungsverfahren untersucht.

1. Eine einfache und effiziente Abtrennung von **1** ist durch mehrfache Extraktion mit polaren Lösungsmitteln möglich. **1** wird durch dreifache Extraktion des auf pH 2 angesäuerten zellfreien Überstandes mit 1-Butanol mit einer Ausbeute von 85 % isoliert. Nach säulenchromatographischer Reinigung wird **1** hochrein ($> 95\%$) mit 70 % Ausbeute erhalten.
2. Durch Verwendung von Reaktivextraktion werden die Extraktionskoeffizienten von organischen Lösungsmitteln signifikant gesteigert. Durch Ionenpaarbildung von **1** mit dem kationischen Löslichkeitsvermittler TOMAC **130** entstehen ungeladene Species, deren Hydrophilie geringer als die anionische Form von **1** ist. **1** ist durch 1-Octanol/TOMAC **130** (9:1) bei pH 7 mit 30 % Ausbeute extrahierbar. Rückextraktion erfolgt mit NaCl-Lösung mit 98 % Ausbeute. Da die Reaktivextraktion hochselektiv ist, liegt **1** in der Produktphase frei von organischen Nebenprodukten vor, muss jedoch durch weitere Stufen von der Salzfracht getrennt werden. Dies ist durch Säulenchromatographie oder Extraktion mit 1-Butanol möglich.
3. **1** bindet selektiv über die Carbonsäurefunktion bei pH 7 an das Ionentauscherharz DOWEX 1x8 (Cl^-). Die dynamische Adsorptionskapazität beträgt für **1** 16 g L⁻¹ sedimentiertem Harz. Elution erfolgt unter sauren Bedingungen (pH 2.8) durch Protonierung der Carbonsäuregruppe, wobei Aromatisierung von **1** nicht auftritt. Unter Verwendung von 2 kg DOWEX-Harz werden 27 g (0.17 mol) **1** in einem einzigen Aufreinigungsschritt mit $> 95\%$ Reinheit und 73 % Ausbeute erhalten.

Methode 3 (Ionentauscher) hat sich zur Isolierung weniger Dekagramm **1** im Labormassstab in Bezug auf Effizienz (Zeit, Ausbeute) und Produktreinheit als Vorzugsvariante erwiesen. Methode 1 kann als kostengünstige Alternative zur Isolierung von **1** in Gramm-Mengen (3.9 g (25 mmol) **1**) angesehen werden. Methode 2 ist durch den höheren Aufwand mehrstufiger Extraktionssequenzen nicht für den Einsatz im Labor geeignet, könnte jedoch eine Alternative zur Methode 3 darstellen, wenn eine kontinuierliche Prozessführung der Isolierung (**1**) vorteilhaft ist.

4.4 Mikrobieller Zugang zu 3,4-*trans*-CHD

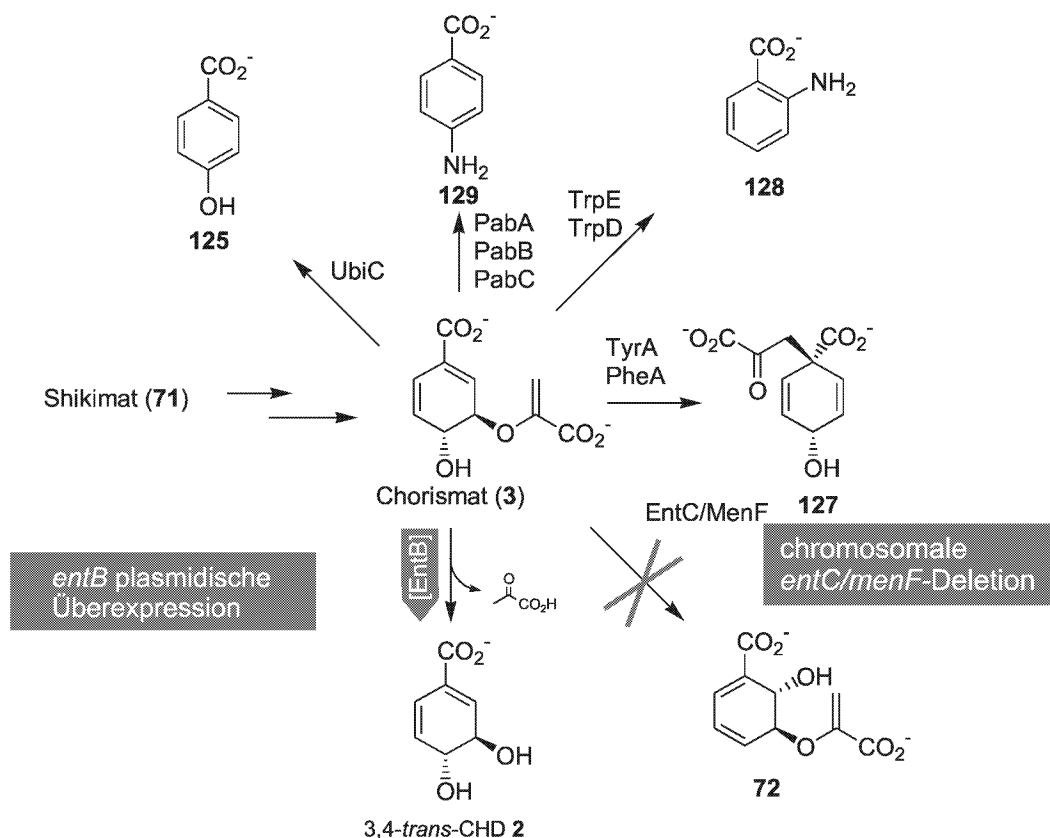
Zur Herstellung von mikrobiellen Produzenten von 3,4-*trans*-CHD **2** werden verschiedene strategische Ansätze untersucht (Schema 4.10 und 4.11).

Durch plasmidische Überexpression von *entB* soll der metabolische Fluss von Chorismat (**3**) zu 3,4-*trans*-CHD **2** verstärkt werden.

Die alleinige Überproduktion von EntB in *E.-coli*-Stämmen mit *entA*⁻-Deletion (AN193/pDF1, H1882/pDF1) sowie den Wild- und Klonierstämmen (DH5 α /pDF1, W3110/pDF1) war zur Bildung von **2** nicht ausreichend. Unter den zur Produktion von 2,3-*trans*-CHD **1** mit Stamm AN193/pDF3 optimierten Bedingungen (pH 7, 37 °C, OD 4) in Mineralsalzmedium 3 wurde **2** im Überstand keines der untersuchten Stämme (AN193/pDF1, H1882/pDF1, DH5 α /pDF1, W3110/pDF1) nachgewiesen. Auch eine Erhöhung der Induktorkonzentrationen bis 500 μ M (IPTG) und 24-stündige Kultivierung führen nicht zu einer nachweisbaren Bildung von **2**.

Es wurde deshalb versucht, den metabolischen Abfluss von Chorismat (**3**) in den Enterobactin-Biosyntheseweg und die aromatischen Aminosäure-, sowie Folat-Biosynthesewege zu verringern und damit **3** in erhöhter Konzentration für die Katalyse durch überproduziertes EntB zu Verfügung zu stellen.

Im zellfreien Exktrakt des *E.-coli*-Stamms PBB8 (*entC*⁻/*menF*⁻-Mutationen) wird keine Isochorismatsynthase-Aktivität ($< 0.25 \text{ mU mg(Protein)}^{-1}$) nachgewiesen. Dieser Stamm ist metabolisch auf dem Biosyntheseweg zum Enterobactin (**4**) und zu den Menachinonen blockiert (Strategie I, Schema 4.10). Nach Transformation mit pDF1 (*entB*) ist im zellfreien Extrakt des resultierenden Stamms PBB8/pDF1 eine auf die Chorismat-Umsetzung bezogene EntB-Aktivität bis zu 40 mU mg(Protein)⁻¹ (100 μ M IPTG) nachweisbar. In nicht-transformierten Zellen ist unter gleichen Bedingungen keine EntB-Aktivität ($< 0.25 \text{ mU mg(Protein)}^{-1}$) nachweisbar. Mit Stamm PBB8/pDF1 wurde eine Bildung von **2** im Kulturmedium nicht erreicht. Ebenso konnte **2** nicht im zellfreien Extrakt nachgewiesen werden ($< 90 \mu\text{mol L(Zellvolumen)}^{-1}$). Isochorismat (**72**), 2,3-*trans*-CHD **1** und Chorismat (**3**) wurden ebenfalls weder im Kultivierungsüberstand noch im Zellextrakt detektiert. Grund hierfür ist, dass durch eine alleinige *menF*⁻/*entC*⁻-Deletion der intrazelluläre Chorismat (**3**)-Pool nicht ausreichend erhöht werden kann. Die gewählte Strategie führt vermutlich deshalb nicht zum Ziel, weil Isochorismatase *EntB* im natürlichen *E.-coli*-Metabolismus die Pyruvatabspaltung von Isochorismat (**72**) zu 2,3-*trans*-CHD **1** katalysiert und die Katalyse von **3** zu **2** physiologisch keine bekannte Bedeutung hat. So weist EntB für die Pyruvat abspaltende Katalysereaktion von **3** einen K_m -Wert von $\geq 37\,000 \mu\text{M}$ ($k_{\text{cat}}/K_m \leq 0.030 \mu\text{M}^{-1} \text{ min}^{-1}$) auf, während im Fall der Pyruvatabspaltung von **72** ein K_m -Wert von 14 μM ($k_{\text{cat}}/K_m 40 \mu\text{M}^{-1} \text{ min}^{-1}$) auf eine signifikant höhere Substrataffinität hinweist.^[166]

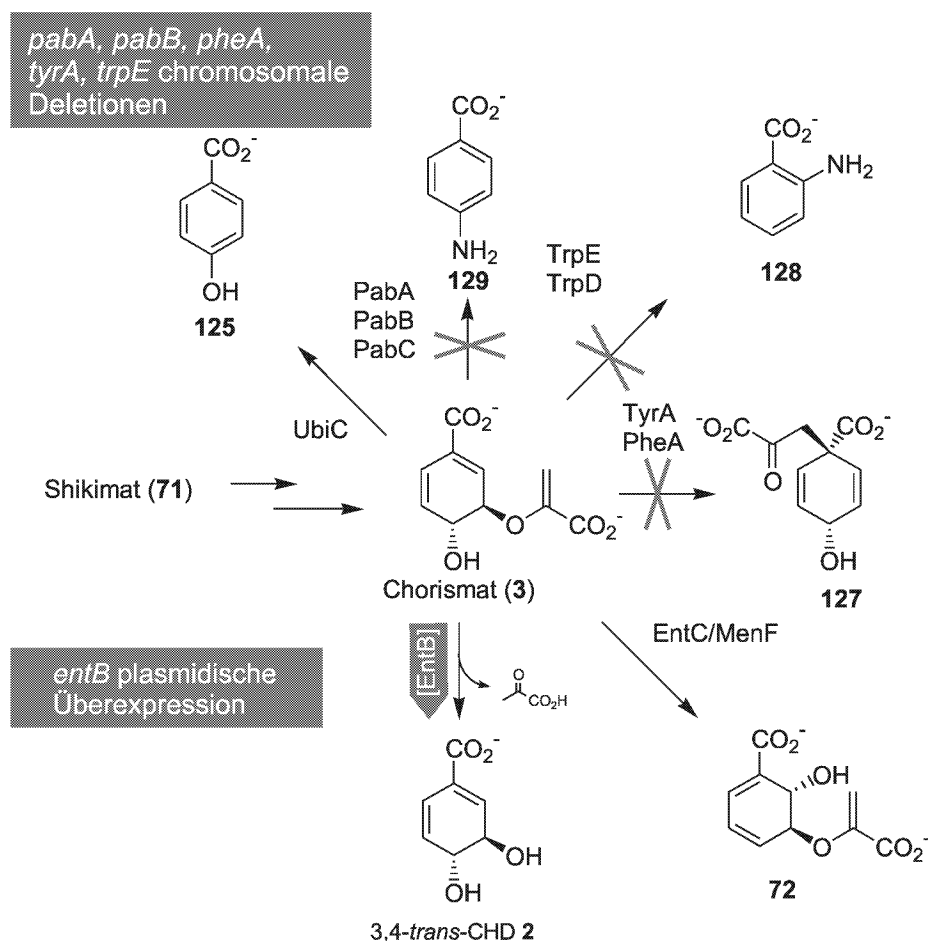


Schema 4.10: Strategie I zur Herstellung mikrobieller Produzenten von **2**. Der metabolische Fluss von **3** zu **2** soll durch plasmidische Überproduktion von EntB erreicht werden. Durch Verwendung von *entC*⁻/*MenF*⁻-Mutanten soll die Bildung von Isochorismat (**72**) und dessen Folgemetabolite verhindert werden. Die Biosynthesewege über 2-Aminobenzoessäure (**128**) und Prephenat (**127**) zu den aromatischen Aminosäuren, über 4-Aminobenzoessäure (**129**) zu den Folaten und über 4-Hydroxybenzoessäure (**125**) zu den Ubichinonen sind dabei weiter offen.

Zur weiteren Erhöhung des Chorismat-Pools für die EntB-Katalyse wurde *E.-coli*-Stamm BN117^[167] mit pDF1 transformiert. Der Stamm BN117 weist an den Eingangsbiosynthesewegen zu den drei aromatischen Aminosäuren Tyrosin, Phenylalanin und Tryptophan und zur Folsäure Defektmutationen auf (*pabA*⁻, *pabB*⁻, *pheA*⁻, *tyrA*⁻, *trpE*⁻) (Strategie II, Schema 4.11).

Extrakte von unter induktiven Bedingungen gewachsenen Zellen (100 μ M IPTG, LB-Medium) zeigten ähnlich hohe Enzymaktivitäten von EntB (80 mU mg(Protein)⁻¹, **3** als Substrat) und EntC (5 mU mg(Protein)⁻¹) wie Zellextrakte der Stämme W3110/pDF1, AN193/pDF1, H1882/pDF1 und DH5 α /pDF1. Trotz Addition aller Substanzen, für die der Stamm BN117 bekannte Auxotrophien aufweist (Tryptophan, Tyrosin, Phenylalanin, Prolin, Arginin, Histidin, 4-Aminobenzoessäure (**129**)), wurde ein Wachstum in Mineralsalzmedium 3 nicht erreicht. Nach Resuspension von aus LB-Medium gewachsenen Zellen in Mineralsalzmedium 3 ohne Aminosäurezugabe (100 μ M IPTG) wird jedoch eine Exkretion von **2** mit einer maximalen Produktionsleistung (2 h nach Induktion) von 19 mg L⁻¹ g(BTM)⁻¹ festgestellt. Bei Zelldichten von 3 g(BTM) L⁻¹ wurde mit diesem Stamm nach 36 h Inkubation

2 in Konzentrationen bis zu 790 mg L^{-1} (5.1 mM) produziert. Es kann angenommen werden, dass durch das Auffinden von weiteren Auxotrophien und entsprechender Supplementierung auch ein Wachstum im Mineralsalzmedium 3 erreichbar ist. In diesem Fall könnte die Produktionsphase ohne vorherigen Zellerntevorgang ähnlich der Produktion von 2,3-*trans*-CHD **1** direkt im Batch-Verfahren eingeleitet werden.



Schema 4.11: Strategie II zur Herstellung mikrobieller Produzenten von **2**. Der metabolische Fluss von **3** zu **2** soll durch plasmidische Überproduktion von EntB erreicht werden. Es sollen Mutanten verwendet werden, deren Eingangs-Biosynthesewege zu den aromatischen Aminosäuren (über **127** und **128**), sowie den Folaten (über **129**) dereguliert sind. Dadurch soll der intrazelluläre Pool an **3** für die EntB-katalysierte Umsetzung zu **2** erhöht werden.

Im Gegensatz zu den Arbeiten mit *Klebsiella*-Stämmen,^[15] bei denen drei der von Chorismat (**3**) abhängenden Biosynthesewege blockiert sind, wurde bei Verwendung von *E. coli* (Strategie II) **2** nicht durch gleichzeitig gebildetes **3** oder andere Metabolite (**1**, **72**) verunreinigt (HPLC-Analyse). Grund hierfür könnte zum einen sein, dass der Chorismat-Pool in den *Klebsiella*-Stämmen größer ist als in *E.-coli*-Stamm BN117, so dass dieses exkretiert wird. Dadurch, dass die in dieser Arbeit untersuchten Expressionssysteme homolog sind, könnte hier aber auch der Stofffluss von Chorismat (**3**) zu 3,4-*trans*-CHD **2** durch eine höhere EntB-Aktivität größer sein, so dass **3** nicht exkretiert wird und auf der anderen Seite **2** in

höheren Konzentrationen von 790 mg L^{-1} (5.1 mM) als bei Verwendung der *Klebsiella*-Stämme (150 mg L^{-1} (1.0 mM) **2**)^[15] entsteht.

Im zellfreien Kultivierungsüberstand war **2** bei pH 7 und 23°C über mehrere Tage stabil ohne Zersetzung (quantitative HPLC).

2 wurde entsprechend der Aufreinigung von mikrobiell produziertem **1** durch präparative HPLC in analytischen Mengen aus dem Überstand (10 mL) isoliert. Die NMR-spektroskopischen Daten stimmen mit denen des auf chemischem Wege synthetisierten racemischen **2** überein. Das Vorzeichen des Drehwertes stimmt mit dem des aus *Klebsiella*-Stämmen erhaltenen Produktes überein.^[15]

Durch Verwendung von Ionenauschromatographie ist eine präparative Isolierung von **2** aus dem zellfreien Kultivierungsüberstand möglich. Die Bedingungen der chromatographischen Aufreinigung können entsprechend denen der Aufreinigung von **1** gewählt werden. Aus 200 mL zellfreiem Überstand (790 mg L^{-1} (5.1 mM) **2**), entsprechend 158 mg (1.0 mmol) **2**) wurden 110 mg (0.7 mmol) **2** isoliert, entsprechend einer Aubeute von 70% . Die Reinheit beträgt $> 95 \%$ (^1H -NMR, HPLC-Analyse), mit geringen Mengen Wasser und anorganischen Salzen (siehe Abbildung 4.18).

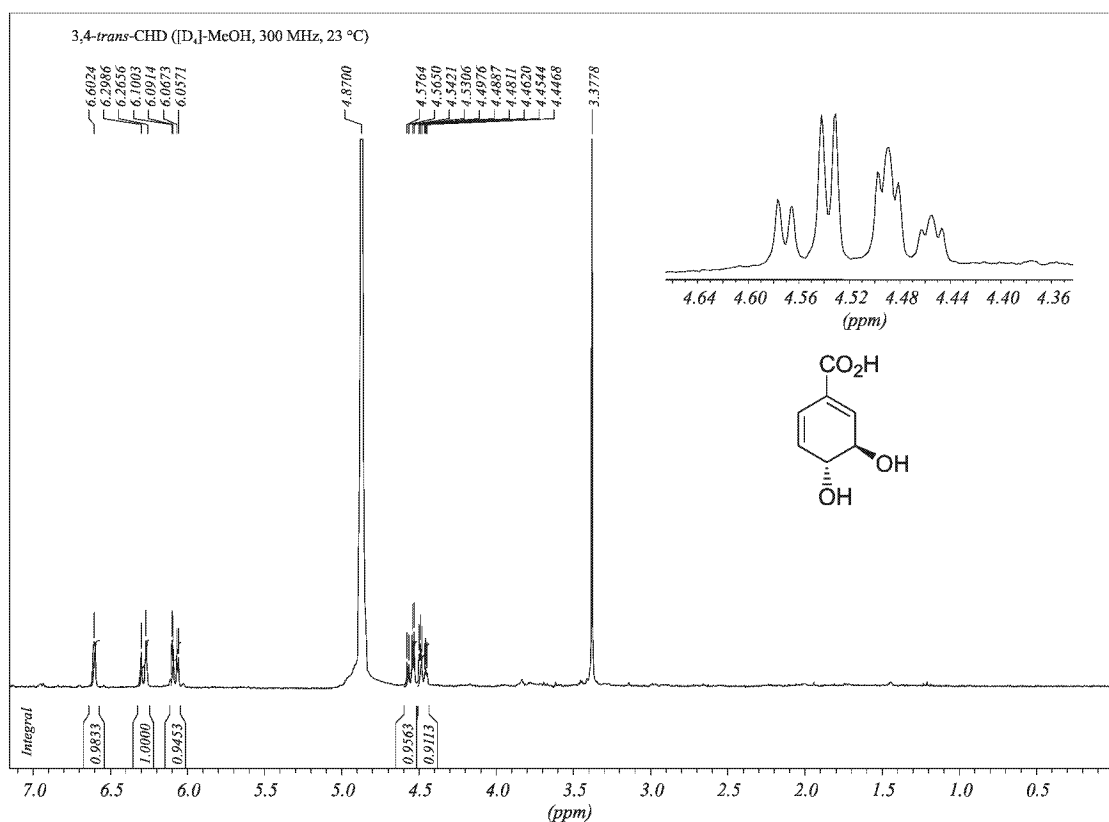


Abbildung 4.18A: ^1H -NMR-Spektrum von **2** nach Isolierung durch Ionenauschromatographie. Messung einer 60 mM Lösung von **2** in $[\text{D}_4]$ -MeOH.

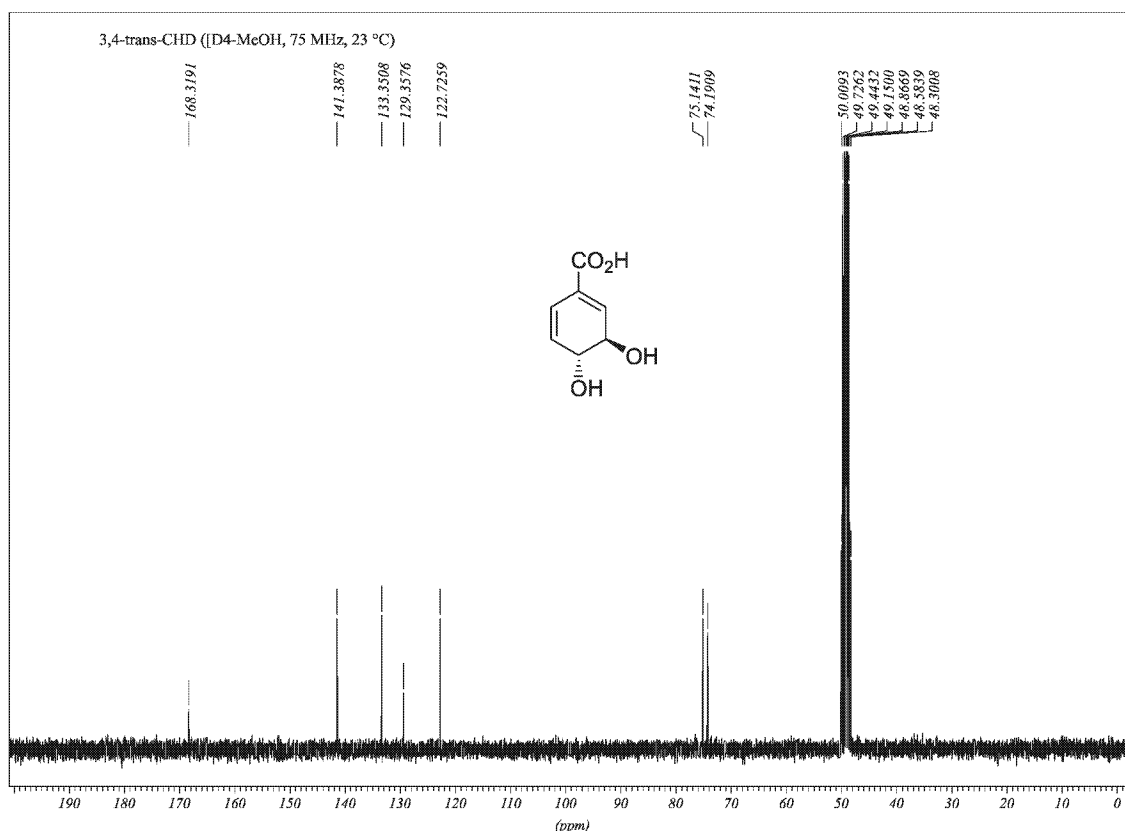


Abbildung 4.18B: ^{13}C -NMR-Spektrum von **2** nach Isolierung durch Ionentauschchromatographie. Messung einer 60 mM Lösung von **2** in [D₄]-MeOH.

4.5 Verwendung von *trans*-CHD in der Naturstoff- und Wirkstoff-synthese

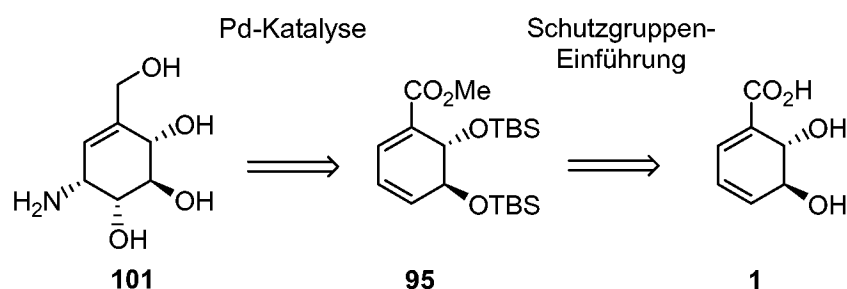
Zur Demonstration, dass ausgehend von *trans*-CHD eine ähnlich vielfältige Folgechemie wie die der *cis*-CHD möglich ist, wurden exemplarisch regio- und stereoselektive Synthesen von 2,3-*trans*-CHD **1** zu Zielmolekülen mit potentiell biologischer Aktivität (Carbazucker und Aminocarbazucker) erarbeitet:

1. Formaler Zugang zu enantiomerenreinem *ent*-Valienamin
2. Darstellung neuer Carbazucker, die als Akzeptor-Bausteine zur Synthese von Pseudooligosacchariden genutzt werden können
3. Synthese eines 3,5,6-tri-*epi*-Valienamin-Analogons
4. Synthese von Mono- und Dihydrierungsprodukten

Für alle Synthesen wurde mikrobiell erzeugtes (enantiomerenreines) 2,3-*trans*-CHD **1** verwendet.

4.5.1 Formaler synthetischer Zugang zu *ent*-Valienamin

Retrosynthetisch kann *ent*-Valienamin (**101**) durch formale Aminohydroxylierung und Reduktion aus mikrobiell erzeugtem **1** gewonnen werden (siehe Schema 4.12). Über eine von B. M. Trost und Mitarbeitern^[12] entwickelte enantioselektive Route, welche die Verwendung von neuartigen Pd-Katalysatoren einschließt, ist Valienamin (**101**) aus TBS-geschütztem Methylester **95** in sieben Reaktionsstufen mit 29 % Ausbeute erhältlich. Die Route wurde zur Darstellung von natürlich vorkommendem (+)-Valienamin ((+)-**101**) und *rac*-**101** aus chemisch synthetisiertem **95** verwendet.



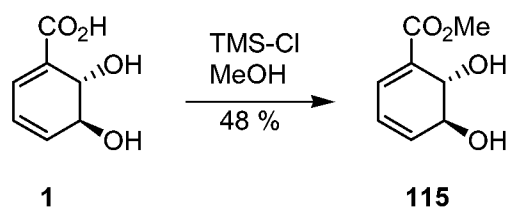
Schema 4.12: Retrosynthese von *ent*-Valienamin (**101**).

95 wird durch Einführung von TBS-Schutzgruppen sowie Veresterung der Carbonsäure-Funktionalität aus **1** gewonnen. Da eine selektive Silylierung der Alkoholgruppen in Gegenwart einer Carbonsäuregruppe schwierig ist, wird die Synthesereihenfolge Veresterung vor TBS-Einführung gewählt.

Zu beachten ist, dass **1** sowohl bei niedrigen (pH < 3) als auch bei hohen pH-Werten (pH > 11) Aromatisierungsreaktionen unterliegt (siehe Kapitel 4.3). So zeigt sich auch, dass Katalysatoren, die standardmäßig für Veresterungen von Carbonsäuren verwendet werden, wie konz. Schwefelsäure,^[168] Bortrifluorid-Etherat^[169] oder Methansulfonsäure, nicht zu befriedigenden Ausbeuten führen. Andere Veresterungsmethoden, die unter milderen Bedingungen über intermediäre Reaktivester ablaufen, wie beispielsweise Veresterung mit Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) und Dimethylaminopyridin (DMAP)^[170] ergeben Schwierigkeiten bei der Aufreinigung, da Katalysator (DMAP) und Nebenprodukt (*N,N*-Dicyclohexylharnstoff) ähnlich hydrophilen Charakter wie **1** besitzen. Andere Reagentien zur Carbonsäureveresterung wie *N,N'*-Carbonyldiimidazol^[171] reagieren zwar zu alkoholysierbaren Produkten. Diese sind jedoch ebenfalls schlecht abtrennbar.

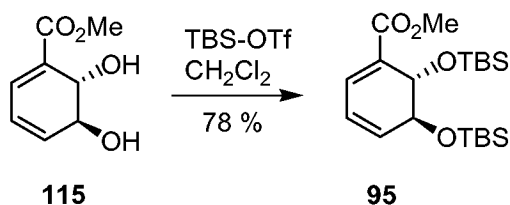
Die Überführung von 2,3-*trans*-CHD **1** in den Methylester **115** gelingt mit Trimethylsilylchlorid (TMS-Cl)^[172] als Reagenz in absolutiertem Methanol in 48 % Ausbeute (siehe Schema 4.13).

Um Aromatisierung durch entstehenden Chlorwasserstoff zu verhindern, hat es sich als vorteilhaft erwiesen, die Reaktion bei Raumtemperatur durchzuführen und das Reagenz sehr langsam (tropfenweise) zuzuführen. Um hohen Umsatz zu erreichen, muss mehr als ein



Schema 4.13: Überführung von **1** in den Methylester **115** mit Trimethylsilylchlorid.

Äquimol Reagenz zugesetzt werden. Dies ist vermutlich deshalb nötig, weil 2,3-*trans*-CHD **1** aufgrund seiner hygroskopischen Eigenschaften nicht vollständig wasserfrei eingesetzt wird. Gegebenenfalls könnte durch die Verwendung von Fedbatch-Verfahren und pH-Statens eine Steigerung der Ausbeute erreicht werden. Alternativ zur Veresterungsmethode mit TMS-Cl kann auch Trimethylsilyldiazomethan^[173,157] als Reagenz verwendet werden. Da die Reaktion in diesem Fall weitgehend unter neutralen Bedingungen erfolgt, werden Ausbeuten von 81 % erreicht. Nachteilig ist jedoch, dass Trimethylsilyldiazomethan als Spezialchemikalie nicht kostengünstig verfügbar ist.* Die Verwendung dieser Methode für die präparative Laborsynthese von **115** im größeren Maßstab kann also gegebenenfalls kostenlimitiert sein. Ausgehend vom Methylester **115** wird das geschützte Produkt **95** durch Reaktion mit *tert*-Butyldimethylsilyltriflat (TBS-OTf) als Silylierungsreagenz^[174] in 78 % Ausbeute erhalten (siehe Schema 4.14).

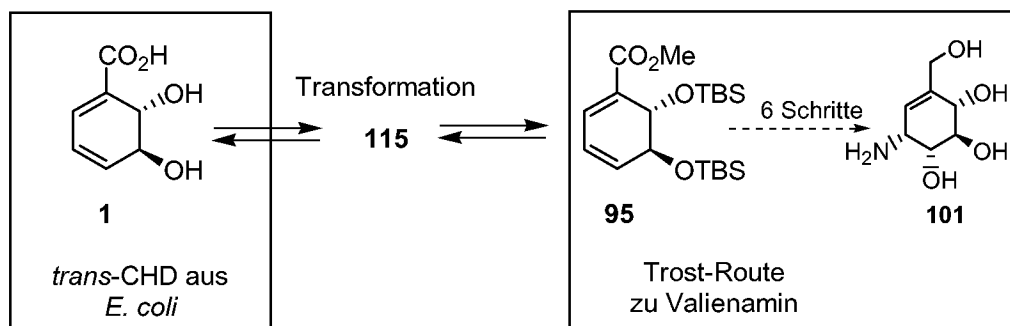


Schema 4.14: Einführung der TBS-Schutzgruppen in **115**.

Die analytischen Daten von **95** entsprechen, bis auf das Vorzeichen des Drehwertes, den Daten des auf chemischer Route synthetisierten **95**. Damit konnte gezeigt werden, dass durch Schutzgruppentechnik eine Überführung des mikrobiell produzierten 2,3-*trans*-CHD **1** zu Intermediaten der Valienamin-Syntheseroute von B. M. Trost^[12] in Ausbeuten bis 63 % möglich ist. Mit der bereits in Kapitel 4.1.1 beschriebenen Entschützung von **95** ist also eine „bidirektionale“ Anbindung der mikrobiell produzierten *trans*-CHD an die Valienamin-Synthese von B. M. Trost gegeben (siehe Schema 4.15).

Alle weiteren Synthesestufen der Trost-Route sind gut charakterisiert. Es ist anzumerken, dass ausgehend von 2,3-*trans*-CHD **1** auf diese Weise enantioselektiv das nicht natürlich-vorkommende (–)-*ent*-Valienamin (*ent*-Valienamin, (–)-**101**) erhalten werden kann, zu welchem bisher keine selektive Synthese beschrieben ist.

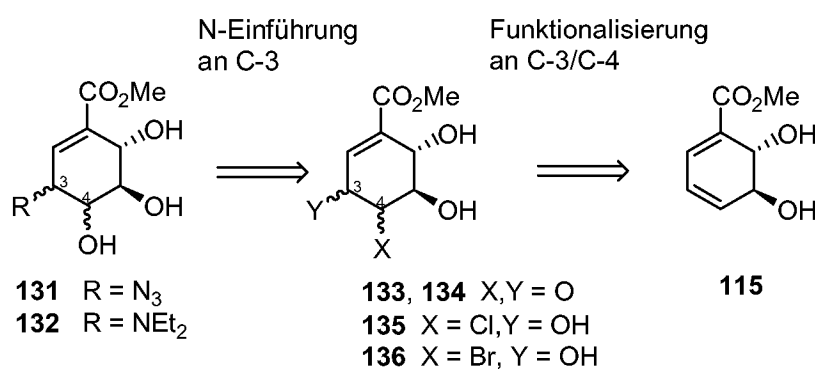
* Preis für 100 mL (0.79 mol): 413.07 DM, Artikel 36,283-2, Aldrich chemical co., Milwaukee, USA, Stand Juli 2001.



Schema 4.15: Reversible Transformation von **1** zu **95** durch Schutzgruppentechnik.

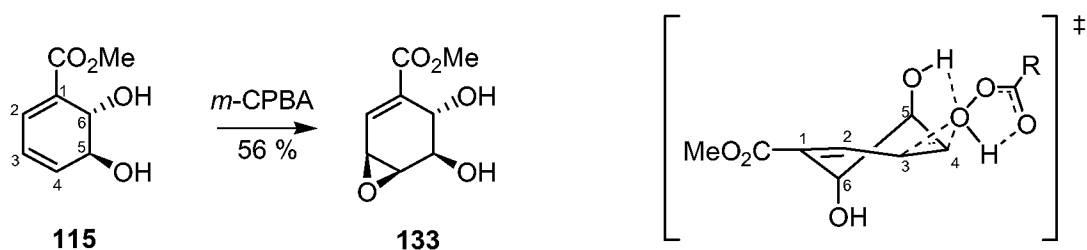
4.5.2 Darstellung funktionalisierter Carbazucker

Ausgehend vom Methylester **115** wird eine Funktionalisierung zu Cyclohexentriol-Bausteinen durch Additionsreaktion an der elektronenreicheren C-3/C-4-Position erreicht (siehe Schema 4.16).



Schema 4.16: Retrosynthese der Valienamin-Analoga **131** und **132** von **115**.

Nach Addition von elektronenziehenden Substituenten (wie Hydroxy-, Halogen-, und Pseudohalogensubstituenten) an C-3/C-4 ist durch S_N2-Reaktionen eine Einführung von Stickstoffsubstituenten (Azid-, Dialkylaminogruppe) regioselektiv an C-3-Position möglich. Die direkte, regio- und stereoselektive Einführung von Sauerstoff in die C-3/C-4-Position zum *cis*-Epoxid **133** erfolgt durch Umsetzung mit *m*-CPBA^[175] (siehe Schema 4.17).



Schema 4.17: Regio- und diastereoselektive Epoxidierung des Methylesters **115** mit *m*-CPBA zu **133**.

Die Oxidierung von Alkenen mit *m*-CPBA ist mechanistisch gut untersucht^[176] und verläuft durch Koordination der Persäure mit der allylischen Alkoholgruppe an C-5 streng

suprafacial.^[177] Die faciale Selektivität lässt sich durch eine Koordinierung des Peroxid-Sauerstoff von *m*-CPBA mit dem Wasserstoff der Alkoholgruppe an C-5 erklären. Dargestellt ist der spiro-ähnliche Übergangszustand des mechanistischen Modells von K. B. Sharpless.^[176] Die Diastereoselektivität beträgt mindestens 95 % (¹H-NMR, kein weiteres Diastereomer). **133** wird in 56 % Gesamtausbeute hochrein erhalten werden. Im Gegensatz zu 2,3-*trans*-CHD **1** und dem entsprechenden Methyl- und Ethylestern **115** und **114** zeigt **133** gute Kristallisierbarkeit. Einkristalle aus einer Präzipitation aus EE/Pentan wurden zur Anfertigung einer Röntgenstrukturanalyse verwendet, welche die *cis*-Konfiguration des Epoxid-Rings relativ zur benachbarten Alkoholgruppe bestätigt (siehe Abbildung 4.19).

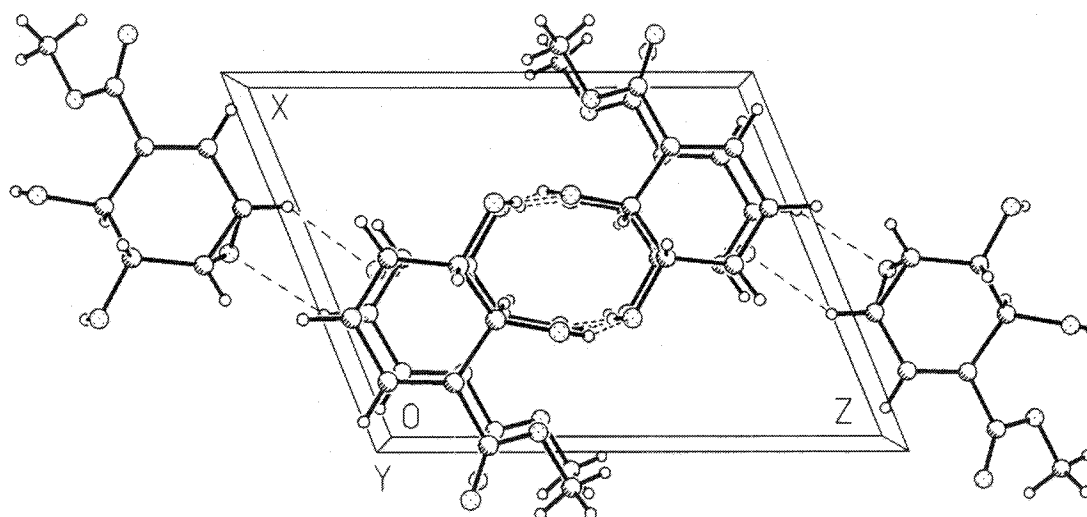
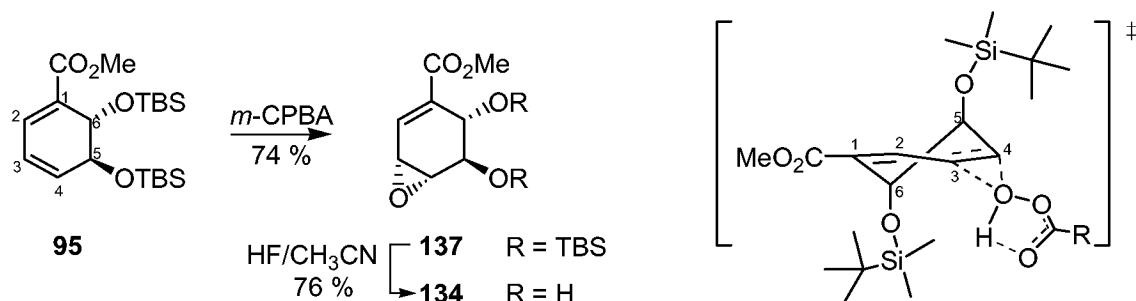


Abbildung 4.19: 3D-Kristallstruktur von **133**.

133 bildet, wie im Röntgenstrukturbild zu sehen, dimere Strukturen über Wasserstoffbrückenbindungen in jeder Elementarzelle. Es kann angenommen werden, dass die zusätzlichen Wasserstoffbrückenbindungen des Oxiran-Sauerstoffatoms zu einem Wasserstoffatom des Oxiranrings des benachbarten Moleküls die Kristallstruktur stabilisiert und dadurch zu der guten Kristallisierbarkeit von **133** und dem Schmelzpunkt von 108-112 °C führen. Der Methylester **115** hat zum Vergleich einen niedrigeren Schmelzpunkt von 79-80 °C.

