



**Methoden zur Herstellung von
Prodigininen als Wirkstoffe**
—
**Eine farbenfrohe Brücke zwischen
Chemie und Biologie**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Andreas Sebastian Klein

aus Düsseldorf (Deutschland)

Düsseldorf, Dezember 2017

aus dem Institut für Bioorganische Chemie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Berichterstatter:

1. Prof. Dr. Jörg Pietruszka
2. Prof. Dr. Karl-Erich Jaeger

Tag der mündlichen Prüfung: 3. Mai 2018

*Es ist schon so: Die Fragen sind es,
aus denen das, was bleibt, entsteht.
Denkt an die Frage jenes Kindes:
„Was tut der Wind, wenn er nicht weht?“*

Dr. Emil Erich Kästner

Veröffentlichungen

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht.

Publikationen

J. Hage-Hülsmann, A. Grünberger, S. Thies, B. Santiago-Schübel, A. S. Klein, J. Pietruszka, D. Binder, F. Hilgers, A. Domröse, T. Drepper, D. Kohlheyer, K.-E. Jaeger, A. Loeschcke, *PLOS One* **2018**; 'Natural biocide cocktails: Combinatorial antibiotic effects of prodigiosin and biosurfactants'.^[1]

A. S. Klein,* H. U. C. Brass,* D. P. Klebl, T. Classen, A. Loeschcke, T. Drepper, S. Sievers, K.-E. Jaeger, J. Pietruszka, *ChemBioChem* **2018**, DOI: 10.1002/cbic.201800154; 'Preparation of cyclic prodiginines by mutasynthesis in *Pseudomonas putida* KT2440'.^[2]

A. S. Klein, A. Loeschcke, K.-E. Jaeger, J. Pietruszka, *GIT Labor-Fachzeitschrift* **2018**, *4*, 41–43; 'Neue bioaktive Naturstoff-Derivate – Nachhaltige Produktion von Prodigiosinderivaten mittels Mutasynthese'.^[3]

A. S. Klein, A. Domröse, P. Bongen, H.U.C. Brass, T. Classen, A. Loeschcke, T. Drepper, L. Laraia, S. Sievers, K.-E. Jaeger, J. Pietruszka, *ACS Synth. Biol.* **2017**, *6*, 1757–1765; 'New Prodigiosin Derivatives Obtained by Mutasynthesis in *Pseudomonas putida*'.^[4]

A. Domröse,* A. S. Klein,* J. Hage-Hülsmann, S. Thies, V. Svensson, T. Classen, J. Pietruszka, K.-E. Jaeger, T. Drepper, A. Loeschcke, *Front. Microbiol.* **2015**, *6*, 972; 'Efficient recombinant production of prodigiosin in *Pseudomonas putida*'.^[5]

Konferenztteilnahmen & Vorträge

Annual Conference of the Association for General and Applied Microbiology (VAAM), 15.–18.04.2018, Wolfsburg, Deutschland; J. Hage-Hülsmann, S. Thies, A. S. Klein, J. Pietruszka, T. Drepper, K.-E. Jaeger, A. Loeschcke; 'Combinatorial antibiotic effects of prodigiosin and surfactants'. (Poster)

69. Mosbacher Kolloquium, 22.–24.03.2018, Mosbach, Deutschland; H. U. C. Brass, A. S. Klein, T. Classen, A. Loeschcke, T. Drepper, L. Laraia, S. Sievers, K.-E. Jaeger, J. Pietruszka; 'Creating Diversity in Prodiginines – Synthetic Biology meets Chemistry'. (Poster)

GASB I (German Association for Synthetic Biology), 24.–25.11.2017, Marburg, Deutschland; A. S. Klein; 'New Prodigiosin Derivatives – Synthetic Biology Meets Chemistry'. (Vortrag)

Gordon Research Conferences – Natural Products & Bioactive Compounds, 30.07.–04.08.2017, Andover (NH), USA; J. Hage-Hülsmann, A. Grünberger, S. Thies, V. Wewer, S. Metzger, A. S. Klein, D. Binder, F. Hilgers, A. Domröse, L. Windeln, D. Dluhosch, S. Kopriva, T. Drepper, K.-E. Jaeger, A. Loeschcke; 'A strategy to new antimicrobials: combinatorial effects of natural compounds'. (Poster)

Directing Biosynthesis V, 22.–24.03.2017, Warwick, Vereinigtes Königreich; H. U. C. Brass, A. S. Klein, T. Classen, A. Domröse, A. Loeschcke, T. Drepper, K.-E. Jaeger, J. Pietruszka; 'New Prodigiosin Derivatives – A mutasynthesis approach'. (Kurzvortrag & Poster)

University of Cambridge, 26.09.2016, Cambridge, Vereinigtes Königreich; A. S. Klein; 'Creating Diversity in Prodiginines – Chemistry Meets Synthetic Biology'. (Vortrag)

„Future Bioeconomy“–PhD Day NRW, 22.09.2016, Düsseldorf, Deutschland; A. S. Klein, A. Domröse, A. Loeschcke, T. Classen, K.-E. Jaeger, T. Drepper, J. Pietruszka; 'Creating diversity in prodiginines – Biotechnology meets chemistry'. (Kurzvortrag & Poster)

Gordon Research Conferences – Natural Products & Bioactive Compounds, 31.07.–05.08.2016, Andover (NH), USA; A. S. Klein, A. Domröse, A. Loeschcke, T. Classen, K.-E. Jaeger, T. Drepper, J. Pietruszka; 'Creating diversity in prodiginines – A mutasynthesis approach'. (Poster)

IV International Conference on Antimicrobial Research (ICAR), 29.06.–01.07.2016, Torremolinos, Spanien; J. Hage-Hülsmann, A. Grünberger, S. Thies, A. Domröse, A. S. Klein, D. Binder, F. Hilgers, D. Kohlheyer, J. Pietruszka, K.-E. Jaeger, T. Drepper, A. Loeschcke; 'Combinatorial antibiotic effects of natural biocide cocktails'. (Poster)

S. Thies, A. Loeschcke, A. Domröse, A. S. Klein, J. Pietruszka, F. Hilgers, R. Weihmann, D. Binder, K. Troost, K.-E. Jaeger, T. Drepper; 'Novel microbial production strategies for natural products with antimicrobial properties'. (Poster)

CLIB-GC Symposium „From Gene to Protein and Beyond“, 08.04.2016, Düsseldorf, Deutschland; A. S. Klein; 'Creating diversity in prodiginines – A bridge between chemistry and biology'. (Vortrag)

Annual Conference of the Association for General and Applied Microbiology (VAAM), 13.–16.03.2016, Jena, Deutschland; A. Domröse, R. Weihmann, A. S. Klein, J. Pietruszka, K.-E. Jaeger, T. Drepper, A. Loeschcke; 'yTREG – Update of a synthetic biology tool for effective gene cluster cloning and secondary metabolite production'. (Poster)

28. Irseer Naturstofftage, 24.–26.02.2016, Irsee, Deutschland; A. S. Klein, A. Domröse, A. Loeschcke, T. Classen, K.-E. Jaeger, T. Drepper, J. Pietruszka; 'Chemo-enzymatic Production of Prodiginines'. (Kurzvortrag & Poster)

6th European Conference on Prokaryotic and Fungal Genomics (ProkaGENOMICS), 29.09.–02.10.2015, Göttingen, Deutschland; A. Domröse, A. S. Klein, J. Pietruszka, K.-E. Jaeger, T. Drepper, A. Loeschcke; 'TREG – A synthetic biology tool for the bacterial production of prodiginosin'. (Poster)

IV. Symposium der „Interdisciplinary Graduate School of Natural Products Research (Saarland University)“, 05.08.2015, Saarbrücken, Deutschland; A. S. Klein, A. Domröse, A. Loeschcke, K.-E. Jaeger, T. Drepper, J. Pietruszka; 'Chemo-enzymatic production of the Antibiotic Prodiginosin in *Pseudomonas putida*'. (Vortrag & Poster)

The 6th Congress of European Microbiologists (FEMS), 07.–11.06.2015, Maastricht, Niederlande; A. Loeschcke, S. Thies, J. Hage-Hülsmann, A. Grünberger, D. Binder, A. Domröse, A. S. Klein, D. Kohlheyer, J. Pietruszka, K.-E. Jaeger, T. Drepper; 'Heterologous production of antibacterial secondary metabolites from *Serratia marcescens* in *Pseudomonas putida*'. (Vortrag & Poster)

Directing Biosynthesis IV, 25.–27.03.2015, Norwich, Vereinigtes Königreich; A. S. Klein, A. Domröse, A. Loeschcke, K.-E. Jaeger, T. Drepper, J. Pietruszka; 'Chemo-enzymatic production of the antibiotic prodiginosin in *Pseudomonas putida*'. (Poster)

Synthetic biology of antibiotic production II, 30.08.–04.09.2014, Sant Feliu de Guíxols, Spanien; A. S. Klein, A. Domröse, A. Loeschcke, K.-E. Jaeger, T. Drepper, J. Pietruszka; 'Chemoenzymatic production of the antibiotic prodiginosin'. (Poster)

Abschluss- und Praktikumsarbeiten

Die vorliegende Arbeit enthält Ergebnisse der Abschluss- und Praktikumsarbeiten folgender Personen:

M.Sc. Lavinia Dunsmore (University of Cambridge, im Rahmen des vom DAAD geförderten RISE-Austauschprogramms), 2015.

M.Sc. David Paul Klebl (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Masterarbeit), 2017; 'Wunderbare Derivate: Mutasynthese von Prodiginin-Analoga'.^[6]

Die entsprechenden Arbeiten wurden unter Weisung des Autors durchgeführt und im Text kenntlich gemacht.

Inhaltsverzeichnis

Vorwort	V
Abkürzungsverzeichnis	VI
Kurzzusammenfassung	VIII
Abstract	IX
1 Einleitung	10
1.1 Einführung in die Thematik	10
1.2 Zielsetzung	12
2 Kenntnisstand	14
2.1 Sekundärmetabolite – Naturstoffe des Lebens	14
2.2 Prodiginine und ihre farbenfrohe Geschichte	15
2.3 Struktur und biologische Aktivität von Prodigininen	16
2.3.1 Struktur	16
2.3.2 Biologische Aktivität	19
2.4 Aufklärung der Struktur und Biosynthese von Prodigininen	22
2.4.1 Biosynthese von 4-Methoxy-2,2'-bipyrrol-5-carbaldehyd (12 , MBC)	24
2.4.2 Biosynthese von 2-Methyl-3- <i>n</i> -amyl-pyrrol (13a , MAP)	26
2.4.3 Biosynthese von 2-Undecylpyrrol (14 , 2-UP)	26
2.4.4 Kondensation zu Prodigininen und anschließende oxidative Zyklisierungen	28
2.5 Biomimetische Synthesen von Prodigininen	31
2.6 Synthesen von Naturstoffderivaten	35
2.6.1 Biosynthese, Semisynthese, <i>Precursor-directed</i> Biosynthese, Mutasynthese	36
2.6.2 Mutasyntesen und Semisynthesen von Prodigininen	39
3 Ergebnisse und Diskussion	42
3.1 Biomimetische Totalsynthese von Prodigiosin (1a)	42
3.1.1 Synthese von MBC (12)	43
3.1.2 Synthese von MAP (13a) (<i>Trofimov</i> -Reaktion I)	44
3.1.3 Kondensationsreaktion zu Prodigiosin (1a)	48
3.1.4 Zusammenfassung der biomimetischen Totalsynthese von Prodigiosin (1a)	48
3.1.5 Synopsis des Kapitels	49
3.2 Heterologe Biosynthese von Prodigiosin (1a) in <i>Pseudomonas putida</i> KT2440	50
3.2.1 Konstruktion der Prodigiosin (1a) Produktionsstämme mittels TREX-System	51
3.2.2 Heterologe Produktion und Charakterisierung des Naturstoffes Prodigiosin (1a) aus <i>P. putida</i> KT2440	54
3.2.2.1 Charakterisierung von Prodigiosin (1a)	56
3.2.2.2 Quantifizierung von Prodigiosin (1a)	58
3.2.2.3 Optimierung der Produktionsbedingungen für <i>P. putida</i> pig-r2	61
3.2.2.4 Einfluss der Prodigiosin (1a) Produktion auf die Vitalität von <i>P. putida</i>	63
3.2.3 Polyurethan als Adsorbens in der Prodigiosin (1a) Biosynthese	65
3.2.4 Synopsis des Kapitels	69
3.3 Mutasynthese zur Herstellung von Prodigiosin (1a) und Derivaten	70
3.3.1 Vorversuche zur Mutasynthese	70
3.3.2 Konstruktion eines MAP (13a)-defizienten Deletionsmutante	73
3.3.3 Komplementationsexperimente mit <i>P. putida</i> pig-r2 Δ <i>pigD</i>	76
3.3.4 Mutasynthese im analytischen Maßstab	79
3.3.4.1 Synthese von 2,3-Dialkylpyrrolen (<i>Trofimov</i> -Reaktion II) & Mutasynthese	80
3.3.4.2 Synthese von 3-Alkylpyrrolen & Mutasynthese	84

3.3.4.3	Synthese von 3-Alkenyl-2-methylpyrrolen & Mutasyntese	87
3.3.4.4	Indole sowie Synthese von zyklischen 2,3-Dialkylpyrrolen & Mutasyntese	89
3.3.4.5	Quantifizierung der Prodiginine	92
3.3.4.6	Mutasyntese artverwandter Mutasyntese im analytischen Maßstab	93
3.3.5	Mutasyntese im präparativen Maßstab	94
3.3.5.1	Evaluation der Mutasyntese im präparativen Maßstab	94
3.3.5.2	<i>Fed-Batch</i> -Prozess	96
3.3.6	Synopsis des Kapitels	97
3.4	<i>In vitro</i> Biotransformation zur Verifizierung des PigC Substratspektrums	98
3.4.1	Klonierung und Expression von <i>pigC</i>	98
3.4.2	<i>In vitro</i> Biotransformation mit PigC	100
3.4.3	Kinetische Untersuchung von PigC	102
3.4.4	Synopsis des Kapitels	104
3.5	Semisynthese als ergänzender Zugang zu Prodigininen	105
3.5.1	Semisynthese mit biosynthetisch produzierten MBC (12)	105
3.5.2	Konsequente Kreuzmetathese zur Derivatisierung von Alken-Prodigininen	107
3.5.3	Synopsis des Kapitels	108
3.6	Bioaktivität von Prodigiosin (1a) und Derivaten	109
3.6.1	Antibiotische Eigenschaften von Prodigininen	109
3.6.2	Einfluss auf die Autophagie in MCF-7 Brustkrebszellen	114
3.6.3	Synopsis des Kapitels	117
3.7	Versuche zur Zyklisierung von Undecylprodigiosin (3) durch RedG	118
3.7.1	Synthese von Undecylprodigiosin (3) und Entwicklung eines Screeningsystems	119
3.7.2	Expression von <i>redG</i> und Aufbau des Elektronentransportsystems	123
3.7.3	Untersuchung gekoppelter Elektronentransportsysteme in Kombination mit RedG	129
3.7.4	Synopsis des Kapitels	130
4	Zusammenfassung und Ausblick	131
5	Materialien	143
5.1	Geräte	143
5.2	Software	145
5.3	Verbrauchsmaterialien	145
5.4	Chemikalien	145
5.5	Enzyme	146
5.6	Fertigkits	146
5.7	Oligonukleotide und synthetische Gene	146
5.8	Verwendete Oligonukleotide	146
5.9	Verwendete Vektoren	148
5.10	Stammlösungen	148
6	Methoden	149
6.1	Molekularbiologische Methoden	149
6.1.1	Amplifikation von Genen aus genomischer DNA oder von Vektoren durch PCR	149
6.1.2	Isolation von Plasmid DNA	150
6.1.3	Isolation genomischer DNA	150
6.1.3.1	<i>Enterobacteriaceae</i>	150
6.1.3.2	<i>Streptomycetaceae</i>	151
6.1.4	Restriktionsverdau und Ligation	151
6.1.5	Primerdesign	152
6.1.6	Kolonie PCR	152
6.1.7	MEGAWHOP	153
6.1.8	<i>Gibson Assembly</i> [®] (GA)	154
6.1.9	Agarose-Gelelektrophorese	156

6.1.10	DNA Konzentrationsbestimmung	157
6.1.11	DNA Sequenzierung	157
6.2	Mikrobielle Methoden	158
6.2.1	Stämme	158
6.2.2	Anzucht von Bakterien	159
6.2.2.1	Nährmedien	159
6.2.2.2	Kultivierungsbedingungen	160
6.2.3	Herstellung und Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i> Zellen	162
6.2.4	Herstellung von Kulturen zur Langzeitlagerung durch Kryokonservierung	163
6.2.5	Genexpression und Reinigung	163
6.2.5.1	Heterologe Genexpression in <i>E. coli</i>	163
6.2.5.2	Zellaufschluss	163
6.2.5.3	Reinigung mittels Poly-Histidin-Tag (IMAC)	163
6.2.5.4	Expressionskontrolle durch SDS-PAGE	164
6.3	Chemische Methoden	166
6.3.1	Allgemeine chemische Methoden	166
6.3.1.1	Kenngößen chemischer Eigenschaften und Konstanten	166
6.3.1.2	Lösungsmittel	166
6.3.1.3	Durchführung von Reaktionen, Reaktionskontrolle und präparative Chromatographie	166
6.3.1.4	Massenspektrometrie	167
6.3.1.5	NMR-Spektroskopie/Quantitative NMR-Spektroskopie	167
6.3.1.6	IR-Spektroskopie	168
6.3.1.7	HPLC Analyse	168
6.3.1.8	LC-MS Analyse	168
6.3.1.9	Drehwert	169
6.3.1.10	Schmelzpunktbestimmung	169
6.3.1.11	Benennung von Verbindungen	169
6.4	Synthesen von Pyrrolen als Präkursoren	170
6.4.1	Vorschrift A für die Synthese der 2,3-Dialkylpyrrole 13a–m , 2-Alkyl-3-Alkenylpyrrole 13t , 13u und der zyklischen 2,3-Dialkylpyrrole 77a–d	172
6.4.1.1	Synthese von 7-Octen-2-on (70)	180
6.4.1.2	Synthese der zyklischen Alkylpyrrole 77a–d	181
6.4.2	Vorschrift B für die Synthese der 3-Alkylpyrrole 13n–s	183
6.4.3	Vorschrift C für die Synthese von 2-Methyl-1 <i>H</i> -pyrrol (13b)	188
6.4.4	Synthesen von 2-Undecyl-1 <i>H</i> -pyrrol (14 , 2-Undecylpyrrol, 2-UP)	190
6.5	Synthesen von Boc-MBC (46) und MBC (12)	193
6.6	Synthesen von Prodigininen	197
6.6.1	Vorschriften für die Kondensationsreaktion zu Prodigininen	197
6.6.2	Synthesen zur Derivatisierung von Prodiginin 1u	201
6.6.2.1	Synthesen zur Derivatisierung von Pyrrol 13u	201
6.6.2.2	Derivatisierung von Prodiginin 1u	204
6.7	Spezieller Experimentalteil	205
6.7.1	Biosynthese und Extraktion von Prodigiosin (1a)	205
6.7.2	Biosynthese und Extraktion von Undecylprodigiosin (3) und Butyl- <i>meta</i> -cycloheptylprodigiosin (4)	206
6.7.3	Quantifizierung von Prodigininen/Molare Extinktionskoeffizienten	207
6.7.4	Allgemeine Vorschrift für Mutasyntesen	207
6.7.5	PigC <i>in vitro</i> Assay	211
6.7.6	PigC Expression und Isolation der Membranfraktion	211
6.7.7	Michaelis-Menten-Kinetik von PigC	212
6.7.8	Semisynthese mit extrahierten Prodigininen	213
6.7.9	Biosynthese und Extraktion von MBC (12) und anschließender Semisynthese	213

6.7.9.1	Biosynthese von MBC (12)	213
6.7.9.2	Extraktion von MBC (12)	213
6.7.9.3	Semisynthese mit extrahiertem MBC (12).....	214
6.7.10	Toxizitäts-Assay von Prodigininen und Präkursoren	214
6.7.11	Zyklisierung von Undecylprodigiosin (3) durch RedG.....	216
7	Anhänge	217
7.1	Allgemeine Anhänge.....	217
7.2	Dosis-Wirkungs-Kurven & Auswertung.....	222
7.3	Codon Harmonisierung	227
7.4	Vektorkarten	229
7.5	Inhaltlicher Eigenanteil an den veröffentlichten Publikationen dieser Arbeit	238
8	Literaturverzeichnis	240
9	Danksagung	260
10	Erklärung	261
11	Formelregister	262

Vorwort

»Die Fragen sind es, aus denen das, was bleibt, entsteht.«

(Dr. Emil Erich Kästner)

Mit diesen bereits erwähnten Worten eines Epigramms von Dr. *Emil Erich Kästner* möchte ich keineswegs einen Vergleich mit dem Meister der Vorworte anstreben; vielmehr hat dieser Satz mich bereits viele Jahre meines Lebens begleitet und bildet den Antrieb meiner wissenschaftlichen Neugier und den Grundgedanken für diese Arbeit.

Am Beginn einer Dissertationsarbeit steht meistens eine, vielleicht auch mehrere zentrale Fragen und oftmals entwickeln sich während der Auswertung von Ergebnissen nicht nur Antworten, sondern auch neue Herausforderungen. Dies galt im Besonderen für die vorliegende Arbeit, da diese den Grundstein für das Themenfeld der wunderbar farbigen Prodiginine am Institut für Bioorganische Chemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf gelegt hat. Den Leser erwartet neben einer Aufarbeitung des historischen und wissenschaftlichen Hintergrunds zu den Prodigininen die Produktion dieser Naturstoffe durch Totalsynthese, Biosynthese, Mutasythese, Semisynthese und Biokatalyse. Auch wenn es beim Lesen der Arbeit den Anschein hat, dass bedingt der Themenvielfalt eine Vielzahl an anfänglichen Diskussionspunkten eine gewisse Route vorgegeben haben, so kann ich diese Annahme negieren. Den Ausgangspunkt für die Reise bildete allein die Frage: „Können Prodigininderivate mittels Mutasythese in einem heterologen Wirt adressiert werden?“ Mit dieser Herausforderung im Gepäck möchte ich den Leser zu einer farbenfrohen Dissertationsarbeit – mit viel mehr Fragen und Antworten als dieser Einen – einladen, welche eine Geschichte an der Schnittstelle zwischen Chemie und Biologie erzählt und hoffentlich neue Fragen für nachfolgende Arbeiten bereithält.

Andreas Sebastian Klein

Abkürzungsverzeichnis

2-UP	2-Undecylpyrrol	FMN	Flavinmononucleotid
ACP	<i>acyl carrier protein</i>	Fnr	Ferredoxinreduktase
ADP	Adenosindiphosphat	FT-ICR	<i>Fourier-transform ion cyclotron resonance</i>
AMP	Adenosinmonophosphat	<i>fw</i>	<i>forward (sense strand orientierter Primer)</i>
Amp	Ampicillin	GA	<i>Gibson Assembly®</i>
API	<i>atmospheric pressure ionization</i>	GRAS	<i>generally recognized as safe</i>
Äq.	molares Äquivalent	HG	<i>Hoveyda Grubbs Katalysator</i>
AT	Acyltransferase	HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>	IC _{max}	maximale inhibitorische Konzentration
ATP	Adenosintriphosphat	IC _x	<i>inhibitory concentration</i>
<i>bla</i>	Gen für die β -Lactamase	IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>	IUPAC	<i>International Union for pure and applied Chemistry</i>
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl	Kan	Kanamycin
bp	Basenpaare	kb	Kilobase
CDS	<i>coding sequence</i>	kDa	Kilodalton
Cm	Chloramphenicol	KP _i	Kaliumphosphatpuffer
CoA	Coenzym A	KS	Ketosynthase
COBALT	<i>Constraint based Multiple Alignment Tool</i>	LB	<i>lysogeny broth</i>
dATP	Desoxyadenosintriphosphat	LC	<i>liquid chromatography</i>
DC	Dünnschichtchromatographie	LDA	Lithiumdiisopropylamid
dCTP	Desoxycytidintriphosphat	LTMP	Lithium-2,2,6,6-tetramethylpiperidin
DCW	<i>dry cell weight</i>	MAP	2-Methyl-3- <i>n</i> -amyl-pyrrol
DDQ	2,3-Dichlor-5,6-dicyano-1,4-benzochinon	MBC	4-Methoxy-2,2'-bipyrrrol-5-carbaldehyd
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat	MDI	Diphenylmethan-4,4'-diisocyanat
DH	Dehydrogenase	MEK	Methylethylketon
DIPA	Diisopropylamin	MIC	<i>minimal inhibitory concentratio</i>
DMB	3,4-Dimethoxybenzyl	MIDA	<i>N</i> -Methyliminodiacetat
DMSO	Dimethylsulfoxid	MS	Massenspektrometrie
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate	MSD	<i>mass selective detector</i>
DSMZ	Leibniz Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH	MW	Mikrowelle (Synthesemikrowelle)
DTT	1,4-Dithio-D-threitol	NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
dTTP	Desoxythymidintriphosphat	NADP	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
eGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>	NRPS	nichtribosomalen Peptidsynthetase
EIC	<i>extracted ion chromatogram</i>	NTA	Nitrilotriessigsäure
ES	<i>electrospray</i>	OAS	PLP abhängige α -Oxamin Synthase
EtOAc	Essigsäureethylester	OD	optische Dichte
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid	OMT	O-Methyltransferase
Fdx	Ferredoxin		

OR	Oxidoreduktase
Ori	<i>origin of replication</i>
PCP	<i>peptidyl carrier protein</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PDB	<i>Precursor-directed Biosynthese</i>
PE	Petrolether
PEG	Polyethylenglycol
PEP	Phosphoenolpyruvat
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i> Polymerase
P _i	anorganisches Phosphat
PKS	Polyketidsynthase
PLP	Pyridoxalphosphat
ppm	<i>parts per million</i>
PPTase	Phosphopantetheinyl Transferase
Prom	Promotor
PT	Phosphotransfer-Domäne
PU	Polyurethan
rcf	<i>relative centrifugal force</i>
RDA	<i>radial diffusion assay</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RT	Raumtemperatur
<i>rv</i>	<i>reverse (antisense strand orientierter Primer)</i>
SAM	S-Adenosylmethionin
SAR	<i>structure-activity-relationship</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sm	Streptomycin
T4	<i>E. coli</i> Phage
T7	T7 Phage
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i> Polymerase
TB	<i>terrific broth</i>
TE	Thioesterase
TEA	Triethylamin
TEV	<i>tabacco edge virus</i>
ThDP	Thiaminpyrophosphat
THF	Tetrahydrofuran
TMP	2,2,6,6-Tetramethylpiperidin
TMS	Tetramethylsilan
Tn5	Transposase
t _R	Retentionszeit
TRIS	2-Amino-2-hydroxymethylpropan-1,3-diol

Kurzzusammenfassung

Naturstoffe sind nicht nur ubiquitäre Biomoleküle aller lebenden Organismen, sie bilden auch zu großen Teilen den Grundstein der heutigen medizinischen Wirkstoffe. Unter der Betrachtung der stetig wachsenden Weltbevölkerung und des demographischen Wandels stehen insbesondere solche Naturstoffe im Vordergrund, welche altersbedingte Krankheiten und bakterielle Epidemien als Ziel vorsehen und zusätzlich die Ernährung der Weltbevölkerung sichern. Gegenwärtige Strategien sehen hierbei für die Entwicklung neuer Naturstoffe und deren Derivate eine, unter bioökonomischen Gesichtspunkten, nachhaltige Produktion als Grundvoraussetzung an. Die zentralen Naturstoffe dieser Arbeit bilden die Prodiginine, welche aus der Stoffklasse der Pyrrolalkaloide stammen. Prodiginine zeigen neben antibakteriellen Eigenschaften auch biologische Aktivitäten gegenüber Tumoren, Pilzen und Malariaerregern. Das Ziel dieser Arbeit bestand in der Entwicklung nachhaltiger Produktionsstrategien für Prodigininderivate und die Evaluation ihrer biologischen Aktivität.

Zunächst lag der Schwerpunkt in der Synthese von biomimetischen Intermediaten des Naturstoffes Prodigiosin. Die Kombination von literaturbekannten Synthesemethoden konnte nicht nur eine Verkürzung der aktuellen Totalsynthesen erreichen, sondern eröffnete auch durch die *Trofimov*-Reaktion den Zugang zu insgesamt 19 Pyrrolbausteinen, welche die Grundlage für die Produktion der Derivate bildeten. Eine nachhaltige, biosynthetische Produktion von Prodigiosin gelang durch die Integration des Biosyntheseclusters aus dem putativen Humanpathogen *Serratia marcescens* in das Genom des GRAS-zertifizierten Stamms *Pseudomonas putida* KT2440. Durch die Etablierung eines auf Polyurethanschaum basierten Extraktionssystems konnte die Produktionsmenge erhöht werden und es gelang zudem eine kostengünstige und effiziente Bereitstellung des Naturstoffes und der späteren Derivate.

Die Herstellung der Derivate wurde durch die Erzeugung einer Intermediat-defizienten Mutante und deren Einsatz in Mutasynthese- und Semisynthese-Strategien ermöglicht. Die Mutasynthese erlaubte dabei die Adressierung von 18 verschiedenen Prodigininen und die Aufklärung des Substratspektrums des finalen Kondensationsenzym der Biosynthese. Das Substratspektrum wurde ebenfalls durch biokatalytische und enzymkinetische Umsetzungen bestätigt und konnte eine Insuffizienz des Substratimports negieren. Die Semisynthese erlaubte den Zugang zu zwei weiteren Derivaten.

Zusätzlich zu Prodigiosin wurde die Bioaktivität von vier Derivaten aus präparativen Mutasynthesen evaluiert. Neben einer ausgeprägten antibakteriellen Wirkung gegenüber grampositiven Bakterien konnte die Inhibierung der Autophagie und die Apoptose bei Brustkrebszellen beobachtet werden. Letztere Aktivität war für ein Derivat stärker ausgeprägt als bei der Verwendung des bekannten synthetischen Derivates Obatoclax.

Der letzte Themenabschnitt dieser Arbeit beschäftigte sich mit der enzymatischen Zyklisierung von Alkylprodigininen. Für dieses Forschungsfeld wurde der Grundstein durch die Etablierung der Analytik und der heterologen Produktion der entsprechenden Zyklase und deren putativen Elektronentransportkette aus *Streptomyces coelicolor* A3(2) in *Escherichia coli* gelegt.

Abstract

Natural products are not only ubiquitously distributed in all living organisms, they also form to a large extent the foundation of medicinal ingredients. Considering the constantly growing world population and the demographic change, focus is most commonly placed on those natural products, which are active against age-associated diseases and bacterial epidemics, and furthermore ensure the nutrition of the world's population. Current strategies envisage the development of new natural products and their derivatives from a bioeconomical point of view as a prerequisite for their sustainable production. The key natural compounds of the present thesis are the prodiginines, which are derived from a group of naturally occurring pyrrole alkaloids. Besides their antibacterial properties, prodiginines exhibit several biological effects including antitumor, antifungal and antimalarial activities. The purpose of the present thesis consisted in the development of sustainable production strategies for derivatives of prodiginines and the evaluation of their biological activities.

Initially, the main focus was on the synthesis of biomimetic intermediates of the natural product prodigiosin. The combination of literature known synthetic methods could not only shorten the current total syntheses, but also created access to 19 pyrrole building blocks *via* the *Trofimov* reaction, which provided the basis for the production of natural product derivatives. A sustainable, biosynthetic production of prodigiosin was achieved by integration of the biosynthetic gene cluster of the opportunistic human pathogen *Serratia marcescens* into the genome of the GRAS classified strain *Pseudomonas putida* KT2440. By establishing a polyurethane foam based extraction system, the production titer could be increased and an economical and efficient provision of the natural compound and subsequent derivatives was achieved.

The production of derivatives was enabled by the generation of an intermediate deficient mutant and its application in mutasynthesis and semisynthetic approaches. The mutasynthesis allowed the access to 18 prodiginines and the determination of the substrate specificity of the final condensing enzyme of the biosynthesis. Furthermore, the substrate scope was also verified by the use of isolated enzyme in biocatalysis and enzyme kinetics and it was therefore possible to negate an insufficient substrate import. The semisynthesis allowed the access to two further derivatives.

In addition to prodigiosin, the bioactivity of four derivatives, generated in preparative scale mutasynthetic reactions, was evaluated. Beyond the distinct antibacterial effect against gram-positive bacteria, an inhibition of the autophagic flux and the apoptosis of breast cancer cells was observed. The latter activity was more pronounced for one of the derivatives than for the known synthetic compound derivative Obatoclax.

The last section of the present thesis focuses on the enzymatic cyclisation of alkylprodiginines. For this topic the analysis of the compounds and the heterologous production of the corresponding cyclase and their putative electron transport chain enzymes from *Streptomyces coelicolor* A3(2) was established in *Escherichia coli*.

1 Einleitung

1.1 Einführung in die Thematik

In dieser Einführung wird zunächst in drei unterschiedliche *gesellschaftliche Herausforderungen*¹ eingeleitet, bevor diese im zweiten Abschnitt des gegenwärtigen Kapitels zusammengeführt werden und einzelne Aspekte die Zielsetzung dieser Arbeit formulieren.²

Antibiotika – Alte und neue Hoffnung

Antibiotika sind Arzneistoffe mit antibakterieller Wirksamkeit und zählen zu den großen Durchbrüchen der medizinischen Forschung. In diesem Zusammenhang wird oftmals von der zufälligen Entdeckung des fungalen Penicillins durch *Alexander Fleming* im Jahre 1928 als Ursprung der Antibiotikaforschung gesprochen, welches ab Mitte der 50er Jahre industriell produziert wurde.^[7] Es sei jedoch erwähnt, dass bereits 1935 das von *Bayer* entwickelte vollsynthetische Antibiotikum Sulfonamid *Prontosil*[®] im großen Maßstab Vermarktung fand.^[8] Die einfache Zugänglichkeit des *Prontosils*[®] und die Adressierbarkeit unzähliger Derivate sowie die massenhafte, – nach heutigem Wissen – unverantwortliche Anwendung führte allerdings binnen weniger Jahre zu dem Phänomen der Antibiotikaresistenz einzelner Bakterienstämme. Die zeitaufwändige Entwicklung des Penicillins als Alternative und Konkurrenz zu den Sulfonamiden war allerdings der schlechten Verfügbarkeit geschuldet. Konträr zur chemischen Synthese isolierte *Fleming* sein Antibiotikum aus Pilzen. Diese Naturstoffextrakte konnten allerdings weder eine entsprechende Reinheit noch Stabilität vorweisen. Erst ab 1938 konnte durch die Arbeiten von *Walter Florey* und *Ernst Boris Chain*, welche später mit *Fleming* den Nobelpreis für ihre Forschungsbemühungen erhielten, die Analyse und Reinigung sowie die großtechnische Produktion des Antibiotikums durch Pilzkulturen vorangetrieben werden. Es gilt damit heute als erstes natürliches Antibiotikum der biotechnologischen Industrie. Es folgten in schneller Chronologie weitere Meilensteine der Antibiotikaforschung wie Streptomycin (1948), Penicillin V (1952), Tetracyclin (1953) und Vancomycin (1954).^[9] Rasch verbreitete sich die Hoffnung der vollständigen Eindämmung von Infektionskrankheiten durch diese neuen Naturstoffe. Doch analog zu den Sulfonamiden wurde diese Hoffnung allzu schnell durch auftretende Antibiotikaresistenzen genommen und die Zahl der Neuentwicklungen nahm seit den 70er Jahren deutlich ab.^[8, 10] Die Resistenzen und die hohen Kosten der Entwicklung von Pharmazeutika führten zu einer Stagnation der Einführung neuer Antibiotikaklassen;^[11] so war das 2003 zugelassene Daptomycin das erste Naturstoffderivat einer neuen Strukturklasse seit 41 Jahre.^[12] Das Auftreten von neuen, multiresistenten Krankenhausregern unterstreicht dabei die aktuelle Bedeutung der Antibiotikaforschung und verlangt nach neuen Derivaten

¹ Die *Europäische Kommission* hat für das Förderprogramm *Horizon 2020* mit einer Laufzeit von 2014 bis 2020 im „Schwerpunkt III“ insgesamt sieben Gesellschaftliche Herausforderungen benannt, welche die angesprochenen Themen beinhalten.

² Der Leser mag an dieser Stelle den fehlenden Tiefgang der nachfolgenden Themen verzeihen; die Themeblocke dienen lediglich zur Hinführung der gegenwärtigen Problemstellung.

und Stoffklassen. ^[13, 14] Neue Hoffnung für das Auffinden und die Produktion neuer Antibiotika aus natürlichen Organismen geben heute computergestützte Verfahren sowie Produktionsmethoden in der Biologie, Biotechnologie und Chemie.

Tumorthherapie – Moderne Ziele

Die höhere Lebenserwartung führt derzeit in Deutschland und anderen Ländern zu einem demografischen Wandel, dessen Entwicklung auch die medizinische Forschung stark beeinflusst. In einer alternden Gesellschaft steigt die Anzahl der altersbedingten Erkrankungen wie Diabetes, Alzheimer und auch der malignen Neoplasie (Krebs). Auch wenn Krebs eine historisch lang bekannte Erkrankung darstellt, so sind die Therapien erst der modernen Forschung zuzuschreiben. Neben der möglichen chirurgischen Entfernung eines Tumors legte die Entwicklung der Strahlentherapie zu Beginn des 20. Jahrhunderts den Grundstein für eine nichtinvasive Behandlung.^[15, 16] Beide Methoden sind heute noch als Standardverfahren zu nennen, wenngleich auch die Strahlentherapie durch die Verbesserung der lokalen Präzision an Bedeutung gewonnen hat. Erste systematische Untersuchungen des Einflusses von Chemikalien auf das Verhalten von Tumorzellen führte *Paul Ehrlich* ebenfalls zu Beginn des 20. Jahrhunderts durch – allerdings ohne bedeutenden Erfolg.^[16] Die Forschung nach dem Zweiten Weltkrieg brachte schließlich die noch heute verwendeten Meilensteine wie Methotrexat (1950), Cisplatin (1965) und Paclitaxel (1993) hervor, welche unselektive Zytostatika (Arzneistoffe, welche das Zellwachstum/Zellteilung hemmen) mit teilweise starken Nebenwirkungen darstellen.^[15, 17]

Die Entwicklung moderner Chemotherapeutika verfolgt das Ziel einer Tumor-selektiven Freisetzung des Arzneistoffes. Da Tumorzellen körpereigene Zellen sind, liegt die Schwierigkeit in der Unterscheidung der gesunden und malignen Zellen. Hierfür sind allerdings detaillierte Kenntnisse in der Biochemie der Tumorzellen obligat. Strategien moderne Chemotherapeutika sind unter anderem Wirkstoff-Antikörper Konjugate, welche Tumor-assoziierte Antigene erkennen, oder komplexe Moleküle, welche über Erkennungsdomänen lediglich von Tumorzellen aufgenommen werden und der Arzneistoff intrazellulär durch Enzyme freigesetzt wird.^[15] Ein weiterer Mechanismus ist die tumorselektive Modulation von Signalkaskaden, welche zur Apoptose (Zelltod) führen. Beispielhaft ist hier im späten Tumorwachstum die Inhibition der Autophagie (Recyclingmechanismus der Zelle), für deren Aufklärung *Yoshinori Ohsumi* 2016 den Medizin-Nobelpreis verliehen wurde. Die Inhibition der Autophagie führt zu einer Unterversorgung der Zellen und anschließend zur Apoptose.^[18]

Bioökonomie – Was ist das eigentlich?

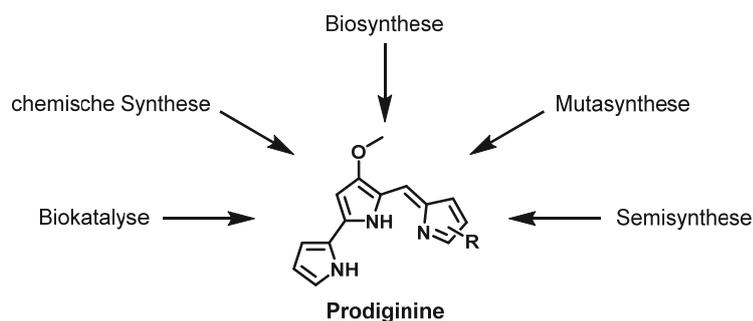
Zunächst sei gesagt, dass es für den Begriff „Bioökonomie“ keine einheitliche Definition gibt. Grundsätzlich wird darunter der Abkehr von der petro-basierten Industrie hin zu einer auf nachwachsende Rohstoffe basierten, nachhaltigen Wirtschaft verstanden.^[19] Die Konzepte der *Europäischen Union*, der *Bundesrepublik Deutschland* und des Bundeslandes *Nordrhein-Westfalen* sehen inhaltlich folgende zentrale Handlungsfelder für die Forschungsstrategie Bioökonomie (auch

„*wissensbasierte Bioökonomie*“ genannt) vor: 1) Sicherung der weltweiten Ernährung trotz Wachstums der Weltbevölkerung; 2) Produktion von gesunden und sicheren Lebensmitteln; 3) Nachhaltige Agrarproduktion; 4) Industrielle Nutzbarkeit von nachwachsenden Rohstoffen; 5) Biomasse zur Erzeugung von Energie.^[19-22] Grundelemente einer solchen Wirtschaft bilden Rohstoffkreisläufe und Kaskadenmodelle, sodass produzierte Biomasse möglichst effizient und nachhaltig genutzt werden kann. Beispiele für die Nutzbarkeit von nachwachsenden Rohstoffen bilden beispielsweise Polymere aus pflanzlichen statt fossilen Grundbausteinen oder die Erzeugung von Kraftstoffen aus Algen. Insbesondere sei hier auch die pharmazeutische Industrie genannt, welche durch den kombinierten Einsatz von Chemie und Biotechnologie die Produktion von biopharmazeutischen Wirkstoffen nachhaltig produzieren kann.^[22]

1.2 Zielsetzung

Die angeführte Entwicklung dringend benötigter, neuartiger Antibiotika und die Adressierung komplexer Ziele in der Tumorthherapie verlangen neben umfangreicher wissenschaftlicher Erkenntnis auch die Produktion von innovativen Arzneistoffen. Dies impliziert jedoch nicht, dass diese Wirkstoffe vollständig neu erfundene Leitstrukturen darstellen, vielmehr können diese auch auf bekannten Naturstoffen aufbauen, welche bereits aus Bakterien oder Pilzen isoliert und deren pharmakologische Eigenschaften bereits untersucht worden sind.^[23-27]

Das Ziel der vorliegenden Arbeit besteht in der Bereitstellung von pharmakologisch aktiven Prodiginine aus der Naturstoffklasse der Pyrrolalkaloide. Diese Wirkstoffe zeigen dabei sowohl antibakterielle als auch antitumorale Eigenschaften und stehen daher seit vielen Jahren im Interesse der Forschung. Im Fokus dieser Arbeit soll die Adressierung dieser Verbindungen durch die Nutzung und Entwicklung diverser Produktionswege stehen, welche sich hierfür aus den angrenzenden Feldern der synthetischen Biologie, der Biotechnologie sowie der organischen Synthesechemie bedienen (Schema 1).



Schema 1: Strategien für die Darstellung von Prodigininen.

Neben der Etablierung der (biomimetischen) Totalsynthese von Prodigininen soll ein Schwerpunkt der Arbeit die heterologe Biosynthese des natürlichen Prodigiosins in einem geeigneten Laborsicherheitsstamm der Risikogruppe 1 darstellen. Dieses Projekt erfolgte in Kooperation mit

Dr. *Andreas Domröse* aus dem Institut für Molekulare Enzymtechnologie (IMET) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf über das in ebendiesem Institut entwickelte *Transfer and Expression System* (TRES-System). Durch den Transfer des Biosyntheseclusters für Prodigiosin aus dem putativen Humanpathogen *Serratia marcescens* in einen unbedenklichen Laborsicherheitsstamm und der Biosynthese des Wirkstoffs soll die Möglichkeit einer sicheren und nachhaltigen Produktion unterstrichen werden. In diesem Zusammenhang wird eine effektive Extraktion des Naturstoffs aus dem Fermentationsmedium eine zu klärende Fragestellung sein.

Für eine ausstehende Untersuchung der Struktur-Wirkungs-Beziehung der Prodiginine gegenüber Bakterien und humanen Krebszellen werden jedoch zahlreiche Derivate des Prodiginins benötigt. Da hierbei eine klassische Totalsynthese eine vollständig petro-basierte Produktion darstellen würde und in die Biosynthese lediglich auf die Herstellung von Prodigiosin begrenzt ist, sollen die Konzepte der Muta- und Semisynthese erprobt werden. Die gezielte Unterbrechung der Biosynthese und die Supplementierung von synthetischen Analoga der Biosyntheseintermediate führen in der Mutasynthese schnell zu einer Vielzahl von Naturstoffderivaten. Da die Inkorporation allerdings von der Chemo Selektivität der beteiligten Enzyme abhängig ist, soll die Aufklärung des Substratspektrums des entsprechenden Enzyms einen weiteren Schwerpunkt der Arbeit bilden. In der Semisynthese wird hingegen die Produktion von Derivaten durch chemische Transformation von extrahierten Biosyntheseintermediaten oder Naturstoffen ermöglicht. Über den entstehenden Synergieeffekt solcher interdisziplinärer Anwendungen könnten die Nachteile der konventionellen chemischen Synthese und der Biosynthese aufgehoben werden und wiederum Naturstoffderivate anteilig nachhaltig produziert werden.

Abschließend soll eine mögliche Derivatisierung von Prodigininen durch eine oxidative Zyklisierung mittels eines oxygenaseähnlichen Enzyms aus dem *Actinomyceten Streptomyces coelicolor* A3(2) evaluiert werden. In diesem Projektabschnitt wird zunächst die heterologe Expression und der Aufbau einer putativen Elektronentransportkette im Vordergrund stehen.

2 Kenntnisstand

2.1 Sekundärmetabolite – Naturstoffe des Lebens

Alle lebenden Organismen produzieren organische Verbindungen, die weithin als Naturstoffe bezeichnet werden.^[28, 29] Es sind ebendiese Moleküle, ihre Biosynthesen, ihre Strukturen und die Funktion sowie Wirkung in lebenden Organismen, welche weite Felder in der organischen Chemie und die angrenzenden Bereiche der Biowissenschaften einnehmen. Die Faszination ihrer facettenreichen Molekülstrukturen und biologischen Aktivitäten bildet heute nicht nur die Grundlage für viele Methoden der Synthesechemie, auch die Entwicklung diverser Pharmazeutika findet hier ihren Ursprung.

Einige dieser Naturstoffe sind ubiquitär in allen lebenden Zellen vertreten und bilden die zentralen essenziellen Elemente im Metabolismus – die Primärmetabolite. Zu ihnen zählen u.a. die Nukleinsäuren, die Aminosäuren und die Zucker und ihre Polymere, welche die strukturelle Grundlage der Zellen ermöglichen.^[28] Den größeren Anteil der Naturstoffe bilden jedoch die Sekundärmetabolite, welche spezifisch von Organismen produziert werden und häufig nicht der intrazellulären biologischen Aktivität, sondern der Interaktion mit anderen Lebewesen dienen.^[29] Die strukturellen Charakteristika der Sekundärmetabolite gehen oftmals aus der Biosynthese hervor, weshalb diese gemäß ihrer Struktur in folgende Klassen eingeteilt werden: Polyketide und Fettsäuren, Terpene und Steroide, Phenylpropanoide, Alkaloide, spezielle Aminosäuren und (nichtribosomale) Peptide sowie spezielle (polymere) Zucker. Eine solche strukturelle Bandbreite eröffnet den möglichen Einsatz dieser Verbindungen in diversen Bereichen wie der Landwirtschaft (z.B. Pflanzenschutz), der Lebensmittelproduktion und der Medizin. Es wird angenommen, dass 49 % aller heutigen Medikamente ihren strukturellen Ursprung in den Sekundärmetaboliten finden.^[27] Tabelle 1 zeigt eine Übersicht der einzelnen Klassen und bekannte ausgewählte Vertreter dieser.

Tabelle 1: Klassen der Sekundärmetabolite und bekannte Vertreter.

Klasse der Sekundärmetabolite	Bekannte Vertreter
Polyketide und Fettsäuren	Erythromycin; Aflatoxine; Tetracycline; Flavonoide; Prostaglandine; Myristin-, Palmitin-, Stearin-, Oleinsäure
Terpene und Steroide	Citral; Menthol; Carvone; Carotinoide; Cannabinoide; Artemisinin; Cholesterin; Estradiol; Cortison
Phenylpropanoide	Anethole; Estragol; Zimtaldehyd/Zimtsäure; Safrol; Coniferylalkohole
Alkaloide	Mutterkorn-Alkaloide (Clavine, Lysergsäuren, Lysergsäureamide); Chinolin-Alkaloide (Chinin, Cinchonidin, Strychnin); Tropan-Alkaloide (Atropin, Cocain); Capsaicin; Coffein; Morphin
spezielle Aminosäuren und (nichtribosomale) Peptide	β -Lactam-Antibiotika (Penicilline, Cephalosporine); Vancomycin; Actinomycin; Cyclosporin; Epothilone; Nisin
spezielle (polymere) Zucker	Kanamycin, Salicin; Naringin; Digitonin; Anthocyane

2.2 Prodiginine und ihre farbenfrohe Geschichte

Eine Reflexion des vorherigen Abschnittes lässt erahnen, dass Sekundärmetabolite seit Jahrtausenden eng mit der Entwicklung der Medizin – wenn auch teilweise unbewusst und vom Zufall getrieben – verbunden sind und eine enorme wirtschaftliche Bedeutung in der pharmazeutischen Industrie erlangten. Überdies weisen viele Sekundärmetabolite die Phänomenologie der Farbigkeit auf, die ubiquitär in allen Bereichen des Lebens vertreten ist.^[30-33] Eine besondere historische Stellung nehmen hier allerdings die Pyrrolalkaloide aus der Klasse der Prodiginine ein. Kaum eine andere Klasse von Sekundärmetabolite kann mit ähnlich vielen geschichtlichen Ereignissen in Verbindung gebracht werden, wie die tiefroten, blutähnlichen Pigmente aus bestimmten *Actinomyceten* und *Proteobacteria* (*vide infra* Tabelle 2).

Heute ist es bekannt, dass die meisten überlieferten Blutwunder („blutiges“ Brot) auf die Kontamination von Prodiginin-produzierenden Bakterien zurückzuführen sind. Eine der frühesten Überlieferungen stammt aus der Zeit *Alexander des Großen*, als seine Armee 322 v. Chr. die Stadt *Tyros* belagerte und das im Inneren „blutige“ Brot als Vorzeichen und Legitimation für die siegreiche Einnahme der Stadt auffasste.^[34] Während der Zeit des Mittelalters galten im christlichen Verbreitungsgebiet „blutende“ Hostien oftmals als Anhaltspunkt für Lehre der Eucharistie, welcher die Verwandlung des Brotes in den Leib Christi zugrunde liegt.^[35] Das berühmteste dieser Blutwunder ereignete sich 1263 n. Chr. in der kleinen Kirche der heiligen *Christina von Bolsena* im heutigen Italien.^[35, 36] Als ein an die katholischen Doktrinen zweifelnder Priester die Messe feierte, brach er zur Kommunion das Brot und erblickte Blut auf der heiligen Hostie. Dieses Ereignis wurde von Papst *Urban IV* untersucht, wenig später als Wunder bestätigt (bekannt als „Wunder von Bolsena“) und nach einem Jahr das Fronleichnamfest als Gedenken an diesen Tag durch eine päpstliche Bulle etabliert. Zudem führte dieses Ereignis auch zum Neubau einer Kathedrale in *Orvieto*, welche für die Aufbewahrung der an dem Wunder beteiligten Reliquien dient. Inspiriert von dieser Geschichte verewigte der Künstler *Raffael* das Blutwunder anschließend im berühmten Fresko „Die Messe von Bolsena“ im Vatikan.

