

Zusammenfassung

Zykloligomerdepsipeptide (ZODP) fungalen Ursprungs verfügen über eine Vielfalt von Bioaktivitäten. Daher hat sich der Gebrauch einiger Vertreter dieser Substanzklasse in der Medizin bereits etabliert. Die Anzahl ist aber dennoch sehr gering, wenn man in Betracht zieht, welches enormes Potential für die Entwicklung neuartiger Arzneimittel hier brach liegt. Diese Lücke kann dadurch erklärt werden, dass die Möglichkeiten zur effizienten strukturellen Diversifizierung stark eingeschränkt sind, da ZODP nicht über funktionelle Gruppen verfügen, die eine einfache chemische Modifizierung erlauben. Die Totalsynthese solcher Moleküle ist oft schwierig, ineffizient und häufig nicht ökonomisch sinnvoll. Derartige Einschränkungen erschweren die gezielte Forschung an diesen Leitstrukturen durch Hochdurchsatzverfahren. Solche Hindernisse könnten aber dadurch umgangen werden, dass man Gene, die für die Produktion der Sekundärmetaboliten verantwortlich sind, in geeigneten Wirten heterolog exprimiert und das System anschließend derartig modifiziert, dass neuartige und chemisch zugängliche Derivate erzeugt werden können.

Die Grundlage der vorliegenden Arbeit bildete ein *Aspergillus niger*-Stamm, der heterolog und unter Kontrolle eines induzierbaren Promotors die Enniatinsynthetase aus *Fusarium oxysporum* exprimiert. Das System erzielte sehr hohe Ausbeuten natürlichen Enniatins in vorhergehenden Studien. Aufgrund der bereits beschriebenen Promiskuität der Enniatinsynthetase schien es einleuchtend, dieses System daraufhin zu überprüfen, ob es in der Lage ist, neuartige Enniatinderivate zu erzeugen.

In dieser Arbeit wurde zunächst ein Ensemble möglicher Hydroxysäurebausteine unter Auswahl günstiger Edukte dargestellt. Nach Zusatz der Vorläufermoleküle zu Kulturen des beschriebenen Stammes konnten etwa 50 Enniatinderivate mittels HRMS und Tandem MS nachgewiesen werden. Etwa 20 der Derivate wurden in Mengen produziert, die eine Isolierung ermöglichten. Die Enniatinderivate enthielten neben dem zugesetzten Vorläufer, häufig auch D-Milchsäure und D-Hydroxyisovaleriansäure, was auch mittels NMR-Spektroskopie bestätigt werden konnte. Die Ausbeute einzelner Derivate lag, in Abhängigkeit vom Vorläufer, in einem Bereich von 1 mg/l bis 50 mg/l. Weiterhin wiesen MS/MS-Analysen darauf hin, dass eine Verstoffwechslung der Vorläufer und/oder der Produkte stattgefunden hat. Die isolierten Substanzen wurden zur Testierung auf antivirale und antiplasmodiale Aktivität als auch für Zytotoxizitätsstudien eingesetzt. Weiterhin wurden sie als Edukte zur Semisynthese verwendet, wobei sie erfolgreich durch verschiedenste Reaktionstypen, z.B. Cu(I) katalysierte [2+3]-dipolare Zykoaddition, Substitution und Eliminierung, umgesetzt werden konnten.

Die vorliegende Studie zeigt, dass die Generierung neuartiger und chemisch zugänglicher ZODP in *A. niger* möglich ist. Sie kann als Grundlagenforschung an einem System verstanden werden, dass die Biosynthese und Semisynthese neuartiger ZODP auch im Rahmen industrieller Wirkstoffentwicklung erlauben könnte.

Abstract

Cyclooligomer depsipeptides (CODPs) of fungal origin display a broad scope of bioactivities. Certain representatives of this substance class are already applied as agents in the treatment of diseases and they are commonly applied in veterinary and human medicine. The number of CODPs in medicinal use is still limited despite the fact that they are particularly promising lead structures for the development of new pharmaceuticals. This can be explained by the lack of means to modify or structurally diversify CODPs in a straight-forward fashion. Naturally occurring non-ribosomal peptides usually lack functional groups that allow efficient chemical modification. The chemical synthesis of complex biomolecules is often cumbersome, inefficient and expensive which in turn impedes the generation of compound libraries for systematic screening approaches. In order to circumvent such limitations and to combine biological tools with the versatility of chemistry, it would be favorable to heterologously express the biosynthetic machinery of a desired compound in an appropriate host and modify the system in such a manner that it produces novel and if desired chemically accessible derivatives.

The cornerstone of this study was a genetically modified *Aspergillus niger* strain that expresses enniatin synthetase from *Fusarium oxysporum* under control of an inducible promoter system. It has been proven in earlier studies that the system allows the high yield production of enniatin. Due to the fact that enniatin synthetase features relaxed substrate specificity this work assessed the potential of *A. niger* for the production of novel enniatin derivatives.

A set of putative substrates for enniatin synthetase was synthesized using affordable starting materials. Upon supplementation of the respective precursors, approximately 50 novel enniatin derivatives were detected and characterized by HRMS, tandem MS and NMR spectroscopy. Out of this multitude of derivatives about 20 were produced in a sufficient amount to allow for their isolation. Yields were, depending on the supplemented precursor, in a range from 1 mg/L to 50 mg/L. The isolated enniatin congeners were to a lesser extent composed of D-lactic acid and D-hydroxyisovaleric acid apart from the supplemented precursor. MS/MS-analysis of enniatin derivatives showed that metabolization of precursors and/or products had occurred. The isolated compounds were on the one hand tested by cooperation partners for anti-viral and anti-plasmodial activity as well as for cytotoxicity. The novel enniatin derivatives were on the other hand used as starting material for semi-synthesis. The chemical modifications comprised Cu(I) catalyzed [2+3]-dipolar cyclo-additions, substitution and elimination reactions. The performed reactions suggest that the enniatin core structure can be structurally diversified in an almost unlimited manner.

This study demonstrates that the production of novel and chemically accessible enniatin derivatives in *A. niger* was successful and will pave the way for a possible industrial application for the biosynthesis and semi-synthesis of novel CODPs of fungal origin in drug discovery.