Neben der selektiven Oxidation an der C-3/C4-Position zum *cis*-Epoxid **133** wurde auch eine Möglichkeit zur *trans*-Epoxidierung etabliert. Ausgehend von TBS-Ether **95**, welcher wie in Kapitel 4.5.1 beschrieben erhältlich ist, wird mit *m*-CPBA selektiv das TBS-geschützte *trans*-Epoxid **137** mit 74 % Ausbeute erhalten (siehe Schema 4.18). Durch den hohen sterischen Anspruch der TBS-Schutzgruppe an C-5 erfolgt die Addition ausschließlich antarafacial (von der Rückseite).

Die Diastereoselektivität beträgt auch hier > 95 % (¹H-NMR-Messung). Hydrolyse der beiden



Schema 4.18: Epoxidierung des TBS-Ethers **95** mit *m*-CPBA zu *trans*-Epoxid **137**.

TBS-Gruppen von **137** durch Behandlung mit Flusssäure^[178] liefert das *trans*-Epoxid **134** in 76 % Ausbeute. *trans*-Epoxid **134** und *cis*-Epoxid **133** sind anhand NMR-spektroskopischer Daten, insbesondere der charakteristischen Kopplungskonstanten der Protonen an Positionen 3, 5 und 4* eindeutig diskriminierbar (siehe Abbildungen 4.20 und 4.21).

Über die Karplus-Conroy-Beziehung^[179] lassen sich aus den H,H-Kopplungskonstanten (¹H-NMR) die Interplanarwinkel (Torsionswinkel) Φ für **133** im solvatisierten Zustand berechnen (siehe Tabelle 4.6). Die so bestimmten Interplanarwinkel Φ zeigen gute Übereinstimmung mit einem durch Minimierung der sterischen Energie optimierten 3D-Strukturmodell^[180] für **133** in der Gasphase, sowie der durch Röntgenstrukturanalyse erhaltenen 3D-Struktur von **133** im kristallinen Zustand (siehe Abbildung 4.20).

Umgekehrt lassen sich über die Karplus-Conroy-Beziehung aus den Röntgenstrukturdaten von **133** auch theoretische H,H-Kopplungskonstanten für **133** im kristallinen Zustand berechnen,[‡] welche mit den Daten für solvatisiertes **133** verglichen werden können (siehe Tabelle 4.6).

Es ist insbesondere auffallend, dass die Winkel und Kopplungen an C-5 und C-6 im kristallinen und solvatisierten Zustand (**133**) sehr ähnlich sind, während im Bereich der Oxiran-Gruppe höhere Abweichungen zu beobachten sind. So beträgt die Differenz der Interplanarwinkel für beide Zustände ($\Delta\Phi$) für die (H³-CC-H⁴)-Torsion 38.5° und für die

* Die Positionsnummerierung der Substituenten erfolgt bei den Epoxiden **133** und **134** streng nach IUPAC-Nomenklaturregeln im Gegensatz zu **1**, **115** und **114** nicht nach dem Cyclohexadien-System sondern nach dem Oxa-Bicyclo-System (vergleiche IUPAC-Namen, Kapitel 6.3.4 im Experimenten Teil). Der Epoxidring befindet sich nach IUPAC also eigentlich an C1/C-6. Aus Gründen der Einheitlichkeit werden die Epoxide **133** und **134** hier jedoch ebenfalls nach dem Cyclohexadien-System durchnummeriert.

‡ Die Karplus-Conroy-Gleichung ist nicht injektiv, das heißt die Umkehrrelation der Funktion ist selber keine Funktion. Aus diesem Grund ergeben sich aus einigen Kopplungskonstanten zwei mögliche Interplanarwinkel. Die nicht strukturell interpretierbaren Werte für $\Phi^{\text{ber.}}$ wurden verworfen.

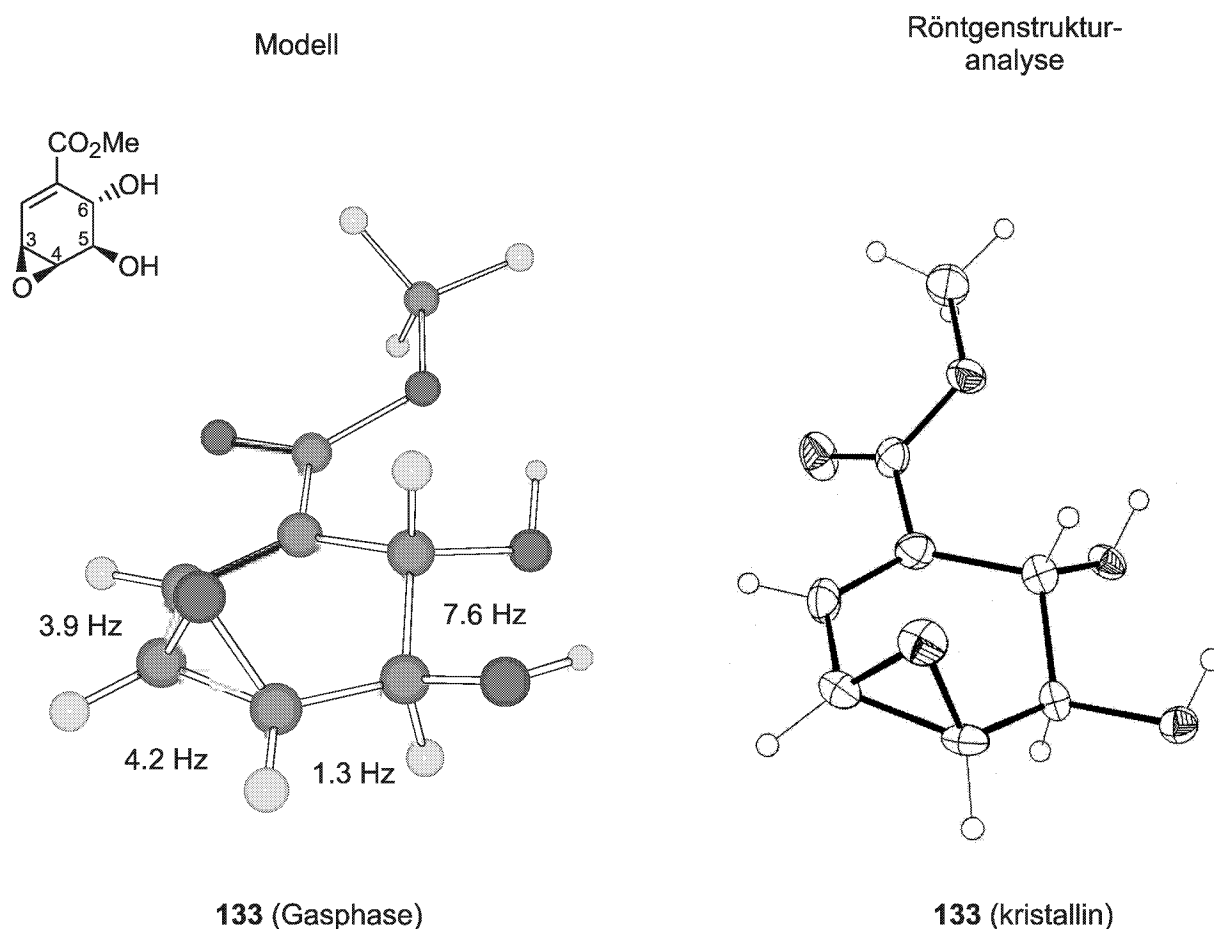


Abbildung 4.20: 3D-Strukturen von **133** in der Gasphase (Modell berechnet aus der Konstitution durch Energieminimierung) und kristallinem **133** (Röntgenstruktur). NMR-spektroskopisch gemessene H,H-Kopplungskonstanten für **133** im solvatisierten Zustand (128 mM **133** in [D₄]-Methanol).

Tabelle 4.6: Kopplungskonstanten $^3J(\text{H,H})$ und Interplanarwinkel Φ (HCCH) von **133**. Für kristallines **133** erfolgt die Berechnung von $^3J^{\text{ber.}}$ aus den gemessenen Werten $\Phi^{\text{ber.}}$. Für die solvatisiertes **133** ([D₄]-Methanol) wird $\Phi^{\text{ber.}}$ aus $^3J^{\text{gem.}}$ (^1H -NMR) berechnet. Interplanarwinkeldifferenz $\Delta\Phi = |\Phi^{\text{gem.}} - \Phi^{\text{ber.}}|$.

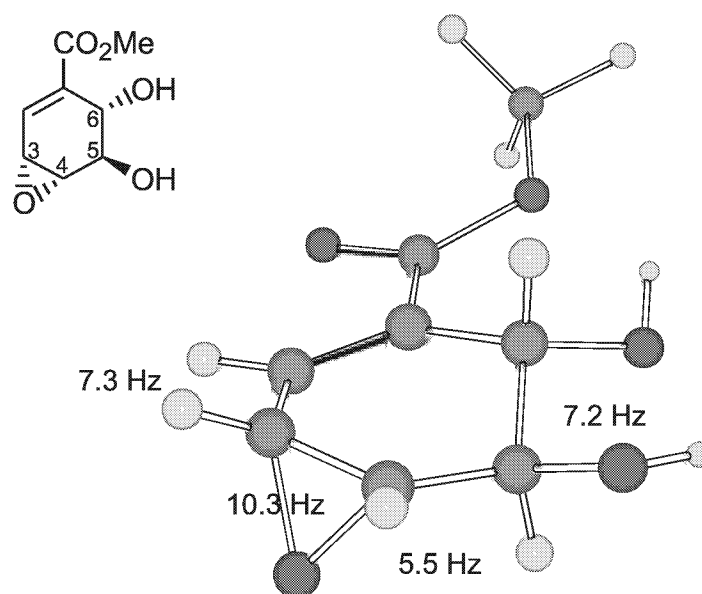
H-Atome	kristallines 133		solvatisiertes 133		$\Delta\Phi$ [1°] ^b
	$\Phi^{\text{gem.}}$ [1°]	$^3J^{\text{ber.}}$ [Hz]	$\Phi^{\text{ber.}}$ [1°]	$^3J^{\text{gem.}}$ [Hz]	
H ⁵ -H ⁶	154.8	7.5	155.6	7.6	0.8
H ⁴ -H ⁵	92.2	-0.3 ^a	100.7	1.3	8.5
H ³ -H ⁴	4.9	8.2	43.4	4.2	38.5
H ² -H ³	14.8	7.7	45.5	3.9	30.7

^a Negative Kopplungskonstante ergibt sich rein rechnerisch aus der Karplus-Conroy-Gleichung.

^b Die Interplanarwinkeldifferenzen sind als Beträge angegeben, da nach allgemeiner Praxis in Cyclohexan-Systemen die Angabe von Interplanarwinkel ebenfalls ohne Richtungs-Vorzeichen erfolgt.^[179b]

(H²-CC-H³)-Torsion 30.7°. Eine Konformationsänderung am Oxiran-Ring von **133** im solvatisierten Zustand könnte möglicherweise durch Wechselwirkungen der Alkohol-Gruppe an C-5 mit dem Oxiran-Sauerstoff über Wasserstoffbrückenbindung bewirkt werden.

Für das *trans*-Epoxid **134** wurden analog dazu die im solvatisierten Zustand bestimmten Kopplungskonstanten und Interplanarwinkel mit der optimierten 3D-Molekülstruktur für **134** in der Gasphase verglichen (siehe Abbildung 4.20 und Tabelle 4.7).



134 (Gasphase)

Abbildung 4.21: 3D-Strukturen von **134** in der Gasphase (Modell berechnet aus der Konstitution durch Energieminimierung) und NMR-spektroskopisch gemessene H,H-Kopplungskonstanten für **134** im solvatisierten Zustand (130 mM **134** in [D₄]-Methanol).

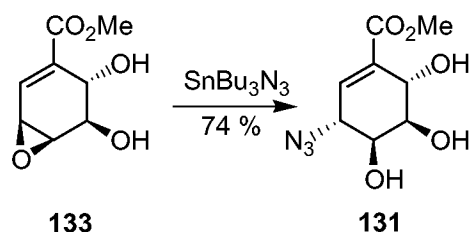
Tabelle 4.7: H,H-Kopplungskonstanten ³*J* und berechnete Interplanarwinkel Φ (HCCH) von **134** in Lösung ([D₄]-Methanol), sowie Differenzbetrag der Interplanarwinkel in *cis*-Epoxid **133** und *trans*-Epoxid **134**.

H-Atome	$\Phi^{\text{ber.}}$ [1°]	³ <i>J</i> _{gem.} [Hz]	$ \Phi^{\text{ber.}}(\mathbf{134}) - \Phi^{\text{ber.}}(\mathbf{133}) $ [1°]
H ⁶ -H ⁵	152.5	7.2	3.1
H ⁵ -H ⁴	34.4	5.5	66.3
H ⁴ -H ³	0 ^a	10.3	43.4
H ³ -H ²	19.2	7.3	26.3

^a Eigentlich ist hier $\Phi = \arccos(1.1)$. Da dies nur im komplexen Zahlenraum definiert, wird gesetzt:
 $\Phi = \arccos(1.1) \approx \arccos(1) = 0^\circ$.

Die aus den Kopplungskonstanten bestimmten Interplanarwinkel Φ sind mit der optimierten 3D-Struktur für **134** gut kongruent (siehe Tabelle 4.7). Charakteristisch für **134** ist

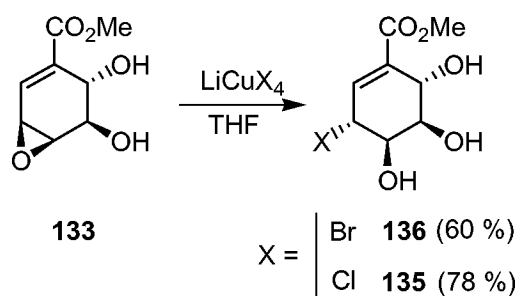
insbesondere die hohe Kopplungskonstante zwischen H^3 und H^4 ($^3J(H,H) = 10.3 \text{ Hz}$), welche auf einen Interplanarwinkel Φ von nahe 0° schließen lässt. Die Unterschiede der Interplanarwinkel von **133** und **134** fallen, wie zu erwarten, im Bereich des Oxiranrings ($\Delta\Phi(H^5\text{-CC-}H^4)$, $\Delta\Phi(H^4\text{-CC-}H^3)$, $\Delta\Phi(H^3\text{-CC-}H^2)$) groß aus, während die Interplanarwinkeldifferenz im Bereich der vicinalen Diolgruppe ($H^6\text{-CC-}H^5$) nur 3.1° beträgt. Bei Versuchen, den Epoxidring in **133** mit verschiedenen Nukleophilen (Halo-, Pseudohalo- oder N-Nukleophilen) regioselektiv zu öffnen, zeigte sich, dass **133** hohe Stabilität aufweist. So führen zahlreiche synthetisch etablierte Methoden der Epoxidöffnung über S_N2 -Reaktionen mit Azid-Anionen als nukleophilem Agens nicht zum Erfolg, einschließlich der Verwendung von Natriumazid,^[181] Natriumazid und Lewis-Säure-Katalysatoren^[182] oder Trimethylsilylazid (TMS-Azid) unter Tetrabutyltitanium-Katalyse.^[183] Die Öffnung des Epoxidrings in **133** zum Azidohydrin **131** gelang schließlich in 74 % Ausbeute mit Tributylzinnazid (TBT-Azid) als nukleophilem Reagenz unter Bedingungen von S. Saito und T. Moriwake^[184] (siehe Schema 4.19).



Schema 4.19: Nukleophile Epoxidöffnung von **133** über S_N2 -Reaktion mit TBT-Azid zum Azidohydrin **131**.

Charakteristisch für die erfolgreiche Öffnung zum Azidohydrin **131** ist die im Infrarot-Spektrum auftretende Azid-Absorptionsbande bei $\tilde{\nu} = 2108 \text{ cm}^{-1}$ (Valenzschwingung der kumulierten Doppelbindung).

Die Epoxidöffnung in **133** kann auch durch nukleophilen Angriff von Halogeniden in einer S_N2 -Reaktion zu Halohydrinen erfolgen (siehe Schema 4.20).



Schema 4.20: Epoxidöffnung von **133** über S_N2 -Reaktion mit Lithiumcupraten zu Halohydrinen **135** und **136**.

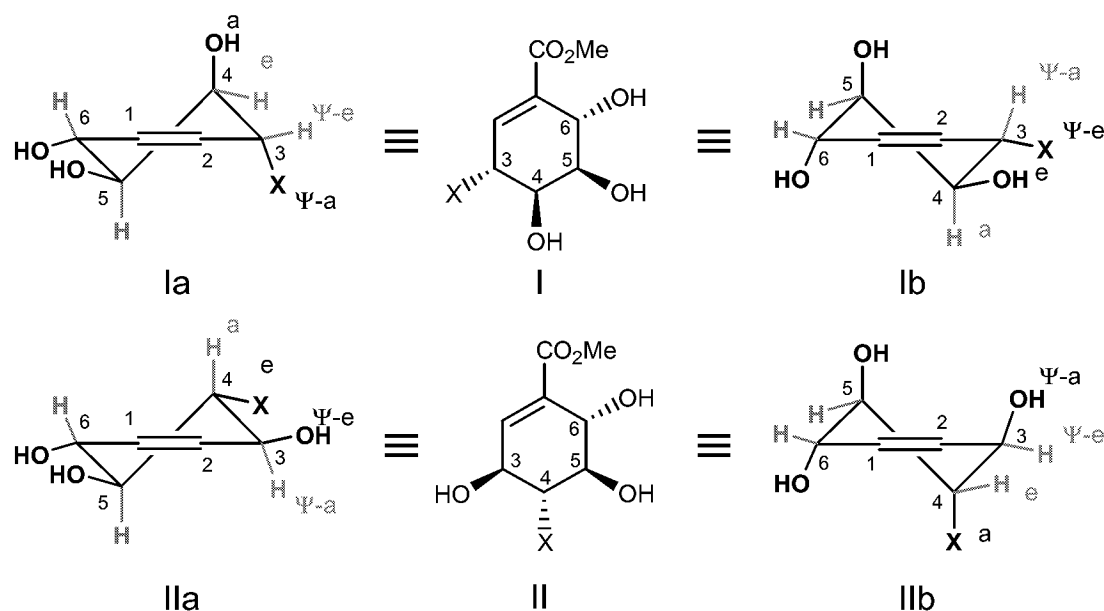
Epoxidöffnungen an ähnlichen Systemen (Cyclohexan-Epoxide) sind bereits mit einem großen Spektrum von Metallhaliden untersucht worden.^[185] Nach einem Verfahren von J. A.

Ciaccio und Mitarbeitern werden das Chlorhydrin **135** sowie das Bromhydrin **136** durch Verwendung von Lithiumtetrachlorocuprat(II)^[186] und Lithiumtetrabromocuprat(II)^[187] dargestellt.

Der eingeführte Substituent ist aufgrund des Rückseitenangriffes (S_N2 -Mechanismus) in bezug auf die benachbarte neu gebildete Alkoholgruppe *trans*-ständig.

Unter der Annahme, dass Payne-Umlagerungen des Epoxides unter den untersuchten weitgehend neutralen Reaktionsbedingungen nicht ablaufen,^[188] sind prinzipiell auch je ein weiteres Konstitutionsisomer zu **131**, **135** und **136** denkbar, welche aus einem nukleophilen Angriff an C-4 resultieren. Da jedoch alle drei Öffnungsreaktionen ausschließlich je ein Produkt ergeben (HPLC, ^1H -NMR, ^{13}C -NMR), welche kristallin nicht erhalten wurden, sollen zur Verifikation der Konstitutionen von **131**, **135** und **136** NMR-spektroskopische Daten verwendet werden. Zu berücksichtigen ist, dass jeweils beide Konstitutionsisomere in Lösung

Tabelle 4.8: Konstitution- sowie Konformationuntersuchung der Komponenten **131**, **135**, **136** und **132** erfolgt über NMR-Spektroskopie durch Messung spezifischer Kopplungskonstanten. Messung in $[\text{D}_4]$ -MeOH. Berechnung der Interplanarwinkel Φ nach Karplus-Conroy.



Substanz	X =	$^3J(\text{H}^3_{\Psi\text{-a}}/\text{H}^4_{\text{a}})$ [Hz] (Φ [1°])	$^3J(\text{H}^4_{\text{a}}/\text{H}^5_{\text{e}})$ [Hz] (Φ [1°])	$^3J(\text{H}^5_{\text{e}}/\text{H}^6_{\Psi\text{-e}})$ [Hz] (Φ [1°])
136	Br	7.5 (154)	2.3 (56) ^c	3.8 (46)
135	Cl	8.0 (159)	2.3 (56) ^c	3.5 (48)
131	N ₃	8.5 (164)	2.3 (56) ^c	3.6 (47)
132^a	NEt ₂	9.2 (177)	2.3 (56) ^c	1.7 (61) ^b

^a ^1H -NMR-Spektrum in CDCl_3 ; ^b Kopplungskonstante und Interplanarwinkel unsicher, da sich überlagernde Signale im ^1H -NMR; ^c Werte für Φ nach Karplus-Conroy aufgrund der kleinen Kopplungskonstanten wenig eindeutig ($\Phi^{1,2} = \arccos(\pm 0.55)$).

je zwei stabile Konformationen (*half-chair*-Konformationen) einnehmen können, von denen jeweils die stabilere im zeitlichen Mittel den größten Beitrag zu den kernspinmagnetischen Eigenschaften des zugehörigen Konstitutionsisomeren liefert (siehe Abbildung der Tabelle 4.8).

Die im ^1H -NMR beobachteten fünf Protonensignale für den Cyclohexenring können anhand ihres Kopplungsmusters und anhand von H,H-COSY-Experimenten den Positionen 2-5 im Ring jeweils eindeutig zugewiesen werden. Die Kopplungskonstanten der Verbindungen **131**, **135** und **136** sind stark homolog (Tabelle 4.8).

Beim Vergleich der H,H-Kopplungskonstanten fällt insbesondere der hohe Wert der $\text{H}^3\text{-H}^4$ -Kopplung von durchschnittlich 8 Hz auf, welche im Cyclohexen-System auf ein pseudo-axiales Proton benachbart zu einem axialen Proton schließen lässt.^[189] Dies trifft sowohl für Konstitutionsisomer I in der gezeigten Konformation Ib als auch für Konstitutionsisomer II in der Konformation IIa zu. Diese beiden Konformere berücksichtigen auch gleichzeitig die energetisch günstigere Positionierung des sterisch anspruchsvollen Halogenrests (in **131** Pseudohalogenrest) X in eine äquatoriale Stellung.^[190]

Die $\text{H}^5\text{-H}^6$ -Kopplungen sind mit ca. 3.6 Hz deutlich niedriger als die $\text{H}^3\text{-H}^4$ -Kopplungen. Sie liegen im Bereich der äquatorial-pseudoäquatorialen oder der axial-äquatorialen Kopplungen. Dies schließt Konformer IIa eindeutig aus, in welchem eine ähnlich hohe Kopplung wie die der $\text{H}^3\text{-H}^4$ -Kopplung zu erwarten wäre.

Die $\text{H}^4\text{-H}^5$ -Kopplungen liegen mit 2.3 Hz ebenfalls deutlich niedriger als eine axial-axiale Kopplung, welche in Konformer IIa zu erwarten wäre, sie sind jedoch gut verträglich mit der Annahme einer axial-äquatorialen Kopplung in Konformer Ib.

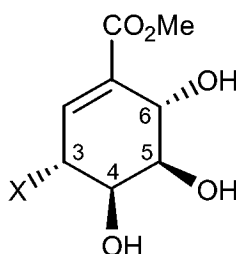
Die chemischen ^1H -Verschiebung der Protonen in **131**, **135** und **136** sind aufgrund der Funktionalisierung durch einander ähnelnder Struktureinheiten (sp^3 -hybridisierter Kohlenstoff mit elektronenziehendem Substituenten) wenig charakteristisch für Reaktionskontrollen und Strukturanalysen (siehe Tabelle 4.9).

Durch unterschiedliche Substituierung an C-3 werden insbesondere die Umgebungen der Protonen an C-3 und C-4 verändert, während das Proton der vinyloge Akzeptorgruppe an C-2 elektronisch kaum beeinflusst wird.

Die chemische Verschiebung des Protons an C-3 nimmt wie zu erwarten von **131** über **135** nach **136** zu, das heißt in umgekehrter Weise des kovalenten Anteils der polarisierten Bindung von C-4 zum Substituenten ($\text{N}_3 < \text{Cl} < \text{Br}$), welcher sich beispielsweise aus den pK_S -Werten der Wasserstoffsäuren abschätzen lässt ($\text{HBr} < \text{HCl} < \text{HN}_3$; $\text{pK}_\text{S} = -8.9, -6.1, 4.9$).^[191] Das Proton an C-6 ist im Vergleich zu den anderen Protonen an sp^3 -hybridisierten Kohlenstoffatom stark in Richtung Tieffeld verschoben. Dies kann durch induktive Effekte der Carbonsäureester-Funktion an der benachbarten C-1-Position erklärt werden.

Die hohe Regioselektivität der Öffnungsreaktionen des Epoxidrings in **133** von $> 95\%$ kann erklärt werden durch eine Aktivierung des allylischen C-Atoms (C-3 in **133**) für

Tabelle 4.9: Chemische Verschiebungen der Protonen im ^1H -NMR-Spektrum der Halo- und Pseudohalohydrine **131**, **135**, **136** sowie des Diethylaminderivats **132**. Messung in $[\text{D}_4]\text{-MeOH}$.



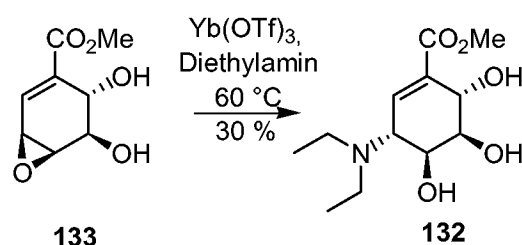
Substanz	X =	δ_{H} (H-6) [ppm]	δ_{H} (H-5) [ppm]	δ_{H} (H-4) [ppm]	δ_{H} (H-3) [ppm]	δ_{H} (H-2) [ppm]
136	Br	4.5	3.9	4.1	4.7	6.9
135	Cl	4.5	3.9	4.0	4.6	6.8
131	N ₃	4.5	3.9	3.7	4.2	6.7
132^a	NEt ₂	4.6	4.3	3.8	3.6	7.1

^a ^{13}C -NMR-Spektrum in CDCl_3 .

nukleophile Angriffe, hervorgerufen durch die Nähe zur elektronenziehenden α,β -ungesättigten Carbonsäuregruppe. In analogen Systemen, in denen keine Aktivierung durch stark elektronenziehende Nachbargruppen existieren, sind im allgemeinen deutliche niedrigere Diastereoselektivitäten für die Öffnungsreaktionen mit solchen Nukleophilen zu erwarten (in der Regel $de < 90\%$), wie für 2,3-Epoxy-Alkohole von K. B. Sharpless und Mitarbeitern intensiv untersucht.^[192]

Zur Demonstration, dass 4-Aminocyclohex-1-en-4,5,6-triol-Einheiten durch Anknüpfung von Aminen an die C-3-Position der funktionalisierten Cyclohexen-Epoxid-Bausteine aufgebaut werden können, wurde die Reaktion von Diethylamin mit **133** untersucht. Wie schon bei der Epoxidöffnung mit Aziden beobachtet, ist **133** auch gegenüber nukleophilen Angriffen von Aminen bei niedrigen Temperaturen ($< 35\text{ }^\circ\text{C}$) oder Abwesenheit von Lewis-Säure-Katalysatoren weitgehend inert. Eine Epoxidöffnung (**133**) ist jedoch unter Katalyse von Ytterbiumtriflat bei $60\text{ }^\circ\text{C}$ möglich.^[193] Die Reaktion erfolgt dabei regio- und stereoselektiv zum 3-Diethylaminocyclohex-1-en-4,5,6-triol **132** (siehe Schema 4.21).^[157]

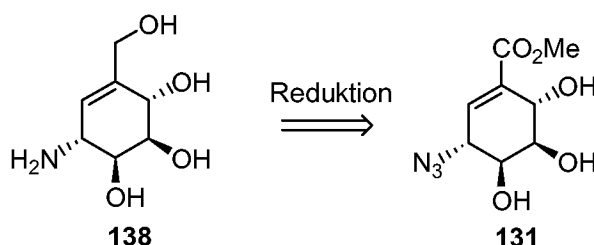
Obwohl die Diethylaminogruppe sich elektronisch von den Pseudohalogenid- und Halogenid-Gruppen unterscheidet, stimmen die Protonenverschiebungen des ^1H -NMR-Spektrums der Verbindung **132** weitgehend mit denen der Verbindungen **131**, **135** und **136** überein (siehe Tabelle 4.8 und Tabelle 4.9). Aufgrund der Kopplungskonstanten kann eindeutig auf die abgebildete Konstitution geschlossen werden, welche Homochiralität zu Verbindungen **131**, **135** und **136** besitzt.



Schema 4.21: Regio- und stereoselektive Öffnung des Epoxidrings in **133** zum 3-Diethylaminocyclohex-1-en-4,5,6-triol **132**.^[157]

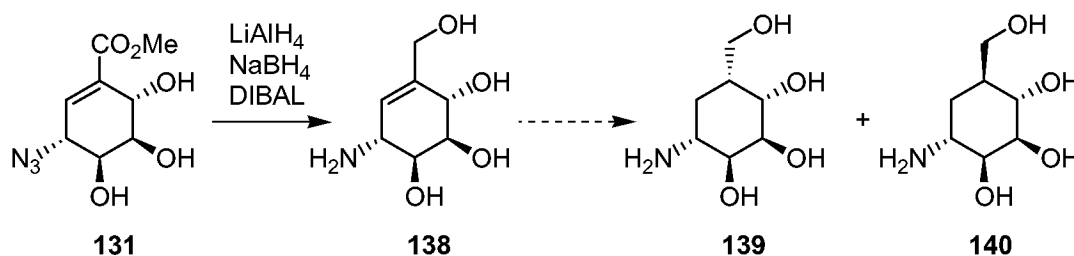
4.5.3 Synthese des 3,5,6-tri-*epi*-Valienamin-Analogons

Die Darstellung von 3,5,6-tri-*epi*-Valienamin (**138**) ist ausgehend vom Azid **131** formal durch Reduktion der Azidgruppe zum Amin sowie des Carbonsäureesters zum primären Alkohol zu erreichen (siehe Schema 4.22). Für beide Reduktionen sind eine Vielzahl von Reagentien bekannt, jedoch schränkt die Notwendigkeit einer hinreichend großen Selektivität die Wahl der Reagentien ein, da die vorhandene Alken-Funktionalität in **131** erhalten bleiben sollte. Es werden insgesamt vier Reduktionsäquivalente von **131** zu **138** benötigt, von denen je zwei auf die primäre Alkoholgruppe und zwei auf die Aminogruppe fallen.



Schema 4.22: Retrosynthese von 3,5,6-tri-*epi*-Valienamin (**138**) ausgehend von Azid **131**.

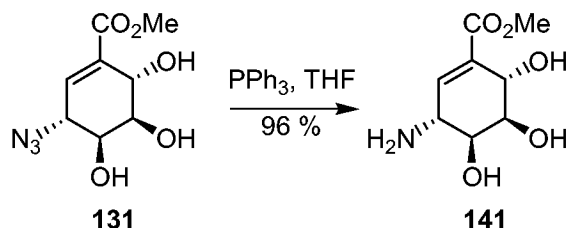
Alle Versuche **138** in einem Syntheseschritt aus **131** mit Di-*iso*-butylaluminiumhydrid (DIBAL) unter literaturbeschriebenen Bedingungen^[194] reduktiv zu gewinnen, führen entweder zu keiner Reaktion (-78°C) oder zu teilweiser oder vollständiger Reduktion der Alkengruppe ($> -78^\circ\text{C}$). Es werden in allen Fällen Produktgemische erhalten (siehe Schema 4.23).



Schema 4.23: Reduktion von **131** mit verschiedenen Reagentien.

Obwohl die Alkenreduktion NMR-spektroskopisch nachgewiesen werden kann, sind die möglicherweise entstandenen Produkte **139** und **140** (Epimere des Validamins) nicht eindeutig identifizierbar und isolierbar. Analytische Referenzdaten zu **139** und **140** sind in der Literatur nicht beschrieben.

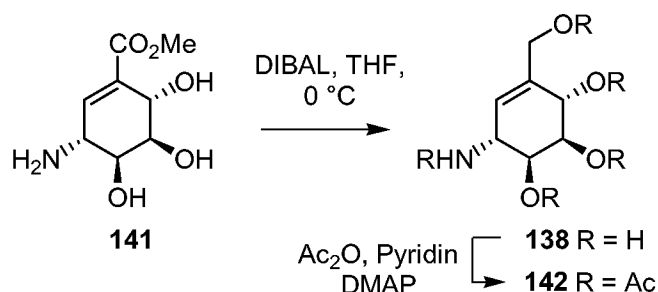
Eine Überführung von **131** in **138** wurde in einer zweistufigen Reaktionssequenz versucht. Nach einem literaturbekannten Verfahren^[195] wurde die Azidgruppe mit Triphenylphosphin unter milden Bedingungen mit 96 % Ausbeute zum Amin **141** reduziert (siehe Schema 4.24).^[157]



Schema 4.24: Reduktion von **131** zum Amin **141** mit Triphenylphosphin.

Amin TMM141 wird gleichzeitig mit hoher Reinheit erhalten (¹H-NMR, kein anderes Produkt).

Es wurden Versuche unternommen, eine Reduktion des Carbonsäureesters in **141** mit DIBAL bei erniedrigter Temperatur (0 °C)^[196] zu erreichen und so 3,5,6-tri-*epi*-Valienamin (**138**) darzustellen (siehe Schema 4.25).



Schema 4.25: Reduktion des Amins **141** zum 3,5,6-tri-*epi*-Valienamin (**138**) durch Reduktion mit DIBAL.

Freies 3,5,6-tri-*epi*-Valienamin (**138**) sollte aufgrund seiner starken Polarität durch Kieselgelchromatographie analog dem Valienamin (**101**) schlecht isolierbar sein.^[12] Unter Verwendung von Kationentauscherharz (DOWEX[®] 50Wx8, Elution mit 0.5 M NH₃-Lösung) war es nicht möglich, **138** zu isolieren. Es wurde deshalb versucht, das Reduktionsprodukt von **141** ohne Aufreinigung durch basenkatalysierte Acylierung^[12,197] in das *N,O*-Pentaacetat **142** zu überführen und durch Kieselgelchromatographie zu reinigen. NMR-spektroskopisch wurden verschiedene Acylierungsprodukte gefunden, bei denen teilweise eine Reduktion der Carbonsäureester-Gruppe nachgewiesen wurde. Die von T. K. M. Shing gemessenen

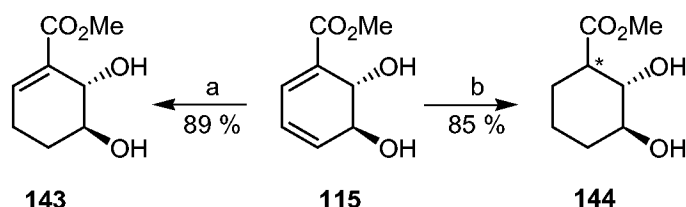
^1H -NMR-Daten für das enantiomere *N,O*-Pentaacetat des 4-*epi*-Valienamin^[197] wurden für keines der Acylierungsprodukte bestätigt.

Durch Einbringen von unpolaren Alkoholschutzgruppen in **141** oder auch **131** könnte gegebenenfalls eine selektive Umsetzung mit DIBAL und Isolation des geschützten 3,5,6-tri-*epi*-Valienamin erreicht werden.

Der in dieser Arbeit beschriebene Zugang zum Amin **141** erfolgt in vier Reaktionsschritten ausgehend von **1** mit einer Gesamtausbeute von 19 %.^[198]

4.5.4 Selektive Hydrierung von 2,3-*trans*-CHD

Eine Reduktion des Cyclohexadien-Systems im Methylester **115** gelingt durch Hydrierung an Palladium/Kohlenstoff.^[199] Bei 23 °C und 5 bar H_2 -Atmosphäre wird in Methanol regioselektiv die elektronenreiche Doppelbindung an C-3/C-4 hydriert (siehe Schema 4.26).

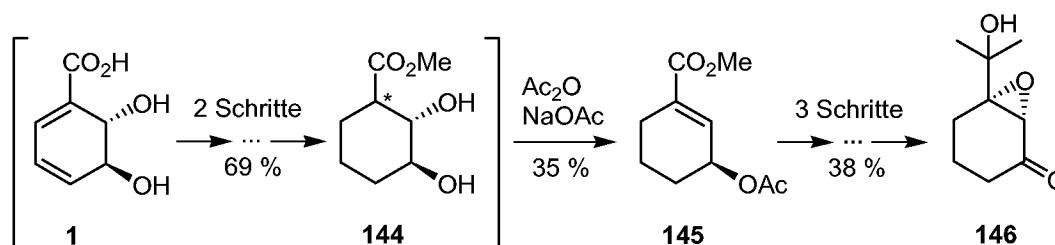


Schema 4.26: Selektive Hydrierung des Cyclohexadien-Systems in **115** zu **143** und **144**. Bedingungen sind: a) **2** (12 mM in MeOH), 5 bar (H_2), Pd/C, 23 °C, 21 h; b) **2** (12 mM in 2-Butanol), 5.5 bar (H_2), Pd/C, 90 °C, 16 h.

Eine Reduktion beider Doppelbindungen gelingt bei 90 °C und 5.5 bar H_2 -Atmosphäre in 2-Butanol. Die Ausbeuten liegen bei 89 % für die Einfachhydrierung und 85 % für die Doppelhydrierung. Eine Reduktion der Methylestergruppe wurde nicht beobachtet (^1H -NMR).

Die Konfiguration des neu entstandenen stereogenen Zentrums an C-1 im Cyclohexanderivat **144** konnte NMR-spektroskopisch nicht aufgeklärt werden.

Racemisches **144** wurde zur Synthese des Callicarpon-Analogs **146** verwendet, welches antimikrobielle Aktivität gegen Mycobakterien zeigt (siehe Schema 4.27).^[200]



Schema 4.27: Syntheseanschluss an die Darstellung des Callicarpon-Analogs **146**.^[200]

Unabhängig von der Konfiguration an C-1 ist ausgehend von **144** über das Cyclohexen **145** der formale Syntheszugang zu enantiomerenreinem **146** gegeben. Dieser Zugang eröffnet die

Möglichkeit der Untersuchung, welches Enantiomer von **146** die biologische Aktivität verursacht.

4.5.4 Zusammenfassung

Ausgehend von mikrobiell erzeugtem 2,3-*trans*-CHD **1** ist eine vielfältige Folgechemie zu pharmakologisch interessanten Zielstrukturen möglich (siehe Abbildung 4.22). Durch zweistufige Synthesefolge wurde der TBS-Ether **95** in 63 % Ausbeute synthetisiert. Mit der Valienaminroute von B. M. Trost^[12] ist somit eine Formalsynthese zu enantiomerenreinem *ent*-Valienamin ((-)-**101**) erschlossen.

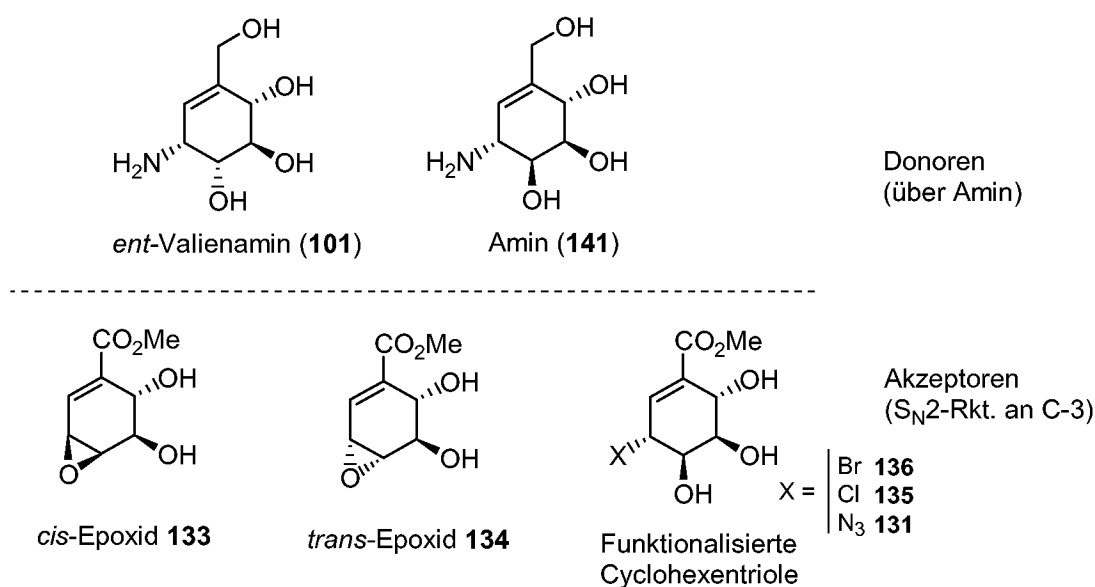


Abbildung 4.22: Akzeptor- und Donor-Substanzen für die Pseudooligosaccharid-Synthese.