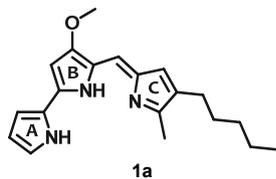
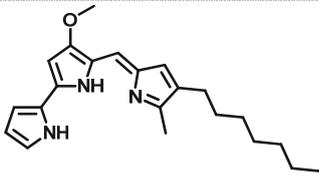
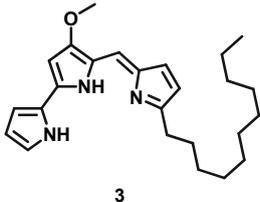
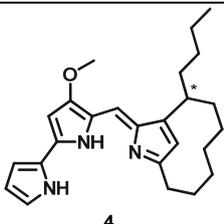
Erst mehr als 500 Jahre später sollte die Ursache der Blutwunder in der italienischen Stadt *Padua* 1819 durch den Pharmazeuten *Bartolomeo Bizio* aufgeklärt werden.^[36] Dieser wurde mit der Untersuchung der spontanen Rotfärbung von Lebensmitteln beauftragt und konnte eine Verbreitung durch einen Mikroorganismus als Grund für dieses übernatürliche Wunder benennen. Durch systematische Experimente versuchte *Bizio* den Einfluss von Feuchtigkeit, Chemikalien und Kontakt zwischen Medien auf die Verbreitung des Organismus zu erforschen und benannte ihn „*Serratia marcescens*“ (nach dem italienischen Wissenschaftler *Serafino Serrati* und nach *marcescere*: lat. = verrotten, verfaulen). Auch wenn *Bizio* den Mikroorganismus irrtümlich als Pilz identifizierte, gilt diese Untersuchung als bemerkenswertes Ereignis der Mikrobiologie noch vor der Geburt von *Pasteur*. Eine spätere Umbenennung des Stamms zu *Micrococcus prodigiosus* und *Bacillus prodigiosus* (von *prodigiosus*: lat. = wundersam) blieb erfolglos, jedoch ist hieraus die Bezeichnung der Prodiginine erhalten geblieben.^[37, 38]

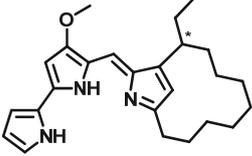
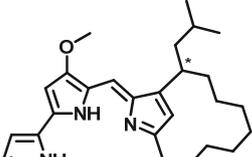
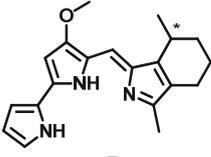
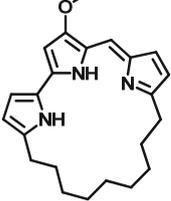
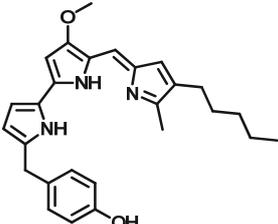
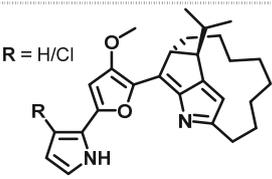
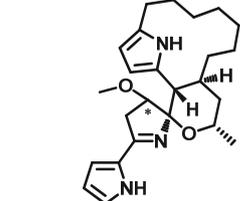
2.3 Struktur und biologische Aktivität von Prodiginen

2.3.1 Struktur

Prodiginine sind eine Klasse von hydrophoben Pyrrolalkaloiden, die strukturell eine sehr nahe Verwandtschaft untereinander besitzen. Der Grundbaustein aller Prodigine ist ein Tripyrrolsystem (siehe Tabelle 2, A-, B-, C-Ring) mit einem Pyrrolylpyrromethen-Chromophor als konstante Einheit (B+C-Ring, Azafulven).^[39-41] Die Sammelbezeichnung „Prodiginine“ für die Verbindungen dieser Klasse sollte der historische Bezeichnung „Prodigosine“ vorgezogen werden, da Prodigiosin (**1a**) nur den ersten charakterisierten Vertreter dieser Sekundärmetabolite bezeichnet und systematische Namen zu komplex werden.^[42]

Tabelle 2: Übersicht verschiedener natürlicher Prodigine, ihrer Produzenten und Anmerkungen zur Biosynthese und/oder der biologischen Aktivität. Wenn nicht anders angegeben, sind die Informationen den Übersichtsartikeln von *Williamson et al.* und *Hu et al.* entnommen.^[40, 41]

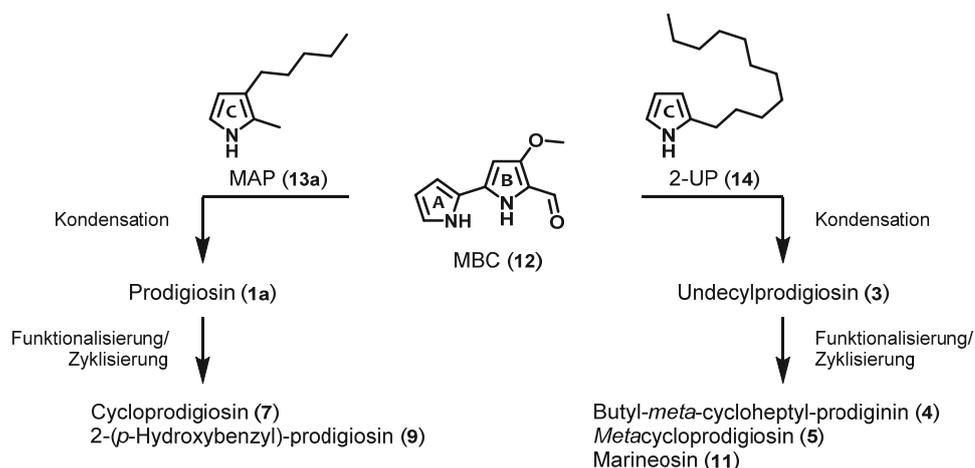
Struktur	Name/Produzenten	Anmerkungen
 <p>1a</p>	Prodigosin <i>Serratia marcescens</i> ^[43] <i>Serratia plymuthica</i> <i>Hahella chejuensis</i> ^[44, 45] <i>Pseudomonas magnesorubra</i> <i>Vibrio ruber</i> sp. nov. <i>Vibrio psychroerythreus</i>	Zytotoxisch gegenüber diversen Krebszelllinien; antimikrobielle-, antifungale-, immunsuppressive-, algicide-, anti-Malaria Aktivitäten; Symporter für H ⁺ /Cl ⁻ ^[40, 41, 44-46]
 <p>2</p>	Heptylprodigosin <i>Pseudovibrio denitrificans</i> Z143-1 ^[47]	Anti-Malaria- und antimikrobielle Aktivitäten ^[48, 49]
 <p>3</p>	Undecylprodigosin <i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2) ^[50] <i>Streptomyces longisporus ruber</i> ^[51] <i>Streptoverticillium rubrireticuli</i> <i>Actinomadura madurae</i> <i>Saccharopolyspora</i> sp. nov. <i>Streptomyces griseus</i> <i>Streptomyces lividans</i>	Zytotoxisch gegenüber diversen Krebszelllinien; antimikrobielle-, immunsuppressive Aktivitäten, Symporter für H ⁺ /Cl ⁻ ^[52-56]
 <p>4</p>	Butyl-meta-cycloheptylprodigosin (Streptorubin B) <i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2) ^[57, 58] <i>Saccharopolyspora</i> sp. nov. <i>Streptomyces rubrireticuli</i>	Zyklisierung von Undecylprodigosin (3); zytotoxisch gegenüber diversen Krebszelllinien, immunsuppressive Aktivitäten ^[59, 60]

 <p>5</p>	<p>Metacycloprodigiosin (Streptorubin A) <i>Streptomyces longisporus ruber</i>^[51, 61] <i>Saccharopolyspora</i> sp. nov. <i>Actinomadura madurae</i></p>	<p>Zyklisierung von Undecylprodigiosin (3); zytotoxisch gegenüber diversen Krebszelllinien, immunsuppressive- und anti-Malaria Aktivitäten; Symporter für H⁺/Cl⁻[56, 59, 60, 62, 63]</p>
 <p>6</p>	<p>Prodigiosin R1 <i>Streptomyces griseoviridis</i> 2464-S5^[64]</p>	<p>Strukturelle Ähnlichkeit zu Roseophilin (10), wird teilweise über identischen Gencluster hergestellt^[65]</p>
 <p>7</p>	<p>Cycloprodigiosin <i>Vibrio gazogenes</i> <i>Alteromonas rubra</i> (Pseudoalteromonas rubra)^[66] <i>Pseudoalteromonas denitrificans</i>^[67]</p>	<p>Zyklisierung von Prodigiosin (1a); zytotoxisch gegenüber diversen Krebszelllinien; immunsuppressive Aktivitäten; Symporter für H⁺/Cl⁻[67, 68]</p>
 <p>8</p>	<p>Cyclononylprodigiosin <i>Actinomadura pelletieri</i> <i>Actinomadura madurae</i>^[69]</p>	<p>Zyklisierung von Nonylprodigiosin; zytotoxisch gegenüber diversen Krebszelllinien^[70]</p>
 <p>9</p>	<p>2-(p-Hydroxybenzyl)-prodigiosin <i>Pseudoalteromonas rubra</i>^[71]</p>	<p>Derivatisierung von Prodigiosin (1a); zytotoxisch gegenüber Adenokarzinom Zellen^[71]</p>
 <p>10</p>	<p>Roseophilin/Dechlororoseophilin <i>Streptomyces griseoviridis</i> 2464-S5^[64, 65]</p>	<p>Zytotoxisch gegenüber diversen Krebszelllinien (Leukämie- und Hautkrebszelllinien); schädigt (anders als viele Prodiginine) die DNA nicht unter oxidativen Bedingungen, Halogenase in Biosynthese enthalten^[39, 72, 73]</p>
 <p>11</p>	<p>Marineosin A und B <i>Streptomyces</i> sp. CNQ-617^[74]</p>	<p>Spiroaminale; zytotoxisch gegenüber Darmkrebszelllinien; antifungale Aktivität^[74]</p>

Prodiginine werden von einer Vielzahl von gramnegativen und grampositiven Bakterien hergestellt, welche aus dem Erdreich, dem Wasser oder marinen Habitaten isoliert werden konnten. Darunter

befinden sich *Proteobacteria* der Gattungen und Familien *Serratia*, *Pseudoalteromonas*, *Hahella* und *Vibrio* und zahlreiche *Actinomyceten* der Familie der *Streptomycetaceae* und der *Thermomonosporaceae*.^[40, 41] Konträr zu der großen Anzahl natürlicher Produzenten wurde bisher nur eine geringe chemische Diversität bei den gegenwärtig entdeckten Prodigininen vorgefunden. Die meisten Derivate unterscheiden sich lediglich im C-Ring und werden in zwei Hauptklassen eingeteilt: Prodiginine mit *n*-Alkyl Substituenten (z.B. Prodigiosin (**1a**), Heptylprodigiosin (**2**) und Undecylprodigiosin (**3**) oder zyklischen Substituenten [z.B. Butyl-*meta*-cycloheptylprodigiosin (**4**), *Metacycloprodigiosin* (**5**), Prodigiosin R1 (**6**) und Cycloprodigiosin (**7**)].^[40] Nachfolgend werden Prodiginine beschrieben, welche nicht unmittelbar den beiden Hauptklassen zugeteilt werden können. Cyclononylprodigiosin (**8**) weicht von den zyklischen Verbindungen ab, da es als einzige Verbindung eine Verknüpfung zwischen dem C- und dem A-Ring aufweist. 2-(*p*-Hydroxybenzyl)-prodigiosin (**9**) ist ein Derivat von Prodigiosin (**1a**).^[41, 71] Darüber hinaus gibt es auch komplexere zyklische Prodiginine mit verzweigten Alkyl Substituenten, Austausch von Pyrrol zum Furan, Halogenierungen und Spirozentren (Roseophilin/Dechlororoseophilin (**10**) und Marineosin A und B (**11**)).^[39, 64, 65, 73]

Die strukturelle Ähnlichkeit aller Prodiginine ist durch die modulare Biosynthese (2.4) bedingt. Ausgehend von dem gemeinsamen Bipyrrrol-Präkursor 4-Methoxy-2,2'-bipyrrrol-5-carbaldehyd (**12**, MBC, A+B-Ring) aller natürlichen Prodiginine wird eine Vielzahl der oben genannten Verbindungen durch die Kondensation (2.4.4) mit 2-Methyl-3-*n*-amyl-pyrrol (**13a**, MAP, C-Ring) oder mit 2-Undecylpyrrol (**14**, 2-UP, C-Ring) biosynthetisch hergestellt (Schema 2). Zyklische Derivate werden anschließend aus den resultierenden *n*-Alkyl substituierten Prodiginine Prodigiosin (**1a**) und Undecylprodigiosin (**3**) durch oxidative Zyklisierung (2.4.4) mit *Rieske*-Nicht-Häm-Eisen-Oxygenasen³ generiert. Durch zusätzliche Funktionalisierung werden auch komplexere Prodiginine erhalten.^[41]



Schema 2: Vereinfachte Darstellung der modularen Biosynthese von Prodigininen.

³ Die Verwendung des Begriffes „Oxygenase“ ist in Bezug auf die zyklisierenden Enzyme definitionsgemäß inkorrekt, da keine Übertragung von Sauerstoff in das Zielmolekül stattfindet. Vielmehr müsste hier von Oxidasen gesprochen werden. Dennoch werden die Zyklasten dieser Arbeit der Literatur entsprechend als Oxygenasen bezeichnet.

2.3.2 Biologische Aktivität

Prodiginine haben eine Vielzahl von biologischen Aktivitäten und sind pharmakologisch in diversen Gebieten von hohem Interesse. Bisher wurden Aktivitäten gegen gramnegative und grampositive Bakterien, Pilzen, Algen und dem Erreger der Malaria *Plasmodium falciparum* beschrieben.^[48, 75-83] Zudem induzieren unterschiedliche Prodiginine bei über 60 Krebszelllinien den programmierten Zelltod (Apoptose) und zeigen hohe Wirkung als Immunsuppressiva.^[39, 56, 84, 85] Die hohe Zytotoxizität, die bereits bei den humanen Krebszelllinien gezeigt wurde, reduziert jedoch bisher die Anwendung in der Therapie; sie veranlasst jedoch die Forschung zur Optimierung der bestehenden Verbindungen.

Zytotoxizität und antibiotische Wirkung

Mehrere Mechanismen sind für die Zytotoxizität und die antibiotische Wirkung bereits aufgeklärt worden. Für den Transport in die jeweilige Zelle werden keine besonderen Transportsysteme benötigt, da die Prodiginine durch ihre Hydrophobizität eine sehr leichte Membranpermeabilität besitzen und somit intrazelluläre Effekte hervorrufen können.

Es konnte gezeigt werden, dass die starke Toxizität in direkten Zusammenhang mit der Prodiginin-moderierten Schädigung der DNA steht und zu Zellzyklus-Arrest, DNA Reparatur und der Initiation der Apoptose führt. Die natürlichen Prodiginine können mit der DNA an der kleinen Furche an AT-Regionen interkalieren und in Gegenwart von Cu(II)-Ionen einen oxidativen Einzel- oder Doppelstrangbruch induzieren.^[72, 86-88] Für diesen Mechanismus wird das Kupferion durch alle drei Stickstoffe koordiniert (Abbildung 1A) und durch die Oxidation des Pyrrolylpyrromethen-Chromophors (B+C-Ring) wird eine Kaskade ausgelöst, die zum DNA Strangbruch führt. Für einen Einzelstrangbruch ist der MBC (12)-Teil (A+B-Ring) der Prodiginine ausreichend, jedoch ist für den Doppelstrangbruch das Pyrrolylpyrromethen-Chromophor essentiell.^[89-93] Jede Substitution des A-Ringes durch einen anderen (Hetero)-Aromaten und die Entfernung der Methoxygruppe im B-Ring reduziert die Aktivität der Strangbrüche und resultiert in einer Verminderung der Zytotoxizität gegenüber Krebszelllinien.^[89]

Ein weiteres Hauptmerkmal der Prodiginine ist die Komplexierung von Anionen in ihrer protonierten Form. Insbesondere wurde die Funktion als H⁺/Cl⁻-Symporter (Abbildung 1B) und der damit verbundenen Einflussnahme auf den Protonengradient und den pH-Wert von Zellen bzw. einzelnen Zellorganellen untersucht.^[87, 88, 94-98] Dabei können Prodiginine nicht nur in die Plasmamembran eingebaut werden und den pH-Wert der Zelle ändern, sondern interagieren auch mit der äußeren Membran von Mitochondrien, entkoppeln die F₀F₁-ATPase und induzieren dadurch die Apoptose.

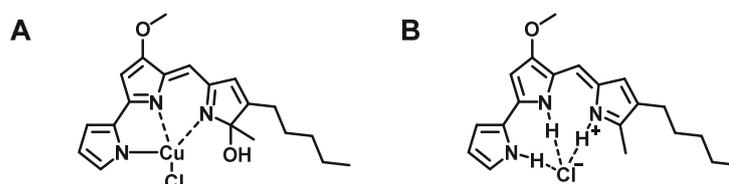


Abbildung 1 Prodigosin (1a)-Komplexe mit Kationen und Anionen. **A**) Cu(II)-Ionen werden von Prodigosin komplexiert und bilden die DNA-schädigende Spezies. Der C-Ring ist in dieser Spezies oxidiert. **B**) Durch die Protonierung kann Prodigosin (1a) als H⁺/Cl⁻-Symporter fungieren und nimmt Einfluss auf den Protonengradient von Zellen.

Einfluss auf die Autophagie

Des Weiteren ist die Einflussnahme von Prodigininen auf die Autophagie (Autophagozytose; von *autóphagos*: gr. = sich selbst verzehrend; und *kýtos*: gr. = Raum) ein weit untersuchtes Themengebiet. Autophagie ist ein zellulärer Recyclingmechanismus, welcher zum Abbau von toxischen Komponenten, aggregierten Proteinen oder beschädigten Zellorganellen dient und während Hungerzeiten diese Abbauprodukte zur Wiederverwertung bereitstellt.^[18, 99, 100] Eine Inhibierung führt daher in stark proliferierenden Krebszellen zu einer Reduzierung der Bereitstellung von Grundbausteinen und der Energie und resultiert daher im Zelltod. Während der Autophagie werden die zum Abbau markierten Komponenten von Autophagosomen umschlossen, welche im letzten Schritt mit den intrazellulär sauren Lysosomen fusionieren und die Komponenten durch Hydrolasen abgebaut werden (Abbildung 2A). Durch den H⁺/Cl⁻-Symport und der Entkopplung der ATPase der Vakuolen (V-ATPase) induzieren die Prodiginine eine Alkalisierung der Lysosomen und blockieren dadurch den letzten Schritt der Autophagie.^[101-103]

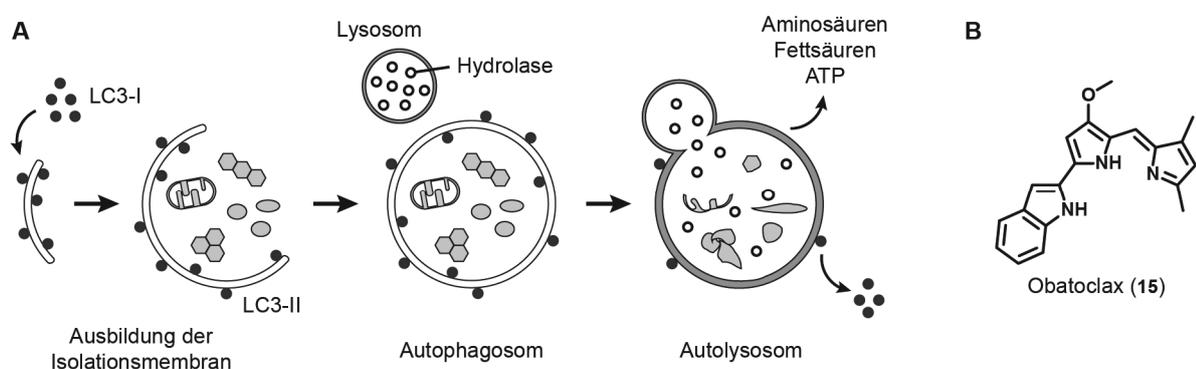


Abbildung 2: Mechanismus der Autophagie. **A)** Die zum Abbau markierten Komponenten werden zunächst in Autophagosomen eingeschlossen und nach der Fusion dieser Autophagosomen mit den sauren Lysosomen durch Hydrolasen abgebaut. Das lösliche, im Cytosol menschlicher Zellen ubiquitär vorhandene Protein LC3-I (1A/1B-*light chain 3*) wird bei der Bildung der Autophagosomen an Phosphatidylethanolamin der Membran konjugiert (LC3-II) und dient daher als Marker für Autophagosomen. In den Autolysosomen wird LC3-II neben den anderen markierten Komponenten ebenfalls abgebaut. **B)** Struktur des synthetischen Prodiginins Obatoclastax (**15**, GX15-070).

Neben den natürlichen Prodigininen zeigt auch das synthetische Derivat Obatoclastax (**15**, GX15-070) eine Inhibition der Autophagie in Krebszellen. Obatoclastax (**15**) wurde von der Firma *GeminX Pharmaceuticals* in einer Struktur-Wirkungs-Beziehung (SAR; engl. = *structure-activity-relationship*) entwickelt und ist in mehreren Studien der klinischen Phase II untersucht worden.^[104-108] In der molekularen Struktur wurde gegenüber Prodigiosin (**1a**) der Pyrrol-A-Ring durch Indol ersetzt und das Alkylierungsmuster am C-Ring verändert (Abbildung 2B). Zusätzlich zum Einfluss auf die Autophagie ist Obatoclastax (**15**) ein Inhibitor von bestimmten antiapoptotischen Proteinen der Bcl-2 (engl. *B-cell lymphoma 2*) Familie und induziert daher ebenfalls den Zelltod durch Apoptose.^[18]

Immunsuppression

Prodiginine besitzen ein hohes Potential bereits im einstelligen nanomolaren Bereich (unterhalb ihrer zytotoxischen Konzentration) als Immunsuppressiva eingesetzt zu werden.^[39, 109] Der Mechanismus beruht auf einer Inhibierung der T-Zellen Proliferation und der Antikörperbildung, sodass eine Immunantwort ausbleibt. Dabei scheinen die Prodiginine ein Inhibitor für die Janus-Tyrosin-Kinase 3 (JAK-3) zu sein, welche den T-Zellen-Wachstumsfaktor Interleukin-2 (IL-2) binden, und somit die Aktivierung von Genen der Immunabwehr unterbinden, ohne dass die Lymphorgane geschädigt werden.^[110] Insbesondere unterscheidet sich dieser Wirkungsmechanismus von den derzeit verbreiteten klinischen Pharmazeutika Cyclosporin und FK 506 und es konnten überdies Synergieeffekte auf die Immunsuppression bei simultaner Verabreichung festgestellt werden.^[39] Ein Beispiel aus Versuchen mit herztransplantierten Ratten ist das synthetische Prodiginin Derivat PNU-156804 (**16**, Abbildung 3), welches eine Benzylgruppe anstelle der Methylgruppe der Methoxygruppe aufweist und eine Verdreifachung der Wirkung gegenüber des natürlichen Undecylprodigosins (**3**) zeigt.^[39, 55, 111, 112]

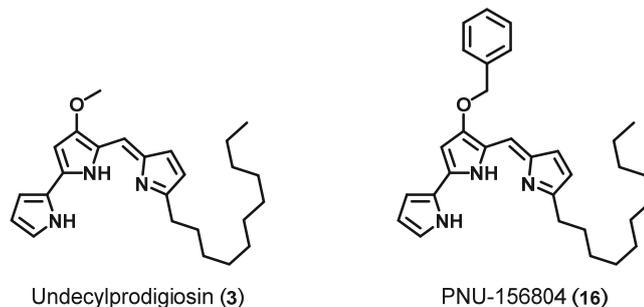


Abbildung 3: Struktur von Undecylprodigosin (**3**) und des Derivats PNU-156804 (**16**).

Anti-Malaria

Ebenfalls zeigen Prodiginine eine Aktivität gegen *Plasmodium falciparum*, dem Krankheitserreger der *Malaria tropica*. Da *P. falciparum* als Ursache für fast alle Malaria-Todesfälle herangezogen werden kann und sich zudem Resistenzen gegenüber den gängigen Therapeutika wie Chloroquin, Quinolin Analoga und Artemisinin entwickelt haben, sind viele SAR-Studien mit Prodiginin Derivaten durchgeführt worden.^[76, 78, 113, 114] Ein Wirkmechanismus ist bisher nicht bekannt, jedoch zeigt sich, dass bei den natürlichen Prodigininen die zyklischen Naturstoffe eine höhere Wirkung als ihre *n*-Alkyl-Vorstufen besitzen.^[42, 77] Darüber hinaus lässt der nicht-alkylierte A-Ring keine Variabilität ohne deutliche Abnahme der Wirkung zu, wohingegen Modifizierungen der Alkylierungsmuster am C-Ring oder Einbringung anderer hydrophober Gruppen eine Verbesserung der Wirkung hervorrufen.^[78] Es ist zu erwähnen, dass die wirksame Dosis vieler Prodiginine, wie z. B. von *Metacycloprodigosin* (**5**), deutlich unter ihrer zytotoxischen Konzentration liegt [*Metacycloprodigosin* (**5**) gegen *P. falciparum* K1: IC₅₀ = 5 ± 1 ng/ml].^[39, 77]

2.4 Aufklärung der Struktur und Biosynthese von Prodigininen

Aufklärung der Struktur

Auch wenn für die Prodiginine auf eine jahrhundertalte Historie zurückgeblickt werden kann, so wurde die Grundstruktur erst zwischen den 20er bis 60er Jahren des 19. Jahrhunderts anhand von Prodigiosin (**1a**) aufgeklärt. 1929 wurde Prodigiosin (**1a**) zum ersten Mal in Reinform von *Wrede* und *Hettchen* isoliert und anhand von chemischen Umsetzungen und Abbauprodukten [darunter auch der Präkursor MAP (**13a**)] 1933 drei mögliche Strukturen postuliert (Abbildung 4).^[37, 38, 115] Dabei sei erwähnt, dass Vorschlag I der korrekten Struktur entspricht, jedoch Vorschlag II und III zu damaliger Zeit favorisiert wurden.

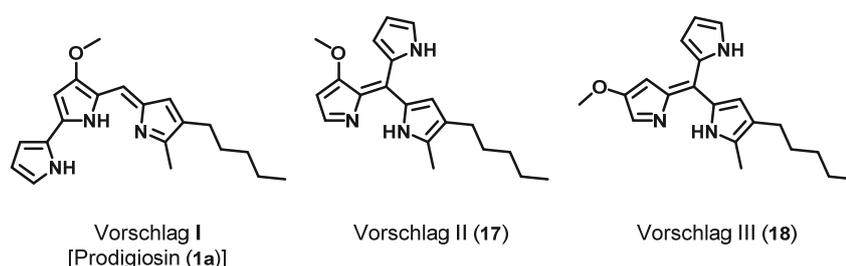


Abbildung 4: Postulierte Strukturen für Prodigiosin (**1a**) nach *Wrede* und *Rothhaas* (1933).^[37, 38]

Erst 1956 konnten durch *Santer* und *Vogel* die Vorschläge II (**17**) und III (**18**) falsifiziert werden, da sie aus einer *Serratia marcescens* Mutante, welche in der Biosynthese blockiert war, den Präkursor MBC (**12**) isolieren konnte.^[116] Auch wenn die endgültige Struktur von MBC (**12**) noch nicht bekannt war, so wurde dieses durch eine weitere *S. marcescens* Mutante zweifelsfrei zu Prodigiosin (**1a**) umgesetzt und *Wassermann* konnte 1960 das isolierte MBC (**12**) ebenfalls mit MAP (**13a**) unter sauren Bedingungen zu Prodigiosin (**1a**) kondensieren.^[117] Die offene Frage der Struktur von MBC (**12**) und der Position der Methoxy-Gruppe konnte zwischen 1960–1962 durch *Rapoport*, *Holdon* und *Willson* mittels Totalsynthesen und Vergleich des Naturstoffes beantwortet werden.^[118-120]

Aufklärung der Biosynthese

Vor der endgültigen Strukturaufklärung ab 1960 wurde angenommen, dass der Biosyntheseweg der Prodiginine Ähnlichkeiten mit dem der Porphyrine hat. Diese These wurde durch den Einbau von radiomarkierten Glycin und Acetat in Prodigiosin (**1a**) und Porphyrinen untermauert, konnte jedoch 1960 abgelehnt werden, da Aminolävulinsäure (wird aus Glycin hergestellt und in Porphyrinen eingebaut) von *S. marcescens* nicht an der Biosynthese von Prodigiosin (**1a**) beteiligt ist. Parallel entstand die Idee eines parallelen gegabelten Biosyntheseweges, welcher sich durch die Isolation von MBC (**12**) durch *Santer* und *Vogel*, die Komplementation von Prodigiosin-defizienten Stämmen und die Erkenntnis einer enzymkatalysierten Kondensation von MAP (**13a**) und MBC (**12**) herauskristallisierte.^[116] Die Generierung von hunderten *S. marcescens* Mutanten und weitere

Komplementationstests durch *Morrison* 1966 betätigten schließlich einen gegabelten Biosyntheseweg mit den o. g. Präkursoren (*vide supra* Schema 2).^[121]

Supplementierungsversuche von *Wasserman et al.* von ¹³C- und ¹⁴C-markierten Präkursoren konnten schließlich die Metabolite der Biosynthese für Prodigiosin (**1a**) und Undecylprodigiosin (**3**) bestimmen (Abbildung 5).^[41, 51, 122] Der A-Ring entsteht aus L-Prolin und der B-Ring aus L-Serin, L-Methionin und Acetat. Einzig die Biosynthese des C-Rings ist bei beiden Sekundärmetaboliten divergent. Wegen der Methylgruppe in 2-Position in MAP (**13a**) entsteht der C-Ring bei Prodigiosin (**1a**) durch L-Alanin und Acetat, wohingegen 2-UP (**14**) durch Glycin und Acetat entsteht. Dies ließ den Schluss übrig, dass es zwischen *Serratia*-Stämmen und *Streptomycetaceae* einen analogen MBC (**12**), jedoch unterschiedlichen C-Ring Biosyntheseweg gibt.

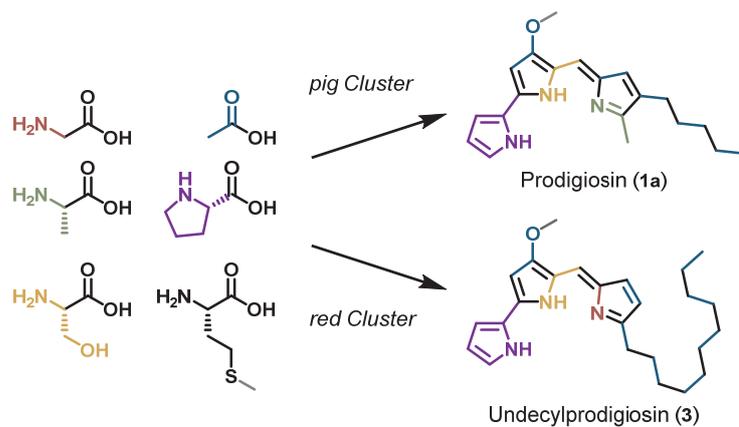


Abbildung 5: Einbaumuster von Metaboliten in der Biosynthese von Prodigiosin (**1a**) und Undecylprodigiosin (**3**). [rot – Glycin; grün – Alanin; gelb – Serin; blau – Acetat; lila – Prolin; grau – Methionin]

Genetische und biochemische Studien sowie Genomsequenzierung konnten die Biosynthesecluster der Prodiginine von *S. marcescens* (*pig Cluster*) und *Streptomyces coelicolor* A3(2) (*red Cluster*) identifizieren und die Aufgabe der Enzyme aufklären (2.4.1–2.4.4).^[40, 123-129]

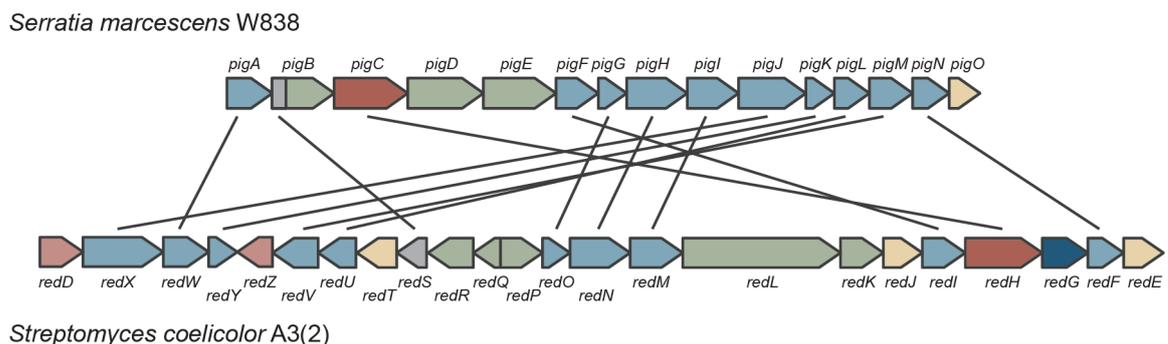
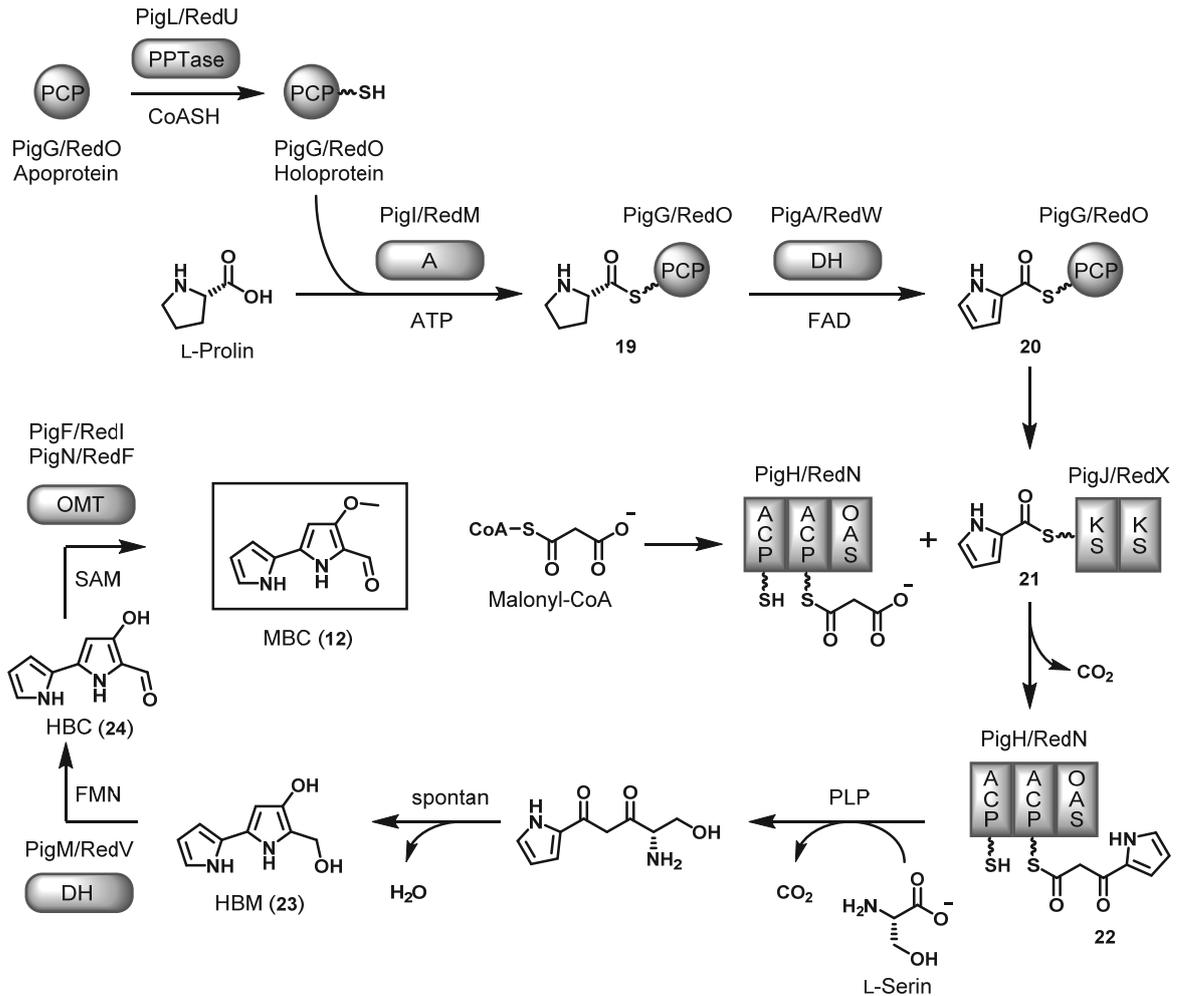


Abbildung 6: Vergleich der Gencluster für Prodigiosin (**1a**) aus *S. marcescens* (*pig Cluster*) und Undecylprodigiosin (**3**)/Streptorubin B(**4**) aus *S. coelicolor* A3(2) (*red Cluster*). Homologe Enzyme sind mit einer Linie verbunden. [hellblau – MBC (**12**) Synthese; grün – MAP(**13a**)/2-UP (**14**) Synthese; dunkelrot – Kondensationsenzyme; dunkelblau – Gen für das zyklisierende Enzym; hellrot – regulatorische Gene; gelb – indirekte Beteiligung an der Biosynthese der Prodiginine]

2.4.1 Biosynthese von 4-Methoxy-2,2'-bipyrrol-5-carbaldehyd (12, MBC)

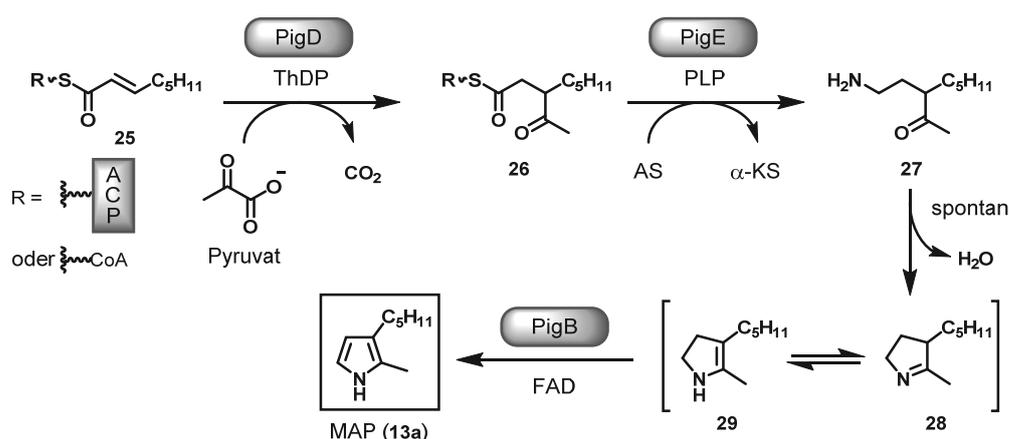
Die Biosynthese von MBC (12) ist in Schema 3 dargestellt. Im ersten Schritt wird das Peptidyl-Carrier Protein (PCP) PigG/RedO durch die Übertragung von einer Phosphopantetheinylgruppe durch die Phosphopantetheinyl Transferase (PPTase) PigL/RedU in seine aktive Holoform überführt.^[40, 41, 126] Anschließend wird L-Prolin durch die autonome Adenylierungsdomäne einer nichtribosomalen Peptidsynthetase (NRPS) PigI/RedM auf holo-PCP-Protein PigG/RedO übertragen und bildet den L-Pyrrolylthioester 19, welcher danach über eine FAD-abhängige Dehydrogenase PigA/RedW zum Pyrrolylthioester 20 oxidiert wird. Die folgende Kettenverlängerung wird analog zu einer Polyketidsynthese (PKS) durch Ketosynthasen (KS) und Acyl-Carrier Proteine (ACP) durchgeführt. Zunächst werden der Pyrrolylthioester 20 auf die KS PigJ/RedX und Malonyl aus Malonyl-CoA auf das ACP von RedN/PigH übertragen. Dieser Malonylrest wird unter CO₂ Kondensation auf den Thioester 21 übertragen und bildet den Pyrrolyl-β-ketothioester 22. Durch die Pyridoxalphosphat (PLP)-abhängige α-Oxamin Synthase (OAS) von PigH/RedN wird L-Serin nach erfolgter Decarboxylierung an den Pyrrolyl-β-Ketothioester 22 gebunden und es entsteht durch nachfolgende Zyklisierung, Kondensation von H₂O und Tautomerisierung das Intermediat HBM (23). Eine Hydroxygruppe des Diols HBM (23) wird durch die FMN-abhängige Dehydrogenase PigM/RedV zum Aldehyd HBC (24) oxidiert und die verbleibende Hydroxygruppe anschließend mittels der S-Adenosylmethionin (SAM)-abhängigen O-Methyltransferase (OMT) PigF/RedI zur Methoxygruppe umgewandelt, sodass der Präkursor MBC (12) entsteht. In *S. marcescens* wird diese Methylierung auch PigN zugesprochen, jedoch konnte sie für das homologe Enzym RedF nicht bestätigt werden.



Schema 3: Übersicht der Biosynthese von MBC (12) durch Enzyme des *pig Clusters* (*S. marcescens*) oder des *red Clusters* [*S. coelicolor* A3(2)]. [A – Adenylierungsdomäne einer NRPS; ACP – Acyl-Carrier Protein; DH – Dehydrogenase; ATP – Adenosintri-phosphat; CoA – Coenzym A; FAD – Flavin-Adenin-Dinukleotid; FMN – Flavinmononucleotid; KS – Ketosynthase; OAS – PLP abhängige α -Oxamin Synthase; OMT – O-Methyltransferase; PCP – Peptidyl-Carrier Protein; PLP – Pyridoxal-phosphat; PPTase – Phosphopantetheinyl Transferase; SAM – S-Adenosylmethionin]

2.4.2 Biosynthese von 2-Methyl-3-*n*-amyl-pyrrol (13a, MAP)

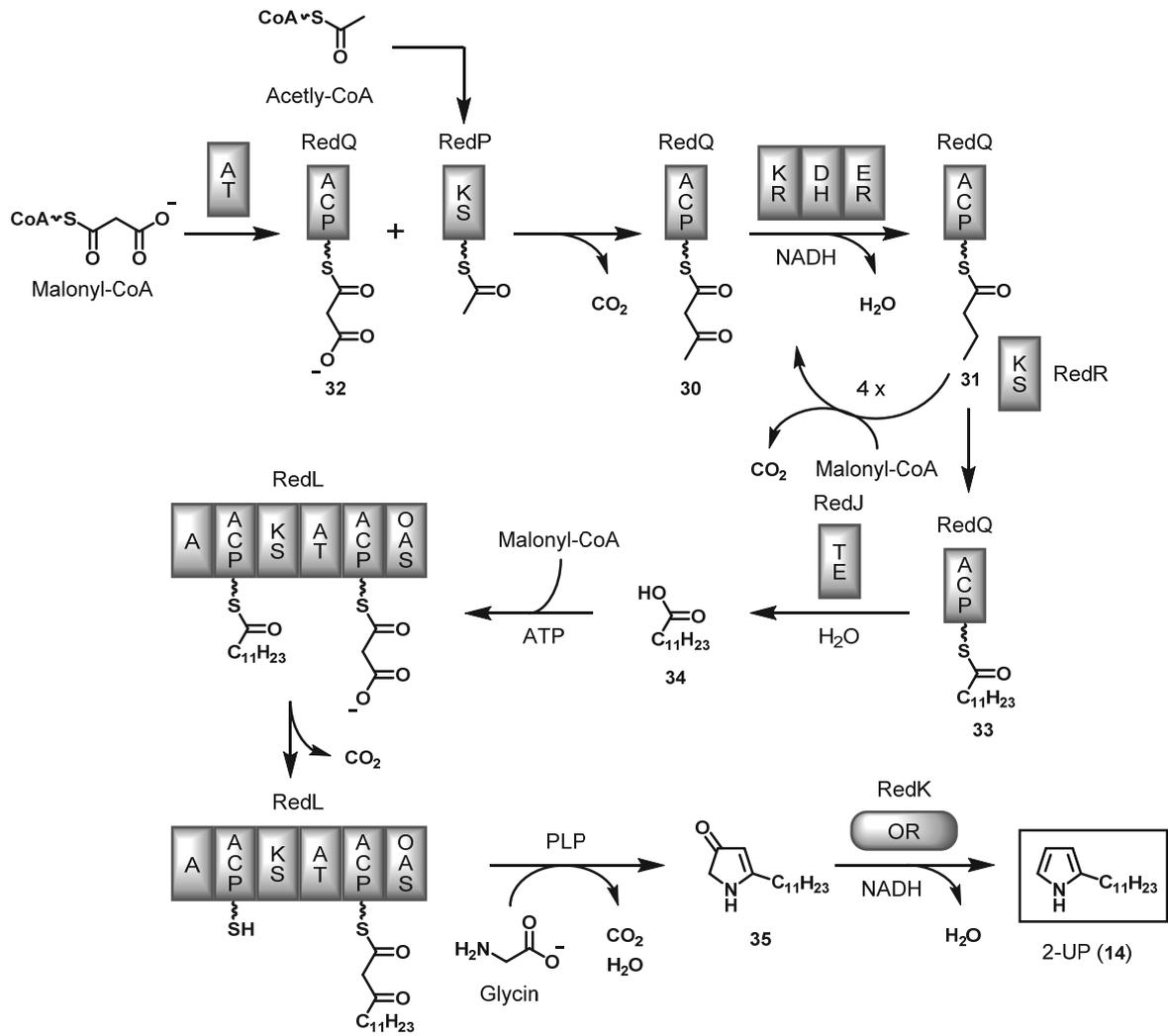
Die Biosynthese von MAP (13a) ist in Schema 4 dargestellt. Im ersten Schritt wird Pyruvat nach erfolgter Decarboxylierung über eine enzymatische *Stetter*-Reaktion durch das Thiamindiphosphat (ThDP)-abhängige Enzym PigD auf den 2-Octenylthioester **25** übertragen.^[40, 41, 129] Nachfolgend katalysiert die PLP-abhängige Transaminase PigE die Aminierung des γ -Ketothioesters **26** und das entstehende γ -Aminoketon **27** zyklisiert spontan unter einer Kondensation von H₂O zum Dihydropyrrol **28**. Das 2-Pyrrolin Tautomer **29** wird anschließend durch die FAD-abhängige Oxidase PigB zum Präkursor MAP (13a) oxidiert.



Schema 4: Übersicht der Biosynthese von MAP (13a) durch Enzyme des *pig Clusters* (*S. marcescens*). [ACP – Acyl-Carrier Protein; AS – Aminosäure; CoA – Coenzym A; α -KS – α -Ketosäure; FAD – Flavin-Adenin-Dinukleotid; PLP – Pyridoxalphosphat]

2.4.3 Biosynthese von 2-Undecylpyrrol (14, 2-UP)

Die Biosynthese von 2-UP (14) ist in Schema 5 dargestellt. Im ersten Schritt wird Malonyl-CoA auf das ACP von RedQ und Acetyl-CoA auf die KS von RedP übertragen.^[40, 41, 123, 125] Der Malonylrest wird unter Decarboxylierung auf den Acetylthioester übertragen und bildet den β -Ketothioester **30**. Dieser wird über eine Ketoreduktase, Dehydratase und Enoylreduktase einer Fettsäuresynthese, welche keinen Bestandteil des Biosyntheseclusters darstellt, zum Thioester **31** reduziert. Anschließend wird die Kette durch die Übertragung vierer Malonyleinheiten von Malonyl-ACP-RedQ (**32**) durch die KS von RedR und iterativer Reduktion durch das Fettsäurecluster (KR, DH und ER) verlängert, sodass der Thioester **33** entsteht. Dieser wird über die Thioesterase (TE) RedJ zur Dodecansäure (**34**) hydrolysiert. Sowohl die Dodecansäure (**34**) als auch Malonyl-CoA werden auf RedL übertragen und durch die KS erfolgt eine weitere Kettenverlängerung nach einer Decarboxylierung der Malonyleinheit. Durch die PLP-abhängige OAS von RedL wird Glycin nach erfolgter Decarboxylierung an den Thioester gebunden und 2-Undecan-2-pyrrolin-4-on (**35**) wird nach einer Zyklisierung mit einer Dehydratisierung erhalten. Dieses wird anschließend durch die Oxidoreduktase (OR) RedK zum Präkursor -2-UP (14) oxidiert.

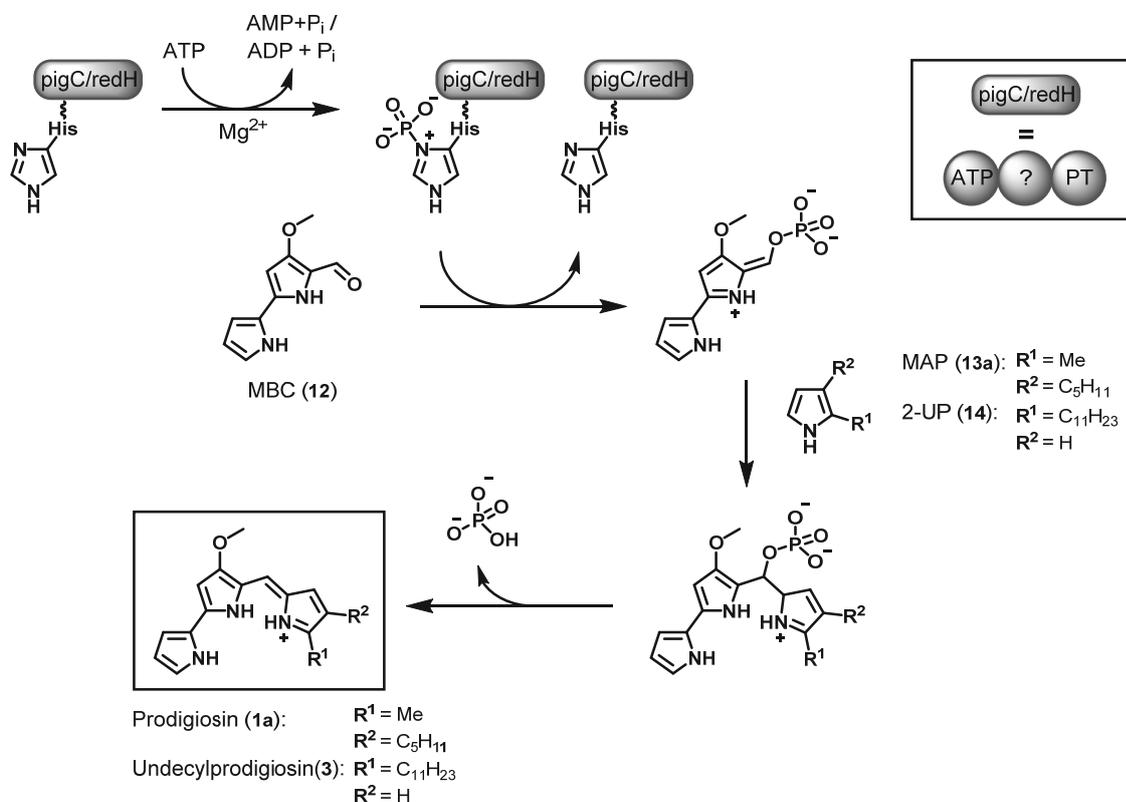


Schema 5: Übersicht der Biosynthese von 2-UP (14) durch Enzyme des *red Clusters* [*S. coelicolor* A3(2)]. [A – Adenylierungsdomäne; ACP – Acyl-Carrier Protein; AT – Acyltransferase; ATP – Adenosintriphosphat; CoA – Coenzym A; DH – Dehydratase; ER – Enoylreduktase; KS – Ketosynthase; KR – Ketoreduktase; NADH – Nicotinamidadenindinukleotid; OAS – PLP abhängige α -Oxamin Synthase; OR – Oxidoreduktase; PLP – Pyridoxalphosphat; TE – Thioesterase]

2.4.4 Kondensation zu Prodigininen und anschließende oxidative Zyklisierungen

Kondensationsreaktion

Die Kondensationsreaktion des Bipyrrrols MBC (12) und des Monopyrrrols MAP (13a) bzw. 2-UP (14) ist in Schema 6 dargestellt. Das Enzym PigC/RedH besteht aus drei Domänen, einer ATP-bindenden Domäne, welche homolog zur Domäne aus der Phosphoenolpyruvatsynthase (PEP-Synthase) ist, einer Phosphotransfer-Domäne, welche homolog zur Pyruvat-Phosphat-Dikinase (PPDK) ist und einer mittleren Domäne, welche keine Homologie zu bekannten Enzymen zeigt.^[40, 41, 124, 127, 129, 130] Analog zu den Reaktionen der bekannten Enzyme wird angenommen, dass zunächst ein Histidin phosphoryliert wird, wodurch die Phosphatgruppe auf den Aldehyden übertragen wird.⁴ Der nukleophile Angriff des Monopyrrrols erfolgt an diesem aktivierten Carbonyl und nach erfolgter Kondensation des Phosphatrestes entsteht das entsprechende Prodiginin.



Schema 6: Übersicht der Kondensationsreaktion des Bipyrrrols MBC (12) und des Monopyrrrols MAP (13a) bzw. 2-UP (14) durch das Enzym des *pig Clusters* PigC (*S. marcescens*) oder des *red Clusters* RedH [*S. coelicolor* A3(2)]. [ADP – Adenosindiphosphat; AMP – Adenosinmonophosphat; ATP – Adenosintriphosphat]

⁴ Die Freisetzung von ADP oder AMP nach dieser Phosphorylierung ist bisher nicht endgültig geklärt. In der Reaktion der PPDK wird AMP freigesetzt, jedoch konnten *Chawrai et al.* in *in vitro* Versuchen mit PigC lediglich ADP nachweisen.^[127]

Oxidative Zyklisierung

Bereits 1974 haben *Wasserman et al.* die oxidative Zyklisierung von Undecylprodigiosin (**3**) zu *Metacycloprodigiosin* (**5**, Streptorubin A) in *Streptomyces longisporus ruber* über Metabolit Supplementierung vorhergesagt.^[51] In *S. coelicolor* A3(2) katalysiert das Enzym RedG die Zyklisierung von Undecylprodigiosin (**3**) zu Butyl-*meta*-cycloheptylprodigiosin (**4**, Streptorubin B).^[57, 58, 131-134] Ein Sequenzvergleich dieses Enzyms und seiner Homologen McpG aus *S. longisporus ruber* [Streptorubin A (**5**)], der Oxygenase aus *Streptomyces griseoviridis* [Prodigiosin R1 (**6**)] und MarG aus *Streptomyces* sp. CNQ-617 [Marineosin (**18**), *vide supra* Tabelle 2] weist Ähnlichkeiten mit der *Rieske*-Nicht-Häm-Eisen-Oxygenasen Naphthalin 1,2-Dioxygenase (NDO) aus *P. putida* auf (Abbildung 7A). Die Bindestelle für den [2Fe-2S] *Rieske*-Cluster mit den Sequenzmotiven CXH und CXXH befindet sich am *N*-Terminus von RedG, wohingegen das E/DXXHXXXH Motiv für die Bindung des Nicht-Häm-Eisens und des Elektronenüberträgers Glutamat am *C*-Terminus lokalisiert ist.^[57, 133] Die benötigten Elektronen werden wahrscheinlich von NAD(P)H über eine Ferredoxinreduktase und einem Ferredoxin zunächst auf das *Rieske*-Cluster und über das Glutamat an das Nicht-Häm-Eisen transportiert, welches für die Substratoxidation verantwortlich ist (Abbildung 7B).^[135] Diese Art der Elektronentransportkette ist obligatorisch, da im Katalysemechanismus jeweils einzelne Elektronen übertragen werden.

