

A Theoretischer Teil

1. Einleitung

1.1. Vorwort

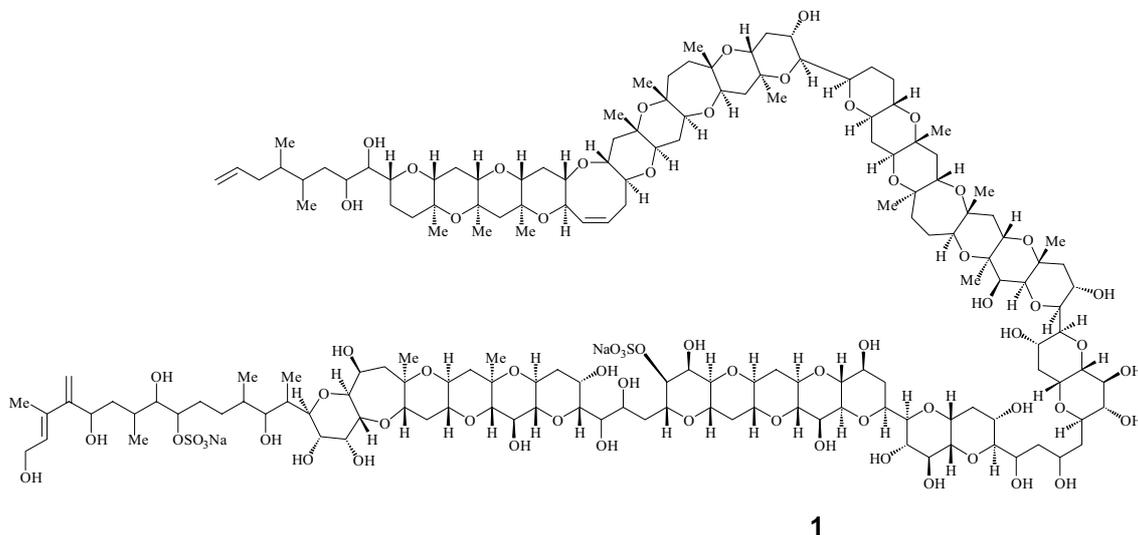
Über Tausende von Jahren hat sich die Menschheit aufgrund ihrer kulturellen und wissenschaftlichen Bedürfnisse stetig weiterentwickelt. Der treibende Motor waren Ideen und Visionen, die, weit entfernt von jeglichen Grundlagen und jeglicher Realisierbarkeit, meist auf erhebliche Ablehnung sogar Antipathie stießen. Dennoch wurden einige Ideen entgegen aller Widerstände und Zweifel umgesetzt, neue Thesen unwiderruflich bewiesen und somit Paradigmenwechsel, Fortschritt und Akzeptanz hervorgerufen. Justus von Liebig schrieb in seinem ersten chemischen Brief exemplarisch: „In unseren Schulen prägen sich den Kindern Wahrheiten ein, deren Eroberung unermessliche Arbeiten, unsägliche Anstrengungen gekostet hat. Sie lächeln, wenn wir ihnen erzählen, wie der italienische Naturforscher eine lange, ausführliche Abhandlung darüber schrieb, dass der Schnee auf dem Aetna aus der nämlichen Substanz bestehe, wie der Schnee der Schweizer Alpen, dass er eine Menge Beweise häufte, um darzuthun, dass beide beim Schmelzen, Wasser von gleichen Eigenschaften und gleicher Beschaffenheit geben; und doch war dieser Schluss nicht so handgreiflich, denn wie sehr ist die Temperatur Siciliens von der in der Schweiz verschieden.“ In der Wissenschaft gibt es dafür zahlreiche Beispiele. Angefangen mit der These und dem späteren Beweis, dass die Erde eine Kugel ist und nicht wie angenommen eine Scheibe, fügen sich Beispiele der Chemie nahtlos ein. So bezeichnete man bis zum 18. Jahrhundert Reinstoffe, wie Harnstoff (1773, Rouelle), Ameisensäure (1749, Marggraf), Weinsäure (1769, Scheele) als Organische Substanzen, da sie lediglich aus Pflanzen- oder Tiergewebe gewonnen werden konnten und ihre Synthese in der unbelebten Natur erfolglos geblieben war. Es galt der Grundgedanke, dass die Synthese solcher Naturstoffe ausschließlich Lebewesen (Organismen) vorbehalten ist, da zu ihrer Entstehung eine besondere 'Lebenskraft' (*vis vitalis*, Berzelius 1807) notwendig sei. Durch die Synthese von Harnstoff aus anorganischen Ausgangssubstanzen im Jahr 1828 durch Friedrich Wöhler konnte diese Annahme widerlegt werden. Dennoch fiel es selbst