Unter Verwendung von Schutzgruppentechnik zur Modifikation der Carbonsäuregruppe und der vicinalen Diolgruppe wurden regio- und stereoselektiv die Epoxide **133** (*cis*-Epoxid) und **134** (*trans*-Epoxid) erhalten, die durch Aktivierung der C-3- und C-4-Position zum Aufbau von höher funktionalisierten Strukturen geeignet sind. Bei **133** ist die C-3-Position aufgrund der benachbarten vinylogenen Akzeptorgruppe für nukleophile Angriffe reaktiver als die C-4-Position. So können aus **133** die 3-substituierten Cyclohexentriole **135** (Chlorid), **136** (Bromid), **131** (Azid) und **132** (Diethylamin) dargestellt werden, welche als Carbazucker von synthetischem Interesse sind.

Ausgehend von **131** ist durch Reduktion der Azidgruppe das Amin **141** enantiomerenrein zugänglich, einem Analogon des 3,5,6-tri-*epi*-Valienamins (**138**) zu welchem ebenfalls keine chemische Synthese beschrieben ist. Ausgehend von 2,3-*trans*-CHD **1** erfolgt die Synthese zu **141** in vier Reaktionsschritten mit 19 % Gesamtausbeute.

Das Cyclohexadien-System von **115** wurde selektiv an der elektronenreichen C-3/4-Position zum Cyclohexen-Derivat **143** hydriert, sowie zum Cyclohexan-Derivat **144** zweifach hydriert.

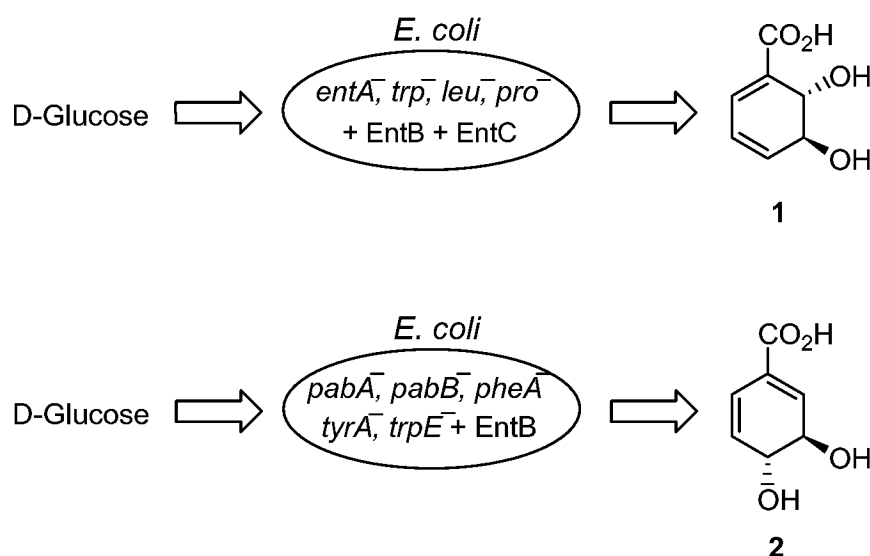
5. Diskussion und Ausblick

Zur Produktion der *trans*-CHD

Durch Methoden der Stoffflussderegulation (*metabolic pathway engineering*) in *E. coli* wurde ein mikrobieller Zugang zu funktionalisierten Cyclohexadien-*trans*-diolen (*trans*-CHD) geschaffen.

Die mikrobielle Produktion von 2,3-*trans*-CHD **1** wurde durch plasmidische Transformation und Überexpression der homologen Gene *entB* und *entC* in *E.-coli*-Stämmen mit *entA*⁻-Deletion erreicht. Unter nicht pH-geregelten Bedingungen betrugen die zellmassenspezifischen Produktbildungsrate 29 mg h⁻¹ g(BTM)⁻¹ (**1**) mit Glucose als C-Quelle, während in Stämmen ohne *entA*⁻-Deletion die Produktbildungsrate um zwei Drittel niedriger waren.

Die mikrobielle Produktion des isomeren 3,4-*trans*-CHD **2** wurde durch Transformation und Überexpression von *entB* erreicht. Während nach Transformation von Stämmen mit *entC*⁻/*menF*⁻-Deletion keine Bildung von **2** beobachtet wird, wurden durch Verwendung von Stämmen mit Mutationsdefekten in den Biosynthesewegen zu den aromatischen Aminosäuren und Folsäure zellmassenspezifische Produktionsrate von 19 mg h⁻¹ g(BTM)⁻¹ (**2**) mit Glucose als C-Quelle erzielt (siehe Schema 5.1).



Schema 5.1: Stoffflussderegulation in *E. coli* zur mikrobiellen Produktion von **1** und **2**.

Die mikrobielle Produktion der *trans*-CHD **1** und **2** gelingt dabei mit hoher Selektivität und ohne Verunreinigungen durch metabolische Nebenprodukte wie Chorismat (**3**) oder Isochorismat (**72**).

Die Transformation von *E.-coli*-Stämmen mit den Genen *entB* und *entC* über einen Vektor mit IPTG-induzierbarem Tac-Promotor (Plasmid pJF119EH1) hat den Vorteil, dass in den Zellen keine transkriptionale Repression durch Eisen auftritt. Aus diesem Grund ist eine Produktion der *trans*-CHD möglich, bei der nicht Wachstumsphase und Produktionsphase getrennt werden müssen. Zeitaufwendiges Ernten und Resuspendieren der Zellen in

eisenfreien Produktionsmedium wird so obsolet. Die mikrobielle Produktion der *trans*-CHD ist vollständig wachstumsentkoppelt.

Im Gegensatz zu den Enolpyruvoylverbindungen Isochorismat (**72**) und Chorismat (**3**) zeigen 2,3-*trans*-CHD **1** und 3,4-*trans*-CHD **2** gute thermische Stabilität in wässriger Lösung. Für **3** und **72** können autokatalytische Zersetzungsreaktionen angenommen werden, die nach konzertiertem Reaktionsmechanismus über pericyclische Übergangszustände verlaufen. In den *trans*-CHD **1** und **2** fehlt dagegen die Enolpyruvoylgruppe, so dass diese Substanzen bei 23 °C und pH 7 stabil sind.

Aufgrund der Stabilität der *trans*-CHD auch unterhalb des pK_s -Wertes der Carbonsäuren ($pK_s = 4.2$ für **1**) sind verschiedene Möglichkeiten der Isolation erfolgreich, die die unterschiedlichen physikalischen Eigenschaften der *trans*-CHD im protonierten und nicht-protonierten Zustand ausnutzen, durch Extraktion, Reaktivextraktion und Ionentauschchromatographie.

Aufbauend auf der mikrobiellen Produktion von 2,3-*trans*-CHD **1** wurde ein biotechnologischer Prozess zur präparativen Darstellung und Isolation von **1** etabliert (siehe Abbildung 5.1).

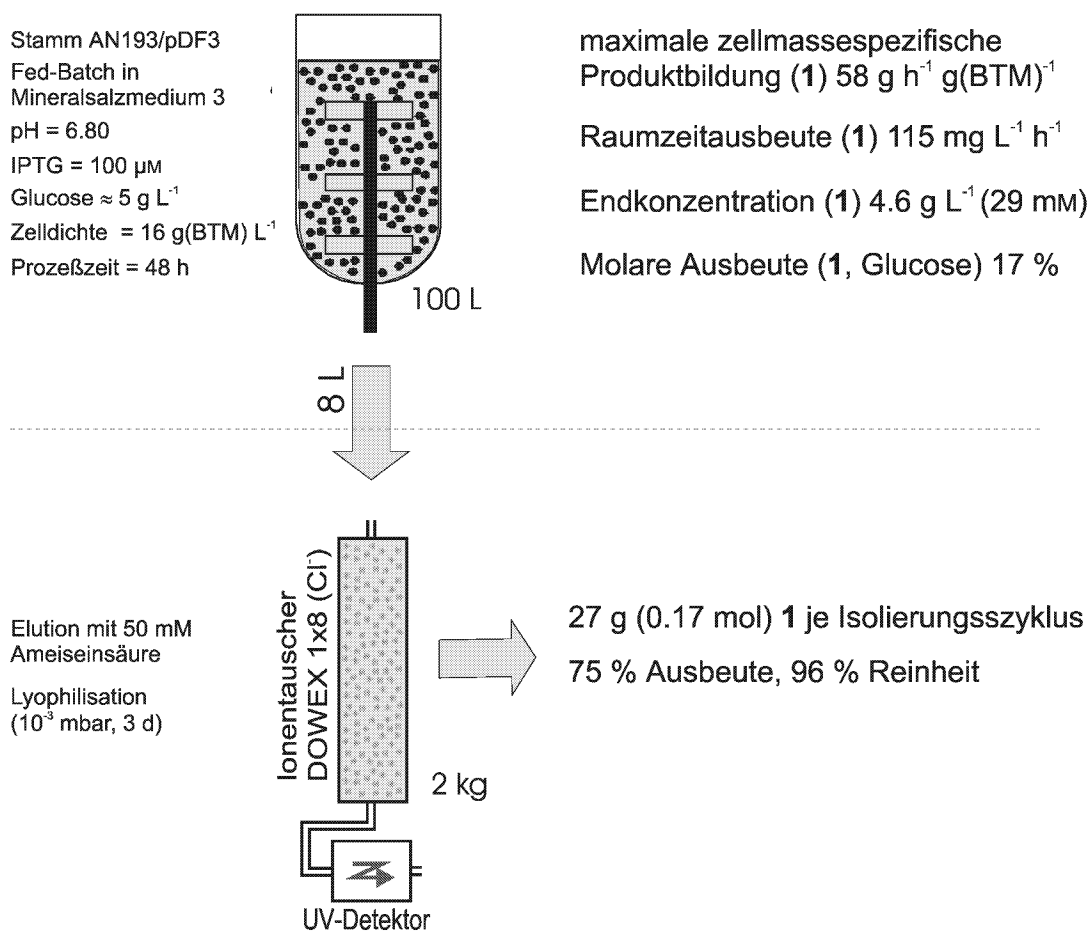
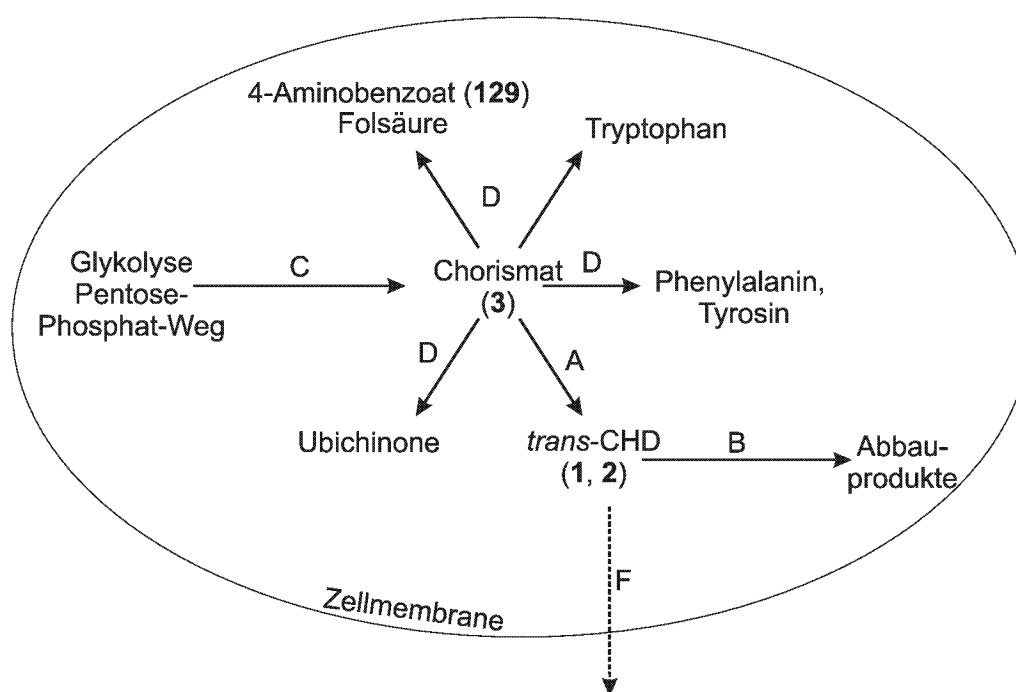


Abbildung 5.1: Prozesscharakteristika der mikrobiellen Produktion und Isolation von **1**.

Unter pH-geregelten Bedingungen erhöht sich die maximale zellmassenspezifische Produktbildungsrate (**1**) auf $58 \text{ mg h}^{-1} \text{ g(BTM)}^{-1}$. Die molare Ausbeute bezogen auf Glucose beträgt 17 %. Bezogen auf die maximal erreichbare theoretische Ausbeute von etwa 43 %^[49] beträgt die relative molare Ausbeute 40 %.

Nach Isolation durch Ionentauschchromatographie wird **1** in 96 % Reinheit erhalten. Die Ausbeute des Isolierungsprozesses beträgt 73 %.

Es kann angenommen werden, dass ausgehend von den hier beschriebenen *E.-coli*-Stämmen zur *trans*-CHD-Produktion weitere Steigerungen der Produktionsleistungen und molaren Ausbeuten durch metabolische Deregulierungen erreicht werden könnten (siehe Schema 5.2).



Schema 5.2: Ansätze der Stoffflussderegulation (*metabolic engineering*) zur Produktion von *trans*-CHD ausgehend vom „branch point“-Metaboliten Chorismat (3) sind: Erhöhung der Stoffflüsse (A) und (C); Verringerung der Stoffflüsse (B) und (D); Erhöhung des Zellmembrantransportes der *trans*-CHD (F).

Ausgehend vom „branch point“-Metaboliten Chorismat (3) wurde bereits in dieser Arbeit eine Bildung der *trans*-CHD **1** und **2** durch Verstärkung des metabolischen Flusses (A) beschrieben. Im Fall von **1** wurde die Steigerung der Produktbildung durch Unterbindung der Abbaureaktion (B) über entsprechende chromosomale Deletion erreicht. Im Fall von **2** ermöglichte erst eine Verhinderung der enzymatischen Abbaureaktionen (D) von **3** zu Tyrosin, Tryptophan, Phenylalanin, und 4-Aminobenzoat (**129**), zusätzlich zur Verstärkung des metabolischen Flusses (A), eine Produktbildung, während alleinige Veränderung der Flüsse (D) oder (A) nicht zur Bildung von **2** führten.

Eine weitere Verbesserung der Produktion von **1** könnte möglicherweise durch Verringerung der Abbaureaktion (D) entsprechend der Produktion von **2** erreicht werden. Eine

chromosomale Deletion von *entA* in Stamm BN117 und anschließende Transformation des Plasmids pDF3 könnte erfolgversprechend sein.

2 besitzt im Gegensatz zu **1** keine gesicherte physiologische Bedeutung in lebenden Systemen und eine Enzymreaktion (B), durch welche **2** abgebaut wird, ist nicht bekannt.

Bislang ungeklärt ist, ob eine Verbesserung der Produktionsleistung (**1** und **2**) durch Verstärkung des Eingangs-Biosyntheseweges (C) zu Chorismat (**3**) erreicht werden kann. Interessant ist insbesondere, ob dies durch Veränderungen im Zentralstoffwechsel insbesondere durch Erhöhung der Produktion von E4P (**65**) oder durch Ausschalten des PEP (**66**) verbrauchenden PTS-Systems unter Einbringung neuer Glucose-Aufnahme und -Phosphorylierungssysteme zu erreichen ist.^[201]

Die Transportmechanismen, welche zur Exkretion der *trans*-CHD aus der Zelle führen, sind ebenfalls nicht bekannt. Für polare und ionische Substanzen existieren in der Regel spezifische Transportsysteme, dennoch erscheint die Annahme nicht sinnvoll, dass sich selektive Transporter für *trans*-CHD evolutiv entwickelt haben, da *E. coli* unter Energieverbrauch aufgenommene Substanzen mit potentiell physiologischem Wert nicht exkretieren sollte. Eine Verbesserung der Produktionsleistung von **1** oder **2** könnte bei Kenntnis des entsprechenden Mechanismus durch eine Erhöhung der Leistung des Membrantransportes der *trans*-CHD (F) erreicht werden.

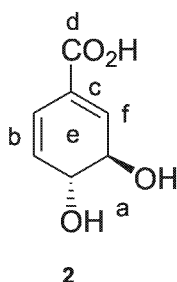
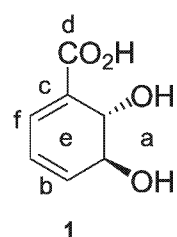
Mit Techniken des „*molecular breeding*“ von Biosynthesewegen sollten zukünftig verstärkt auch Substanzen mit Mikroorganismen zugänglich sein, die nicht im natürlichen Metabolismus vorkommen, bzw. keine bekannte physiologische Bedeutung haben. Möglich ist, nicht nur auf Veränderungen der Enzymaktivitäten zur Stoffflussderegulationen aufzubauen, sondern ebenfalls die Substratspezifitäten der Enzyme (homolog oder heterolog) zu verändern und so neue metabolische Systeme zu schaffen. Am Beispiel der Biosynthese neuartiger Carotenoide wurde dies erstmals von F. H. Arnold und C. Schmidt-Dannert demonstriert.^[202]

Zur Verwendung der trans-CHD

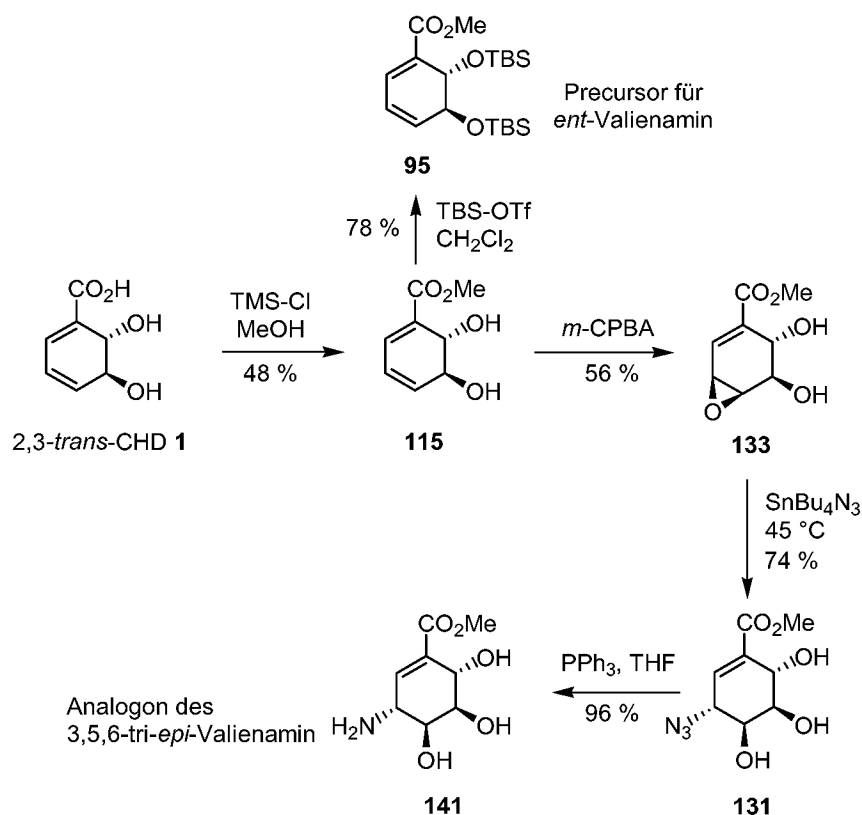
Der hohe Funktionalisierungsgrad von **1** und **2** durch Carbonsäuregruppe, chirale Alkoholgruppen und Alkadien-System eröffnet ein breites Spektrum von operativen Angriffspunkten zur Synthese pharmakologisch interessanter Zielstrukturen (siehe Abbildung 5.2).

Einige der chemischen Modifizierungen wurden bereits auf 2,3-*trans*-CHD **1** in dieser Arbeit angewendet, einschließlich Schutzgruppeneinführung an der Diolgruppe (a), Addition und Epoxidierung an C-3/C-4 (c), sowie selektive Hydrierung an C-3/C-4 (c) und Hydrierung beider Alkengruppen (b, c).

Durch Aminohydroxylierung (drei Schritte) an C-3/C-4 (c) konnte aus 2,3-*trans*-CHD (**1**) in einer vierstufigen Synthese der Aminocarbazucker **141** synthetisiert werden, der ein Analogon für 3,5,6-tri-*epi*-Valienamins (**138**) darstellt (siehe Schema 5.3).



- a) **vicinale Dioleinheit (chiral)**
Schutzgruppentechnik
S_N2-Reaktionen
Glycolspaltung zu C₇-Einheiten
- b) **Alkenfunktion 1 (elektronenreich)**
selektive Epoxidierung
selektive Additionen
selektive Ozonolyse zu C₇-Einheiten
- c) **Alkenfunktion 2 (elektronenarm, sterisch abgeschirmt)**
Epoxidierung
Additionen
Ozonolyse zu C₅-Einheiten
- d) **Carbonsäureeinheit**
S_N2_T-Reaktionen
C-C-Anbindungen
Reduktion
- e) **Diensystem**
Diels-Alder-Reaktionen
Hetero-Diels-Alder-Reaktionen
¹O₂-Addition
- f) **Vinyloges Akzeptorsystem (Michael-Akzeptor)**
1,2-Additionen
1,4-Additionen
Substitutionen

Abbildung 5.2: Operative Seiten des 2,3-*trans*-CHD **1** und des 3,4-*trans*-CHD **2**.Schema 5.3: Darstellung des Analogons von 3,5,6-tri-*epi*-Valienamin (**141**) aus 2,3-*trans*-CHD **1**.

Die Synthese ist dadurch charakterisiert, dass auf Schutzgruppentechniken, bis auf die Carbonsäureveresterung, verzichtet wird. Die Ausbeute der enantioselektiven Synthese zu

141 ausgehend von **1** beträgt 19 %. Eine Röntgenstrukturanalysen der Zwischenverbindung *cis*-Epoxid **133** bestätigt die abgebildete relative Konfiguration der Substituenten von **133**. Die Stereochemie des Azidohydrins **131** wurde über NMR-spektroskopische Analyse anhand charakteristischer Kopplungskonstanten nachgewiesen.

Mit der von T. K. M. Shing beschriebenen Synthese von 4-*epi*-Valienamin in 15 Reaktionsschritten mit 11 % Ausbeute aus Shikimat (**71**)^[195] ist nun ein Aminocarbazucker mit der Konfiguration des zu 4-*epi*-Valienamin enantiomeren 3,5,6-tri-*epi*-Valienamins (**138**) selektiv darstellbar.

Durch Überführung der Komponente **135** zum TBS-Ether **95** wurde formell der Syntheseanschluß zu enantiomerenreinem *ent*-Valienamin ((-)-**101**) über die von B. M. Trost beschriebene Route^[12] erreicht. Die Darstellung von **95** aus 2,3-*trans*-CHD **1** in zwei Schritten mit 78 % Ausbeute stellt eine verkürzte Syntheseroute zur enantioselektiven Synthese von B. M. Trost aus Cyclohexendibenzoaten über Palladiumkatalyse dar. Bei dieser wird **95** in zehn Reaktionsstufen mit 6 % Ausbeute dargestellt. Von Nachteil ist, dass aus mikrobiell erzeugtem **1** auf dieser Route ausschließlich (-)-**101**, nicht jedoch (+)-**101** darstellbar ist.

Aminocyclitole (**141** und (-)-**101**) stellen in sich selber bereits potentielle Glycosidase-Inhibitoren dar. Dies läßt sich anhand der konfigurativen Beziehungen zu den Monosacchariden ableiten (siehe Abbildung 5.3).

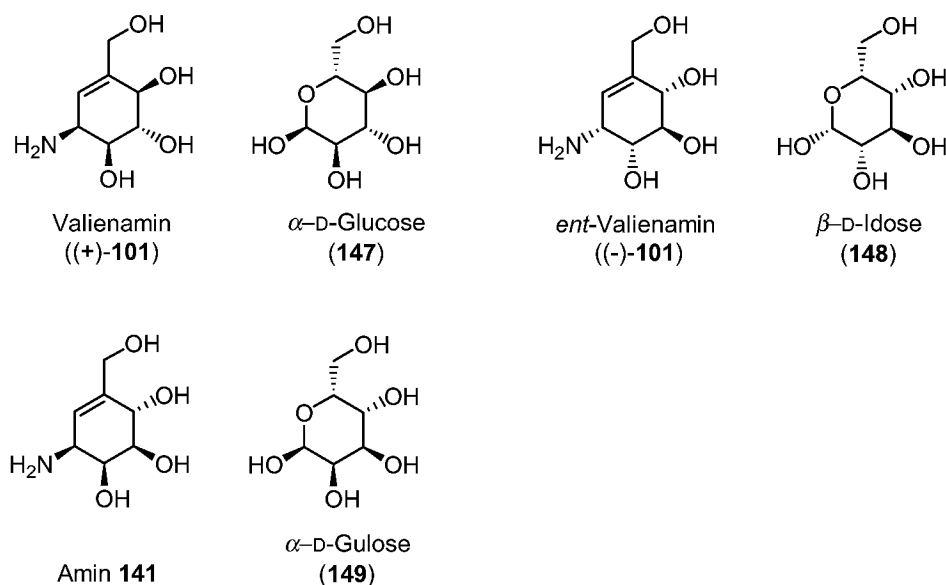


Abbildung 5.3: Konfigurative Beziehung zwischen den Aminocarbazuckern (+)-**101**, (-)-**101**, **141** und den entsprechenden Monosacchariden **147**, **148** und **149**.

Während natürlich vorkommendes Valienamin ((+)-**101**) stereochemisch ein Analogon von α-D-Glucose (**147**) ist, sind *ent*-Valienamin ((-)-**101**) und Amin **141** Analoga von β-D-Idose (**148**) und α-D-Gulose (**149**). Die Aminocarbazucker (+)-**101**, (-)-**101** und **141** stellen potentielle Mimetika für die natürlichen Zucker **147**, **148** und **149** dar.

Das natürlich vorkommende Valienamin ((+)-**101**) ist als Cyclitoleinheit in zahlreichen Pseudooligosacchariden mit glycosidase-inhibitorischer Aktivität und therapeutischem Wert zur *Diabetes-mellitus*-Behandlung enthalten, einschließlich Acarbose (**5**),^[203] Adiposin,^[204] Trestatin,^[205] Salbostatin^[206] und Amylostatin.^[207] Das Antibiotikum Validamycin A, welches im Nahen Osten zur Behandlung von Mehltau-Erkrankungen bei Reispflanzen eingesetzt wird,^[208] enthält sowohl Valienamin ((+)-**101**) als auch das Dihydroderivat Validamin als Substrukturen.^[209]

Sowohl *ent*-Valienamin ((-)-**101**) und Amin **141**, als auch die aus 2,3-*trans*-CHD **1** in dieser Arbeit ebenfalls dargestellten Epoxide **133**, **134** und funktionalisierten Cyclohexentriole **131**, **135** und **136** sind mögliche Synthesebausteine zur Darstellung von analogen Pseudooligosacchariden (siehe Abbildung 5.4)

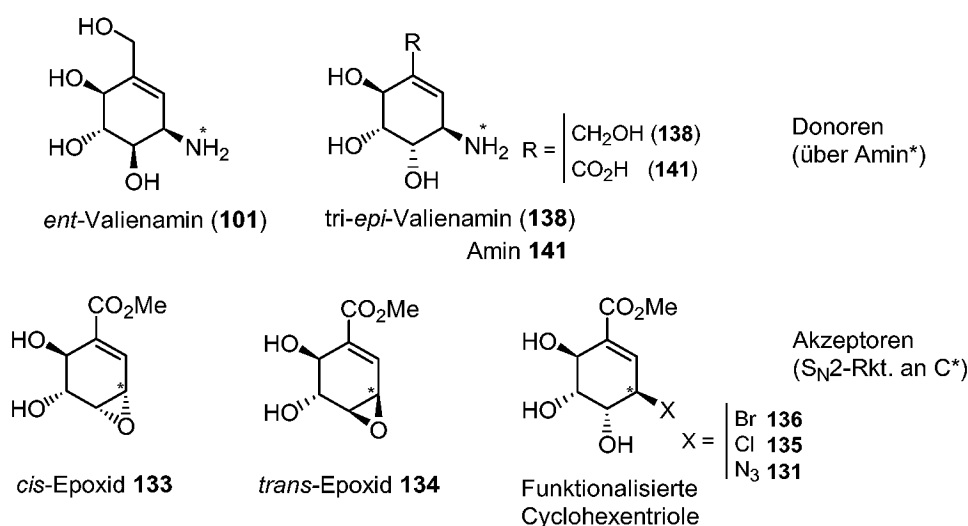


Abbildung 5.4: Aus 2,3-*trans*-CHD **1** zugängliche Donor- und Akzeptor-Bausteine für die Pseudooligosaccharid-Synthese.

Mögliche Anknüpfungspunkte für Folgeuntersuchungen

Die Bausteine **101** und **141** könnten als N-Donoren über reduktive Aminierung mit einem Ketozucker zur Synthese von Pseudooligosacchariden genutzt werden. Dies kann theoretisch sowohl mit chemischen Methoden über reduktive Aminierung,^[210] oder mit enzymatischen Methoden über Glycosyltransferasen^[211] erfolgen.

Amin **141** besitzt eine Carbonsäureestergruppe an C-1, welche zur direkten Einführung weiterer funktioneller Gruppen über S_N2_t-Reaktionen^[212] unter C-C-Knüpfung verwendbar ist.

Cis-Epoxid **133**, *trans*-Epoxid **134**, sowie die funktionalisierten Cyclohexentriole **131**, **135**, **136** besitzen eine für nukleophile Substitution aktivierte Position an C-3, die als Akzeptorgruppe für Stickstoff zur Synthese von Pseudooligosacchariden verwendbar ist, wie bereits durch die Verknüpfung von Diethylamin an das *cis*-Epoxid **133** geschehen. Eine enzymatische Verknüpfung mit Aminen über Glycosyltransferase-Katalyse analog der

Biosynthese von Maltooligosacchariden durch Transaminierung aus Acarbose (**5**)^[213] könnte eine Alternative zur chemischen Verknüpfung darstellen.

Durch Verwendung der genannten Bausteine mit unterschiedlicher Stereochemie als Baustein für die Cyclitoleinheit sowie Verknüpfung mit verschiedenen, teilweise kommerziell erhältlichen Restzuckern ist die Synthese von zahlreichen Pseudooligosaccharid-Analoga und von Pseudooligosaccharid-Bibliotheken vorstellbar.

Zahlreiche Natur- und Wirkstoffe, einschließlich Naturstoffmimetika, besitzen ebenfalls ein modifiziertes funktionalisiertes Cyclohexandiol-Gerüst mit *trans*-ständiger Diol-Einheit und könnten prinzipiell ausgehend von *trans*-CHD dargestellt werden (siehe Abbildungen 5.5 und 5.6).

Die Syntheseroute von T. Hudlicky et al.^[43] zum Pflanzenmetaboliten Zeylena (**94**)^[214] aus einem *trans*-CHD wurde bereits erwähnt (siehe Kapitel 3.4). Da das *trans*-CHD aus *cis*-CHD durch *diastereomeric switch* in fünf Syntheseschritten mit 26 % Ausbeute erhalten wird, ist es naheliegend, dass *trans*-CHD hier direkt eingesetzt werden können.

Simmondsin (**158**) ist ein Hauptbestandteil der Samen der Jojoba-Pflanze *Simmondsia chinensis*.^[215] Eine chemische Synthese zu diesem interessanten Naturstoff mit glycosidase inhibitorischer Aktivität, welcher die reduzierte Grundstruktur von mikrobiell produziertem 2,3-*trans*-CHD **1** mit der richtigen Stereokonfiguration enthält, ist nicht literaturbekannt.

Der Precursor **150** wurde von R. B. Woodward^[216] in der ersten Synthese des Yohimbin-Alkaloids (–)-Reserpin eingesetzt. In der ursprünglichen Woodward-Synthese wurden racemische Ausgangsverbindungen eingesetzt und die Intermediate durch aufwendige Racematspaltung enantioselektiv angereichert. Obwohl zahlreiche Syntheseansätze zu isomeren Produkten beschrieben wurden,^[217–219] sind nur zwei enantioselektive Synthesen zu Reserpin bekannt. Eine Syntheseroute nach G. Stork^[220] verwendet ebenfalls Racematspaltung eines Intermediaten. Eine zweite, kürzlich von S. Hanessian^[221] erschienene Syntheseroute, baut auf der *chiral-pool*-Substanz Quinat (**69**) auf. Durch eine Synthese ausgehend von 2,3-*trans*-CHD **1** sollte (+)-Reserpin zugänglich sein, zu dem bisher keine Syntheseroute beschrieben ist.

Nemadectin $\alpha 2$ (**157**), ein Breitband-Endektozid zur Therapie von caniden gastrointestinalen Helminthen-Befall (Würmer-Befall bei Hunden),^[222] enthält das reduzierte Grundgerüst von 3,4-*trans*-CHD **2** mit weiteren Funktionalisierungen an 2- und 5-Position. Gleiches gilt für das Antibiotikum Rancinamycin III (**154**) (verschiedene Epimere),^[223] welches ausgehend von 3,4-*trans*-CHD **2** durch Dihydroxylierung an 5- und 6-Position und Reduktion der Carbonsäuregruppe formal erhältlich ist.

Auch zahlreiche Terpene mit unterschiedlichen biologischen Funktionen in Pflanzen besitzen Strukturen mit *trans*-ständigen vicinalen Dioleinheiten an einem funktionalisierten Cyclohexan-Systemen, wie 3,4-Epoxy-7(14),10-bisboladien-1,2,8-triol (**156**) (Sesquiterpen),

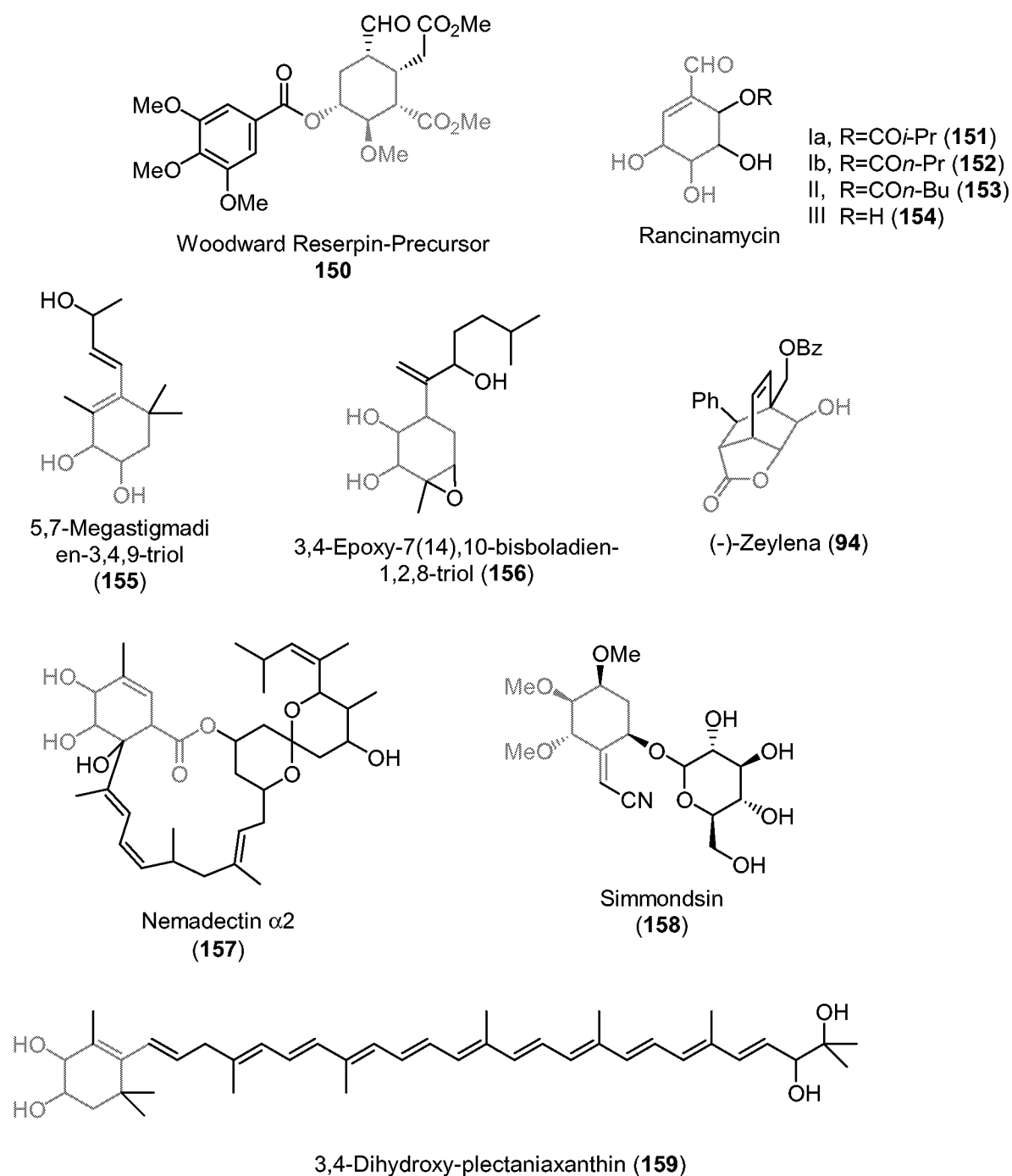


Abbildung 5.5: Zielstrukturen mit Substrukturen, welche sich von *trans*-CHD ableiten lassen; 1. Teil: Substanzen mit allgemeiner biologischer Aktivität. Bei nicht angegebener Stereochemie ist diese nicht aufgeklärt.

3,4-Dihydroxy-pectaniaxanthin (**159**) (Tetraterpen) und 5,7-Megastigmadien-3,4,9-triol (**155**) aus Blättern von Japanischen *Alangium platanifolium* (Monoterpen).^[224] Zu diesen Substanzen sind keine effizienten Syntheserouten bekannt. Über eine Totalsynthese der Naturstoffe **155**, **156**, **157** und **159** ausgehend von *trans*-CHD könnten die noch nicht bekannten Konfigurationen dieser Substanzen durch NMR-Spektroskopie aufgeklärt und bewiesen werden.

Mikrobiell produzierte *trans*-CHD könnten ebenfalls Verwendungsmöglichkeiten in der Synthesechemie komplexerer Strukturen, wie der Synthese von Immunsuppressiva finden (siehe Abbildung 5.6).