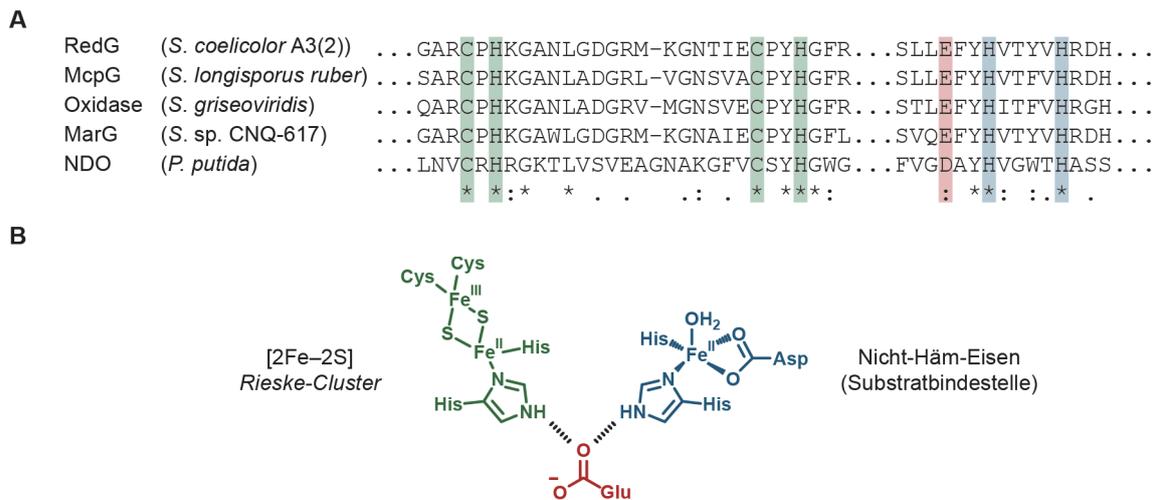
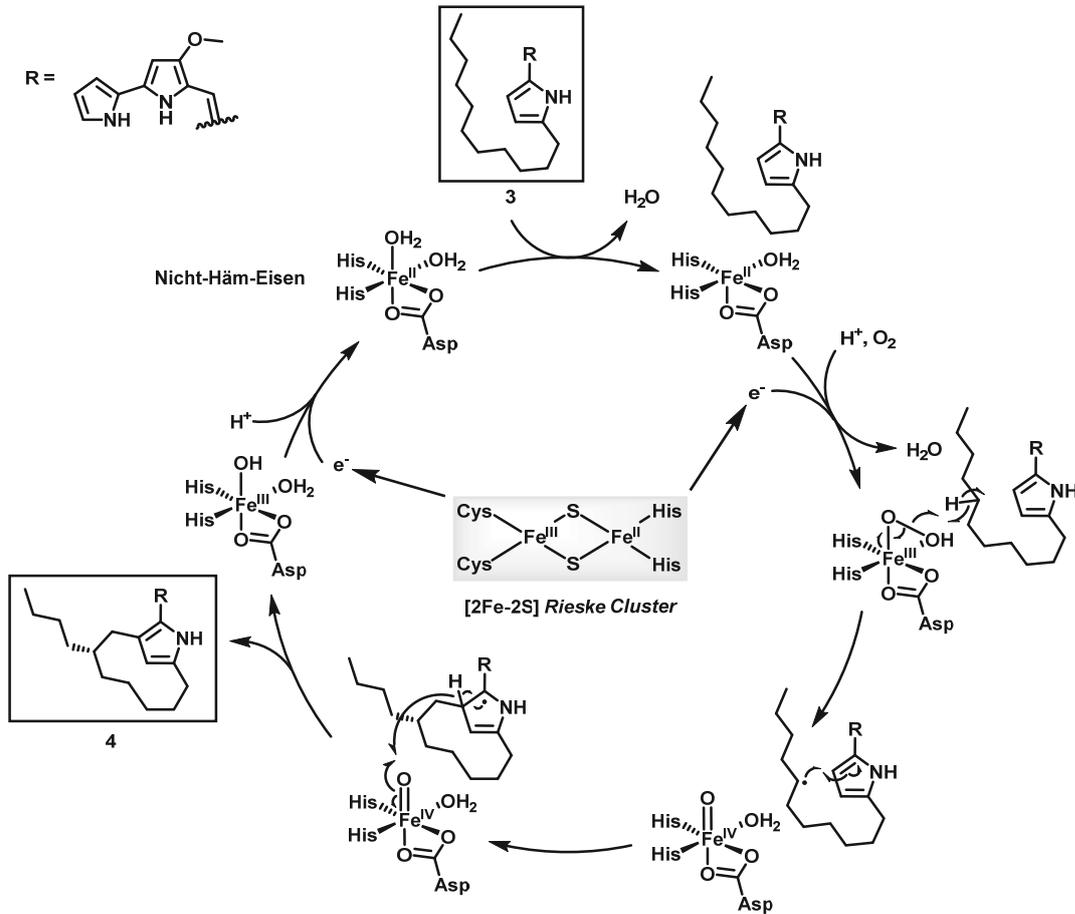


Abbildung 7: Vergleich und aktives Zentrum von Oxygenasen. **A)** Sequenzvergleich verschiedener Oxygenasen, welche an der Zyklisierung von Prodigininen beteiligt sind, mit der *Rieske*-Nicht-Häm-Eisen-Oxygenasen Naphthalin 1,2-Dioxygenase (NDO) aus *P. putida*. Farblich markiert sind die in **B** dargestellten konservierten Aminosäuren des [2Fe-2S] *Rieske*-Clusters und des Nicht-Häm-Eisen Zentrums. **B)** Katalytisches Zentrum der Oxygenasen. Die Abbildung B wurde modifiziert nach *Barry und Challis*.^[135] [grün – *Rieske*-Cluster; blau – Nicht-Häm-Eisen Zentrum; rot – Aminosäure der Elektronentransportbrücke]

Der von *Challis et al.* auf Basis von Experimenten und der Naphthalin 1,2-Dioxygenase postulierte Katalysemechanismus ist in Schema 7 dargestellt.^[132, 135] Bisher ist nicht bekannt, ob der Mechanismus

radikalisch über Abstraktion von Wasserstoffatomen oder über kationische Intermediate durch die Abstraktion von Hydridionen verläuft.



Schema 7: Von Barry und Challis vorgeschlagener Katalysezyklus der Zyklisierung von Undecylprodigiosin (3) zu Streptorubin B (4) durch RedG. Die Abbildung wurde modifiziert nach Barry und Challis.^[135]

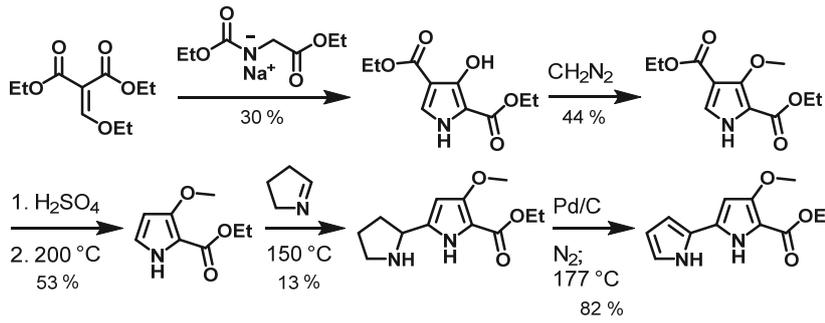
Auch wenn in der Literatur der Begriff einer „Oxygenase“ im Bezug zu RedG verankert ist, so ist diese Verwendung irreführend, da kein Sauerstoff in das Zielmolekül übertragen wird (*vide supra* Fußnote 3). Vielmehr sollte daher von einem Rieske-oxygenaseähnlichem Enzym oder einer Oxidase gesprochen werden.

2.5 Biomimetische Synthesen von Prodigininen

Die ersten Totalsynthesen von Prodigininen wurden über 30 Jahre überwiegend durch die Erzeugung von biomimetischen Intermediaten der Biosynthese bestimmt.^[118-120, 136, 137] Anfangs war diese Herangehensweise der Strukturaufklärung von Prodigiosin bzw. dessen Intermediate geschuldet (*vide supra* 2.4), später jedoch eröffnete diese Art der modularen Synthese – analog zur ohnehin konvergent angeordneten Biosynthese – auch die Erschließung der Strukturen der komplexen Prodiginine. Zudem ermöglichten die biomimetischen Synthesen einen effizienten Zugang zu Prodiginin-Bibliotheken und der Erforschung ihrer Bioaktivität durch SAR-Studien.

Der erste Versuch einer biomimetischen Totalsynthese von Prodigiosin (**1a**) durch *Rapoport* und *Willson* (1962) führte zu einer Isoform des Naturstoffes, welche nicht mit den spektroskopischen Daten des aus *S. marcescens* isolierten Naturstoffes übereinstimmte.^[120] Diese Synthese bildete jedoch die Grundlage für die erste strukturell korrekte Totalsynthese von *Rapoport* und *Holden* im gleichen Jahr, welche als eindeutige Bestätigung der zuvor vorgeschlagenen Struktur von Prodigiosin (**1a**) angesehen wird (2.4).^[119] Als besondere Herausforderung der biomimetischen Totalsynthesen dieser Zeit ist die Synthese des Präkursors MBC (**12**) ohne den Einsatz von metallkatalysierten Kreuzkupplungen anzusehen. Das Schema 8 zeigt einen Vergleich der ersten drei Synthesen dieses Bausteins, welche für die Totalsynthese diverser Prodiginine eingesetzt wurden. Erst über zwei Jahrzehnte später zeigten *Boger* und *Patel* (1988) und *Wasserman* und *Lombardo* (1989) alternative Synthesewege dieses Präkursors.^[136, 137] Während *Boger* und *Patel* den Aufbau des B-Pyrrolrings über eine *Diels-Alder* Reaktion mit anschließender Reduktion durch Zink und die oxidative Kupplung des A-Rings durch Pd(OAc)₂-Katalyse erzielten, haben *Wasserman* und *Lombardo* den B-Ring über eine Zyklisierung einer Tricarbonyleinheit aufgebaut.^[137]

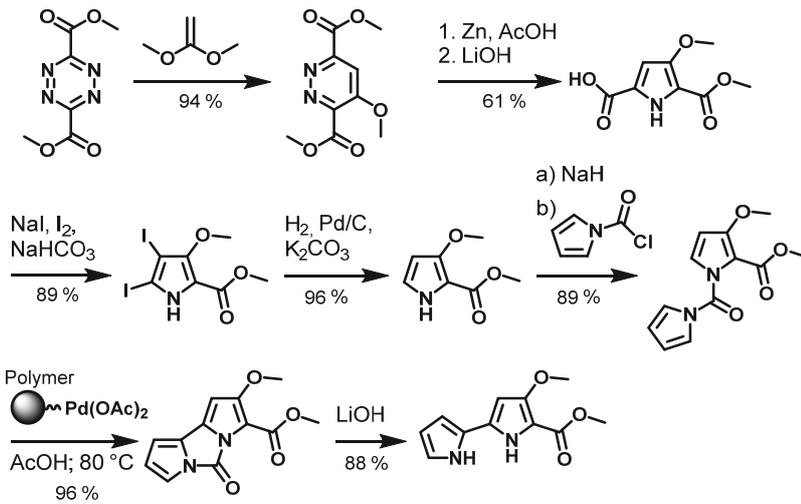
A Rapoport, Holden (1962)



1. H_2NNH_2
2. *p*-TosCl, Pyridin
3. Na_2CO_3 ; 170 °C

25 %
(< 1%, 9 Schritte)

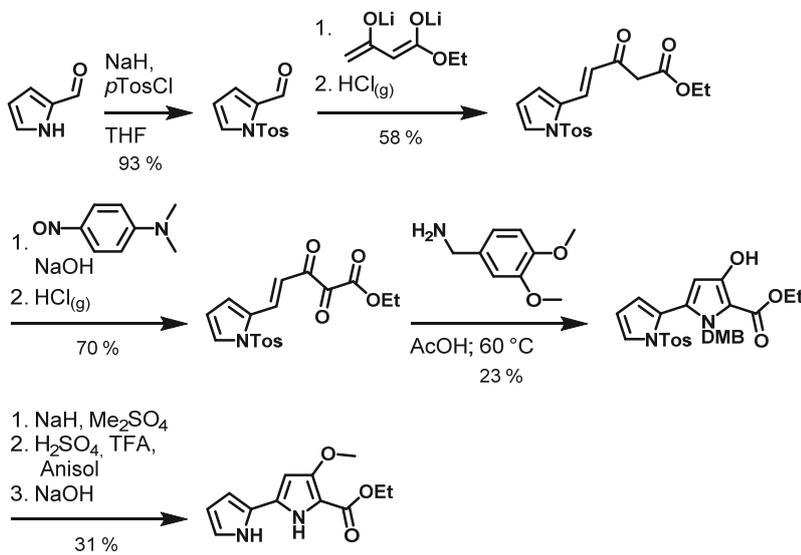
B Boger, Patel (1988)



1. H_2NNH_2
2. *p*-TosCl, Pyridin
3. Na_2CO_3 ; 170 °C

34 %
(13 %, 11 Schritte)

C Wasserman, Lombardo (1989)

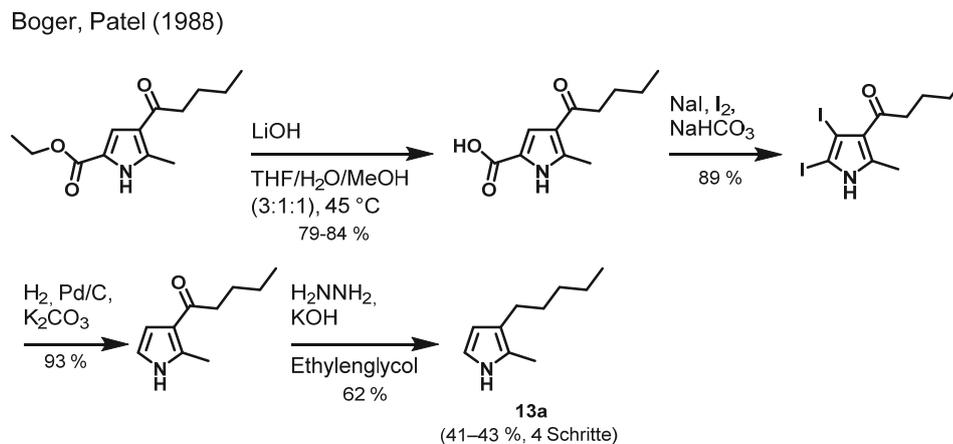


1. H_2NNH_2
2. *p*-TosCl, Pyridin
3. Na_2CO_3 ; 170 °C

24 %
(< 1 %, 11 Schritte)

Schema 8: Vergleich der MBC (12) Synthese von **A**) Rapoport und Holden (1962), **B**) Boger und Patel (1988) und **C**) Wasserman und Lombardo (1989).^[119, 136, 137]

Auch wenn über diese drei Methoden ein Zugang zu den natürlichen Prodigininen Prodigiosin (**1a**) und Undecylprodigiosin (**3**) sowie weiteren unnatürlichen Derivaten gefunden wurde, so wurde die Gesamtausbeute jeder einzelnen Synthesesequenz durch die abschließende ungenügende Ausbeute der *McFayden-Stevens*-Reduktion deutlich gemindert. In Kombination mit der Synthese des Präkursors MAP (**13a**), wie sie beispielhaft von *Boger* und *Patel* in Schema 9 gezeigt ist, und der säurekatalysierten Kondensationsreaktion (50–59 % Ausbeute) zum Prodigiosin (**1a**) konnten nur Gesamtausbeuten von < 1%–3 % über 12–16 Schritten erzielt werden (Tabelle 3).^[136] Hierbei ist zu beachten, dass die Synthese von MAP (**13a**) bei *Rapoport* und *Holden* zwar beschrieben ist, jedoch keine Ausbeuten angegeben sind;^[119] bei *Wasserman* und *Lombardo* wurde hingegen lediglich die Synthese für MBC (**12**) und die Kondensation beschrieben.^[137]



Schema 9: MAP (**13a**) Synthese nach *Boger* und *Patel* (1988) für die Totalsynthese von Prodigiosin (**1a**).^[136]

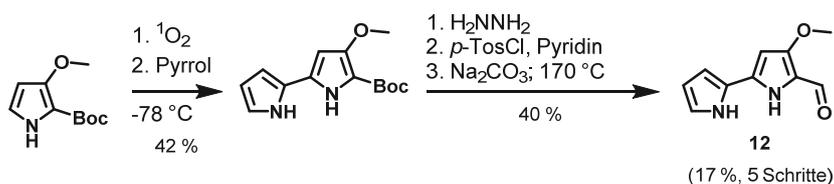
Tabelle 3: Vergleich der Totalsynthesen von Prodigiosin (**1a**) von *Rapoport* und *Holden* (1962), *Boger* und *Patel* (1988) und *Wasserman* und *Lombardo* (1989).^[119, 136, 137] [n. b. – nicht benannt]

		<i>Rapoport,</i> <i>Holden</i> (1962)	<i>Boger, Patel</i> (1988)	<i>Wasserman,</i> <i>Lombardo</i> (1989)
Ausbeute/ Schritte	MBC (12)	< 1 % / 9	13 % / 11	< 1 % / 11
	MAP (13a)	n. b. / 5	43 % / 4	n. b. / n. b.
	Kondensation	55 % / 1	59 % / 1	50 % / 1
Σ	Prodigiosin (1a)	< 1 % / 15 ^[a]	3 % / 16	< 1 % / 12 ^[a]

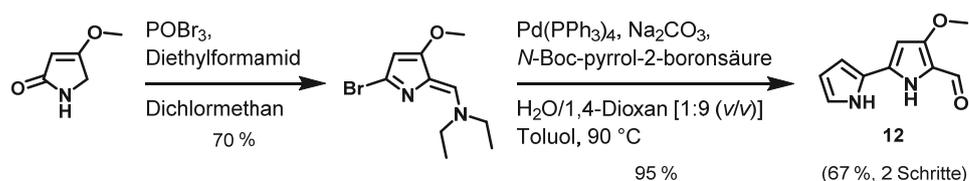
^[a] Die Gesamtausbeute von Prodigiosin (**1a**) bezieht sich nur auf alle genannten Einzelausbeuten und/oder Syntheseschritte.

1999 berichteten *Wasserman et al.* über eine deutlich verkürzte Syntheseroute von MBC (**12**) über fünf Schritte mit einer Gesamtausbeute von 17 % durch eine oxidative Kupplung zum Bipyrrrol mittels Singulett-Sauerstoff (Schema 10A).^[138] Da aber auch in dieser Synthese die Ausbeute durch eine abschließende *McFayden-Stevens-Reduktion* gemindert wurde, entwickelten *Lavallée et al.* 2006 bei *GeminX Pharmaceuticals* eine Synthese über zwei Schritte mit einer Gesamtausbeute von 67 % (Schema 10B).^[139] Dabei erlaubte die Reaktion mit einem *Vilsmeier-Reagenz* und anschließender *Suzuki-Kupplung* den Zugang zum Autophagie-Inhibitor Obatoclax (**15**) im Multikilogramm-Maßstab.^[41, 140]

A *Wasserman et al.* (1999)



B *Lavallée et al.* (2006)



Schema 10: Verbesserungen der MBC (**12**) Synthese von **A**) *Wasserman et al.* (1999) und **B**) *Lavallée et al.* (2006).^[138, 139]

In Bezug auf die Analyse der Funktion jedes einzelnen Enzyms aus dem *pig Cluster* der Biosynthese von Prodigiosin (**1a**) publizierten *Williamson et al.* 2005 eine neue Synthese für das Monopyrrol MAP (**13a**).^[127, 129] Mit einer Gesamtausbeute von 15 % über fünf Schritte war diese jedoch nicht kompetitiv zu der Synthese von *Boger* und *Patel* (*vide supra* Schema 9); allerdings sei hier zu beachten, dass *Boger* und *Patel* ihre Synthese bereits mit einer 5-Methyl-2,4-dicarbonylpyrrol-Einheit begonnen haben.^[136]

2.6 Synthesen von Naturstoffderivaten

Wie bereits zu Beginn dieses Kapitels erwähnt, bieten Naturstoffe, insbesondere die Sekundärmetabolite, eine schier unerschöpfliche Quelle für die Anwendung in der Pharmazie.^[141] Auch wenn die meisten dieser Komponenten über Millionen Jahre der Evolution für ihre spezifische Aufgabe optimiert wurden, so kann eine Verbesserung hinsichtlich eines therapeutischen Einsatzes dennoch obligat sein. Hierbei seien u. a. die Spezifizierung und Wirkverbesserung gegenüber Zielmolekülen, die Wasserlöslichkeit und die Stabilität im Metabolismus zu erwähnen. Die Bereitstellung von Naturstoffen und einer Bibliothek ihrer Derivate ist daher für medizinische Studien unvermeidbar und gilt daher als eine Herausforderung der Naturstoffforschung.

Insbesondere durch die Entwicklung der organischen Chemie ab der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts bildet die Totalsynthese von Naturstoffen den Grundstein für die Bereitstellung bioaktiver Verbindungen (*vice versa* bildete der Bedarf an Naturstoffen die Grundlage der Evolution der organischen Chemie bis heute). Durch die kontinuierliche Entwicklung neuer Reaktionen, Katalysatoren und Reagenzien, Multikomponenten- und Dominoreaktionen und stereospezifischen Reaktionen – nicht zuletzt durch den Einsatz von Biokatalysatoren – können gegenwärtig komplexeste Strukturen hergestellt werden. Ein Hauptvorteil der Totalsynthese besteht sicher in der Einflussnahme eines jeden Syntheseschrittes, wodurch die Bereitstellung von Derivaten vereinfacht wird. Mit zunehmender Komplexität steigt jedoch meist auch die Anzahl der Syntheseschritte, wodurch die damit verbundene Gesamtausbeute unausweichlich vermindert wird. Ebendieses Argument macht die Totalsynthese auf Basis eines industriellen Ansatzes jedoch häufig unattraktiv, sodass eine kritische ökonomische Betrachtung im Vergleich mit dem Potential eines Naturstoffes nötig ist.

Alternativen für die Totalsynthese können in der Biologie und durch das Synergiepotenzial durch die Kombination von Chemie und Biologie gefunden werden. Diesen Methoden werden im nachstehenden Kapitel (2.6.1) gesondert beschrieben. Neben der reinen Biosynthese bildet die Semisynthese die älteste Möglichkeit der Diversifizierung von Naturstoffen, da hier noch kein Wissen über Biosynthesewege oder genetische Konstrukte erforderlich waren (Abbildung 8). Erst mit der Entwicklung genetischer Werkzeuge wie der Sequenzierung in den 70er und 80er Jahren, der Polymerase-Kettenreaktion in den 90er Jahren und der automatischen Sequenzierung ganzer Genome gegen Ende des 20. Jahrhunderts, und dem damit zunehmenden Verständnis der biochemischen Reaktionen, entwickelten sich Methoden wie die *Precursor-directed* Biosynthese und die Mutasynthese.^[142]

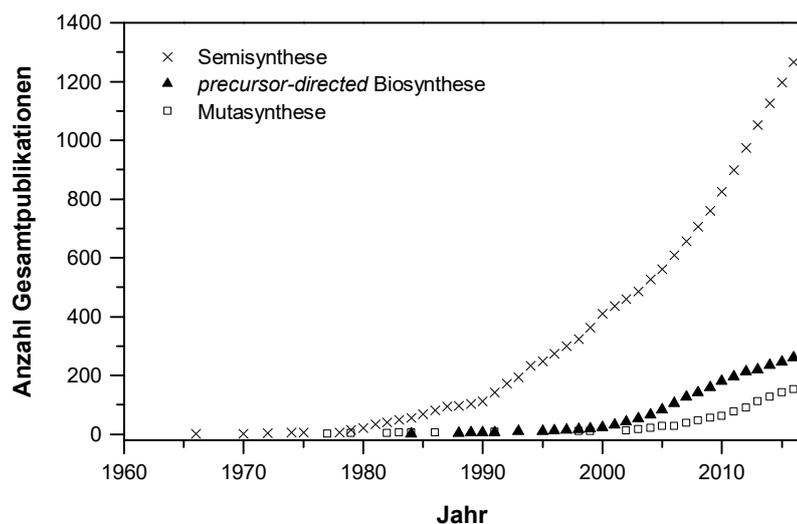


Abbildung 8: Anzahl der Gesamtpublikationen über Semisynthese, *Precursor-directed* Biosynthese und Mutasynthese bis Ende 2016. Als Datengrundlage wurde die Datenbank „Web of Science™“ von Thomson Reuters™ verwendet (Stand: Juni 2017). Als Suchgrundlage wurden die englischen Begriffe „semisynthesis“, „precursor(-)directed biosynthesis“ und „mutasynthesis“ für den Titel und/oder das Thema der Publikation gewählt.

2.6.1 Biosynthese, Semisynthese, *Precursor-directed* Biosynthese, Mutasynthese

Nachfolgend werden die vier Methoden der Biosynthese, Semisynthese, *Precursor-directed* Biosynthese und Mutasynthese (Abbildung 9) für den Einsatz der Gewinnung von Naturstoffen und deren Derivate beschrieben.

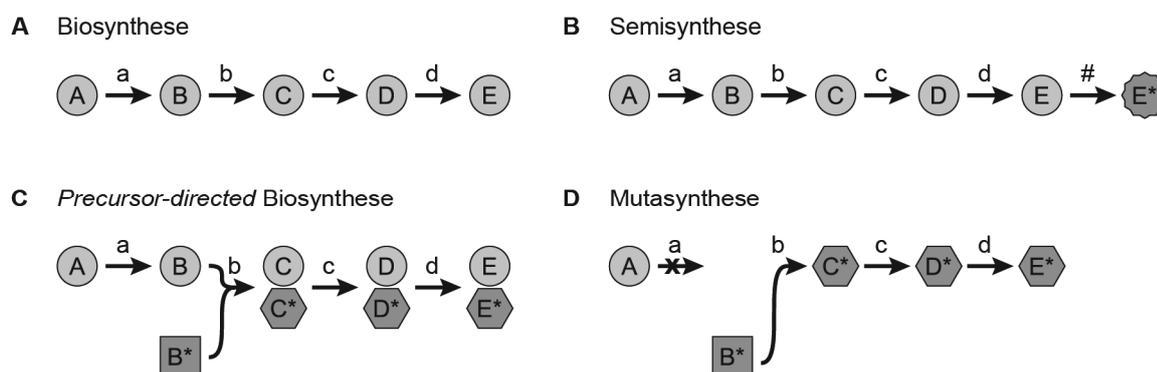


Abbildung 9: Schemata der A) Biosynthese, B) Semisynthese, C) *Precursor-directed* Biosynthese, D) Mutasynthese. Folgende Kodierung wird verwendet: A – Grundbaustein; B–E – Intermediate; E – Naturstoff(derivat); a–d – Enzyme; * – Derivat; # – chemische Synthese. Die Abbildung wurde modifiziert nach Kirschning *et al.*^[143]

Biosynthese

Die Nutzung der Biosynthese ist der älteste und einfachste Weg zur Produktion von Naturstoffen. Grundlegend ist kein Wissen über die Biosynthese und angrenzende metabolische Stoffwechselwege sowie genetische Konstrukte erforderlich; meistens werden die Präkursoren durch den Primärmetabolismus und Enzyme sowie deren Kofaktoren oder Coenzyme durch den Organismus selbst bereitgestellt. Die Biosynthese kann jedoch durch zusätzliches Wissen über den Syntheseweg optimiert werden, hierzu zählen z. B. die Supplementierung von Grundbausteinen und Additiven in das Kulturmedium oder die genetische Optimierung des Metabolismus durch *metabolic flux* Analysen.^[144-146] Ebenfalls kann die Biosynthese gegenüber der Wahl des Wirtes optimiert werden, da die genetischen Werkzeuge den Transfer ganzer Gencluster in heterologe Wirte erlauben.^[147] Der Vorteil der Biosynthese liegt in der Bereitstellung aller beteiligten Komponenten durch den Wirt und der damit verbundenen ökonomischen Wertschöpfung (Bioökonomie). Dahingegen kann die Biosynthese jedoch kaum einen Beitrag zur Produktion von Derivaten liefern, da meist nur ein definiertes Produkt entsteht (Abbildung 9A). Ausnahmen bilden hier Biosynthesewege mit promiskuitiven Enzymen, welche auch leicht veränderte Metabolite akzeptieren, die allerdings meist hohe Ähnlichkeit zum eigentlichen Präkursor aufweisen.^[148] Beispiele für industrielle Biosyntheseprodukte sind Riboflavin (Vitamin B2), Aminosäuren wie L-Glutamat und L-Lysin als Futtermittelzusatz, Biokraftstoffe und Polylactide.^[149-152]

Eine Weiterentwicklung der Biosynthese, die kombinatorische Biosynthese, wurde durch die Kenntnisse der heutigen genetischen Werkzeuge unterstützt.^[153] Dabei werden einzelne Enzyme oder Enzym-Module (beispielsweise bei Polyketidsynthesen) genetisch verändert oder durch Homologe ausgetauscht und somit neue Biosynthesewege aufgebaut. Dadurch ist zwar eine Produktion eines Derivates möglich, jedoch steht dieser Gewinn einem hohen Aufwand der Konstruktion solcher Hybride entgegen.

Semisynthese

Die Semisynthese kombiniert die klassische Biosynthese (*vide supra*) und die organische Chemie und generiert Derivate durch konsekutive chemische Veränderung des extrahierten Naturstoffes (Abbildung 9B).^[14, 154-156] Für diesen Ansatz werden meist komplexe hochmolekulare Naturstoffe oder Vorläufer als Grundgerüst verwendet und diese zum bioaktiven Naturstoff vollendet oder die spezifische Wirkung durch (nicht-biologische) funktionelle Gruppen verbessert. Dieser Nutzung steht jedoch ein limitiertes Angebot für die anschließenden chemischen Transformationen entgegen. Selbst bei strukturell hochkomplexen Naturstoffen muss die synthetische Modifikation chemo- und regioselektiv verlaufen, um eine nachfolgende Trennproblematik und damit einhergehende Ausbeutenverluste abzuwenden. Bekannte Beispiele für semisynthetische Produkte sind die Penicillin Derivate Amoxicillin und Methicillin, das Antitumorthapeutikum Paclitaxel (Taxol), das Antimalariatherapeutikum Artemether (ein Artemisinin Derivat) und der Cholesterinsenker Simvastatin (einem Lovastatin Derivat).^[155, 157, 158]

Precursor-directed Biosynthese (PDB)

Mit der zunehmenden Kenntnis der Biosynthesewege und der Funktion einzelner Enzyme wurde die Methode der *Precursor-directed Biosynthese* (PDB, Vorläufer-gerichtete Biosynthese) entwickelt, welche die klassische Biosynthese mit der organischen Synthese von Vorläufermolekülen kombiniert (Abbildung 9C).^[143, 155, 156] Durch Supplementierung von einfachen unnatürlichen Präkursoranaloga zum Produktionsorganismus werden diese in der Biosynthese eingebaut und somit in ein Naturstoffderivat inkorporiert. Auch hier können relativ schnell Derivate unter Verwendung der wildtypischen Biosynthese ohne zeitaufwändige genetische Manipulationen produziert werden. Allerdings sind die Ausbeuten der Analoga oft niedrig, da der unnatürliche Präkursor mit dem präferierten natürlichen Vorläufer konkurrieren muss. Durch den Einsatz recht hoher Präkursorkonzentrationen kann diese Konkurrenz zugunsten des unnatürlichen Bausteins verschoben werden, jedoch sind hier konzentrationsabhängige toxische Eigenschaften dieser Verbindungen zu beachten. Ein weiterer Nachteil ist die Generierung eines Produktgemisches von strukturell und physikochemisch oft ähnlichen Molekülen, wodurch aufwendige Trennprozesse etabliert werden müssen. Bekannte Beispiele für eine PDB sind Penicillin V- und Rapamycin Analoga.^[159, 160]

Mutasynthese

Die Mutasynthese (engl. *mutational biosynthesis*) baut konzeptionell auf dem Prinzip der PDB auf und reduziert die Nachteile auf den Einsatz und die Akzeptanz (möglicherweise toxischer) Präkursoren. Auch in der Mutasynthese werden unnatürliche Präkursoranaloga (Mutasynthone) zu einem Produktionsstamm supplementiert, allerdings ist die Biosynthese dieser Organismen an einer definierten Stelle unterbrochen (Abbildung 9D), wodurch die Konkurrenz mit natürlichen Präkursoren unterbunden wird. Dadurch sind diese Stämme nicht in der Lage den Naturstoff ohne Inkorporation des Mutasynthons zu produzieren und bilden daher keine Produktgemische, sodass keine aufwendigen Trennprozesse mehr nötig sind.^[143, 154, 155, 161, 162]

Erstmals wurde das Konzept der Mutasynthese von *Birch* 1963 für die Produktion von Antibiotika-Derivaten beschrieben;^[163] der Begriff Mutasynthese selbst wurde jedoch erst 1977 von *Rinehart* für die Herstellung von Aminocyclitol-Antibiotika geprägt.^[164] Eine Grundvoraussetzung für die effiziente und gerichtete Anwendung der Mutasynthese sind jedoch die Kenntnisse über die einzelnen Stufen der Biosynthese und deren genetische Konstrukte. Folglich setzte die Entwicklung und Verbreitung erst Mitte der 90er Jahre des 20. Jahrhunderts ein und ist damit die jüngste der hier vorgestellten Konzepte zur Erzeugung von Naturstoffderivaten (Abbildung 8). Ist die Biosynthese eines Naturstoffes bekannt, kann der Einstiegspunkt für die Mutasynthese gezielt gewählt werden, um die Effizienz dieser Methodik zu erhöhen. Eine Mutation in einer der frühen Schlüsselstellen in der Biosynthese ermöglicht durch die Supplementierung sehr einfacher Mutasynthone die Produktion von komplexen Naturstoffderivaten. Hierbei gilt allerdings zu beachten, dass diese frühen Mutasynthone weder für das Wachstum des Wirtes obligat sind noch die Akzeptanz der folgenden Enzyme für die veränderten Intermediate zu gering ist. Daher eignen sich insbesondere parallel verlaufende Biosynthesewege für den Ansatz der Mutasynthese. Beispiele für die Mutasynthese sind die Produktion von Ansamitocin-, Geldanamycin-, Rapamycin-, Vancomycin- und Platensimycin Analoga.^[144, 159, 161, 165-169]

2.6.2 Mutasyntesen und Semisynthesen von Prodigininen

Wie bereits im Kapitel zur Aufklärung der Struktur von Prodigiosin (**1a**) und dessen Biosynthese (2.4) erwähnt, wurden eine Vielzahl Mutanten von *S. marcescens* erstellt und durch Kreuzfütterungen und Komplementationen die Grundlegenden Biosyntheseintermediate charakterisiert. Für die genaueren Untersuchungen der Funktion der einzelnen Enzyme der Biosynthesen von Prodigiosin(**1a**) und Undecylprodigiosin (**3**), wie sie in den Kapiteln 2.4.1–2.4.4 beschrieben werden, wurden *Knockout*-Stämme von *S. marcescens* und *S. coelicolor* sowie Stämme für die heterologe Produktion von einzelnen Enzymen erstellt. Im Zusammenhang dieser Studien wurde die Substrat-Promiskuität von PigC, RedH und homologen Enzymen durch *in vitro* Untersuchungen, aber auch durch Mutasyntesen, erforscht. Diese Experimente dienten jedoch allein dem Ziel einer Charakterisierung der Enzyme und nicht der Produktion von neuartigen Prodigininen in quantitativen Maßstäben.

Bereits 1969 konnten *Hearn et al.* durch Supplementierung von 2,4-Dimethylpyrrol (**36**) und 2,4-Dimethyl-3-ethylpyrrol (**37**, Kryptopyrrol) zu einer *Serratia*-Mutante zeigen, dass PigC diese MAP (**13a**) Analoga zu den entsprechenden Prodigininen kondensieren kann (Tabelle 4).^[170] Diese Ergebnisse wurden 2005 und 2008 von *Williamson et al.* und *Chawrai et al.* bestätigt, welche *S. marcescens* Mutanten der frühen MAP- (**13a**) bzw. MBC (**12**) Biosynthese verwendeten.^[129, 130] Eine Variation bezüglich des A-Rings konnte sowohl in *Serratia*- als auch *S. coelicolor* Mutanten erreicht werden (Tabelle 4 und Tabelle 5); PigC und RedH inkorporieren Phenyl-, 2-Furyl-, 2-Thionyl- und 2-Indolyl-Analoga (**38**, **39**, **40** und **41**) in die entsprechenden Prodiginine.^[124, 130] Durch gleichzeitige Supplementierung von 2,4-Dimethylpyrrol (**36**) und 2-Indolyl-MBC (**41**) konnte durch die Kondensation mit PigC der Autophagie-Inhibitor Obatoclax (**15**) hergestellt werden.^[130] Bei dieser Mutasynthese wurde jedoch eine *Serratia*-Mutante verwendet, welche lediglich in der MBC (**12**) Biosynthese blockiert war, sodass 2,4-Dimethylpyrrol (**36**) in Konkurrenz mit dem natürlichen Präkursor MAP (**13a**) trat und in deutlich geringerem Maße eingebaut wurde.

Mo et al. konnten 2005 und 2008 zeigen, dass ebenfalls die Enzyme der 2-UP (**14**) Biosynthese ein gewisses Maß an Promiskuität gegenüber der *n*-Alkylkette zeigen.^[125, 171] Durch Supplementierung von L-Valin (**42**) und den Fettsäuren 11-Methylaurinsäure (**43**), 12-Methyltridecansäure (**44**) und Tetradekansäure (**45**) zu *S. coelicolor* Mutanten der frühen MBC (**12**) Biosynthese konnten Undecylprodigiosin (**3**) Derivate des C-Rings hergestellt werden (Tabelle 5). Eine Mutasynthese zu einem so frühen Zeitpunkt der Biosynthese lässt darauf schließen, dass sämtliche Enzyme der 2-UP (**14**) Biosynthese und das abschließende Kondensationsenzym RedH eine Substratflexibilität zulassen. Längere Fettsäuren als Tetradekansäure sowie Halogenderivate in ω -2-Position wurden nicht akzeptiert.

Tabelle 4: Übersicht von Mutasyntesen mit dem *pig Cluster* aus *S. marcescens*.

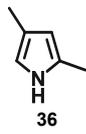
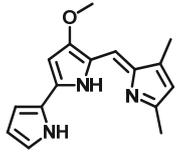
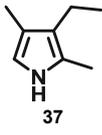
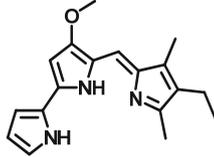
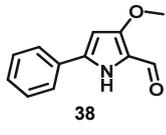
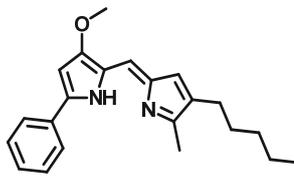
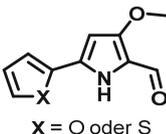
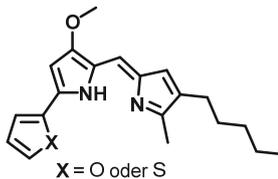
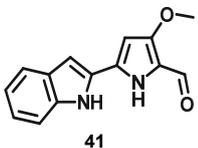
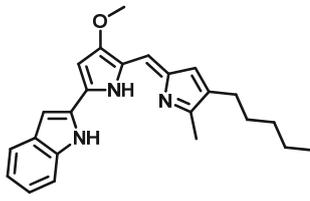
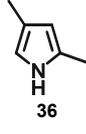
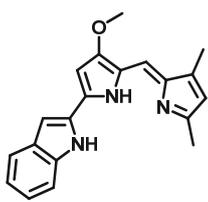
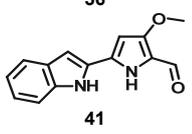
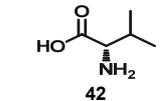
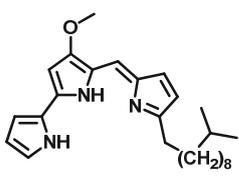
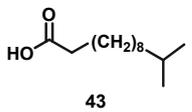
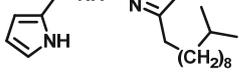
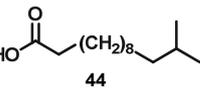
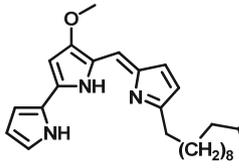
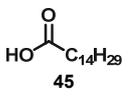
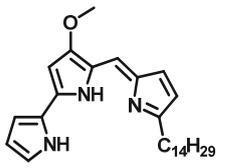
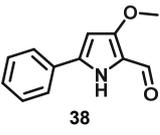
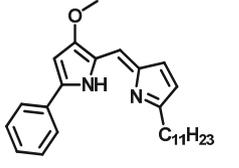
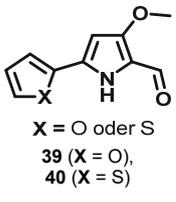
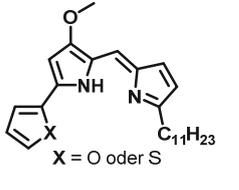
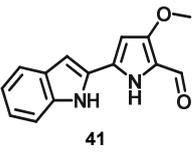
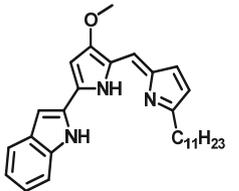
Mutasyntese	Stamm-Bezeichnung	Prodiginin
MAP Mutasyntese		
	<i>S. marcescens</i> 9-3-3 ^[170]	
	<i>S. marcescens</i> 9-3-3 ^[170] <i>Serratia</i> 39006 Δ <i>pigB</i> <i>Serratia</i> 39006 Δ <i>pigD</i> ^[129]	
MBC Mutasyntese		
	<i>Serratia</i> 39006 Δ <i>pigH57</i> ^[130]	
 X = O oder S 39 (X = O), 40 (X = S)	<i>Serratia</i> 39006 Δ <i>pigH57</i> ^[130]	
	<i>Serratia</i> 39006 Δ <i>pigH57</i> ^[130]	
MAP + MBC Mutasyntese		
	<i>Serratia</i> 39006 Δ <i>pigH57</i> ^[130]	
		Obtaoclax (15)

Tabelle 5: Übersicht von Mutasyntesen mit dem *red Cluster* aus *S. coelicolor*.

Mutasynton	Stamm-Bezeichnung	Prodiginin
 42	<i>S. coelicolor</i> SJM1/pSW7 ($\Delta redP$) ^[171]	
 43	<i>S. coelicolor</i> SJM3 ($\Delta redR$) ^[125]	
 44	<i>S. coelicolor</i> SJM3 ($\Delta redR$) ^[125]	
 45	<i>S. coelicolor</i> SJM3 ($\Delta redR$) ^[125]	
MBC-Mutasyntese		
 38	<i>S. coelicolor</i> W39 ($\Delta redM$) ^[124]	
 X = O oder S 39 (X = O), 40 (X = S)	<i>S. coelicolor</i> W39 ($\Delta redM$) ^[124]	
 41	<i>S. coelicolor</i> W39 ($\Delta redM$) ^[124]	

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Biomimetische Totalsynthese von Prodigiosin (1a)

Die Totalsynthesen von Prodigininen sind seit den ersten Versuchen von *Rapoport, Willson* und *Holden* (1962) eng mit den biomimetischen Intermediaten des Dipyrrrolcarbaldehyden MBC (12) und des Monopyrrols MAP (13a) verbunden.^[119, 120] Analog zur gegabelten Biosynthese gründen daher gegenwärtig die meisten Totalsynthesen von Prodigininen weiterhin auf dem Vorteil der konvergenten Synthese und nutzen die späte Kondensation bei der C–C Knüpfung zweier Pyrrolbausteine. Die Vorteile dieser Modularen Synthesestrategie liegen auf der Hand:

1. Die Verwendung einer konvergenten Synthese kann, verglichen mit linearen Synthesen, höhere Gesamtausbeuten ermöglichen.
2. Der Aufbau von Bibliotheken für SAR Studien wird durch die Permutation eines Synthesebausteins vereinfacht.
3. Es wird eine höhere Flexibilität bezüglich möglicher Reaktionen gewährleistet, da die Anzahl der funktionellen Gruppen in den einzelnen Syntheseintermediaten reduziert ist.

Beispiele für die Entwicklung diverser Totalsynthesen von Prodigiosin (1a) wurden bereits im Kenntnisstand (2.5) thematisiert. Dabei ist zu resümieren, dass durch die bekannten Synthesen von *Rapoport* und *Holden* (1962), *Boger* und *Patel* (1988) und *Wasserman* und *Lombardo* (1989) lediglich unzureichende Gesamtausbeuten von < 1%–3% über 12–16 Schritten erzielt werden (*vide supra* Tabelle 3) konnten.^[119, 136, 137] Diese Einschränkungen sind hauptsächlich auf die umfangreichen Synthesen des MBC (12) zurückzuführen, welche durch den Einsatz einer Pd-katalysierte *Suzuki*-Kupplung von *Lavallée et al.* 2006 (*vide supra* Schema 10) aufgehoben werden konnten.^[139] Dennoch verwehren die bisher verwendeten Synthesen für den Baustein MAP (13a) eine einfache Synthese von Prodigiosin (1a), welche mit moderaten Gesamtausbeuten von 15–43% über vier bis fünf Schritten und teils komplexen mehrfach-substituierten Pyrrolen als Starteinheit keine Basis für eine optimierte Synthese darstellen. Insbesondere im Hinblick auf die Generierung von Prodigiosin (1a) Derivaten mit Modifikationen am C-Ring bilden diese strukturell sehr eingeschränkten Synthesen keinen adäquaten Ansatz für das spätere Ziel einer Mutasyntese.

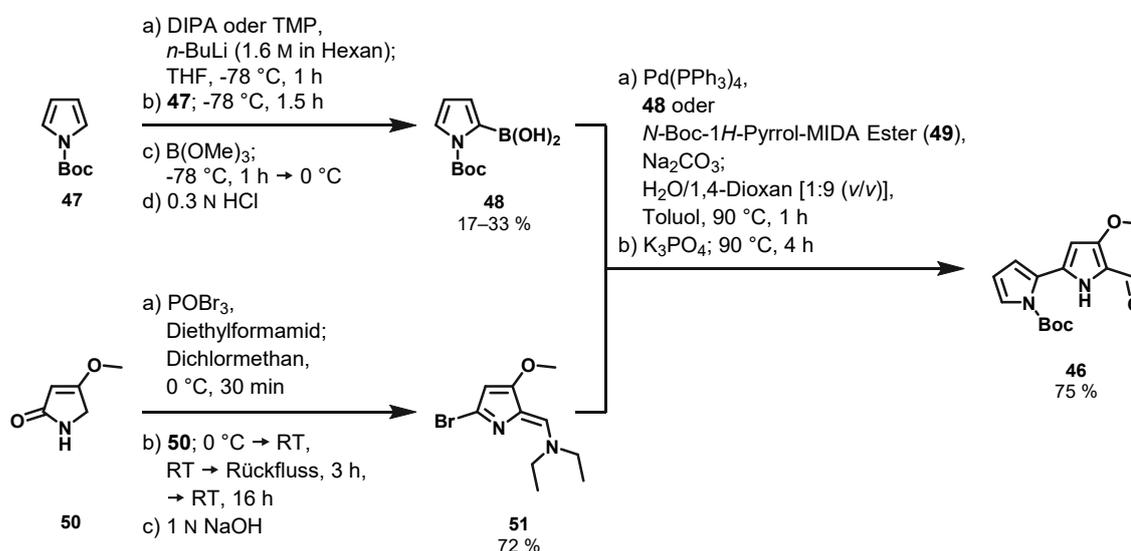
Die Ideen hinter dem nachstehenden Themenabschnitt der biomimetischen Totalsynthese eines bekannten Naturstoffes sind besonders unter dem Gesichtspunkt der Mutasyntese und der Einführung der Stoffklasse der Pyrrolalkaloide in den Arbeitskreis *Pietruszka* zu verstehen. Folgende Ziele bildeten daher den Grundstein für die Thematik dieser Arbeit:

1. Es sollte eine möglichst kurze (biomimetische) Totalsynthese von Prodigininen durch Kombination mehrerer Syntheseansätze ermöglicht werden.
2. Die Synthese des Intermediates MAP (13a) sollte im Hinblick auf die Generierung von Derivaten optimiert werden, da die Bereitstellung einer Vielzahl an Derivaten die Grundlage für die Mutasyntese bildet.

3. Die biomimetische Totalsynthese von Prodigiosin (**1a**) sollte den Zugang zu den Referenzbausteinen MAP (**13a**), MBC (**12**) und Prodigiosin (**1a**) ermöglichen.
4. Die Synthese von Prodigiosin (**1a**) sollte als Einführung der Stoffklasse der Pyrrolalkaloide in den Arbeitskreis *Pietruszka* dienen.

3.1.1 Synthese von MBC (**12**)

Die Synthese des Schlüsselintermediates MBC (**12**) bzw. seines Boc-geschützten Derivates **46** basiert auf der literaturbekannten Vorschrift von *Lavallée et al.* 2006, welche für die Herstellung von Obatoclox (**15**) entwickelt und in mehreren Prodigiosinsynthesen bereits Anwendung gefunden hat.^[76, 124, 139, 172, 173] Eine Übersicht der durchgeführten Synthese zum Boc-geschützte MBC (**46**) ist in Schema 11 dargestellt.



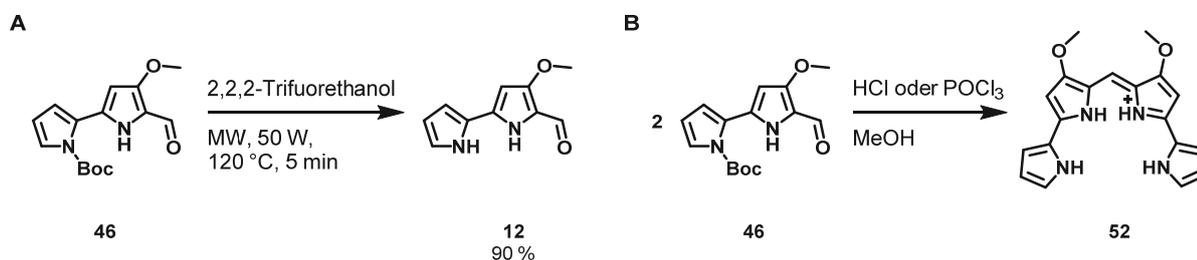
Schema 11: Konvergente Synthese des Boc-geschützten MBC (**46**). [DIPA – Diisopropylamin; TMP – 2,2,6,6-Tetramethylpiperidin; MIDA – *N*-Methyliminodiacetat]

Zunächst wird *N*-Boc-1*H*-Pyrrol (**47**) durch das *in situ* gebildete Lithiumdiisopropylamid (LDA) oder Lithium-2,2,6,6-tetramethylpiperidin (LTMP) an der 2-Position regioselektiv lithiiert. Zum einen verhindert die Boc-Schutzgruppe die Lithiierung des Stickstoffes [$pK_s(\text{Pyrrol-NH}) = 17.5$] und zum anderen erhöht sie die Regioselektivität bezüglich der α -Position durch den elektronenziehenden Effekt und die Koordination des Lithiums durch den Carbonylsauerstoff. Durch anschließende Zugabe von Trimethylborat und nachfolgende Ansäuerung wird die entsprechende *N*-Boc-1*H*-Pyrrol-2-boronsäure (**48**) freigesetzt. Die geringen Ausbeuten von 17–33% und die Instabilität der freien Boronsäure veranlassten später den Einsatz der kommerziell erhältlichen und geschützten Boronsäure *N*-Boc-1*H*-Pyrrol-MIDA Ester **49** (MIDA – *N*-Methyliminodiacetat) in der

MBC (**12**) Synthese. Diese Substitution hatte jedoch keinen Einfluss auf die Ausbeute der nachfolgenden *Suzuki*-Kupplung.

Ausgehend von 4-Methoxy-3-pyrrolin-2-on (**50**) wird das Bromamin (**51**) in einer *Vilsmeier-Haack* Haloformylierung mit Phosphoroxybromid und *N,N*-Diethylformamid in 72 % Ausbeute (Lit. 59–83 %)^[124, 130, 139, 140, 172] gewonnen. Da am Ende dieser Reaktion keine saure Aufarbeitung durchgeführt wurde, konnte die Hydrolyse zum Aldehyd vermieden werden.

Die *Suzuki*-Kupplung von *N*-Boc-1*H*-Pyrrol-2-boronsäure (**48**) und dem Bromamin **51** ergab das lagerfähige Boc-geschützte MBC (**46**) mit einer Ausbeute von 75 % (Lit. 48–95 %)^[139, 172] im Gramm-Maßstab, welches als Edukt für sämtliche Prodiginin Synthesen dieser Arbeit eingesetzt wurde. Entgegen mehrerer Literaturvorschriften wurde die Entschützung von Boc-MBC am Ende der Reaktion nicht durch einen Überschuss von HCl durchgeführt, da der geschützte Präkursor eine bessere Lagerfähigkeit aufwies, wie es bereits durch *Aldrich* 2010 und 2012 beschrieben wurde.^[172, 174] Überdies zeigte das Boc-MBC (**46**) auch eine deutlich bessere Löslichkeit in polaren und unpolaren Lösungsmitteln und war daher für Folgereaktionen einfacher einzusetzen.⁵ Die säurekatalysierte Entschützung erfolgt *in situ* bei den Prodiginin-Synthesen durch die Verwendung von HCl oder Phosphoroxychlorid. Für spätere biokatalytische *in vitro* Umsetzungen wurde die Entschützung von kleinen Mengen Boc-MBC (**46**) mit 2,2,2-Trifluorethanol in der Mikrowelle durchgeführt (Schema 12A), wodurch die Nebenreaktion der HCl-katalysierten Dimerisierung zweier MBC (**12**) bzw. Boc-MBC (**46**) Moleküle zum blauen Tetrapyrrol (**52**, Schema 12B)^[175] deutlich herabgesetzt werden konnte.



Schema 12: A) Synthese von MBC (**12**) durch Entschützung von Boc-MBC (**46**). B) Bildung des blauen Tetrapyrrols (**52**) durch Dimerisierung von Boc-MBC (**46**).

3.1.2 Synthese von MAP (**13a**) (*Trofimov*-Reaktion I)

Wie bereits in den einführenden Worten dieses Kapitels und im Kenntnisstand (2.5) erwähnt, sind die bisherigen MAP (**13a**) Synthesen, welche im Zusammenhang mit den Totalsynthesen für Prodigiosin (**1a**) und anderen Prodigininen veröffentlicht wurden, zu komplex im Hinblick auf die einfache Generierung von MAP (**13a**)-Pyrrolderivaten aus günstigen kommerziellen Startmaterialien. Die klassischen Pyrrolsynthesen, wie die *Hantzsch*-Pyrrolsynthese oder die (*Paal*)-*Knorr*-Pyrrolsynthese, bieten hier keine Alternative, da sie durch den Einsatz von 1,4-Diketonen oder β -Ketoestern

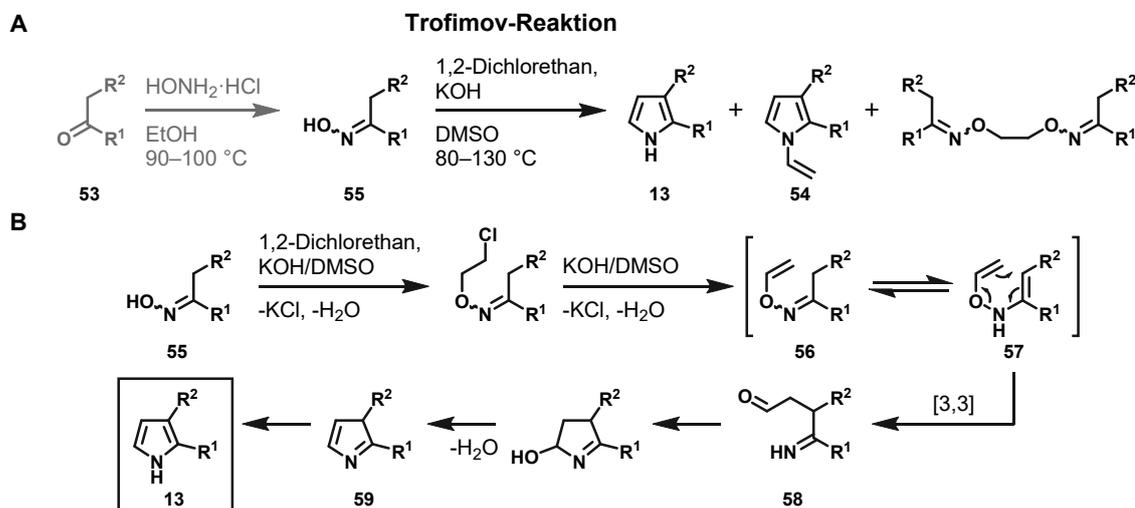
⁵ Das entschützte MBC (**12**) zeigte lediglich in DMSO eine zufriedenstellende Löslichkeit, weshalb die NMR-Spektren auch in diesem Lösungsmittel aufgenommen wurden.

zwangsläufig Carbonyl-substituierte Pyrrole als Produkt hervorbringen.^[176-178] Diese Synthesen mögen zwar bei *Boger* und *Patel* die Quelle für die 5-Methyl-2,4-dicarbonylpyrrol-Einheit gewesen sein, dennoch wären selbst für einfache Alkyl-derivate meist schon die Synthesen der Edukte von Nöten.^[136] Moderne Pyrrolsynthesen verwenden oft teure Metallkatalysatoren (Platin, Ruthenium, Gold) und komplexe Edukte, sind nur über vielstufige Synthesen zugänglich oder zielen auf hochfunktionalisierte Pyrrole ab und bilden damit keine generell einfachen Synthesen für die Generierung von Bibliotheken.^[179-181]

Allerdings wurde bereits 1985 von *Trofimov et al.*, noch vor der Synthese von *Boger* und *Patel* im Jahr 1988, eine zweistufige Synthese von MAP (**13a**) aus dem Startmaterial 2-Octanon (**53a**) vorgestellt.^{[182]⁶} Die heute nach seinem Erfinder als *Trofimov-Reaktion* benannte Synthese gilt als Paradebeispiel einer ein- bzw. zweistufigen Synthese zur Bildung von einfachen Alkyl-, Cycloalkyl-, Aryl- und Heteroaryl-substituierten Pyrrolen und bildet die Grundlage fast aller in dieser Arbeit vorgestellten Pyrrole.