fortschrittlichen Wissenschaftlern schwer, Beobachtungen Glauben zu schenken, wie die ersten Untersuchungen der Physiologie der Gärung belegen. Nach Liebig war eine zellfreie Gärung möglich und lies sich rein chemisch erklären. Der französische Mikrobiologe Louis Pasteur vertrat hingegen die Auffassung, dass eine Gärung nur im Beisein von Mikroorganismen möglich sei. Dies widerlegte Eduard Buchner (1897),^{1,2,3,4,5} indem er aus zermahlten Hefezellen einen zellfreien Extrakt - ein so genanntes unorganisiertes Ferment – herstellte, das Zucker zu Alkohol abbaut. Das Ferment wurde von Wilhelm Kühne 1876 erstmals als Enzym benannt. Nach der zufälligen Entdeckung des Penicillins durch Flemming und dessen Entwicklung während des zweiten Weltkrieges dachte man, die ultimative Lösung gegen bakterielle Infektionskrankheiten gefunden zu haben, obwohl die molekularen Mechanismen dieses Wirkstoffes noch nicht erforscht waren. Die Natur wurde mit ihren Abwehrmechanismen unterschätzt. Heute wissen wir besser denn je, dass Viren und Bakterien Resistenzen entwickeln, Tumore aufgrund sehr komplexer zellulärer Mechanismen schwer therapierbar sind. Dennoch dringen die Wissenschaften tiefer in die Mechanismen der Natur ein und es wird deutlich, dass die Erforschung molekularer Mechanismen, nur zum Erfolg führen, wenn grundsätzliche Zusammenhänge erkannt und beschrieben werden.

In diesem Sinne möchte diese Arbeit zum Verständnis des mikrobiellen Sekundärstoffwechsels beitragen.

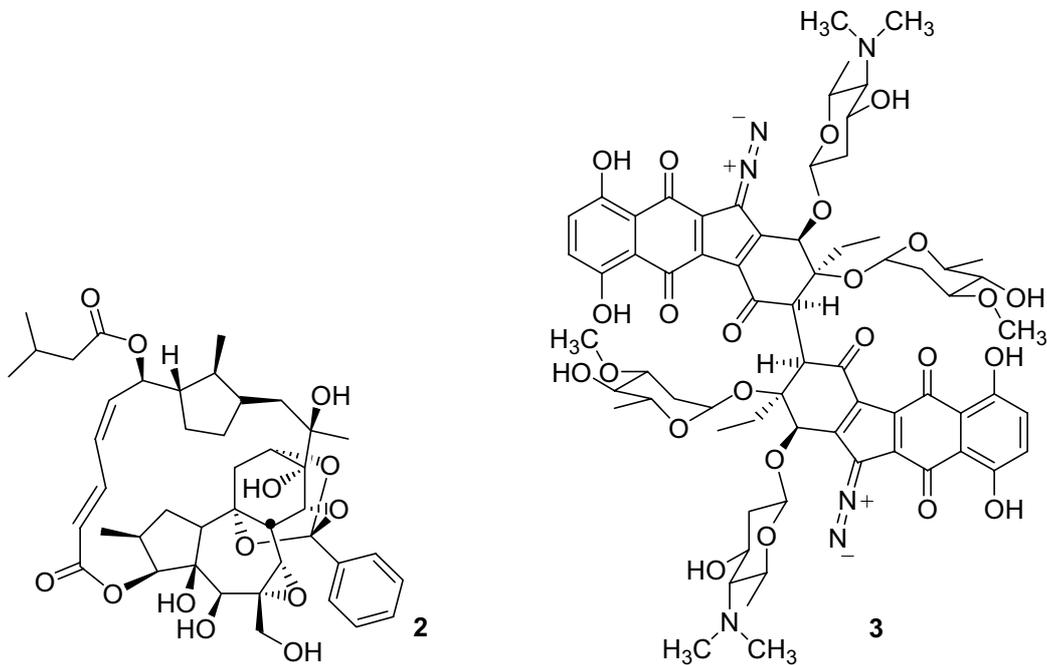
1.2. Molekulare Diversität von Naturstoffen

Die molekulare Diversität von Naturstoffen versetzt die Forscher immer wieder in Erstaunen. Nicht nur, dass die Natur mit einem großen Repertoire an Synthesewerkzeugen agiert, schafft sie es immer wieder, den Chemiker mit erzeugten Strukturen zu überraschen und zu inspirieren. Wie bewerkstelligt es die Natur, ein Molekül wie das Maitotoxin **1** zu synthetisieren? Welche biologische Funktion besitzt ein neuer Naturstoff und kann er selbst bzw. sein Gerüst als neue Leitstruktur für die Entwicklung von Wirkstoffen gegen Krebs, virale und bakterielle Infektionen oder Malaria dienen?