Seit den 90er Jahren des letzten Jahrtausend haben Immunsuppressiva wie FK506 (**160**) und FR65814 (**161**) in der medikamentöse Begleitbehandlungen von Transplantationspatienten verstärkt an Bedeutung erlangt und haben das vormals verwendete stark toxische Cyclosporin vollständig substituiert.^[225]

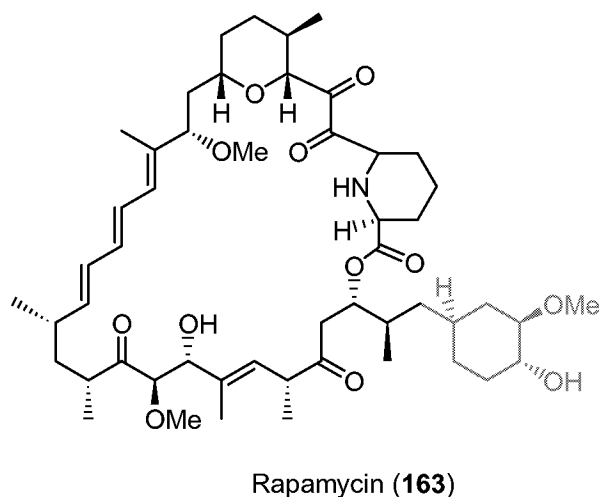
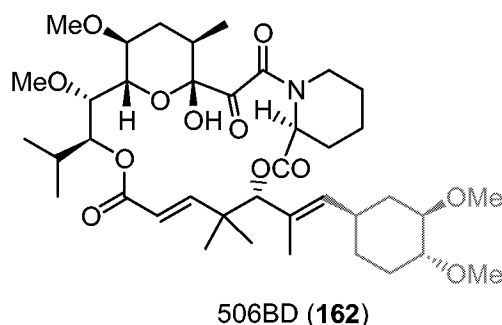
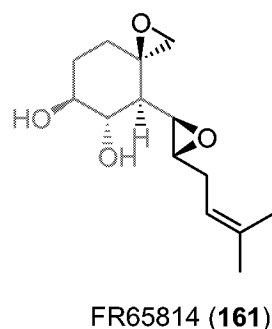
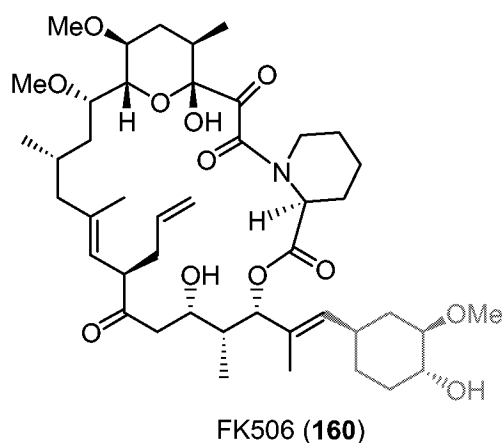
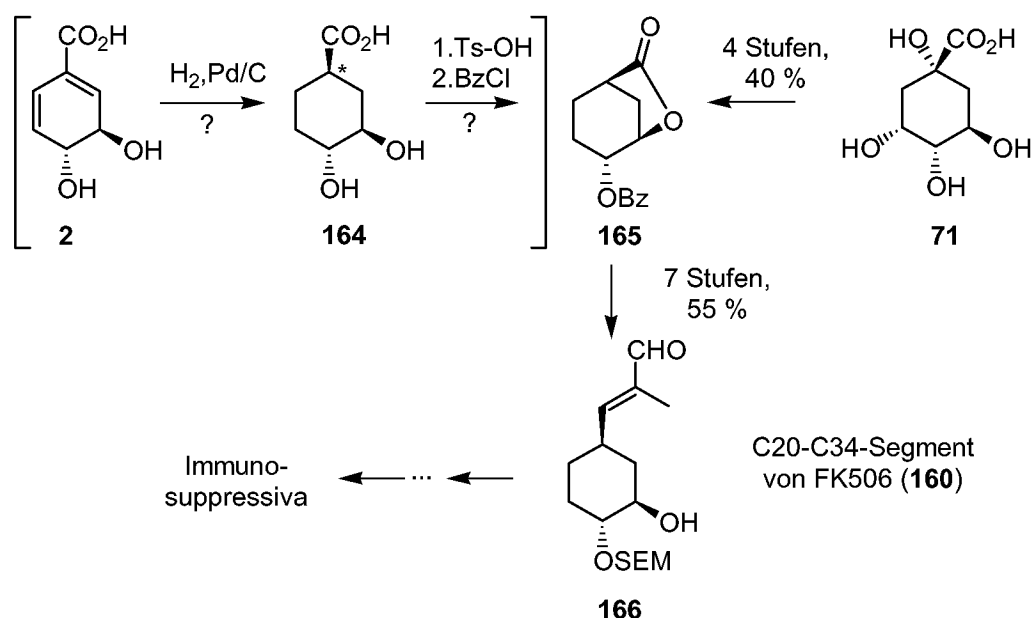


Abbildung 5.6: Zielstrukturen mit Substrukturen, welche sich von *trans*-CHD ableiten lassen; 2. Teil: Substanzen mit immunsuppressiver Aktivität.

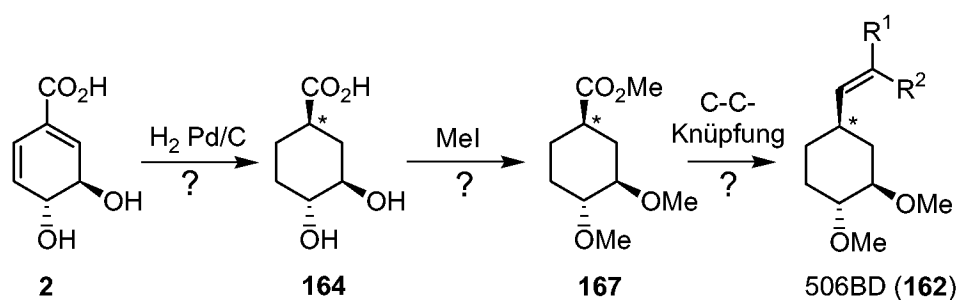
S. L. Schreiber benutzte in seiner FK506-Synthese^[226] funktionalisierte Cyclohexan-*trans*-diole als Ausgangsmaterialien. Da diese Bausteine im Gegensatz zu den *trans*-CHD keine Tendenz zu Aromatisierung zeigen, sind sie ebenfalls leicht aus funktionalisierten 3,4-Cyclohexenen durch Epoxidierung und Epoxidöffnung erhältlich, jedoch ist zur Wirkstoffsynthese nur eines der zwei möglichen enantiomeren Produkte mit *trans*-Diol-Konfiguration zu verwenden. Eine von J. D. White und Mitarbeitern^[227] entwickelte enantio-selektive Syntheseroute zur FK506-Teilstruktur **166** (C20-C34-Segment) geht deshalb von Shikimat (**71**) als *chiral pool*-Baustein (siehe Schema 5.5).



Schema 5.5: Mögliche Verwendung von 3,4-*trans*-CHD **2** als chiraler Synthesebaustein für die Synthese von FK506 (**160**) und anderen Immunosuppressiva. * Neue chirale Information.

Als Zwischenverbindung wird das Lacton **165** aus Shikimat (**71**) in vier Reaktionsstufen mit 40 % Ausbeute erhalten. Ein effizienterer Zugang zu Lacton **165** sollte durch Verwendung von 3,4-*trans*-CHD **2** erreichbar sein, da dieses nach Hydrierung lediglich lactonisiert und geschützt werden müsste, was möglicherweise auch in einem Schritt erfolgen kann. Möglichkeiten der enantioselektiven (asymmetrische) Hydrierung unter Einführung der chiralen Information in **165** sind durch gut etablierte Methoden der Homogen- und Heterogenkatalyse^[228] gegeben.

Gleiches gilt für 506BD (**162**)^[229] und Rapamycin (**163**)^[230] welche ebenfalls das reduzierte Grundgerüst von **2** als Teilstruktur enthalten. Die Teilstruktur von **162** ist ausgehend von **2** in zwei Schritten durch Reduktion und Methylierung der Alkoholgruppen denkbar (siehe Schema 5.6).



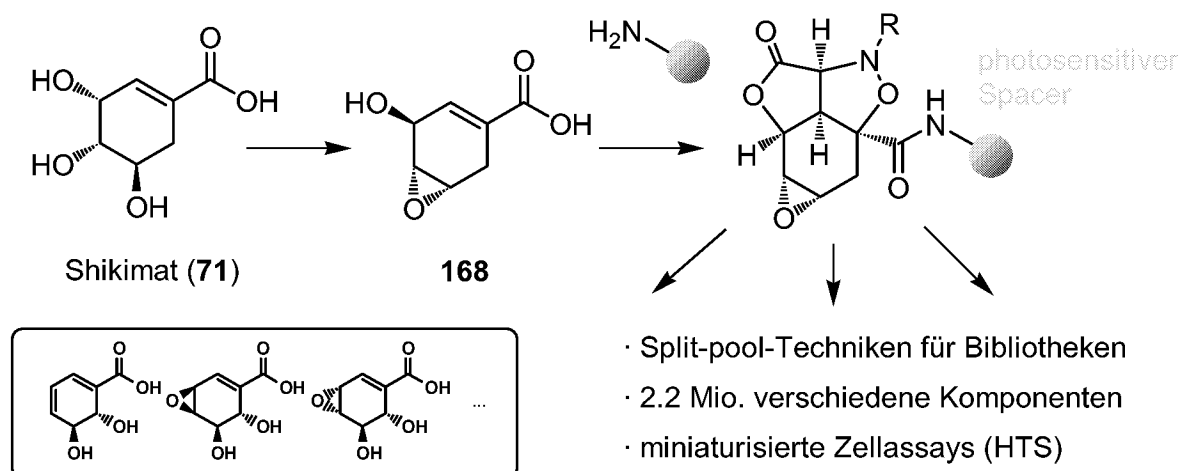
Schema 5.6: Mögliche Verwendung von 3,4-*trans*-CHD **2** zur Synthese von 506BD (**162**). * Neue chirale Information

Synthesen zum Immunosuppressivum FR65814 (**161**) ausgehend von 3,4-*trans*-CHD-Derivaten liegen auch nahe, sind jedoch ebenfalls noch nicht untersucht worden. **161** wird

bisher durch aufwendige Isolierung aus Fermentationsüberstand von *Penicillium* sp.^[231] oder mehrstufige Synthesen ausgehend von Glucose^[232] gewonnen.

Eine weitere interessante Anwendungsmöglichkeit für *trans*-CHD sowie deren Derivate ist die Verwendung als Ausgangsmaterial in diversifizitätsorientierten organischen Synthesen zur Wirkstofffindung.^[233] Konträr zu den in dieser Arbeit vorgestellten selektiven Synthesen potentiellen Wirkstoffen ist es Ziel der diversifizitätsorientierten Synthesen, Bibliotheken von Zielstrukturen zu erhalten, in denen jedes Element in nachweisbaren Mengen enthalten ist. Zu einer solchen Synthese werden *split pool*-Techniken und anderen Techniken der kombinatorischen Chemie eingesetzt.

Wie bereits in dieser Arbeit beschrieben, sind *trans*-CHD und die Epoxide **133** und **134** aufgrund ihres hohen Funktionalisierungsgrades gut dazu geeignet, als Startmaterial für eine vielfältige Folgechemie verwendet zu werden. Über die Carbonsäuregruppe sollte zudem auch eine peptidische oder amidische Anknüpfung an polymere oder dendritische Träger möglich sein, so dass eine Aufreinigung der Strukturbibliotheken vereinfacht wird. Eine Anbindung und Verwendung von Shimikat-Derivat **168** ist von S. L. Schreiber et al. zur Synthese einer 2.2 Millionen Einzelstrukturen enthaltene Bibliothek beschrieben (siehe Schema 5.7).^[234]



Schema 5.7: Diversifizitätsorientierte Synthese von Substanz-Bibliotheken durch *split-pool*-Technik nach S. L. Schreiber et al.^[234] ausgehend von Shikimat-Derivaten.

Durch Polymeranbindung über amidische Verknüpfung der Carbonsäuregruppe mit einem photosensitiven, polymergebundenen Spacer wurden von S. L. Schreiber et al. die Bibliotheken frei von Reagentien erhalten werden. Quantitative Reagenzabtrennung ist eine wichtige Voraussetzung für die Verwendung der Bibliotheken in miniaturisierten Hochdurchsatz-Screening-Verfahren (HTS-Verfahren)^[235] und anderen biologischen Screening-Assays.

6. Experimenteller Teil

6.1 Molekularbiologische Arbeiten

6.1.1 Verwendete *E.-coli*-Stämme und Plasmide

Es wurden die in Tabelle 6.1 angegebenen *E.-coli*-Stämme und die in Tabelle 6.2 angegebenen Plasmide verwendet.

Tabelle 6.1: Verwendete *E.-coli*-Stämme.

Stamm	Relevanter Genotyp	Referenz
DH5 α	F ⁻ <i>endA1 hsdR17(r_k⁻m_k⁺) recA1 supE44 thi-1 Δ(lacZYA-argF)U169 Φ80lacZΔM15</i>	Hanahan ^[137]
W3110	F ⁻ λ^- IN(<i>rrnD-rrnE</i>) prototroph	Lederberg ^[129]
AN193 ^a	<i>trpE38 leuB6 proC14 lacY1 fhuA23 rpsL109(str^R) λ^- entA403</i>	Gibson ^[139,140]
H1882 ^a	<i>araD139 Δ(argF-lac)169 λ^- flhD5301 rpsL150(str^R) Δ(fepA-ent)</i>	Casadaban ^[138]
PBB8 ^b	F ⁻ <i>lacIq Δ(lon) hflA150::Tn10 Δ(argF-lac)169 proA⁺ araD139 rpsL λ^- entC⁻ menF⁻</i>	Leistner ^[141]
BN117 ^c	<i>pabA1 pabB::Kn pheA1 tyrA4 trpR(Tn10) ΔtrpEA2 his4 proA2 argE3 rpsL704</i>	Nichols ^[142]

^a Freundlicherweise erhalten von Professor Dr. Klaus Hantke, Universität Tübingen.

^b Freundlicherweise erhalten von Professor Dr. Eckard Leistner, Universität Bonn.

^c Freundlicherweise erhalten von Professor Dr. Brian P. Nichols, University of Illinois at Chicago, USA.

Zur Stammhaltung werden *E.-coli*-Zellen aus der mittellogarithmischen Phase (LB-Medium, OD 3) geerntet, mit 50 % (v/v) Glycerol versetzt und die Suspensionen bei -70 °C gelagert. Für Zeiträume von bis vier Wochen werden die *E.-coli*-Kulturen auf Agarplatten bei 4 °C aufbewahrt.

Tabelle 6.2: Verwendete und konstruierte Plasmide.

Plasmid	Größe [bp]	Relevante Merkmale	Referenz
pJF119EH1	5428	Amp ^R , <i>lacI^q</i> , <i>Ptac</i> , <i>ori</i> colE1	Fürste ^[127]
pDF1	6328	<i>entB</i> (900 bp) aus <i>E. coli</i> kloniert in pJF119EH1 (<i>Bam</i> HI/ <i>Pst</i> I)	diese Arbeit
pDF2	6637	<i>entC</i> (1209 bp) aus <i>E. coli</i> kloniert in pJF119EH1 (<i>Sac</i> I/ <i>Bam</i> HI)	diese Arbeit
pDF3	7537	<i>entC</i> (1209 bp) aus <i>E. coli</i> kloniert in pDF1 (<i>Sac</i> I/ <i>Bam</i> HI)	diese Arbeit

6.1.2 Verwendete Medien und Chemikalien

Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen Aldrich, Fluka und Merck bezogen (Reinheitsgrad p.a.).

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

LB-Medium (nach Sambrook et al.)^[236]

Das LB-Medium enthält: 10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 5 g (86 mmol) NaCl, H₂O_{dem.} ad 1 L. Zur Herstellung von Kultivierungsplatten werden 1.5 % (w/v) Agar hinzugegeben.

Mineralsalzmedium 1 (nach E. Leistner)^[15]

Das Produktionsmedium 1 wird aus zwei Einzellösungen hergestellt. Lösung A enthält: 16.1 g (90 mmol) Na₂HPO₄·2H₂O, 2.7 g (50 mmol) NH₄Cl, 1.36 g (10 mmol) KH₂PO₄, 20.3 mg (0.10 mmol) MgCl₂·6H₂O, H₂O_{dem.} ad 1 L. Nach dem Autoklavieren wird über einen Sterilfilter Lösung B, die Lösungen mit Kohlenstoffquelle sowie Antibiotikum hinzugegeben. Lösung B (100×) besteht aus: 100 mg (0.30 mmol) Thiaminhydrochlorid, 100 mg (0.76 mmol) Leucin, 100 mg (0.87 mmol) Prolin, 100 mg (0.74 mmol) Adenin, 100 mg (0.49 mmol) Tryptophan, 100 mg (0.65 mmol) 2,3-Dihydroxybenzoesäure, 20 mg (51 µmol) (NH₄)₂Fe(SO₄)₂·6H₂O, H₂O_{dem.} ad 50 mL.

Mineralsalzmedium 2 (nach J. G. Pan)^[147]

Das Mineralsalzmedium 2 enthält: 13.0 g (96 mmol) KH₂PO₄, 10.0 g (57 mmol) K₂HPO₄, 6.0 g (43 mmol) NaH₂PO₄·2H₂O, 2.0 g (15 mmol) (NH₄)₂SO₄, 0.2 g (3.7 mmol) NH₄Cl, 3.0 g (12 mmol) MgSO₄·7H₂O, H₂O_{dem.} ad 1 L. Nach dem Autoklavieren wird über einen Sterilfilter die Spurenlösung nach J. G. Pan,^[147] die Lösung der Kohlenstoffquelle, Supplementlösung und Lösung mit Antibiotikum zugegeben.

Mineralsalzmedium 3 (modifiziertes Mineralsalzmedium 2)^[153]

Das Mineralsalzmedium 3 für optimierte Produktion und Wachstum (verändert nach J. G. Pan et al.^[147]) enthält: 13.0 g (96 mmol) KH₂PO₄, 10.0 g (57 mmol) K₂HPO₄, 6.0 g (43 mmol) NaH₂PO₄·2H₂O, 2.0 g (15 mmol) (NH₄)₂SO₄, 5.0 g (93 mmol) NH₄Cl, 3.0 g (12 mmol) MgSO₄·7H₂O, H₂O_{dem.} ad 1 L. Nach dem Autoklavieren wird über einen Sterilfilter die Spurenlösung nach J. G. Pan,^[147] die Lösung mit Kohlenstoffquelle, Supplementlösung und Lösung mit Antibiotikum zugegeben.

Spurenlösung nach Pan (1000×)^[147]

FeSO ₄ ·7H ₂ O	40 g	(140 mmol)
CaCl ₂ ·H ₂ O	40 g	(270 mmol)
MnSO ₄ ·2H ₂ O	10 g	(59 mmol)
AlCl ₃ ·6H ₂ O	10 g	(41 mmol)
CoCl ₂ ·6H ₂ O	4 g	(31 mmol)
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	2 g	(7.0 mmol)
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	2 g	(8.3 mmol)
CuCl ₂ ·2H ₂ O	1 g	(5.9 mmol)
H ₃ BO ₃	0.5 g	(8.1 mmol)
5 N Salzsäure	ad 1000 L	

Supplementlösung (100×)^[153]

Leucin	20 g	(150 mol)
Prolin	20 g	(170 mmol)
Adenin	20 g	(150 mmol)
Thiaminhydrochlorid	2 g	(5.9 mmol)
Tryptophan	20 g	(98 mmol)
2,3-Dihydroxybenzoesäure	2 g	(13 mmol)
H ₂ O _{dem.}	ad 1000 L	

Kohlenstoffquellen, Antibiotika, Induktoren

Die Glucose-Stammlösung (10×) enthält 180 g L⁻¹ (0.91 M) Glucose-Monohydrat in wässriger Lösung. Sie wird separat autoklaviert und den Medien steril zudosiert. Gleiches gilt auch für die anderen Substratlösungen. Die Ampicillin-Stammlösung (100×) enthält 10 g L⁻¹ (29 mM) Ampicillin in wässriger Lösung und wird steril filtriert zudosiert. Die IPTG-Stammlösung (1000×) enthält 2.38 g L⁻¹ (0.1 M) IPTG in wässriger Lösung und wird steril filtriert zudosiert.

6.1.3 Klonierung der Gene *entB* und *entC***Allgemeine Vorgehensweise**

Die Darstellung der Plasmide pDF1, pDF2 und pDF3 erfolgte nach Standardtechniken der Molekularbiologie.^[236] Plasmid pJF119EH1 und Amplifikationsprodukt *entB* aus *E.-coli*-Stamm W3110 werden mit *Bam*HI und *Pst*II geschnitten und mit T4 DNA-Ligase ligiert. Transformation von *E.-coli*-Stamm DH5α mit dem resultierenden Plasmid pDF1 gibt den rekombinanten Stamm DH5α/pDF1, der Ampicillin-Resistenz aufweist. Korrekte Ligation und Transformation wird mit Restriktionsanalyse und Sequenzierung der Polylinker-Region und des *entB*-Inserts bestätigt.

PCR-Produkt von *entC* wurde mit *Pst*I und *Sac*I geschnitten und entsprechend in die Vektoren pJF119EH1 und pDF1 kloniert. Es werden die Plasmide pDF2 und pDF3 erhalten. Transformation von *E.-coli*-Stamm DH5 α mit diesen beiden Plasmiden gibt die Stämme DH5 α /pDF2 und DH5 α /pDF3 mit Ampicillin-Resistenz. Auch hier werden die korrekten Insertionen durch Restriktionsanalyse und Sequenzierung verifiziert.

Es werden alle anderen Stämme (W3110, AN193, H1882, PBB8, BN117) mit den vier Vektoren (pJF119EH1, pDF1, pDF2 und pDF3) transformiert.

Standardtechniken für das Arbeiten mit Nukleinsäuren

Alle Arbeiten mit Nukleinsäuren werden in sterilisierten Gefäßen durchgeführt.

DNA-Konzentrationen in Lösung werden durch Absorptionsmessung mit einem Spektralphotometer DU-640 der Firma Beckman, München, bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260$ nm in Quarzküvetten (Schichtdicke 1 cm) bestimmt. Eine OD_{260nm} von 1 entspricht einer Konzentration von 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ doppelsträngiger DNA.^[236]

Die Auftrennung und Größenabschätzung, sowie Grobabschätzung der DNA-Konzentrationen erfolgt durch elektrophoretische Auftrennung in 0.8 % (w/v) Agarosegel in 1 $\times$ TAE-Puffer (40 mM Tris-HCl, 20 mM Essigsäure, 1mM EDTA [pH 8]) nach Sambrook.^[236] Ethidiumbromid dient als Färbungsmittel. GeneRuler™ (1000 bp Leitermarker) der Firma MBI Fermentas, Vilnius, Litauen, wird als molekulare Größenmarker verwendet.

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

Plasmid-DNA-Präparationen aus *E. coli* erfolgt unter Verwendung von „QIAprep Spin Miniprep Kit“ und „QIAGEN Plasmid Midi Kit“ der Firma Qiagen, Hilden, nach Herstellerangaben. Genomische DNA des *E.-coli*-Stamms W3110 wird unter Verwendung von „Genomic-tip 500“-Säulen der Firma Qiagen, Hilden, nach Herstellerangaben gereinigt.

Oligonukleotidsynthesen

Die in der PCR verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma MWG Biotech, Ebersberg, synthetisiert. Diese werden als salzfreie Proben ohne weitere Aufreinigung eingesetzt. Die zur Amplifikation der *E.-coli*-Gene *entB* und *entC* benutzten Primerpaare sind in Tabelle 6.3 aufgeführt.

Tabelle 6.3: Bezeichnung und Sequenz der Oligonukleotide, die zur Amplifikation von *entB* und *entC* aus chromosomaler *E.-coli*-DNA (W3110, *E. coli* K12-Typ) genutzt werden. Restriktionserkennungssequenzen sind fett gedruckt und klein geschrieben.

Name	Sequenz 5' → 3'	T _m [°C] ^a	eingefügte Schnittstelle
<i>entB</i>			
BBAM	TAT ggatcc ACGCGCATCAGCCTGAA	66.4	<i>Bam</i> HI
BPST	GGG ctgcag ACATTTTACCGCTG	64.4	<i>Pst</i> I
<i>entC</i>			
CSAC	GGC gagctc ATTATTAAAGCCTTT	59.7	<i>Sac</i> I
CBAM	TGC ggatcc TCGCTCCTTAATGC	64.2	<i>Bam</i> HI

^a Die Schmelztemperaturen T_m sind nach N. Chester und D. R. Marshak^[237] berechnet.

Amplifikation von *entB* und *entC*

Die PCR wird unter Verwendung eines „Pwo DNA polymerase kit“ der Firma Roche Diagnostics, Mannheim, in einem Thermocycler „Peltier Thermal Cycler PTC 200“ der Firma MJ Research, Waltham, USA, und unter Verwendung von *Taq*-Polymerase der Firma Boehringer, Mannheim, nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Das Synthesevolumen beträgt 100 µL. Die eingesetzte Konzentration an chromosomaler DNA (*E.-coli*-Stamm W3110) beträgt 0.1 ng µL⁻¹.

EntB wird generiert mit 0.5 pmol µL⁻¹ der Primer CSAC und CBAM. Die Reaktionsmischung wird einem anfänglichen Denaturierungsschritt von 2 min unterworfen, gefolgt von 10 Zyklen von: 30 sec Denaturieren bei 94 °C, 45 sec Annealen bei 40 °C, 1 min Prolongieren bei 72 °C. Es schließen sich 20 weitere Zyklen an von: 30 sec Denaturieren bei 94 °C, 45 sec Annealen bei 40 °C und 1 min (+ 10 sec pro Zyklus) Prolongieren bei 72 °C. Danach wird auf 4 °C gekühlt. Es werden drei Produkte mit 500, 900 und 2500 bp Größe (Agarosegel-Elektrophorese) amplifiziert. Das 900 bp-Produkt (*entB*) wird isoliert und mittels präparativer Agarosegel-Elektrophorese gereinigt.

EntC wird amplifiziert mit 1 pmol µL⁻¹ der Primer BBAM und BPST. Nach einem anfänglichen Denaturierungsschritt von 5 min bei 94 °C erfolgt die Synthese durch 34 Zyklen von: 4 min Denaturieren bei 94 °C, 2 min Annealen bei 57 °C und 90 sec Prolongieren bei 75 °C. Am Ende der Synthese wird auf 4 °C gekühlt. *EntC* wird als einziges Produkt in Form eines 1200 bp Fragmentes amplifiziert.

DNA-Spaltung

Sequenzspezifisches Schneiden von DNA erfolgt mit Restriktionsenzymen der Firma Roche Corporate, Basel, Schweiz, nach Herstellerangaben. 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. Bei doppelter Restriktion wird zunächst mit einem Enzym gearbeitet und das

zweite erst nach vollständigem Schnitt (Überprüfung durch Agarosegel-Elektrophorese) hinzugegeben.

Reinigung von PCR-Ansätzen und Restriktionsansätzen

Zur Isolierung von DNA aus Agarosegelen wird das „QIAquick Gel Extraction Kit“ der Firma Qiagen, Hilden, nach Herstellerangaben verwendet. Zur Umpufferung von DNA-Lösungen bei Restriktionsansätzen, zur Reinigung von PCR-Ansätzen oder zur Abtrennung modifizierender Enzyme von Plasmid-DNA wird das „QIAquick PCR Purification Kit“ der Firma Qiagen, Hilden, nach Herstellerangaben eingesetzt.

DNA-Ligation

Ligationen von DNA-Fragmenten erfolgt mit dem „rapid ligation kit“ der Firma Roche Corporate, Basel, Schweiz, über einen Zeitraum von 14 h bei 16 °C mit T4-DNA-Ligase.^[236] Dabei wird die 10-fache molaren Menge an DNA-Fragment im Verhältnis zur Vektor-DNA eingesetzt.

Transformation von *Escherichia coli*

Für die Transformation von *E.-coli*-Zellen mit plasmidischer DNA werden kompetente Zellen nach der Rubidiumchlorid-Methode^[238] hergestellt. Die Zellen werden direkt verwendet. Zur Transformation von 200 µL kompetenten Zellen werden 250 ng DNA verwendet. Der Ansatz wird für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgt ein Hitzeschock für 2 min bei 42 °C. Zur Regeneration werden die Zellen in 800 µL LB-Medium resuspendiert und für 45 min bei 37 °C inkubiert. 25-100 µL der Zellsuspensionen werden auf Agarplatte (100 mg L⁻¹ Ampicillin) ausgestrichen und über Nacht kultiviert. Transformierte Stämme zeigen Resistenz gegenüber dem Antibiotikum. Die Klone werden in Pools sowie einzeln in 5 mL LB-Medium (100 mg L⁻¹ Ampicillin) über 14 h kultiviert (150 rpm, 37 °C). Die Plasmide werden extrahiert und analysiert. Transformanten mit korrekter Insertsequenz werden in Glycerolsuspension für weitere Inokulationen tiefgefroren.

Restriktionsanalyse

Zur Restriktionsanalyse erfolgt das sequenzspezifische Schneiden der Plasmid-DNA mit Enzymen der Firmen Roche Corporate, Basel, Schweiz; Promega, Mannheim und New England Biolabs, Schwalbach, gemäß den Herstellerhinweisen. Die Restriktionsansätze umfassen mindestens ein Volumen von 10 µL. Für einen analytischen 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.

Mit den zur Verifikation der Insertion von *entB* in pJF119EH1 verwendeten sieben Restriktionsenzymen ergeben sich die in Tabelle 6.4 aufgeführten charakteristischen Fragmentierungsmuster für das resultierende Plasmid pDF1.

Tabelle 6.4: Verwendete Enzyme und erhaltene Fragmentierung der Restriktionsanalyse zur Bestätigung der Insertion von *entB* in pDF119EH1.

Nuclease	Erkennungssequenz	größte Fragmente (Schnittanzahl) pJF119EH1+ <i>entB</i> = pDF1 ^a		größte Fragmente (Schnittanzahl) pJF119EH1 ohne Insertion ^a	
<i>DraI</i>	TTTAAA	5617, 692, 19	(3)	4717, 692, 19	(3)
<i>HindIII</i>	AAGCTT	6328	(1)	5428	(1)
<i>PvuII</i>	CAGCTG	3066, 1993, 1176, 93	(4)	4159, 1176, 94	(3)
<i>Sau3a</i>	GATC	1374, 806, 510, 384	(29)	1374, 656, 510, 384	(24)
<i>SacI</i>	GAGCTC	6328	(1)	5428	(1)
<i>BamHI</i>	GGATCC	6328	(1)	5428	(1)
<i>EcoRI</i>	GAATTC	6328	(1)	5428	(1)

^a Werte in Klammern geben Anzahl der Schnitte an.

Die Restriktionsanalyse zur Verifikation der Insertion von *entC* in pDF119EH1 und pDF1 erfolgt anhand von sieben ausgewählten Restriktionsenzymen. Für die resultierenden Plasmide pDF2 und pDF3 ergeben sich die in Tabelle 6.5 aufgeführten charakteristischen Fragmentierungsmuster.

Tabelle 6.5: Verwendete Enzyme und Fragmente der Restriktionsanalyse zur Bestätigung der Insertion von *entC* in pDF119EH1 und pDF1.

Nuclease	Erkennungssequenz	größte Fragmente (Schnittanzahl) pJF119EH1+ <i>entC</i> = pDF2 ^a		größte Fragmente (Schnittanzahl) pDF1+ <i>entC</i> = pDF3 ^a	
<i>HindIII</i>	AAGCTT	3705, 2026, 906	(3)	3705, 2026, 1806	(3)
<i>PvuII</i>	CAGCTG	3021, 2347, 1176, 93	(4)	3066, 2347, 1176, 855, 93	(5)
<i>EcoRI</i>	GAATTC	5736, 901	(2)	6636, 901	(2)
<i>PvuI</i>	CGATCG	5158, 1479	(2)	5158, 2379	(2)
<i>SalI</i>	GTCGAC	5874, 763	(2)	7537	(1)
<i>NruI</i>	TCGCGA	4239, 2398	(2)	4423, 2398, 716	(3)
<i>EcoRV</i>	GATATC	4775, 1862	(2)	4136, 1862, 1539	(3)

^a Werte in Klammern geben Anzahl der Schnitte an.

DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung des Plasmids pDF1 erfolgt nach der Didesoxynukleotid-Terminationsmethode von F. Sanger.^[239] Die Sequenzierungsreaktionen werden mit einem „AutoRead Sequencing Kit“ der Firma Pharmacia LKB, Freiburg, 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 GmbH, Oldendorf, mit einem LI-COR 4200 DNA-Sequenziergerät der Firma MWG Biotech, Ebersberg, analysiert. Der Sequenzlauf wurde mit Hilfe des Programms „Data Collection Modell 4200 Single Dye DEV7“, Version 4.1 der Firma MWG Biotech aufgezeichnet und mittels des Programms „Image Analysis“, Version 4.1 der Firma MWG Biotech ausgewertet.

Mit der DNA-Einzelstrang-Sequenzierung der Plasmide pDF2 und pDF3 über „*primer-walking*“ wurde die Firma Agowa, Berlin, beauftragt. Die zur Sequenzierung von pDF2 (Auftrag 810-114) zusätzlich synthetisierten Primer sind GATTGATATCACCCTGACG (1. Teilsequenz) und GGTTATTGCTGAACTGGAAC (2. Teilsequenz). Die zur Sequenzierung von pDF3 (Auftrag 810-113) zusätzlich synthetisierten Primer sind TCCAGCAATACGCCACTATC (1. Teilsequenz) und TGCGGAATATCGTGAGACTC (2. Teilsequenz).

6.2 Mikrobielle und separationstechnische Untersuchungen

6.2.1 Verwendete Geräte und Chemikalien

Die **optische Dichte** wird mit einem Photometer UV-160A der Firma Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan, bei einer Wellenlänge von 600 nm bestimmt.

Zur **Messung des pH-Wertes** wird ein pH-Meter 632 der Firma Metrohm, Herisau, Schweiz, verwendet. Die Messanzeige des Gerät wird vor jeder Versuchsreihe durch Zwei-Punkt-Kalibrierung (pH 4.01 und pH 7.00) korrigiert.

Der **Glucose-Gehalt** wird mit einem Accutrend Sensor der Firma Boehringer, Mannheim, sowie Accu-Check[®] Sensor Comfort Messstäbchen der Firma Roche Corporate, Basel, Schweiz, gemessen.

Die **elektrische Leitfähigkeit** wird mit einem Konduktometer LF530 der Firma WTW, Weilheim durchgeführt.

Zur Etablierung der Analytik und für biologische Arbeiten werden folgende **Chemikalien** der Firmen Aldrich, Fluka und Merck bezogen (Reinheitsgrad p.a.): Ampicillin, Anthranilsäure (**128**), 4-Aminobenzoessäure (**129**), Chorismat (**3**, freie Säure), 2,3-Dihydroxybenzoessäure (**73**), 3,4-Dihydroxybenzoessäure (**126**), 2-Hydroxybenzoessäure (**123**), 3-Hydroxybenzoessäure (**124**), 4-Hydroxybenzoessäure (**125**), Isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranosid (IPTG), Prephenat (**127**, freie Säure), Pyruvat (freie Säure).

TOMAC **130** (Aliquat 336[®]), Dehyquart F9030 und Dehyquart F75 werden von der Firma Henkel, Düsseldorf, bezogen.

Es werden die in Tabelle 6.6 aufgeführten **organische Lösungsmittel** für die Untersuchungen zur Extraktion und Reaktivextraktion von **1** verwendet. Die Lösungsmittel werden von den Firmen Aldrich, Fluka und Merck bezogen (Reinheitsgrad p. a.).

Tabelle 6.6: Verwendete organische Lösungsmittel und deren logP-Werte.^[156]

Lösungs mittel	logP [1]	Lösungs mittel	logP [1]	Lösungs mittel	logP [1]
1,4-Dioxan	-0.27	Toluen	2.73	<i>n</i> -Hexan	3.90
2-Propanol	0.16	1-Octanol	2.97	2-Undecanon	4.13
2-Methyl-2- propanol	0.40	Dibutylether	3.08	Diphenylether	4.21
2-Butanol	0.61	<i>p</i> -Xylen	3.15	<i>n</i> -Heptan	4.40
1-Butanol	0.88	<i>n</i> -Pentan	3.39	<i>n</i> -Octan	4.86
BME ^a	1.24	Butylbenzen	3.45	Dibutylphthalat	4.72
1-Hexanol	2.03	Cylohexan	3.54	<i>n</i> -Dodecan	5.82
2-Heptanol	2.29	2-Methylpentan	3.63	Butylstearat	8.44

^a BME = 1,1-Dimethylmethyl-methylether (t-Butylmethylether).

6.2.2 Verwendete Analytik

Zur **Quantifizierung der Metabolitkonzentrationen** werden die Proben zentrifugiert (5 000 g, 5 °C, 10 min) und der Überstand mit über RP-HPLC auf einem HP Serie 1100 System der Firma Hewlett Packard Company, Palo Alto, USA, mit einer Lichrospher[®] C8 Säule (25 cm × 3 mm; 5 µm Partikelgröße) der Firma CS Chromatographie Service GmbH, Langerwehe, vermessen. Als Vorsäule wird eine Lichrospher[®] 100 RP-8-5EC Säule (20 mm × 3 mm; 5 µm Partikelgröße) der Firma CS Chromatographie Service GmbH verwendet. Die Säulentemperatur beträgt 23 °C. Die Metabolite werden über einen Photodiodenarraydetektor (DAD) detektiert und durch Integration der Peaks bei $\lambda = 275$ nm quantifiziert. Das Injektionsvolumen beträgt 5 µL. Die anfängliche mobile Phase ist Wasser (0.1 % Trifluoressigsäure) bei einer Flussrate von 0.45 mL min⁻¹. Ab 5 min nach Injektion wird ein linearer Gradient bis zu einem Anteil von 50 % Methanol bei 40 min gefahren. Anschließend wird die Säule bei dieser Zusammensetzung 10 min gewaschen, dann 15 min regeneriert mit der Startzusammensetzung. Bei Konzentrationen über 500 mg L⁻¹ (**1** und **2**) werden die Proben mit Wasser bis unterhalb diese Konzentration verdünnt und über HPLC analysiert. Die LOQ-Werte sind für alle Substanzen ≤ 40 µM (≤ 9 mg L⁻¹). Die analytischen Grenzkonzentrationen (Nachweis der Substanzen) liegen bei ≤ 7 µM (≤ 1 mg L⁻¹) in allen Fällen.

Zur **Bestimmung der Biotrockenmasse** werden 2 mL Aliquots der Zellsuspension mit einer Biofuge^{pico} der Firma Heraeus, Hanau, in 2 mL Gefäßen der Firma Eppendorf, zentrifugiert (13 000 g, 10 min). Der Überstand wird abdekantiert und das zurückbleibende Pellet mit

1 mL Wasser gewaschen und abermals zentrifugiert (13 000 g, 10 min). Der Überstand wird verworfen und das Pellet bei 65 °C bis zur Gewichtskonstanz nach 24 h getrocknet. Die Biomasse wird gravimetrisch bestimmt.

6.2.3 Untersuchungen zur Produktion und Aktivität von EntB und EntC

Herstellung von zellfreiem Extrakt

100 µL einer *E.-coli*-Vorkultur aus 5 mL LB-Medium (150 rpm, 37 °C, 12 h Inkubation) werden als Inokulum für 100 mL LB-Medium (100 µM IPTG als Induktor) verwendet. Nach Kultivierung in 1 L Schüttelkolben mit Schikanen (150 rpm, 37 °C, 10 h) werden die Zellen aus je 30 mL der erhaltenen Suspension durch Zentrifugation (5000 g, 5 °C, 10 min) geerntet und in 1 mL dem. Wasser resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgt mit einem Ultraschall-Zelldisruptor „Sonifier 250“ der Firma Banson Inc., Danbury, USA, bei 20 % Arbeitszyklus und Beschallungsstufe 2 über einen Zeitraum von 4 min unter Eiskühlung. Das Zell-Homogenat wird zur Entfernung der Zellbruchstücke zentrifugiert (19 000 g, 5 °C, 10 min) und der enzymhaltige Überstand für weitere Analysen innerhalb von 24 h bei 4 °C gekühlt aufbewahrt.

Proteinkonzentrationsbestimmung

Proteinkonzentrationen werden nach der Methode von M. M. Bradford^[240] bei einer Wellenlänge von $\lambda = 595$ nm bestimmt. Kalibrierung erfolgt mit BSA-Standardlösungen (25 bis 100 µg L⁻¹) der Firma Merck, Darmstadt.

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Für die Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach der Methode von U. K. Lämmli^[241] werden die Proteinproben in SDS-Probenpuffer (120 mM Tris-HCl pH 6.8, 20 % [v/v] Glycerin, 6 % [w/v] SDS, 10 % [v/v] β -Mercaptoethanol, 50 ppm [w/v] Bromphenolblau) aufgenommen, gemischt und für 3 min bei 95 °C denaturiert. Die Proben (Proteingesamtmenge: 310 ng pro Bahn) werden direkt in ein NuPAGE™ 4-12 % (w/v) Bis-Tris Polyacrylamidgel der Firma NOVEX, San Diego, USA, aufgetragen und in einer Xcell II Mini-Cell Elektrophoreseapparatur der Firma NOVEX bei einer Stromstärke von 56 mA elektrophoretisiert. Das Gel wird mit Coomassie Brilliantblau R-250 der Firma Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, nach Herstellerangaben gefärbt. „Sigmamarker Low Range“ der Firma Sigma Chemical Co., St. Louis, USA, wird als Molekulargewichtsstandard verwendet.

Quantifizierung von Enzymaktivitäten

Die enzymatische Aktivität von EntB und EntC im zellfreien Extrakt wird durch HPLC-chromatographisch verfolgten Abbau von Chorismat (**3**) bestimmt. Lösung A (gepufferte Substratlösung) enthält 8 mM Chorismat (**3**, freie Säure), 10 mM MgCl₂ · 6H₂O und 200 mM

Tris-HCl in wässriger Lösung bei pH 8.5. Lösung B enthält zellfreies Extrakt mit einer Gesamt-Proteinkonzentration von $85 \mu\text{g mL}^{-1}$. Für einen Versuch werden je $50 \mu\text{L}$ Lösung A und B gemischt und der Abbau von Chorismat (**3**) zu Isochorismat (**72**), 2,3-*trans*-CHD **1** und 3,4-*trans*-CHD **2** bei 20°C über RP-HPLC-Analyse untersucht. Zur Untersuchung der Aktivität von chromosomal kodiertem EntA werden für die Stämme W3110 und DH5 α in einer analogen Versuchsreihe 0.6 mg ($0.8 \mu\text{mol}$) β -NAD Dihydrat (8 mM Endkonzentration) zu der Mischung gegeben und durch kurzes Rühren gelöst. Eine Bildung von 2,3-Dihydroxybenzoat **73** wird nicht beobachtet (analytische Grenzkonzentration $13 \mu\text{M}$).