Exkursion – Die *Trofimov*-Reaktion

Die *Trofimov*-Reaktion dient zur Synthese von 2-substituierten-, 2,3-disubstituierten-, *NH*- und *N*-Vinyl-Pyrrolen (**13** und **54**) durch die Reaktion von Ketoximen **55** mit 1,2-Dichlorethan oder Acetylen in einem Superbasen-System aus MOH/DMSO (M = Alkali Metall: Na, K, Li) binnen 3–5 h und wurde erstmals von *Trofimov et al.* 1973 publiziert.^[183-185] Die Produkte dieser Synthese und der allgemeine Reaktionsmechanismus mit 1,2-Dichlorethan, welches in dieser Arbeit verwendet wurde, ist in Schema 13A und B dargestellt.



Schema 13: A) Die *Trofimov*-Reaktion ausgehend von einem Keton bzw. Oxim. Die Bildung des Oxims ist hier in Grau dargestellt, da sie kein Bestandteil der eigentlichen *Trofimov*-Reaktion ist. B) Der allgemeine – von *Trofimov* vorgeschlagene – Reaktionsmechanismus mit 1,2-Dichlorethan in einem Superbase-System aus KOH/DMSO. Die hier gezeigten Reste R^1 und R^2 sind variabel.

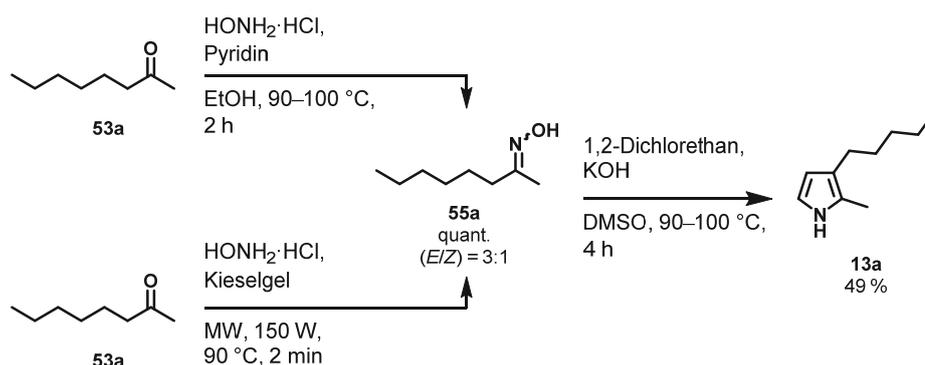
⁶ Persönliche Anmerkung d. Autors: Hier zeigt sich aller Wahrscheinlichkeit, dass der Eiserne Vorhang für den Austausch von Wissenschaft nicht förderlich war. Viele Publikationen dieser Zeit wurden erst viel später ins Englische übersetzt und waren der westlichen Welt nicht bekannt.

Die *Trofimov*-Reaktion ist obligat in einem Superbasen-System durchzuführen, welches das Acetylen bzw. das 1,2-Dichlorethan aktiviert. Eine Superbase ist ein Basenkomplex aus einer starken ionischen Base (KOH) und einer starken Lewis Base (DMSO). Die Lewis Base kann hierbei das Kation des Alkalimetalls binden und bildet einen größeren Kationenkomplex mit einer delokalisierten positiven Ladung, wodurch die Aktivität des Anions erhöht wird. Die Basenstärke steigt von $pK_s(\text{OH}^-/\text{H}_2\text{O}) = 14$ auf $pK_s(\text{OH}^-/\text{H}_2\text{O})_{\text{KOH/DMSO}} = 30\text{--}32$.^[186, 187]

Ausgehend von dem Ketoxim **55** erfolgt durch die Aktivierung des 1,2-Dichlorethans eine Vinylierung zum *O*-Vinyl-Ketoxim **56**. Nach der Tautomerisierung dieses Imins zum Enamin **57** entsteht in einer 3-Aza-4-oxa-Cope Umlagerung (eine [3,3] sigmatrope Umlagerung) das 1,4-Carbonylimin **58**. Nach *Trofimov* entsteht nach intramolekularer Zyklisierung und Kondensation von H₂O zunächst das 3*H*-Pyrrol **59**, welches sich zum 1*H*-Pyrrol **13** tautomerisiert.

Synthese von MAP (13a)

Die Synthese von MAP (**13a**) gelang in Anlehnung an die Literatur von *Trofimov et al.* 1985 in 49 % Ausbeute durch die *Trofimov*-Reaktion über zwei Schritte ausgehend von 2-Octanon (**53a**).^[182] Das Edukt der Pyrrolsynthese, das Ketoxim **55a**⁷, wurde entweder klassisch in einer Umsetzung mit Hydroxylaminhydrochlorid und Pyridin nach *Bryant und Smith* in Ethanol oder in einer lösungsmittelfreien Mikrowellenreaktion nach *Hajipour et al.* mit Hydroxylaminhydrochlorid auf Kieselgel erhalten.^[188, 189] In beiden Fällen kann das Edukt der *Trofimov*-Reaktion in quantitativen Ausbeuten in einem (*E/Z*)-Verhältnis von 3:1 gewonnen werden. Das Isomerenmischungs ist mittels Säulenchromatographie trennbar, wurde jedoch als Mischung ohne weitere Reinigung direkt in der Pyrrolsynthese eingesetzt. Über die anschließende *Trofimov*-Reaktion gelang die Synthese von MAP (**13a**) in einer Ausbeute von 49 % (Lit. 43 %)^[182] bei vollständigem Substratumsatz (Schema 14).⁸



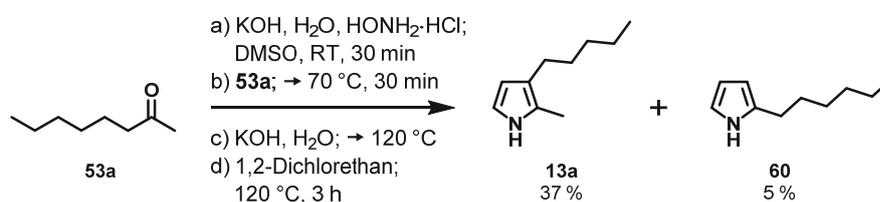
Schema 14: Herstellung von MAP (**13a**) ausgehend von 2-Octanon (**53a**) über zwei Stufen.

⁷ Allen Ketoximen dieser Arbeit wurde diese allgemeine Molekülnummer zugeordnet, da es sich um ein Intermediat der konsekutiven Pyrrolsynthese handelt. Ausgenommen sind hier explizite Erwähnungen von spezifischen Ketoximen.

⁸ Es ist anzumerken, dass die Synthese von Pyrrolen ausschließlich unter Schutzgasatmosphäre und möglichst unter Lichtausschluss erfolgte, da die Gegenwart von Sauerstoff und Tageslicht zur Bildung von Polypyrrolen führt.

Dieser Versuch zeigt zwar eine erfreulich kurze Synthese dieser sonst schwer darzustellenden asymmetrisch 2,3-dialkylierten Pyrrole aus kostengünstigen Edukten, jedoch weist sie auch einen großen Schwachpunkt der *Trofimov*-Reaktion auf. Die moderate Ausbeute des Pyrrols kann durch die möglichen Nebenprodukte dieser Pyrrolsynthesen begründet werden. Wie aus Schema 13A ersichtlich, besteht die Möglichkeit der Dimerisierung zweier Oxime nach Reaktion mit dem 1,2-Dichlorethan und einer *N*-Vinylisierung als konsekutive Reaktion nach der Pyrrolsynthese. MAP (**13a**) kann demnach als Zwischenprodukt angesehen werden, sodass eine Verbesserung der Ausbeute durch zeitlich kontrollierten Reaktionsabbruch möglich wäre. Eine zeitliche Optimierung durch Reaktionskontrolle wurde jedoch für keine Pyrrolsynthese dieser Arbeit durchgeführt. Überdies zeigt auch die Literatur, dass die Wahl des Superbasen-Systems, der Reaktionstemperatur und des Reaktanden (Acetylen oder 1,2-Dibromethan statt 1,2-Dichlorethan) einen Einfluss auf die Produktverteilung und Ausbeute haben und somit zahlreiche Möglichkeiten für eine selektive Optimierung der *Trofimov*-Reaktion für jedes einzelne Pyrrol geboten werden.^[180, 182, 187, 190, 191]

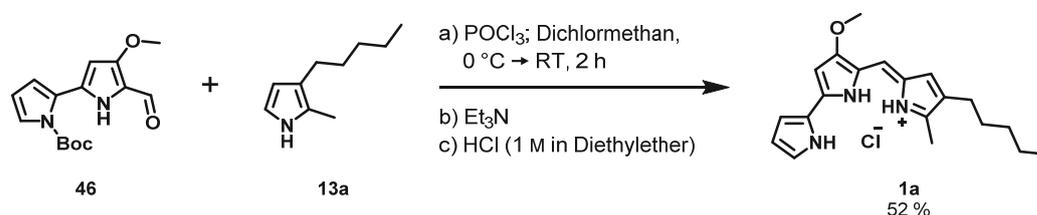
Nachdem *Trofimov et al.* 2015 eine sequentielle Eintopfsynthese von zwölf *NH*-Pyrrolen [überwiegend 2-(Hetero)aryl-1*H*-pyrrole mit Ausbeuten von 11–85 %, ausgehend von Ketonen] gezeigt hat, wurde dieser Ansatz ebenfalls für die Synthese von MAP (**13a**) angewandt.^[181] Hierbei wird die gesamte Reaktion in DMSO durchgeführt und als Base KOH für die Bildung des Ketoxims und des Pyrrols eingesetzt. Zunächst wird das Ketoxim (**55a**) in der Reaktionsfolge hergestellt und konsekutiv zum Pyrrol umgesetzt. Über diese Reaktion gelang die Synthese von MAP (**13a**) in einer Ausbeute von 37 % (Schema 15). Die Möglichkeit der Wiederverwertung von nicht umgesetzten 2-Octanonoxim (**55a**) wurde in Anbetracht des Aufwandes gegenüber dem kostengünstigen Edukt nicht in Erwägung gezogen. Als Nebenprodukt wurde die Entstehung von 2-Hexyl-1*H*-pyrrol (**60**) über die [3,3] sigmatrope Umlagerung zur Methylgruppe beobachtet, welches jedoch nach einer säulenchromatographischen Reinigung in Anteilen vom Produkt getrennt werden konnte. Die Bildung des Nebenproduktes konnte in der zweistufigen Synthese hingegen nicht beobachtet werden.



Schema 15: Herstellung von MAP (**13a**) ausgehend von 2-Octanon (**53a**) über eine Stufe.

3.1.3 Kondensationsreaktion zu Prodigiosin (1a)

Der finale Schritt der Totalsynthese von Prodigiosin (**1a**) besteht in der Kondensation des Bipyrrrolaldehyds MBC (**12**) und des Monopyrrols MAP (**13a**), welche in der Natur durch das Enzym PigC (*vide supra* 2.4.4) katalysiert wird. Synthetisch wird diese Reaktion oftmals durch Säurekatalyse vorangetrieben. Seit einigen Jahren wird für die Kondensation zu Prodigininen oder ähnlichen Strukturen auch Phosphoroxchlorid eingesetzt, welches als Intermediat der Reaktion einen aktivierten Chlorphosphatester bildet und somit als gute Abgangsgruppe eingesetzt wird.^[192-194] Diese Reaktion wurde bereits 1977 von *van Koeveringe* und *Lugtenburg* für die Synthese von 2-(2-Pyrrylmethyl)-2H-pyrrolen vorgestellt, welche das Grundmotiv des Pyrrolylpyromethen-Chromophors darstellt.^[195] Unter den Bedingungen, wie sie von *Yu et al.* 2012 beschrieben wurden, konnte die Kondensation zu Prodigiosin (**1a**) mit Boc-MBC (**46**) mit einer Ausbeute von 52 % durchgeführt werden (Schema 16).^[193]



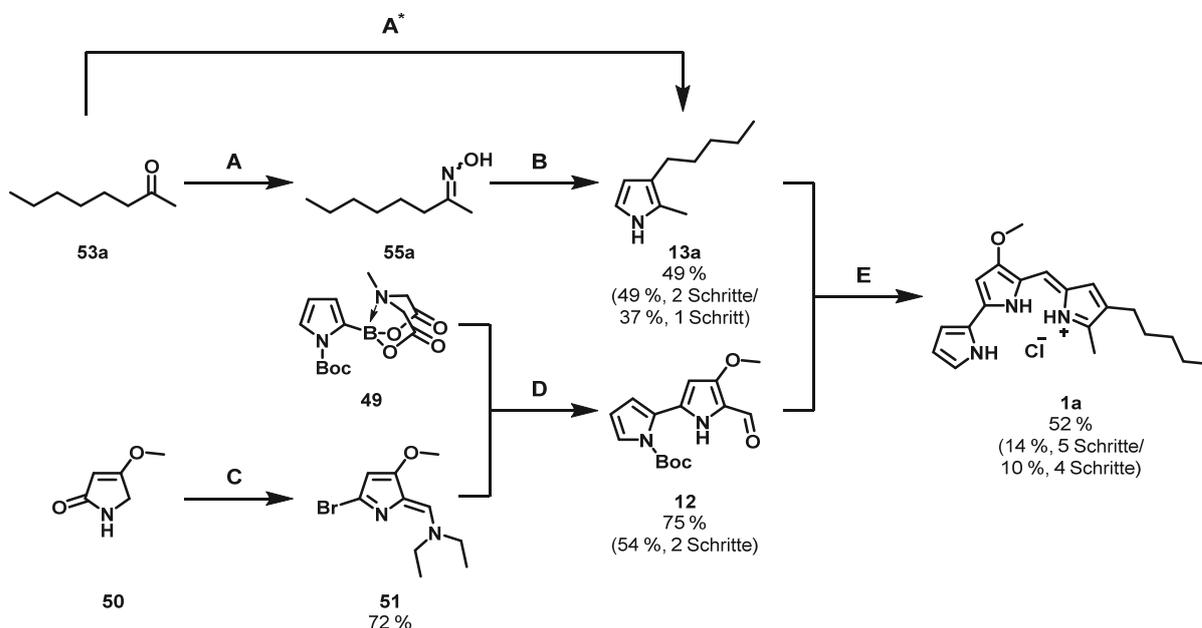
Schema 16: Kondensationsreaktion von Boc-MBC (**46**) und MAP (**13a**) zu Prodigiosin (**1a**).

Als Nebenprodukte dieser Reaktion treten die bereits erwähnten Dimere des MBC (**12**) (*vide supra* 3.1.1) und auch Polymere des Monopyrrols auf. Durch die Ausfällung als Hydrochlorid kann das Prodigiosin (**1a**) als stabiler tiefroter Feststoff, welcher leicht bläulich schimmert, erhalten werden. Prodigiosin (**1a**) lag in der oben gezeichneten (*Z*)-Konfiguration vor, da durch die Protonierung der Chelatkomplex mit dem Chloridanion bevorzugt wird (Schema 16). Die Charakterisierung dieser Verbindung wird im nachfolgenden Kapitel der Biosynthese von Prodigiosin (**1a**) in *P. putida* KT2440 (3.2) aufgegriffen.

3.1.4 Zusammenfassung der biomimetischen Totalsynthese von Prodigiosin (1a)

Zusammenfassend konnte durch die Verwendung der *Trofimov*-Reaktion in Kombination mit der MBC (**12**) Synthese von *Lavallée et al.* die bisher kürzeste biomimetische Totalsynthese von Prodigiosin (**1a**) über fünf Schritte mit einer Gesamtausbeute von 14 % ermöglicht werden (Schema 17; vergleiche Kapitel 2.5 und Tabelle 3).^[139] Überdies eröffnet sich durch den modularen Aufbau dieser Synthesestrategie und der einfachen Modifikation der kostengünstigen Edukte der Pyrrolsynthese die Möglichkeit der Bildung von Prodigiosin (**1a**) Derivaten. Eine weitere Reduzierung der Syntheseschritte auf insgesamt vier war durch eine sequentielle Eintopfsynthese der Pyrrole möglich, wie sie *Trofimov et al.* 2015 beschrieben haben.^[181] In diesem Ansatz erfolgte die gesamte Reaktion in DMSO und anstatt Pyridin wird direkt KOH als Base eingesetzt. Dies führte allerdings neben

der Reduktion der Syntheseschritte zusätzlich zu einer Verminderung der Gesamtausbeute auf 10%. *Trofimov et al.* führen auf, dass auch hier eine zeitliche Kontrolle des Versuchsverlauf über Gaschromatographie für eine möglichst hohe Ausbeute erforderlich ist.



Schema 17: Biomimetische Totalsynthese von Prodigiosin (**1a**). Folgende Reaktionsbedingungen wurden verwendet: **A**) $\text{HONH}_2 \cdot \text{HCl}$, Pyridin; in EtOH, 2 h 90–100°C; **A***) in DMSO a) KOH, $\text{HONH}_2 \cdot \text{HCl}$, H_2O ; 30 min RT, b) 2-Octanon (**53a**); 30 min 70°C, c) KOH, H_2O ; 70°C → 120°C, d) 1,2-Dichlorethan; 3 h 120°C; **B**) 1,2-Dichlorethan, KOH; in DMSO, 4 h 90–100°C; **C**) in Dichlormethan, a) POBr_3 , Diethylformamid; 30 min 0°C, b) 4-Methoxy-3-pyrroline-2-on (**50**); 0°C → RT, 3 h reflux, 16 h RT, c) 1 N NaOH; **D**) in H_2O /Dioxan 1:9 (v/v) und Toluol, a) $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, Na_2CO_3 ; 1 h 90°C, b) K_3PO_4 ; 4 h 90°C; **E**) in Dichlormethan, a) POCl_3 , 2 h 0°C → RT, b) Et_3N , c) 1 M HCl in Diethylether. Für die Reduzierung der MAP (**13a**) Synthese auf einen Schritt wurde die im Text erwähnte sequentielle Eintopfsynthese verwendet (**A***).

3.1.5 Synopsis des Kapitels

1. Es konnte die bisher kürzeste biomimetische Totalsynthese von Prodigiosin (**1a**) über fünf Schritte mit einer Gesamtausbeute von 14% respektive über vier Schritte mit 10% ermöglicht werden.
2. Der modulare Aufbau der Synthese erlaubte den Zugang für weitere Prodigiosin (**1a**) Derivate dieser Arbeit und die Schlüsselintermediate MAP (**13a**) und MBC (**46**).
3. Die Einführung der *Trofimov*-Reaktion für die Synthese des Schlüsselintermediates MAP (**13a**) ermöglichte die Darstellung dieses Bausteins über 2 Schritte aus einem kostengünstigen Keton mit einer Gesamtausbeute von 49% und bereitete den Zugang zu 18 weiteren Pyrrolbausteinen dieser Arbeit.

3.2 Heterologe Biosynthese von Prodigiosin (1a) in *Pseudomonas putida* KT2440

Die natürlichen Produzenten von Prodigininen sind, wie bereits anfänglich beschrieben (2.3.1), sowohl gramnegative als auch grampositive Bakterien aus diversen Habitaten. Unbestritten ist der Umstand, dass ein Großteil der natürlich vorkommenden Bakterien entweder gar nicht oder nur unter speziellen Bedingungen in einem mikrobiologischen Labor angezogen werden können und somit die Produktion von Naturstoffen erschwert wird.^[196] Zusätzlich muss bei der Kultivierung im Laborbereich auf die Einhaltung von rechtlichen Grundlagen bezüglich der biologischen Sicherheit geachtet werden. Hierdurch ergeben sich allerdings nicht nur Rahmenbedingungen für die Produktion von Naturstoffen durch lebende Organismen, sondern auch für die weitere Verwendung dieser Produkte z. B. im Pharma-, Kosmetik- und Lebensmittelbereich. Im Hinblick auf die Produktion und Verwendung von Prodigiosin (1a) ist der bekannteste natürliche Produzent *Serratia marcescens* zwar unter gängigen Laborbedingungen kultivierbar, er ist allerdings nach der rechtlichen Grundlage der Biostoffverordnung (*BioStoffV*) in Deutschland in die Risikogruppe 2 einzuordnen.⁹ *S. marcescens* ist putativ humanpathogen, jedoch ist das Risiko für das Hervorrufen von Krankheiten und die Verbreitung in der Bevölkerung unwahrscheinlich. Eine andere große Klasse der Prodiginin Produzenten sind *Actinomyceten* der Familie der *Streptomycetaceae*. Diese sind zwar meist unter Laborbedingungen gut kultivierbar und oftmals auch, wie z. B. *Streptomyces coelicolor* A3(2), der Risikogruppe 1 zugeordnet, allerdings spricht eine durchschnittliche Verdopplungszeit von 4–6 h gegen eine ökonomische Nutzung als Produktionswirt.^[197]

Unter dem Gesichtspunkt einer sicheren und ökonomisch vertretbaren biotechnologischen Produktion von Prodigiosin (1a) als Vertreter der Prodiginine, insbesondere auch im Hinblick auf spätere Anwendungsprofile für den Naturstoff, waren folgende Ziele für den nächsten Projektabschnitt zu benennen:

1. Es sollte ein geeigneter Laborstamm der Risikogruppe 1 für die Produktion von Prodigiosin (1a) gewählt werden.
2. Durch die genomische Integration des Biosyntheseclusters aus *S. marcescens* sollte die heterologe Produktion von Prodigiosin (1a) ermöglicht werden.
3. Die Produktion von Prodigiosin (1a) und den Einfluss auf den Organismus sollte evaluiert werden.
4. Die Erkenntnisse über den Produktionsstamm und die Entwicklung der Produktreinigung (engl. *downstream processing*) und Analytik dienen als Grundlage für den späteren Einsatz bei der Mutasynthese.

⁹ Stand März 2013

3.2.1 Konstruktion der Prodigiosin (1a) Produktionsstämme mittels TREX-System

Der Wahl eines geeigneten Organismus für die heterologe Produktion von Prodigiosin (1a) lagen mehrere Kriterien zugrunde. Der entsprechende Organismus musste der Risikogruppe 1 entsprechen, die Kultivierung unter Standardbedingungen im Labor möglich und durch gängige gentechnische Werkzeuge manipulierbar sein. Demgegenüber steht bei jeder heterologen Produktion von Naturstoffen die Bereitstellung von metabolischen Präkursoren und die Synthese der Proteine im Wirtssystem. Eine unterschiedliche Codonnutzung (engl. *codon usage*) zwischen dem ursprünglichen Organismus und dem heterologen Wirt kann bereits zur Fehlfaltung der Proteine und somit zu inaktiven Enzymen führen.^[198] Neben den Präkursoren für den neuen Biosyntheseweg müssen auch für die Enzyme die entsprechenden Kofaktoren bereitgestellt werden. Doch selbst wenn all diese Rahmenbedingungen erfüllt sind, kann der Wirtsorganismus durch die Produktion des Naturstoffes neuen physiologischen und physikochemischen Bedingungen gegenübergestellt sein. Insbesondere für die Produktion von Antibiotika und zytotoxischen Substanzen, aber auch für die extrazelluläre Supplementierung von Präkursoren in Lösungsmitteln, muss eine entsprechende „Robustheit“ des Produktionsstamms vorliegen.

Für die Konstruktion eines Prodigiosin (1a) produzierenden Organismus wurde das gramnegative Bodenbakterium *Pseudomonas putida* verwendet. Dieses Bakterium erfüllt die meisten oben genannten Kriterien und entwickelte in den letzten Jahren analog zu *E. coli* eine hohe Verbreitung als Laborstamm und zeigt auch ähnliche Verdopplungszeiten. Insbesondere der Stamm KT2440, welcher GRAS (engl. *generally recognized as safe*)-zertifiziert ist und somit von der *Food and Drug Administration* (FDA) für den Einsatz in der Lebensmittelindustrie und als Lebensmittelzusatzstoff zugelassen und als unbedenklich deklariert ist, findet auch außerhalb der Laborumgebung in der Industrie Anwendung.^[199] Neben der vollständigen Sequenzierung des Genoms ist auch der Metabolismus intensiv charakterisiert worden.^[147, 200-202] Zusätzlich verfügt das Bakterium über eine hohe Toleranz gegenüber Antibiotika und organischen Lösungsmitteln.^[203, 204] *P. putida* wurde bereits für die rekombinante Biosynthese von Naturstoffen wie von Aminosäuren abgeleitete Bausteine, nichtribosomale Peptide, Polyketide, Rhamnolipide und Terpene eingesetzt und wird in der synthetischen Biologie als idealer *Chassis*-Stamm und einer der „Nachfolger“ für die Laborstämme von *E. coli* angesehen.^[199, 205] *Loeschke et al.* konnten 2013 bereits die Produktion von analytischen Mengen Prodigiosin (1a) in *P. putida* KT2440 unter Kontrolle eines T7-Promotors zeigen.^[206]

Die Konstruktion des Prodigiosin (**1a**) produzierenden *P. putida* KT2440 wurde von Dr. *Andreas Domröse* aus dem Institut für Molekulare Enzymtechnologie (IMET) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf über das in ebendiesem Institut entwickelte *Transfer and Expression System* (TRES-System) in Rahmen seiner Promotion durchgeführt.^[5, 207] Das TRES-System dient der randomisierten Integration von Genclustern in das Genom eines gramnegativen Wirtes. Es besteht aus den Genkassetten L-TRES und R-TRES, welche jeweils alle genetischen Elemente für die Insertion des genetischen Materials tragen (Abbildung 10A).^[206, 208] Der Ablauf für die TRES-System basierte Genomintegration ist in Abbildung 10B dargestellt. Zunächst wurde der *pig Cluster* für Prodigiosin (**1a**) aus *S. marcescens* durch die beiden Genkassetten in einem Plasmid flankiert, welches einen Replikationsursprung (*ori*; engl. *origin of replication*) für *E. coli* trägt. Anschließend wurde dieses Konstrukt in den Donor *E. coli* S17-1 durch Transformation übertragen (Schritt 1).^[209] Mittels horizontalen Gentransfer durch Konjugation wird das Plasmid ausgehend vom Konjugationsursprung (*oriT*; engl. *origin of transfer*), welcher durch die L-TRES Kasette eingebracht wurde, in den Rezipienten *P. putida* KT2440 übertragen (Schritt 2). Die randomisierte Integration des Genclusters erfolgte durch eine Tn5 Transposase der R-TRES Kasette (*tnp* Gen); dabei ist der für die Transposition verwendete Genabschnitt durch Gensequenzen (OE; engl. *outer end*) markiert. Durch diese Begrenzung wurde der *oriT* nicht in das Genom übertragen und eine weitere Konjugation wird unterbunden. Ebenfalls wurde nur die Gentamicin Resistenz (Gm^R), nicht aber die für Tetracyclin (Tc^R) in das Genom integriert, sodass für die potentiellen Produktionsstämme eine Positiv-Selektion auf Gentamicin und eine Negativ-Selektion auf Tetracyclin durchgeführt werden konnte. Auch wenn durch die T7-Promotoren eine T7 RNA Polymerase induzierte Transkription möglich ist, konnten unter 2000 Kolonien nach der Konjugation bereits zwei Stämme mit einem roten Phänotyp selektiert werden (*P. putida pig-r1* und *P. putida pig-r2*, *vide infra* Abbildung 15A). Dieser Phänotyp lässt eine randomisierte Integration des Prodigiosin (**1a**) *pig Clusters* hinter einem starken wirtseigenen, konstitutiven Promotor vermuten. Durch das Einbringen eines Plasmids (pML5-T7), welches für eine T7 RNA Polymerase kodiert, in die verbleibenden weißen Phänotypen konnte ein Produktionsstamm unter Kontrolle der T7-Promotoren erzeugt werden (*P. putida pig-w1*). Nach Induktion mit IPTG zeigte dieser eine schwächere Rotfärbung als die konstitutiv produzierenden Stämme (*vide infra* Abbildung 15A).

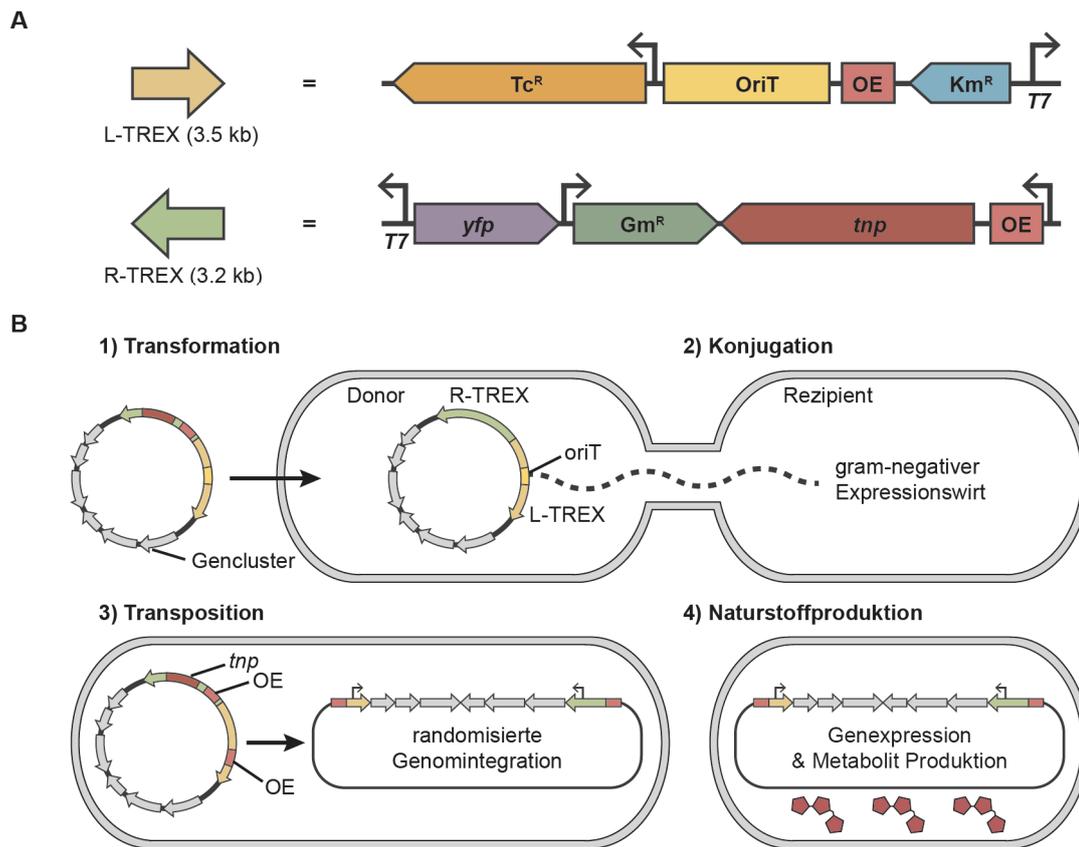


Abbildung 10: Das *Transfer and Expression System* (TREX-System) für die randomisierte Integration von Genclustern in Expressionswirte. **A)** Genkassetten des TREX-Systems L-TREX und R-TREX. Folgende Kodierung wird verwendet: Tc^R – Gen für Tetracyclin Resistenz; oriT – *origin of Transfer*; OE – *outer end*, Begrenzungssequenz der Transposition; Km^R – Gen für Kanamycin Resistenz; *yfp* – Gen für das gelb fluoreszierende Protein; Gm^R – Gen für Gentamicin Resistenz; *tnp* – Gen für die Transposase Tn5; T7 – T7 Promotor. **B)** Ablauf der randomisierten Integration eines Genclusters mittels TREX-System ausgehend von einem durch die TREX-Kassetten flankierten Gencluster.

Dr. *Andreas Domröse* hat überdies eine Lokalisation des Insertionsortes der konstitutiv produzierenden Stämme mittels *plasmid rescue* und PCR durchgeführt.¹⁰ Der Insertionsort des *pig Clusters* im Produktionsstamm *P. putida pig-r1* befindet sich in der 23S-rRNA kodierenden Sequenz des rRNA Operons B und im Stamm *P. putida pig-r2* in der 16S-rRNA kodierenden Sequenz des rRNA Operons C. Der Insertionsort der rRNA kodierenden Regionen spricht für die konstitutive Produktion von Prodigiosin (**1a**), da diese Regionen zeitlich über den gesamten Lebenszyklus der Zelle abgelesen werden. Da die Transkription dieser *Loci* insbesondere in der Wachstumsphase zur Bereitstellung von Proteinen besonders hoch ist, kann eine Korrelation bezüglich der Produktionsrate von Prodigiosin (**1a**) und der Wachstumskurve der Bakterien beobachtet werden. Dieser Zusammenhang wird im Folgekapitel 3.2.2 diskutiert und im Kapitel 3.3.3 der Mutasyntese erneut aufgegriffen. Möglicherweise korreliert die Prodigiosin (**1a**) Produktion mit der Ableserate dieses

¹⁰ Detaillierte Angaben zu den Methoden, die Ergebnisse der exakten Lokalisation und des Zusammenhang zwischen Abstand zum Promotor und Produktionsleistung können in seiner Dissertationsschrift eingesehen werden.^[207]

Genlocus. Durch die Konstruktion von weiteren 50 konstitutiv produzierenden *P. putida* Stämmen konnte Dr. Andreas Domröse eine Transposition des *pig Clusters* in die 16S- oder 23S-rRNA kodierenden Sequenzen bei 48 Stämmen beobachten. Dabei waren die Insertionsorte über die insgesamt 7 rRNA Operons von *P. putida* KT2440 verteilt und eine Korrelation bezüglich der Entfernung des *Clusters* zum Promotor und der Produktionsleistung von Prodigiosin (**1a**) (ein kurzer Abstand erhöhte die Produktion) konnte gezeigt werden.^[201, 207] Diese Ergebnisse sprechen für eine zukünftige Nutzung solcher Insertionsorte für die Produktion von Naturstoffen. Die 50 Produktionsstämme (*P. putida* pig-r3–52) sind nicht Gegenstand der in dieser Arbeit verwendeten Stämme.

3.2.2 Heterologe Produktion und Charakterisierung des Naturstoffes Prodigiosin (**1a**) aus *P. putida* KT2440

Für die Analyse der von den beiden Stämmen *P. putida* pig-r1 und *P. putida* pig-r2 produzierten roten Pigmente und eine spätere Charakterisierung dieser Naturstoffe sowie deren Quantifizierung wurden zunächst Vergleiche mit den biologischen und chemischen Referenzsubstanzen vorgenommen und essentielle Analytik entwickelt. Im Hinblick auf die zukünftige Produktion von Prodigiosin (**1a**) Derivaten wurden unterschiedliche literaturbekannte Methoden für die Extraktion, Charakterisierung und Evaluation der Produktionsleistung untersucht, um gängige Standards zu etablieren. An dieser Stelle sollen daher nur die wichtigsten und zielführenden Ergebnisse zusammengefasst und erläutert werden; explizite Versuchsbeschreibungen und ausführliche Erläuterungen oder Herleitungen sind dem Methoden-Kapitel und insbesondere dem speziellen Experimententeil (6 bzw. 6.7) zu entnehmen.

Zunächst wurde die für Farbpigmente prädestinierte Methode der Absorptionsspektroskopie für die Evaluierung der produzierten Naturstoffe eingesetzt. In Abbildung 11 sind die Absorptionsspektren von bakteriellen Extrakten aus den beiden konstruierten *P. putida* Stämmen im Vergleich mit einem Extrakt aus dem natürlichen Produzenten *S. marcescens* und dem zuvor chemisch synthetisiertem Prodigiosin (**1a**) gezeigt. Alle hier dargestellten Absorptionsspektren sind in acidem EtOH [4 % (v/v) 1 N HCl in EtOH] aufgenommen, welches das in der Literatur vorherrschende Lösungsmittel für die spektroskopische Untersuchung von Prodigininen darstellt (auf den Einfluss von unterschiedlichen Lösungsmitteln und dem pH-Wert bezüglich der Absorptionsspektroskopie wird in einem späteren Abschnitt dieses Kapitels näher eingegangen).^[42, 91, 113, 210] In dieser sauren Umgebung zeigten die bakteriellen Pigmente aus den *P. putida* Stämmen ein identisches Absorptionsverhalten im Vergleich zu den beiden Referenzspektren. Das Absorptionsmaximum von $\lambda_{\max} = 535$ nm bestimmte die rote Farbigekeit dieser Verbindungen; zusätzlich war eine hypsochromen Schulter eines energetisch höheren Energieübergangs bei ca. $\lambda = 507$ nm in allen Spektren zu erkennen.

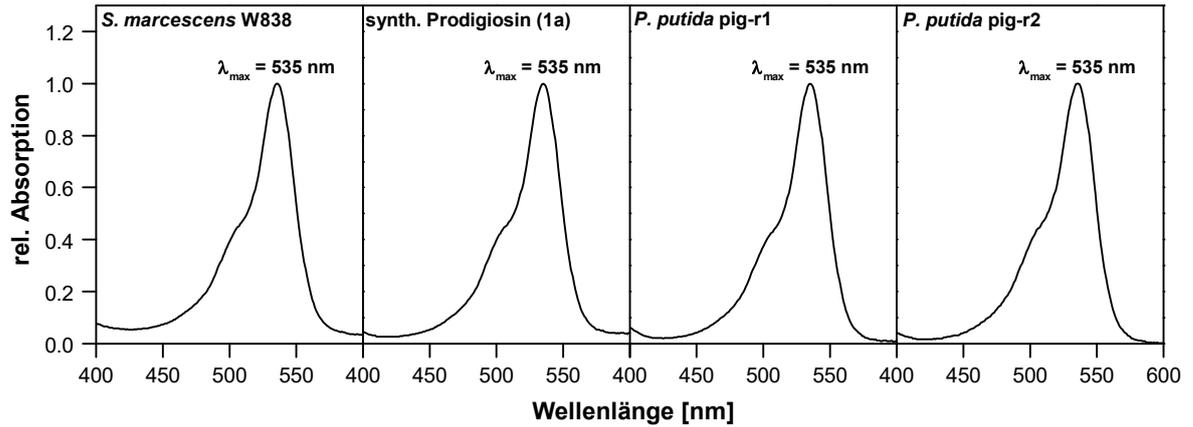


Abbildung 11: Absorptionsspektren von bakteriell extrahiertem Prodigiosin (1a) aus *S. marcescens* W838, *P. putida* pig-r1 und *P. putida* pig-r2 sowie synthetisch hergestelltem Prodigiosin (1a). Die Spektren wurden in acidem EtOH aufgenommen. Die Absorptionsmessung für *S. marcescens* W838 wurde im Rahmen der Dissertation von Dr. Andreas Domröse durchgeführt.^[207]

Da dieses Verhalten ebenso andere (Alkyl)derivate vom Prodigiosin zeigen, welche ebenfalls die Azafulven-Kernstruktur des B- und C-Rings enthalten (Schema 18A und B), erfolgte weitere Abgleiche mit der chemischen Referenz über Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) und hochauflösender Massenspektrometrie (HRMS) (Abbildung 12, exemplarisch ist hier das Pigment aus *P. putida* pig-r1 gezeigt). Die absolute Strukturbestimmung erfolgte anschließend mittels NMR-Spektroskopie. Die roten Pigmente der *P. putida* Stämme konnten eindeutig als Prodigiosin (1a) identifiziert werden.

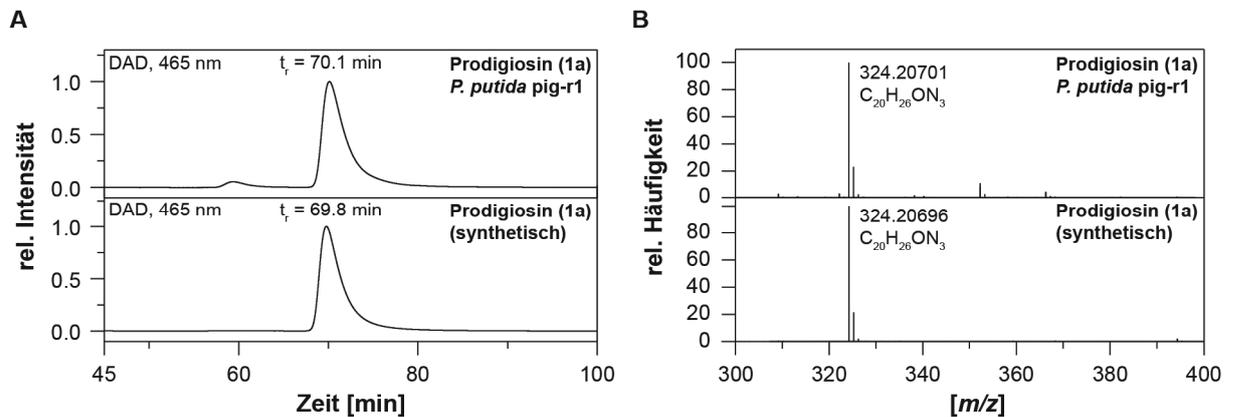


Abbildung 12: HPLC (A) und HRMS (B) Messungen zum Vergleich des Pigments aus *P. putida* pig-r1 und des chemisch synthetisierten Prodigiosins (1a). Die Messparameter können dem Methodenteil entnommen werden (6.3).

Das aus den bakteriellen Produktionsstämmen und der chemischen Synthese gewonnene Prodigiosin (1a) wurde anschließend physikochemisch charakterisiert. Die Schwerpunkte bildeten hierbei das unterschiedliche Absorptionsverhalten in verschiedenen Lösungsmitteln und bei verschiedenen pH-Werten.

3.2.2.1 Charakterisierung von Prodigiosin (1a)

Zunächst wurde die Phänomenologie der Farbgebung bei unterschiedlichen pH-Werten und die Messung des apparenten pK_s -Wertes nach einer von *Melvin et al.* 2002 beschriebenen spektrophotometrischen Methode analysiert.^[91] Als Tripyrrole mit der Azafulven-Gruppe sind die Prodiginine leicht basisch und können daher Protonen aufnehmen. Die freie Base (A) absorbiert bei ca. $\lambda = 460\text{--}480$ nm (Farbeindruck gelb) und die protonierte Spezies (AH^+) bei $\lambda = 530\text{--}540$ nm (Farbeindruck rot). Mittels einer UV-Vis Titration (Abbildung 13A) konnten das Absorptionsverhalten und die Farbigekeit von Prodigiosin (1a) bei verschiedenen pH-Werten in wässriger Umgebung untersucht werden. Da das Tripyrrol in Wasser nahezu unlöslich ist, wurden 10 % (v/v) EtOH als Löslichkeitsvermittler eingesetzt. In diesem wässrigen System besitzt die protonierte Spezies ein λ_{\max} bei 532 nm und die freie Base bei 478 nm; der isosbestische Punkt liegt bei $\lambda = 494$ nm. Der apparente pK_s -Werte wurde über eine logistische Funktion mit $pK_s = 8.2 \pm 0.3$ bestimmt (Abbildung 13B), welcher mit den in der Literatur bestimmten Werten von 8.2 und 7.98 ± 0.02 in Wasser/Acetonitril (1:1) Gemischen übereinstimmt.^[91, 95] In den pH-Bereichen von wässrigen, gepufferten Kulturmedien (TB-Flüssigmedium: $pH \approx 7.2$) wird das von Bakterien produzierte Prodigiosin (1a) daher einen orangeroten Farbton als Mischfarbe annehmen. Eine Quantifizierung ist daher nur im basischen oder sauren Milieu oder am isosbestischen Punkt sinnvoll möglich.

Der Einfluss auf die chromophoren Eigenschaften der Prodiginine wird allerdings nicht nur vom pH-Wert im wässrigen Medium bestimmt, sondern auch vom Lösungsmittel selbst. So ist in Abbildung 13C und D der Einfluss unterschiedlicher Lösungsmittel auf die Farbigekeit von Prodigiosin (1a) dargestellt. Hier ist neben einem leichten solvatochromen Effekt, welcher im Anschluss näher betrachtet wird, der starke Einfluss der Polarität der Lösungsmittel erkennbar. In aprotisch-unpolaren Lösungsmitteln mit niedriger Permittivität kann die protonierte Spezies AH^+ nicht deprotoniert werden, da eine Solvatation der Ionen schwer möglich ist, sodass der rote Farbeindruck hier dominiert. Die Löslichkeit von Prodigiosin (1a) ist daher auch in den Lösungsmitteln mit $\epsilon_r \leq 5$ sehr niedrig. In aprotisch-polaren Lösungsmitteln und protischen Lösungsmitteln ist die Solvatation deutlich einfacher und es stellt sich meist ein Gleichgewicht zwischen der protonierte Spezies und der freien Base ein. Bei DMSO, dem Lösungsmittel mit der höchsten relativen Permittivität $\epsilon_r = 46.68$ in diesem Lösungsmittelscreening, verschiebt sich das Gleichgewicht vollständig auf die Seite der freien Base. Für photometrische Quantifizierungen sollte daher ein Lösungsmittel gewählt werden, welches das Kriterium der Löslichkeit erfüllt, jedoch keinen starken Einfluss auf das Protonierungsgleichgewicht besitzt. Dies ist für EtOH der Fall, welches durch seine Wassermischbarkeit zudem leicht angesäuert werden kann und somit das Gleichgewicht zur freien Base unterbindet. Deshalb wurde für diese Arbeit das bisher in der Literatur gängige acide EtOH [4 % (v/v) 1 N HCl in EtOH] als Lösungsmittel für photometrische Untersuchungen durchgängig verwendet. Der bereits erwähnte solvatochrome Effekt wurde anhand des chemisch synthetisierten Hydrochlorids des Prodigiosins (1a) in den zuvor verwendeten Lösungsmitteln untersucht. Durch die Verwendung des Hydrochlorids steigt in den polaren Lösungsmitteln die Konzentration der solvatisierten Protonen, zugleich liegt das Prodiginin in den unpolar-protischen Lösungsmitteln dauerhaft protoniert vor, wodurch nur die rote Spezies vorliegt. In Abbildung 13E und Tabelle 32 (Anhang) sind die Absorptionsmaxima λ_{\max} abgetragen; die

maximale Differenz mit $\Delta\lambda_{\max} = 17$ nm kann zwischen Acetonitril und DMSO gemessen werden. Dieser solvatochrome Effekt ist ebenfalls für die gelbe Spezies A zu beobachten (Anhang: Tabelle 32).

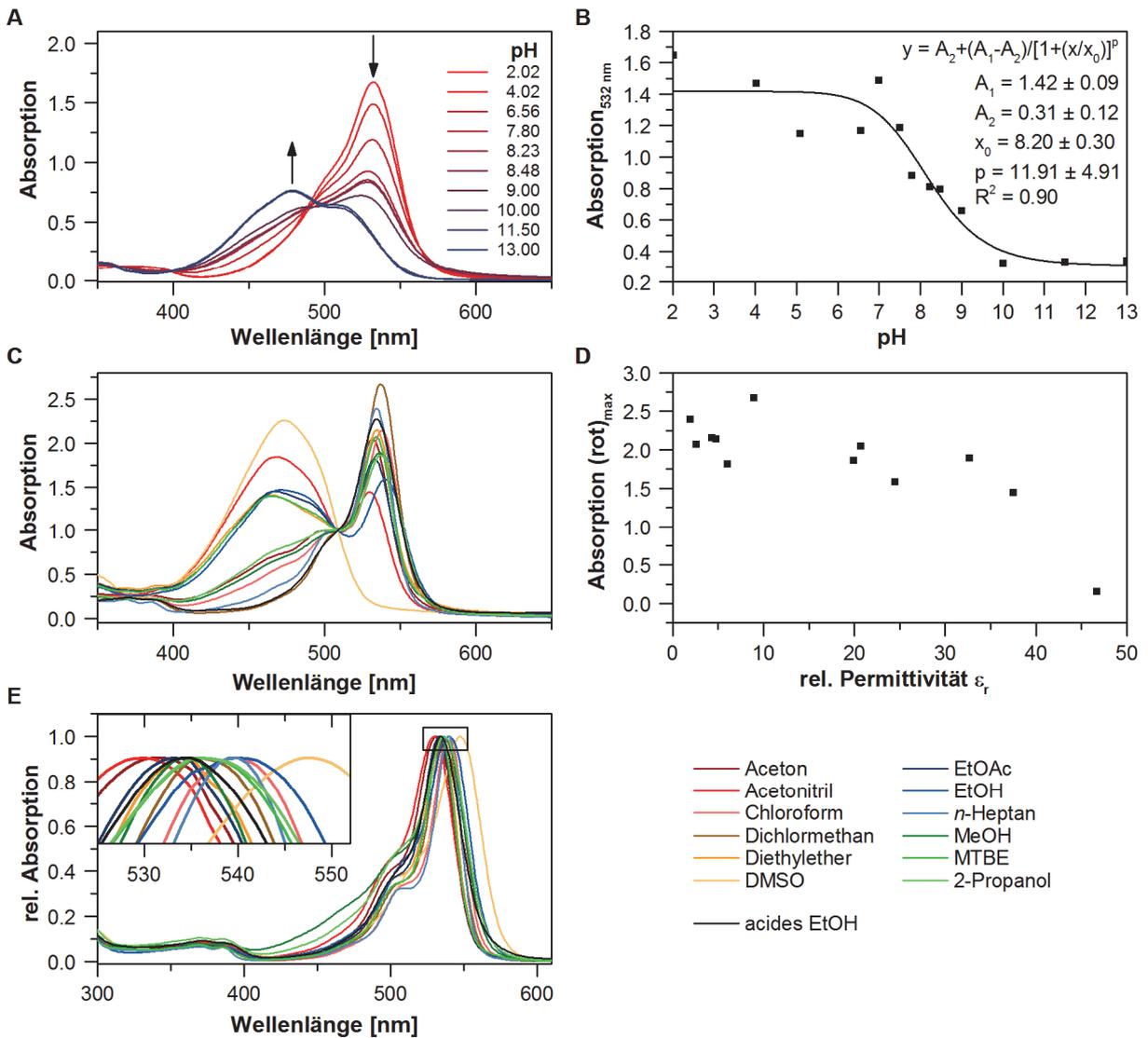
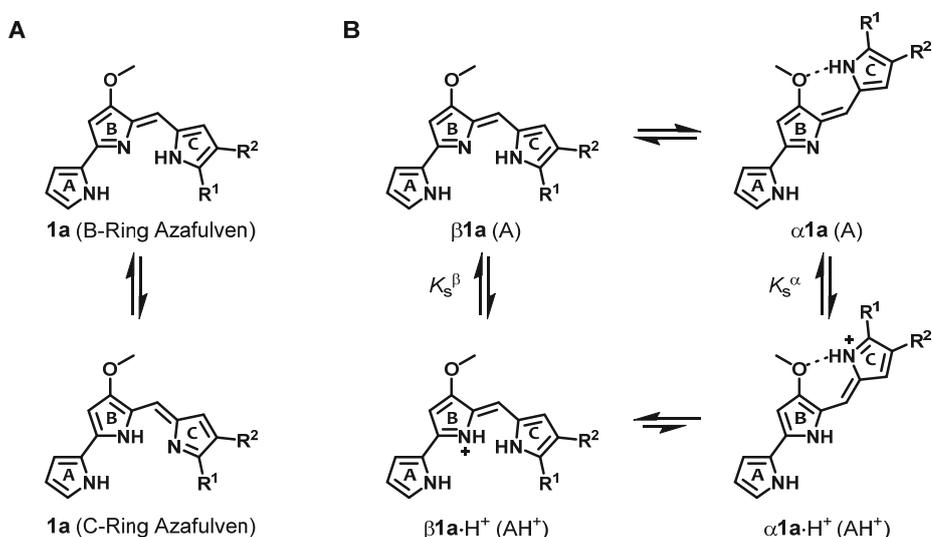


Abbildung 13: Charakterisierung von Prodigiosin (**1a**) bezüglich des Einflusses des pH-Wertes und verschiedener Lösungsmittels auf die chromophoren Eigenschaften. **A)** Absorptionsverhalten bei verschiedenen pH-Werten in wässriger Lösung [10 % (v/v) EtOH]. **B)** Bestimmung des pK_s-Wertes in wässriger Lösung [10 % (v/v) EtOH] anhand der Absorption bei $\lambda = 532$ nm. [logistische Funktion: A₁ – obere Asymptote; A₂ – untere Asymptote; x₀ – x-Koordinate des Mittelpunkts der sigmoidalen Kurve; p – Steigung in x₀] **C)** Absorptionsverhalten von Prodigiosin (**1a**) in verschiedenen Lösungsmitteln. **D)** Abhängigkeit der Absorption $\lambda_{\max}(\text{rot})$ von der relativen Permittivität ϵ_r der verwendeten Lösungsmittel. **E)** Absorptionsverhalten des Hydrochlorids von Prodigiosin (**1a**) in verschiedenen Lösungsmitteln.