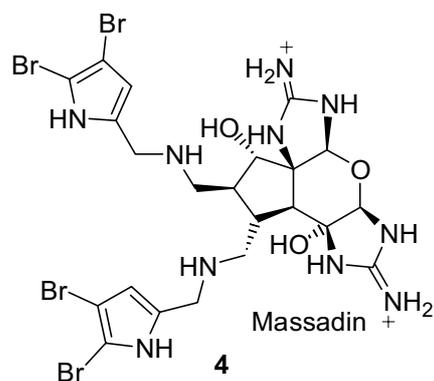


Ein aktuelles Beispiel für die molekulare Diversität sind die Rediocide A-E⁶, von denen Redioid A **2** erstmals durch ein Screening gegen Moskitolarven aufgefallen war.⁷ Es handelt sich um ein Daphnan-Diterpenoid mit einer Polyketidverlängerung. Das Insektizid wurde in einer Ausbeute von 0.75% als Rohextrakt aus dem thailändischen Wolfsmilchgewächs *Trigonostemon reidioides* isoliert und tötet bei einer Konzentration von 0.25 ppm 90% aller Fliegen (*Ctenocephalides felis*). Auf der Suche nach neuen Naturstoffen spielt die Herkunft eine besondere Rolle. So wird marinen Naturstoffen ein hohes Potential für die Wirkstoffforschung vorhergesagt. Neuartige Strukturen wie das Polyketid Lomaiviticin A **3** aus dem marinen Bakterienstamm *Micromonospora lomaivitiensis* bestätigen dies eindrucksvoll.⁸ Erste Untersuchungen weisen den

Naturstoff als DNA interkalierendes Molekül aus, welches den Wirkmechanismus durch elektrophile Azokupplung verstärkt.⁹



Ebenso besteht Massadin A **4**, ein Pyrrol-Imidazol-Alkaloid, durch seine ungewöhnliche Struktur. Das aus dem Meeresschwamm *Stylissa* aff. *massa* isolierte Alkaloid inhibiert die Geranylgeranyltransferase Typ I (GGTase I) aus *Candida albicans* mit einem IC_{50} von $3.9 \mu M$.¹⁰



1.3. Biosyntheseuntersuchungen

Eine essentielle Frage ist, mit welcher Strategie die Natur das molekulare Gerüst eines Naturstoffes aufbaut. Die klassische Methode, dies zu untersuchen, ist die vorläuferdirigierte Biosynthese, insbesondere mit isotope-markierten Biosynthese-Vorstufen. Es kann verfolgt werden, wo sich markierte Biosynthese-Vorstufen im Produkt wiederfinden, daraus lässt sich auf die Bildungsmechanismen rückschließen. Oftmals führen die Einbaumuster nicht zu plausiblen Mechanismen, die mit den bekannten Enzymen zu erklären wären. Hier fängt die Wissenschaft an, interessant zu werden. Das sind die ersten Schritte, neue Biosynthesewege zu entdecken. Ein aktuelles Beispiel ist die Makrophomsäure **5**. Umfangreiche Biosyntheseuntersuchungen legten die Vermutung nahe, dass zum Aufbau von **5** eine Diels-Alder Reaktion durchlaufen wird. Nach ersten Untersuchungen von *Sakurai et al.* zur Makrophomsäure **5**, einem Metaboliten aus dem Pilz *Macrophoma commelinae*, wurde Makrophomsäure **5** aus dem 2-Pyron **13** und einer nicht identifizierten C₃-Einheit unter Abspaltung von CO₂ gebildet.^{11, 12} *Oikawa et al.* wiesen den Einbau von [1-¹³C]-L-Alanin, [1-¹³C]-L-Serin, [U-¹³C]-Glycerin, (1*RS*, 2*S*)-[1-²H]-Glycerin, (1*RS*, 2*R*)-[1-²H]-Glycerin nach und postulierten die Bildung des Phosphenolpyruvates **12**.¹³ Dieses sollte als Dienophil mit **13** zu dem Intermediat **14** reagieren, welches nach einer Retro-Diels-Alder-Reaktion und *syn*-Eliminierung der Phosphorsäure **5** bildete. Weitere Untersuchungen zur C₃-Einheit identifizierten Oxalacetat als direkten Vorläufer von **5**.^{14,15, 16}

Obgleich die Diels-Alder-Cycloaddition eine sehr effiziente und elegante Synthesemethode in der organischen Synthese darstellt, und deren Beteiligung bei einer Vielzahl komplexer Naturstoffe vermutet wird, bestanden Zweifel grundsätzlicher Natur an ihrer Existenz. Denn der Übergangszustand einer Diels-Alder Reaktion ist strukturell dem Produkt sehr ähnlich. Folglich sollte ein Enzym durch sein Produkt inhibiert werden. Dennoch konnte im vergangenen Jahr die dreidimensionale Struktur der Makrophomat-Synthase (MPS) im Komplex mit seinem Dienophil bestimmt werden und nach dem Modellieren des Diens **13** in das aktive Zentrum detaillierte Einblicke in den katalytischen Mechanismus erhalten werden.¹⁷ Demnach katalysiert die Makrophomat-Synthase die Umsetzung von Oxalacetat **15** als Vorläufer mit dem 2-