6.2.4 Untersuchung der *trans*-CHD-Bildung mit *E.-coli*-Mutanten

Mikrobielle Produktion von 2,3-*trans*-CHD **1**

Die *E.-coli*-Kultivierungen zur Untersuchung der Bildung von **1** werden in 1 L Schüttelkolben mit Schikanen durchgeführt. Dazu werden Zellen von 100 mL Vorkultur aus LB-Medium (100 mg L^{-1} Ampicillin, $100 \mu\text{M}$ IPTG) in der Phase mittelexponentiellen Wachstums ($\text{OD } 2$) geerntet (5000 g , 5°C , 5 min) und in 100 mL Mineralsalzmedium 1, 2 oder 3 ($100 \mu\text{M}$ IPTG, pH 7 mit 1 N NaOH) resuspendiert. Es werden standardmäßig 15 g L^{-1} (83 mM) Glucose oder anderer C-Quelle (gleiche Massenkonzentration) steril zugegeben. Inkubation erfolgt in 1 L Schüttelkolben (150 rpm , 37°C). In Intervallen von 1 h werden steril Aliquots genommen und die Produktbildung über HPLC-Analyse verfolgt. Maximale Produktbildungsrate (**1**) werden nach 2 bis 4 h beobachtet.

Bei Versuchen mit verschiedenen Induktorkonzentrationen enthielt sowohl die LB-Vorkultur, als auch das Medium, in welchem die Zellen resuspendiert werden, IPTG in der angegebenen Konzentration. Es werden die maximalen zellmassenspezifische Produktionsraten (**1**) bei folgenden IPTG-Konzentrationen untersucht: 0, 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 200, 500 [μM].

Folgende Kohlenstoffquellen werden zur Produktion von **1** untersucht: Galactose, Fructose, Milchsäure, Essigsäure, Citronensäure, Glycerin, Stärke, Glucose. Die Kohlenstoffquellen werden dazu in Wasser gelöst (180 g L^{-1}) und die Lösungen auf pH 7 gebracht (1 N NaOH-Lösung). Nach Sterilisation (120°C , 20 min) werden sie analog der Verwendung der Glucoselösung eingesetzt.

Elementaranalyse von *E.-coli*-Zellen AN193

Für die Elementaranalyse werden *E.-coli*-Zellen aus 100 mL Zellsuspension des Stamms AN193 in LB-Medium (150 rpm , 37°C) kultiviert und in der mittellogarithmischen Phase ($\text{OD } 3$) durch Zentrifugation (5000 , 10 min , 4°C) geerntet. Nach zweimaligem Waschen mit je 20 mL Wasser wird die Biomasse bei 60°C getrocknet (2 d). Die Elementaranalyse wird in der „Zentralabteilung für Chemische Analysen“ der Forschungszentrum Jülich GmbH (ZCH-Nr. 395/00) durchgeführt. Aufschluss erfolgt mit 65% (v/v) HNO_3 -Lösung im Hochdruckverascher. Die Konzentrationen der Elemente werden durch MS mit induktiv gekoppelter

Plasmaionenquelle (ICP-MS) und optischer Emissionsspektroskopie mit induktiv gekoppelter Plasmaanregung (ICP-OES) bestimmt. N-, H-, C-, und S-Anteile werden in einem CHNS-Analysator (LECO) gemessen. Dazu werden die IR-Absorptionen für die Verbrennungsgase CO₂, H₂O und SO₂, sowie die Wärmeleitfähigkeit für N₂ aufgenommen. Sauerstoff wird gesondert durch Verbrennung über Aktivkohle und Messung des CO₂ durch IR-Detektion analysiert. Cl wird im Mikroverbrennungsansatz durch ionenchromatographische Detektion quantifiziert.

CHNS, elementare Massenanteile in [g g(BTM)⁻¹]: C 38.6±0.3, H 6.2±0.2, N 12.7±0.1, S 0.69±0.1, O 29.0±0.2, Cl 0.17±0.03 ; ICP-MS, Elementkonzentrationen in [µg g(BTM)⁻¹]: Li 76±3, Na 11000±500, Mg 1680±30, Al 122±1, K 6030±220, Ti 11.0±0.4, V 0.12±0.005, Cr 1.25±0.05, Mn 12.5±0.6, Fe 280±10, Co 0.13±0.01, Ni 15±1, Cu 450±10, Zn 640±30, Mo 1.1±0.06.

Mikrobielle Produktion von 3,4-*trans*-CHD 2

Zur mikrobiellen Darstellung von 3,4-*trans*-CHD 2 werden Zellen des Stamms BN117/pDF1 aus 100 mL LB-Medium (100 mg L⁻¹ Ampicillin, 100 µM IPTG) in der Phase mittelexponentiellen Wachstums (OD 2) geerntet (5 000 g, 5 °C, 5 min) und in 100 mL Mineralsalzmedium 3 (100 µM IPTG, pH 7 mit 1 N NaOH) resuspendiert. Es werden 18 g L⁻¹ Glucose steril zugegeben. Inkubation erfolgt in 1 L Schüttelkolben (150 rpm, 37 °C) über einen Zeitraum von 36 h. Maximale Produktionsraten werden nach 3 h beobachtet. Die Zellen werden durch Zentrifugation abgetrennt (5000 rpm, 5 °C, 10 min). Die Lösung enthält 790 mg L⁻¹ (5.1 mM) 2.

HPLC-Isolierung von *trans*-CHD für analytische Zwecke

Zur Isolierung von 2,3-*trans*-CHD 1 und 3,4-*trans*-CHD 2 für analytische Zwecke werden 100 mL des jeweiligen zellfreien Kultivierungsüberstandes auf pH 7 eingestellt (1 N NaOH-Lösung; 1 N HCl-Lösung) und i. Vak. weitgehend eingeeengt. Chromatographische Trennung erfolgt auf einer präparativen HPLC „System Gold®“ der Firma Beckman Coulter, Fullerton, USA. Diese besteht aus einer Pumpe „125P Solvent Module“, einem DAD-Detektor „168NM-Detector“ und einem „Gold™ Nouveau Chromatography Data System, Version 1.6“ zur Steuerung der Module. Zum Probeneinlass wird ein Handinjektor 7725i der Firma Rheodyne, Coati, USA, mit 1 mL Probenschleife verwendet. Trennung erfolgt auf einer „Kromasil 10C-18“ (RP-18)-Säule (Art. Nr. 520 920) der Firma CS-Chromatographie Services GmbH, Langerwehe. Elutionsmittel ist Wasser (0.1 % TFA) bei einer Flussrate von 5 mL min⁻¹. Von 20 min bis 40 min wird ein Gradient bis Methanol/Wasser (1:1) gefahren. Fraktionen von 5 mL werden zur weiteren Analyse genommen.

Zur analytischen Isolierung von 1 werden 500 µL Überstandskonzentrat (40 g L⁻¹ (0.26 M) 1; insgesamt 20 mg (0.12 mmol) 1) injiziert. Die Fraktionen zwischen 12 min und 14.5 min

werden vereinigt, i. Vak. eingeengt und bis zur Gewichtskonstanz lyophilisiert (10^{-3} mbar, 1 d). Es bleiben 20 mg (0.12 mmol) **1** als weißer Feststoff zurück. Die analytischen Daten des mikrobiell erzeugten **1** entsprechen den Daten des chemisch synthetisierten **1** (^1H -NMR, ^{13}C -NMR, R_f -Werte).

Die Aufreinigung von **2** durch HPLC erfolgt analog der Aufreinigung von **1** mit 500 μL Überstandskonzentrat (20 g L^{-1} (0.13 M) **2**; insgesamt 10 mg (60 μmol) **2**). **2** wird aus den Fraktionen zwischen 20 min und 23 min isoliert. Nach Lyophilisation (10^{-3} mbar) bleiben 10 mg (60 μmol) **2** als weißer Feststoff zurück. Die analytischen Daten entsprechen denen des chemisch synthetisierten **2**.

6.2.5 Produktion von 2,3-*trans*-CHD im pH-geregelten Rührkessel-Bioreaktor

Die *E.-coli*-Kultivierung im 30 L Rührkessel-Bioreaktor Chemap[®] der Firma Stihler GmbH, Schweiz, (20 L Arbeitsvolumen) wird bei pH 7.0 (geregelt) und 37 °C in Mineralsalzmedium 3 durchgeführt. 1 L Vorkultur aus LB-Medium (1 L Schüttelkolben mit 100 mL Füllvolumen, 150 rpm, 37 °C, 12 h, kein IPTG) dient als Inokulum. Die anfängliche Glucosekonzentration beträgt 30 g L^{-1} (167 mM). Die Begasungsrate wird auf 25 L min^{-1} (Luft) eingestellt. Sterile Glucoselösung (700 g L^{-1} (3.9 M), 20 min bei 121 °C autoklaviert) wird während des Prozesses nach Bedarf zugesetzt, so dass eine Konzentration von 5 bis 10 g L^{-1} (28 mM bis 56 mM) aufrecht gehalten wird. Antischaum AF298 der Firma Sigma Chemical Co., St. Louis, USA, wird bei Schaumbildung im Gasraum zugegeben. Die Induktion erfolgt durch Zugabe von 100 μM (Endkonzentration) IPTG bei einer Zellkonzentration von 5 g(BTM) L^{-1} . Der Prozess wird nach 50 h abgebrochen. Zellen und nicht-lösliche Bestandteile werden durch Zentrifugation entfernt (4000 rpm, 4 °C, 15 min). Der zellfreie Kultivierungsüberstand (das Zentrifugat) ist eine braune Lösung.

Die Produktionen in pH-geregelten Chemap[®] Rührkesselreaktoren mit 7.5 L (150 L) Kesselvolumen der Firma Stihler GmbH, Schweiz, werden mit einem Füllvolumen 5 L (100 L) analog durchgeführt. Alle intensiven Parameter wurden unverändert aus dem 20 L Kultivierungsversuch übernommen, alle extensiven Parameter wurden proportional angepasst. Die Kultivierungsbedingungen sind soweit nicht anders angegeben pH 7.0 (geregelt) und 37 °C in Mineralsalzmedium 3. 500 mL Vorkultur aus LB-Medium (1 L Schüttelkolben, wie oben beschrieben) dient als Inokulum für 7.5 L Kesselvolumen. 9 L Vorkultur aus LB-Medium (5 L Schüttelkolben, 70 rpm, 37 °C, 14 h, kein IPTG) dient als Inokulum für 100 L Kesselvolumen. Die Induktion erfolgt bei einer Zellkonzentration von 5 g(BTM) L^{-1} durch Zugabe von 100 μM (Endkonzentration) IPTG. Standardmäßig werden die Produktionsprozesse nach 50 h abgebrochen.

6.2.5 Untersuchungen zur Produktisolierung

Bestimmung der Sättigungskonzentrationen (1) in organischen Lösungsmitteln

Zur Bestimmung von Sättigungskonzentration in organischen Lösungsmitteln wird **1** (lyophilisierter Feststoff) mit ca. 1 mL Lösungsmittel überschichtet und in einem geschlossenen Reagenzglas über einen Zeitraum von 14 h durch Schütteln gelöst (150 rpm, 23 °C). Nach Zentrifugation (10 000 rpm, 23 °C, 5 min) wird die organische Phase HPLC-chromatographisch analysiert. Es werden die in Tabelle 6.7 angegebenen Sättigungskonzentrationen gemessen.

Tabelle 6.7: Sättigungskonzentrationen von **1** in organischen Lösungsmitteln.

Lösungs mittel	c(1) [g L ⁻¹] ([mM])	Lösungs mittel	c(1) [g L ⁻¹] ([mM])	Lösungs mittel	c(1) [g L ⁻¹] ([mM])
Hexan	< 0.01 (< 0.06)	Dichlormethan	0.07 (0.4)	2-Propanol	18.9 (121)
Heptan	< 0.01 (< 0.06)	Chloroform	0.18 (1.1)	THF	26.2 (168)
Cyclohexan	< 0.01 (< 0.06)	Diethylether	2.8 (18)	Ethanol	31.8 (204)
p-Xylen	< 0.01 (< 0.06)	Ethylacetat	4.9 (32)	Aceton	49.2 (315)
Toluen	< 0.01 (< 0.06)	1-Butanol	14.4 (92)	Methanol	69.2 (443)

Präparative Extraktion mit 1-Butanol

Zur präparativen Aufreinigung von **1** durch Extraktion wird 1 L zellfreier Kultivierungsüberstand (pH 7, 4.6 g L⁻¹ (29 mM) **1**) bei einer Temperatur von 45 °C i. Vak. auf 200 mL Volumen eingengt. Es wird mit 1 N HCl-Lösung auf pH 2 eingestellt und dreimal mit je 200 mL 1-Butanol extrahiert. Der pH-Wert wird nach jeder Extraktion überprüft, er verändert sich aufgrund der Extraktion nicht signifikant. Die Fraktionen werden einzeln über MgSO₄ getrocknet (12 h unter Rühren), dann i. Vak. weitgehend eingengt und lyophilisiert (2 d, 10⁻³ mbar). Wie nach Stoffbilanzierung der Aufreinigungsschritte zu sehen, können nach dreimaligem Extrahieren 3.92 g (25 mmol) **1** (85 % isolierte Ausbeute) gewonnen werden (siehe Tabelle 6.8). Alle Extraktionsfraktionen werden i. Vak. (2 mbar) von allen flüchtigen Bestandteilen befreit. Der durch Wichtung der Trockenmassen gemittelte Massenanteil von **1** an der festen Substanz nach Vereinigung der Einzelfractionen beträgt 61 %. Der Restanteil besteht größtenteils aus anorganischen Salzen (HPLC-Analyse).

Die Abtrennung der Salzfracht wird ein säulenchromatographischer Reinigungsschritt an Kieselgel-60 angeschlossen. Unter Verwendung von MeOH/EE (1:5) als Laufmittel wird **1** mit einem Retentionsfaktor von R_f = 45 % eluiert. Aus 6.43 g extrahiertem Feststoff (Gehalt von **1** 61 %, entsprechend 3.92 g (25 mmol) **1**) werden durch nach Entfernen des Elutionsmittels i. Vak. 2.86 g (18 mmol, 73 % Ausbeute) **1** als gelber Feststoff mit > 95 % Reinheit erhalten (HPLC-Analyse). Die Ausbeute bezogen auf den gesamten Trennprozess (Extraktion und Kieselgelchromatographie) beträgt 62 %.

Tabelle 6.8: Bilanzierung der dreifachen Extraktion von **1** aus 200 mL konzentrierter wässriger Lösung (23 g L^{-1} (0.15 M) **1**, insgesamt 4.6 g (30 mmol) **1**) mit je 200 mL Butanol.

Butanol-Phase	flüssige Fraktionen			getrocknete Fraktionen	
	Konzentration (1) [g L^{-1}]	Massengehalt (1) [g], Bilanzierung ([%])		Trockenmasse [g]	Massenanteil (1) [%]
1	11.1	2.22	(48)	3.38	66 %
2	5.8	1.17	(25)	1.98	59 %
3	2.6	0.53	(12)	1.07	50 %
Restlösung	3.4	0.68	(15)	— ^a	— ^a

^a Aufgrund des Proteingehaltes kann die wässrige Restlösung nach der Extraktion nicht vollständig getrocknet werden.

Versuche zur Extraktion und Reaktivextraktion von **1**

Zur Untersuchung von Extraktion und Reaktivextraktion von **1** wird der zellfreie Kultivierungsüberstand (910 mg L^{-1} (5.8 mmol) **1**) auf den erforderlichen pH-Wert eingestellt (1 N NaOH-Lösung, 6 N HCl-Lösung). Es werden je 5 mL dieser Lösung mit 5 mL des organischen Lösungsmittels (bei Reaktivextraktion mit gelöstem Carrier) überschichtet, beide Phasen kräftig durchmischt und der pH-Wert der wässrigen Phase gegebenenfalls nachkorrigiert. In einem geschlossenen Reagenzglas wird das Phasensystem über einen Zeitraum von 12 h durch Schütteln vermischt (150 rpm , 23 °C), die Phasen dann durch Zentrifugation ($10\,000 \text{ rpm}$, 23 °C , 4 min) getrennt. Der pH-Wert der wässrigen Phase wird gemessen. Dieser Wert gibt die pH-Bedingungen der Extraktion wider. Sowohl die wässrigen als auch die organischen Phasen werden HPLC-chromatographisch analysiert und die Verteilungskoeffizienten aus den gemessenen Konzentrationen errechnet. Bei Lösungsmitteln mit hoher dynamischer Viskosität η wird auf die Konzentrationsbestimmung (**1**) in der organischen Phase verzichtet und diese aus der Abnahme in der wässrigen Phase ermittelt (η in [cP]): Butylstearat, Dibutylphthalat (15), Diphenylether (4.0), 1-Octanol (7.4), Paraffin (20), 2-Undecanon.

Die für Reaktivextraktion mit variabler Carrierkonzentration getesteten zehn unpolaren Lösungsmittel (logP-Wert) sind: Butylbenzen (3.45), Butylstearat (8.44), Cyclohexan (3.54), Dibutylphthalat (4.72), Diphenylether (4.21), 1-Octanol (2.97), *n*-Octan (4.86), Paraffin, 2-Undecanon (4.13), *p*-Xylen (3.15).

Versuche zur Rückextraktion von **1** nach Reaktivextraktion

Zur Untersuchung der Rückextraktion von **1** nach der Reaktivextraktion werden 20 mL Kultivierungsüberstand (910 mg L^{-1} (5.8 mmol) **1**) wie oben beschrieben mit 20 mL 1-Octanol (10 % TOMAC **130**) bei pH 7 extrahiert. Nach vollständiger Abtrennung der extrahierten wässrigen Phase werden je 2 mL der organischen Extraktphase (272 mg L^{-1} (1.7 mmol) **1**) mit 2 mL eines wässrigen Rückextraktionssystems unterschichtet und mit

diesem über einen Zeitraum von 14 h durch Schütteln vermischt (150 rpm, 23 °C). Nach Phasentrennung durch Zentrifugation (10 000 rpm, 23 °C, 4 min) werden die Konzentrationen (**1**) in beiden Phasen HPLC-chromatographisch bestimmt und aus diesen die Verteilungskoeffizienten ε der Rückextraktion berechnet. Es werden folgende wässrige Rückextraktionssysteme untersucht (ε [%] der Rückextraktion): Wasser (8), ges. NaCl-Lösung (99), ges. Na₂CO₃-Lösung (91), ges. NaHCO₃-Lösung (99), 1 N HCl-Lösung (93), 6 N HCl-Lösung (54).

Die Wiederverwertbarkeit der organischen Extraktorphase nach Rückextraktion von **1** mit ges. NaCl-Lösung wird überprüft, indem 2 mL dieser Phase zur Reaktivextraktion von **1** aus einem weiteren Aliquot von 2 mL Kultivierungsüberstand (910 mg L⁻¹ (5.8 mM) **1**) bei pH 7 verwendet wird. Die in der organischen Phase gemessenen Konzentrationen (**1**) entsprechen denen der für die Extraktion mit frisch bereiteter Extraktorphase unter gleichen Bedingungen gemessenen Werte (277 mg L⁻¹ (1.8 mM) **1**).

Bestimmung des pK_S-Wertes von **1**

Die Bestimmung des pK_S-Wertes von **1** erfolgt anhand einer gemessenen pH-Titrationskurve. Dazu werden 68 mg (0.44 mmol) **1** in 10 mL Wasser gelöst und diese mit 6 N HCl-Lösung (100 µL) auf pH 1.5 eingestellt. Titration erfolgt mit 1 N NaOH-Lösung in 20 µL-Schritten, wobei der pH-Wert jeweils nach kräftigem Rühren gemessen wird.

Der pK_S-Wert wird beim Maximum der graphischen Auftragung der differenziell errechneten Pufferkapazität $\frac{dc(\text{NaOH})}{dpH}$ gegen den pH-Wert an der Abszisse abgelesen (pK_S = 4.2 ± 0.2).

Präparative Ionentauschchromatographie

Präparative Ionentauschchromatographie wird mit einer IndEX™ Säule 100 (Innendurchmesser 100 mm, 3.5 L maximales Bettvolumen) der Firma Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden, mit 2 kg DOWEX®-Harz 1×8 (Cl⁻, 100-200 mesh) der Firma Merck, Darmstadt durchgeführt. Das Harz wird mit einem hydraulischen Stempel bis zu einem Bettvolumen von 2.6 L gepackt. Die Produktelution wird über einen UV/Vis-Durchflussdetektor der Firma Knauer, Berlin, (Detektion bei λ = 280 nm) gemessen und über einen Skalar®-Recorder 7021, Modell BD41 aufgezeichnet (Vorschub 1 mm min⁻¹, Empfindlichkeit 500 mV). Die gesamte Isolierung wird bei einer Fluidgeschwindigkeit von 70 mL min⁻¹ durchgeführt.

Die Equilibrierung der Säule erfolgt mit 50 mM (8.7 g L⁻¹) K₂HPO₄-Lösung (pH 8, 9.5 mS cm⁻¹, H₃PO₄ und KOH, 50 L). **1** kann bis zu einer dynamischen Kapazität von 16 g L⁻¹ (102 mM) sedimentiertem Harz gebunden werden, wie anhand von Durchbruchkurven mit zellfreiem Kultivierungsüberstand (1.1 g L⁻¹ (7 mM) **1**) an 5 g sedimentiertem Harz bei pH 7 gezeigt. Bezogen auf die verwendeten Harzmenge von 2 kg ermöglicht eine solche Beladungskapazität die Isolierung von **1** aus 8 L zellfreiem Kultivierungsüberstand (pH 7, 4.6

g L⁻¹ (29 mM) **1**). Der Kultivierungsüberstand wird bei einer Flussrate von 65 mL min⁻¹ aufgetragen wird. Die Transduktion des zellfreien Überstandes beträgt 16 mS cm⁻¹. Elution erfolgt mit 50 mM (2.3 g L⁻¹) Ameisensäure (pH 2.3, 1.2 mS cm⁻¹) bei einer Flussrate von 76 mL min⁻¹. **1** wird bei pH 2.8 und 1.2 mS cm⁻¹ nach 11 h (50 L Ameisensäure-Lösung) eluiert. Regenerierung des Harzes sowie Langzeitlagerung erfolgt in 2 M NaCl-Lösung. Die nach der ersten Verwendung und weiteren Lagerung auftretende bräunliche Färbung des Harzes ist nach Angaben des Herstellers nicht auf mikrobiellen Bewuchs zurückzuführen. Das Harz ist im Zustand veränderter Farbe uneingeschränkt verwendbar.

Ohne Neutralisierung wird das Eluat (7.8 L) i. Vak. zu 500 mL eines gelben, viskosen Öls aufkonzentriert. Das Produkt wird mit einer Lyovac GT 20 der Firma Lybold-Heraeus bei 5·10⁻² mbar über einen Zeitraum von 7 d lyophilisiert. Es werden 27 g (173 mol) **1** in Form von weißem Feststoff erhalten, was einer isolierten Ausbeute von 73 % entspricht. Die Reinheit beträgt 96 % (¹H-NMR, quantitative HPLC-Analyse). Die analytischen Daten werden mit dem chemisch synthetisierten *rac*-**1** verglichen.

Zur präparativen Isolation von **2** im Dezigramm-Maßstab werden 200 mL zellfreier Kultivierungsüberstand (pH 7, 790 mg L⁻¹ **2** (5.1 mM)) i. Vak. eingengt und das zurückbleibende viskose Öl mit 200 mL Methanol/EE (1:1) über 14 h extrahiert. Alle nicht-löslichen Bestandteile werden durch Filtration entfernt und die organische Phase i. Vak. eingengt zu 630 mg eines klebrigen, viskosen Öls. Mit den zur Isolierung von **1** verwendeten intensiven Größen wird die säulenchromatographische Trennung an 20 g DOWEX-Harz 1×8 (Cl⁻-Form, 5 cm Betthöhe) durchgeführt. Elution erfolgt mit 50 mM (2.3 g L⁻¹) Ameisensäure (pH 2.3, 1.2 mS cm⁻¹) bei einer Flussrate von 16 mL min⁻¹, wobei **2** nach 20 min (pH 2.3) eluiert wird. Nach Entfernen des Lösungsmittels i. Vak. werden 110 mg (0.7 mmol) **2** in Form eines gelben Feststoffs erhalten, entsprechen einer Isolierungsausbeute von 70 %. Die Reinheit beträgt > 90 % (¹H-NMR, quantitative HPLC-Analyse). Die analytischen Daten werden mit dem chemisch synthetisierten *rac*-**2** verglichen.

6.3 Chemische Synthesen

6.3.1 Verwendete Geräte und Chemikalien

NMR-Spektren werden auf einem NMR-Spektrometer AMX 300 (¹H-NMR 300 MHz; ¹³C-NMR 75.5 MHz) der Firma Bruker Analytische Messtechnik GmbH, Rheinstetten, aufgenommen. Die chemischen Verschiebungen sind angegeben in δ -Werten [ppm], gemessen in [D₄]-MeOH (¹H, δ = 4.87 (CH₃OH); ¹³C, δ = 49.2 (CD₃OD)) oder in CDCl₃ (¹H, δ = 7.27 (CHCl₃); ¹³C, δ = 77.2 (CDCl₃)). Abkürzungen der Multiplizitäten: s (Singulett), d (Dublett), t (Triplet), 't' (Pseudotriplett), q (Quartett), m (Multiplett), b (breit).

Die **GCMS-Spektren** werden mit einem Gaschromatographen HP 6890 (Säule: HP-5MS, 5 % Phenylmethylsiloxan, 30 m × 250 μ m), T_{GC}(Injektor) = 250 °C, T_{MS}(Ionenquelle) =

200 °C, Zeitprogramm (Ofen): $T_{0\min} = 60\text{ °C}$, $T_{3\min} = 60\text{ °C}$, $T_{14\min} = 280\text{ °C}$ (Aufheizrate: 20 °C min^{-1}), $T_{19\min} = 280\text{ °C}$, und einem „*mass selective detector*“ HP 5973 der Firma Hewlett Packard Company, Palo Alto, USA, aufgenommen.

UV/Vis-Spektren werden auf einem Ultrospec 2000 UV/Vis der Firma Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden, aufgenommen

IR-Spektren werden einem Avatar 360 FT-IR der Firma Thermo Nicolet Corporation, Madison, USA, gemessen.

Drehwerte werden mit einem Polarimeter 241^{E.S.P.} der Firma Perkin-Elmer Corporate, Wellesley, USA, bestimmt.

Die **Einkristall-Röntgenstrukturanalyse** wird mit einem Vierkreisdiffraktometer KappaCCD der Firma Nonius, Delft, Niederlande, am Institut für Anorganische Chemie der Universität Bonn durchgeführt.

Die **Massenspektren** werden mit einem MS-50 (EI-MS) der Firma A.E.I., Manchester, Großbritannien aufgenommen.

Die **Elementaranalysen** werden mit einem Vario EL der Firma Heraeus, Hanau, in der mikroanalytischen Abteilung des Instituts für Organische Chemie und Biochemie der Universität Bonn durchgeführt.

Schmelzpunkte werden mit der Schmelzpunktapparatur B-540 der Firma Büchi Labortechnik AG, Flawil, Schweiz, bestimmt.

Chromatographiematerialien:

DC-Alufolien Kieselgel 60 F₂₅₄, Merck, Darmstadt, Nr. 5554

DC-Alufolien RP-18 F_{254S}, Merck, Darmstadt, Nr. 5560

Kieselgel 60 (40-63 µm), Merck, Darmstadt, Nr. 9385

Zur **selektiven Anfärbung der *trans*-CHD** auf den Dünnschichtchromatogrammen wird das **Blei(IV)-acetat-Difluorescein-Reagenz**^[242] verwendet. Dieses besteht aus zwei Lösungen die einzeln über mehrere Wochen bei 4 °C haltbar sind:

Lösung I ges. Lösung von Blei(IV)-acetat in Eisessig

Lösung II 0.5 g (1.2 mmol) 2',7'-Dichlorfluorescein in 100 mL Ethanol

Unmittelbar vor Gebrauch werden 0.5 mL Lösung I und 0.5 mL Lösung II gemischt und mit Toluol auf 200 mL aufgefüllt.

Die vom Fließmittel befreiten Chromatogramme werden 10 sec in die Reagenzlösung getaucht, kurz im Warmluftstrom getrocknet und 15 min im Trockenschrank auf 100 °C erwärmt. Substanzen mit vicinaler Dioleinheit sind im kurzwelligen UV-Licht ($\lambda = 254\text{ nm}$)

als gelb fluoreszierende Zonen erkennbar, die auch im sichtbaren Licht als orangerote Flecken erscheinen.

Die Reaktion basiert einerseits auf der oxidativen Spaltung vicinaler Diole durch Blei(IV)-acetat und andererseits auf der Reaktion von Dichlorfluorescein mit Blei(IV)-acetat zu einem nichtfluoreszierenden Oxidationsprodukt. Die Fluoreszenz des Dichlorfluoresceins bleibt nur in den Chromatogramm-Zonen erhalten, in denen das Blei(IV)-acetat für die Glycolspaltungsreaktion verbraucht wurde.^[242a]

Chemikalien und Lösungsmittel

Chemikalien werden von den Firmen Aldrich, Fluka und Merck bezogen (Reinheitsgrad p.a.) und ohne weitere Reinigung eingesetzt. Wenn nicht anders angegeben, werden Lösungsmittel analytischer Qualität benutzt, die vor Gebrauch nach literaturüblichen Methoden getrocknet werden.

Der TBS-Ether **137**, sowie der Methylester **115** wurde im Rahmen auf diese Arbeit aufbauender Untersuchungen^[105] racemisch nach der Trost-Route^[12] synthetisiert und für diese Arbeiten freundlich zur Verfügung gestellt.

6.3.2 Synthesevorschriften zur Darstellung von racemischem 3,4-*trans*-CHD

Cyclohexa-2,5-dien-carbonsäure (**120**)

Ein 1 L Dreihalsrundkolben mit Dewar-Kondensator und Gaseinlassvorstoß wird unter Stickstoff ausgeheizt, dann mit 32 g (0.26 mol) Benzoesäure (**119**) gefüllt. Der Kolben wird auf $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlt und soviel Ammoniak eindestilliert, dass der größte Teil der Säure gelöst wird (ca. 500 mL). Die Lösung wird mit 6.34 g (0.91 mol) Lithiummetall portionsweise versetzt, wobei die Lösung kurze Zeit aufkocht und eine metallisch-blaue Farbe annimmt. Es wird über einen Zeitraum von 30 min gerührt und 32.2 g (0.70 mol) wasserfreies Ethanol tropfenweise über einen Zeitraum von 20 min zugegeben. Die Reaktionsmischung wird 30 min unter Rückfluss zum Sieden erhitzt, dann wieder gekühlt auf $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$. Nach Quenchen mit 54 g (1.01 mol) Ammoniumchlorid wird der Ammoniak über einen Zeitraum von 14 h abdestilliert. Der zurückbleibende weiße Rückstand wird in 200 mL Wasser aufgenommen. und mit Diethylether gewaschen ($2 \times 100\text{ mL}$). Die wässrige Phase wird mit 100 mL Diethylether bedeckt und angesäuert bis pH 1 (6 N HCl-Lösung) unter gleichzeitigem Kühlen von außen, so dass die Temperatur $23\text{ }^{\circ}\text{C}$ nicht überschreitet. Die organische Phase wird abgetrennt und die wässrige Phase nochmals mit Diethylether extrahiert ($2 \times 100\text{ mL}$). Die vereinigten org. Extrakte werden über MgSO_4 getrocknet, aufkonzentriert und das verbleibende gelbe Öl fraktioniert destilliert (Sdp. 95 bis $96\text{ }^{\circ}\text{C}/2\text{ mbar}$). Es werden 25.5 g (79 %) **120** als gelblich-klare, mittelviskose Flüssigkeit erhalten.

DC (SiO ₂)	$R_f = 0.36$ (Hexan/EE 7:3).
¹ H-NMR	(300 MHz, CDCl ₃ , 23 °C) $\delta = 2.71$ (m, 2 H), 3.80 (m, 1 H), 5.85 (d't'd, $J = 10.7, 3.1, 1.9$ Hz, 2 H), 5.94 (dd't', $J = 10.7, 3.1, 1.5$ Hz, 2 H), 11.85 (b, 1 H, CO ₂ H).
¹³ C-NMR	(75 MHz, CDCl ₃ , 23 °C) $\delta = 26.0$ (CH ₂), 41.7 (C-1), 121.7 (CH), 127.1 (CH), 179.3 (C=O).
GC-MS	$R_t = 7.20$ min; m/z (%) = 124 (14) [M] ⁺ , 79 (100) [M-CO ₂ H] ⁺ , 77 (64), 51 (11).
C ₇ H ₈ O ₂	(124.14)

5,6-Dibrom-cyclohex-2-encarbonsäure (118)

Zu einer Lösung von 2.24 g (18 mmol) Dihydrobenzoesäure **120** in 20 mL Chloroform werden bei 0 °C über einen Zeitraum von 30 min unter Rühren 9.5 mL (19 mmol) einer frisch bereiteten 2 M Lösung von Brom in Chloroform gegeben. Nach vollständiger Reaktion wird die anfänglich farblose Lösung durch überschüssiges Brom gerade gelb gefärbt. Alle flüchtigen Bestandteile werden i. Vak. entfernt. Das zurückbleibende blassgelbe Öl wird getrocknet und in wenig Diethylether gelöst. Es wird Petrolether 40-60 bis zum Einsetzen der ersten Trübung zugesetzt und das Dibromaddukt bei -80 °C über einen Zeitraum von 14 h zur Fällung gebracht. Nach Filtrieren und Trocknen des Feststoffs i. Vak. bleiben 2.21 g (43 %) **118** als rundliche, weiße Kristallen mit Schmp. 98 °C zurück.

DC (SiO ₂)	$R_f = 0.19$ (Hexan/EE 7:3)
¹ H-NMR	(300 MHz, CDCl ₃ , 23 °C) $\delta = 2.68$ (d, $J = 20.0$ Hz, 1 H, H-4), 3.30 (dddd, $J = 20.0, 6.8, 4.5, 2.2$ Hz, 1 H, H-4), 4.27 (ddd, $J = 6.5, 4.1, 2.3$ Hz, 1 H), 4.67 ('t', $J = 4.4$ Hz, 1 H), 4.83 ('t', $J = 3.8$ Hz, 1 H), 5.81 (d, $J = 10.7$ Hz, 1 H), 5.95 (d, $J = 10.7$ Hz, 1 H), 10.6 (b, 1 H, CO ₂ H).
¹³ C-NMR	(75 MHz, CDCl ₃ , 23 °C) $\delta = 30.6$ (CH ₂), 43.0 (CH), 48.0 (CH), 53.0 (CH), 119.6 (CH), 123.7 (CH), 176.8 (C=O).
GC-MS	$R_t = 10.44$ min; m/z (%) = 125 (49), 123 (56), 105 (15), 79 (100), 77 (54), 51 (14).
C ₇ H ₈ O ₂ Br ₂	(283.95)

8-Brom-6-oxabicyclo[3.2.1]oct-2-en-7-on (117)

Eine Lösung von 1.14 g (4.3 mmol) Dibromaddukt **118** in 60 mL Wasser wird bei 0 °C unter kräftigem Rühren mit 40 mL 0.1 N NaOH-Lösung versetzt. Bei der Zugabe sollte darauf geachtet werden, dass der pH-Wert nicht unter 5 fällt und nicht über 9 steigt. Die Reaktionsmischung wird auf 23 °C erwärmt und dann weitere 8 h bei dieser Temperatur gerührt. Danach zeigt die Lösung pH 5. Es wird dreimal mit insgesamt 125 mL Diethylether extrahiert und die vereinigten org. Phasen über MgSO₄ getrocknet. Alle flüchtigen Bestandteile werden i. Vak. entfernt. Es werden 490 mg (64 %) **117** in Form eines gelben klebrigen Feststoffs erhalten.

DC (SiO ₂)	$R_f = 0.46$ (PE/EE 3:1)
¹ H-NMR	(300 MHz, CDCl ₃ , 23 °C) $\delta = 2.54$ (m, 1 H), 2.68 (ddd, $J = 19.2, 5.2, 2.9$ Hz, 1 H), 3.23 (d, $J = 7.2$ Hz, 1 H), 4.40 (s, 1 H), 4.83 (ddd, $J = 4.0, 2.7, 1.3$ Hz, 1 H), 5.77 (d't'd, $J = 9.2, 2.9, 1.3$ Hz, 1 H), 5.89 (m, 1 H).
¹³ C-NMR	(75 MHz, CDCl ₃ , 23 °C) $\delta = 33.3$ (C-4), 47.9 (CH), 50.6 (CH), 81.9 (CH), 125.3 (CH), 127.3 (CH), 174.2 (C=O).
GC-MS	$R_t = 9.02$ min; m/z (%) = 203 (2) [M] ⁺ , 159 (1) [M-CO ₂] ⁺ , 95 (6), 79 (100), 77 (47).
C ₇ H ₇ O ₂ Br	(203.03)

4,8-Dibrom-6-oxabicyclo[3.2.1]oct-2-en-7-on (121)

2.19 g (11.4 mmol) Lacton **117** werden in 30 mL trockenem Tetrachlorkohlenstoff gelöst und mit 2.01 g (11.3 mmol) N-Bromsuccinimid (NBS) und 23 mg (0.14 mmol) α, α' -Azobisisobutyronitril (AIBN) versetzt. Das Reaktionsgemisch wird vorsichtig unter Rückfluss erwärmt, bis die Reaktion einsetzt. Dies läßt sich anhand der Wärmeentwicklung, durch stärkeres Sieden erkennen. Notfalls muss dann etwas gekühlt werden, es ist jedoch darauf zu achten, dass die Reaktion nicht zum Stillstand kommt. Die Reaktion ist nach 18 h beendet. Nach dem Abkühlen wird der entstandene weiße Feststoff abfiltriert und mit Tetrachlorkohlenstoff gewaschen. Aus den vereinigten Filtratphasen wird das Lösungsmittel i. Vak. destillativ entfernt und die zurückbleibende gelbe Flüssigkeit säulenchromatographisch (SiO₂, PE/EE 5:1 bis 4:6) gereinigt. Es werden 2.24 g (76 %) **121** in Form von weißen Kristallen mit Schmp. 69 °C erhalten.

DC (SiO ₂)	$R_f = 0.32$ (PE/EE 5:1)
¹ H-NMR	(300 MHz, CDCl ₃ , 23 °C) $\delta = 3.37$ (d, $J = 6.9$ Hz, 1 H), 4.72 ('t', $J = 2.7$ Hz, 1 H), 4.84 (s, 1 H), 4.98 (m, 1 H), 6.03 (m, 1 H).
¹³ C-NMR	(75 MHz, CDCl ₃ , 23 °C) $\delta = 43.1$ (CH), 46.1 (CH), 47.9 (CH), 84.0 (CH), 127.4 (CH), 129.3 (CH), 173.4 (C=O).
GC-MS	$R_t = 9.98$ min; m/z (%) = 282 (1) [M] ⁺ , 226 (2), 175 (10), 173 (10), 159 (97), 157 (98), 78 (90), 77 (100).
C ₇ H ₆ O ₂ Br ₂	(281.93)

Essigsäure-8-brom-7-oxo-6-oxabicyclo[3.2.1]oct-2-en-4-ylester (116)

Zu 210 mg (0.81 mmol) **121** in 4 mL Hexamethylphosphorsäuretriimid (HMPT) werden portionsweise 260 mg (3.2 mmol) Natriumacetat gegeben. Nach einer Reaktionszeit von 3 h bei 23 °C wird das Produkt säulenchromatographisch (SiO₂, PE/EE 1:1 bis 0:1) gereinigt. Alle flüchtigen Bestandteile werden i. Vak. entfernt. Es werden 100 mg (49 %) gelbes Öl erhalten, welches im 1:1-Gemisch neben **116** noch γ -substituiertes Produkt **122** enthält.

DC (SiO ₂)	$R_f = 0.55$ (EE)
¹ H-NMR	(300 MHz, CDCl ₃ , 23 °C) $\delta = 2.14$ (s, 3 H, CH ₃), 3.36 (d, $J = 7.5$ Hz, 1 H), 4.55 (s, 1 H), 4.78 (d't', $J = 3.0, 1.6$ Hz, 1 H), 5.40 (dd, $J = 3.5, 3.0$ Hz, 1 H), 5.90 (ddd, $J = 9.3, 3.5, 1.6$ Hz, 1 H), 6.24 (dd, $J = 9.3, 7.5$ Hz, 1 H).
¹³ C-NMR	(75 MHz, CDCl ₃ , 23 °C) $\delta = 21.0$ (CH ₃), 47.4 (CH), 48.0 (CH), 68.7 (CH), 82.0 (CH), 126.6 (CH), 130.2 (CH), 169.6 (C=O), 175.9 (C=O).
GC-MS	$R_t = 10.25$ min; m/z (%) = 220 (1) [M-CO ₂] ⁺ , 190 (1), 174 (2), 158 (12), 156 (12), 95 (100), 77 (34).
C ₉ H ₉ O ₄ Br	(261.07)

***rac*-3,4-Dihydroxy-cyclohexa-1,5-dien-carbonsäure, *rac*-3,4-*trans*-CHD *rac*-2**

racemische Darstellung aus 116

100 mg (0.20 mmol) Lacton-Isomerengemisch **116** (1:1 mit **122**) werden in 4 mL Wasser suspendiert und mit 1 mL ges. NH₄Cl-Lösung versetzt. Das Reaktionsgemisch wird mit wässriger 4 N KOH-Lösung unter starkem Rühren auf pH 12 gebracht und über einen Zeitraum von 4 h bei 23 °C gerührt. Dabei sinkt der pH-Wert auf 6 ab und die Lösung wird gelblich, später orange. Alle flüchtigen Bestandteile werden i. Vak. entfernt. Der zurückbleibende gelb-bräunliche Feststoff wird säulenchromatographisch (SiO₂, MeOH/EE 1:4) aufgereinigt. Es werden 21 mg (35 %) **116** in Form eines gelblichen Feststoffs erhalten.