Den beschriebenen phänomenologischen Effekten liegt neben dem Einfluss der Protonierung auch die Möglichkeit der Isomerisierung der Prodiginine zugrunde. Sowohl die protonierte Spezies als auch die freie Base können als α - oder β -Isomer vorliegen (Schema 18B), wobei das α -Isomer durch eine intramolekulare Wasserstoffbrücke stabilisiert wird.^[88, 91, 94, 111] Das relative Verhältnis beider Isomere

ist zum einen vom Lösungsmittel und zum anderen vom pH-Wert abhängig, da beide Isomere unterschiedliche pK_s -Werte besitzen.^[111] Dies hat neben dem Einfluss auf die Absorption auch eine Einwirkung auf HPLC- und NMR-Untersuchungen, da die verschiedenen Spezies unterschiedliche Signalsätze hervorrufen und somit die deutlich differierenden NMR-Spektren in der Literatur erklärt werden können.¹¹ Beide Isomere sind zudem in der Lage Anionen zu komplexieren; dennoch kann durch die Wahl eines Komplexes das Gleichgewicht zugunsten eines Isomers verschoben werden.^[88] So ist der Einfluss des Chlorid-Anions in den Hydrochloriden in unpolaren Lösungsmitteln, welche ohnehin die Ausbildung der intramolekularen Wasserstoffbrückenbindung der α -Isomere erschweren, so stark, dass z.B. in Chloroform ausschließlich das β -Isomer vorliegt.^[111] Als Konsequenz wurden daher alle NMR-Spektren der Prodiginine in der Form des Hydrochlorid-Komplexes aufgenommen und das Laufmittel der LC-MS Analytik angesäuert.



Schema 18: Tautomere und Rotamere von Prodigiosin (**1a**). **A**) Tautomere von Prodigiosin (**1a**); das B-Ring Azafulven ist im festen Kristall favorisiert. **B**) Rotationsisomere der freien Base und der protonierten Spezies von Prodigiosin (**1a**). Die Abbildung B ist modifiziert nach *Gale et al.* (2010).^[88]

3.2.2.2 Quantifizierung von Prodigiosin (**1a**)

Zur Ermittlung der Reinheit von Prodiginin Extrakten wird in der Literatur zumeist auf HPLC-Analytik oder auf Absorptionsspektroskopie zurückgegriffen. Bei der Quantifizierung mittels HPLC wird allerdings häufig nur die Wellenlänge der größten Absorption bei $\lambda = 535$ nm oder $\lambda = 468$ nm betrachtet, sodass starke Abweichungen zur realen Reinheit auftreten können. Beispielsweise ergibt sich bei Betrachtung der freien Base bei $\lambda = 465$ nm für den bakteriellen Extrakt in Abbildung 12A lediglich eine Verunreinigung von 3 %, obwohl die Quantifizierung mittels quantitativer NMR-Spektroskopie (qNMR) mit 4-Methoxyphenol (**61**) als internen Standard (exemplarisches Spektrum in Abbildung 14, 6.3.1.5) lediglich eine Reinheit von 30 % bestätigte. Bei der Verwendung der Absorptionsspektroskopie

¹¹ Auch für säulenchromatographische Reinigungen zeigten sich unterschiedliche Retentionsverhalten beider Spezies. Für einige Prodiginine wurde daher Ammoniak zum Laufmittel zugesetzt, um das Isomerengleichgewicht zu verschieben.

zur Quantifizierung von Prodiginen ist ein verlässlicher (molarer) Extinktionskoeffizient obligatorisch. Da jedoch die in der Literatur beschriebenen und bis zum Zeitpunkt dieser Arbeit weiterhin gängig verwendeten Extinktionskoeffizienten von *Hubbard* und *Rimington* (1950) mit $\epsilon_{535-540} = 110\,000 \pm 5\,000 \text{ l/M}\cdot\text{cm}$ und *Castro et al.* (1958) für das Hydrochlorid mit $\epsilon_{535} = 70\,700 \text{ l/M}\cdot\text{cm}$ extrem stark divergierten und zudem in einer Zeit bestimmt wurden, als weder eine verlässliche Synthese von Prodigiosin (**1a**) noch die Struktur bekannt war oder gar eine absolute Reinheit gewährleistet werden konnte¹², wurde der molare Extinktionskoeffizient für das Hydrochlorid von Prodigiosin (**1a**) neu bestimmt.^[43, 211] Die Reinheit des für die Bestimmung des molaren Extinktionskoeffizienten verwendeten Prodigiosin (**1a**) wurde zunächst über qNMR bestätigt und anschließend in acidem EtOH bei $\lambda = 535 \text{ nm}$ mit $\epsilon_{535} = 139\,800 \pm 5\,000 \text{ l/M}\cdot\text{cm}$ bestimmt (Abbildung 14B). Spätere Vergleiche zwischen Quantifizierungen mittels Absorptionsspektroskopie und qNMR wiesen lediglich maximale Abweichungen von 3% auf und verifizierten somit den bestimmten Extinktionskoeffizienten mit der angegebenen Standardabweichung.

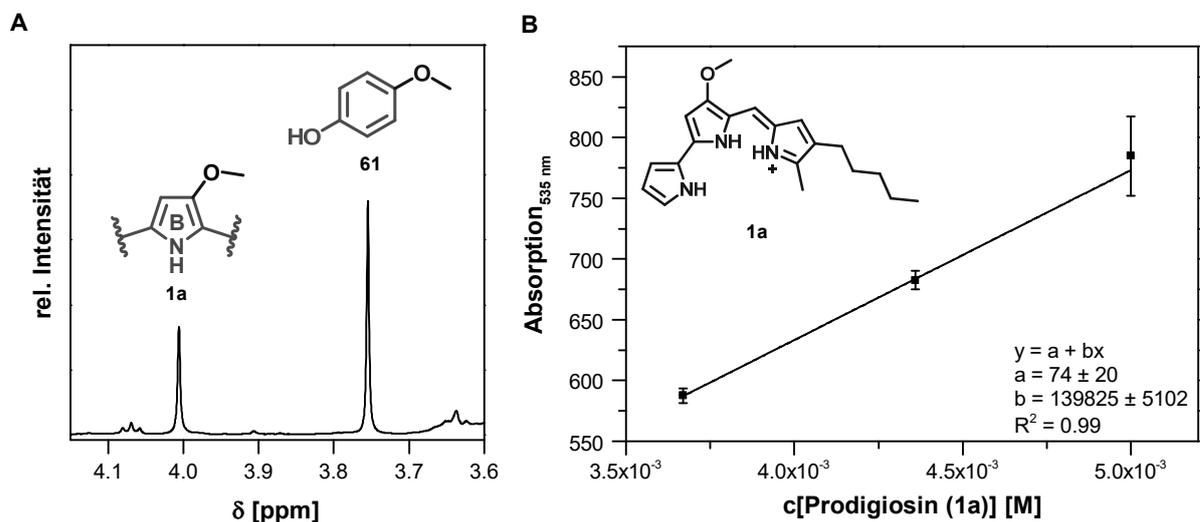


Abbildung 14: A) Beispielspektrum für die Quantifizierung von Prodigiosin (**1a**) mittels quantitativer NMR-Spektroskopie (qNMR). Als interner Standard wird 4-Methoxyphenol (**61**) eingesetzt und anschließend die Integrale der Methoxygruppen von Prodigiosin (**1a**) und 4-Methoxyphenol (**61**) für die Quantifizierung verwendet. B) Bestimmung des molaren Extinktionskoeffizienten ϵ bei $\lambda = 535 \text{ nm}$ in acidem EtOH.

Anhand des Extinktionskoeffizienten wurde anschließend die Produktion von Prodigiosin (**1a**) in den konstitutiv produzierenden Stämmen *P. putida* pig-r1 und *P. putida* pig-r2 und dem induzierbaren Stamm *P. putida* pig-w1 quantifiziert und die Produktionsleistung dem natürlichen Produktionsstamm *S. marcescens* W838 gegenüber gestellt. Die Quantifizierung wurde durch Dr. *Andreas Domröse* durchgeführt.^[207] Die einzelnen Stämme wurden in LB-Flüssigmedium bei 30 °C und 120 rpm in 100 mL

¹² Dies soll in keiner Hinsicht als Kritik an der wissenschaftlichen Arbeit von *Hubbard* und *Rimington* sowie *Castro et al.* zu verstehen sein, deren Ergebnisse dem technischen *Status quo* der damaligen Zeit entsprachen. *Hubbard* und *Rimington* bestimmten die Reinheit über den berechneten Stickstoffanteil und klassifizierten das verwendete Prodigiosin (**1a**) selbst bei einer Abweichung von 15% als „rein“.

Erlenmeyerkolben über 24 h kultiviert, anschließend die Menge Zellen entsprechend für eine $OD_{650} = 1$ entnommen, um Unterschiede im Zellwachstum nicht zu berücksichtigen, und die durch Zentrifugation sedimentierten Zellen mit akkumuliertem Prodigiosin (**1a**) mit 1 mL acidem EtOH extrahiert. Hierbei ist anzumerken, dass sämtliches Prodigiosin an den Zellen assoziiert ist, da keine Löslichkeit in wässrigem Medium gegeben ist. Gestützt von einer Kalibrierung konnte anschließend die bestimmte Menge Prodigiosin (**1a**) in Milligramm pro Gramm Zelltrockengewicht (gDCW; engl. *grams dry cell weight*) angegeben werden. Die Produktion von Prodigiosin (**1a**) in *S. marcescens* W838 war indes im Flüssigmedium unter verschiedensten Parametern für Temperatur, Medium und Sauerstoffeintrag nicht detektierbar, sodass auf die Produktion auf Nährbodenplatten zurückgegriffen wurde. Entsprechend wurden Kulturen von diesen Platten extrahiert und ebenfalls die Produktionstiter in Milligramm pro Gramm Zelltrockengewicht angegeben. Die Ergebnisse sind in Abbildung 15B abgetragen; es ist deutlich erkennbar, dass der konstitutiv produzierende Stamm *P. putida* pig-r2 mit 6.2 ± 0.2 mg/gDCW die höchste Produktionsleistung zeigte. *P. putida* pig-r1 erreichte hingegen nur 2.0 ± 0.1 mg/gDCW und der IPTG induzierte Stamm 0.35 ± 0.02 mg/gDCW. In diesem Zusammenhang kann auf die Transposase-bedingten unterschiedlichen Insertionsorte des *pig* Clusters im Genom verwiesen werden, wie sie schon in Kapitel 3.2.1 erläutert wurden. Dr. *Andreas Domröse* konnte in seiner Dissertation eindeutig den Einfluss des Insertionsortes und den Abstand zu den entsprechenden konstitutiven starken Promotoren auf die Produktionsleistung zeigen.^[207] Im Vergleich zeigt der natürliche Produzent *S. marcescens* W838 mit 1.2 ± 0.3 mg/gDCW nur einen Prodigiosin (**1a**) Titer von annähernd 20% gegenüber *P. putida* pig-r2; hier ist jedoch die schlechte Vergleichbarkeit zwischen Flüssig- und Festmedium zu unterstreichen.

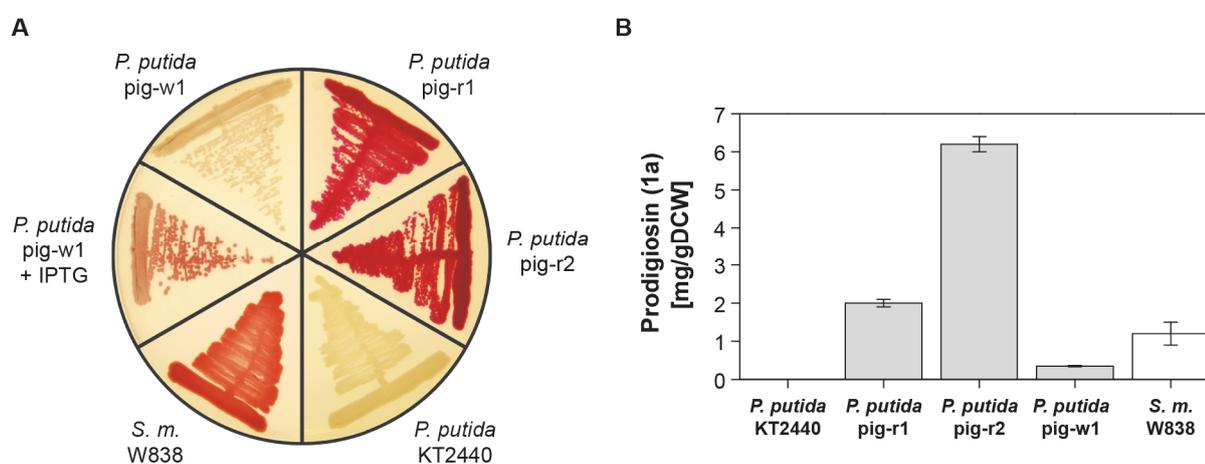


Abbildung 15: A) Phänotyp der konstitutiv Prodigiosin (**1a**) produzierenden Stämme *P. putida* pig-r1 und *P. putida* pig-r2, des wildtypischen Stamms *P. putida* KT2440, des natürlichen Produzenten von Prodigiosin (**1a**) *S. marcescens* W838 und des induzierbaren Stamms *P. putida* pig-w1 mit und ohne Zugabe von IPTG auf einer LB-Nährbodenplatte. B) Quantifizierung der Produktionsleistung von Prodigiosin (**1a**) verschiedener Stämme in LB-Flüssigmedium bei 30°C und 120 rpm in 100 mL Erlenmeyerkolben nach 24 h Kultivierung. Für *S. marcescens* W838 wurde Kulturextrakt von LB-Nährbodenplatte verwendet. Die Quantifizierung wurde durch Dr. *Andreas Domröse* durchgeführt.^[207]

In Anbetracht der hohen Produktionsleistung des Stamms *P. putida* pig-r2 wurden alle weiteren Experimente und auch die spätere Mutasythese exklusiv auf diesen Stamm aufgebaut und die weiteren Stämme nicht mehr berücksichtigt.

3.2.2.3 Optimierung der Produktionsbedingungen für *P. putida* pig-r2

Dr. *Andreas Domröse* hat anschließend eine Optimierungsstudie für die Produktion von Prodigiosin (**1a**) in *P. putida* pig-r2 durchgeführt, deren Ergebnisse für die Anwendung der Mutasythese später größtenteils übernommen wurden und Hinweise bezüglich der zeitlich inhomogenen Expression des *pig Clusters* und der damit verknüpften Produktion lieferten.^[5, 207]

Die Optimierungsstudie enthielt die Parameter Medienzusammensetzung (LB- und TB-Vollmedium), Temperatur (20 °C, 25 °C und 30 °C), Sauerstoffeintrag (Kolben ohne und mit Schikane, unterschiedliche Füllvolumina: 10 % oder 20 % des Kolbenvolumens) und die Kultivierungsdauer (6 h, 24 h, 48 h und 72 h). Als Kultivierungsvolumen wurde 50 bzw. 100 mL gewählt, um den Einfluss des Volumenverlustes durch Probenentnahme und Verdunstung zu minimieren. Der Sauerstoffeintrag wurde nicht quantifiziert, dennoch ist davon auszugehen, dass bei äquivalenter Schüttelfrequenz und einer Flüssigkeitsrotation „In-Phase“ die Sauerstoffsättigung bei Kolben ohne Schikane geringer ist, als bei Kolben mit Schikane. Eine geringere Füllhöhe bewirkt außerdem eine größere Flüssigkeitssichel am Gefäßrand, sodass ebenfalls ein größerer Sauerstoffeintrag zu erwarten ist.^[212, 213]¹³ Zu jeder Probenentnahme wurde die Zelldichte photometrisch bestimmt und der Prodigiosin (**1a**) Titer wie zuvor bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 16 dargestellt.¹⁴

¹³ Hierbei sei anzumerken, dass unterschiedliche Füllhöhen, Drehzahlen und Viskositäten von Flüssigmedien das Außer-Phase- und In-Phase-Phänomen (engl. *out-of-phase phenomenon*, *in-phase phenomenon*) hervorrufen können und somit einen starken Einfluss auf den Sauerstoffeintrag haben. In dem beschriebenen Experiment konnte allerdings bei niedriger Füllhöhe kein Außer-Phase-Phänomen beobachtet werden.

¹⁴ Details zu den Messungen sowie die exakten Angaben zu den Zelldichten und Prodigiosinmengen sind der Dissertationsschrift von Dr. *Andreas Domröse* zu entnehmen.^[207]

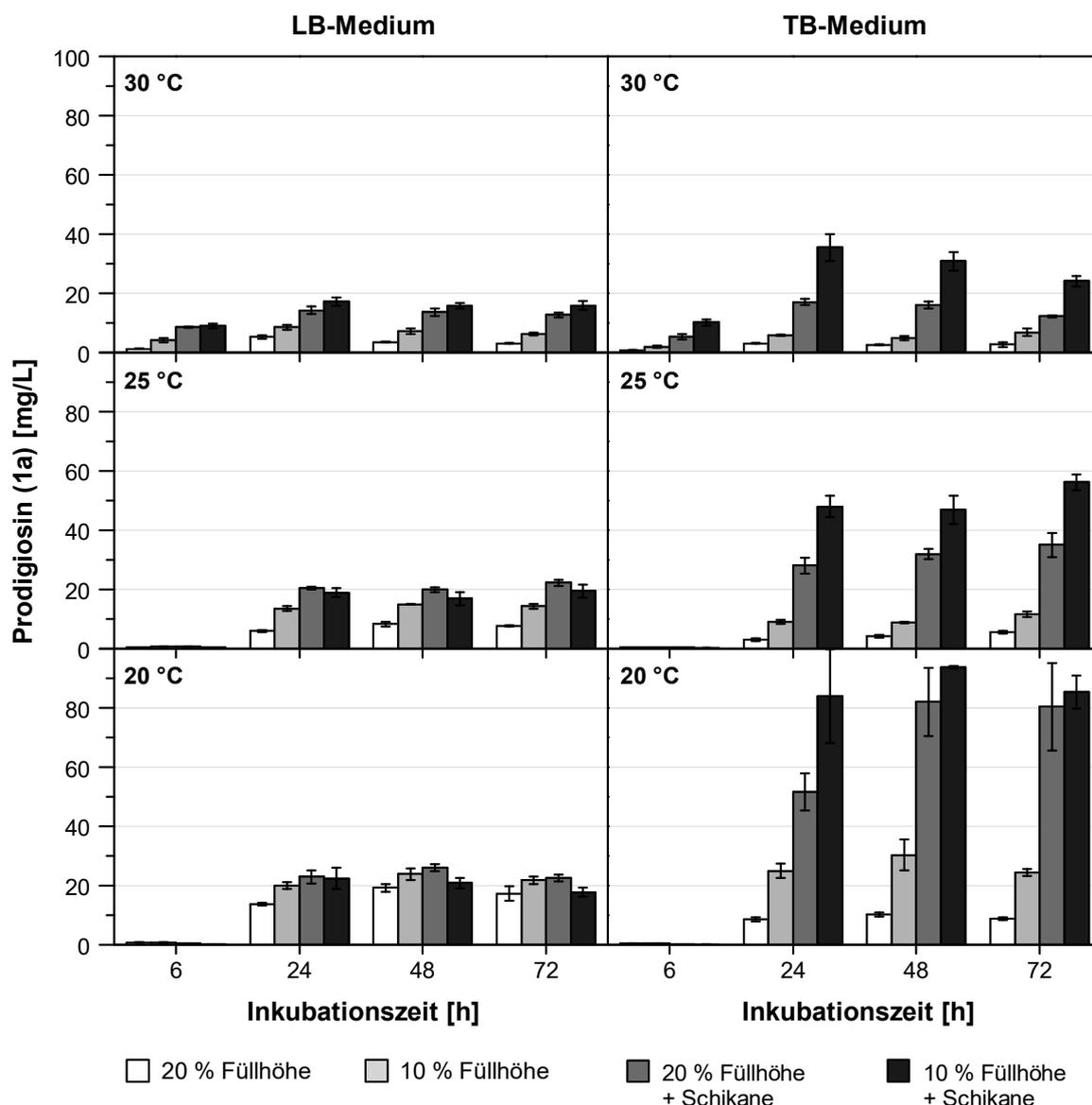


Abbildung 16: Optimierung der heterologen Produktion von Prodigiosin (1a) in *P. putida* pig-r2 bei durch Evaluierung unterschiedlicher Parameter: Medienzusammensetzung (LB- und TB-Vollmedium), Temperatur (20 °C, 25 °C und 30 °C), Sauerstoffeintrag (Kolben ohne und mit Schikane, unterschiedliche Füllvolumina: 10 % oder 20 % des Kolbenvolumens) und Kultivierungsdauer (6 h, 24 h, 48 h und 72 h). Die Daten für diese Abbildung wurden von Dr. *Andreas Domröse* im Rahmen seiner Dissertation erhoben und die Abbildung in Anlehnung an seine Arbeit erstellt.^[207]

Unabhängig aller Parameter mit Ausnahme der Inkubationszeit kann für alle Optimierungsreihen festgehalten werden, dass nach 6 h Prodigiosin (1a) entweder nicht oder nur in geringen Mengen nachweisbar war. Dieser Umstand ist allerdings der Wachstumskurve von *P. putida* KT2440 geschuldet, da die Lag-Phase einer frisch innokulierten Kultur bei ca. 4–5 h liegt (*vide infra* Abbildung 17) und daher kaum Zellmasse vorhanden ist. Grundsätzlich erreichten die Kulturen im LB- (OD₆₅₀ ≈ 4) und TB-Medium (OD₆₅₀ Kolben ohne Schikane ≈ 6–8; OD₆₅₀ Kolben mit Schikane ≈ 9–11) die stationäre Phase bereits nach 24 h (Werte hier nicht gezeigt, vergleiche Wachstumskurve in Abbildung 17) und

zeigen nach Erreichen dieser einen gleichbleibenden Prodigiosin (**1a**) Titer. Allgemein kann beobachtet werden, dass keiner der gewählten Parameter für das LB-Medium einen deutlichen Einfluss hat und maximal im Mittel 20 mg/L Prodigiosin (**1a**) produziert wird. Im Gegensatz dazu führt im TB-Medium die Erhöhung des Sauerstoffeintrags zu deutlich höheren Zelldichten und verbunden mit der Minderung der Temperatur zu einer Erhöhung der Produktionsleistung um den Faktor 11 gegenüber den Standardbedingungen auf maximal 94 ± 1 mg/L (bei 20°C, 10 % Füllvolumen und 48 h Inkubationszeit in TB-Medium). Es ist dabei anzumerken, dass bei diesen Parametern ebenfalls eine höhere Produktionsleistung in Bezug auf die Zelldichte erreicht wird; dieser Vergleich wird in der Tabelle 34 (Anhang) dargelegt.

Zusammenfassend kann daher für eine möglichst effiziente Prodigiosin (**1a**) Produktion in *P. putida* pig-r2 eine Kultivierung über 24 h in TB-Medium bei 20–25°C mit einem möglichst hohen Sauerstoffeintrag festgehalten werden. Der nahezu gleichbleibende Prodigiosin (**1a**) Titer mit Erreichen der stationären Phase kann möglicherweise mit der Transkriptionsrate der rRNA kodierenden Sequenzen erörtert werden, wobei in der exponentiellen Wachstumsphase zunächst die Transkriptionraten dieser *Loci* zur Bereitstellung von Proteinen zu den höchsten in der Zelle zählen, diese allerdings in der stationären Phase auf ein basales Level reduziert werden.^[214, 215] Anzeichen für ebendiese Hypothesen geben auch die Ergebnisse der Mutasyntese, welche sich auf die Supplementierung von Präkursoren sowie die Produktionsleistung von Prodigiosin (**1a**) zu verschiedenen Zeitpunkten der Wachstumskurve stützen und im Kapitel 3.3.3 besprochen werden. Aufschluss über diese Vermutung würde ebenfalls eine *real-time* PCR zur Quantifizierung der Transkriptmengen verschiedener Gene des *pig Clusters* zu verschiedenen Zeitpunkten der Wachstumsphase und der stationären Phase von *P. putida* pig-r2 ergeben. Einen Hinweis geben hier zusätzlich bisher unveröffentlichte Ergebnisse von M.Sc. Hannah U. C. Braß zur weiteren Optimierung der Prodigiosin (**1a**) Produktion in *P. putida* pig-r2 durch den Einfluss von Minimalmedien. Durch die Verwendung des Minimalmediums M63 konnte die Wachstumsphase ausgedehnt werden und somit die Produktionsrate von 94 ± 1 mg/L auf 341 mg/L (photometrisch quantifiziert) erhöht werden (unveröffentlichte Ergebnisse).

3.2.2.4 Einfluss der Prodigiosin (**1a**) Produktion auf die Vitalität von *P. putida*

Wie bereits im Kenntnisstand erwähnt, besitzen Prodiginine antimikrobielle Eigenschaften gegen diverse gramnegative und grampositive Bakterien (*vide supra* 2.3.2). Darunter befinden sich neben Stämmen wie *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus pyogenes*, *Salmonella typhi*, *E. coli*, *Bacillus cereus* auch *Pseudomonadacea* wie z.B. der humanpathogene Stamm *Pseudomonas aeruginosa* und nicht weiter charakterisierte *Pseudomonas* Spezies.^[80-83] Dennoch besitzt *P. putida* KT2440 eine hohe Toleranz gegenüber Antibiotika und *P. putida* pig-r2 kann Prodigiosin (**1a**) in antimikrobiellen Konzentrationen produzieren. Möglicherweise wird eine intrazelluläre Akkumulation durch effiziente Effluxsysteme verhindert und es findet eine Einlagerung in membranständigen Vesikeln statt, welche die Hydrophobizität der Zelloberfläche vergrößern, wie sie bei Anwesenheit von Xenobiotika beobachtet werden konnte.^[147, 203, 204, 216-219] Diese Theorie kann auch durch die Lokalisation des Kondensationsenzym PigC gestützt werden, da dieses membranassoziiert

vorliegt. Daher wurde überprüft, ob die Produktion des Naturstoffes einen Einfluss auf die Vitalität des Bakteriums aufweist, da insbesondere die angesprochene Akkumulation von Prodigiosin (**1a**) in der Zelle oder der Zellmembran zu beobachten und praktisch keine Löslichkeit des hydrophoben Moleküls in Wasser gegeben ist. Ein Vergleich der Wachstumskurve des ursprünglichen Stamms *P. putida* KT2440 und des Produktionsstamms *P. putida* pig-r2 unter den oben beschriebenen optimierten Bedingungen zeigt über 48 h keinen nennenswerten Unterschied trotz Produktion von Prodigiosin (**1a**) (Abbildung 17A). Die maximale Zelldichte ist nach der exponentiellen Wachstumsphase nach 24 h erreicht, welches auch das zeitliche Limit für die Metabolit Produktion darstellt (*vide supra* Abbildung 16). Ein von Dr. Stephan Thies vom Institut für molekulare Enzymtechnologie parallel durchgeführter Agardiffusionstest mit Prodigiosin (**1a**) führte zu keinen apparenten Anzeichen von stressinduzierter Heterogenität in der Kolonieförmigkeit und -farbe (*vide infra* 3.6.1), wie es im Kontext von heterologer Expression von Genclustern in *P. putida* KT2440 berichtet wurde.^[220] Gleichwohl unterstreicht die Abbildung 17B diese Ergebnisse nochmals in einem Toxizitäts-Assay von Prodigiosin (**1a**) gegenüber *P. putida* KT2440 und dem oftmals in der synthetischen Biologie eingesetzten Laborstamm *E. coli* BL21(DE3). Letzterer zeigt ein $IC_{50} = 4.82 \mu\text{M}$ (entspricht 1.6 mg/L) bezüglich Prodigiosin (**1a**) und ist daher nicht für die heterologe Produktion dieses Naturstoffes geeignet. In dieser Grafik zeigt sich für *P. putida* KT2440 hingegen bis $60 \mu\text{M}$ (entspricht 19.4 mg/L) kein Einfluss auf das Wachstum; dieses Verhalten wurde bis zu einer Konzentration von $300 \mu\text{M}$ (entspricht 97.0 mg/L) untersucht (Daten hier nicht gezeigt) und bestätigt die Wahl von *P. putida* KT2440 als Produzent für Prodigiosin (**1a**) Produktion. Diese Toleranz unterstreicht nochmals die Verwendung von *P. putida* KT2440 als zukunftssträchtigen *Chassis*-Stamm der synthetischen Biologie.

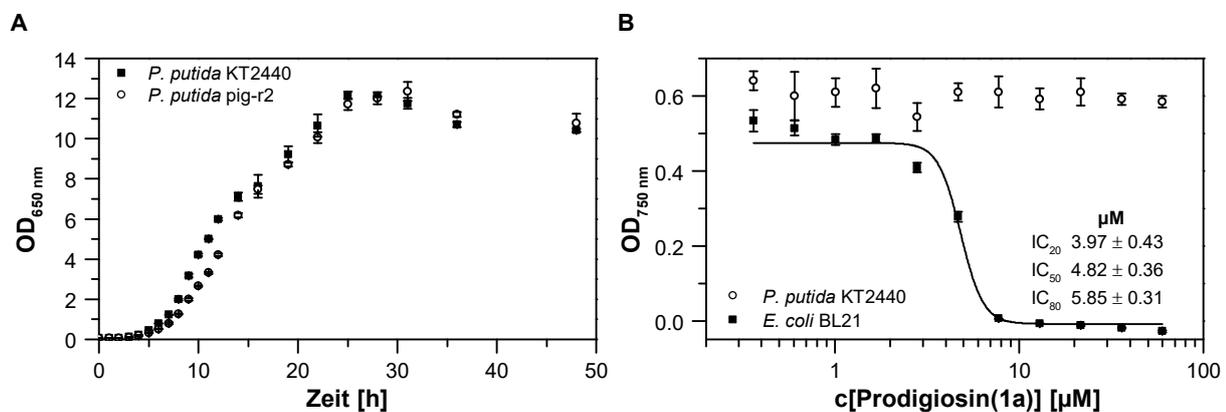


Abbildung 17: A) Vergleich der Wachstumskurven von *P. putida* KT2440 und *P. putida* pig-r2 unter für die Prodigiosin (**1a**) Produktion optimierten Bedingungen (20 °C, 48 h Inkubationszeit in TB-Flüssigmedium). B) Toxizitäts-Assay von *P. putida* KT2440 und *E. coli* BL21(DE3) gegenüber Prodigiosin (**1a**). Die Daten der Wachstumskurven wurden von Dr. Andreas Domröse erhoben.^[5, 207]

Diese Aussagen sind jedoch nicht allgemeingültig für andere Prodiginin-produzierende Stämme oder gar ausweitend auf die Nutzung des TREX-Systems für jedweden heterologen Biosyntheseweg zu treffen, da die Tn5 Transposase-vermittelte Insertion der Gencluster ausschließlich randomisiert stattfindet und daher jeder neukonstruierte Stamm individuell überprüft werden muss.

3.2.3 Polyurethan als Adsorbens in der Prodigiosin (1a) Biosynthese

Die bisher verwendete Extraktion von Prodigiosin (**1a**) durch Sedimentierung der Zellen und anschließender Extraktion durch *acides* EtOH wurde ausschließlich im analytischen Maßstab durchgeführt. Die Anwendung dieses Extraktionsverfahren für den präparativen Maßstab (Kulturvolumina ≥ 500 mL) mit dem Ziel der Isolierung eines Reinstoffs, z. B. für die Evaluation der Bioaktivität, ist jedoch im Labormaßstab nicht praktikabel handhabbar. Insbesondere erschwert der hohe Anteil an Komponenten im Ganzzellextrakt, welche nicht das Zielmolekül darstellen, die anschließende Reinigung. Überdies wiesen Kunststoffgefäße nach Verwendung häufig eine Kontamination durch Prodigiosin (**1a**) auf, sodass ein Arbeitsablauf mit Glasapparaturen zu bevorzugen ist.

Basierend auf der schlechten Löslichkeit der hydrophoben Prodigininen in Wasser wurden bereits in der Literatur Methoden für die *in situ* Extraktion durch hydrophobe Oberflächen aus dem wässrigen Kulturmedium beschrieben. Diese bieten den Vorteil der direkten Desorption des angereicherten Naturstoffs aus den Extraktionsmaterialien und optimieren somit die anschließende Reinigung. Die in der Literatur beschriebenen Materialien sind zumeist polymere Kunstharze wie *Diaion*[®] HP-20, *Sepabeads*[®] SP-850 und SP-825 (mit Divenylbenzol quervernetztes Polystyrole für Ionenaustauscher), makroporöses X-5 und auch verschiedene *Amberlite*[®] XAD Polymere. Letztere weisen allerdings weniger gute Adsorbereigenschaften für Prodigiosin (**1a**) auf.^[210, 221-224] Als kosteneffiziente Alternative zu den genannten Polymeren wurde für die *in situ* Extraktion von Prodigiosin (**1a**) aus *P. putida* pig-r2 auf Polyurethan (PU) zurückgegriffen. PU wurde bereits zuvor für die Adsorption von Protochlorophylliden aus wässrigem Kulturmedium durch *Heyes et al.* verwendet, welche durch das Tetrapyrrol-Porphyringerüst eine strukturelle Ähnlichkeit zu den Tripyrrol-Prodigininen aufweisen.^[225] Die Komposition des für die Prodigiosin (**1a**) Extraktion verwendeten Polyurethans ist nicht bekannt, allerdings wiesen NMR-Spektren auf aromatische Grundbausteine von kommerziellem Polyurethan-Weichschaum hin, was die Theorie der Adsorption der Prodiginine durch hydrophobe π - π -Wechselwirkungen hervorruft.¹⁵ Weitere Herstellerangaben zu den physikalischen Parametern des PU-Schaums können der Tabelle 33 (Anhang) entnommen werden.

Der hydrophobe PU-Schaum wurde vor der Verwendung in ca. 1 cm³ große Würfel geschnitten, autoklaviert und anschließend trocken nach Inokulation der Kultur in das Kulturmedium zugegeben (5 g pro 500 mL Kultur) und bildet somit ein Zweiphasensystem (fest-flüssig). Nach der Kultivierung über 24 h konnte eine nahezu komplette Adsorption von Prodigiosin (**1a**) nicht nur aus dem Kulturmedium, sondern auch von dem zuvor an *P. putida* pig-r2 assoziiertem Pigment beobachtet werden. Das Kulturmedium zeigte eine farblose Erscheinung, welche der einer Kultur des wildtypischen Stamms *P. putida* KT2440 ähnlich sieht (Abbildung 18).

¹⁵ Das für die Prodigiosin (**1a**) Extraktion verwendete Polyurethan wird zur Anwendung in Polstermöbeln vertrieben, sodass nähere Informationen zur Zusammensetzung dieses kommerziellen PU-Schaums nicht erhältlich waren. NMR-Spektren von durch Lösungsmittel degradierten Polymeren wiesen jedoch symmetrische aromatische Signale auf, die auf die Verwendung des Standardbausteins Diphenylmethan-4,4'-diisocyanat (MDI) für kommerziellen Polyurethan-Weichschaum hinwiesen.



Abbildung 18: Adsorption von Prodigiosin (**1a**) durch Zugabe von Polyurethan (PU) in das Kulturmedium von *P. putida* pig-r2 (links: Kultur ohne PU-Zugabe; rechts: Kultur mit PU-Zugabe). Für die bessere Visualisierung von Prodigiosin (**1a**) wurde das, gegenüber TB-Flüssigmedium, hellere LB-Flüssigmedium verwendet und nach 24 h Kultivierung mit 1 M HCl leicht angesäuert, um die protonierte rote Spezies AH⁺ zu erhalten.

Das hervorragende Extraktionspotential von PU veranlasste anschließend zu der Entwicklung eines vollständigen Prozesses der Produktreinigung (engl. *downstream processing*) für die Bereitstellung von reinen Prodigininen aus dem Fermentationsprozess, wie er in Abbildung 19 dargestellt ist. Zunächst erfolgte die bereits beschriebene Kultivierung in Anwesenheit der PU-Würfel (Abbildung 19A), anschließend werden diese Würfel mittels eines Siebes von dem Flüssigmedium abgetrennt, ausgewrungen und mit Wasser mehrfach gewaschen. Hierdurch werden nahezu alle wasserlöslichen Stoffe und restliche Bakterien entfernt; das adsorbierte Prodigiosin (**1a**) verbleibt jedoch an der Oberfläche des PU-Materials. Die roten Würfel wurden anschließend über einen *Soxhlet*-Extraktor mit acidem EtOH oder Diethylether kontinuierlich extrahiert bis die Schwämme annähernd farblos erschienen (Abbildung 19B). Die Verwendung von Diethylether ist aufgrund des niedrigeren Siedepunktes zu bevorzugen, um eine lange Exposition der PU-Würfel mit dem Lösungsmittel zu vermeiden und die Degradation der Polymere möglichst gering zu halten. Nach Einengen des Rohextraktes wurde dieser säulenchromatographisch gereinigt und das reine Prodigiosin (**1a**) als Produkt erhalten (Abbildung 19C).

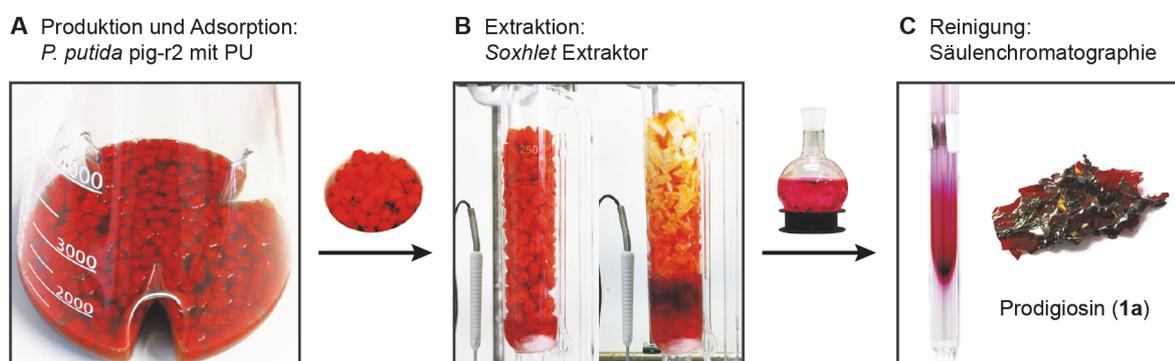


Abbildung 19: Produktreinigung von Prodigiosin (**1a**) aus dem Fermentationsprozess von *P. putida* pig-r2. A) Kultivierung von *P. putida* pig-r2 in Gegenwart von PU-Schaum. B) Kontinuierliche Extraktion der gewaschenen PU-Würfel mit acidem EtOH oder Diethylether im *Soxhlet*-Extraktor. C) Säulenchromatographische Reinigung des Rohextraktes.

Die Tabelle 6 zeigt die Evaluierung des entwickelten Prozesses der Produktreinigung mit PU-Schaum in Gegenüberstellung einer klassischen Extraktion und Reinigung jeweils als Dreifachbestimmung aus 500 mL Fermentationsansätzen. Bemerkenswert ist in diesem Vergleich eine mittlere Steigerung des Prodigiosin (**1a**) Titer in der Kultur mit PU-Würfel um 100 %. Dies spricht für die Vermutung eines Prodiginintransportes in die Membran oder die Zelloberfläche in Vesikeln nach der Kondensation durch PigC, wodurch eine stetige Extraktion durch den Adsorber möglich ist, eine Akkumulation verhindert wird und kontinuierlich Prodigiosin (**1a**) produziert wird. Da die Extraktionseffizienz beider Prozesse fast quantitativ ist, kann das produzierte Prodiginin annähernd vollständig aus der Kultur gewonnen werden. Die Bildung des Zweiphasensystems und die Möglichkeit der Entfernung von wasserlöslichen Komponenten durch Waschen erhöht die Reinheit des Rohextraktes von $9 \pm 2\%$ auf $37 \pm 1\%$ gegenüber der Ganzzelleextraktion und vereinfacht die anschließende säulenchromatographische Reinigung. Die Kostenreduzierung durch den Einsatz der PU-Würfel ist in Anbetracht der Höhe der Kosten der Verbrauchsmittel vernachlässigbar, jedoch wird die aktive Arbeitszeit halbiert.

Tabelle 6: Vergleich der Prodigiosin (**1a**) Produktreinigung mit und ohne Einsatz von PU-Schaum als *in situ* Adsorber aus jeweils drei 500 mL Kulturen. Die Kultivierungsbedingungen entsprechen den zuvor optimierten Bedingungen.

Kultivierung	mit PU	ohne PU
Prodigiosin (1a) Titer in Kultur	$\approx 48 \text{ mg/L}^{[a]}$	$24 \pm 8 \text{ mg/L}$
Prodigiosin (1a) Titer in Rohextrakt	$47 \pm 6 \text{ mg/L}$	$23 \pm 9 \text{ mg/L}$
Rückgewinnung von Prodigiosin (1a) von Kultur zu Rohextrakt	$> 97\%^*$	ca. 94 %
Reinheit des Rohextraktes	$37 \pm 1\%$	$9 \pm 2\%$
Spezielle Kosten pro 500 mL Ansatz	PU: 0.14 €	Hochgeschwindigkeits-Zentrifugengefäße: 1.20 €
Aktive Arbeitszeit^[b] pro 500 mL Ansatz	ca. 45 min	ca. 95 min

^[a] Der Prodigiosin (**1a**)-Titer in den Kulturen mit PU-Schaum kann lediglich anhand des Rückstandes ($< 1 \text{ mg/L}$) nach der Entfernung der Würfel und des Prodigiosin (**1a**) Anteils im Rohextrakt geschätzt werden; gleiches gilt für die Rückgewinnung.

^[b] Die aktive Arbeitszeit bezieht sich auf die Arbeitsschritte, welche durch eine einzelne Person durchgeführt werden. Die Produktreinigung mit PU-Schaum besteht aus: PU-Isolation durch Sieben, Auswringen und Waschen, Soxhlet-Extraktion und Zweiphasenextraktion. Die Produktreinigung ohne PU-Schaum besteht aus: Zellernte, Zellpellet Extraktion und Zweiphasenextraktion. In beide Prozesse wurden automatisierte Arbeitszeiten wie die kontinuierliche Extraktion mittels Soxhlet-Extraktors und die Evaporation des Lösungsmittels nicht mit einberechnet.

Im direkten Vergleich zu der entwickelten Totalsynthese von Prodigiosin (**1a**) (3.1) erlaubt die Verwendung der PU-Würfel die biosynthetische Produktion als kosteneffiziente Alternative anzusehen. Wie Tabelle 7 zu entnehmen ist, steht für die identische Menge Prodigiosin (**1a**) von 97 mg in der Totalsynthese über fünf Schritte (darunter vier Schritte mit säulenchromatographischer Reinigung) mit einer Gesamtausbeute von 14 % lediglich ein Schritt durch das Ansetzen von 2 L Fermentationskultur mit anschließender Extraktion und säulenchromatographischer Reinigung entgegen. Diese Reduktion

der Schritte führt nicht nur zu einer deutliche Minderung der Arbeitszeit, die Kosten werden insgesamt um 56 % reduziert, da weniger Lösungsmittel für säulenchromatographische Reinigungen benötigt werden und, bis auf die Grundzutaten für das Kulturmedium und dem PU-Schaumstoff, der Einsatz von zusätzlichen Chemikalien entfällt. Dem steht natürlich die Entstehung von 2 L wässrigen Kulturabfalls entgegen, welcher, wie auch die Entstehung übriger Abfälle, nicht in der Gesamtkalkulation berücksichtigt wurde. Durch die Berücksichtigung realer Lohnkosten äquivalent zur Arbeitszeit und der Einberechnung von Verbrauchsmaterialien wie z.B. Kieselgel für die Chromatographie würde die Differenz zwischen beiden Prozessen allerdings deutlich höher ausfallen. Eine gesonderte, detaillierte Auflistung aller Kosten kann der Tabelle 35 (Anhang) entnommen werden.

Tabelle 7: Vergleich der Produktionsschritte und -kosten für Prodigiosin (1a) durch Totalsynthese und Fermentation mit PU-Schaumstoff.

Produktion von 97 mg Prodigiosin (1a) durch	Totalsynthese (nach 3.1)	Fermentation mit PU
Anzahl der Arbeitsschritte	5	1
Anzahl der Arbeitsschritte mit Chromatographie	4	1
Kosten^[a] ohne Chromatographie	30.62 €	9.92 €
Gesamtkosten^[a]	51.82 €	22.83 €

^[a] In den Kosten sind weder Gehälter für die Arbeitszeit noch Verbrauchsmaterialien mit inbegriffen. Die Kosten für die Chemikalien sind von *Sigma-Aldrich/Fluka* und *Carl Roth GmbH & Co KG* am 25. Juli 2017 abgerufen worden und enthalten keine Vergünstigungen. Eine detaillierte Kostenkalkulation kann der Tabelle 35 (Anhang) entnommen werden.

Die hier beschriebene Produktreinigung mit PU-Würfeln bietet allerdings weitere Möglichkeiten der Optimierung. Zum einen könnte durch eine strukturell gezielte Synthese von PU eine deutliche Steigerung der Adsorptionskapazität erreicht werden. In späteren Fermentationen unter den durch M.Sc. *Hannah U. C. Braß* weiter optimierten Bedingungen wurde die Kapazitätsgrenze der Adsorption von 5 g PU-Würfeln in einer 500 mL Kultur in weniger als 24 h erreicht; lediglich die Entfernung dieser Schwämme und die Supplementierung neuer, unbelasteter Schwämme konnte eine höhere Produktausbeute gewährleisten (unveröffentlichte Daten). Diese Beobachtung eröffnet zum anderen die Diskussion einer externen, mit PU-Schaum gefüllten Festbettsäule, welche kontinuierlich mit Fermentationsmedium durchströmt wird. Ein solches System wurde für die Prodigiosin (1a) Extraktion aus einer *Serratia* Spezies bereits von *Kim et al.* mit einer *Diaion*[®] HP-20 Kunstharzbeladung erfolgreich evaluiert.^[221] Die Position eines externen Adsorbens würde den Austausch im laufenden Fermentationsprozess ermöglichen und daher auch den Betrieb einer Zulaufkultur (engl. *fed-batch culture*) erlauben. Eine weitere Optimierungsstrategie betrifft die Größe und Form der PU-Zusätze. Eine Halbierung eines 1 cm³ großen PU-Würfels nach 24 h Fermentation zeigte im Inneren eine unbelastete Schaumstruktur (Abbildung 20, weiß). Dies lässt darauf schließen, dass der Innenkern dieser Würfel möglicherweise wegen Lufteinschlüsse nicht mit der Fermentationskultur benetzt wurde.

Eine Reduktion der Größe der PU-Würfel könnte hier eine höher adressierbare Adsorptionskapazität bei gleichbleibender Kulturbeladung ergeben.



Abbildung 20: Halbierter PU-Würfel nach einer 24 h Fermentation von *P. putida* pig-r2. Im Innenkern des Würfels zeigt sich kein adsorbiertes Prodigiosin (**1a**).

3.2.4 Synopsis des Kapitels

1. Die heterologe Biosynthese von Prodigiosin (**1a**) wurde nach Integration des Biosynthesecusters in das Genom des GRAS-zertifizierten Stamms *P. putida* KT2440 ermöglicht.
2. Eine Optimierung der Kultivierungsparameter erlaubte eine Produktion von 94 ± 1 mg/L Prodigiosin (**1a**).
3. Die Produktion von Prodigiosin (**1a**) zeigte keinen Einfluss auf die Vitalität von *P. putida* KT2440, sodass der Stamm möglicherweise als zukunftssträchtiger *Chassis*-Stamm der synthetischen Biologie verwendet werden kann.
4. Die Einführung von Polyurethan als Adsorbens im *Downstream Process* führte zu einer Verdopplung des Produktionstiters unter Reduktion der Kosten um 56 % und Halbierung des Arbeitsaufwandes. Die Reinheit des Rohextraktes wurde überdies vervierfacht.
5. Das heterolog produzierte Prodigiosin (**1a**) ermöglichte die chemische- und physikochemische Charakterisierung dieses Naturstoffes und die Erhebung eines aktuellen molaren Extinktionskoeffizienten für die Quantifizierung mit $\epsilon_{535} = 139\,800 \pm 5\,000$ l/M·cm in acidem EtOH.

3.3 Mutasynthese zur Herstellung von Prodigiosin (1a) und Derivaten

Die Mutasynthese von Naturstoffen gilt als eine elegante Methode zur Derivatisierung und damit zur Produktion von Substanzbibliotheken, welche insbesondere für SAR-Studien obligatorisch sind. Durch die Bereitstellung von einfachen Synthesebausteinen und die Nutzung der Ganzzellkatalyse entsteht ein Synergieeffekt beider fachlichen Bereiche, der unter bioökonomischer Sicht besonders reizvoll erscheint. Die Grundlagen hierfür bilden unbestritten kurze Syntheserouten für die Mutasynthese und ein gut charakterisierter Biosynthesestamm mit Gendeletion. Durch die beiden vorausgehenden Kapitel wurde daher die Basis für eine Mutasynthese, ausgehend von der *Trofimov*-Reaktion für die Bereitstellung der Mutasynthese und der Konstruktion des Biosynthesestamms *P. putida* pig-r2, gelegt.

Aufbauend auf diesen Ergebnissen wurden die Ziele einer Mutasynthese von Prodigiosin (1a) Derivaten auf den C-Ring begrenzt. Zum einen wird durch die *Trofimov-Reaktion* der schnelle und kostengünstige Zugang zu Monopyrrolen als Mutasynthese gewährleistet und zum anderen ist auch in der Natur dieser Teil der Prodiginine hoch flexibel, wohingegen der MBC (12) Teil größtenteils konserviert ist. Eine solche Konservierung weist möglicherweise auf eine optimierte Molekülgrundstruktur gegenüber natürlichen Zielen hin. Die literaturbekannten Mutasynthesen von Prodigininen resümierend (Kapitel 2.6.2), weisen die Diversifizierung des C-Rings und die Substratspezifität des Kondensationsenzym PigC grundsätzliche Forschungsdefizite auf. Daher wurden für einen Mutasyntheseansatz folgende Ziele definiert:

1. Die Eignung des Prodigiosin (1a) Produktionsstamms als Ausgang für einen potentiellen *Knockout*-Stamm für die Mutasynthese sollte erprobt werden und eine MAP (13a)-defiziente Deletionsmutante erzeugt werden.
2. Die *Trofimov*-Reaktion sollte für die Bereitstellung diverser Pyrrole als Mutasynthese evaluiert werden.
3. Die Mutasynthese sollte im analytischen Maßstab evaluiert und unter Verwendung des PU-Schaums auf einen präparativen Maßstab skaliert werden.
4. Das Substratspektrum von PigC sollte anhand der aus der Mutasynthese abgeleiteten Ergebnisse spezifiziert werden.

3.3.1 Vorversuche zur Mutasynthese

Initial zur Entwicklung der Mutasynthese und der damit verbundenen Konstruktion eines *Knockout*-Stamms wurden zunächst Vortests für die Aufnahme von exogen supplementierten Präkursoren mit dem Biosynthesestamms *P. putida* pig-r2 durchgeführt. Diese Internalisierung bildet die Grundvoraussetzung der Mutasynthese und war daher unabdingbar für die weitere Entwicklung des Gesamtkonzeptes. Für die aromatischen Alkylpyrrol-Mutasynthese als unpolare Moleküle besteht hierbei die Möglichkeit des passiven Transports durch die Membran, weshalb auf die Genexpression von aktiven Membrantransportern verzichtet wurde.

Hierfür wurde zuerst der Import von Präkursoren in die Zelle und deren Akzeptanz von dem Kondensationsenzym PigC in einer *Precursor-directed* Biosynthese (PDB, 2.6.1) evaluiert. Die Supplementierung von 3 mM des natürlichen Bausteins MAP (**13a**) in Ethanol zu *P. putida* pig-r2 in einem Mikrotiterplatten-Assay resultierte in einer 52 % höheren Prodigiosin (**1a**) Produktion gegenüber einer Kontrolle ohne Zugabe des Präkursors (Abbildung 21). Hierbei ist zu beachten, dass die Supplementierung in EtOH mit einer Endkonzentration von 6 % (v/v) keinesfalls den optimalen Kultivierungsbedingungen für *P. putida* entspricht und daher in späteren Experimenten das Cosolvens DMSO in deutlich geringeren Konzentrationen eingesetzt wurde.^[226, 227]

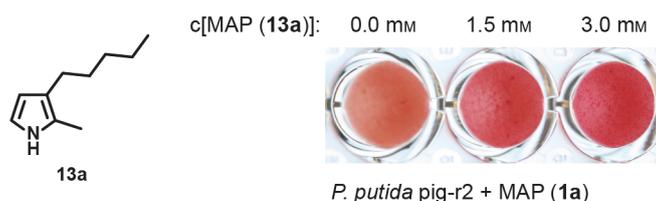


Abbildung 21: Mutasynthese Vorversuch durch Supplementierung von MAP (**13a**) in EtOH [6 % (v/v)] in unterschiedlichen Konzentrationen zum Produktionsstamm *P. putida* pig-r2. Die Supplementierung von 3mM MAP (**13a**) resultierte in 52 % höherer Prodigiosin (**1a**) Produktion.

Dieser Vorversuch gab einen Hinweis auf den möglichen Import von Pyrrolen in die Zelle, jedoch kann eine höhere Produktionsleistung auch durch den Einfluss einer exogenen Substanz wie MAP (**13a**) durch eine Stressantwort und die Hochregulierung der Genexpression verschiedener *Loci* der DNA hervorgerufen werden.^[228] Daher wurde die Produktionsleistung in Abhängigkeit der Präkursorkonzentration später gesondert untersucht.

In einer *Precursor-directed* Biosynthese wurde zusätzlich die Akzeptanz von nicht-natürlichen Präkursoren evaluiert. In Analogie zur MAP (**13a**) Synthese (3.1.2) wurde mittels der *Trofimov*-Reaktion die 2,3-Dialkylpyrrole 3-Butyl-2-methyl-1*H*-pyrrol (**13e**) und 3-Hexyl-2-methyl-1*H*-pyrrol (**13f**) hergestellt und ebenfalls zum Beginn der Wachstumsphase in das Kulturmedium von *P. putida* pig-r2 in einer analytischen Ansatzgröße supplementiert (6.7.4).¹⁶ Nach 24 h Kultivierung wurden die Bakterienzellen extrahiert und die Extrakte mittels LC-MS analysiert (Abbildung 22A und B). Die Chromatogramme zeigen die für eine *Precursor-directed* Biosynthese erwartungsgemäße Mischung aus dem natürlichen Sekundärmetaboliten Prodigiosin (**1a**) und jeweils den unnatürlichen Derivaten **1e** ($M = 309.4$ g/mol) respektive **1f** ($M = 338.5$ g/mol). Dieses Ergebnis bestätigt zum einen den Import der Pyrrole in die Zelle und zum anderen die Akzeptanz von kleinen Änderungen in der Präkursorstruktur durch PigC.

¹⁶ Detaillierte Angaben zu den Synthesen folgen im Kapitel 3.3.4.

Ergebnisse und Diskussion

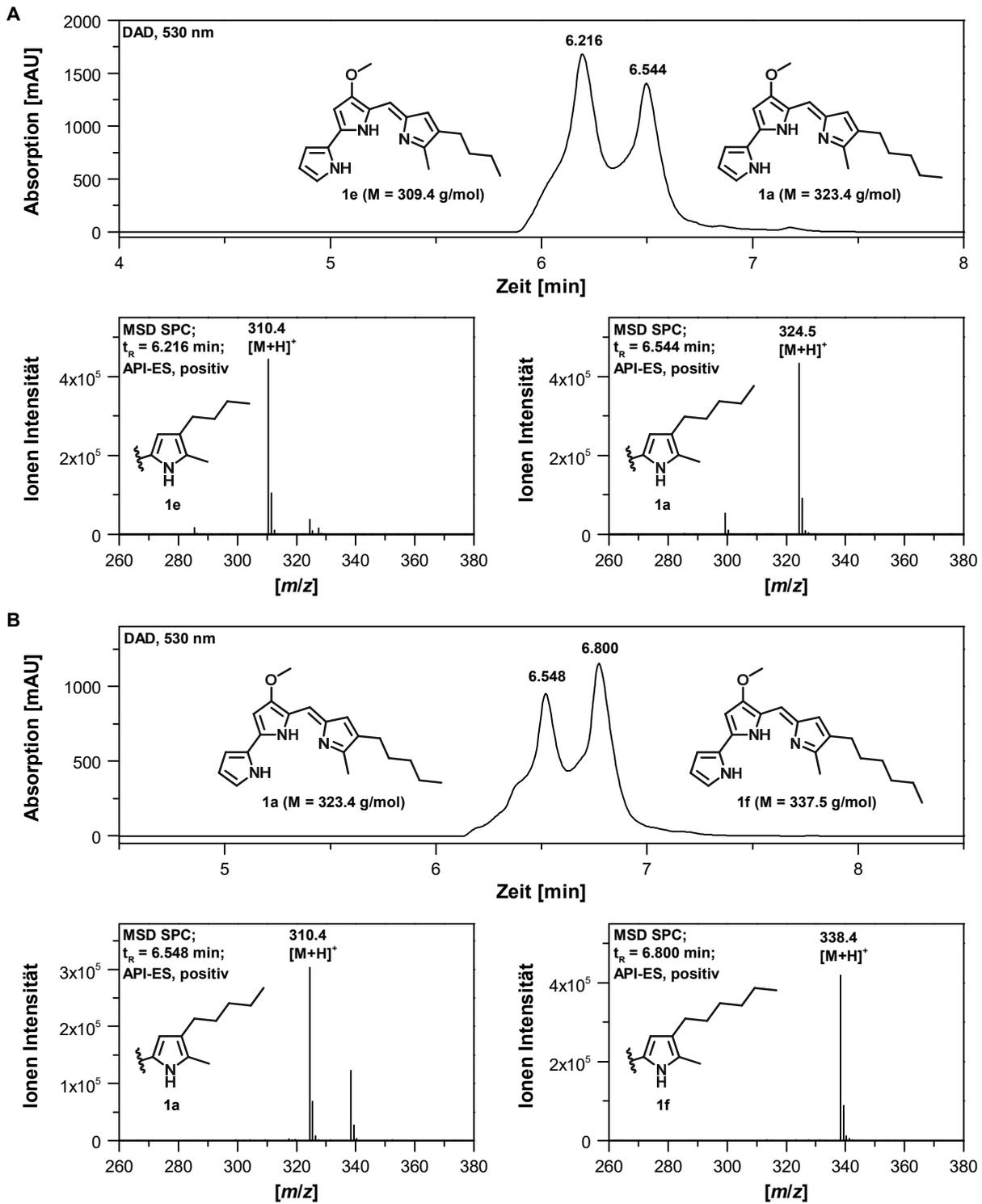
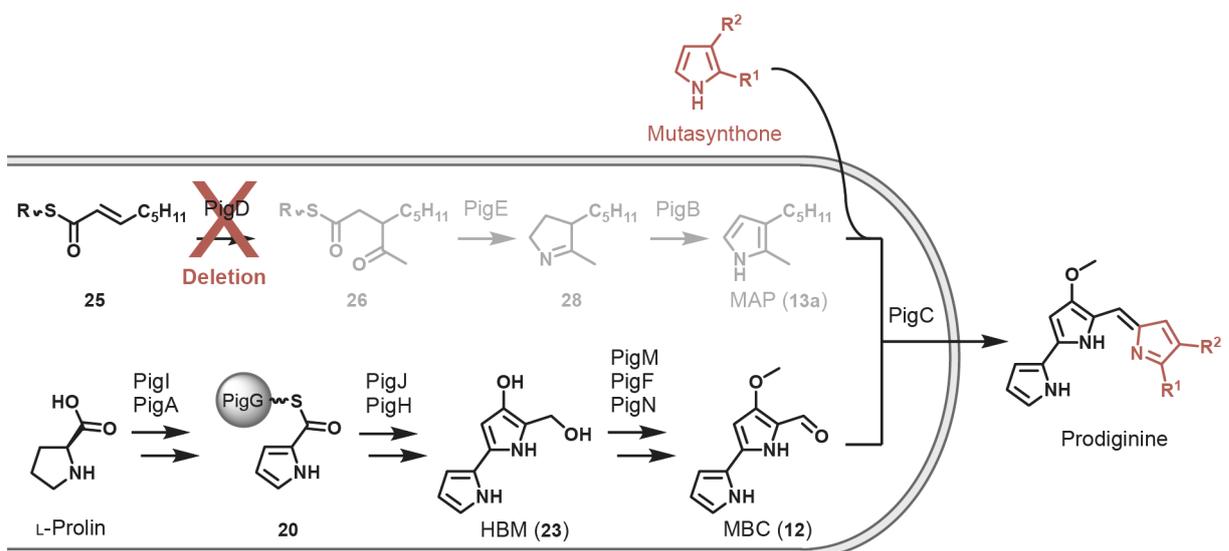


Abbildung 22: LC-MS Chromatogramme und Massenspektren der *Precursor-directed* Biosynthese mit den Pyrrolen 13e und 13f und dem Prodigiosin (1a) Produktionsstamm *P. putida* pig-r2.

3.3.2 Konstruktion eines MAP (13a)-defizienten Deletionsmutante

Wie bereits einleitend beschrieben (2.6.1), beruht die Strategie der Mutasyntese auf einer Unterbrechung der Biosynthese durch einen gezielten *Knockout* eines Gens. In einem solchen Organismus akkumulieren anschließend meist alle Intermediate der Biosynthese bis zu dieser Unterbrechung. Anschließend wird ein synthetischer, unnatürlicher Präkursor des Folgeintermediats, welches durch diesen *Knockout*-Stamm nicht mehr produziert werden kann, *in vivo* in das Fermentationsmedium supplementiert und als Ersatz in der Biosynthese inkorporiert. Strategisch wird die Mutation möglichst in einem frühen Schritt der Biosynthese eingeführt, um die Bildung von möglicherweise toxischen Intermediaten zu reprimieren und auch einen unnötigen Verbrauch von Energie und Metaboliten zu unterbinden. Die Gencluster aller Prodiginine eignen sich für das Vorhaben der Mutasyntese im Besonderen, da die beiden Schlüsselintermediate MAP (13a) und MBC (12) durch einen gegabelten Biosyntheseweg produziert werden. Diese konvergente Biosynthese bietet den Idealfall für einen gezielten *Knockout* von Genen in einer Mutasyntese, da jeweils die Produktion der Schlüsselintermediate unabhängig voneinander unterbrochen werden kann.

Für die Produktion von Prodigiosin (1a) Derivaten mit Hilfe eines Mutasynteseansatzes sollte daher durch eine partielle Deletion des *pigD* Gens eine MAP (13a)-defizienten Deletionsmutante erzeugt werden. Das Thiamindiphosphat (ThDP)-abhängige Enzym PigD ist dabei am ersten Schritt der enzymatischen *Stetter*-Reaktion in der MAP (13a) Synthese beteiligt, sodass durch die Gendeletion die vollständige MAP (13a) Biosynthese unter Beibehaltung der Produktion von MBC (12) unterbunden wird (Schema 19). Hierdurch wird die Möglichkeit der Derivatisierung des C-Rings eröffnet.



Schema 19: Strategie für die Mutasyntese von Prodigiosin (1a) Derivaten. Durch die Deletion des *pigD* Gens wird die Biosynthese von MAP (13a) unterbunden; die Biosynthese von MBC (12) ist weiterhin möglich.

Die Konstruktion der MAP (13a)-defizienten Deletionsmutante wurde von Dr. *Andreas Domröse* durchgeführt.^[207]¹⁷ Über eine homologe Rekombination wurden Teilstücke der *pigD* Sequenz durch das promotor- und terminatorlose Streptomycin Resistenzgen *aadA* (Sm^R) ersetzt (Abbildung 23). Hierfür wurden das *aadA*-Gen mit Teilstücken von *pigC* und *pigD* flankiert und in den Vektor pSUP202 kloniert, welcher in *P. putida* KT2440 nicht repliziert werden kann.^[209, 229] Hierdurch wird die Konstruktion von falsch-positiven Streptomycin resistenten Stämmen ausgeschlossen. Das Plasmid wird analog zum TREX-System über horizontalen Gentransfer durch Konjugation mittels dem Donor *E. coli* S17-1 in den Rezipienten *P. putida pig-r2* übertragen (*vide supra* 3.2.1) und die Deletionsmutante *P. putida pig-r2 ΔpigD* erhalten.^[4, 207]

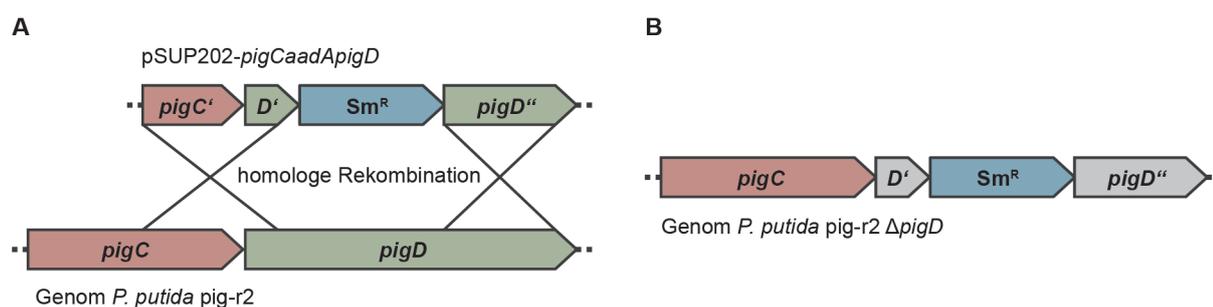


Abbildung 23: Konstruktion des *Knockout*-Stamms *P. putida pig-r2 ΔpigD* durch homologe Rekombination mit Teilstücken von *pigC* und *pigD*. Durch die Insertion des Streptomycin Resistenzgens in *pigD* entsteht die MAP (13a)-defiziente Deletionsmutante. **A)** Homologe Rekombination mit Vektor *pSUP202-pigCaadApigD* und dem Genom aus *P. putida pig-r2*. **B)** Genom der Deletionsmutante *P. putida pig-r2 ΔpigD*. [Sm^R – Gen für Streptomycin Resistenz; *D'* – 5'-Teilsequenz von *pigD*; *pigD''* – 3'-Teilsequenz von *pigD*]

Anschließend wurden potentielle *Knockout*-Stämme über diese Resistenz selektiert, da durch den promotorlosen Einbau des Streptomycin Resistenzgens lediglich Stämme mit einer korrekt orientierten Insertion diese phänotypische Antibiotika Resistenz aufwiesen. Zudem ist der Phänotyp der Deletionsmutante eher farblos (Abbildung 25B), da diese die Fähigkeit der Prodigiosin (1a) Produktion nicht mehr besaß. Die Überprüfung der Insertion wurde von Dr. *Andreas Domröse* mittels PCR und Sequenzierung bestätigt.^[207]

Biosynthese und Extraktion von MBC (12)

Neben der Sequenzierung und der phänotypischen Kontrolle der Deletionsmutante *P. putida pig-r2 ΔpigD* wurde die Biosynthese von MBC (12) nach Extraktion der ganzen Zellen durch HPLC- und LC-MS-Messungen verifiziert. Dafür wurde der Stamm unter den Standardbedingungen für die Prodigiosin (1a) Produktion (*vide supra* 3.2.2) kultiviert und anschließend extrahiert (6.7.9). Ebenso wurde der gesamte Kulturüberstand nach Gefriertrocknung analog zu den separierten Zellen extrahiert, um eine Lokalisation des produzierten MBC (12) durchzuführen. Als Referenz diente jeweils chemisch

¹⁷ Details zu der Konstruktion des *Knockout*-Stamms sind der Dissertationsschrift von Dr. *Andreas Domröse* zu entnehmen.^[207]

synthetisiertes MBC (12), welches aus der Entschützung von Boc-MBC (46) gewonnen wurde. Durch die HPLC Messung (Abbildung 24) wurde deutlich, dass MBC lediglich in der Zelle akkumuliert und, konträr zum Prodigiosin (1a), keine Sekretion in die äußere Membran bzw. das Kulturmedium stattfindet. Spätere Kultivierungen mit PU-Schaum führten ebenfalls nicht zu einer extrazellulären Anreicherung (Daten hier nicht gezeigt). Die Produktion von MAP (13a) konnte nicht beobachtet werden und bestätigen die genetische Deletion von *pigD* (LC-MS Daten im Anhang: Abbildung 65 und Abbildung 66). Die geringe Signalintensität für das MBC (12) Signal im HPLC Chromatogramm ließ sich zum einen auf die geringe Löslichkeit von MBC (12) in allen Lösungsmitteln, mit Ausnahme von DMSO, begründen, sodass eine hohe Konzentration im verwendeten Eluenten kaum gegeben war. Zum anderen scheint allerdings die Akkumulation innerhalb der Zellen äußerst gering zu sein, da für das gezeigte Chromatogramm insgesamt 4 g Zellmasse verwendet wurden. Mögliche Ursachen, wie die Toxizität oder eine Degradation des Metaboliten werden im Kapitel der Semisynthese mit biosynthetisch produziertem MBC (12) näher erörtert (*vide infra* 3.5.1). Eine absolute Quantifizierung des Schlüsselintermediates war nicht möglich, da eine vollständige Extraktion des gesamt gebildeten MBC (12) aus den Zellen durch DMSO nicht erfolgreich war. Es scheint allerdings, dass in der Biosynthese das gebildete MBC (12) direkt durch PigC mit MAP (13a) zu Prodigiosin (1a) umgesetzt wird, welches anschließend exportiert wird.

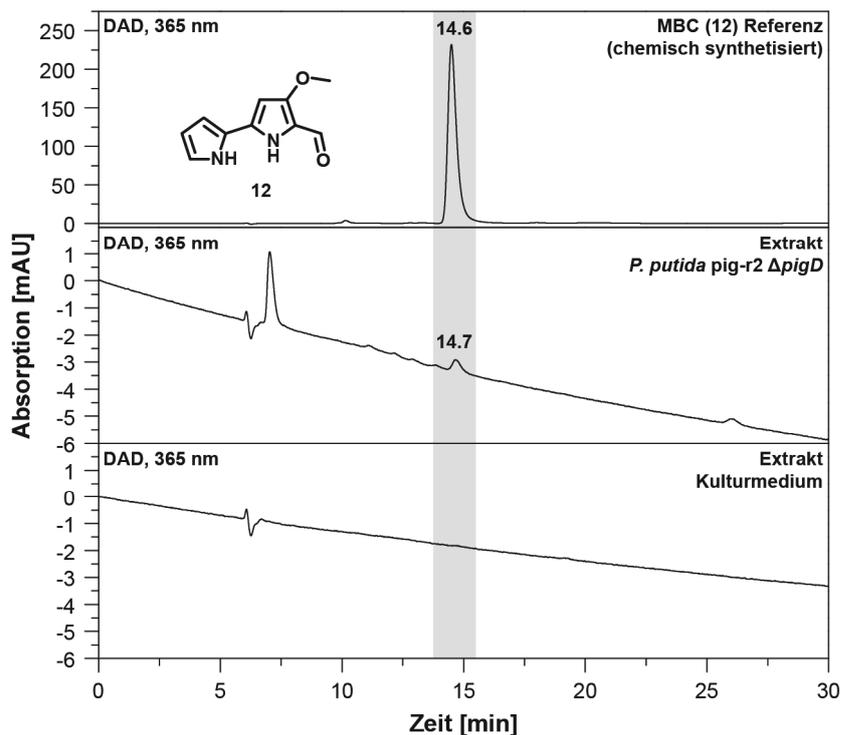


Abbildung 24: HPLC-Analyse der Biosynthese von MBC (12) der Deletionsmutante *P. putida pig-r2 ΔpigD*. Als Referenz diente chemisch synthetisiertes MBC (12); die Lokalisation des Biosyntheseintermediats wurde durch Extraktion ganzer Zellen und des Mediums überprüft.

Ein, im Vergleich zu Prodigiosin (**1a**), verminderter Export kann durch die erhöhte Hydrophilie diskutiert werden. Durch die Aldehydgruppe in MBC (**12**, berechneter LogP = 0.47; berechneter CLogP = 1.56¹⁸) erhöht sich die Polarität gegenüber Prodigiosin (**1a**, berechneter LogP = 2.40; berechneter CLogP = 5.09) deutlich, sodass eine gewisse Wasserlöslichkeit vorhanden ist und es möglicherweise eines aktiven Membrantransports für den Export bedarf. Hierbei sei allerdings zu beachten, dass die Wasserlöslichkeit zwar in der Literatur durchaus durch Agardiffusionsexperimente von MBC (**12**) produzierenden Stämmen beschrieben ist, diese jedoch in eigenen Löslichkeitsversuchen als äußerst gering betrachtet wurde.^[233]

3.3.3 Komplementationsexperimente mit *P. putida* pig-r2 Δ pigD

Mit dem Vorwissen der *Precursor-directed* Biosynthese mit MAP (**13a**) (*vide supra* 3.3.1) konnte anschließend die Biosynthese von Prodigiosin (**1a**) mit der Deletionsmutante *P. putida* pig-r2 Δ pigD durch Komplementation wiederhergestellt werden. Durch Supplementierung von exogenem MAP (**13a**) in DMSO bildete sich der rote Phänotyp vom ursprünglichen Produktionsstamm *P. putida* pig-r2 (Abbildung 25A) erneut aus (Abbildung 25C) und die Produktion von Prodigiosin (**1a**) konnte durch LC-MS verifiziert. Ebenfalls wurde die *in situ* Extraktion mittels PU-Schaum in dem Komplementationsansatz positiv evaluiert (Abbildung 25D); das Kulturmedium zeigte ebenfalls das phänotypisch farblose Erscheinungsbild der Deletionsmutante (Abbildung 25B), wohingegen die Schaumstoffwürfel den gebildeten Sekundärmetaboliten adsorbierten und anscheinend keinen Einfluss auf eine externe Zugabe und Aufnahme des Präkursors hatten.

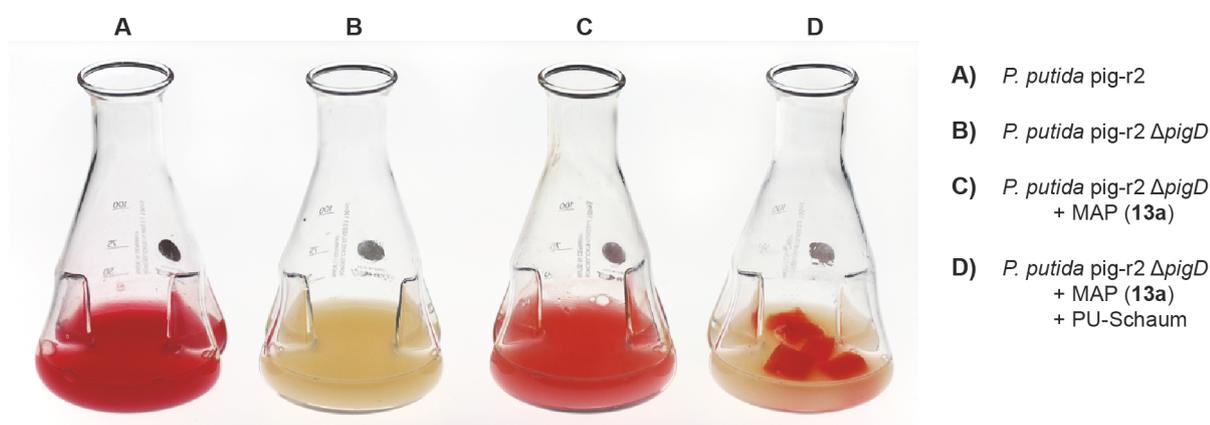


Abbildung 25: Komplementationsexperimente der Deletionsmutante *P. putida* pig-r2 Δ pigD. A) Produktionsstamm *P. putida* pig-r2 als Vergleich; B) *P. putida* pig-r2 Δ pigD; C) *P. putida* pig-r2 Δ pigD + MAP (**13a**); D) *P. putida* pig-r2 Δ pigD + MAP + PU-Schaum.

¹⁸ Die Berechnungen des LogP- und des CLogP-Wertes wurden durch ChemBioDraw Ultra 16.0 durchgeführt. Der LogP-Wert beruht auf dem Anteil von 94 verschiedenen Atomen am LogP-Wert von 830 exemplarischen Molekülen. Der LogP-Wert wurde durch Regression auf Basis der kleinsten Quadrate evaluiert und besitzt eine Standardabweichung von $\sigma = 0.47$.^[230] Der CLogP-Wert basiert auf einer Datenbank von BioByte mit über 60000 gemessenen logP-Werten von Molekülen, deren Fragmente jeweils einen Anteil an den LogP-Wert haben. Diese Fragmentanteile wurden durch QSAR (Quantitative Struktur-Wirkungs-Beziehung) modelliert.^[231, 232]

Nachdem die Grundlage für die Mutasyntese gelegt war, wurde diese unter den Gesichtspunkten der verwendeten Lösungsmittelkonzentration des Cosolvens und der „effektiven Präkursorkonzentration“ optimiert.¹⁹ Hierbei stand eine möglichst hohe Prodiginin Produktion unter geringer Einflussnahme auf die Vitalität der Zellen im Vordergrund. Zunächst wurde daher die Toxizität des Cosolvens DMSO auf den *Knockout*-Stamm evaluiert. Im Vergleich zu den Vorversuchen (3.3.1) wurde für die Supplementierung des Präkursors DMSO statt EtOH eingesetzt, da EtOH eine deutlich höhere bakteriostatische Wirkung auf *Pseudomonadaceae* aufweist. So inhibiert EtOH beim lösungsmitteltoleranten Stamm *Pseudomonas putida* S12 bereits ab ca. 2 % (v/v) die Wachstumsrate um 50 %, wohingegen bakteriostatische Konzentrationen von bis zu 20 % DMSO bei anderen *Pseudomonas* Spezies berichtet wurden.^[226, 227] Überdies eignet sich DMSO deutlich besser als Cosolvens in Fermentationen aufgrund seiner deutlich niedrigeren Volatilität (Flüchtigkeit DMSO/EtOH bei 20 °C = 0.56 hPa/58 hPa).

Durch den Vergleich der Wachstumsraten bei verschiedenen DMSO Konzentrationen konnten die inhibitorischen Parameter für *P. putida* *pig-r2 ΔpigD* bestimmt werden (Abbildung 26A und B). Für das Wachstum zeigte der Einsatz von 2 % (v/v) DMSO nahezu keinen Einfluss auf die Vitalität des Stamms und nur leichte Abweichungen in der Wachstumsrate, weshalb dieser Anteil Cosolvens für alle Mutasyntese Experimente dieser Arbeit übernommen wurde.

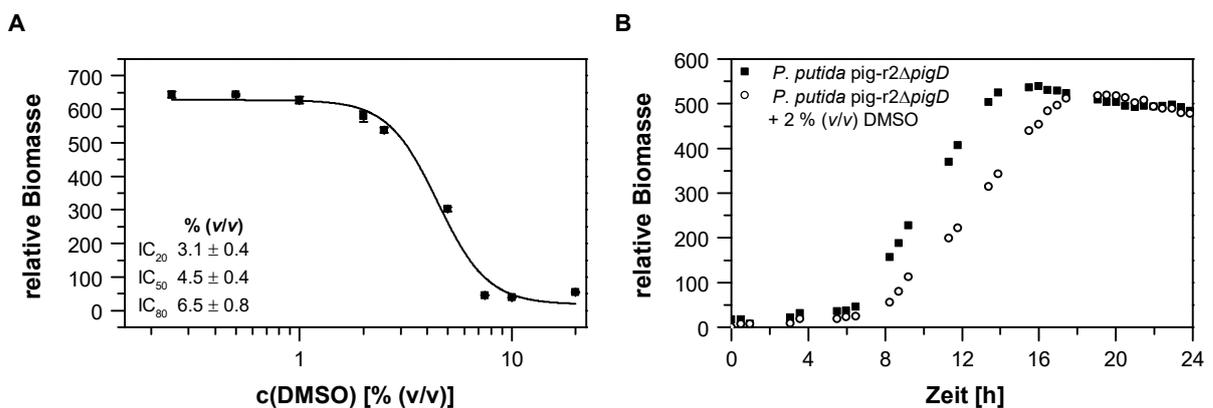


Abbildung 26: Lösungsmiteltoleranz von *P. putida* *pig-r2 ΔpigD* gegenüber DMSO. **A)** Bestimmung der inhibitorischen Konstante verschiedener DMSO Konzentrationen. **B)** Einfluss auf das Wachstum von *P. putida* *pig-r2 ΔpigD* bei 2 % (v/v) DMSO.

Ebenfalls wurde mit dem natürlichen Präkursor MAP (**13a**) exemplarisch die Toleranz in einem Toxizitäts-Assays gegenüber *P. putida* KT2440 und *E. coli* BL21(DE3) durchgeführt. Aus Abbildung 27A ist ersichtlich, dass *P. putida* KT2440 deutlich höhere Konzentrationen im Vergleich zu *E. coli* (IC₅₀ = 1.7 mM, entspricht 257 mg/L) tolerierte. Wie schon bei dem Toxizitäts-Assay mit Prodigiosin (**1a**) (3.2.2) zeigt dieses Ergebnis, dass *P. putida* KT2440 nicht nur ein idealer

¹⁹ Der Begriff der *effektiven Konzentration* ist hier nicht pharmakologisch oder toxikologisch zu verstehen und wurde auch nicht über Dosis-Wirkungs-Kurven berechnet.

Prodigiosin (**1a**) Produzent ist, sondern durch seine hohen Toleranzen auch für die Mutasyntese einen geeigneten Stamm darstellt.

Nach der Toxizitätsevaluation erfolgte die Bestimmung der effektiven MAP (**13a**) Präkursorkonzentration für die Produktion von Prodigiosin (**1a**) (Abbildung 27B). Hierfür wurde im analytischen Maßstab nach 24 h Kultivierung in einer *Deep-Well* Platte mit einem DMSO Anteil von 2% (v/v) die Menge des gebildeten Prodiginins mittels Absorption in ethanolischen Extrakten gemessen. Eine Präkursorkonzentration von 1.25 mM für Experimente im analytischen Maßstab und von 0.5 mM im präparativen Maßstab wurde nach Betrachtung der Daten für Folgeexperimente festgelegt.²⁰ Diese, für die Mutasyntese angestrebten Konzentrationen, sind für *P. putida* KT2440 zuvor als nicht toxisch bemessen worden. Um einen Vergleich zwischen Experimenten zu ermöglichen, wurden diese Konzentrationen ebenfalls für alle nichtnatürlichen Präkursoren angewandt.

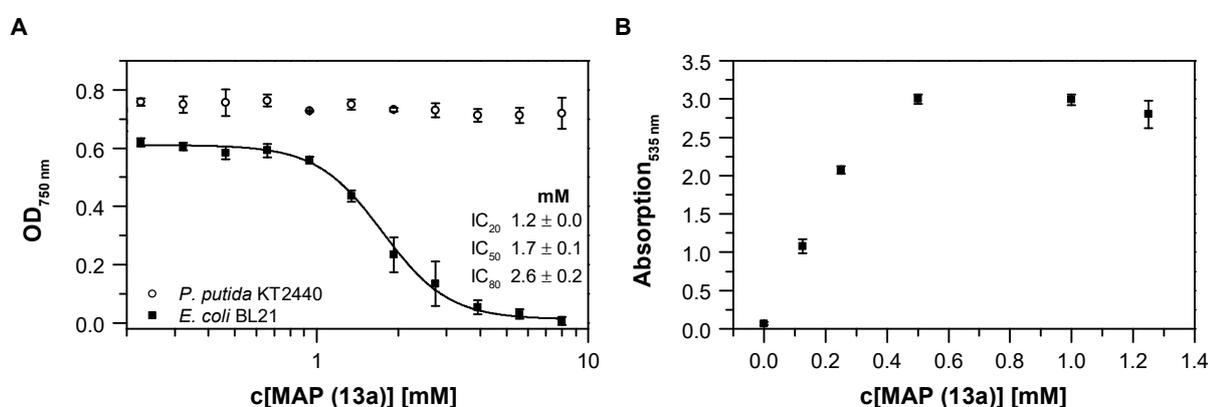


Abbildung 27: A) Toxizitäts-Assay von MAP (**13a**) gegenüber *P. putida* KT2440 und *E. coli* BL21(DE3). B) Effektive MAP (**13a**) Präkursorkonzentration für die Produktion von Prodigiosin (**1a**) im analytischen Maßstab. Die Quantifizierung von Prodigiosin (**1a**) basiert auf Absorptionmessungen von ethanolischen Zellextrakten.

Abschließend wurden über die Komplementationstests zwei leicht realisierbare Produktionsoptimierungen evaluiert. Eine allgemeine Optimierungsstrategie für die Produktion von Primär- und Sekundärmetaboliten betrachtet die Zuführung von Additiven wie Kohlenstoff- und Stickstoffquellen sowie kosteneffizienten Grundbausteinen zum Fermentationsmedium.^[234] Da der MBC (**12**) Biosynthesewegs auf L-Prolin aufbaut (*vide supra* Schema 3 und Schema 19), wurde in einer Optimierung diese Aminosäure in verschiedenen Konzentrationen dem Fermentationsmedium des *Knockout*-Stamms supplementiert und nach zusätzlicher MAP (**13a**) Zufütterung die Produktionsleistung von Prodigiosin (**1a**) evaluiert. Es stellte sich jedoch heraus, dass eine Supplementierung von L-Prolin keinen Effekt auf den Gesamtprozess der Mutasyntese aufweisen kann (Abbildung 28A); der spezifische Einfluss auf die MBC (**12**) Biosynthese wurde nicht betrachtet.

Eine weitere Optimierungsmöglichkeit betrifft den Zeitpunkt der Supplementierung der Präkursoren. Dieser Zeitpunkt kann die Produktionsleistung beeinflussen und divergiert, abhängig vom Organismus,

²⁰ Die niedrigere Präkursorkonzentration in den präparativen Ansätzen ist allein der verfügbaren Menge der Präkursoren geschuldet. Dennoch sollten sie gemäß Abbildung 27B eine ähnliche Produktionsmenge erreichen.

oftmals von Stunden bis Tagen.^[161, 169, 235] Wie bereits in den Abschnitten der Lokalisation des *pig Clusters* des Produktionsstamms (3.2.1) und der Optimierung der heterologen Produktion von Prodigiosin (**1a**) diskutiert, scheint die Produktionsleistung mit der Wachstumsphase des Bakterienstamms zu korrelieren. Daher wurde MAP (**13a**) zu verschiedenen Zeitpunkten zum *Knockout*-Stamm supplementiert und die Kultur jeweils für weitere 24 h fermentiert und im Anschluss die jeweilige Produktion von Prodigiosin (**1a**) evaluiert. Die Ergebnisse dieser Studie (Abbildung 28B) unterstützen ebenfalls die Theorie einer maximalen Produktionsleistung in der Wachstumsphase, welche möglicherweise durch den Genlocus des *pig Clusters* bedingt ist. Eine Supplementierung in den ersten Stunden der Wachstumsphase (4–14 h, Abbildung 28) führte zu einer erhöhten Prodigiosin (**1a**) Produktion, wohingegen bei einer Zufütterung in der Endphase des Wachstums – mit beginnender stationären Phase – die Produktion lediglich ein basales Level erreichte. Anhand der Prodigiosin (**1a**) Produktion kann möglicherweise die Ableserate der 16S-rRNA kodierenden Sequenz des rRNA Operons C von *P. putida* KT2440 visuell verfolgt werden. Als Resultat dieser Studie wurde die Supplementierung der Präkursoren direkt nach Inokulation der Mutasynthesekultur durchgeführt und nicht erst in der stationären Phase.

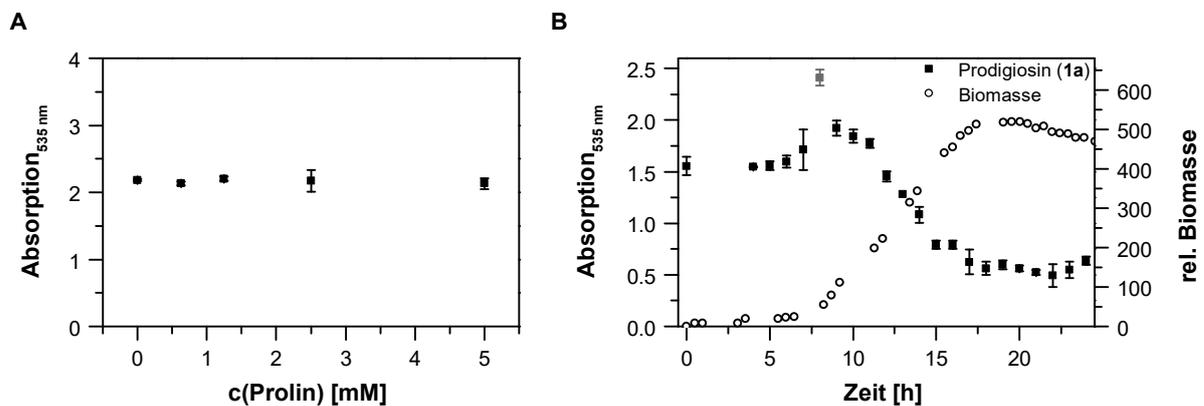


Abbildung 28: A) Einfluss der L-Prolin Supplementierung ins Fermentationsmedium auf die Prodigiosin (**1a**) Produktion. B) Einfluss des Zeitpunkts der MAP (**13a**) Supplementierung bei der Mutasynthese auf die Prodigiosin (**1a**) Produktion im Vergleich zur Wachstumskurve von *P. putida* *pig-r2 ΔpigD*. Die Supplementierung erfolgte jeweils zum gegebenen Zeitpunkt der x-Achse und die Quantifizierung von Prodigiosin (**1a**) nach weiteren 24 h Kultivierung. Die Quantifizierung basiert auf Absorptionsmessungen in ethanolischen Zellextrakten. Die Kulturen wurden mit einer $OD_{600} = 0.02$ angeimpft.

3.3.4 Mutasynthese im analytischen Maßstab

Anhand der optimierten Bedingungen wurde zunächst die Mutasynthese im analytischen Maßstab in *Deep-Well* Platten durchgeführt, um die Akzeptanz von PigC bezüglich verschiedener Präkursoren zu evaluieren.

Die *Precursor-directed* Biosynthese Experimente mit den 2,3-Dialkylpyrrolen 3-Butyl-2-methyl-1*H*-pyrrol (**13e**) und 3-Hexyl-2-methyl-1*H*-pyrrol (**13f**) zeigten bereits, dass PigC geringe Abweichungen des natürlichen Präkursors akzeptiert. Aufbauend auf diesen Ergebnissen wurden daher die Mutasynthese der ersten und zweiten Generation mit hoher struktureller Ähnlichkeit

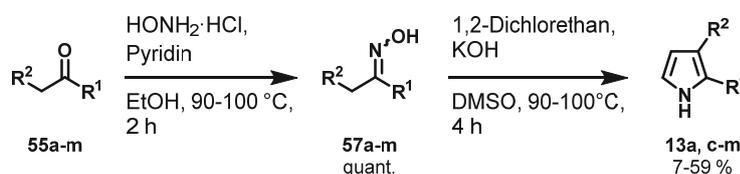
zu diesen Bausteinen erstellt. Die Produktion erfolgte in Analogie zur MAP (**13a**) Synthese (3.1.2). Die erste Generation enthielt dabei zunächst acht verschiedene 2,3-Dialkylpyrrole mit steigender Kettenlänge in der 3-Position, beginnend mit einer Methylgruppe bis hin zu einem Dodecylrest. Die Methylgruppe in der 2-Position wurde entsprechend dem natürlichen Baustein konstant gehalten. Einzig das Pyrrol mit einer exklusiven Methylgruppe in 2-Position (**13b**) wurde nicht über die *Trofimov*-Reaktion hergestellt; es wird jedoch trotzdem zur ersten Generation Mutasyntnone zugezählt. Die Mutasyntnone der zweiten Generation umfassten Pyrrole mit unterschiedlichen Kettenlängen in 2- und 3-Position. Dabei lag der Schwerpunkt insbesondere auf der Kettenverlängerung der Methylgruppe in der 2-Position.

3.3.4.1 Synthese von 2,3-Dialkylpyrrolen (*Trofimov*-Reaktion II) & Mutasyntnese

Synthese von 2,3-Dialkylpyrrolen

Analog zu MAP (**13a**) wurden die 2,3-Dialkylpyrrole **13b–m** mittels der *Trofimov*-Reaktion in schlechten bis moderaten Gesamtausbeuten von 7–59 % dargestellt (Tabelle 8).

Tabelle 8: Synthese der Mutasyntnone der ersten und zweiten Generation mittels der *Trofimov*-Reaktion. Angegeben ist jeweils die Gesamtausbeute über alle Schritte. Die entsprechende Synthesevorschrift ist in Kapitel 6.4 vermerkt.

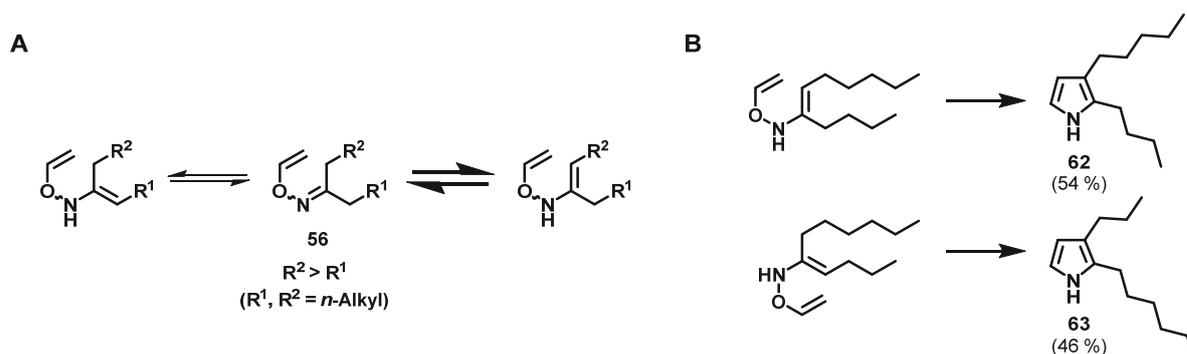


Mutasyntnon Generation	#	Monopyrrol	R ¹	R ²	Synthesevorschrift	Gesamtausbeute [%]	Prodiginin in Mutasyntnese
1. Generation	1	13b	Methyl	H	A/C	22/47 ^[a]	1b
	2	13c	Methyl	Methyl	A	47	1c
	3	13d	Methyl	<i>n</i> -Propyl	A	59	1d
	4	13e	Methyl	<i>n</i> -Butyl	A	48	1e
	5	13a	Methyl	<i>n</i> -Pentyl	A	49	1a
	6	13f	Methyl	<i>n</i> -Hexyl	A	49	1f
	7	13g	Methyl	<i>n</i> -Octyl	A	49	1g
	8	13h	Methyl	<i>n</i> -Decyl	A	36	1h
	9	13i	Methyl	<i>n</i> -Dodecyl	A	41	1i
2. Generation	10	13j	Ethyl	<i>n</i> -Pentyl	A	7	1j
	11	13k	<i>n</i> -Butyl	<i>n</i> -Propyl	A	14	1k
	12	13l	<i>n</i> -Pentyl	<i>n</i> -Butyl	A	27	1l
	13	13m	<i>n</i> -Hexyl	<i>n</i> -Pentyl	A	35	1m

^[a] Die Gesamtausbeute von 22 % ist auf die Synthese mittels der *Trofimov*-Reaktion bezogen. Die Gesamtausbeute von 47 % wird nach einer Reduktion von 1*H*-Pyrrol-2-carbaldehyd (**65**) erhalten.

Allerdings scheint eine zu MAP (**13a**) äquivalente Ausbeute lediglich bei den Pyrrolen der ersten Generation (Einträge 2–4, 6–9) möglich zu sein, welche ebenfalls als Rest R^1 eine Methylgruppe tragen und deren Rest R^2 größer als ein Wasserstoff waren.²¹ Längere Alkylketten, wie sie bei den Pyrrolen der zweiten Generation vorkommen, führten automatisch zu niedrigeren Ausbeuten, was zu der Annahme führt, dass möglicherweise die [3,3] sigmatrope Umlagerung unter den gewählten Bedingungen der *Trofimov*-Reaktion nicht ungehindert verlaufen kann oder die möglichen Nebenprodukte zunehmen. Allerdings sei darauf hingewiesen, dass mehrere Arbeiten aus dem Arbeitskreis von *Trofimov* explizit eine Optimierung jeder einzelnen Reaktion nahe legen.^[179, 180, 182-187]

Die schlechte Ausbeute von 7% des Pyrrols **13j** beleuchtet ein – von der Literatur nicht näher diskutiertes – Problem der Regioselektivität für die [3,3] sigmatrope Umlagerung der *Trofimov*-Reaktion. Anders als in Schema 13B gezeigt muss die Umlagerung nicht regioselektiv verlaufen. Werden *n*-Alkylketone für die Pyrrolsynthese eingesetzt, ist die Regioselektivität unter thermodynamischer Kontrolle abhängig von der Verteilung der möglichen intermediären Diene als Vorläufer der Sigmatropen Umlagerung (Schema 20A). Für die Methylketone der ersten Generation Mutasyntese (Einträge 1–8) und die symmetrischen Ketone der zweiten Generation (Einträge 10-12) kann diese Problematik selbstredend unbeachtet bleiben. Allerdings zeigte sich bereits bei der Substitution der Methylgruppe durch einen Ethylrest (Einträge 4 und 9), dass ein schwer trennbares Produktgemisch entsteht, woraus eine deutlich geminderte Gesamtausbeute von nur 7% resultiert. Allgemein entsteht das höher substituierte Enamin, sodass eine Produkttrennung teilweise dennoch möglich ist; nahezu identische Kettenlängen führen allerdings zu untrennbaren Produktgemischen. Bei einer weiteren Verlängerung beider Alkylreste konnte in der Synthese mit 5-Undecanon lediglich ein Gemisch der beiden Produkte **62** und **63** (54:46²²) erhalten werden, sodass diese Pyrrole keine Anwendung in der Mutasyntese fanden (Schema 20B).

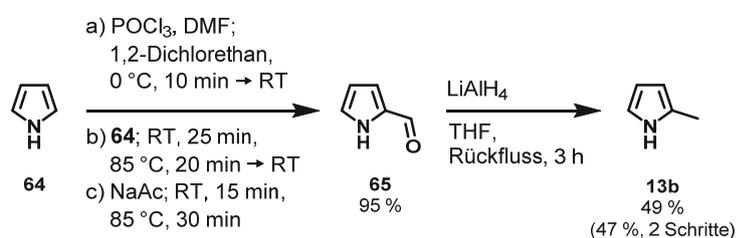


Schema 20: A) Mögliche Diene ausgehend vom *O*-Vinyl-Ketoxim **56**. B) Ausgehend von verschiedenen Dienene führt die [3,3] sigmatrope Umlagerung in der *Trofimov*-Reaktion zu unterschiedlichen Produkten. Das Verhältnis wurde über NMR-Spektroskopie bestimmt.

²¹ Pyrrol **13b**, welches nicht den 2,3-Dialkylpyrrolen zugeordnet werden kann, wird gesondert am Ende dieses Syntheseabschnittes behandelt.

²² Das Verhältnis wurde über NMR-Spektroskopie bestimmt.

Das Pyrrol **13b** nimmt in diesem Abschnitt eine gesonderte Rolle ein, da es selbstredend nicht der Klasse der 2,3-Dialkylpyrrole zugehörig ist. Da dieses Pyrrol strukturell zu der Untersuchung der Mutasyntone der ersten Generation zählt und überdies der Zugang über die *Trofimov*-Reaktion erreicht wurde, findet es seine Erwähnung in diesem Kapitel. Ausgehend vom Aceton kann dieser Baustein über Acetonoxim (**55b**) in einer Gesamtausbeute von 22% hergestellt werden. Die, im Vergleich zu MAP (**13a**), deutlich geringere Ausbeute kann möglicherweise auf den niedrigen Anteil des intermediären Enamins zurückgeführt werden. Da das Intermediat Acetonoxim (**55b**) zusätzlich als putativ karzinogen eingestuft wird, wurde eine alternative Syntheseroute durch eine ebenfalls zweistufige Synthese ausgehend von 1*H*-Pyrrol (**64**) angewandt. Hierfür wurde in einer *Vilsmeier* Formylierung zunächst das 1*H*-Pyrrol-2-carbaldehyd (**65**) dargestellt, welches anschließend zum 2-Methyl-1*H*-pyrrol (**13b**) reduziert wurde. Die Gesamtausbeute für diese Reaktion betrug 47% (Schema 21).



Schema 21: Alternative Synthese des 2-Methyl-1*H*-pyrrols (**13b**).

Mutasyntese mit 2,3-Dialkylpyrrolen

Die Mutasyntone Akzeptanz von *P. putida* pig-r2 Δ pigD und dem Kondensationsenzym PigC wurde zunächst mit den Präkursoren der ersten Generation **13a–i** mittels *in vivo* Mutasyntese evaluiert. Die Verwendung dieser Bausteine erlaubt es den Einfluss der Alkylkettenlänge in der 3-Position zu untersuchen; in Analogie zu MAP (**13a**) blieb die Methylgruppe in 2-Position unangetastet. Wie in Abbildung 29 gezeigt, werden die Mutasyntone größtenteils von PigC akzeptiert und zu den entsprechenden roten Prodiginine gebildet. Neben Prodigiosin (**1a**) kann die Formierung von sechs weiteren Prodigininen **1c–h** visuell und mittels LC-MS bestätigt werden. Die Prodiginine **1c** und **1h** konnten allerdings nur in geringen Spuren über die LC-MS nachgewiesen werden und auch die Quantifizierung über Absorptionsspektroskopie wies auf eine sehr geringe Einbaurate der entsprechenden Mutasyntone **13c** und **13h** hin (Extinktionskoeffizienten *vide infra* 3.3.4.5). Da die Mutasyntone **13b** und **13i**, welche die größte Divergenz zum natürlichen Substrat aufweisen, nicht mehr von PigC akzeptiert wurden, war deutlich eine Limitierung der Mutasyntese in Bezug auf die Alkylkettenlänge in 3-Position erkennbar. Gleichwohl konnte anhand des Ergebnisses von Mutasyntone **13b** festgehalten werden, dass die Alkylkette in der 3-Position unerlässlich für die Akzeptanz von PigC ist.

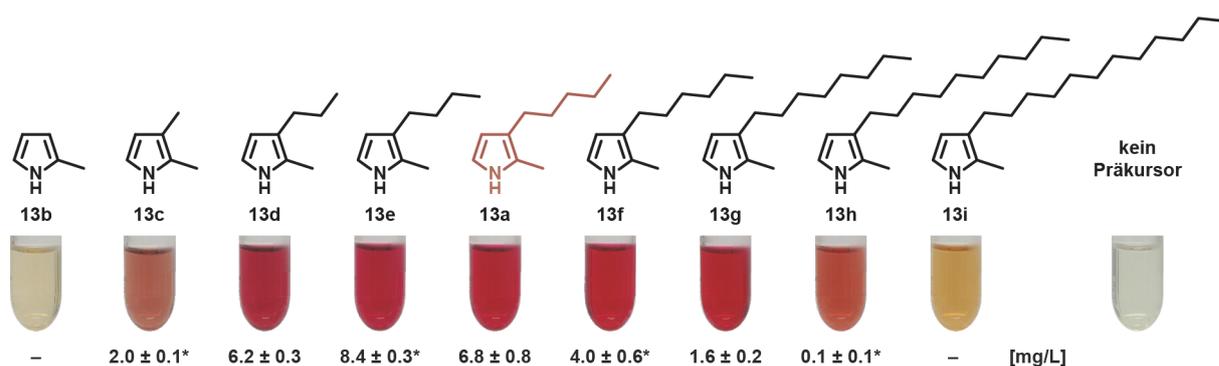


Abbildung 29: Mutasyntese durch Supplementierung der Mutasyntese 13a–i der ersten Generation mit variabler Alkylkettenlänge in 3-Position und konstanter Methylgruppe in 2-Position. Die Quantifizierung der Prodiginine 1c–h basiert auf Absorptionsmessungen von ethanolischen Zellextrakten aus Mutasyntesen im analytischen Maßstab. Folgende Farbkodierung wird verwendet: rot – natürlicher Präkursor MAP (13a). [* Die Quantifizierung beruht auf berechneten molaren Extinktionskoeffizienten (*vide infra* 3.3.4.5).]

Entsprechend der Variabilität der Alkylkettenlänge in 3-Position wurden die Mutasyntese 13j–m synthetisiert um die Akzeptanz bezüglich der Kettenlänge in 2-Position zu untersuchen. Bedingt durch die zuvor beschriebenen Einschränkungen in der Pyrrolsynthese durch die *Trofimov*-Reaktion (*vide supra*) konnte eine zunehmende Kettenlänge der 2-Position nicht mit gleichbleibender Kettenlänge in 3-Position realisiert werden. In der Anwendung in der Mutasyntese war erkennbar, dass im Kontrast zu der flexiblen Akzeptanz der 3-Position die Verlängerung der Methylgruppe in 2-Position zu einer starken Einschränkung in der Inkorporation führte (Abbildung 30). Lediglich das Mutasyntese 13j wurde in der Mutasyntese toleriert; das Prodiginin 1k konnte nur durch LC-MS Analyse in Spuren nachgewiesen werden.

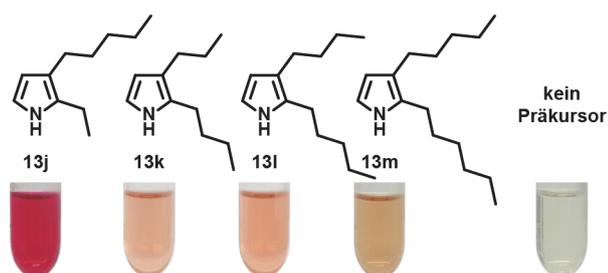


Abbildung 30: Mutasyntese durch Supplementierung der Mutasyntese 13j–m der zweiten Generation mit variabler Alkylkettenlänge in 2- und 3-Position.

3.3.4.2 Synthese von 3-Alkylpyrrolen & Mutasyntese

Synthese von 3-Alkylpyrrolen

Aufbauend auf den Ergebnissen für die 2- und 3-Position wurde anschließend die Frage der Bedeutung der Methylgruppe in 2-Position untersucht. Hierfür wurden sechs in 2-Position demethylierte 3-Alkylpyrrole **13n–s** synthetisiert (Tabelle 9). Da eine Synthese von exklusiv in 3-Position alkylierten Pyrrolen mittels *Trofimov*-Reaktion nicht möglich ist, wurde auf die Synthesesequenz in Tabelle 9 zurückgegriffen. Der Vorteil dieser Sequenz liegt in einem einzigen finalen Chromatographieschritt im Anschluss der letzten reduktiven Synthese. Zunächst wird *N*-Tosylpyrrol (**66**) in quantitativer Ausbeute aus 1*H*-Pyrrol (**64**) erhalten und dient als Edukt aller 3-Alkylpyrrole (**13n–s**). Die Einbringung der Tosylgruppe erfolgt hier nicht als Schutzgruppe, sondern dirigiert die nachfolgende *Friedel-Crafts*-Acylierung in die 3-Position. Gewöhnlich sind die fünfgliedrigen Heterozyklen wie Pyrrol einer elektrophilen Substitution präferiert an der α -Position (2- und 5-Position) ausgesetzt (Abbildung 31). Konträr zu den 6-Ringsystemen kann diese hohe α -Reaktivität durch Vergleich der *Wheland* Intermediate der Übergangszustände erklärt werden, da der elektronische Anteil des Elektronenpaares am Heteroatom beim α -Angriff größer ist. Durch die Tosylierung wird der Stickstoff deaktiviert und der regioselektive Angriff bei einer Acylierung wird durch den Katalysator, die Lewis-Säure, und das Acylierungsmittel diskriminiert.^[236, 237] So verläuft die Acylierung bei Verwendung eines Anhydrids in Gegenwart von Bortrifluorid fast ausschließlich α -selektiv, wohingegen bei Acylchloriden mit Aluminiumtrichlorid die β -Position elektrophil angegriffen wird.

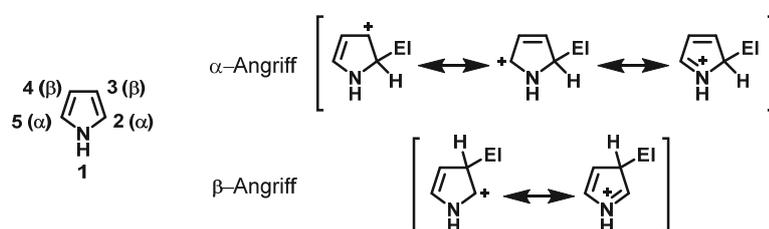
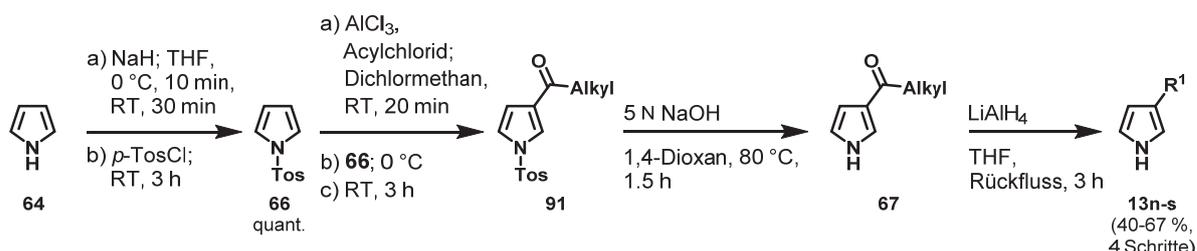


Abbildung 31: Elektrophile Substitution am Pyrrol an α - und β -Position. [El = Elektrophil]

Nach erfolgter *Friedel-Crafts*-Acylierung in 3-Position wird die Tosylgruppe unter basischer Hydrolyse quantitativ abgespalten und die 3-Alkylpyrrole **13n–s** in moderaten Gesamtausbeuten von 40–67 % nach anschließender Reduktion der 3-Acylpyrrole (**67**) durch Lithiumaluminiumhydrid erhalten. Die Verwendung von Lithiumaluminiumhydrid für die Reduktion zum Alkan konnte für diese Reaktion als ausreichend evaluiert werden und war obligat, da die Verwendung von Natriumborhydrid nur den Alkohol freisetzt und die hohen Temperaturen der *Wolff-Kishner*-Reduktion die Polymerisation der Pyrrole beschleunigte und nicht zum gewünschten Produkt führte. Dass die Reduktion von kurzkettigen Carbonylverbindungen in 2- und 3-Position mit der Lithiumverbindung nicht ebenfalls bei den entsprechenden sekundären Alkoholen abbricht, wurde bereits 1952 und 1954 von *Treibs* und *Scherer* festgestellt und als „Überreduktion“ beschrieben.^[238, 239] Die hier dargestellten Pyrrole **13n–s** zeigen, dass diese Reduktion eine generelle Alternative zu der oft verwendeten *Wolff-Kishner*-Reduktion mit karzinogenen Hydrazinen bildet.^[240, 241]

Tabelle 9: Synthese der Mutasyntnone der dritten Generation. Angegeben ist jeweils die Gesamtausbeute über alle Schritte. Die entsprechende Synthesevorschrift ist in Kapitel 6.4 vermerkt.