DC (SiO ₂)	$R_f = 0.41$ (MeOH/EE 1:4)
¹ H-NMR	(300 MHz, [D ₄]MeOH, 23 °C) $\delta = 4.47$ (d't', $J = 10.3, 2.3$ Hz, 1 H), 4.55 (dd, $J = 10.3, 3.4$ Hz, 1 H), 6.03 (dd, $J = 9.9, 3.1$ Hz, 1 H), 6.28 (d, $J = 9.9$ Hz, 1 H), 6.60 (s, 1 H).
¹³ C-NMR	(75 MHz, [D ₄]MeOH, 23 °C) $\delta = 74.2$ (C-3), 75.1 (C-4), 122.7 (C-6), 129.4 (C-1), 133.4 (C-5), 141.4 (C-2), 168.3 (C=O).
IR (KBr)	$\tilde{\nu}$ [cm ⁻¹] = 3385 (O-H), 1661 (C=O), 1645 (C=C), 1600 (C=C), 1406, 1260, 1078, 1016.
CHN-Analyse	ber. für ×1H ₂ O: C 48.23, H 5.74; gef.: C 49.17, H 6.03.
C ₇ H ₈ O ₄	(156.14)

(3*R*,4*R*)-Dihydroxy-cyclohexa-1,5-dien-carbonsäure, 3,4-*trans*-CHD **2** **enantiomerenrein aus mikrobieller Produktion**

Drehwert: $[\alpha]_D^{20} = -1.6$ ($c = 0.1$ in Ethanol)

Alle anderen analytischen Daten sind mit denen des *rac*-3,4-*trans*-CHD **2** identisch.

6.3.3 Synthesevorschriften zur Darstellung von racemischem 2,3-*trans*-CHD

Buta-1,3-dienyloxy-*tert*-butyldimethylsilan (120)

2.2 g (31 mmol) Crotonaldehyd (**112**) werden mit 3.2 g (32 mmol) Triethylamin in 4 mL Benzen gelöst. Unter Rühren werden 30 mg (0.22 mmol) wasserfreies Zinkchlorid, 50 mg (0.45 mmol) Hydrochinon und 4.9 g (33 mmol) *tert*-Butyldimethylsilylchlorid (TBS-Cl) hinzugegeben. Die Mischung wird unter Luftausschluss auf 70 °C erhitzt, wobei sich die Lösung bräunlich-gelb färbt. Nach 12 h Rühren bei dieser Temperatur wird auf 0 °C abgekühlt und mit ges. NaHCO₃-Lösung gequenchet. Alle unlöslichen Bestandteile werden durch Filtration entfernt und das Filtrat mit 10 %iger KHSO₄-Lösung und Wasser gewaschen. Die org. Phasen werden über Na₂SO₄ getrocknet. Alle flüchtigen Bestandteile werden i. Vak. entfernt und das zurückbleibende Öl bei 16 mbar fraktioniert destilliert. Es werden 1.15 g (20 %) **120** in Form einer farblosen, viskosen Flüssigkeit mit Sdp. = 80 – 90 °C (16 mbar) erhalten.

¹ H-NMR	(300 MHz, CDCl ₃ , 23 °C) δ = 0.16 (s, 6 H, CH ₃), 0.92 (s, 9 H, C(CH ₃) ₃), 4.81 (dd, J = 10.3, 1.9 Hz, 1 H), 4.98 (d, J = 16.8 Hz, 1 H), 5.72 (t', J = 11.8 Hz, 1 H), 6.57 (d, J = 11.8 Hz, 1 H).
¹³ C-NMR	(75 MHz, CDCl ₃ , 23 °C) δ = -5.3 (CH ₃), 18.3 (C(CH ₃) ₃), 25.6 (C(CH ₃) ₃), 111.8 (CH ₂), 114.1 (CH), 133.3 (CH), 145.3 (CH).
GC-MS	R_f = 5.86 min; m/z (%) = 184 (28) [M] ⁺ , 127 (100), 111 (15), 99 (31), 73 (28), 59 (15).
C ₁₀ H ₂₀ OSi	(184.35)

6-(*tert*-Butyldimethylsilyloxy)-cyclohexa-1,4-dien-carbonsäureethylester (109)

Eine Mischung von 1.56 g (8.5 mmol) Silylenolether **120**, 1.06 g (9.7 mmol) Ethylpropiolat (**95**) und 15 mg (47 µmol) Methylenblau wird einem dreifachen Gefrier-Auftau-Cyclus unterworfen. Die Reaktionsmischung wird i. Vak. für 5 d auf 80 °C erhitzt. Dabei tritt zuerst eine rötliche Färbung ein, die nach ca. 24 h auf gelbliche Färbung umschlägt. Alle flüchtige Bestandteile werden i. Vak. entfernt und die zurückbleibende gelbe Flüssigkeit ohne Aufreinigung für weitere Synthesen eingesetzt. Die Ausbeute (**109**) beträgt 0.43 g (41 %).

DC (SiO ₂)	R_f = 0.61 (Hexan/EE 7:3)
¹ H-NMR	(300 MHz, CDCl ₃ , 23 °C) δ = 0.10 (s, 3 H, CH ₃), 0.12 (s, 3 H, CH ₃), 0.86 (s, 9 H, C(CH ₃) ₃), 1.31 (t, J = 7.3 Hz, 3 H, CH ₂ CH ₃), 2.79 (m, 1 H), 2.88 (m, 1 H), 4.20 (dq, J = 20.2, 7.1 Hz, 1 H), 4.33 (dq, J = 20.2, 7.1 Hz, 1 H), 5.09 (d't', J = 5.5, 2.3 Hz, 1 H), 5.87 (s, 1 H), 5.88 (s, 1 H), 6.99 (t'd, J = 3.6, 1.1 Hz, 1 H).
¹³ C-NMR	(75 MHz, CDCl ₃ , 23 °C) δ = -4.2 (CH ₃), 14.1 (CH ₂ CH ₃), 18.2 (C(CH ₃) ₃), 26.0 (C(CH ₃) ₃), 27.5 (C-3), 62.6 (CH ₂ CH ₃), 125.1 (CH), 128.4 (CH), 132.1 (C _q), 137.4 (CH), 166.1 (C=O).
C ₁₅ H ₂₆ O ₃ Si	(282.45)

2-(*tert*-Butyldimethylsilanyloxy)-7-oxabicyclo[4.1.0]hept-3-en-3-carbonsäureethylester (113)

Zu einer Lösung von 2.63 g (9.3 mmol) Diels-Alder-Produkt **109** und 2.37 g (28 mmol) NaHCO₃ in 40 mL Benzen werden portionsweise 3.22 g (19 mmol) *m*-CPBA gegeben. Die Lösung wird über einen Zeitraum von 12 h bei 23 °C gerührt. Die ausgefallene *m*-Chlorbenzoesäure wird abfiltriert und mit Benzen gewaschen. Die org. Phase wird mit je 10 mL ges. Na₂SO₄-Lösung, ges. NaHCO₃-Lösung und ges. NaCl-Lösung gewaschen. Nach Trocknen über MgSO₄ und Filtration werden alle flüchtigen Bestandteile i. Vak. entfernt und der gelbe Rückstand säulenchromatographisch (SiO₂, Hexan/Diethylether 5:1) aufgereinigt. Es werden 583 mg (21 %) **113** in Form eines farblosen Öls erhalten.

DC (SiO ₂)	$R_f = 0.33$ (Hexan/Diethylether 5:1)
¹ H-NMR	(300 MHz, CDCl ₃ , 23 °C) $\delta = 0.11$ (s, 3 H, CH ₃), 0.18 (s, 3 H, CH ₃), 0.85 (s, 9 H, C(CH ₃) ₃), 1.29 (t, $J = 7.2$ Hz, 3 H, CH ₂ CH ₃), 2.74 (m, 2 H), 3.27 (m, 1 H), 3.33 (m, 1 H), 4.15 (dq, $J = 10.9, 7.1$ Hz, 1 H), 4.26 (dq, $J = 10.9, 7.1$ Hz, 1 H), 5.06 (dd, $J = 3.1, 1.6$ Hz, 1 H), 6.75 (ddd, $J = 5.0, 3.1, 1.7$ Hz, 1 H).
¹³ C-NMR	(75 MHz, CDCl ₃ , 23 °C) $\delta = -4.6$ (CH ₃), -4.7 (CH ₃), 14.5 (CH ₂ CH ₃), 18.3 (C(CH ₃) ₃), 26.1 (C(CH ₃) ₃), 26.1 (CH ₂), 49.5 (CH), 54.5 (CH), 60.8 (CH ₂ CH ₃), 72.7 (CH), 129.7 (C-1), 135.3 (C-2), 166.3 (C=O).
C ₁₅ H ₂₆ O ₄ Si	(298.45)

5,6-Bis-(*tert*-butyldimethylsilanyloxy)-cyclohexa-1,3-dien-carbonsäureethylester (108)

95 mg (0.32 mmol) Epoxid **113**, 58 mg (0.380 mmol) *tert*-Butyldimethylsilylchlorid (TBS-Cl) und 3.8 mg (29 µmol) 4-Dimethylaminopyridin (DMAP) werden in 0.56 mL Dichlormethan gelöst. Es wird eine Lösung von 61 mg (0.40 mmol) 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en(1,5-5) (DBU) in 80 µL Dichlormethan hinzugegeben. Anschließend wird über einen Zeitraum von 24 h bei 20 °C gerührt, wobei sich die Lösung dunkelbraun färbt. Nach Entfernen aller flüchtigen Bestandteile i. Vak. wird der zurückbleibende gelbliche Feststoff säulenchromatographisch gereinigt (SiO₂, Hexan/EE 20:1 bis 9:1). Es werden 91 mg (69 %) **108** in Form eines farblosen Öls erhalten.

DC (SiO ₂)	$R_f = 0.54$ (Hexan/EE 19:1)
¹ H-NMR	(300 MHz, CDCl ₃ , 23 °C) $\delta = 0.05$ (s, 3 H, CH ₃), 0.09 (s, 3 H, CH ₃), 0.12 (s, 3 H, CH ₃), 0.17 (s, 3 H, CH ₃), 0.83 (s, 9 H, C(CH ₃) ₃), 0.87 (s, 9 H, C(CH ₃) ₃), 1.32 (t, $J = 7.2$ Hz, 3 H, CH ₂ CH ₃), 4.11 (dd, $J = 4.6, 1.5$ Hz, 1 H), 4.18 (dq, $J = 10.9, 7.1$ Hz, 1 H), 4.28 (dq, $J = 10.9, 7.1$ Hz, 1 H), 4.58 (br s, 1 H), 6.18 (m, 2 H), 7.10 (dd, $J = 5.0, 1.1$ Hz, 1 H).
¹³ C-NMR	(75 MHz, CDCl ₃ , 23 °C) $\delta = -4.6$ (CH ₃), -4.3 (CH ₃), -4.2 (CH ₃), -4.0 (CH ₃), 14.5 (CH ₂ CH ₃), 18.3 (C(CH ₃) ₃), 18.4 (C(CH ₃) ₃), 25.9 (C(CH ₃) ₃), 26.0 (C(CH ₃) ₃), 60.7 (CH ₂ CH ₃), 68.1 (CH), 70.1 (CH), 123.8 (CH), 129.8 (C _q), 132.8 (CH), 133.1 (CH), 167.0 (C=O).
C ₂₁ H ₄₀ O ₄ Si ₂	(412.71)

***rac*-5,6-Dihydroxy-cyclohexa-1,3-dien-carbonsäureethylester (114)**

91 mg (0.22 mmol) TBS-Ether **108** werden in 10 mL Acetonitril gelöst und unter starkem Rühren mit 0.5 mL konz. Flusssäure (40 %) versetzt. Die Reaktionsmischung wird über einen Zeitraum von 1 h bei 23 °C gerührt. Danach wird die gelbliche Lösung mit 1 N NaOH-Lösung neutralisiert (pH 7.0) und i. Vak. alle flüchtigen Bestandteile entfernt. Der übrigbleibende gelbe Feststoff wird säulenchromatographisch (RP-18, MeOH/Wasser/HCO₂H 3:7:0.01) gereinigt. 48 mg (54 %) **114** werden als blassgelber Feststoff isoliert.

DC (RP-18)	$R_f = 0.45$ (MeOH/Wasser/HCO ₂ H 3:7:0.01)
¹ H-NMR	(300 MHz, CDCl ₃ , 23 °C) $\delta = 1.34$ (t, $J = 6.9$ Hz, 3 H, CH ₂ CH ₃), 4.30 (q, $J = 6.9$ Hz, 2 H, CH ₂ CH ₃), 4.59 (d't', $J = 10.5, 2.7$ Hz, 1 H, H-5), 4.77 (dd, $J = 10.5, 1.5$ Hz, 1 H, H-6), 6.08 (ddd, $J = 9.9, 5.7, 2.3$ Hz, 1 H, H-3), 6.28 (dd, $J = 9.5, 3.0$ Hz, 1 H, H-4), 6.99 (d, $J = 5.3$ Hz, 1 H, H-2).
¹³ C-NMR	(75 MHz, CDCl ₃ , 23 °C) $\delta = 14.4$ (CH ₃), 61.3 (CH ₂), 72.7 (CH), 72.9 (CH), 122.9 (CH), 129.7 (C-1), 133.2 (CH), 136.3 (CH), 167.5 (C=O).
C ₈ H ₁₀ O ₄	(170.16)

rac*-5,6-Dihydroxy-cyclohexa-1,3-dien-carbonsäuremethylester (115)*racemische Darstellung aus 95**

200 mg (0.49 mmol) TBS-Ether **95** werden in 10 mL Acetonitril gelöst und unter starkem Rühren mit 0.5 mL konz. Flusssäure (40 %) versetzt. Die Reaktionsmischung wird über einen Zeitraum von 1 h bei 23 °C gerührt. Danach wird die gelbliche Lösung mit 1 N NaOH-Lösung neutralisiert (pH 7.0) und i. Vak. alle flüchtigen Bestandteile entfernt. Der übrigbleibende gelbe Feststoff wird säulenchromatographisch (RP-18, MeOH/Wasser/HCO₂H 3:7:0.01) gereinigt. 48 mg (54 %) **115** werden als blassgelber Feststoff isoliert.

DC (SiO ₂):	$R_f = 0.35$ (EE)
¹ H-NMR	(300 MHz, CDCl ₃ , 23 °C) $\delta = 3.82$ (s, 3 H, OCH ₃), 4.57 (ddd, $J = 9.3, 3.3, 1.9$ Hz, 1 H, H-5), 4.76 (dd, $J = 9.3, 1.3$ Hz, 1 H, H-6), 6.08 (ddd, $J = 9.6, 5.4$ Hz, 1.9 Hz, 1 H, H-3), 6.29 (ddd, $J = 9.6, 3.3, 0.9$ Hz, 1 H, H-4), 6.99 (d, $J = 5.4$ Hz, 1 H, H-2).
¹³ C-NMR	(75 MHz, CDCl ₃ , 23 °C) $\delta = 52.3$ (OCH ₃), 72.5 (CH), 72.7 (CH), 122.9 (CH), 129.4 (C-1), 133.4 (CH), 136.4 (CH), 167.9 (C=O).
IR (KBr)	$\tilde{\nu}$ [cm ⁻¹] = 2971 (C-H), 2931 (C-H), 1725 (C=O), 1638 (C=C), 1454, 1372, 1276 (C-O), 1109.
UV/Vis	$\lambda_{\max}(\text{H}_2\text{O}) = 282$ nm
MS (EI)	m/z (%) = 170 (27) [M] ⁺ , 152 (54) [M-H ₂ O] ⁺ , 138 (91), 128 (2), 121 (89), 110 (100), 93 (38), 82 (69), 65 (50), 53 (38).
HR-MS	ber.: 170.0579; gef.: 170.0580.
C ₈ H ₁₀ O ₄	(170.17)

***rac*-5,6-Dihydroxy-cyclohexa-1,3-dien-carbonsäure, *rac*-2,3-*trans*-CHD *rac*-1
racemische Darstellung aus geschütztem *trans*-CHD 114**

Zu einer Lösung von 9 mg (49 μ mol) Ester **114** in 0.5 mL Methanol werden bei 0 °C tropfenweise insgesamt 0.25 mL einer 0.27 M LiOH-Lösung gegeben. Es wird über einen Zeitraum von 24 h bei 23 °C gerührt, dann mit 6 N HCl-Lösung auf pH 7 gebracht. Alle flüchtigen Bestandteile werden i. Vak. entfernt und der zurückbleibende gelbe Feststoff säulenchromatographisch (SiO₂, EE/MeOH 5:1) gereinigt. Es werden 6.6 mg (80 %) **1** in Form eines gelben Feststoffs erhalten.

¹ H-NMR	(300 MHz, [D ₄]MeOH, 23 °C) δ = 4.10 (d, J = 2.5 Hz, 1 H, H-5), 4.50 (d, J = 2.5 Hz, 1 H; H-6), 6.20 (m, 2 H; H-3,4), 7.06 (dd, J = 3.3, 3.2 Hz, 1 H, H-2).
¹³ C-NMR	(75 MHz, [D ₄]MeOH, 23 °C) δ = 68.8 (C-3), 70.4 (C-2), 125.1 (C-5), 130.8 (C-1), 134.3 (C-4), 134.4 (C-6), 170.2 (C=O).
IR (KBr)	$\tilde{\nu}$ [cm ⁻¹] = 1699 (C=O), 1644 (C=C), 1586 (C=C), 1258 (C-O), 1075, 1008.
UV/Vis	λ_{max} (H ₂ O) = 279 nm; ϵ (λ_{max}) = 4900.
MS (EI)	m/z (%) = 156 (6) [M] ⁺ , 138 (100) [M-H ₂ O] ⁺ , 110 (63), 93 (10), 82 (29), 65 (13).
HR-MS	ber.: 156.0423; gef.: 156.0424.
C ₇ H ₈ O ₄	(156.14)

(5*S*,6*S*)-Dihydroxy-cyclohexa-1,3-dien-carbonsäure, 2,3-*trans*-CHD **1
enantiomerenrein aus mikrobieller Produktion**

Drehwert: $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +3.8$ (c = 0.6 in Ethanol)

Alle anderen analytischen Daten sind mit denen des *rac*-2,3-*trans*-CHD **1** identisch.

6.3.4 Synthesevorschriften zur Folgechemie von 2,3-*trans*-CHD

(5*S*,6*S*)-Dihydroxycyclohex-1-encarbonsäuremethylester (143**)**

Eine Lösung von 50 mg (0.29 mmol) Methylester **115** und 2 mg Palladium/Aktivkohle in 25 mL Methanol wird bei 5 bar H₂-Atmosphäre und 23 °C über einen Zeitraum von 21 h hydriert. Nach Entfernen des Katalysators durch Filtration (G4-Fritte) wird die gelbliche Lösung i. Vak. eingedunstet, der Rückstand getrocknet. 45 mg (89 %) **143** werden als gelber Feststoff erhalten.

Drehwert	$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +0.5$ (c = 1.0 in Ethanol)
¹ H-NMR	(300 MHz, [D ₄]MeOH, 23 °C) δ = 1.67-1.79 (m, 2 H), 2.17-2.22 (m, 2 H), 3.68 (s, 3 H, OCH ₃), 3.84 (br, 1 H, CHOH), 4.24 (br, 1 H, CHOH), 7.04 (s, 1 H, Alken).
¹³ C-NMR	(75 MHz, [D ₄]MeOH, 23 °C) δ = 22.8 (CH ₂), 24.4 (CH ₂), 52.3 (OCH ₃), 67.5 (CH), 70.5 (CH), 131.2 (C-2), 144.2 (C-1), 169.0 (C=O).

GC-MS	$R_t = 8.70 \text{ min}; m/z (\%) = 172 (1) [M]^+, 128 (100) [M-CO_2]^+, 96 (70), 68 (34).$
$C_8H_{12}O_4$	(172.14)

(2*S*,3*S*)-Dihydroxycyclohexancarbonsäuremethylester (144)

Eine Lösung von 50 mg (0.29 mmol) Methylester **115** und 2 mg Palladium/Aktivkohle in 25 mL 2-Butanol wird bei 5.5 bar H_2 -Atmosphäre und 90 °C über einen Zeitraum von 16 h hydriert. Nach Entfernen des Katalysators durch Filtration (G4-Fritte) wird die gelbliche Lösung i. Vak. eingedunstet, der Rückstand getrocknet. 44 mg (85 %) **144** werden als gelber Feststoff erhalten.

1H -NMR	(300 MHz, $[D_4]MeOH$, 23 °C) $\delta = 1.27$ -1.49 (m, 3 H), 1.73 (m, 1 H), 1.82 (d, $J = 10.6 \text{ Hz}$, 1 H), 1.92 (d, $J = 9.9 \text{ Hz}$, 1 H), 2.32 (t', $J = 11.0, 3.6 \text{ Hz}$, 1 H), 3.29 (s, 1 H, $CHOH$), 3.45 (t', 1 H, $J = 9.2 \text{ Hz}$, $CHOH$), 3.67 (s, 3 H, OCH_3).
^{13}C -NMR	(75 MHz, $[D_4]MeOH$, 23 °C) $\delta = 24.5 (CH_2)$, 29.9 (CH_2), 34.1 (CH_2), 51.6 (C-1), 52.4 (OCH_3), 75.3 (CH), 77.2 (CH), 176.5 (C=O).
GC-MS	$R_t = 8.30 \text{ min}; m/z (\%) = 173 (1) [M-H]^+, 156 (61) [M-H_2O]^+, 97 (100).$
$C_8H_{14}O_4$	(174.14)

(5*S*,6*S*)-Dihydroxy-cyclohexa-1,3-dien-carbonsäuremethylester (115)

enantiomerenreine Darstellung aus 2,3-*trans*-CHD 1

a) Verfahren mit Trimethylsilylchlorid

Zu einer Lösung von 6.51 g (42 mmol) 2,3-*trans*-CHD **1** in 77 mL wasserfreiem Methanol werden tropfenweise 10 mL (79 mmol) Trimethylsilylchlorid (TMS-Cl) gegeben. Die Reaktionsmischung wird über einen Zeitraum von 18 h bei Raumtemperatur gerührt, dann mit ges. $NaHCO_3$ -Lösung neutralisiert. Entstandenes weißes Präzipitat wird durch Filtration entfernt. Nach Abdestillieren des Lösungsmittels i. Vak. und säulenchromatographischer Endreinigung (SiO_2 , EE) werden 3.27 g (48 %) Methylester **115** in Form von gelben Kristallen mit Schmp. 79-80 °C erhalten.

Drehwert: $[\alpha]_D^{20} = +4.6$ ($c = 0.45$ in Ethanol)

Alle anderen analytischen Daten sind mit denen des racemischen **115** (siehe Kapitel 6.3.3) identisch.

b) Verfahren mit Trimethylsilyldiazomethan

Zu einer Lösung von 255 mg (1.6 mmol) 2,3-*trans*-CHD **1** in 5.4 mL Methanol und 11 mL Hexan werden tropfenweise 4 mL einer 2 M Lösung von Trimethylsilyldiazomethan (TMS-diazomethan) in Hexan gegeben. Nach Rühren über einen Zeitraum von 24 h bei Raumtemperatur werden alle flüchtigen Bestandteile i. Vak. entfernt und das Rohprodukt säulen-

chromatographisch (SiO₂, EE) gereinigt. Es werden 224 mg (81 %) Methylester **115** als Kristalle mit ähnlicher Farbe, ähnlichem Habitus und Schmp. wie die aus Verfahren a) gewonnenen Kristalle erhalten.

Alle analytischen Daten entsprechen denen des nach Verfahren a) hergestellten **115**.

(5*S*,6*S*)-Bis-(*tert*-butyldimethylsilanyloxy)-cyclohexa-1,3-dien-carbonsäuremethylester (95)

Eine Lösung von 18 mg (0.11 mmol) Methylester **115** und 20 mg (0.2 mmol) Triethylamin in 10 mL Dichlormethan wird mit 34 mg (1.3 mmol) *tert*-Butyldimethylsilyltriflat (TBS-OTf) versetzt. Es wird über einen Zeitraum von 18 h bei 23 °C gerührt, wobei sich die Lösung dunkel färbt. Die Lösung wird mit 4 mL kalter (0 °C), ges. NaHCO₃-Lösung gequenchet, dann mit Diethylether verdünnt und über MgSO₄ getrocknet. Alle flüchtigen Bestandteile werden i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch (SiO₂, Hexan/EE 20:1 bis 9:1) gereinigt. Es werden 34 mg (78 %) **95** in Form eines farblosen Öls erhalten.

DC (SiO ₂)	$R_f = 0.35$ (Hexan/EE 19:1)
Drehwert	$[\alpha]_D^{20} = +305$ ($c = 3.3$ in CH ₂ Cl ₂)
¹ H-NMR	(300 MHz, CDCl ₃ , 23 °C) $\delta = 0.05$ (s, 3 H, CH ₃), 0.09 (s, 3 H, CH ₃), 0.12 (s, 3 H, CH ₃), 0.17 (s, 3 H, CH ₃), 0.83 (s, 9 H, C(CH ₃) ₃), 0.87 (s, 9 H, C(CH ₃) ₃), 3.78 (s, 3 H, OCH ₃), 4.11 (dd, $J = 4.8, 1.5$ Hz, 1 H), 4.57 (b, 1 H), 6.18 (m, 2 H), 7.12 (dd, $J = 5.0, 1.5$ Hz, 1 H).
¹³ C-NMR	(75 MHz, CDCl ₃ , 23 °C) $\delta = -4.6$ (CH ₃), -4.3 (CH ₃), -4.2 (CH ₃), -4.0 (CH ₃), 18.3 (C(CH ₃) ₃), 18.4 (C(CH ₃) ₃), 26.0 (C(CH ₃) ₃), 26.0 (C(CH ₃) ₃), 51.8 (OCH ₃), 68.1 (CH), 70.1 (CH), 123.8 (CH), 129.5 (C _q), 133.1 (CH), 133.1 (CH), 167.0 (C=O).
C ₂₀ H ₃₈ O ₄ Si ₂	(398.68)

(1*S*,4*S*,5*R*,6*R*)-4,5-Dihydroxy-7-oxabicyclo[4.1.0]hept-2-en-3-carbonsäuremethylester ((3*S*,4*R*,5*R*,6*S*)-5,6-Dihydroxy-3,4-epoxy-cyclohexa-1-encarbonsäuremethylester, 133)

Eine Lösung von 458 mg (2.7 mmol) Methylester **115**, 1.86 g (22 mmol) NaHCO₃ und 1.24 g (7.2 mmol) *m*-CPBA in 230 mL Methylenchlorid wird über einen Zeitraum von 12 h bei 23 °C gerührt. Die Reaktionslösung wird durch Filtration von entstandenem weißen Niederschlag getrennt und i. Vak. aufkonzentriert. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch (SiO₂, EE) gereinigt. Man erhält 281 mg (56 %) **133** als weißer kristalliner Feststoff mit einem Schmelzpunkt von 108-112 °C. Einkristalle für die Röntgenstrukturanalyse werden durch Umkristallisation von 100 mg (0.54 mmol) **133** in EE/Pentan bei 4 °C über 14 h hergestellt.

DC (SiO ₂)	$R_f = 0.27$ (EE)
Drehwert	$[\alpha]_D^{20} = -0.8$ ($c = 1.1$ in Ethanol)

¹ H-NMR	(300 MHz, [D ₄]MeOH, 23 °C) δ = 3.50 (dd, J = 4.2, 3.9 Hz, 1 H, H-3), 3.58 (dd, J = 4.2, 1.3 Hz, 1 H, H-4), 3.74 (s, 3 H, OCH ₃), 3.84 (dd, J = 7.6, 1.3 Hz, 1 H, H-5), 4.22 (dd, J = 7.6, 2.1 Hz, 1 H, H-6), 6.83 (dd, J = 3.9, 2.1 Hz, 1 H, H-2).
¹³ C-NMR	(75 MHz, [D ₄]MeOH, 23 °C) δ = 48.9 (CH), 52.6 (OCH ₃), 56.4 (CH), 70.4 (CH), 74.3 (CH), 134.1 (C-1), 140.1 (C-2), 168.1 (C=O).
IR (KBr)	$\tilde{\nu}$ [cm ⁻¹] = 3416 (O-H), 2927 (C-H), 1725 (C=O), 1648 (C=C), 1433, 1385, 1267 (C-O), 1128, 1101, 1069.
UV/Vis	λ_{max} (H ₂ O) = 222 nm
MS (EI)	m/z (%) = 186 (1) [M] ⁺ , 168 (1) [M-H ₂ O] ⁺ , 155 (9), 139 (24), 125 (100), 110 (14), 97 (29), 81 (13), 69 (15), 59 (7), 53 (18).
CHN-Analyse	ber.: C 51.61, H 5.41; gef.: C 51.38, H 5.40.
C ₈ H ₁₀ O ₅	(186.16)

(1*R*,4*S*,5*R*,6*S*)-4,5-Dihydroxy-7-oxabicyclo[4.1.0]hept-2-en-3-carbonsäuremethylester ((3*R*,4*S*,5*R*,6*S*)-5,6-Dihydroxy-3,4-epoxy-cyclohexa-1-encarbonsäuremethylester, 134)

Zu einer Lösung von 120 mg (0.29 mmol) Silylether **137** in 6 mL Acetonitril werden tropfenweise über einen Zeitraum von 30 min insgesamt 300 μ L 40 % Flusssäure gegeben. Die Lösung wird 1 h bei 23 °C gerührt, dann mit 1 N KOH-Lösung auf pH 7 eingestellt. Alle flüchtigen Bestandteile werden i. Vak. entfernt und das zurückbleibende farblose viskose Öl säulenchromatographisch (EE/MeOH 5:1) gereinigt. 41 mg (76 %) **134** werden in Form eines farblosen Öls erhalten.

DC (SiO ₂)	R_f = 0.18 (EE/MeOH 5:1)
¹ H-NMR	(300 MHz, [D ₄]MeOH, 23 °C) δ = 3.35 (dd, J = 10.3, 8.1 Hz, 1 H), 3.48 (dd, J = 10.3, 7.3 Hz, 1 H), 3.74 (s, 3 H, OCH ₃), 4.14 (ddd, J = 8.0, 4.8, 2.7 Hz, 1 H), 4.35 (d, J = 7.2, 1 H), 6.53 (s, 1 H, H-2).
¹³ C-NMR	(75 MHz, [D ₄]MeOH, 23 °C) δ = 49.2 (CH), 52.6 (OCH ₃), 61.7 (CH), 72.8 (CH), 76.5 (CH), 133.5 (C-1), 141.2 (C-2), 173.2 (C=O).
C ₈ H ₁₀ O ₅	(186.16)

(3*R*,4*S*,5*R*,6*S*)-3-Azido-4,5,6-trihydroxy-cyclohex-1-encarbonsäuremethylester (131)

177 mg (0.95 mmol) Epoxid **133** werden in 451 mg (1.36 mmol) Tributylzinnazid (TBT-azid) suspendiert und bei 2 mbar für 2 d auf 45 °C erhitzt. Nach Zugabe von 1 mL THF wird die Mischung nochmals bei 2 mbar für 1 d auf 45 °C erhitzt. Das entstehende gelbe Öl wird säulenchromatographisch (SiO₂, EE) gereinigt. Es werden 161 mg (74 %) **131** in Form eines farblosen Feststoffs erhalten.

DC (SiO ₂)	R_f = 0.35 (EE)
Drehwert	$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ = -0.2 (c = 0.3 in Ethanol)
¹ H-NMR	(300 MHz, [D ₄]MeOH, 23 °C) δ = 3.74 (dd, J = 3.6, 2.3 Hz, 1 H, H-5), 3.75 (s, 3 H, OCH ₃), 3.88 (m, 1 H, H-4), 4.21 (dd, J = 8.5, 2.5 Hz, 1 H, H-3), 4.45 (dd, J = 3.1, 1.0 Hz, 1 H, H-6), 6.72 (d, J = 2.4 Hz, 1 H, H-2).

^{13}C -NMR	(75 MHz, $[\text{D}_4]\text{MeOH}$, 23 °C) δ = 52.7 (OCH ₃), 62.3 (CH), 69.1 (CH), 70.9 (CH), 75.2 (CH), 133.2 (C-1), 139.3 (C-2), 167.8 (C=O).
IR (KBr)	$\tilde{\nu}$ [cm ⁻¹] = 3425 (O-H), 2955 (C-H), 2108 (Azid), 1712 (C=O), 1654 (C=C), 1440, 1275 (C-O), 1095, 1032.
UV/Vis	$\lambda_{\text{max}}(\text{H}_2\text{O})$ = 210 nm
CHN-Analyse	ber.: C 41.92, H 4.84; gef.: C 42.27, H 5.11.
$\text{C}_8\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_5$	(229.19)

(3*R*,4*R*,5*R*,6*S*)-3-Chlor-4,5,6-trihydroxy-cyclohex-1-encarbonsäuremethylester (135)

Zu 177 mg (0.95 mmol) Epoxid **133** werden tropfenweise 1.4 mL einer 1 M Lösung von Lithiumtetrachlorocuprate(II) in THF gegeben. Die gelbe Lösung wird über einen Zeitraum von 12 h bei 23 °C gerührt und überschüssiges Cuprat mit 1 mL Methanol, dann 1 mL Wasser hydrolysiert. Nach Aufkonzentrieren i. Vak. wird das zurückbleibende grüne Öl durch Flashchromatographie (SiO_2 , EE) gereinigt. Es werden 166 mg (78 %) **135** in Form eines schwach gelben Öls erhalten.

DC (SiO_2)	R_f = 0.32 (EE)
Drehwert	$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -0.1$ (c = 1.0 in Ethanol)
^1H -NMR	(300 MHz, $[\text{D}_4]\text{MeOH}$, 23 °C) δ = 3.77 (s, 3 H, OCH ₃), 3.92 (dd, J = 3.5, 2.3 Hz, 1 H, H-5), 3.97 (dd, J = 8.0, 2.3 Hz, 1 H, H-4), 4.48 (dd, J = 3.5, 0.5 Hz, 1 H, H-6), 4.63 (ddd, J = 8.0, 2.7, 0.7 Hz, 1 H, H-3), 6.81 (d, J = 2.7 Hz, 1 H, H-2).
^{13}C -NMR	(75 MHz, $[\text{D}_4]\text{MeOH}$, 23 °C) δ = 52.7 (OCH ₃), 59.8 (CH), 69.0 (CH), 73.0 (CH), 75.0 (CH), 132.6 (C-1), 140.6 (C-2), 167.7 (C=O).
IR (KBr)	$\tilde{\nu}$ [cm ⁻¹] = 3409 (O-H), 2954 (C-H), 1717 (C=O), 1654 (C=C), 1439, 1280 (C-O), 1252 (C-O), 1094, 1034.
UV/Vis	$\lambda_{\text{max}}(\text{H}_2\text{O})$ = 202 nm
MS (EI)	m/z (%) = 221 (0.1) $[\text{M} - \text{H}]^+$, 191 (16), 169 (40), 162 (77), 137 (58), 127 (100), 109 (42), 95 (94), 81 (37), 60 (32), 53 (33).
$\text{C}_8\text{H}_{11}\text{ClO}_5$	(222.62)

(3*R*,4*R*,5*R*,6*S*)-3-Brom-4,5,6-trihydroxy-cyclohex-1-encarbonsäuremethylester (136)

Die Darstellung des Bromderivates **136** erfolgt analog **135** mit 1 N Lösung von Lithiumtetrabromocuprate(II) in THF. Ausgehend von 8 mg (43 μmol) Epoxid **133** werden 6.9 mg (60 %) **136** in Form eines schwach gelben Öls erhalten.

DC (SiO_2)	R_f = 0.57 (EE)
Drehwert	$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -0.04$ (c = 0.35 in Ethanol)
^1H -NMR	(300 MHz, $[\text{D}_4]\text{MeOH}$, 23 °C) δ = 3.76 (s, 3 H, OCH ₃), 3.89 (dd, J = 3.8, 2.3 Hz, 1 H, H-5), 4.07 (ddd, J = 7.5, 2.3 Hz, 1 H, H-4), 4.49 (d, J = 3.8 Hz, 1 H, H-6), 4.71 (ddd, J = 7.5, 2.9, 0.6 Hz, 1 H, H-3), 6.91 (d, J = 2.9 Hz, 1 H, H-2).

^{13}C -NMR	(75 MHz, $[\text{D}_4]\text{MeOH}$, 23 °C) δ = 50.9 (CH), 52.7 (OCH_3), 69.0 (CH), 73.6 (CH), 74.8 (CH), 132.4 (C-1), 141.0 (C-2), 167.8 (C=O).
IR (KBr)	$\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3420 (O-H), 2955 (C-H), 2925 (C-H), 1712 (C=O), 1647 (C=C), 1439, 1282 (C-O), 1259 (C-O), 1092, 1033.
UV/Vis	$\lambda_{\text{max}}(\text{H}_2\text{O})$ = 210 nm
CHN-Analyse	ber.: C 35.98, H 4.15; gef.: C 36.52, H 4.55.
$\text{C}_8\text{H}_{11}\text{BrO}_5$	(267.07)

(3R,4S,5R,6S)-3-Diethylamino-4,5,6-trihydroxy-cyclohex-1-encarbonsäuremethylester (132)

Zu einer Lösung von 132 mg (0.71 mmol) Epoxid **133** und 133 mg (0.24 mmol) $\text{Yb}(\text{OTf})_3$ in 8 mL Dichlormethan werden tropfenweise unter Rühren 105 μL (1.0 mmol) Diethylamin gegeben. Anschließend wird 24 h bei 23 °C gerührt, dann weitere 24 h zum Sieden erhitzt. Alle flüchtigen Bestandteile werden i. Vak. entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an DOWEX[®] 50W $\times$ 8 gereinigt. Dazu wird das Harz (2 g) mit 2 M HCl-Lösung gewaschen, mit Wasser äquilibriert und das in 5 mL H_2O gelöste Produkt aufgetragen. Die Elution erfolgt mit 0.5 M Ammoniaklösung. Nach Entfernen des Elutionsmittels i. Vak. werden 55 mg (30 %) Diethylaminoderivat **132** in Form eines weißen Feststoffs erhalten.

^1H -NMR	(300 MHz, CDCl_3 , 23 °C) δ = 1.10 (t, J = 7.0 Hz, 6 H, CH_2CH_3), 2.63 (dq, J = 19.4, 7.0 Hz, 4 H, CH_2CH_3), 3.80 (s, 3 H, OCH_3), 3.58 (d, J = 9.2 Hz, 1 H, H-3), 3.82 (dd, J = 9.2, 2.3 Hz, 1 H, H-4), 4.29 (s, J = 2.3, 1.7 Hz, 1 H, H-5), 4.55 (s, J = 1.7 Hz, 1 H, H-6), 7.06 (s, 1 H, H-2).
^{13}C -NMR	(75 MHz, CDCl_3 , 23 °C) δ = 14.8 (CH_2CH_3), 45.3 (CH_2CH_3), 52.3 (OCH_3), 59.5 (CH), 66.6 (CH), 68.0 (CH), 71.8 (CH), 131.9 (C-1), 140.0 (C-2), 170.0 (C=O).
GC-MS	R_t = 12.12 min; m/z (%) = 259 (1) $[\text{M}]^+$, 241 (3) $[\text{M} - \text{H}_2\text{O}]^+$, 228 (4), 212 (18), 199 (37), 167 (100), 110 (20), 71 (30), 56 (17).
$\text{C}_{12}\text{H}_{21}\text{NO}_5$	(259.30)

(3R,4S,5R,6S)-3-Amino-4,5,6-trihydroxy-cyclohex-1-encarbonsäuremethylester (141):

Zu einer Lösung von 200 mg (0.87 mmol) Azid **131** in 10 mL THF werden portionsweise unter starkem Rühren 450 mg (1.71 mmol) Triphenylphosphin gegeben. Nach 2 h hat sich der Feststoff vollständig gelöst. Es werden 30 μL (1.67 mmol) Wasser zugegeben und die Lösung über einen Zeitraum von 24 h bei 23 °C gerührt. Nach Zugabe von 10 mL EE wird die org. Phase dreimal mit je 20 mL Wasser extrahiert. Die wässrigen Phasen werden dreimal mit je 20 mL Hexan gewaschen. Alle flüchtigen Bestandteile der wässrigen Phase werden i. Vak. entfernt und das Rohprodukt durch Flashchromatographie (SiO_2 , $\text{MeOH}/\text{CHCl}_3$ 1:1) gereinigt. Nach Trocknen i. Vak. werden 171 mg (96 %) Amin **141** in Form eines farblosen Öls erhalten.