Mutasynton Generation	#	Monopyrrol	R ¹	Synthesevorschrift	Gesamtausbeute [%]	Prodiginin in Mutasyntnese
3. Generation	1	13n	Ethyl	B	57	1n
	2	13o	<i>n</i> -Propyl	B	66	1o
	3	13p	<i>n</i> -Pentyl	B	40	1p
	4	13q	<i>n</i> -Hexyl	B	67	1q
	5	13r	<i>n</i> -Octyl	B	58	1r
	6	13s	<i>n</i> -Undecyl	B	46	1s

Mutasyntnese mit 3-Alkylpyrrolen

Die Akzeptanz dieser Mutasyntnone von *P. putida* pig-r2 Δ pigD bzw. dem Kondensationsenzym PigC ist im Vergleich zu den methylierten Präkursoren der ersten Generation 13a–i drastisch reduziert. Lediglich bei den Pyrrolen 13p–r, welche die größte Ähnlichkeit zu dem natürlichen Präkursor MAP (13a) aufweisen, sind die gebildeten Prodiginine 1p–r sowohl visuell als auch *via* LC-MS nachweisbar (Abbildung 32). Dies verdeutlicht – insbesondere nach den zuvor beschriebenen Einschränkungen der Verlängerung in der 2-Position bei den Mutasyntnonen 13j–m – die Wichtigkeit der natürlichen Methylgruppe für die Akzeptanz von *n*-Alkylpyrrolen.

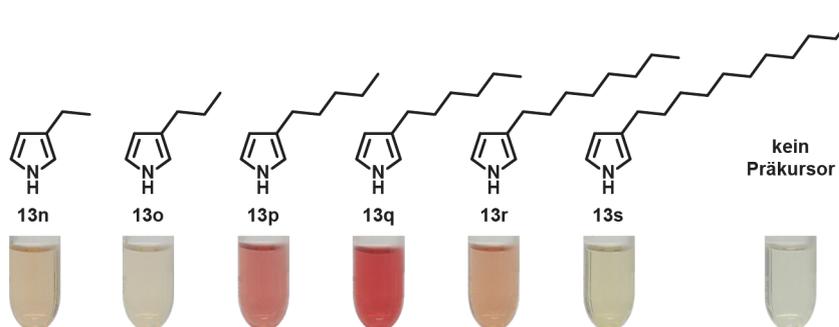


Abbildung 32: Mutasyntnese durch Supplementierung der Mutasyntnone 13n–s der dritten Generation mit variabler Alkylkettenlänge in 3-Position.

Die Analyse der Absorptionsspektren der gebildeten Prodiginine zeigt aufgrund des divergenten Alkylierungsmusters eine Verschiebung des Absorptionsmaximums von $\lambda_{\text{max}} = 535$ nm bei

Prodigiosin (**1a**) auf $\lambda_{\max} = 522$ nm für die Prodiginine **1p–r**. Zusätzlich ist bei der Betrachtung der LC-MS Daten auffällig, dass im Vergleich zu den methylierten Prodigininen jeweils mindestens zwei Signale unterschiedlicher Intensität im Bereich dieser Absorptionswellenlänge im Chromatogramm und in den extrahierten Massenspektren detektiert worden sind. In Abbildung 33 sind exemplarisch die Daten für Prodiginin **1p** gezeigt, welches das demetylierte Derivat zu Prodigiosin (**1a**) darstellt.

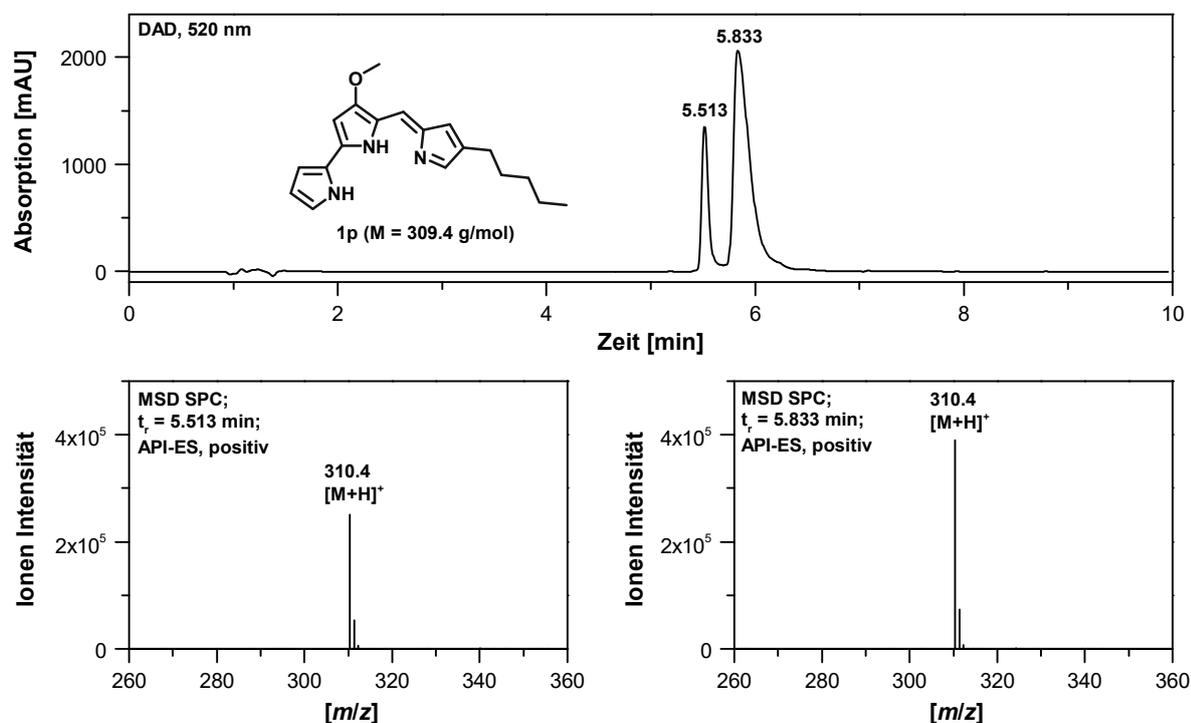
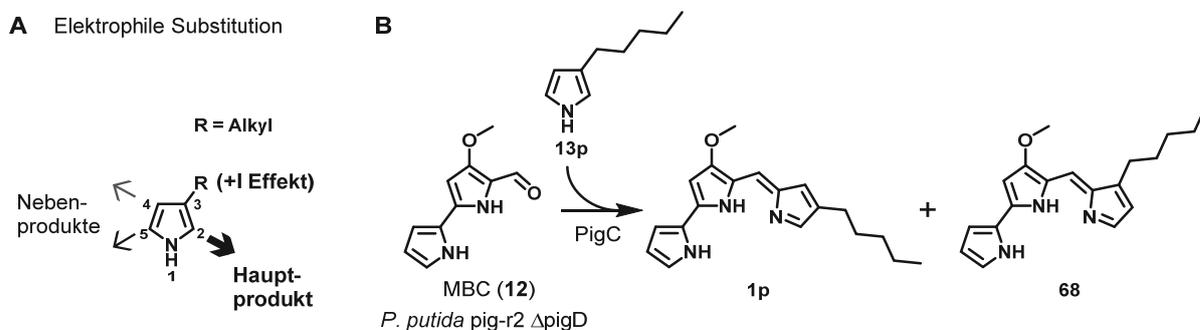


Abbildung 33: LC-MS Chromatogramme und Massenspektren der Mutasyntese mit dem Mutasynton **13p** der dritten Generation.

Da die Peaks jeweils dieselben Absorption- und Massenspektren zeigen und auch die für Prodiginine typischen Isotopenpeaks aufweisen [Prodiginin **1p** $[M+H]^+$; berechnet: 310.19 (100%), 311.19 (20.5%), 312.20 (2.0%); gefunden: 310.19 (100%), 311.19 (20.3%), 312.20 (2.0%)], muss es sich um Regioisomere handeln. Möglicherweise ist die Methylgruppe des MAP (**13a**) Präkursors in der natürlichen Biosynthese von Prodigiosin (**1a**) für die Regioselektivität verantwortlich und daher essentiell, da nur eine α -Position (5-Position) für die elektrophile aromatische Substitution zur Verfügung steht. Dass in bisher allen entdeckten natürlichen Prodigininen die α -Position (2-Position) durch einen Rest für eine Substitution blockiert ist, wäre ein weiteres Argument für diese These. Im Beispiel allerdings von Mutasynton **13p** und den anderen demethylierten Pyrrolen sind jedoch zwei α -Positionen vorhanden (2- und 5-Position), sodass die zwei Regioisomere **1p** und **68** bei ungenügender Selektivität von PigC entstehen können (Schema 22B). Dabei würde, ausgehend von dem +I-Substituenteneffekt der Alkylgruppe, der Angriff an der 2-Position bevorzugt werden (Schema 22A).^[242] Bezüglich des sterischen Anspruchs der Pentylkette und der allgemeinen Selektivität von PigC für die 5-Position kann jedoch das Hauptprodukt ebenso das in Abbildung 33 und Schema 22B

dargestellte Prodiginin **1p** sein. Eine Substitution an 4-Position kann zwar nicht ausgeschlossen werden, erscheint allerdings aus Sicht der chemischen- und enzymatischen-Selektivität als unwahrscheinlich. Eine Aufklärung der Selektivität wurde nicht durchgeführt, sie kann allerdings durch den Vergleich von NMR-Spektren oder Retentionszeiten – der durch Chromatographie getrennten Verbindungen – mit dem chemisch synthetisierten Prodiginin ermöglicht werden.

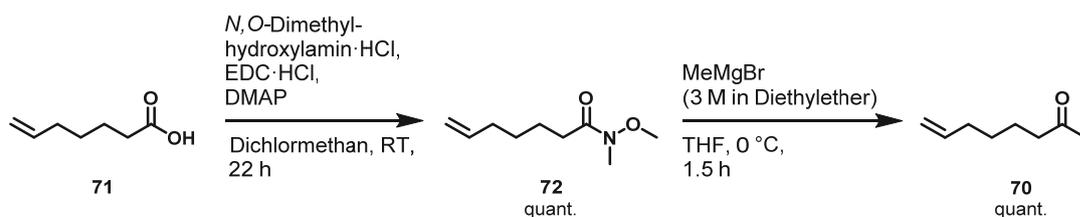


Schema 22: Regioselektivität der 3-Alkylpyrrole der Mutasyntese mit dem Mutasynthon **13p** der dritten Generation. **A)** Regioselektivität der elektrophilen aromatischen Substitution an Pyrrol für einen Alkylrest in 3-Position. **B)** Mögliche Regioisomere der Mutasyntese mit dem Mutasynthon **13p**.

3.3.4.3 Synthese von 3-Alkenyl-2-methylpyrrolen & Mutasyntese

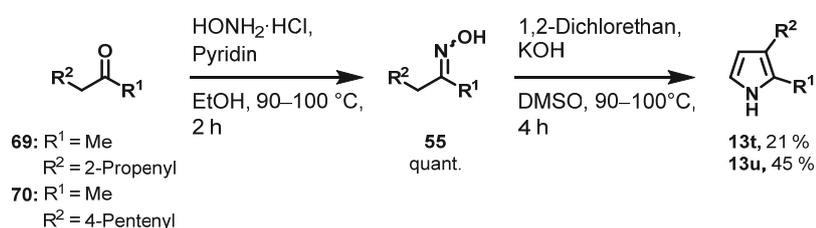
Synthese von 3-Alkenyl-2-methylpyrrolen

Aus den gewonnenen Erkenntnissen der ersten bis dritten Generation an Präkursoren wurde schließlich das Konzept der Mutasyntese durch zwei weitere Pyrrole **13t** und **13u** mit terminalen Alkenen erweitert (Tabelle 10). Hierdurch sollte anschließend eine weitere chemische Funktionalisierung durch konsekutive Semisyntese nach Einbau dieser Mutasyntehone angestrebt werden. Die Synthese dieser Pyrrole wurde analog zu der ersten und zweiten Generation Mutasyntehone über die *Trofimov*-Reaktion verwirklicht, allerdings war lediglich das Keton 5-Hexen-2-on (**69**) kommerziell verfügbar; das Keton 7-Octen-2-on (**70**) für das Pyrrol **13u** wurde nach folgender Sequenz hergestellt. Zunächst wurde 6-Heptensäure (**71**) in einer *Weinreb-Nahm* Ketonsynthese zum entsprechenden *Weinreb-Nahm* Amid **72** umgesetzt und anschließend das Keton **70** nach Behandlung mit dem *Grignard*-Reagenz Methylmagnesiumbromid in quantitativer Ausbeute erhalten (Schema 23). Ausgehend von diesen Ketonen wurden die Pyrrole **13t** und **13u** über die *Trofimov*-Reaktion in moderaten Gesamtausbeuten von 21 % respektive 45 % synthetisiert (Tabelle 10).



Schema 23: Synthese des Ketons 7-Octen-2-on (70) als Ausgangsmaterial für die Pyrrolsynthese.

Tabelle 10: Synthese der Mutasyntnone der vierten Generation mittels der *Trofimov*-Reaktion. Angegeben ist jeweils die Gesamtausbeute über alle Schritte. Die entsprechende Synthesevorschrift ist in Kapitel 6.4 vermerkt.



Mutasynton Generation	#	Monopyrrol	R ¹	R ²	Synthese- vorschrift	Gesamt- ausbeute [%]	Prodiginin in Mutasyntnese
4. Generation	1	13t	Methyl	2-Propenyl	A	21	1t
	2	13u	Methyl	4-Pentenyl	A ^[a]	45 ^[b]	1u

^[a] Das Ausgangsmaterial 7-Octen-2-on (70) wurde zuvor aus 6-Heptensäure (71) hergestellt.

^[b] Die Gesamtausbeute ist für die Synthese beginnend von 6-Heptensäure (71) angegeben.

Mutasyntnese mit 3-Alkenyl-2-methylpyrrolen

Vergleichbar zu den Pyrrolen 13d und MAP (13a) wurden beide neuen Mutasyntnone von PigC – mit einer höheren Präferenz für Pyrrol 13u – angenommen (Abbildung 34). Diese Präferenz kann durch die Identität zum natürlichen Präkursor erörtert werden. Die Bereitstellung des Prodiginins 1u im quantitativen Maßstab sowie der Anwendung in einer konsekutiven Semisyntnese wird in Kapitel 3.5.2 betrachtet.

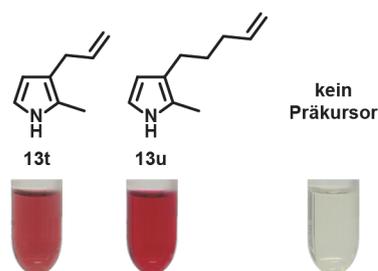


Abbildung 34: Mutasyntese durch Supplementierung der Mutasyntone 13t und 13u der vierten Generation mit terminalen Alkenfunktionalitäten in 3-Position.

3.3.4.4 Indole sowie Synthese von zyklischen 2,3-Dialkylpyrrolen & Mutasyntese

Die bisher betrachteten Mutasyntone 13b–u sind gemeinschaftlich als Analoga des natürlichen Intermediats MAP (13a) zu verstehen. Dabei handelt es sich ausschließlich um *n*-Alkyl- bzw. *n*-Alkenylpyrrole mit einer teilweise eingeschränkten Akzeptanz des Kondensationsenzym PigC. In der anfänglichen Auflistung verschiedener natürlicher Prodiginine sind allerdings auch zyklische Alkyl Vertreter wie Streptorubin A (5) und -B (4), Prodigiosin R1 (6) oder Cycloprodigiosin (7) aufgelistet. Diese entstehen auf natürlichen Weg zwar über eine enzymatische, konsekutive Zyklisierung der *n*-Alkylprodiginine zu 2,4- oder 3,4-Cycloalkylpyrrolen, dennoch entwickelte sich aus der Betrachtung dieser natürlichen Sekundärmetabolite die Frage nach der direkten Akzeptanz von zyklischen Pyrrolen oder strukturell ähnlichen Vertretern durch PigC für die Bereitstellung von artifiziellen zyklischen Prodigininen.

Mutasyntese mit Indolen

Indole stellen zyklische Pyrrolderivate dar. Da viele verschiedene Indole mit unterschiedlichen funktionellen Resten kommerziell erhältlich sind und die chemische Synthese von einem Indolderivat von Prodigiosin bezüglich des C-Rings bereits von *Baldino et al.* 2006 publiziert wurde, fanden vier Indole ihren Einsatz in der Mutasyntese.^[63] Neben Indol (73a) wurden 5-Nitroindol (73b) und 5-Chlorindol (73c) als Analoga mit elektronenziehenden Gruppen und 5-Methoxyindol (73d) mit einem Elektronendonator als Mutasyntone eingesetzt (Abbildung 35).

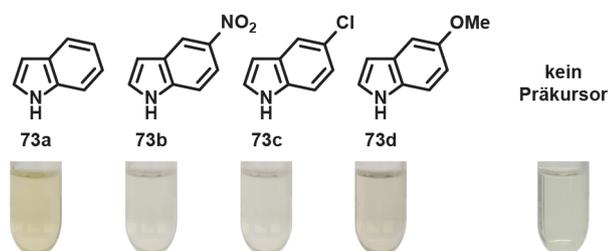
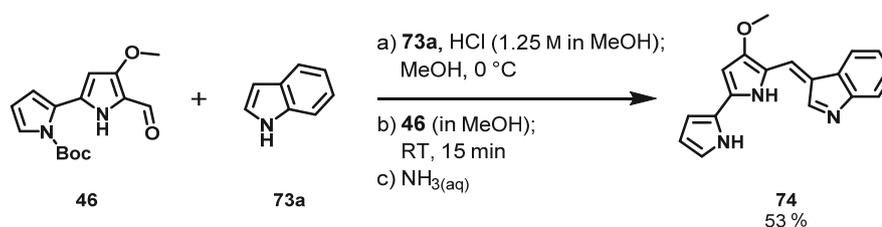


Abbildung 35: Mutasyntese durch Supplementierung der Indol Mutasyntone 73a–d.

Wie Abbildung 35 bereits visuell bestätigt, wurde keines der Indole als Mutasynton akzeptiert. Es konnte ebenfalls keine Produktformierung über LC-MS Analyse bestätigt werden. Dabei sei anzumerken, dass lediglich bei Indol (**73a**) und 5-Methoxyindol (**73d**) ein Bakterienwachstum zu vermerken war, 5-Nitroindol (**73b**) und 5-Chlorindol (**73c**) sind entweder in den verwendeten Konzentrationen der Mutasyntese stark bakteriostatisch oder gar bakterizid. Für 5-Nitroindol (**73b**) ist überdies in der Literatur eine starke Mutagenität über Ames Tests für diverse Mikroorganismen bestätigt.^[243, 244] Eine Reduktion der Konzentration wurde aufgrund der negativen Ergebnisse und der deutlichen Verminderung des Wachstums ausgeschlossen und die mutasyntetische Produktion von Indolprodigininen nicht weiter verfolgt. Da für das in der Literatur publizierte Indolprodiginin (**74**) keine Angaben bezüglich der Produktausbeuten der Reaktion gegeben waren, wurde die chemische Synthese im analytischen Maßstab evaluiert, um zukünftig eine Synthese für Indolprodiginine inklusive der zugehörigen Analytik vorweisen zu können.²³ Dabei stellte sich heraus, dass Indol (**73a**) in der Kondensationsreaktion deutlich langsamer als das zuvor verwendete MAP (**13a**) reagiert und eine Synthese unter den zuvor berichteten Bedingungen der Prodigiosin (**1a**) Synthese (3.1.3) nicht möglich war. Wie schon bei der Entschützung von Boc-MBC (**46**) beobachtet, wurde durch die Verwendung von Phosphoroxychlorid oder HCl und Vorlage des Boc-MBC (**46**) die Nebenreaktion der Dimerisierung zweier Boc-MBC (**46**) Moleküle zum blauen Tetrapyrrol (**52**, Schema 12B) katalysiert und anschließend das reaktionsträge Indol (**73a**) polymerisiert. Daher wurde anschließend das Indol (**73a**) im sauren MeOH vorgelegt und langsam das Boc-MBC (**46**) zugegeben, wodurch die Kondensation zum Indolprodiginin (**74**) gelang (Schema 24). Diese war jedoch deutlich langsamer als die vergleichbare Synthese von Prodigiosin (**1a**). Dieses Ergebnis zeigt, dass Indole – auch wenn sie als Pyrrolderivate verstanden werden – ein deutlich abweichendes Reaktionsverhalten zeigen. Dies könnte, neben der Molekülstruktur, auch ein Grund der Abweisung in der Mutasyntese darstellen.



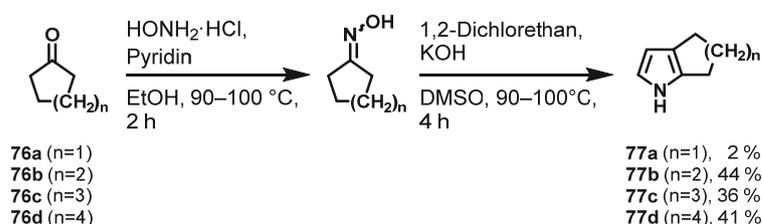
Schema 24: Kondensationsreaktion von Boc-MBC (**46**) und Indol (**73a**) zu Indolprodiginin (**74**).

²³ Die Synthese von Indolprodiginin (**74**) wurde von M.Sc. Lavinia Dunsmore (University of Cambridge) während ihres Aufenthalts am Institut für Bioorganische Chemie (IBOC) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf im Rahmen des vom DAAD geförderten RISE-Austauschprogramms unter Weisung des Autors durchgeführt.

Synthese von zyklischen 2,3-Dialkylpyrrolen

Nachdem die Indole gezeigt haben, dass zyklische ungesättigte Verbindungen von PigC nicht akzeptiert werden oder toxisch für *P. putida* pig-r2 Δ pigD waren, wurden die zyklischen Verbindungen auf gesättigte Alkyle ausgeweitet. Die Produkte dieser Mutasyntese sind artifiziellen zyklischen Prodigininen **75** mit 2,3-Cycloalkylpyrrolen als C-Ring. Der Vorteil von gesättigten, unverzweigten Verbindungen liegt in ihrer Struktur, da ihre Ketone für die *Trofimov*-Reaktion in jedem Fall symmetrisch sind und daher keine Produktgemische entstehen können. Ausgehend von den zyklischen Ketonen **76a–d** wurden ähnliche moderate Ausbeuten für die Pyrrole **77b–d** im Vergleich zu den Methylketonen **13a–i** und den symmetrischen Ketonen **13k–m** erhalten.^[2] Einzig das Fünfringpyrrol 1,4,5,6-Tetrahydrocyclopenta[*b*]pyrrol (**77a**) konnte nur in sehr schlechter Ausbeute von 2 % hergestellt werden (Tabelle 11).²⁴

Tabelle 11: Synthese der Mutasyntese der fünften Generation mittels der *Trofimov*-Reaktion. Angegeben ist jeweils die Gesamtausbeute über alle Schritte. Die entsprechende Synthesevorschrift ist in Kapitel 6.4 vermerkt.



Mutasynton Generation	#	Monopyrrol	Ringgröße	Synthesevorschrift	Gesamtausbeute [%]	Prodiginin in Mutasyntese
	1	77a	Cyclopentyl	A	2	75a
5. Generation	2	77b	Cyclohexyl	A	44	75b
	3	77c	Cycloheptyl	A	36	75c
	4	77d	Cyclooctyl	A	41	75d

Mutasyntese mit zyklischen 2,3-Dialkylpyrrolen

In der Mutasyntese zeigten die zyklischen Alkylpyrrole **77a–d** eine beachtliche Akzeptanz von PigC. Dabei stieg die Akzeptanz mit Zunahme der Ringgröße (Abbildung 36).^[2] Verglichen mit den Mutasyntesen der ersten und zweiten Generation kann hier eine Korrelation bezüglich der 2- und 3-Position diskutiert werden. So kann das zyklische Cyclopentylpyrrol **77a** bezüglich seiner Größe mit dem 2,3-Dimethylpyrrol **13c** verglichen werden, welches auch nur eine moderate Akzeptanz zeigt. Die Zunahme der Ringgröße entspricht auch einer Zunahme in 2- und insbesondere der 3-Position, wodurch die Akzeptanz zumindest bezüglich der 3-Position bis zum Pentylrest von MAP (**13a**) zunimmt. Die Grenze des Einbaus wurde in diesem Mutasynteseexperiment nicht erreicht und muss daher durch die

²⁴ Wiederholte Syntheseversuche von M.Sc. *David Paul Klebl* für das Pyrrol **77a** im Rahmen seiner Masterarbeit bestätigten den schlechten Zugang zu diesen Pyrrolen und ergaben keine Verbesserung der Ausbeute.^[6]

Synthese größerer Ringsysteme zukünftig evaluiert werden.²⁵ Verglichen mit den zuvor getesteten Indolen **73a–d** ist die Inkorporation der zyklischen Pyrrole bemerkenswert. Dies zeigt, dass die Substratspezifität von PigC für den C-Ring nicht nur ausschließlich auf den sterischen Anspruch der Reste beruht, sondern ebenfalls elektronische Effekte und damit unterschiedliche Reaktivitäten berücksichtigt werden.

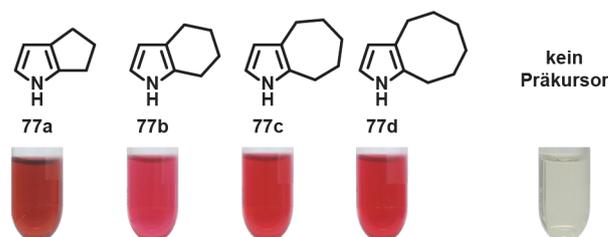


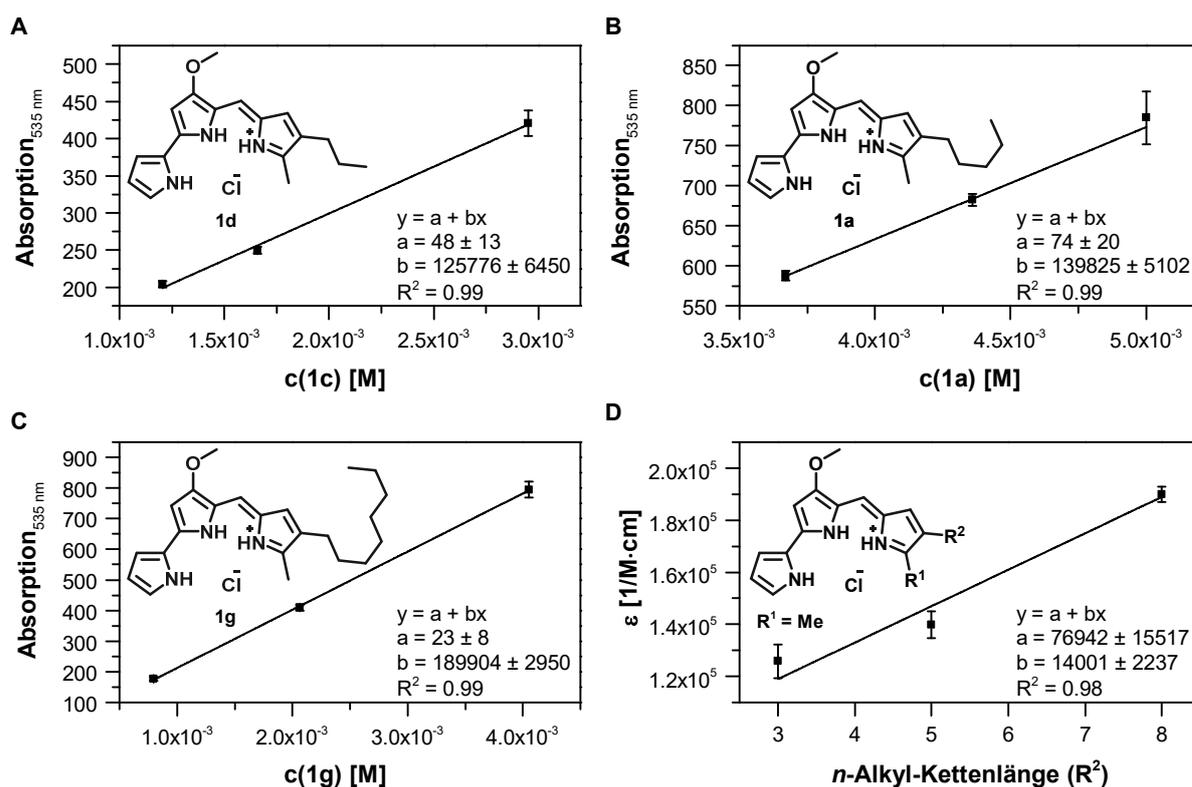
Abbildung 36: Mutasynthese durch Supplementierung der Mutasynthese **77a–d** der fünften Generation mit 2,3-Cycloalkylpyrrolen.

Auch wenn die gebildeten zyklischen Prodiginin Derivate **75a–d** keinesfalls mit den natürlichen zyklischen Prodigininen durch ihre differierende Verknüpfung gleichgesetzt werden können, so bildet die Mutasynthese einen einfachen Zugang zu solchen Systemen. Ähnlich zu den stereoselektiven enzymatischen Zyklisierungen könnten durch Dekorationen an den Alkanringen Stereoinformationen in den Naturstoff eingebracht werden.

3.3.4.5 Quantifizierung der Prodiginine

Die Quantifizierung der Prodiginine dieser Arbeit erfolgte, wie bei Prodigiosin (**1a**) gezeigt, durch Absorptionsspektroskopie nach Bestimmung des molaren Extinktionskoeffizienten [*vide supra* Abbildung 14B, Prodigiosin (**1a**)] oder mittels gravimetrischer Messung nach Säulenchromatographie. Für die Quantifizierung der Prodiginine **1c–h** der Mutasynthese mit den 3-Alkyl-2-methylpyrrolen **13c–h** wurden die Prodiginine **1d** und **1g** über die chemische Kondensation mit Boc-MBC (**46**) hergestellt und deren molarer Extinktionskoeffizient in acidem EtOH bei $\lambda = 535$ nm bestimmt (Abbildung 37A und C). Durch lineare Regression wurden die Extinktionskoeffizienten der verbleibenden Prodiginine mit abweichender *n*-Alkylkettenlängen in 3-Position näherungsweise berechnet (Abbildung 37D).

²⁵ Im Rahmen seiner Masterarbeit hat M.Sc. David Paul Klebl ein Cyclododecanpyrrol hergestellt, welches ebenso von PigC akzeptiert wurde und nahezu die Akzeptanzgrenze darstellt.^[6]



Prodiginin	R ¹	R ²	Molarer Extinktionskoeffizient ϵ_{535} [1/M·cm]
1c	Methyl	Methyl	90 943*
1d	Methyl	<i>n</i> -Propyl	125 776 ± 6 450
1e	Methyl	<i>n</i> -Butyl	132 946*
1a	Methyl	<i>n</i> -Pentyl	139 825 ± 5 102
1f	Methyl	<i>n</i> -Hexyl	160 948*
1g	Methyl	<i>n</i> -Octyl	189 904 ± 2 950
1h	Methyl	<i>n</i> -Decyl	216 952*

Abbildung 37: Bestimmung der molaren Extinktionskoeffizienten bei $\lambda = 535$ nm in acidem EtOH der Prodiginine 1a (B), 1d (A) und 1g (C). D) Lineare Regression zur Bestimmung der Näherungswerte der Extinktionskoeffizienten der verbleibenden Prodiginine mit abweichender *n*-Alkylkettenlängen in 3-Position. [* Approximation]

3.3.4.6 Mutasynthese artverwandter Mutasyntnone im analytischen Maßstab

Abweichend von den zuvor verwendeten Alkylpyrrolen wurde überdies die Akzeptanz der nichtsubstituierten Fünfringheteroaromaten in der Mutasynthese überprüft. Auch wenn Furan (78) und Thiophen (79) deutlich unreaktiver als Pyrrol sind und über einen inversen Dipolmoment verfügen, so gibt es für alle drei Aromaten eine Präferenz für den Angriff der α -Position. Dem allgemeinen Trend folgend, wurde Pyrrol und ebenso das Furan und Thiophen nicht in der Mutasynthese akzeptiert (Abbildung 38). Eine Evaluation von 2,3-dialkylierten Furan und Thiophen Präkursoren wurde nicht durchgeführt und könnte zu einer weiteren Diversifizierung führen.

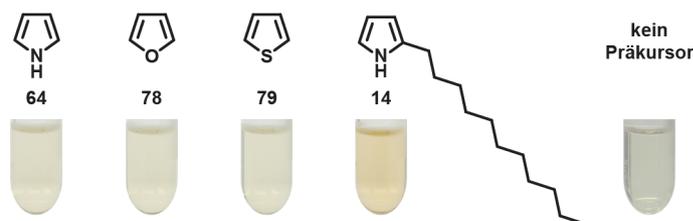


Abbildung 38: Mutasyntese durch Supplementierung der Fünfringheteroaromaten Pyrrol (64), Furan (78), Thiophen(79) und des natürlichen Präkursors 2-UP (14) der Biosynthese zu Undecylprodigiosin (3).

Auch 2-UP (14), welches den Präkursor für Undecylprodigiosin (3) diverser anderen Mikroorganismen bildet, wird ebenfalls nicht von PigC in der Kondensationsreaktion akzeptiert. Da dieser Baustein allerdings als natürliches Biosyntheseintermediat von anderen Kondensationsenzymen wie dem RedH aus *S. coelicolor* A3(2) verwendet wird, zeigte sich hier ein divergentes Substratspektrum bezüglich des Alkylierungsmusters in 2- und 3-Position von Pyrrolen. Diese differierende Substratselektivität kann die Basis für eine nähere strukturelle Untersuchung beider Enzyme bieten und eröffnet gegebenenfalls auch Ansätze für Optimierungen dieser Enzyme für einen fermentativen oder biokatalytischen Ansatz.

3.3.5 Mutasyntese im präparativen Maßstab

Die Mutasyntese im analytischen Maßstab konnte die Umsetzbarkeit dieser Methodik zur Generierung von Prodigiosin (1a) Analoga zeigen. Neben der strukturellen Evaluierung der Präkusoren wurden überdies die Kultivierungsparameter der Cosolvens- und Präkursorkonzentration sowie der optimale Supplementierungszeitpunkt bestimmt. Dennoch kann ein biotechnologischer/bioorganischer Prozess nur an seiner Anwendbarkeit in nicht-analytischer Skalierung bemessen werden. Insbesondere wirft der Übergang zu einem semipräparativen- oder präparativen Maßstab immer die Frage auf, ob die Funktionalität und das Potential der Methode weiterhin gegeben sind und letztendlich das entsprechende Produkt nicht nur im analytischen Maßstab hergestellt werden kann. Insbesondere letzterer Punkt wird in vielen publizierten Mutasyntesen nicht betrachtet und die Produkte lediglich im LC-MS- und HRMS-Maßstab nachgewiesen und nicht quantifiziert. Herausforderungen in den präparativen Biotransformationen können u.a. die Skalierung der Produktionsanlage, die Extraktion und eine Verminderung der Produktionsleistung durch nicht übertragbare Parameter sein. Unter dem Gesichtspunkt der Machbarkeit einer Skalierung wurde daher die Mutasyntese für einige Derivate im (semi)präparativen Maßstab durchgeführt.

3.3.5.1 Evaluation der Mutasyntese im präparativen Maßstab

Die Vorkenntnisse aus der präparativen, heterologen Produktion von Prodigiosin (1a) in *P. putida* pig-r2 (*vide supra* 3.2.3) und die Erkenntnis der Nutzbarkeit des PU-Schaums in der Mutasyntese (Abbildung 25) konnten auch für die Skalierung der Mutasyntese auf einen präparativen Maßstab

angewandt werden. Hierbei zeigte sich, dass der PU-Schaum trotz seines Potentials der Adsorption von unpolaren Aromaten die Zugänglichkeit der Präkursoren für die Zellen nicht zu beeinflussen scheint, die Ausbeute analog zur heterologen Produktion von Prodigiosin (**1a**) nahezu verdoppelt (*vide infra* dieses Kapitel) und überdies weiterhin als Adsorbens für die produzierten Prodiginine dient. Die präparativen Ansätze sind jeweils in 500 mL TB-Flüssigmedium bei 25 °C über 24 h mit 5 g PU-Würfeln, 0.5 mM Präkursor und 2 % (v/v) DMSO durchgeführt worden.²⁶ Die Supplementierung erfolgte, wie in den Komplementationsversuchen bestimmt (3.3.3), direkt zu Beginn des Fermentierungsprozesses. Die Extraktion wurde analog zu der Produktreinigung von Prodigiosin (**1a**, Abbildung 19) durchgeführt.

Vorversuch für den Einsatz von PU-Schaum in der Mutasynthese

In einem Vorversuch wurde zunächst der Einfluss des PU-Schaums auf die Bereitstellung der Präkursoren für die Zellen untersucht, da diese unter Umständen ebenfalls von dem Polymermaterial adsorbiert werden und hierdurch nicht mehr für den *Knockout*-Stamm zur Verfügung stehen. Diese Evaluation erfolgte im semipräparativen Maßstab mit 20 mL Fermentationsmedium in einem 100 mL Kolben unter den oben beschriebenen Bedingungen mit optionaler Zugabe von PU-Würfeln. Nach 24 h Fermentation betrug der Prodigiosin (**1a**) Titer im Kolben ohne PU-Schaum 6.2 mg/L und ist damit äquivalent zu der Quantifizierung des analytischen Ansatzes (*vide supra* Abbildung 29). Der Fermentationsansatz mit 275 mg PU-Würfeln konnte im Vergleich jedoch eine Produktionsleistung von 11.2 mg/L Prodigiosin (**1a**) aufweisen, was einer Steigerung von 81 % entspricht. Damit ist die Eignung und ein positiver Einfluss durch den Einsatz von PU-Schaum auch in der Mutasynthese, ebenso wie in der heterologen Produktion von Prodigiosin (**1a**), gezeigt.

Mutasynthese im präparativen Maßstab

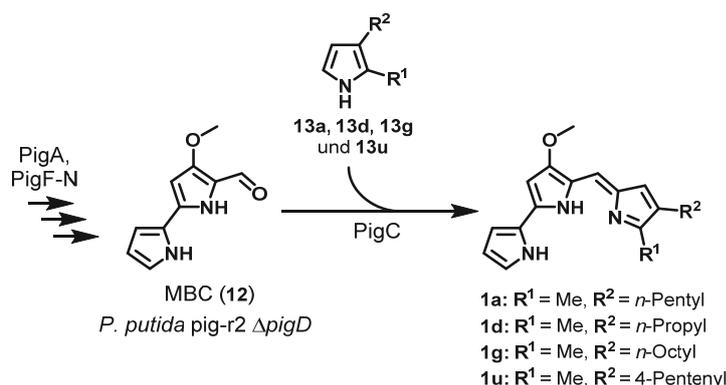
Die Machbarkeit des präparativen Maßstabs wurde nicht für die Grundgesamtheit aller evaluierten Mutasynthone gezeigt. Als Vertreter wurden neben dem natürlichen Baustein MAP (**13a**), welcher den direkten Vergleich mit dem Produktionsstamm *P. putida* pig-r2 gewährleistet, das strukturell verwandte 3-Alkenyl-2-methylpyrrol **13u** und die Mutasynthone **13d** und **13g** getestet.²⁷ Die letzten beiden Mutasynthone repräsentieren hierbei die visuell und quantitativ bestätigten Limitierungen bezüglich der Länge der Alkylkette in 3-Position. Die Ausbeuten der Prodiginine in Tabelle 12 beziehen sich jeweils auf die verwendete Stoffmenge des supplementierten Mutasynthons.

²⁶ Die Erhöhung der Temperatur von 20 °C auf 25 °C im Vergleich zu den optimierten Bedingungen der heterologen Produktion von Prodigiosin (**1a**) in *P. putida* pig-r2 (*vide supra* 3.2.3) beruht auf den Vorversuchen im analytischen Maßstab. Diese konnten lediglich bei ≥ 25 °C durchgeführt werden. Hierdurch verkürzt sich auch die Wachstumsphase bis maximal 16 h nach Fermentationsbeginn um ca. 8 h (Abbildung 26B).

Persönliche Anmerkung d. Autors: *Eine Kultivierung über 24 h würde auch bei 20 °C aufgrund der Stabilität der Pyrrole im wässrigen Milieu unter konstanter Sauerstoffeinbringung kaum vorteilhaft sein.*

²⁷ Die Mutasynthese wurde von M.Sc. David Paul Klebl in seiner Masterarbeit überdies mit den zyklischen Alkylpyrrolen **77b–d** durchgeführt.^[6]

Tabelle 12: Mutasyntese im präparativen Maßstab. Die Mutasyntesen wurden jeweils in 500 mL TB-Flüssigmedium bei 25 °C über 24 h mit 5 g PU-Würfeln, 0,5 mM Präkursor und 2 % (v/v) DMSO durchgeführt.



#	Mutasynton	Prodiginin	R ¹	R ²	Titer [mg/L]	Stoffmenge [μmol]	Ausbeute
1	13a	1a	Methyl	<i>n</i> -Pentyl	17.2	53.2	11 %
2	13d	1d	Methyl	<i>n</i> -Propyl	10.5	35.5	7 %
3	13g	1g	Methyl	<i>n</i> -Octyl	3.8	10.4	2 %
4	13u	1u	Methyl	4-pentenyl	19.8	61.6	12 %

Die Inkorporationseffizienz von MAP (13a) und dem artifiziellen Analogon 13u ist nahezu identisch, wohingegen die beiden Pyrrole 13d und 13g erwartungsgemäß geringere Prodiginintiter aufwiesen. Der Prodiginosin (1a) Titer der Mutasyntese ist im direkten Vergleich zur heterologen Produktion in *P. putida pig-r2* (48 mg/L, 148.4 μmol) dennoch deutlich geringer. Die niedrigeren Ausbeuten können eine Konsequenz der etwas höheren Kultivierungstemperatur und einer kontinuierlichen Degradation des Präkursors im wässrigen, sauerstoffreichen Kulturmedium durch Polymerisation sein. Überdies könnte in der Deletionsmutante *P. putida pig-r2 ΔpigD* die Produktion von MBC (12) reduziert sein, da durch die schlechte Wasserlöslichkeit keine Akkumulation möglich ist und der Verbrauch des Moleküls von der Importrate des Mutasyntons abhängig ist. Die Produktion des Prodiginins 1u mit dem terminalen Alken ermöglichte die spätere konsekutive chemische Umsetzung dieses Bausteins (*vide infra* 3.5.2).

3.3.5.2 Fed-Batch-Prozess

Zusätzlich zu der Optimierung der allgemeinen Kultivierungsbedingungen in der Fermentation ist die Supplementierung der Präkursoren bei der Mutasyntese eine weitere nennenswerte Herausforderung. Oftmals sind die zu fütternden Mutasyntone toxisch für den Produktionsstamm (vgl. Indole 73a–d, *vide supra* 3.3.4.4) und wirken bakteriostatisch oder bakterizid. Diese Eigenschaften können auch dem verwendeten Cosolvens zugeschrieben werden. Oftmals ist dann die einzusetzende Konzentration der Supplementierungszeitpunkt zu berücksichtigen, da Organismen in der stationären Phase manchmal toleranter gegen äußere Einflüsse sind. Ein weiteres Problem kann auch die Degradation des Mutasyntons über die Zeit darstellen. In der Mutasyntese werden daher verschiedene Methoden

eingesetzt, um diese Herausforderungen zu minimieren. Neben der direkten Supplementierung der gesamten Menge eines Präkursors wird die Supplementierung häufig erst in der stationären Phase durchgeführt. Die Fütterung kann aber auch über einen Zeitraum verteilt in mehreren *Chargen* stattfinden oder sie wird durch den Betrieb einer (kontinuierlichen) Zulaufkultur (engl. *fed-batch culture*) ermöglicht.^[154, 161, 166, 168]

Für die Mutasythese der Prodiginine konnte die Toxizität der Präkursoren oder des Cosolvens DMSO bei Verwendung von *P. putida pig-r2 ΔpigD* ausgeschlossen werden. Allerdings ist die Stabilität der Pyrrole in sauerstoffreicher Umgebung nicht gegeben. Daher wurde der Präkursor MAP (**13a**) unter den gängigen semipräparativen Mutasythesebedingungen in einem *Fed-Batch*-Prozess binnen 14 h, beginnend mit der Wachstumsphase nach 4 h, zum Fermentationsmedium gleichmäßig mittels Spritzenpumpe supplementiert. Der Präkursor lagerte über diese Zeit im Dunklen außerhalb des Fermenters, um die Polymerisation durch Licht zu unterbinden. Als direkter Vergleich diente eine Kultur mit direkter Zugabe der äquivalenten Menge des Präkursors. Beide Kulturen enthielten keine PU-Schwämme, um den Faktor der unterschiedlich großen Würfel zu vernachlässigen. Nach 24 h Fermentation zeigte der *Fed-Batch*-Prozess eine Produktionsleistung von 4.9 mg/L Prodigiosin (**1a**), wohingegen die direkte Supplementierung lediglich 2.2 mg/L Prodigiosin (**1a**) produziert hat. Eine kontinuierliche Supplementierung in der Wachstumsphase könnte daher eine höhere Produktion ermöglichen. Im Vergleich zu dem Vorversuch für den Einsatz von PU-Schaum in der Mutasythese (*vide supra* 3.3.5.1) ist der Prodigiosin (**1a**) Titer allerdings insgesamt niedriger ausgefallen; eine detailliertere Evaluation dieser Methodik in Bezug auf die Produktion ist noch ausstehend.

3.3.6 Synopsis des Kapitels

1. Die Mutasythese von Prodigininen wurde durch die partielle Deletion des *pigD* Gens für die MAP (**13a**) Biosynthese ermöglicht und sowohl analytisch als auch präparativ mit Polyurethan als Adsorbens durchgeführt.
2. Insgesamt wurden 31 Pyrrole und Indole in der Mutasythese evaluiert; es wurden 18 verschiedene Prodiginine produziert, von denen zwölf neuartig waren.
3. Die Akzeptanz der Präkursoren in der Mutasythese konnte Hinweise auf das Substratspektrum des Kondensationsenzym PigC geben.
4. Präkursoren mit einer Methylgruppe in 2-Position der Pyrrole erzielten die größte Akzeptanz durch PigC; zudem wurden auch zyklische 2,3-Dialkylpyrrole angenommen.
5. Die Einführung von Alkenfunktionalitäten durch die Mutasythese eröffnete die Möglichkeit einer konsekutiven chemischen Derivatisierung in einer anschließenden Semisythese.

3.4 *In vitro* Biotransformation zur Verifizierung des PigC Substratspektrums

Die bisherige Betrachtung der unterschiedlichen Akzeptanz der Präkursoren in der Mutasyntese wurde ausschließlich über die Substratspezifität des Kondensationsenzym PigC erörtert. Allerdings besteht bei einer exogenen Supplementierung auch die Möglichkeit eines selektiven Imports, welcher passiv oder aktiv geschehen kann. Um diese Hypothese zu falsifizieren, wurde das Substratspektrum von heterolog produziertem PigC *in vitro* evaluiert. In einer zellfreien Biotransformation mit isoliertem Kondensationsenzym ist der Zugang zum Präkursor zweifelsfrei ungehindert. Für die Klärung der Hypothese wurden folgende Ziele definiert:

1. Das Kondensationsenzym PigC sollte durch heterologe Genexpression bereitgestellt werden.
2. Das vorgeschlagene Substratspektrum von PigC sollte durch *in vitro* Biokatalyse evaluiert werden.

3.4.1 Klonierung und Expression von *pigC*

Die Sequenz für das *pigC*-Gen hat eine vollständige Sequenzidentität zu dem natürlichen Gen aus *S. marcescens* (ATCC274) und wurde für die heterologe Expression in *E. coli* nicht bezüglich des Codongebrauchs (engl. *codon usage*) optimiert. Das Gen wurde von dem Vektor pUC19::*pig*, welcher das gesamte *pig Cluster* trägt, amplifiziert und mittels *Gibson Assembly*[®] (6.1.8) in den pET28a(+)-Vektor kloniert (pPIGC_3; Tabelle 21; Vektorkarte im Anhang: Abbildung 78). Hierbei wurde auf einen N- oder C-terminalen 6xHis-Tag verzichtet, da in der Literatur bereits der negative Einfluss eines PigC Fusionsproteins mit einem Polyhistidin-Tag beschrieben wurde.^[127] Nach einer Reinigung dieser Fusionsproteine konnte nahezu keine Restaktivität, jedoch eine Präzipitation des Proteins beobachtet werden. Lediglich PigC aus der Membranfraktion zeigte eine Aktivität.

Das Enzym konnte in *E. coli* BL21(DE3) exprimiert und anschließend direkt im *in vitro* Assay verwendet werden. Dabei sei anzumerken, dass PigC ein membranassoziiertes Protein zu sein scheint. Bereits 1989 konnten *Kobayashi* und *Ichikawa* zeigen, dass ein – damals noch nicht benanntes – 100 kDa Protein aus *S. marcescens* [M(PigC) = 99.3 kDa] eine Kolokalisation mit der inneren Membran aufweist und an der Prodigiosin (**1a**) Produktion beteiligt ist.^[245] *Chawrai et al.* verwendeten in *in vitro* Versuchen ebenfalls die Membranfraktion nach Expression von *pigC* in *E. coli* BL21(DE3). Eine nähere strukturelle Untersuchung des Enzyms mit einem Online-Programm für die Vorhersage einer Transmembran Proteintopologie basierend auf einem *Hidden Markov Model* konnte allerdings keine Transmembrandomänen oder N-terminalen Signalpeptide identifizieren (Abbildung 39A).^{28[246]} Eine weitere Analyse durch das Online-Programm *Amphipaseek* von *Sapay et al.* konnte in der mittleren Domäne des Enzyms allerdings eine amphipathische α -Helix vorhersagen, wie sie in parallel zur Membranebene verlaufenden Membranankern (*IPM anchor*; engl. *in-plane membrane anchor*)

²⁸ Februar 2016: <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>

vorkommt.^{29[247]} Gestützt wird diese Theorie durch ein flankierendes Tryptophan (427), einer Aminosäure, welche an der Lipid-Wasser Grenzfläche von Membranproteinen zu finden ist (Abbildung 39B).^[248, 249]

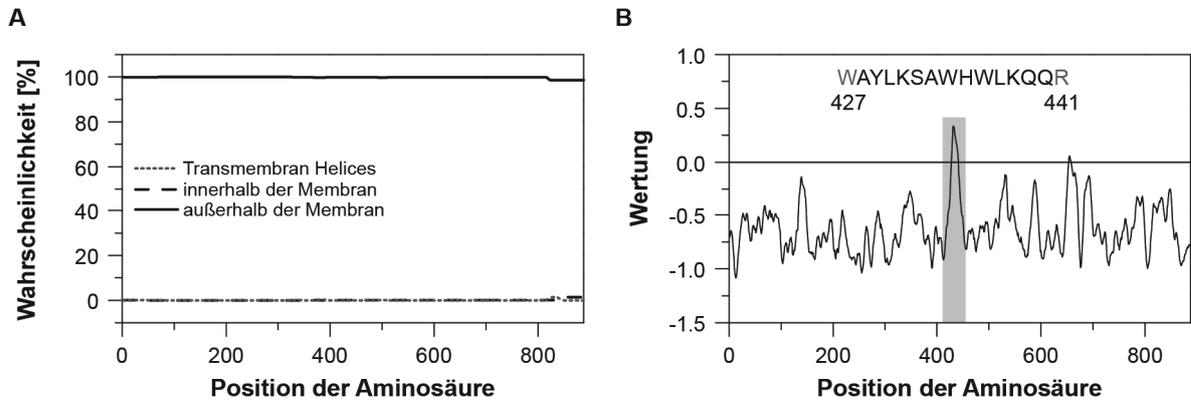


Abbildung 39: *In silico* Vorhersagen für PigC. A) Vorhersage für Transmembrandomänen und N-terminaler Signalpeptide für PigC über das Online-Programm *TMHMM* von *Krogh et al.*^[246] Eine vollständige Wahrscheinlichkeit der gesamten Sequenz für die Lokalisation innerhalb oder außerhalb der Membran, wie hier für PigC vorhergesagt, erlaubt keine Auskunft über die reale Lokalisation. B) Vorhersage für IPM Anker durch *AmphipaSeek* von *Sapay et al.*^[247] Positive Werte prognostizieren eine amphipathische α -Helix von IPM Ankern (Aminosäuren in schwarz).

Eine Bestätigung für die Membranständigkeit konnte nach der Expression von *pigC* in *E. coli* BI21(DE3) durch die Trennung der Membranfraktion von dem Cytoplasma mittels Ultrazentrifugation erhalten werden. Das SDS-Gel in Abbildung 40 zeigt deutlich, dass PigC nach Ultrazentrifugation des zellfreien Lysats (Spalte 2) ausschließlich in der Membranfraktion (Spalte 4) enthalten ist, nicht aber im Überstand des zellfreien Lysats (Spalte 3). Daraus lässt sich folgern, dass PigC selbst in einem heterologen Organismus an oder in der Membran lokalisiert ist und als membranassoziiertes Protein bestätigt werden kann.