DC (SiO_2)	R_f = 0.45 ($\text{MeOH}/\text{CHCl}_3/\text{HCO}_2\text{H}$ 10:10:1)
-----------------------	--

$^1\text{H-NMR}$	(300 MHz, $[\text{D}_4]\text{MeOH}$, 23 °C) δ = 3.65 (s, 1 H), 3.67 (s, 3 H, OCH_3), 3.69 (s, 1 H), 3.85 (s, 1 H), 4.40 (d, J = 2.9 Hz, 1 H), 6.73 (s, 1 H).
$^{13}\text{C-NMR}$	(75 MHz, $[\text{D}_4]\text{MeOH}$, 23 °C) δ = 51.9 (CH), 52.7 (OCH_3), 70.0 (CH), 71.3 (CH), 74.8 (CH), 133.1 (C-1), 140.5 (C-2), 167.9 (C=O).
IR (KBr)	$\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3420 (O-H), 1716 (C=O), 1632 (C=C), 1594 (N-H), 1349, 1268 (C-O), 1108, 668.
CHN-Analyse	ber.: C 47.29, H 6.45, N 6.89; gef.: C 37.27, H 5.68, N 4.12.
$\text{C}_8\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_5$	(203.19)

7. Röntgenstrukturanalyse

Kristallographische Daten der Verbindung 133

Geeignete Kristalle zur Anfertigung einer Röntgenstrukturanalyse von **133** werden durch Umkristallisieren in EE/Pentan erhalten.

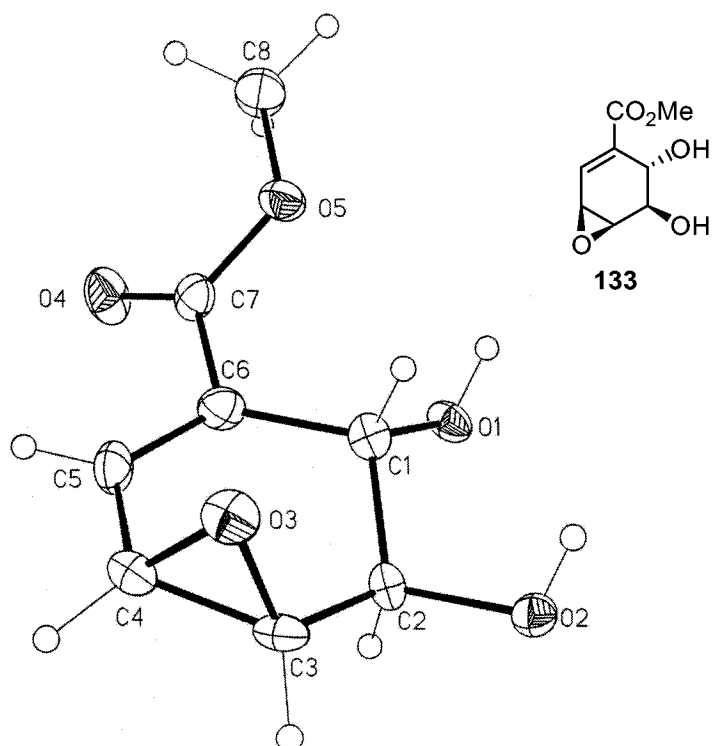


Table 1. Crystal data and structure refinement for jyk_mm.

Identification code	jyk_mm_2
Empirical formula	C ₈ H ₁₀ O ₅
Formula weight	186.16
Temperature	123(2) K
Wavelength	0.71073 Å (MoKα)
Crystal system, space group	Monoclinic, P2 ₁ (No.4)
Unit cell dimensions	$a = 8.6140(2) \text{ Å}$ $\alpha = 90^\circ$ $b = 4.5655(1) \text{ Å}$ $\beta = 112.515(2)^\circ$ $c = 11.0991(4) \text{ Å}$ $\gamma = 90^\circ$
Volume	403.23(2) Å ³
Z, Calculated density	2, 1.533 Mg/m ³

Z, Calculated density	2, 1.533 Mg/m ³
Absorption coefficient	0.129 mm ⁻¹
F(0,0,0)	196
Crystal size	0.40 x 0.20 x 0.08 mm
Diffractometer	Nonius KappaCCD
Θ range for data collection	1.99 to 24.99°
Limiting indices	$-10 \leq h \leq 10$, $-5 \leq k \leq 5$, $-13 \leq l \leq 13$
Reflections collected / unique	8907 / 1418 [$R_{\text{int}} = 0.0270$]
Completeness to $\Theta = 24.99$	99.3 %
Absorption correction	None
Refinement method	Full-matrix least-squares on F^2
Data / restraints / parameters	1418 / 1 / 121
Goodness-of-fit on F^2	1.097
Final R indices [$I > 2\sigma(I)$]	$R_1 = 0.0290$, $wR_2 = 0.0772$
R indices (all data)	$R_1 = 0.0294$, $wR_2 = 0.0776$
Absolute structure parameter	0.5(10), cannot be determined reliabl.
Largest diff. peak and hole	0.581 and $-0.167 \text{ e}\text{\AA}^{-3}$

Table 2. Atomic coordinates [$\times 10^4$] and equivalent isotropic displacement parameters [$\text{\AA}^2 \times 10^3$] for jyk_mm. $U(\text{eq})$ is defined as one third of the trace of the orthogonalized U_{ij} tensor.

	x	y	z	$U(\text{eq})$
C(1)	3517(2)	3720(4)	3308(2)	13(1)
O(1)	3230(1)	5050(3)	4375(1)	15(1)
C(2)	4901(2)	5418(4)	3073(2)	13(1)
O(2)	6482(1)	5187(3)	4162(1)	15(1)
C(3)	5083(2)	4560(4)	1829(2)	15(1)
O(3)	4767(2)	1536(3)	1426(1)	19(1)
C(4)	3560(2)	3809(4)	701(2)	17(1)
C(5)	1949(2)	3705(4)	888(2)	19(1)
C(6)	1921(2)	3636(4)	2084(2)	16(1)
C(7)	294(2)	2944(4)	2219(2)	17(1)
O(4)	-1062(2)	3837(3)	1512(1)	26(1)
O(5)	546(2)	1062(3)	3200(1)	20(1)
C(8)	-951(2)	74(5)	3378(2)	25(1)

Table 3. Bond lengths [Å] and angles [°] for jyk_mm.

C(1)-O(1)	1.4332(19)	C(3)-C(4)	1.465(3)
C(1)-C(6)	1.519(2)	O(3)-C(4)	1.471(2)
C(1)-C(2)	1.526(2)	C(4)-C(5)	1.481(2)
O(1)-H(10)	0.8400	C(5)-C(6)	1.337(3)
C(2)-O(2)	1.4379(19)	C(6)-C(7)	1.500(2)
C(2)-C(3)	1.500(2)	C(7)-O(4)	1.201(2)
O(2)-H(20)	0.8400	C(7)-O(5)	1.338(2)
C(3)-O(3)	1.445(2)	O(5)-C(8)	1.449(2)
O(1)-C(1)-C(6)	111.51(13)	C(3)-C(4)-O(3)	58.93(11)
O(1)-C(1)-C(2)	108.63(13)	C(3)-C(4)-C(5)	117.94(14)
C(6)-C(1)-C(2)	110.97(13)	O(3)-C(4)-C(5)	113.88(14)
C(1)-O(1)-H(10)	109.5	C(6)-C(5)-C(4)	120.92(15)
O(2)-C(2)-C(3)	110.82(13)	C(5)-C(6)-C(7)	118.50(16)
O(2)-C(2)-C(1)	111.67(13)	C(5)-C(6)-C(1)	122.25(15)
C(3)-C(2)-C(1)	112.91(13)	C(7)-C(6)-C(1)	118.42(14)
C(2)-O(2)-H(20)	109.5	O(4)-C(7)-O(5)	124.33(16)
O(3)-C(3)-C(4)	60.73(11)	O(4)-C(7)-C(6)	125.08(16)
O(3)-C(3)-C(2)	117.40(13)	O(5)-C(7)-C(6)	110.51(14)
C(4)-C(3)-C(2)	118.17(14)	C(7)-O(5)-C(8)	115.80(14)
C(3)-O(3)-C(4)	60.34(11)		

Table 4. Anisotropic displacement parameters [$\text{\AA}^2 \times 10^3$] for jyk_mm. The anisotropic displacement factor exponent takes the form:

$$-2\pi^2 [(ha^*)^2 U_{11} + \dots + 2hka^*b^* U_{12}]$$

	U_{11}	U_{22}	U_{33}	U_{23}	U_{13}	U_{12}
C(1)	15(1)	13(1)	13(1)	-1(1)	7(1)	2(1)
O(1)	21(1)	14(1)	12(1)	0(1)	9(1)	0(1)
C(2)	15(1)	13(1)	12(1)	1(1)	4(1)	1(1)
O(2)	14(1)	15(1)	15(1)	1(1)	5(1)	0(1)
C(3)	20(1)	10(1)	20(1)	0(1)	12(1)	-1(1)
O(3)	24(1)	15(1)	19(1)	-3(1)	11(1)	2(1)
C(4)	22(1)	16(1)	15(1)	1(1)	9(1)	0(1)
C(5)	18(1)	21(1)	14(1)	1(1)	2(1)	1(1)
C(6)	14(1)	16(1)	20(1)	0(1)	8(1)	0(1)
C(7)	17(1)	20(1)	12(1)	-4(1)	5(1)	0(1)
O(4)	14(1)	41(1)	22(1)	8(1)	5(1)	7(1)
O(5)	15(1)	24(1)	21(1)	6(1)	7(1)	-2(1)
C(8)	22(1)	33(1)	24(1)	1(1)	12(1)	-5(1)

8. Literaturverzeichnis

- [1] a) P. Sears, C.-H. Wong, *Science* **2001**, *291*, 2344-2350; b) H. Lis, N. Sharon, *Eur. J. Biochem.* **1993**, *218*, 1-27; c) S. Hakomori, Y. Zhan, *Chem. Biol.* **1997**, *4*, 97-104; d) Y. C. Lee, R. T. Lee, *Acc. Chem. Res.* **1995**, *28*, 321-327; e) T. Kolter, K. Sandhoff, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 1632-1670; *Angew. Chem., Int. Ed.* **1999**, *38*, 1532-1568; f) R. A. Dwek, *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 683.
- [2] a) J. D. McCarter, S. G. Withers, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1994**, *4*, 885-892; b) P. Sears, C.-H. Wong, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 2446-2471; *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.* **1999**, *38*, 2300-2324.
- [3] a) M. Mammen, S.-K. Choi, G. M. Whitesides, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 2908-2935; *Angew. Chem., Int. Ed.* **1998**, 2754-2794; b) E. J. Gordon, W. J. Sanders, L. L. Kiessling, *Nature* **1998**, *392*, 30-31.
- [4] S. J. Danishefsky, J. R. Allen, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 882-912; *Angew. Chem., Int. Ed.* **2000**, *39*, 836-863.
- [5] Übersichten zur Verwendung von *chiral-pool*-Substanzen in der Naturstoff- und Wirkstoffsynthese: a) G. M. Goppola, *Asymmetric Synthesis*, Wiley, New York, **1987**; S. Hanessian, *Total Synthesis of Natural Products: The Chiron Approach*, Pergamon, Elmsford, New York, **1983**; c) J. D. Morrison, J. W. Scott, *Asymmetric Synthesis, Vol. 4*, Academic Press, New York, **1984**.
- [6] a) Arbeitsgruppen, die sich mit der Verwendung von *cis*-CHD in der Naturstoff- und Wirkstoffsynthese, einschließlich der Chemie der Kohlenhydratmimetika beschäftigen, sind: **Australien**: Banwell; **Österreich**: Griengl; **Japan**: Suemone; **Indien**: Mereyala; **Italien**: Bossetti, Di Gennaro, Nicolosi, Orsini, Sello; **Spanien**: Noheda; **Großbritannien**: Boyd, Carless, Carnell, Crout, Dalton, Ley, Page, Ribbons, Roberts, Stephenson, Widdowson; **Uruguay**: Seoane; **USA**: Chapman, Eaton, Gibson, Grubbs, Gunsalus, Hudlicky, Johnson, Martin, Olivo, Selifonov, Wackett, Whited, Wiest, Ziffer; entnommen aus: T. Hudlicky, D. Gonzalez, D. T. Gibson, *Aldrichimica Acta* **1999**, *32*; b) die Verwendung von *trans*-CHD in der Naturstoff- und Wirkstoffsynthese untersuchten folgende Arbeitsgruppen: **Großbritannien**: Boyd; **China**: Shing; **Japan**: Ogawa; **USA**: Hudlicky, White, Schlessinger; **Jülich**: Müller.
- [7] a) T. Hudlicky, F. Rulin, T. Tsunoda, H. Luna, C. Andersen, J. D. Price, *Isr. J. Chem.* **1991**, *31*, 229-238; b) T. Hudlicky, J. D. Price, *Synlett* **1990**, 159-160; c) S. V. Ley, M. Parra, A. J. Redgrave, F. Sternfeld, *Tetrahedron* **1990**, *46*, 4995-5026; zit. Ref.
- [8] a) H. A. J. Carless, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1992**, 234-235; b) D. C. Billington, F. Perron-Sierra, I. Picard, S. Beaubras, J. Duhault, J. Espinal, S. Challal, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1994**, *4*, 2307-2312; c) Y. Kara, M. Balci, S. A. Bourne, W. H. Watson, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 3349-3352.
- [9] C. R. Johnson, P. A. Ple, L. Su, M. J. Heeg, J. P. Adams, *Synlett* **1992**, 388-390; zit. Ref.

- [10] a) T. Hudlicky, M. G. Nutchus, T. C. Nugent, *Synth. Commun.* **1992**, 22, 151-157; b) M. Mandel, T. Hudlicky, L. D. Kwart, G. M. Whited, *J. Org. Chem.* **1993**, 58, 2331-2333; c) M. Mandel, T. Hudlicky, *Perkin 1* **1993**, 741-743; d) T. Hudlicky, M. Cebulak, *Cyclitols and Their Derivatives: A Handbook of Physical, Spectral, and Synthetic Data*, VCH Publisher, Weinheim, **1993**; zit. Ref; e) T. Hudlicky, M. Mandel, J. Rouden, R. S. Lee, B. Bachmann, T. Dudding, K. J. Yost, J. S. Merola, *Perkin 1* **1994**, 1553-1567; f) M. Desjardins, L. E. Brammer, T. Hudlicky, *Carbohydr. Res.* **1997**, 304, 39-42; g) L. E. Brammer, T. Hudlicky, *Tetrahedron: Asymmetry* **1998**, 9, 2011-2014; h) T. Hudlicky, N. Restrepo-Sánchez, P. D. Kary, L. M. Jaramillo-Gómez, *Carbohydr. Res.* **2000**, 324, 200-203.
- [11] a) L. Pingli, M. Vandewalle, *Tetrahedron* **1994**, 50, 7061-7074; b) B. V. Nguyen, C. York, T. Hudlicky, *Tetrahedron* **1997**, 53, 8807-8814; c) K. A. Oppong, T. Hudlicky, F. Yan, C. York, B. V. Nguyen, *Tetrahedron* **1999**, 55, 2875-2880.
- [12] B. M. Trost, L. S. Chupak, T. Lübbers, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 1732-1740.
- [13] D. T. Gibson, J. R. Koch, R. E. Kallio, *Biochem.* **1968**, 7, 2653-2662.
- [14] I. G. Young, F. Gibson, *Biochim. Biophys. Acta* **1969**, 177, 182-183.
- [15] R. Müller, M. Breuer, A. Wagener, K. Schmidt, E. Leistner, *Microbiology* **1996**, 142, 1005-1012.
- [16] a) D. T. Gibson, J. R. Koch, R. E. Kallio, *Biochem.* **1968**, 7, 2653-2662; b) D. T. Gibson, J. R. Koch, C. L. Schuld, R. E. Kallio, *Biochem.* **1968**, 7, 3795-3802; c) D. T. Gibson, M. Hensley, H. Yoshioka, J. J. Mabry, *Biochem.* **1970**, 9, 1626-1630.
- [17] D. R. Boyd, G. N. Sheldarke, *Nat. Prod. Rep.* **1998**, 309-324.
- [18] K. Störmer, *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenk. Infek.* **1908**, 20, 282-286.
- [19] a) N. L. Söhngen, *Centr. Bakteriol., Parasitenk. Abt. II* **1913**, 37, 595-609; b) T. Wieland, G. Griss, B. Haccius, *Arch. Microbiol.* **1958**, 28, 383-393; c) B. Haccius, O. Helfrich, *Arch. Microbiol.* **1958**, 28, 394-403.
- [20] H. Ziffer, D. M. Jerina, D. T. Gibson, V. M. Kobal, *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, 95, 4048-4049.
- [21] Sigma-Aldrich-Angebot von chiralen nicht-racemischen *cis*-CHD; vergleiche: *Aldrichimica Acta* **1999**, 32, S. 63.
- [22] J. N. Smith, B. Spencer, R. T. Williams, *Biochem. J.* **1950**, 47, 284-293;
- [23] a) T. Sato, T. Fukuyama, T. Suzuki, H. Yoshikawa, *J. Biochem.* **1963**, 53, 23-27; b) D. M. Jerina, J. W. Daly, B. Witkop, P. Zaltzman-Nirenberg, S. Udenfriend, *Arch. Biochem. Biophys.* **1968**, 128, 176-183; c) D. M. Jerina, H. Ziffer, J. W. Daly, *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, 92, 1056-1061; d) D. M. Jerina, J. W. Daly, *Science* **1974**, 185, 573-582.
- [24] Zur Darstellung von *cis*-Cyclohexadien-1,2-diolen ohne Funktionalisierung durch Reduktion von Dihydroxytetrachlorcyclohexan-Derivaten vergleiche: M. Nakajima, I. Tomida, S. Takei, *Chem. Ber.* **1959**, 92, 163-172.

- [25] Zur mikrobiellen Aktivierung einer nicht-aktivierter *tert*-Butylgruppe vergleiche: a) D. Franke, G. Schmitz, D. Weuster-Botz, C. Wandrey, *Proc. Biotrans '99* (Giardini Naxos/Italien) **1999**; b) D. Franke, Diplomarbeit, Universität Bonn, **1998**; c) G. Schmitz, D. Franke, S. Stevens, R. Takors, D. Weuster-Botz, C. Wandrey, *J. Mol. Cat. B: Enzym.* **2000**, *10*, 313-324.
- [26] a) G. Maier, *Angew. Chem., Int. Ed.* **1967**, *6*, 402-458; b) E. Vogel, H. Günther, *Angew. Chem.* **1967**, *10*, 429-480; c) E. Vogel, *Pure Appl. Chem.* **1969**, *20*, 237-262; d) D. R. Boyd, M. E. Stubbs, *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 2554-2559; e) D. R. Boyd, N. D. Sharma, *Chem. Soc. Rev.* **1996**, 289-296.
- [27] Neuere Übersichten zur kinetischen Racematspaltung siehe: J. M. Keith, J. F. Larrow, E. N. Jacobsen, *Adv. Synth. Catal.* **2001**, *343*, 5-26; zit. Ref.
- [28] D. R. Boyd, N. D. Sharma, H. Dalton, D. A. Clarke, *Chem. Commun.* **1996**, 45-46.
- [29] a) R. M. DeMarinis, C. N. Filer, S. M. Waraszkiewicz, G. A. Berchtold, *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, *96*, 1193-1197; c) R. M. DeMarinis, G. A. Berchtold, *Chem. Commun.* **1971**, 810-811.
- [30] a) S. Ogawa, T. Takagaki, *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 2356-2359; b) S. Ogawa, T. Toyokuni, M. Ara, M. Suetsugu, T. Suami, *Chem. Lett.* **1980**, 379-382; c) S. Ogawa, T. Toyokuni, M. Ara, M. Suetsugu, T. Suami, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1983**, *56*, 1710-1714; d) S. Ogawa, I. Kasahara, T. Suami, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1979**, *52*, 118-123.
- [31] R. H. Schlessinger, A. Lopes, *J. Org. Chem.* **1981**, *46*, 5252-6254.
- [32] T. K. M. Shing, E. K. W. Tam, *Tetrahedron: Asymmetry* **1996**, *7*, 353-356.
- [33] B. M. Trost, L. S. Chupak, T. Lübbers, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 1732-1740.
- [34] B. A. Chiasson, G. A. Berchtold, *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, *96*, 2898-2901.
- [35] N. Ikota, B. Ganem, *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 351-353.
- [36] S. M. Roberts, P. W. Sutton, L. Wright, *Perkin 1* **1996**, 1157-1165.
- [37] a) C. A. Pittol, S. M. Roberts, P. W. Sutton, J. O. Williams, *Chem. Commun.* **1994**, 803-804; b) S. M. Roberts, P. W. Sutton, *Perkin 1* **1995**, 1499-1503.
- [38] a) G. H. Posner, A. Haces, W. Harrison, C. M. Kinter, *J. Org. Chem.* **1987**, *52*, 4836-4841; b) G. H. Posner, T. D. Nelson, *Tetrahedron* **1990**, *46*, 4573-4586; c) G. H. Posner in *Stereocontrolled Organic Synthesis* (Hrsg.: B. M. Trost), Blackwell Scientific Publications, London, **1994**, S. 177-191.
- [39] Übersichten siehe: a) D. L. Boger, M. Patel, *Prog. Heterocycl. Chem.* **1989**, *1*, 30-64; b) S. Pugnaud, D. Masure, J.-C. Hallé, P. Chaquin, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 8687-8692; c) Z.-K. Wan, J. K. Snyder, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 2487-2490; d) I. E. Markó, G. R. Evans, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 2767-2770; e) I. E. Markó, G. R. Evans, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 2771-2774.
- [40] Kinetischen Racematspaltung zu Cyclehexen-*trans*-1,2-diol mit Lipasen siehe: H. Suemune, M. Hizuka, T. Kamashita, K. Sakai, *Chem. Pharm. Bull.* **1989**, *37*, 1379-1381.

- [41] Verwendung der Mitsunobu-Reaktion zur Chiralitätsumkehr von Alkoholen vergleiche: O. Mitsunobu, *Synthesis* **1981**, 1-28.
- [42] B. P. McKibben, G. S. Barnosky, T. Hudlicky, *Synlett* **1995**, 806-808.
- [43] T. Hudlicky, G. Seoane, T. Pettus, *J. Org. Chem.* **1989**, 54, 4239-4243.
- [44] D. R. Boyd, N. D. Sharma, C. R. O'Dowd, F. Hempenstall, *Chem. Commun.* **2000**, 2151-2152.
- [45] I. G. Young, F. Gibson, C. G. MacDonald, *Biochim. Biophys. Acta* **1969**, 192, 62-72.
- [46] I. G. Young, L. Langman, R. K. J. Juke, F. Gibson, *J. Bacteriol.* **1971**, 106, 51-57.
- [47] a) A. J. Pittard in *Escherichia coli & Salmonella typhimurium* (Hrsg.: F. C. Neidhardt), ASM Press, Washington, **1987**, S. 317-394; b) K. M. Herrmann in *Amino Acids: Biosynthesis and Genetic Regulation*, Addison-Wesley Reading, **1983**, S. 301-376; c) K. M. Draths, J. W. Frost, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 1657-1659.
- [48] R. Patnaik, J. C. Liao, *Appl. Environ. Microbiol.* **1994**, 60, 3903-3908.
- [49] K. Li, J. W. Frost, *Biotechnol. Prog.* **1999**, 15, 876-883.
- [50] a) K. M. Draths, D. R. Knop, J. W. Frost, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 1603-1604; frühere Arbeiten siehe: b) K. M. Draths, T. L. Ward, J. W. Frost *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 9725-9726; c) J. W. Frost, K. M. Draths, WO 94/08015, **1994** [*Chem. Abstr.* **1994**, 121, 7466g].
- [51] K. Li, M. R. Mikola, K. M. Draths, R. M. Worden, J. W. Frost, *Biotechnol. Bioeng.* **1999**, 64, 61-73.
- [52] a) J. M. Gibson, P. S. Thomas, J. D. Thomas, J. L. Barker, S. S. Chandran, M. K. Harrup, K. M. Draths, J. W. Frost, *Angew. Chem.* **2001**, 113, 1999-2002; *Angew. Chem., Int. Ed.* **2001**, 40, 1945-1948; b) vergleiche auch Ref. [50b].
- [53] a) C. E. Rieger, J. L. Turnbull, *Prep. Biochem. Biotechnol.* **1996**, 26, 67-76; erste Beschreibung von mikrobiellen Chorismat-Produzenten siehe: b) M. I. Gibson, F. Gibson, *Biochem. J.* **1964**, 90, 248-256; c) F. Gibson, *Biochem. J.* **1964**, 90, 256-261.
- [54] C. Grisostomi, P. Kast, R. Pulido, J. Huynh, D. Hilvert, *Bioorg. Chem.* **1997**, 25, 297-305.
- [55] E. Haslam, *Shikimic Acid: Metabolism and Metabolites*, Wiley Verlag, New York, **1993**, S. 40-42.
- [56] E. Haslam, *Shikimic Acid: Metabolism and Metabolites*, Wiley Verlag, New York, **1993**, S. 56.
- [57] Für einige neuere Beispiele siehe: a) J. C. Rohloff, K. M. Kent, M. J. Postich, M. W. Becker, H. H. Chapman, D. E. Kelly, W. Lew, M. S. Louie, L. R. McGee, E. J. Prisbe, L. M. Schultze, R. H. Yu, L. Zhang, *J. Org. Chem.* **1998**, 63, 4545-4550; b) M. Federspiel, R. Fischer, M. Hennig, H.-J. Mair, T. Oberhauser, G. Rimmler, T. Albiez, J. Bruhin, H. Estermann, C. Gandert, V. Göckel, S. Götzö, U. Hoffmann, G. Huber, G. Janatsch, S. Lauper, O. Röckel-Stäbler, R. Trussardi, A. G. Zwahlen, *Org. Process Res. Dev.* **1999**, 3, 266-274; c) M. Karpf, R. Trussardi, *J. Org. Chem.* **2001**, 66, 2044-

- 2051; d) C. U. Kim, W. Lew, M. A. Williams, H. Liu, L. Zhang, S. Swaminathan, N. Bischofberger, M. S. Chen, D. B. Mendel, C. Y. Tai, W. G. Laver, R. C. Stevens, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 681-690.
- [58] A. Barco, S. Benetti, C. D. Risi, P. Marchetti, G. P. Pollini, V. Zanirato, *Tetrahedron: Asymmetry* **1997**, *8*, 3515-3545; zit. Ref.
- [59] J. D. White, S. G. Toske, T. Yakura, *Synlett* **1994**, 591-593.
- [60] a) D. S. Tan, M. A. Foley, M. D. Shair, S. L. Schreiber, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 8565-8566; b) D. S. Tan, M. A. Foley, B. R. Stockwell, M. D. Shair, S. L. Schreiber, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 9073-9087; c) B. R. Stockwell, D. S. Tan, M. A. Foley, M. D. Matthew, S. L. Schreiber, S. M. Scott, WO00/06525, **2000** [*Chem. Abstr.* **2000**, *132*, 151600r].
- [61] a) W. Lew, M. A. Williams, D. B. Mendel, P. A. Escarpe, C. U. Kim, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, *7*, 1843-1846; b) L. Zhang, M. A. Williams, D. B. Mendel, P. A. Escarpe, C. U. Kim, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, *7*, 1846-1850.
- [62] a) I. G. Young, F. Gibson, *Biochim. Biophys. Acta* **1969**, *177*, 348-450; b) I. G. Young, L. M. Jackman, F. Gibson, *Biochim. Biophys. Acta* **1969**, *177*, 381-388; c) I. G. Young, T. J. Batterham, F. Gibson, *Biochim. Biophys. Acta* **1969**, *177*, 388-400; d) I. G. Young, F. Gibson, *Biochim. Biophys. Acta* **1969**, *177*, 401-411; e) I. G. Young, F. Gibson, C. G. MacDonald, *Biochim. Biophys. Acta* **1969**, *192*, 62-72.
- [63] a) I. G. Young, L. Langman, R. K. J. Luke, F. Gibson, *J. Bacteriol.* **1971**, *106*, 51-57; b) A. J. Laird, D. W. Ribbons, G. C. Woodrow, I. G. Young, *Gene* **1980**, *11*, 347-357; c) A. J. Laird, I. G. Young, *Gene* **1980**, *11*, 359-366.
- [64] Nukleotid-Sequenz und transkriptionale Organisation von *entA*, *entB* und *entC* siehe: a) B. A. Ozenberger, T. J. Brickman, M. A. McIntosh, *J. Bacteriol.* **1989**, *171*, 775-783; b) M. S. Nahlik, T. J. Brickman, B. A. Ozenberger, M. A. McIntosh, *J. Bacteriol.* **1989**, *171*, 784-790; c) M. K. R. Tummuru, T. J. Brickman, M. A. McIntosh, *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 20547-20551; d) T. J. Brickman, B. A. Ozenberger, M. A. McIntosh, *J. Mol. Biol.* **1990**, *212*, 669-682
- [65] Charakterisierung der Gen-Produkte EntA, EntB und EntC siehe: a) J. Liu, K. Duncan, C. T. Walsh, *J. Bacteriol.* **1989**, *171*, 791-798; b) J. Liu, N. Quinn, G. A. Berchtold, C. T. Walsh, *Biochemistry* **1990**, *29*, 1417-1425; c) F. Rusnak, J. Liu, N. Quinn, G. A. Berchtold, C. T. Walsh, *Biochem.* **1990**, *29*, 1425-1435; d) M. Sakaitani, F. Rusnak, N. R. Quinn, C. Tu, T. B. Frigo, G. A. Berchtold, C. T. Walsh, *Biochem.* **1990**, *29*, 6789-6798; e) C. T. Walsh, J. Liu, F. Rusnak, M. Sakaitani, *Chem. Rev.* **1990**, *90*, 1105-1129.
- [66] a) A. Kaiser, E. Leistner, *Arch. Biochem. Biophys.* **1990**, *276*, 331-335; b) A. Kaiser, E. Leistner, *World J. Microbiol. Biotechnol.* **1992**, *8*, 92-95; c) C. Dahm, R. Müller, G. Schulte, K. Schmidt, E. Leistner, *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, *1425*, 377-386.
- [67] Charakterisierung der Isochorismat-Synthase MenF aus *E. coli* siehe: a) R. Daruwala, O. Kwon, R. Meganathan, M. E. S. Hudspeth, *FEMS Microbiol. Lett.* **1996**, *140*, 159-

- 163; b) O. Kwon, M. E. S. Hudspeth, R. Meganathan, *J. Bacteriol.* **1996**, *178*, 3252-3259; c) R. Daruwala, D. K. Bhattacharyya, O. Kwon, R. Meganathan, *J. Bacteriol.* **1997**, *179*, 3133-3138; d) zit. Ref.
- [68] K. Schmidt, E. Leistner, *Biotechnol. Bioeng.* **1995**, *45*, 285-291.
- [69] R. Müller, A. Wagener, K. Schmidt, E. Leistner, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1995**, *43*, 985-988.
- [70] a) K. A. Reynolds, K. M. Fox, Z. M. Yuan, Y. Lam, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 4339-4340; b) B. S. Moore, H. Cho, R. Casati, E. Kennedy, K. A. Reynolds, E. Kennedy, U. Mocek, J. M. Beale, H. G. Floss, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 1577-1578.
- [71] a) M. Sugita, T. Sasaki, K. Furihata, H. Seto, N. Otake, *J. Antibiot.* **1982**, *35*, 1467-1473; b) M. Damberg, P. Russ, A. Zeek, *Tetrahedron Lett.* **1982**, *23*, 59-62.
- [72] a) T. A. Cropp, D. J. Wilson, K. A. Reynolds, *Nature Biotechnol.* **2000**, *18*, 980-983; b) S. Chen, D. von Bamberg, V. Hale, M. Breuer, B. Hardt, R. Müller, H. G. Floss, K. A. Reynolds, E. Leistner, *Eur. J. Biochem.* **1999**, *261*, 98-107.
- [73] Übersichten siehe: a) S. M. Brown, T. Hudlicky in *Organic Synthesis: Theory and Applications, Vol. 2* (Hrsg. T. Hudlicky), JAI, New York, **1993**, S. 113-176; b) T. Hudlicky, J. W. Reed in *Advances in Asymmetric Synthesis, Vol. 1* (Hrsg.: A. Hassner), JAI Press, New York, **1995**, S. 271-312; c) T. Hudlicky, D. Gonzalez, D. T. Gibson, *Aldrichimica Acta* **1999**, *32*, 35-62; zit. Ref.
- [74] a) T. Hudlicky, J. Rouden, H. Luna, *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 985-987; b) T. Hudlicky, J. Rouden, H. Luna, S. Allen, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 5099-5107.
- [75] J. Rouden, T. Hudlicky, *Perkin I* **1993**, 1095-1097.
- [76] a) T. Hudlicky, H. F. Olivio, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 9694-9696; b) T. Hudlicky, H. F. Olivio, B. McKibben, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 5108-5115; c) X. Tian, T. Hudlicky, K. Königsberger, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 3643-3644; d) T. Hudlicky, X. Tian, K. Königsberger, J. Rouden, *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 4037-4039; e) T. Hudlicky, G. Seoane, J. D. Price, K. G. Gadamasetti, *Synlett* **1990**, 433-440; f) X. Tian, R. Maurya, K. Königsberger, T. Hudlicky, *Synlett* **1995**, 1125-1126.
- [77] T. Hudlicky, J. D. Price, F. Rulin, T. Tsunoda, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 9439-9440.
- [78] T. Hudlicky, D. Gonzalez, T. Martinot, *Tetrahedron Lett.* **1999**, 3077-3080.
- [79] T. Hudlicky, J. Rouden, H. Luna, S. Allen, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 5099-5107.
- [80] T. Hudlicky, H. Luna, J. D. Price, F. Rulin, *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 4683-4687.
- [81] Abbildung modifiziert entnommen aus: H. Waldmann, *Organic synthesis highlights, 2. Auflage*, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, **1995**, S. 16.
- [82] B. Trivedi, O. Motl, V. Herout, F. Šorm, *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1964**, *29*, 1675-1688.

- [83] a) M. Banwell, M. McLeod, *Chem. Commun.* **1998**, 1851-1852; b) M. G. Banwell, P. Damos, D. C. R. Hockless, M. D. McLeod, *Synlett* **1998**, 897-902.
- [84] M. Banwell, S. Blakey, G. Harfoot, R. Longmore, *Perkin I* **1998**, 3141-3142.
- [85] a) D. G. H. Ballard, A. Courtis, I. M. Shirley, S. C. Taylor, *Chem. Commun.* **1983**, 954-955; b) D. G. H. Ballard, A. Courtis, I. M. Shirley, S. C. Taylor, *Macromolecules* **1988**, *21*, 294-304.
- [86] a) I. W. Davies, C. H. Senanayake, L. Castonguay, R. D. Larsen, T. R. Verhoeven, P. J. Reider, *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 7619-7622; b) I. W. Davies, P. J. Reider, *Chem. Ind. (London)* **1996**, 412-415.
- [87] a) B. D. Ensley, B. J. Ratzkin, T. D. Osslund, M. J. Simon, L. P. Wackett, D. T. Gibson, *Science* **1983**, *222*, 167-169; b) G. Whited, *Proc. Biotrans '95* (Warwick), **1995**.
- [88] C. T. Evans, D. W. Ribbons, S. D. Thomas, S. M. Roberts (Enzymatix-Ltd.), WO 9012798, **1990** [*Chem. Abstr.* **1991**, *115*, 90684w].
- [89] T. Hudlicky, G. Seoane, T. Pettus, *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 4239-4243.
- [90] Isolierung von Crotepoxid aus *Croton macrostachys* siehe: a) S. M. Kupchan, R. J. Hemingway, P. Coggon, A. T. McPhail, G. A. Sim, *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, *90*, 2982; b) S. M. Kupchan, R. J. Hemingway, R. M. Smith, *J. Org. Chem.* **1969**, *34*, 3898-3902; c) S. Takahashi, *Phytochemistry* **1969**, *8*, 321-322; Röntgenstrukturanalyse von Crotepoxid siehe: d) P. Coggon, A. T. McPhail, G. A. Sim, *J. Chem. Soc., B* **1969**, 534-539.
- [91] Isolierung von Senepoxid siehe: a) R. Hollands, D. Becher, A. Gaudemer, J. Polonsky, N. Ricroch, *Tetrahedron* **1968**, *24*, 1633-1650; Röntgenstrukturanalyse von Senepoxid siehe: b) A. Ducruix, C. Pascard, J. Polonsky, *Acta Crystallogr., Sect. B* **1976**, *32*, 1589-1591.
- [92] M. Kodpinid, C. Sadavongvivad, C. Thebtaranonth, Y. Thebtaranonth, *Tetrahedron Lett.* **1983**, *24*, 2019-2022.
- [93] Isolation und Veröffentlichung einer ersten, falschen Struktur von Pipoxid siehe: a) J. Singh, K. D. Dhar, C. K. Atal, *Tetrahedron* **1970**, *26*, 4403-4406; Folgeveröffentlichung der korrekten Struktur und Synthese siehe: b) G. W. Holbert B. Ganem, L. Borsub, K. Chantrapromma, D. Van Engen, J. Clardy, C. Sadavongvivad, Y. Thebtaranonth, *Tetrahedron Lett.* **1979**, *8*, 715-718; c) B. S. Joshi, D. H. Gawd, H. Fuhrer, *Tetrahedron Lett.* **1979**, *8*, 2427-2430.
- [94] S. Atsumi, K. Umezawa, H. Iinuma, H. Naganawa, H. Nakamura, Y. Iitaka, T. Takeuchi, *J. Antibiot.* **1990**, *43*, 49-53.
- [95] P. Tuntiwachwuttikul, O. Pancharoen, W. A. Bubbs, T. W. Hambley, W. C. Taylor, V. Reutrakul, *Aust. J. Chem.* **1987**, *40*, 2049-2061.
- [96] a) T. K. M. Shing, E. K. W. Tam, *Tetrahedron: Asymmetry* **1996**, *7*, 353-356; b) T. K. M. Shing, E. K. W. Tam, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 1547-1554.

- [97] a) V. Lorbach, Diplomarbeit, Universität Bonn, **2000**; b) V. Lorbach, D. Franke, C. Dose, M. Müller, *Proc. 12th European Symposium on Organic Chemistry – ESOC 12* (Groningen), **2001**; c) V. Lorbach, D. Franke, M. Nieger, M. Müller, *Chem. Commun.*, eingereicht.
- [98] M. R. Demuth, P. E. Garrett, J. D. White, *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, *98*, 634-635.
- [99] G. W. Holbert, B. Ganem, L. Borsub, K. Chantrapromma, D. Van Engen, J. Clardy, C. Sadavongvivad, Y. Thebtaranonth, *Tetrahedron Lett.* **1979**, *8*, 715-718.
- [100] R. H. Schlessinger, A. Lopes, *J. Org. Chem.* **1981**, *46*, 5253-6254.
- [101] S. Ogawa, T. Takagaki, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1986**, *59*, 655-656.
- [102] a) H. Seçen, Y. Sütbeyaz, M. Balci, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 1323-1326; b) M. Balci, *Pure Appl. Chem.* **1997**, *69*, 97-104.
- [103] V. Plouvier, *C. R. Hebd. Séance Acad. Sci. Paris* **1962**, 360.
- [104] a) A. Ishida, T. Mukaiyama, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1977**, *50*, 1161-1168; b) Charakterisierung des Silylethers **TMM7** siehe: M. C. Kozlowski, P. A. Bartlett, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 5897-5898.
- [105] V. Lorbach, Diplomarbeit, Universität Bonn, **2000**.
- [106] a) B. M. Trost, L. S. Chupak, T. Lübbers, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 736; b) L. N. Mander, S. P. Sethi, *Tetrahedron Lett.* **1984**, *25*, 5953-5956.
- [107] a) M. C. Kozlowski, N. J. Tom, C. T. Seto, A. M. Seffler, P. A. Bartlett, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 2128-2140; b) M. C. Kozlowski, P. A. Bartlett, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 5897-5898.
- [108] D. R. Kelly, S. M. Roberts, R. F. Newton, *Synth. Commun.* **1979**, *9*, 295-299.
- [109] E. J. Corey, A. Venkateswarlu, *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 6190-6191.
- [110] J. T. Kohrt, J.-X. Gu, C. R. Johnson, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 5088-5093.
- [111] a) J. Farras, C. Serra, J. Vilarrasa, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 327-330; b) G. Bartoli, M. Bosco, E. Marcantoni, L. Sambri, E. Torregiani, *Synlett* **1998**, 209-211; c) P. A. Grieco, C. J. Markworth, *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 665-666.
- [112] a) R. F. Newton, D. P. Reynolds, M. A. W. Finch, D. R. Kelly, S. M. Roberts, *Tetrahedron Lett.* **1979**, *41*, 3981-3982; b) Das aktive Reagenz ist vermutlich nicht HF, sondern mit der Glaswand des Reaktionskolbens in katalytischen Mengen gebildete H₂SiF₆, wie von P. DeShong diskutiert; vergleiche: A. S. Pilcher, P. DeShong, *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 5130-5134; c) Komparative Untersuchungen zur TBS-Abspaltung mit TBAF und HF siehe neuere Arbeiten von C. R. Johnson, Ref. [110].
- [113] M. Müller, R. Müller, T.-W. Yu, H. G. Floss, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 9753-9755.
- [114] A. F. Beecham, A. McL. Mathieson, S. R. Johns, J. A. Lamberton, A. A. Sioumis, T. J. Batterham, I. G. Young, *Tetrahedron* **1971**, *27*, 3725-3738.

- [115] Eine detaillierte Beschreibung der Reaktionsbedingungen und eine Charakterisierung der Zwischenverbindungen der Ikota/Ganem-Route, Ref. [35], ist nicht literaturbekannt.
- [116] H. Plieninger, G. Ege, *Chem. Ber.* **1961**, 94, 2088-2105.
- [117] K. Ziegler, A. Späth, E. Schaaf, W. Schumann, E. Winkelmann, *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1942**, 551, 80-119.
- [118] T. Mukhopadhyay, D. Seebach, *Helv. Chim. Acta* **1982**, 65, 385-391.
- [119] A. F. Beecham, A. McL. Mathieson, S. R. Johns, J. A. Lamberton, A. A. Sioumis, T. J. Batterham, I. G. Young, *Tetrahedron* **1971**, 27, 3725-3738.
- [120] a) K. Fukushi, S. Takeda, S.-I. Wakida, M. Yamane, K. Higashi, K. Hiio, *J. Chromatogr., A* **1997**, 772, 313-320; b) N. J. Benz, J. S. Fritz, *J. High Resolut. Chromatogr.* **1995**, 18, 175-178.
- [121] B. Mopper, C. J. Sciacitano, *J. AOAC Int.* **1994**, 77, 881-884.
- [122] H. Chen, Y. Xu, M. P. C. Ip, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **1997**, 20, 2475-2493.
- [123] a) D. Volgger, A. J. Zemann, G. K. Bonn, *J. High Resolut. Chromatogr.* **1998**, 21, 3-10; b) D. Volgger, A. J. Zemann, G. K. Bonn, M. J. Antal, *J. Chromatogr., A* **1997**, 758, 263-276; c) A. J. Zemann, *J. Chromatogr., A* **1997**, 787, 243-251; d) A. M. Masselter, A. J. Zemann, *Anal. Chem.* **1995**, 67, 1047-1053; e) S. M. Masseleter, A. J. Zemann, *J. Chromatogr., A* **1995**, 693, 359-365.
- [124] M. F. M. Tavares, R. Colombara, S. Massaro, *J. Chromatogr., A* **1997**, 772, 171-178.
- [125] M. Hesse, H. Meier, B. Zeeh, *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, **1995**, S. 10-14.
- [126] Der Korrelationskoeffizient r ergibt sich hier aus den Flächenintegralen der DAD-Signale a_i bei bekannten *trans*-CHD-Konzentrationen c_i und einer n -elementigen Versuchsreihe aus der Gleichung:
- $$r = \frac{\sum_i c_i a_i - \frac{1}{n} \sum_i c_i \sum_i a_i}{\sqrt{\left[\sum_i c_i^2 - \frac{1}{n} \left(\sum_i a_i \right)^2 \right] \left[\sum_i c_i^2 - \frac{1}{n} \left(\sum_i a_i \right)^2 \right]}};$$
- vergleiche: E. Kreyszig, *Statistische Methoden und ihre Anwendungen*, 4. Auflage, Vandenhoeck und Ruprecht, Göttingen, **1974**, S. 300-323.
- [127] J. P. Fürste, W. Pansegrau, R. Frank, H. Blöcker, P. Scholz, M. Bagdasarian, E. Lanka, *Gene* **1986**, 48, 119-131.
- [128] a) H. A. De Boer, L. J. Comstock, M. Vasser, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1983**, 80, 21-25; b) J. Brosius, A. Holy, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1984**, 81, 6929-6933.
- [129] a) B. J. Bachmann, *Bacteriol. Rev.* **1972**, 36, 525-557; b) C. W. Hill, B. W. Harnish, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1981**, 78, 7069-7072; c) K. F. Jensen, *J. Bacteriol.* **1993**, 175, 3401-3407.
- [130] T. P. Fleming, M. S. Nahlik, M. A. McIntosh, *J. Bacteriol.* **1983**, 156, 1171-1177.

- [131] F. R. Blattner, G. Plunkett, C. A. Bloch, N. T. Perna, V. Burland, M. Riley, J. Collado-Vides, J. D. Glasner, C. K. Rode, G. F. Mayhew, J. Gregor, N. W. Davis, H. A. Kirkpatrick, M. A. Goeden, D. J. Rose, B. Mau, S. Shao, *Science* **1997**, 277, 1453-1474.
- [132] a) M. S. Nahlik, T. J. Brickman, B. A. Ozenberger, M. A. McIntosh, *J. Bacteriol.* **1989**, 171, 784-790; b) B. A. Ozenberger, T. J. Brickman, M. A. McIntosh, *J. Bacteriol.* **1989**, 171, 775-783.
- [133] a) W. M. Barnes, *Gene* **1992**, 112, 29-35; b) N. F. Cariello, J. A. Swenberg, T. R. Skopek, *Nucleic Acids Res.* **1991**, 19, 4193-4198.
- [134] Die Sicherheit (Wahrscheinlichkeit) P einer korrekten Gen-Amplifikationen lässt sich aus den Fehlerquoten f der Polymerasen und der Basenzahl n des Gens nach Formeln der Statistik berechnen. Es gilt: $P = (1 - f)^n$; vergleiche: K. Rottmann, *Mathematische Formelsammlung*, 4. Aufl., BI-Wissenschaftsverlag, Mannheim, Wien, Zürich, **1991**, S. 25-27.
- [135] S. Dabrowski, J. Kur, *Protein Expr. Purif.* **1998**, 14, 131-138.
- [136] J. Cline, J. C. Braman, H. H. Hogrefe *Nucleic Acids Res.* **1996**, 24, 3546-3551.
- [137] D. Hanahan, *J. Mol. Biol.* **1983**, 166, 557-580.
- [138] a) M. J. Casadaban, *J. Mol. Biol.* **1976**, 104, 541-555; b) M. J. Casadaban, S. N. Cohen, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **1979**, 76, 4530-4533.
- [139] G. B. Cox, F. Gibson, R. K. J. Luke, N. A. Newton, I. G. O'Brien, H. Rosenberg, *J. Bacteriol.* **1970**, 104, 219-226.
- [140] Stamm-Charakterisierung siehe: a) R. Wayne, K. Frick, J. B. Neilands, *J. Bacteriol.* **1976**, 126, 7-12; b) T. P. Fleming, M. S. Nahlik, M. A. McIntosh, *J. Bacteriol.* **1983**, 156, 1171-1177; c) C. L. Pickett, L. Hayes, C. F. Earhart, *FEMS Microbiol. Lett.* **1984**, 24, 77-80; d) M. S. Nahlik, T. P. Fleming, M. A. McIntosh, *J. Bacteriol.* **1987**, 169, 4163-4170; e) vergleiche auch Ref. [132b].
- [141] a) R. Müller, C. Dahm, G. Schulte, E. Leistner, *FEBS Lett.* **1996**, 378, 131-134; b) C. Dahm, R. Müller, G. Schulte, K. Schmidt, E. Leistner, *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, 1425, 377-386.
- [142] a) B. P. Nichols, A. M. Seibold, S. Z. Doktor, *J. Biol. Chem.* **1989**, 264, 8597-8601; b) V. K. Viswanathan, J. M. Green, B. P. Nichols, *J. Bacteriol.* **1995**, 177, 5918-5923.
- [143] Die Abweichungen der gemessenen von den berechneten Proteinmassen können nach Herstellerangaben bis zu 10 % betragen; vergleiche *Instruction Booklet, NuPAGE™ Electrophoresis System, Bis-Tris Gels*, NOVEX, San Diego, USA, Februar **1999**.
- [144] F. Gibson, *Biochem. J.* **1964**, 90, 256-261.
- [145] I. G. Young, F. Gibson, C. G. MacDonald, *Biochim. Biophys. Acta* **1969**, 192, 62-72.
- [146] a) C. Walsh, J. Liu, F. Rusnak, M. Sakaitani, *Chem. Rev.* **1990**, 90, 1105-1129; b) F. Dosselaere, J. Vanderleyden, *Crit. Rev. Microbiol.* **2001**, 27, 75-131.
- [147] J. G. Pan, J. S. Rhee, J. M. Lebeault, *Biotechnology Lett.* **1987**, 9, 89-94.

- [148] H. G. Schlegel, *Allgemeine Mikrobiologie*, 7. Auflage, Thieme Verlag, Stuttgart, New York, **1992**, S. 535.
- [149] a) R. Chen, V. Hatzimanikatis, W. M. Yap, P. W. Postma, J. E. Bailey, *Biotechnol. Prog.* **1997**, *13*, 768-775; b) R. Chen, W. M. Yap, P. W. Postma, J. E. Bailey, *Biotechnol. Bioeng.* **1997**, *56*, 583-590; c) P. W. Postma, J. W. Lengeler, G. R. Jacobson in *Escherichia coli and Salmonella typhimurium. Cellular and molecular biology. Vol. 1* (Hrsg. F. C. Neidhardt), ASM Press, Washington, **1996**, S. 1149-1174.
- [150] a) K. A. Dell, J. W. Frost, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 11581-11589; b) R. Patnaik, R. Spitzer, J. C. Liao, *Biotechnol. Bioeng.* **1995**, *46*, 361-370.
- [151] J. E. Stanek, Master Thesis, Virginia Polytechnic Institute and State University, **1997**, S. 29.
- [152] F. C. Neidhardt, H. Umbarber in *Escherichia coli and Salmonella typhimurium. Cellular and molecular biology. Vol. 1* (Hrsg. F. C. Neidhardt), ASM Press, Washington, **1996**, S. 13-16.
- [153] D. Franke, G. A. Sprenger, M. Müller, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 578-581; *Angew. Chem., Int. Ed.* **2001**, *40*, 555-557.
- [154] Das bei pH > 6.8 ausfallende Salz ist mikroskopisch anhand charakteristischen Kristallformen (rhombischer Habitus, häufig prismatisch zu "Sargdeckeln" verzerrt) nachweisbar; vergl. G. Jander, E. Blasius, *Lehrbuch der analytischen und präparativen anorganischen Chemie*, 13. Aufl., Hirzel, Stuttgart, **1989**, S. 250-251.
- [155] Zur Hückel-Theorie siehe: a) H. E. Zimmerman in *Pericyclic Reactions, Vol. 2* (Hrsg.: A. P. Marchand, R. E. Lehr), Academic Press, New York, **1977**, S. 53-107; b) J. March, *Advanced organic chemistry: reactions, mechanisms, and structure, 4th Edition*, John Wiley, New York, **1992**, S. 847-855; c) zit. Ref.
- [156] a) logP-Werte vom National Center for Manufacturing Sciences, zu finden unter <http://solvdb.ncms.org/solvdb.htm>, Juli **2001**; b) falls dort nicht angegeben, erfolgte die Berechnung aus der Strukturformel mit dem Programm CS ChemDraw Ultra®, Vers. 5.0, CambridgeSoftCorporation, Cambridge, USA, **1999**.
- [157] C. Dose, Diplomarbeit, Fachhochschule Jülich, **2001**.
- [158] J. M. Edwards, L. M. Jackman, *Aust. J. Chem.* **1965**, *18*, 1227-1239.
- [159] Beschreibung und Klassifikation von Methoden der Reaktivextraktion siehe: K. Schügerl, R. Hänsel, E. Schlichting, W. Halwachs, *Int. Chem. Eng.* **1988**, *28*, 393-404.
- [160] L. Boyadzhiev, I. Atanassova, *Biotechnol. Bioeng.* **1991**, *38*, 1059-1064.
- [161] a) L. Boyadzhiev, I. Atanassova, *Process Biochem.* **1994**, *29*, 237-243; b) M. Teramoto, T. Yamashiro, A. Inoue, A. Yamamoto, H. Matsuyama, Y. Miyake, *J. Membr. Sci.* **1991**, *58*, 11-32; c) H. Itoh, M. Hatton, D. Wang, *Biotechnol. Bioeng.* **1990**, *35*, 853-860.
- [162] a) M. M. Bora, N. N. Dutta, K. G. Bhattacharya, *Chem. Eng. Commun.* **2000**, *179*, 15-34; b) M. M. Bora, N. N. Dutta, K. G. Bhattacharya, *J. Chem. Eng. Data* **2000**, *45*,

- 399-403 c) M. M. Bora, K. G. Bhattacharya, N. N. Dutta, *J. Chem. Eng. Data* **1998**, *43*, 318-324; c) M. M. Bora, A. C. Ghosh, N. N. Dutta, *Can. J. Chem. Eng.* **1997**, *75*, 251-257; d) T. Hano, M. Matsumoto, T. Ohtake, F. Hori, *J. Chem. Eng. Jpn.* **1992**, *25*, 293-297.
- [163] a) P. Dzygiel, P. Wieczorek, L. Mathiasson, J. Å. Jönsson, *Anal. Lett.* **1998**, *31*, 1261-1274; b) J. A. Adarkar, S. B. Sawant, J. B. Joshi, V. G. Pangarkar, *Biotechnol. Prog.* **1997**, *13*, 493-496; c) R. Molinari, L. DeBartolo, E. Drioli, *J. Membr. Sci.* **1992**, *73*, 203-215; d) T. Hano, T. Ohtake, M. Matsumoto, D. Kitayama, F. Hori, F. Nakashio, *J. Chem. Eng. Jpn.* **1991**, *24*, 20-24; e) R. Haensel, W. Halwach, K. Schuegerl, *Chem. Eng. Sci.* **1986**, *41*, 1811-1821.
- [164] I. G. Young, L. M. Jackman, F. Gibson, *Biochim. Biophys. Acta* **1969**, *177*, 381-388.
- [165] D. A. McGowan, G. A. Berchtold, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 1153-1154.
- [166] F. Rusnak, J. Liu, N. Quinn, G. A. Berchtold, C. T. Walsh, *Biochemistry* **1990**, *29*, 1425-1435.
- [167] a) B. P. Nichols, A. M. Seibold, S. Z. Doktor, *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 8597-8601; b) V. K. Viswanathan, J. M. Green, B. P. Nichols, *J. Bacteriol.* **1995**, *177*, 5918-5923.
- [168] B. Unterhalt, D. Thamer, *Arch. Pharm. (Weinheim, Ger.)* **1975**, *308*, 954-960.
- [169] J. L. Marshall, K. C. Erickson, T. K. Folsom, *Tetrahedron Lett.* **1970**, *11*, 4011-4012.
- [170] a) B. Neises, W. Steglich, *Angew. Chem.* **1978**, *90*, 556-557; b) A. Hassner, V. Alexanian, *Tetrahedron Lett.* **1978**, *46*, 4475-4478.
- [171] Übersicht siehe: R. C. Morton, D. Mangroo, G. E. Gerber, *Can. J. Chem.* **1988**, *66*, 1701-1705; zit. Ref.
- [172] a) R. Nakao, K. Oka, T. Fukumoto, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1981**, *54*, 1267-1268; b) M. A. Brook, T. H. Chan, *Synthesis* **1983**, 201-203.
- [173] a) Y. Hirai, T. Aida, S. Inoue, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 3062-3063; b) S. C. Fields, W. H. Dent III, F. R. Green III, E. G. Tromiczak, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 1967-1970.
- [174] a) E. J. Corey, A. Venkateswarlu, *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 6190-6191; neuere TBS-Schutzgruppentechnik in der Naturstoffsynthese vergleiche: b) F. A. Luzzio, E. M. Thomas, W. D. Figg, *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 7151-7155; c) C. Jäkel, K. H. Dötz, *J. Organomet. Chem.* **2001**, *624*, 172-185.
- [175] a) R. A. Johnson, K. B. Sharpless in *Catalytic Asymmetric Synthesis* (Hrsg. I. Ojima), VCH-Verlag, New York, **1993**, Kapitel 4.1; zur Verwendung von *m*-CPBA in der Prilezhaev-Reaktion siehe: b) M. Hudlický, *Oxidations in Organic Chemistry*, ACS Press, Washington, **1990**, S. 67-73; c) A. H. Haines, *Methods for the Oxidation of Organic Compounds*, Academic Press, New York, **1981**, S. 162-171; d) V. G. Dryuk, *Russ. Chem. Rev.* **1985**, *54*, 986-1005.

- [176] Mechanistische Studien zur *cis*-Epoxidierung von Allylalkoholen siehe: M. Feccero, R. Gandolfi, M. Sarzi-Amadè, A. Rastelli, *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 8948-8959; zit. Ref.
- [177] W. Adam, T. Wirth, *Acc. Chem. Res.* **1999**, *32*, 703-710.
- [178] J. T. Kohrt, J.-X. Gu, C. R. Johnson, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 5088-5093.
- [179] a) Die Interplanarwinkel Φ lassen sich durch die Karplus-Conroy-Beziehung aus den vicinalen Kopplungskonstanten $^3J_{\text{H,H}}$ berechnen. Es gilt: $^3J_{\text{H,H}} = a \cos^2 \Phi - 0.28$ ($a = 8.5$ für $\Phi < 90^\circ$; $a = 9.5$ für $\Phi > 90^\circ$); b) vergleiche E. Breitmaier, *Vom NMR-Spektrum zur Strukturformel organischer Verbindungen*, 2. Aufl., Teubner-Verlag, Stuttgart, **1992**, S. 40.
- [180] 3D-Strukturen des *cis*-Epoxids **133** und des *trans*-Epoxids **134** wurden unter Verwendung des Computerprogramms *MM2 force field*, enthalten in CS Chem3D Pro™ der Firma CambridgeSoft Corporation, Cambridge, USA, **1996**, ermittelt. Es wurde jeweils die sterischen Abstoßungsenergien und Hybridisierungsenergien aller Atome iterativ minimiert.
- [181] M. J. McManus, G. A. Berchtold, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 2977-2978.
- [182] a) B. Zipperer, D. Hunkler, H. Fritz, G. Rihs, H. Prinzbach, *Angew. Chem.* **1984**, *96*, 296-297; b) M. G. Banwell, N. Haddad, T. Hudlicky, T. C. Nugent, M. F. Mackay, S. L. Richards, *Perkin 1* **1997**, 1779-1791.
- [183] a) M. Caron, K. B. Sharpless, *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 1560-1563; b) D. Sinou, M. Emziane, *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 4423-4426; c) C. Blandy, R. Choukroun, D. Gervais, *Tetrahedron Lett.* **1983**, *24*, 4189-4192.
- [184] a) S. Saito, S. Yamashita, T. Nishikawa, Y. Yokoyama, M. Inaba, T. Moriwake, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 4153-4156; b) S. Saito, T. Nishikawa, Y. Yokoyama, T. Moriwake, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 221-224.
- [185] C. Bonini, G. Righi, *Synthesis* **1994**, 225-238; zit. Ref.
- [186] J. A. Ciaccio, K. J. Address, T. W. Bell, *Tetrahedron Letters* **1986**, *27*, 3697-3700.
- [187] J. A. Ciaccio, E. Heller, A. Talbot, *Synlett* **1991**, 248-250.
- [188] a) G. B. Payne, *J. Org. Chem.* **1962**, *27*, 3819-3822; b) C. H. Behrens, S. Y. Ko, K. B. Sharpless, F. J. Walker, *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 5687-5696.
- [189] M. Chini, P. Crotti, L. Favero, F. Macchia, M. Pineschi, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 433-436.
- [190] Die axiale Positionierung des Substituenten ist aus sterischen Gründen ungünstiger, da in dieser Positionierung 1,3-diaxiale Wechselwirkungen mit dem H⁵-Atom (Ia) und dem pseudoaxialen Alkohol an Position 6 (IIb) auftreten; vergleiche J. March, *Advanced organic chemistry: reactions, mechanisms, and structure*, 4th Edition, John Wiley, New York, **1992**, S. 144-145.
- [191] A. F. Hollemann, E. Wiberg, *Lehrbuch der anorganischen Chemie*, 91.-100. Aufl., de Gruyter, Berlin, New York, **1985**, S. 409, 569.

-
- [192] C. H. Behrens, K. B. Sharpless, *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 5696-5704.
- [193] a) M. Chini, P. Crotti, F. Maccia, *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 5939-5942; b) M. Beaton, D. Gani, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 8549-8552.
- [194] T. Ikeno, T. Kimura, Y. Ohtsuka, T. Yamada, *Synlett* **1999**, *1*, 96-98.
- [195] a) M. Vaultier, N. Knouzi, R. Carrié, *Tetrahedron Lett.* **1983**, *24*, 763-764; b) B. Ganem, S. Nagarajan, *J. Org. Chem.* **1987**, *52*, 5044-5046.
- [196] a) N. M. Yoon, Y. S. Gyoung *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 2443-2450; b) C. K. Lai, M. Gut, *J. Org. Chem.* **1987**, *52*, 685-688; c) Z. Zhou, S. M. Bennett, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 1153-1156; d) S. C. Sinha, E. Keinan, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 377-386.
- [197] T. K. M. Shing, T. Y. Li, S. H.-L. Kok, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 1941-1946.
- [198] D. Franke, V. Lorbach, C. Dose, M. Halfar, J. Thömmes, R. Takors, G. A. Sprenger, M. Nieger, M. Müller, *Chem. Eur. J.*, in Vorbereitung.
- [199] Übersichten über katalytische Hydrogenierungen: a) P. N. Rylander, *Hydrogenation Methods*, Academic Press, New York, **1985**; b) P. N. Rylander, *Catalytic Hydrogenation in Organic Synthesis*, Academic Press, New York, **1979**.
- [200] J. D. McChesney, P. M. Kabra, P. Fraher, *J. Pharm. Sci.* **1979**, *68*, 1116-1120.
- [201] M. Krämer, Dissertation, Universität Düsseldorf, **2000**.
- [202] a) C. Schmidt-Dannert, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2000**, *11*, 255-261; b) C. Schmidt-Dannert, F. H. Arnold, *Nature Biotechnol.* **2000**, *18*, 750-753.
- [203] Totalsynthese von Acarbose siehe: a) S. Ogawa, Y. Shibata, *Chem. Commun.* **1988**, 605-606; b) Y. Shibata, S. Ogawa, *Carbohydr. Res.* **1989**, *189*, 309-322; pharmakologische Wirkung von Acarbose siehe: c) D. D. Schmidt, W. Frommer, B. Junge, L. Müller, W. Wingender, E. Truscheit, D. Schäfer, *Naturwissenschaften* **1977**, *64*, 535-536; d) W. Puls, U. Keup, H. P. Krause, G. Thomas, F. Hoffmeister, *Naturwissenschaften* **1977**, *64*, 536-537; e) E. Truscheit, W. Frommer, B. Junge, L. Müller, D. D. Schmidt, W. Wingender, *Angew. Chem.* **1981**, *93*, 738-755; Biosynthese von Acarbose in *Actinoplanes*-Stämmen siehe: f) T. Mahmud, I. Tornus, E. Egelkrout, E. Wolf, C. Uy, H. G. Floss, S. Lee, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *30*, 6973-6983.
- [204] a) S. Namiki, K. Kangouri, T. Nagate, H. Hara, K. Sugita, S. Omura, *J. Antibiot.* **1982**, *35*, 1234-1239; b) S. Namiki, K. Kangouri, T. Nagate, H. Hara, K. Sugita, K. Noda, Y. Tarumoto, S. Omura, *J. Antibiot.* **1982**, *35*, 1167-1173.
- [205] a) K. Yokose, K. Ogawa, T. Sano, K. Watanabe, H. B. Maruyama, Y. Suhara, *J. Antibiot.* **1983**, *36*, 1157-1165; b) K. Yokose, K. Ogawa, Y. Suzuki, I. Umeda, Y. Suhara, *J. Antibiot.* **1983**, *36*, 1166-1175; c) K. Yokose, M. Ogawa, K. Ogawa, *J. Antibiot.* **1984**, *37*, 182-186.
- [206] L. Vertesy, H.-W. Fehlhaber, A. Schulz, *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 1936-1937.
- [207] S. Murao, K. Ohyama, S. Ogura, *Agric. Biol. Chem.* **1977**, *41*, 919-924.
- [208] T. Iwasa, E. Higashide, H. Yamamoto, M. Shibata, *J. Antibiot.* **1971**, *24*, 107-112.

- [209] H. Dong, T. Mahmud, I. Tornus, S. Lee, H. G. Floss, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 2733-2742; zit. Ref.
- [210] Übersichten zur reduktiven Aminierung siehe: a) P. N. Rylander, *Hydrogenation Methods*, Academic Press, New York, **1985**, S. 82; b) M. V. Klyuev, M. L. Khidekel, *Uspekhi Khimii* **1980**, *49*, 28-53; *Russ. Chem. Rev.* **1980**, *49*, 14-27; c) P. N. Rylander, *Catalytic Hydrogenation over Platinum Metals*, Academic Press, New York, **1967**, S. 291.
- [211] a) T. Furumoto, T. Yoshioka, K. Kamata, Y. Kameda, M. K. Matsui, *J. Antibiot. (Tokyo)* **1991**, *44*, 371-373; b) T. Furumoto, Y. Kameda, K. Matsui, *Chem. Pharm. Bull (Tokyo)* **1992**, *40*, 1871-1875.
- [212] Vergleiche auch: H. R. Christen, F. Vögtle, *Organische Chemie: von der Grundlagen bis zur Forschung*, Salle und Sauerländer, Frankfurt, **1992**, S. 613-615.
- [213] M. Hemker, A. Stratmann, K. Goeke, W. Schröder, J. Lenz, W. Piepersberg, H. Pape, *J. Bacteriol.* **2001**, *183*, 4484-4492.
- [214] Isolation aus *Uvaria zeylanica* siehe: a) S. D. Jolad, J. J. Hoffmann, K. H. Schram, J. R. Cole, M. S. Tempesta, R. B. Bates, *J. Org. Chem.* **1981**, *46*, 4267-4272; erste Totalsynthese von Zeylena siehe: b) S. Ogawa, T. Takagaki, *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 5075-5077; c) S. Ogawa, T. Takagaki, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1986**, *59*, 655-656.
- [215] a) C. A. Elliger, A. C. Weiss, R. Lundin, *Perkin 1* **1973**, *19*, 2209-2212; b) C. A. Elliger, A. C. Weiss, R. E. Lundin, *Phytochemistry* **1974**, *13*, 2319-2320; c) A. N. Booth, C. A. Elliger, A. C. Weiss, *Life. Sci.* **1974**, *15*, 1115-1120; d) M. Cokelaere, H. Dangreau, S. Arnouts, E. Kühn, E. Decuypere, *J. Agric. Food Chem.* **1992**, *40*, 1839-1842; e) M. Van Boven, P. Daenens, J. Tytgat, M. Cokelaere, *J. Agric. Food Chem.* **1996**, *44*, 2239-2243; f) M. Cokelaere, G. Flo, P. Daenens, E. Decuypere, M. Van Boven, S. Vermaut in *Progress of New Crops* (Hrsg.: J. Janick) ASHS Press, Arlington, **1996**, S. 377-382.
- [216] a) R. B. Woodward, F. E. Bader, H. Bickel, A. J. Frey, R. W. Kierstead, *J. Am. Chem. Soc.* **1956**, *78*, 2023-2025; b) R. B. Woodward, F. E. Bader, H. Bickel, A. J. Frey, R. W. Kierstead, *J. Am. Chem. Soc.* **1956**, *78*, 2057-2659; c) R. B. Woodward, F. E. Bader, H. Bickel, A. J. Frey, R. W. Kierstead, *Tetrahedron* **1958**, *2*, 1-57; d) R. B. Woodward in *Perspectives in Organic Syntheses* (Hrsg.: A. R. Todd), Interscience, New York, **1956**.
- [217] a) B. A. Pearlman, *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 6398-6404; b) B. A. Pearlman, *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 6404-6408.
- [218] a) P. A. Wender, J. M. Schaus, A. W. White, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 6157-6159; b) P. A. Wender, J. M. Schaus, A. W. White, *Heterocycles*. **1987**, *25*, 263-270; c) P. A. Wender, J. M. Schaus, D. C. Torney *Tetrahedron Lett.* **1979**, 2485-2488.
- [219] a) S. F. Martin, H. Rueger, S. A. Williamson, S. Grzejszczak, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 6124-6134; b) S. F. Martin, S. Grzejszczak, H. Rueger, S. A. Williamson, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 4072-4074.

- [220] G. Stork, *Pure. Appl. Chem.* **1989**, *61*, 439-442.
- [221] S. Hanessian, J. Pan, A. Carnell, H. Bouchard, L. Lesage, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 465-473.
- [222] M. E. Doscher, I. B. Wood, J. A. Pankavich, C. A. Ricks, *Vet. Parasitol.* **1989**, *34*, 255-259.
- [223] a) A. D. Argoudelis, T. R. Pike, R. W. Sprague, *J. Antibiot.* **1976**, *29*, 777-786; b) A. D. Argoudelis, R. W. Sprague, S. A. Mizsak, *J. Antibiot.* **1976**, *29*, 787-796.
- [224] a) A. Tamaki, H. Otsuka, T. Die, *J. Nat. Prod.* **1999**, *62*, 1074-1076; b) X. M. Du, N. Y. Sun, N. Irino, Y. Shoyama, *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **2000**, *48*, 1803-1804.
- [225] T. E. Starzl, S. Todo, A. Tzakis, M. Alessiani, A. Casavilla, K. Abu-Elmagd, J. J. Fung, *Surg. Gynecol. Obstet.* **1991**, *172*, 335-344.
- [226] B. E. Bierer, P. K. Somers, T. J. Wandless, S. J. Burakoff, S. L. Schreiber, *Science* **1990**, *250*, 556-559.
- [227] J. D. White, S. G. Toske, T. Yakura, *Synlett* **1994**, 591-593.
- [228] Übersichten siehe: J. D. Morrison, *Asymmetric Synthesis*, Vol. 5, Academic Press, New York, **1985**; zit. Ref.
- [229] T. Hultsch, M. W. Albers, S. L. Schreiber, R. J. Hohman, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1991**, *14*, 6229-6233.
- [230] Totalsynthese von Rapamycin **163** sind von K. C. Nicolaou, S. L. Schreiber, S. J. Danishefsky und A. B. Smith beschrieben, siehe: a) A. B. Smith, S. M. Condon, J. A. McCauley, J. L. Leazer, J.W. Leahy, R. E. Maleczka, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 947-961; b) A. B. Smith, S. M. Condon, J. A. McCauley, J. L. Leazer, J.W. Leahy, R. E. Maleczka, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 962-973; c) zit. Ref.
- [231] H. Hatanaka, T. Kino, M. Hashimoto, Y. Tsurumi, A. Kuroda, H. Tanaka, T. Goto, M. Okuhara, *J. Antibiot.* **1988**, *41*, 999-1008.
- [232] S. Amano, R. Ogawa, M. Ohtsuka, S. Ogawa, N. Chida, *Chem. Commun.* **1998**, 1263-1264.
- [233] Neuere Aspekte der diversizitätsorientierten organischen Synthese siehe: a) S. L. Schreiber, *Science* **2000**, *287*, 1964-1968; b) P. Arya, D. T. H. Chou, M.-G. Baek, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 351-358.
- [234] a) D. S. Tan, M. A. Foley, M. D. Shair, S. L. Schreiber, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 8565-8566; b) D. S. Tan, M. A. Foley, B. R. Stockwell, M. D. Shair, S. L. Schreiber, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 9073-9087; c) B. R. Stockwell, D. S. Tan, M. A. Foley, M. D. Matthew, S. L. Schreiber, S. M. Scott WO 00/06525, **2000** [*Chem. Abstr.* **2000**, *132*, 151600r].
- [235] a) A. Borchardt, S. D. Liberles, S. R. Biggar, G. R. Crabtree, S. L. Schreiber, *Chem. Biol.* **1997**, *4*, 961-968; b) A. J. You, R. J. Jackman, G. M. Whitesides, S. L. Schreiber, *Chem. Biol.* **1997**, *4*, 969-975.

- [236] J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2. Aufl., Cold Spring Harbor, NY, **1989**.
- [237] N. Chester, D. R. Marshak, *Anal. Biochem.* **1993**, 209, 284-290; Abschätzung der Schmelztemperatur T_m eines Primers mit der Länge L [bp] und einem Guanin-/Cytosin-Gehalt GC [%] erfolgt über die Gleichung: $T_m = 69.3 + 0.41 \times GC - 650/L$.
- [238] D. Hanahan in *DNA Cloning Volume, Vol. 1* (Hrsg.: D. M. Glover), IRL Press Oxford, Washington, **1985**.
- [239] F. Sanger, S. Nickeln, A. R. Coulson, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1977**, 74, 5463-5467.
- [240] M. M. Bradford, *Anal. Biochem.* **1976**, 72, 248-254.
- [241] U. K. Lämmli, *Nature* **1970**, 227, 680-685.
- [242] a) G. Gübitz, R. W. Frei, H. Bethke, *J. Chromatogr.* **1976**, 117, 337-343; b) R. Klaus, J. Rippahn, *J. Chromatogr.* **1982**, 244, 99-124; c) R. Klaus, W. Fischer, *Chromatographia* **1987**, 23, 137-140; d) J. Stepanek, *J. Chromatogr.* **1983**, 257, 405-410.

Anmerkung: Es wurde nach Richtlinien der Zeitschrift „*Chemistry – A European Journal*“, Wiley-Verlag zitiert. Die für die Zitationen verwendeten Zeitschriftenkurztitel wurden entsprechend den Empfehlungen der *American Chemical Society* (ACS) verwendet.

9. Veröffentlichungen

Zeitschriftenbeiträge:

- D. Franke, G. A. Sprenger, M. Müller,
Synthesis of Functionalized Cyclohexadiene-*trans*-Diols with Recombinant Cells of *Escherichia coli*
Angew. Chem. **2001**, *113*, 578-581; *Angew. Chem., Int. Ed.* **2001**, *40*, 555-557.
- V. Lorbach, D. Franke, M. Müller,
trans-Cyclohexadiene diols as versatile starting material in natural product synthesis: New short and efficient syntheses of *iso*-crotopoxide and *ent*-senepoxide
Chem. Commun. **2002**, 494-495.

Posterbeiträge:

- D. Franke, V. Lorbach, M. Müller,
Cyclohexadiene-*trans*-diols as Precursors in Carbohydrate Mimics Chemistry
Proceedings of the IKCOC-8, Kyoto/Japan, **11.-15.07.2000**, PP-63.
- D. Franke, G. A. Sprenger, C. Wandrey, M. Müller,
Production of Functionalized Cyclohexadiene-*trans*-diol with Recombinant Strains of *E. coli*
Proceedings of the World Congress on Biotechnology 2000, Berlin, **03.-08.09.2000**.
- V. Lorbach, D. Franke, M. Müller,
Epoxidation and Following Nucleophilic Opening of Microbial Produced Cyclohexadiene-*trans*-diols
Proceedings of ORCHEM 2000, Bad Nauheim, **14.-16.09.2000**, P-143.
- D. Franke, V. Lorbach, G. A. Sprenger, C. Wandrey, M. Müller,
Interplay of Metabolic Engineering and Organic Chemistry for Natural Product Syntheses: Approach to *ent*-Crotopoxide
Proceedings of the 5th SFB-Symposium, Research Centre Juelich, **26.-27.10.2000**.
- V. Lorbach, D. Franke, C. Dose, M. Müller,
New Efficient Syntheses of *ent*-Senepoxide, *iso*-Crotopoxide and *iso*-Valienamine Starting from Microbial Produced *trans*-Cyclohexadienediols
Proceedings of the ESOC 12, Groningen, The Netherlands, **13.-18.07.2001**.

Vorträge:

- D. Franke, V. Lorbach, G. A. Sprenger, M. Müller,
Cyclohexadien-*trans*-diol: Darstellung und Verwendung zur Synthese von
Kohlenhydratmimetika
*Proceedings of the 9. Nachwuchswissenschaftler-Symposium "Bioorganische Chemie",
Sektion „Medizinische Chemie“, Heidelberg, 18.-20.09.2000.*
- D. Franke, G. A. Sprenger, M. Müller,
Untersuchung der Exkretion von Intermediaten des Chorismat-Biosyntheseweges in
Escherichia coli-Zellen: Darstellung von homochiraler (5*S*,6*S*)-Dihydroxy-cyclohexa-1,3-
diencarbonsäure
*Proceedings of the VAAM-Workshop "Biologie bakterieller Naturstoffproduzenten",
Bonn, 24.-26.09.2000, V11.*
- D. Franke, V. Lorbach, G. A. Sprenger, M. Müller,
Metabolische Stoffflussregulation zur fermentativen Produktion von
Chorisminsäurederivaten in *Escherichia coli*-Zellen
*Proceedings of 19. DECHEMA-Jahrestagung der Biotechnologen, Leipzig, 13.-
15.03.2001.*
- D. Franke, V. Lorbach, C. Dose, G. A. Sprenger, M. Müller,
Cyclohexadiene-*trans*-diols: Preparation with Recombinant Cells of *E. coli* and
Application in the Chemistry of New Enzyme Inhibitors
Proceedings of ACHEMASIA 2001, Beijing/VR China, 07.-12.05.2001.
- D. Franke, V. Lorbach, C. Dose, G. A. Sprenger, M. Müller,
Cyclohexadiene-*trans*-diols: Microbial Access and Applicability in the Chemistry of
Carbohydrate Mimics
*Seminar of the Verdine group, Department of Chemistry and Chemical Biology, Harvard
University, Cambridge, 31.03.2001.*

Patente:

- D. Franke, G. A. Sprenger, R. Müller, R. Takors, V. Lorbach, J. Thömmes, M. Halfar, M.
Müller,
Verfahren zur verbesserten Herstellung und Isolierung von *trans*-Dihydroxy-
cyclohexadien-carbonsäuren und/oder deren Folgeprodukte sowie ein dazu geeigneter
genetisch veränderter Organismus
Deutsche Patentanmeldung, Nr. 100 42 535.6, 31.08.2000.

Dank

Herrn **Volker Lorbach** danke ich für die gute Kooperation bei der Untersuchung der Folgechemie der *trans*-CHD und die vielen fruchtbaren Diskussionen bei der Interpretation der analytischen Daten, sowie für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Herrn **Christian Dose** danke ich für die erfolgreiche und angenehme Zusammenarbeit bei den nächtlichen Ionentauscherchromatographien und den Aminreduktionen. Ihm wünsche ich viel Erfolg bei dem aufgenommenen Chemie-Studium.

Den Schulpraktikantinnen Frau **Marianne Mertens**, **Antika Hüllenkrämer**, **Sabrina Kreder** und **Regina Haselhorst** danke ich für die Unterstützung im Labor.

Frau **Ursula Degener** und Frau **Regine Halbach** danke ich für ihre Hilfe bei den gentechnischen Arbeiten und bei der DNA-Sequenzierung.

Herrn **Hans-Jürgen Brandt** und Frau **Susanne Stevens** danke ich für die Unterstützung bei den Fermentationen im Rührkesselreaktor.

Herrn **Markus Halfar** danke ich für die wertvolle Hilfe beim Etablieren der Ionentauscherchromatographie zur Produktisolierung.

Herrn Dr. **Martin Nieger**, Universität Bonn, danke ich für die Anfertigung der Röntgenstrukturanalyse.

Frau **Petra Geilenkirchen** danke ich für die freundliche Anfertigung der IR-Spektren.

Allen Kolleginnen und Kollegen danke ich für das angenehme Arbeitsklima, insbesondere meinen Laborkolleginnen und Kollegen.

Herr PD Dr. **Georg A. Sprenger** möchte ganz herzlich für die zahlreichen Diskussionen und hilfreichen Ratschläge bei der Herstellung der rekombinanten Stämme danken.

Herrn Dr. **Ralf Takors** und Herrn Dr. **Jörg Thömmes**, IDEC Pharmaceuticals Corp., SanDiego, danke ich für die Diskussionen zur Produktisolierung.

Herrn Professor Dr. **Eckhard Leistner**, Universität Bonn, und Herrn Dr. **Rolf Müller**, GBF Braunschweig, danke ich für hilfreiche Diskussion.

Der Graduiertenförderung des Landes NRW und der Studienstiftung des deutschen Volkes danke ich für die finanzielle Unterstützung durch Promotionsstipendien.

Dem Fond der chemischen Industrie danke ich für ein freundliches Angebot für eine Promotionsförderung.

Die Reise nach Japan wurde teilweise finanziert durch ein Reisestipendium der Smith-Kline-Beecham-Stiftung, bei der ich mich herzlich bedanke. Der Vortrag auf der ACHEMASIA/Peking wurde ermöglicht durch ein großzügiges Reise- und Kongressstipendium der Max-Buchner-Stiftung der DECHEMA e.V.

Herrn Professor Dr. **Christian Wandrey** danke ich für die kontinuierlich gewährte, großzügige Unterstützung und die vielen beratenden Gespräche während der Promotion und auch schon während der Diplomarbeit.

Bei Herrn Dr. **Michael Müller** möchte ich mich herzlich für die interessante Themenstellung, die anregenden Gespräche sowie die stetige freundliche, hilfreiche und persönliche Betreuung bei der Durchführung dieser Arbeit bedanken.