²⁹ Februar 2016: https://npsa-prabi.ibcp.fr/NPSA/npsa_amphipaseek.html

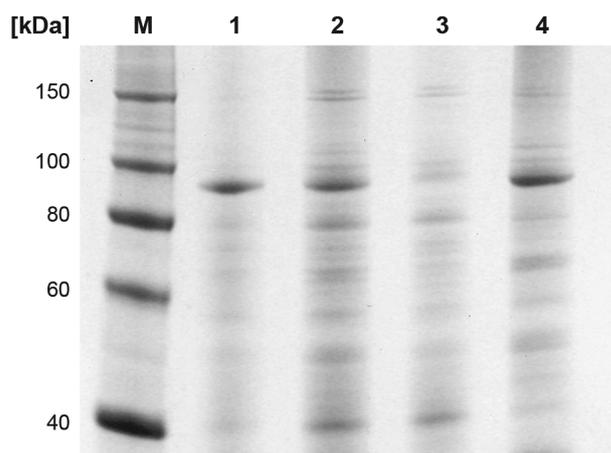


Abbildung 40: SDS-Gel und Lokalisation von PigC. Folgende Kodierung wird verwendet: M – Marker; 1 – ganze Zellen; 2 – zellfreier Überstand nach Zellaufschluss mittels Ultraschall; 3 – Überstand des zellfreien Lysats nach Ultrazentrifugation; 4 – Membranfraktion nach Ultrazentrifugation. [Berechnet $M(\text{PigC}) = 99.3 \text{ kDa}$]

3.4.2 *In vitro* Biotransformation mit PigC

Zur Überprüfung des Substratspektrums von PigC wurden in einer *in vitro* Biotransformation alle in der Mutasynthese verwendeten Präkursoren getestet. Hierfür erfolgte die Umsetzung der Präkursoren mit äquivalenter Menge ungeschützten MBC (**12**) mit zellfreiem Überstand oder Zelllysat durch Zugabe von ATP. Nach erfolgter Umsetzung wurden die Ansätze jeweils mit (acidem) EtOH extrahiert und visuell sowie mittels LC-MS analysiert. Um eine Selbstkondensation der Präkursoren und MBC (**12**) auszuschließen, wurde zum einen exemplarisch MAP (**13a**) mit dem Dipyrrrol **12** ohne Zugabe von PigC unter den Biotransformationsbedingungen umgesetzt. Zum anderen erfolgte als zweite Negativkontrolle eine Umsetzung ohne ATP Zugabe. Beide Versuche zeigten keine Produktbildung, sodass eine Selbstkondensation unter den gewählten Bedingungen auszuschließen sei. Die Extraktion der LC-MS Proben wurde nur mit reinem EtOH durchgeführt, da unter Verwendung von acidem EtOH die säurekatalysierte Kondensation beim Einengen des Lösungsmittels beobachtet wurde.

Die Abbildung 41 zeigt den Vergleich der ethanolischen Extrakte aus der Mutasynthese und der *in vitro* Umsetzung mit PigC. Allein durch die visuelle Analyse konnte eine Übereinstimmung des Farbmusters beider Methoden bestätigt werden. Damit ist gezeigt, dass die Grenzen der Präkursorakzeptanz der Mutasynthese auf dem Substratspektrum des Kondensationsenzym PigC beruhen und keine Limitierung durch den Import darstellen.

Es sei hier allerdings anzumerken, dass durchaus Präkursoren existieren, welche von PigC akzeptiert werden, allerdings aufgrund ihrer Polarität nicht die Membran überwinden können. M.Sc. David Paul Klebl konnte in seiner Masterarbeit zeigen, dass ein MAP (**13a**) Analogon mit terminaler Hydroxygruppe an der Pentylkette der 3-Position hervorragend als Substrat von PigC angenommen wird, dieser Präkursor in der Mutasynthese aber nahezu kein Produkt bildet.^[6]

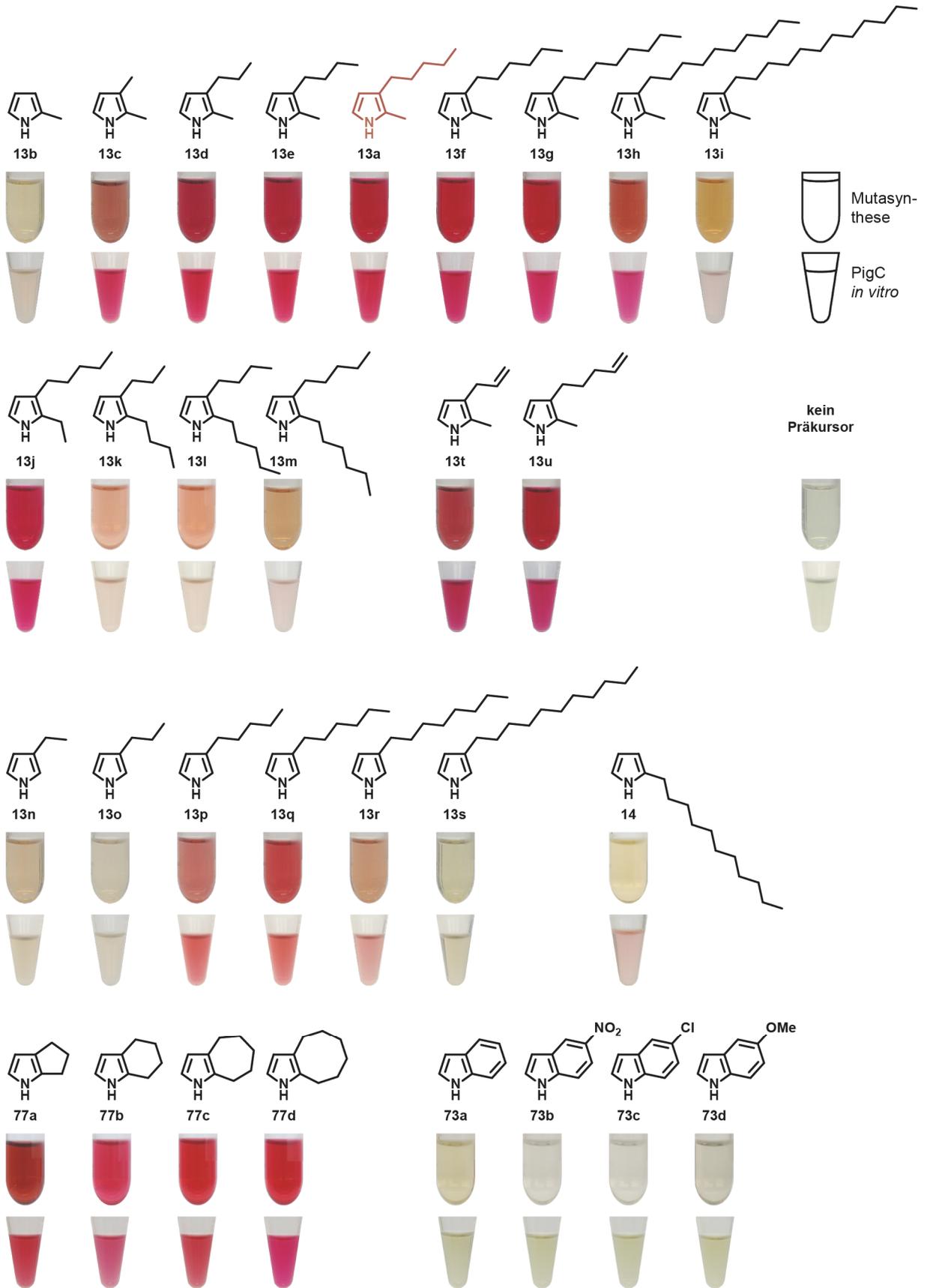


Abbildung 41: Vergleich der Substratspektren der Mutasyntesen und der Biotransformationen mit PigC.

3.4.3 Kinetische Untersuchung von PigC

Neben der reinen visuellen Betrachtung der Substratspezifität von PigC können auch enzymkinetische Untersuchungen einen näheren Aufschluss über die Akzeptanz der Präkursoren geben. Zusätzlich ermöglicht eine Analyse der Kinetiken und die Bestimmung der enzymkinetischen Parameter ein tieferes Verständnis über den katalytischen Mechanismus des Enzyms und der Ableitung möglicher Modelle für diesen Prozess.

Exemplarisch erfolgte daher die Untersuchung der Enzymkinetik von PigC in einer Umsetzung des Intermediats MBC (12) mit dem natürlichen Baustein MAP (13a) und den Monopyrrolen 13d und 13g (Abbildung 42), welche jeweils strukturelle Ähnlichkeiten zu MAP (13a) aufweisen. Die Umsätze dieser Substrate wurden zudem zuvor in der Mutasyntese sowohl analytisch als auch präparativ quantifiziert (*vide supra* Abbildung 29 und 3.3.5), sodass Analogien zwischen den kinetischen Daten von PigC und den Ganzzellumsätzen der Mutasyntese geschlossen werden können. Gemäß eines etablierten Protokolls von *Chawrai et al.* wurde die Aufnahme der Kinetiken mit einer verdünnten PigC Membranfraktion und statischer Konzentration von 100 μM MBC (12) unter Zugabe von ATP zur Initialisierung der Reaktion durchgeführt.^[127] Als Negativkontrolle erfolgte eine Umsetzung ohne ATP Zugabe.

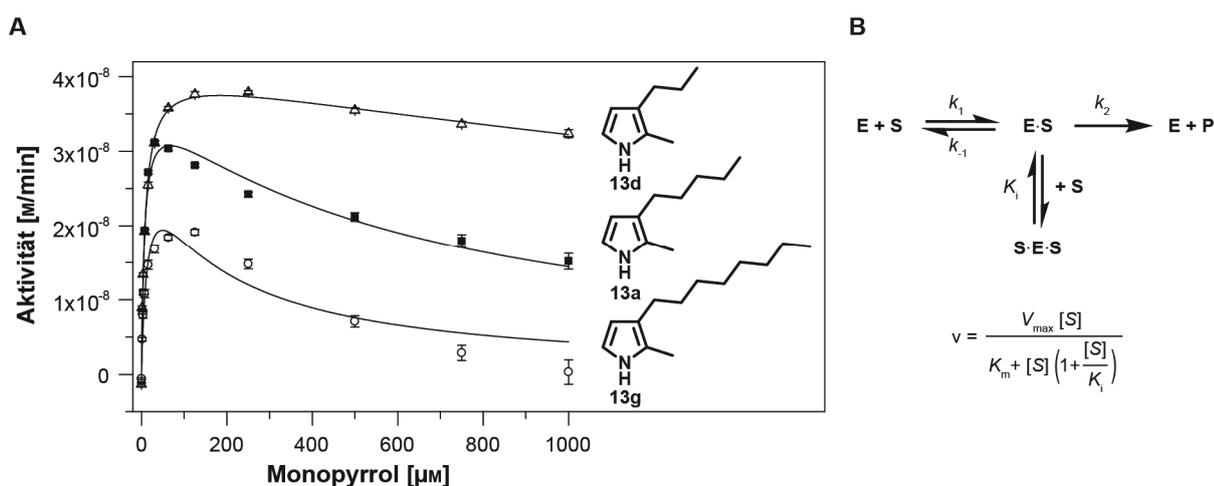


Abbildung 42: Kinetische Untersuchung von PigC. **A)** Michaelis-Menten-Kinetik mit Substratüberschussinhibierung von PigC mit den Monopyrrolen 13d, 13a und 13g als Substrate. MBC (12) wurde in allen Ansätzen mit einer Konzentration von 100 μM eingesetzt. Kinetische Parameter: 13d – $V_{\max} = 41 \pm 1 \text{ nM/min}$, $K_m = 9 \pm 1 \mu\text{M}$, $K_i = 3760 \pm 559 \mu\text{M}$; 13a – $V_{\max} = 37 \pm 2 \text{ nM/min}$, $K_m = 7 \pm 1 \mu\text{M}$, $K_i = 636 \pm 100 \mu\text{M}$; 13g – $V_{\max} = 31 \pm 7 \text{ nM/min}$, $K_m = 15 \pm 7 \mu\text{M}$, $K_i = 161 \pm 71 \mu\text{M}$. **B)** Verwendetes kinetisches Modell und Fitfunktion der Michaelis-Menten-Kinetik mit Substratüberschussinhibierung. [E – Enzym; S – Substrat; P – Produkt; v – Reaktionsgeschwindigkeit; v_{\max} – maximale Reaktionsgeschwindigkeit; K_m – Michaeliskonstante; K_i – Dissoziationskonstante des Substrats als Inhibitor]

In Abbildung 42A bestätigt sich bei der Auftragung der Anfangsgeschwindigkeit der Kondensationsreaktionen gegen die Substratkonzentration die zuvor beobachteten Unterschiede der Akzeptanz der verwendeten Präkursoren bei niedrigen Konzentrationen ($\leq 40 \mu\text{M}$); es zeigte sich, dass der Präkursor **13g** deutlich niedrigere Substratspezifität gegenüber der beiden anderen Präkursoren aufwies. Dennoch folgt der Fit der kinetischen Daten nicht der klassischen *Michaelis-Menten*-Kinetik. Bei höheren Konzentrationen konnte für alle drei Substrate eine Substratüberschussinhibierung verzeichnet werden, welche mit zunehmender Kettenlänge in 3-Position des Monopyrrols ebenfalls zunahm. Eine Substratüberschussinhibierung konnte bereits für MAP (**13a**) als Substrat durch *Chawrai et al.* beobachtet und ähnliche kinetische Parameter abgeleitet werden.^[127] Eine direkte Übertragung dieser Ergebnisse auf die Mutasyntese ist jedoch nicht möglich. Auch wenn eine Inhibition bereits bei sehr niedrigen Substratkonzentrationen nachgewiesen wurde und in der Mutasyntese deutlich höhere Konzentrationen der Präkursoren eingesetzt wurden, so kann die Konzentration innerhalb der Zelle deutlich geringer sein und sollte daher zukünftig evaluiert werden.

Für den Mechanismus einer solchen Substratüberschussinhibierung können – insbesondere bei einem bimolekularen Mechanismus – mehrere Modelle herangezogen werden. Zum einen wäre eine Bindung zweier Monopyrrole im aktiven Zentrum möglich, sodass ein Pyrrol in direkter Konkurrenz zum MBC (**12**) steht und erst durch Dissoziation dieses Moleküls die nachfolgende Kondensationsreaktion fortgeführt werden kann. Ein vereinfachtes Modell dieser Annahme ist in Abbildung 42B ohne die Betrachtung des MBC (**12**) dargestellt und wurde für die nichtlineare Regression in Abbildung 42A verwendet. Im Gegensatz dazu betrachteten *Chawrai et al.* eine spezifische zeitliche Abfolge der Substratbindung und der Phosphorylierung.^[127] Hierbei wäre denkbar, dass zunächst MBC (**12**) an das Enzym bindet, in einer langsamen Reaktion durch ATP phosphoryliert wird und anschließend erst das Monopyrrol bindet. Eine Substratüberschussinhibierung könnte bei dieser Betrachtung entweder durch vorzeitige Bindung des Monopyrrols und einer damit verbundenen Inhibition der Akzeptanz des MBC (**12**) Bausteins (Abbildung 43A) oder durch die Bindung des Monopyrrols ohne der vorzeitigen Phosphorylierung von MBC (**12**) erklärt werden (Abbildung 43B). Im letzteren Fall würde die Phosphorylierungsreaktion durch die Bindung des Monopyrrols inhibiert werden.

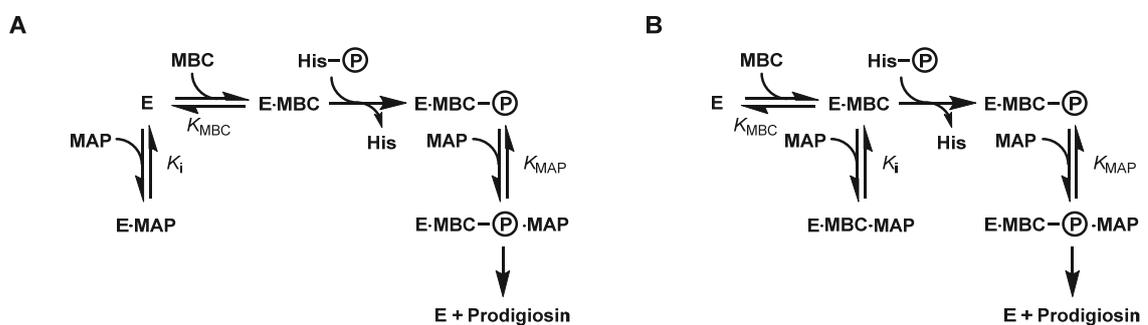


Abbildung 43: Kinetische Modelle der Substratinhibition nach *Chawrai et al.* Die Abbildung wurde modifiziert nach *Chawrai et al.*^[127]

Eine Ausweitung der kinetischen Untersuchungen von PigC auf weitere Substrate dieser Arbeit, aber auch auf andere Analoga von MBC (12), könnten ein tieferes Verständnis für den Katalysemechanismus des Kondensationsenzym und auch Optimierungen für die Mutasyntese ermöglichen. Durch die Verwendung eines *Fed-Batch*-Prozesses, wie er in Kapitel 3.3.5.2 demonstriert wurde, kann die Konzentration der Präkursoren in der Mutasyntese niedrig gehalten werden, sodass dem Effekt der Substratüberschussinhibierung entgegengewirkt werden kann.

3.4.4 Synopsis des Kapitels

1. Durch heterologe Genexpression in *E. coli* Bl21(DE3) konnte das Kondensationsenzym PigC für *in vitro* Biokatalyseexperimente als membranassoziiertes Protein bereitgestellt werden.
2. Die biokatalytischen Umsetzungen mit PigC bestätigten das Substratspektrum der Mutasyntese und konnten daher einen Einfluss durch selektiven Import negieren.
3. Erste enzymkinetische Untersuchungen zeigten eine Substratüberschussinhibierung von PigC, welche von der Struktur der Präkursoren abhängig ist.

3.5 Semisynthese als ergänzender Zugang zu Prodigininen

Neben der Mutasyntese bietet die Semisynthese einen weiteren Zugang zur Darstellung von Naturstoffen oder deren Derivate. Durch die konsekutive Durchführung von Biotechnologie und anschließender organischer Synthese bietet sie insbesondere den Vorteil, auch unnatürliche Transformationen zu erlauben. Nach der Evaluation der Substratspektren der Mutasyntese und der Biotransformation des letzten Kapitels kann insbesondere dieser Aspekt hervorgehoben werden, da oftmals eine geringe Abweichung der Intermediate eine drastische Absenkung der Akzeptanz in den biologischen Systemen hervorruft. Dabei muss die Semisynthese nicht zwangsläufig auf einen fertigen Naturstoff aufbauen, als Quelle für die anschließende chemische Umsetzung können auch akkumulierte Intermediate verwendet werden. Beide Möglichkeiten sollten in der Erstellung neuer Prodiginine betrachtet werden und folgende Ziele wurden hierfür definiert:

1. Die Synthese von artifiziellen Prodigininen sollte durch Verwendung des biologisch produzierten MBC (12) ermöglicht werden.
2. Prodiginine aus der Mutasyntese sollten anschließend chemisch modifiziert werden.

3.5.1 Semisynthese mit biosynthetisch produzierten MBC (12)

Wird die (biomimetische) Synthese von Prodiginine betrachtet, so ist meist die Darstellung des Bipyrrrolintermediates der kostentreibende Faktor. Wie auch zuvor in der Mutasyntese beruht die Produktion von C-Ring Derivaten auf der Bereitstellung des konstanten Bipyrrrols MBC (12), welcher synthetisch effizient nur über die Verwendung des teuren Eduktes 4-Methoxy-3-pyrrolin-2-on (50) und von Palladiumkatalysatoren adressierbar ist (*vide supra* 3.1.1). Ein Semisynthese Ansatz beruht daher auf der Bereitstellung von MBC (12) durch den *Knockout*-Stamm *P. putida* pig-r2 Δ pigD, welcher ausschließlich dieses Intermediat des Prodigiosins (1a) biosynthetisch produzieren kann. Wie bereits in Kapitel 3.3.2 gezeigt, akkumuliert MBC (12) in geringen Konzentrationen im inneren der Zellen und kann daraus extrahiert werden.

Die Biosynthese von MBC (12) fand unter den für die heterologe Prodigiosin (1a) Produktion optimierten Bedingungen in TB-Vollmedium und M63-Minimalmedium statt. Die Zelldichte war erwartungsgemäß in TB-Vollmedium mit 34.2 g/L deutlich höher als im Minimalmedium mit 18.4 g/L. Nach der Sedimentierung der Zellen durch Zentrifugation war der Überstand der Minimalmedium Kultur deutlich rosa gefärbt, obwohl das Medium zu Beginn der Fermentation nahezu farblos war (Abbildung 44A). Ein Absorptionsspektrum bestätigte ebenfalls für das dunklere TB-Flüssigmedium die Produktion eines rötlichen Metaboliten. Auch wenn das Absorptionsspektrum die charakteristische Form eines Prodiginins aufweist, so kann mit einem Absorptionsmaximum von $\lambda_{\max} = 550$ nm eine Produktion von Prodigiosin (1a) ausgeschlossen werden (Abbildung 44B).

Da für die Ausbildung einer roten Farbgebung das Azafulven-ähnliche Motiv (B+C-Ring) zwingend notwendig ist, jedoch MAP (13a) in der Deletionsmutante nicht gebildet wird, scheint während der Fermentation durch PigC eine Kondensation mit zelleigenen Metaboliten katalysiert worden zu sein.

Das gebildete rötliche Produkt war überdies wasserlöslich und konnte nicht, wie alle zuvor dargestellten Prodiginine, mit Dichlormethan extrahiert werden. Da diese Produktion eine Nebenreaktion mit Verminderung der MBC (12) Ausbeute darstellt, ist für eine effektive Produktion des Bipyrrols eine Deletion des Kondensationsenzym PigC ebenfalls notwendig.

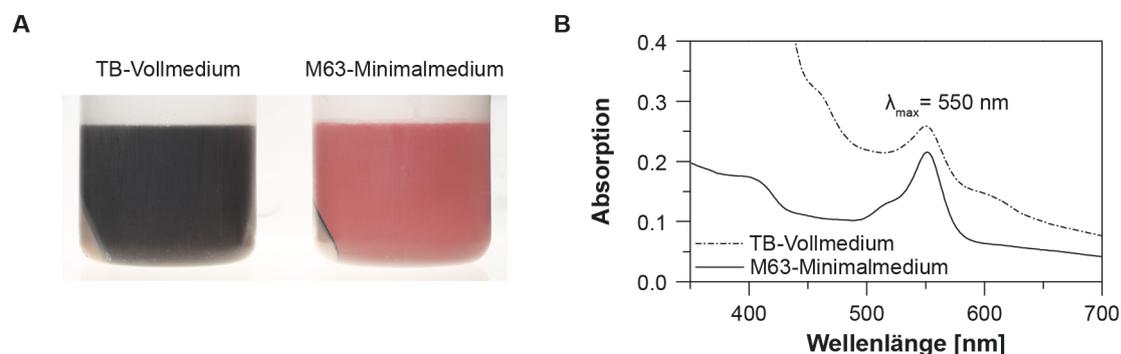


Abbildung 44: A) Überstand nach Sedimentation der Zellen der Fermentation von *P. putida* pig-r2 Δ pigD in TB-Vollmedium und M63-Minimalmedium. B) Absorptionsspektren der Fermentationsmedien.

Die anschließende Semisynthese wurde mit den Zellextrakten unter den Kondensationsbedingungen der chemischen Synthese von Prodigiosin (**1a**) (*vide supra* 3.1.3) mit dem Präkursor MAP (**13a**) durchgeführt.³⁰ Dabei konnte visuell hauptsächlich bei der TB-Vollmedium Kultur eine Prodigiosin (**1a**) Produktformierung beobachtet werden. Eine Quantifizierung ergab einen Prodigiosin (**1a**) Titer für das TB-Vollmedium von 1.3 mg/L (4.0 μ mol) und für das M63 Minimalmedium von 0.2 mg/L (0.6 μ mol), was deutlich unter den Produktionsmengen der Mutasyntese und der heterologen Biosynthese liegt.

Exemplarisch wurde die Semisynthese ebenfalls mit dem Monopyrrol Präkursor **13m** durchgeführt, welcher sowohl in der Mutasyntese als auch in der Biotransformation mit PigC nicht vom Kondensationsenzym akzeptiert worden ist. Analog zu MAP (**13a**) konnte das Pyrrol **13m** in der Semisynthese zum Prodiginin **1m** umgesetzt werden und sowohl visuell als auch über LC-MS nachgewiesen werden (Abbildung 45A und B).

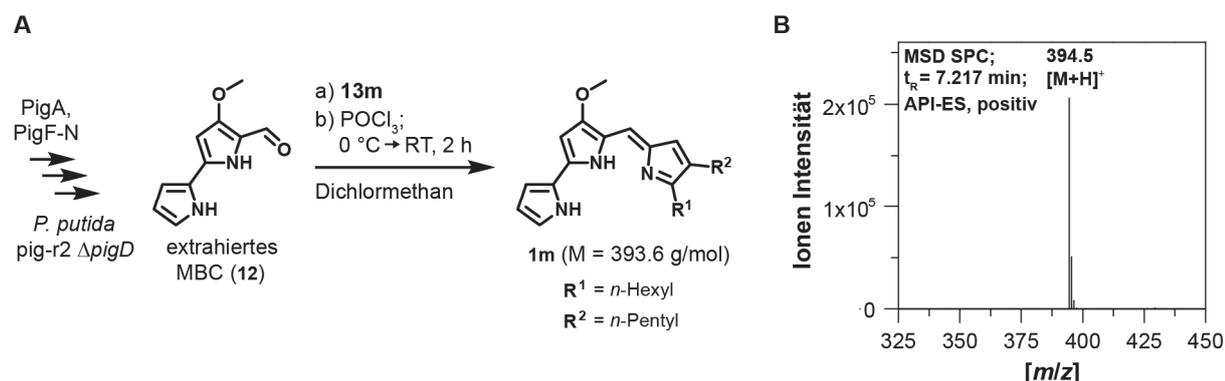


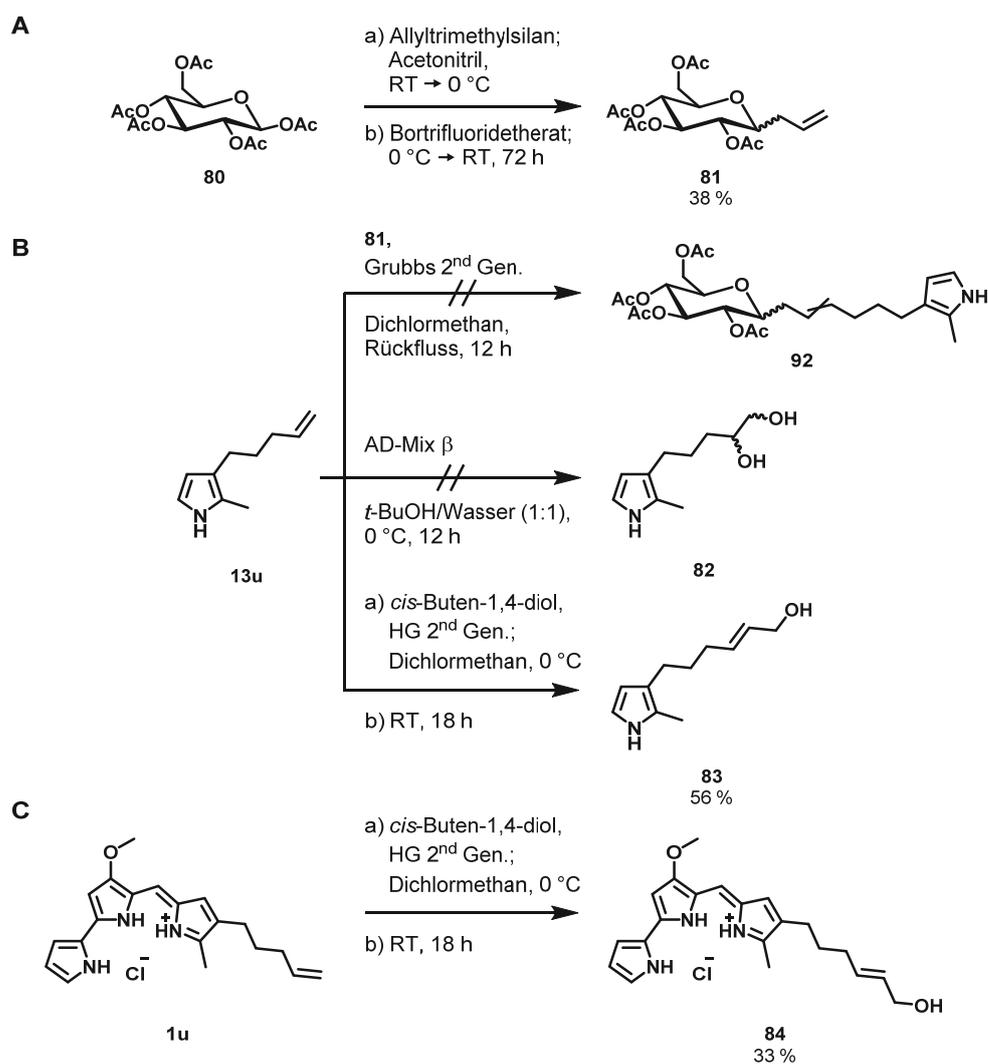
Abbildung 45: A) Semisynthese mit extrahiertem MBC (**12**) aus *P. putida* pig-r2 Δ pigD und dem Präkursor **13m**. B) LC-MS Massenspektrum der Semisynthese mit dem Präkursor **13m**.

³⁰ Für die Semisynthese wurden jeweils 4 g Zellen extrahiert, damit ein Vergleich beider Fermentationen direkt visuell möglich war und nicht durch unterschiedliche Zelldichten verfälscht wurde.

3.5.2 Konsekutive Kreuzmetathese zur Derivatisierung von Alken-Prodigininen

Die zweite Möglichkeit einer Semisynthese, die chemische Transformation eines biosynthetisch hergestellten Prodiginins, wurde anhand einer Kreuzmetathese mit dem Prodiginin **1u** erprobt, welches eine terminale Alkenfunktionalität besitzt.

Die erste Idee einer Funktionalisierung war die Bildung eines C-Glycosids zur Steigerung der Wasserlöslichkeit des Prodiginins. Hierfür wurde β -D-Glucosepentaacetat (**80**) zunächst nach *Giannis* und *Sandhoff* zum C-Allylglycopyranosid (**81**) mit einer moderaten Ausbeute von 38 % umgesetzt (Schema 25A).^[250] Im Anschluss wurde die nachfolgende Kreuzmetathese zunächst mit dem Monopyrrol **13u** als Testreaktion für das spätere Prodiginin evaluiert. Allerdings war diese Reaktion mit dem *Grubbs* Katalysator der zweiten Generation in mehreren Versuchen nicht erfolgreich (Schema 25B). Ebenfalls die Addition des Oxidationsmittels 2,3-Dichlor-5,6-dicyano-1,4-benzochinon (DDQ), welcher die mit der Zeit gebildete Ru-H Spezies oxidiert und im Arbeitskreis *Pietruszka* oftmals verwendet wird, brachte kein Erfolg.^[251] Aus diesem Grund wurde anschließend die Bildung eines vicinalen Diols (**82**) über eine *Sharpless* asymmetrische Dihydroxylierung angestrebt (Schema 25B).^[252] Die Stereoselektivität war für diesen Ansatz nicht bedeutend, sodass die Wahl des AD-Mixes nicht relevant war. Allerdings war diese Reaktion ebenfalls nicht erfolgreich und es konnten nur Polymergemische isoliert werden. Eine Addition von Methansulfonamid, wie sie oftmals als Cosolvens und leicht basischer Katalysator in dieser Reaktion Verwendung findet, konnte desgleichen keine Produktbildung unterstützen.^[253] Letztendlich wurde die Funktionalisierung des Pyrrols **13u** über eine Kreuzmetathese mit *cis*-Buten-1,4-diol in einem vierfachen Überschuss nach *Taber* und *Frankowski* mit einer Ausbeute von 56 % erreicht (**83**, Schema 25B).^[254] Der Vorteil für den Einsatz des symmetrischen Diols in der Kreuzmetathese liegt in der verminderten Möglichkeit der Bildung von Nebenprodukten. In der Reaktion kann als einziges Nebenprodukt die Dimerisierung des Pyrrols stattfinden, da alle anderen möglichen Kreuzmetathesen lediglich die Bildung des Edukts oder von Allylalkohol zur Folge haben, welcher wiederum in der Kreuzmetathese als Edukt eingesetzt werden kann. Unter diesen Bedingungen wurde anschließend die Umsetzung des in der Mutasynthese gewonnenen Prodiginins **1u** mit dem *cis*-Buten-1,4-diol durchgeführt und das hydroxylierte Prodiginin **84** mit einer Ausbeute von 33 % erhalten, welches polarer als das Edukt und kaum noch in Diethylether löslich war (Schema 25C). Dieses Beispiel zeigt nicht nur die Anwendung einer Semisynthese durch konsekutive Funktionalisierung eines Prodiginins sondern überdies noch die Möglichkeit einer Kombination aus Muta- und Semisynthese.



Schema 25: Experimente zur Funktionalisierung des Prodiginins **1u**. **A)** Synthese des C-Allylglycopyranosid (**81**). **B)** Versuche zur Funktionalisierung von Pyrrols **13u**. **C)** Hydroxylierung von Prodiginin **1u** durch Kreuzmetathese. [HG – Hoveyda Grubbs Katalysator]

3.5.3 Synopsis des Kapitels

1. Durch die Extraktion des Biosyntheseintermediats MBC (**12**) und anschließender Semisynthese mit dem Monopyrrol **13m** konnte das Prodiginin **1m** dargestellt werden, welches weder über Mutasyntese noch Biokatalyse adressierbar war.
2. Mittels Kreuzmetathese konnte nach erfolgter Mutasyntese die konsekutive Derivatisierung eines Prodiginins mit Alkenfunktionalisierung ermöglicht werden.

3.6 Bioaktivität von Prodigiosin (1a) und Derivaten

Prodiginine haben zahlreiche biologische Aktivitäten, darunter befinden sich insbesondere antibakterielle und zytotoxische Effekte. Die Ursprünge liegen in der leichten Membrangängigkeit, DNA Einzel- oder Doppelstrangbrüchen, Anionentransporte über Zell- und Organellmembranen und den Einfluss auf die Steuerung der Autophagie, welche letztendlich zur Apoptose von humanen Zellen führen kann (*vide supra* 2.3.2).

Unter dem Gesichtspunkt der gesteigerten Diversität der Prodiginine wurde daher die Evaluation unterschiedlicher Strukturen auf ihre Wirkung angestrebt. Hierbei sollten insbesondere die 2,3-Dialkylpyrrole mit Methylgruppe in der 2-Position berücksichtigt werden, welche durch die Mutasyntese präparativ adressierbar waren und eine möglichst hohe strukturelle Diversität, jedoch auch Gemeinsamkeit zum natürlichen Prodigiosin (1a), aufwiesen. Die Untersuchung der biologischen Aktivität beschränkte sich in dieser Arbeit ausschließlich auf die antibiotischen Effekte gegenüber bakteriellen Modellsystemen und die Modulation der Autophagie einer humanen Brustkrebszelllinie. Folgende Ziele wurden für diesen Abschnitt definiert:

1. Für die antibakterielle Aktivität sollte zunächst ein geeigneter Assay getestet werden, welcher auch im Hochdurchsatz verwendet werden kann.
2. Der antibakterielle Einfluss der Alkylkettenlänge in 2- und 3-Position der Pyrrole des C-Rings sollte gegenüber verschiedenen Modellorganismen getestet werden.
3. Der Einfluss der Alkylkettenlänge in 2- und 3-Position der Pyrrole des C-Rings auf die Modulation der Autophagie von Brustkrebszellen sollte evaluiert und mit dem bekannten synthetischen Derivat Obatoclax (15, GX15-070) verglichen werden.

3.6.1 Antibiotische Eigenschaften von Prodigininen

In der Literatur ist die antibakterielle Wirkung von Prodigininen gegenüber diverse gramnegativen und grampositiven Bakterien bereits berichtet worden (*vide supra* 2.3.2 und 3.2.2). Ebenfalls wurde bereits der toxische Einfluss von Prodigiosin (1a) auf *E. coli* BL21(DE3), nicht jedoch auf den heterologen Produzenten *P. putida* KT2440 gezeigt (*vide supra* Abbildung 17B). Daher wurden neben dem gängigen gramnegativen Modellorganismus *E. coli* auch die grampositiven, nicht-pathogenen Bodenbakterien *Bacillus subtilis* und *Corynebacterium glutamicum* untersucht. Beide Bakterien sind Modellorganismen der weißen Biotechnologie und sowohl das Genom als auch das Metabolom umfassend analysiert worden.^[255-258] *C. glutamicum* wird zudem oft wegen seiner Bereitstellung und Sekretion von Metaboliten für die Co-Kultivierung eingesetzt und dient überdies auch als Modellorganismus für die human-pathogenen *Corynebacterineae* *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium leprae* und *Corynebacterium diphtheriae* verwendet.^[150, 259, 260] Einen weiteren gramnegativen und opportunistisch-humanpathogenen Vertreter für die Evaluation der antimikrobiellen Wirkung stellte *Pseudomonas aeruginosa* dar, welches ebenfalls als Modellorganismus für biofilmbildende Bakterien zählt.^[261]

Im Rahmen der heterologen Produktion von Prodigiosin (**1a**) in *P. putida* pig-r2 wurde von Dr. *Stephan Thies* aus dem Institut für Molekulare Enzymtechnologie (IMET) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf zunächst ein vorläufiger Test der antibiotischen Wirksamkeit von Prodigiosin (**1a**) gegenüber *P. putida*, *E. coli*, *B. subtilis* und *Staphylococcus aureus* in einem Agardiffusionstest durchgeführt (Abbildung 46).

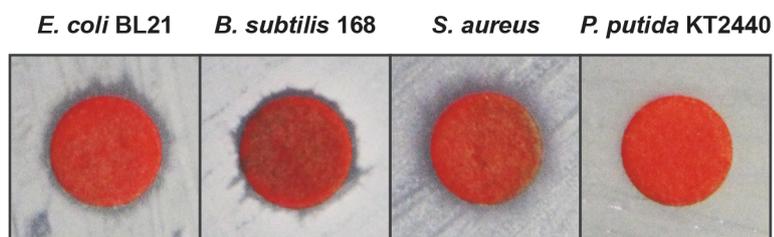


Abbildung 46: Agardiffusionstest von Prodigiosin (**1a**) mit *E. coli*, *B. subtilis*, *S. aureus* und *P. putida*. Plättchen aus *Whatman*TM Filter mit einem Durchmesser von 5 mm wurden mit 5 μ L einer 10 mg/mL ethanolischen Lösung von Prodigiosin (**1a**) (31 mM) versetzt und die Plättchen vor der Anwendung getrocknet. Die Hemmhöfe wurden nach einer Kultivierung über Nacht betrachtet. Der Agardiffusionstest wurde von Dr. *Stephan Thies* durchgeführt.

Zwar waren leichte Hemmhöfe zu erkennen, welche eine Inhibition des Wachstums darstellen, allerdings waren diese nur schwach ausgeprägt und eine quantitative Analyse nicht möglich. Dennoch wird der Agardiffusionstest als Standard in den meisten Veröffentlichungen für die Evaluation der antibakteriellen Wirkung von Prodigininen verwendet.^[80-83] Für diesen Test spricht sicher die einfache Handhabung, dennoch ist er nicht für einen hohen Durchsatz geeignet, untauglich für diffusionsgehinderte Stoffe wie Prodiginine und fehleranfällig, da die Hemmhöfe einzeln physisch vermessen werden müssen.^[262]

Für nachfolgende Tests wurde daher ein Mikrotiterplatten-basierter Assay zur Aufnahme von Dosis-Wirkungs-Kurven entwickelt, welcher das Auslesen der Kenngrößen verschiedener inhibitorischer Konzentrationen IC_{20} , IC_{50} , IC_{80} , IC_{max} (engl. *maximal inhibitory concentration*) und MIC (engl. *minimal inhibitory concentration*) ermöglichte (Abbildung 47).³¹ Der Einfluss auf das Wachstum der Mikroorganismen konnte somit direkt über die optische Dichte verfolgt werden und bot einen schnellen zuverlässigen Auslesemodus. Als Medium diente LB-Flüssigmedium und als Cosolvens das schon zuvor evaluierte DMSO in einer Konzentration von 3 % (v/v).

³¹ Die ausführliche Herleitung der Parameter aus der Dosis-Wirkungs-Kurve kann dem speziellen Experimentalteil entnommen werden (*vide infra* 6.7.10). Der Schnittpunkt der Geraden y_1 mit der unteren Asymptote A_1 wurde gemäß *du Toit* und *Rautenbach* sowie *Rautenbach et al.* als MIC angenommen.^[262, 263]

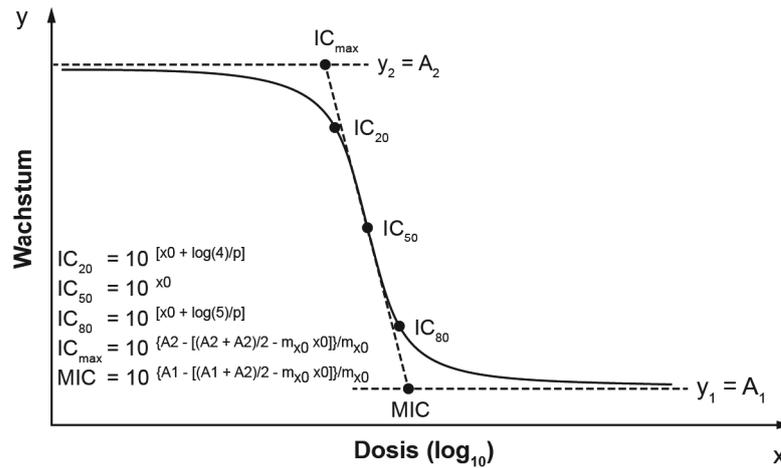


Abbildung 47: Abgeleitete Parameter der Dosis-Wirkungs-Kurve.

Zunächst wurde überprüft, ob die beiden Hauptintermediate – das Monopyrrol und MBC (12) – individuell bereits eine Einschränkung für das Wachstum von Bakterien darstellen. Aus Abbildung 17B war ersichtlich, dass bei *E. coli* BL21(DE3) bereits Prodigiosin (1a) Konzentrationen von 6 bis 7 μM für die vollständige Inhibierung des Wachstums ausreichten, deutlich höhere Konzentrationen bei *P. putida* KT2440 jedoch keinen Einfluss zeigten. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde die Toxizität des Mono- und des Dipyrrols mit Verdünnungsreihen von 300 μM bis 1.8 μM mit *E. coli* BL21(DE3) und *P. putida* KT2440 durchgeführt, wodurch sowohl ein positiver als auch negativer Effekt auf die Toxizität durch die Kondensation beider Intermediate berücksichtigt wurde. Exemplarisch wurde für das Monopyrrol der natürliche Präkursor MAP (13a) verwendet. Aus Abbildung 48A und B war jedoch ersichtlich, dass weder MAP (13a) noch MBC (12) eine Inhibierung des Wachstums für Konzentrationen $\leq 300 \mu\text{M}$ hervorrufen, sodass eine Notwendigkeit der Kondensation zum Naturstoff für die Wirkung gezeigt wurde. Dieses Ergebnis spricht auch evolutiv für die konvergente Biosynthese, da die Intermediate bis zum letzten Schritt der Synthese nicht toxisch für den Produzenten zu sein scheinen und erst durch die finale Kondensation mittels eines membranständigen Enzyms „aktiviert“ werden. Überdies wird durch die Membranständigkeit von PigC und verwandten Enzymen ein möglichst kurzer Exportweg gewählt, sodass die Expositionszeit des Produzenten reduziert wird.

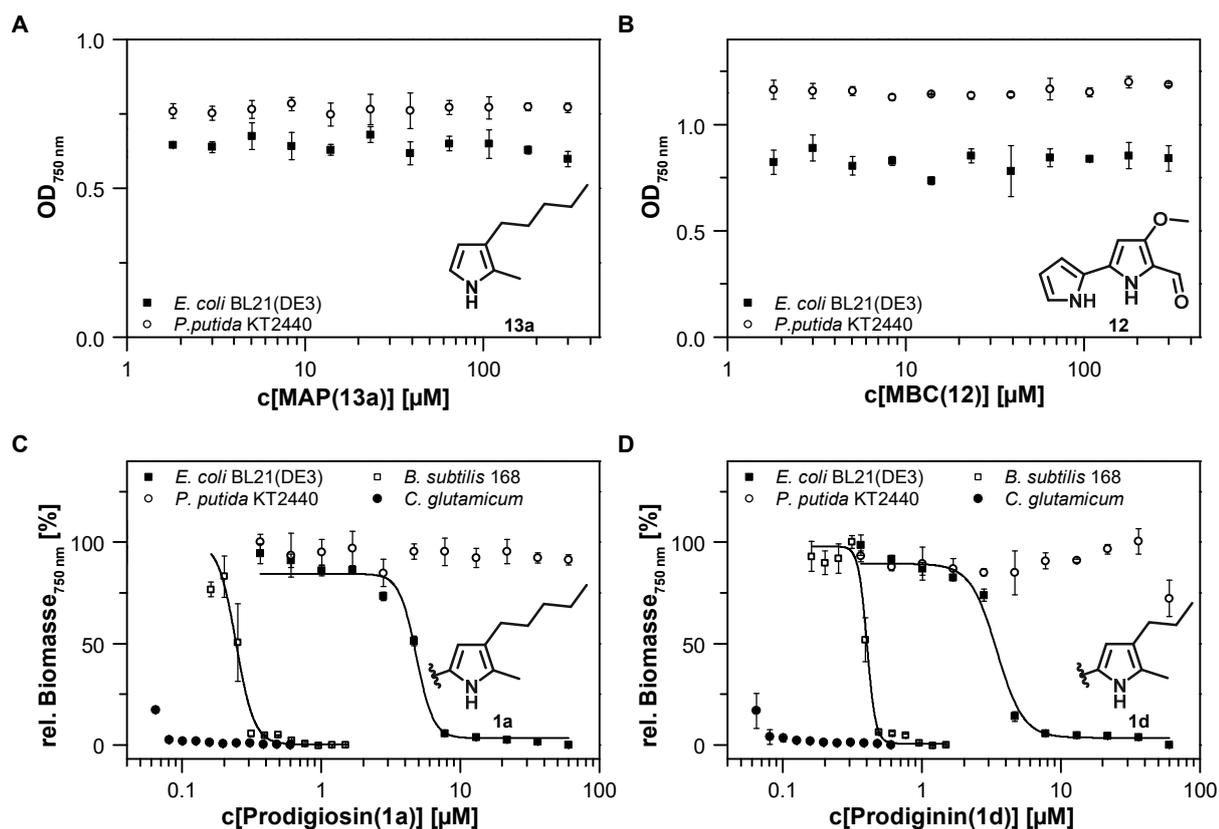


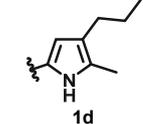
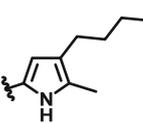
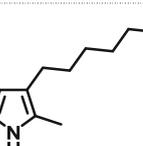
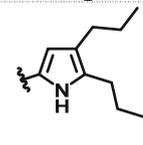
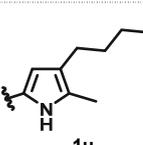
Abbildung 48: Toxizitätsuntersuchungen im Mikrotiterplatten-basiertem Assay mit *E. coli* BL21(DE3), *B. subtilis* 168, *C. glutamicum* und *P. putida* KT2440. **A)** Toxizitätstest mit MAP (13a). **B)** Toxizitätstest mit MBC (12). **C)** Toxizitätstest mit Prodigiosin (1a). **D)** Toxizitätstest mit Prodiginin 1d. Die nichtlineare Regression erfolgte über Dosis-Wirkungs-Kurven.

Anschließend erfolgte die Evaluation der biologischen Wirkung von Prodigiosin (1a) und die durch präparativen Mutasynthese gewonnenen Prodiginine 1d, 1g und 1u auf die oben genannten Modellorganismen. Durch die Wahl dieser Prodiginine konnte der Einfluss der Kettenlänge in 3-Position und des terminalen Alkens untersucht werden. Bei den gewählten Testbedingungen erwies sich *P. aeruginosa* PAO1 als ungeeigneter Stamm, da dieser bereits ohne Zugabe eines Prodiginins bei 3% (v/v) DMSO einen wachstumsdefizienten Phänotypen aufwies; *P. aeruginosa* PAO1 wurde daher nicht für die Auswertungen berücksichtigt. In Abbildung 48C und D sind jeweils beispielhaft die Dosis-Wirkungs-Kurven für Prodigiosin (1a) und dem Prodiginin 1d mit der höchsten biologischen Aktivität dieses Assays dargestellt und in Tabelle 13 jeweils die IC_{50} - und MIC-Werte abgetragen. Eine ausführliche Darstellung aller Dosis-Wirkungs-Kurven und die Auflistung aller abgeleiteten Parameter können Abbildung 67 bis Abbildung 71 sowie Tabelle 36 und Tabelle 37 entnommen werden (jeweils im Anhang³²). Die Ergebnisse des Assays zeigten, dass insbesondere die grampositiven Bakterien *Bacillus subtilis* und *Corynebacterium glutamicum* in sehr geringen Konzentrationen jedes Prodiginins im Wachstum gehemmt werden, wohingegen bei den gramnegativen Mikroorganismen *E. coli* und *P. putida* deutlich höhere Konzentrationen toleriert wurden. Die Ergebnisse einer Präferenz für

³² Die Tabelle 37 enthält hierbei die Werte in der, für die im Fachbereich der Biologie üblich verwendeten, Einheit „ $\mu\text{g}/\text{mL}$ “.

grampositive Bakterien sind kongruent zu Beobachtungen, welche zuvor in der Literatur beschrieben worden sind.^[42, 81, 264] Bei *P. putida* zeigte sich, wie schon zuvor bei Prodigiosin (**1a**) beobachtet wurde (*vide supra* Abbildung 17B), keine Inhibition des Wachstums bezogen auf dem gemessenen Konzentrationsbereich $\leq 60 \mu\text{M}$. Bei *Corynebacterium glutamicum* zeigte sich für alle Prodiginine, dass kein Wachstum bei Konzentrationen $\geq 100 \text{ nM}$ zu beobachten waren und somit ebenfalls keine Toxizitätsparameter bestimmt werden konnten.

Tabelle 13: Abgeleitete Parameter aus den Dosis-Wirkungs-Kurven der Toxizitätsuntersuchungen. Bei *P. putida* bezieht sich die Inhibition des Wachstums lediglich auf den gemessenen Konzentrationsbereich $\leq 60 \mu\text{M}$. [n. b. – nicht bestimmt]

Prodiginin	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	<i>B. subtilis</i> 168	<i>C. glutamicum</i>	<i>P. putida</i> KT2440
	MIC/IC ₅₀ [μM]			
 1d	3.45 ± 0.38 / 2.22 ± 0.40	0.40 ± 0.03 / 0.34 ± 0.04	n. b. > 0.1 kein Wachstum	n. b. keine Inhibition des Wachstums
 1a	4.82 ± 0.36 / 3.64 ± 0.45	0.24 ± 0.01 / 0.18 ± 0.01	n. b. > 0.1 kein Wachstum	n. b. keine Inhibition des Wachstums
 1g	22.57 ± 0.39 / 16.23 ± 0.77	0.36 ± 0.04 / 0.22 ± 0.05	n. b. > 0.1 kein Wachstum	n. b. keine Inhibition des Wachstums
 1k	7.35 ± 0.67 / 4.67 ± 0.71	0.24 ± 0.01 / 0.20 ± 0.02	n. b. > 0.1 kein Wachstum	n. b. keine Inhibition des Wachstums
 1u	4.78 ± 0.58 / 2.67 ± 0.52	0.50 ± 0.05 / 0.46 ± 0.07	n. b. > 0.1 kein Wachstum.	n. b. keine Inhibition des Wachstums

In Bezug auf die Kettenlänge zeigte sich besonders für *E. coli*, dass eine Verkürzung der Kettenlänge gegenüber Prodigiosin (**1a**) eine höhere Toxizität beeinflusst, wohingegen das Prodiginin **1g** eine fast 5-fach verringerte biologische Wirkung zeigte. Ein Bezug zwischen Kettenlängen bzw. der Lipophilie anderer Prodiginin-derivate und der abnehmenden Wirkung gegenüber drei grampositiven Bakterien – einem multiresistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) Stamm, einem Vancomycin-resistenten *Enterokokken* (VRE) und einem Penicillin-resistenten *Streptococcus pneumoniae* (PRSP) Stamm – wurde bereits von Marchal *et al.* 2013 beobachtet und diskutiert.^[264] Bei *Bacillus subtilis* war dieser Effekt hingegen nicht zu erkennen. Die terminale Alkengruppe von Prodiginin **1u** hat keinen Einfluss

auf die biologische Aktivität. Da das Prodiginin **1g** die Verbindung mit der höchsten Wirkung zu sein schien, wurde über chemische Synthese das Prodiginin **1k** hergestellt, um den Einfluss der Verlängerung der Alkylkette in 2-Position zu untersuchen. Für *E. coli* zeigte sich eine Reduktion der Inhibierung des Wachstums, wohingegen für *Bacillus subtilis* die Toxizität im Vergleich zu Prodigiosin (**1a**) gleich blieb. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die getesteten Prodiginine eine stark wachstumsinhibierende Wirkung auf grampositive Bakterien haben, wogegen gramnegative Bakterien 10-fach höhere Konzentrationen tolerieren oder gar nicht beeinflusst werden.

3.6.2 Einfluss auf die Autophagie in MCF-7 Brustkrebszellen

Die physiologischen Tests und Analysen mit Prodigininen an Brustkrebszellen wurden am *Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie* in Dortmund in der Abteilung für *Chemische Biologie* und am *Compound Management and Screening Center (COMAS)* von Dr. Luca Laraia und Dr. Sonja Sievers durchgeführt.³³ Als Modellzelllinie für die Brustkrebszellen wurde die Zelllinie MCF-7 verwendet, welche die meist angewandte Brustkrebszelllinie darstellt und bereits 1973 von der *Michigan Cancer Foundation* eingeführt wurde.^[265, 266]

Neben der oben dargelegten antibakteriellen Wirkung ist bei den Prodigininen ebenfalls die Beeinflussung der Autophagie bekannt (*vide supra* 2.3.2). Als Beispiel ist in der Literatur neben dem natürlichen Prodigiosin (**1a**) das artifizielle Prodiginin Obatoclox als Mesylat (**15**, GX15-070) genannt, welches als Autophagie Inhibitor in mehreren Studien der klinischen Phase II untersucht worden ist.^[104-108] Um den Einfluss der Alkylkettenlänge in 3-Position des C-Rings und des eingeführten Alkens in Bezug auf die die Änderung der Autophagie zu untersuchen, wurden neben Prodigiosin (**1a**) die Prodiginine aus den präparativen Mutasyntesen **1d**, **1g** und **1u** und das synthetische Prodiginin **1q** in den physiologischen Tests analysiert. Dabei wurde die Einwirkung auf die Modulation der LC3 *puncta* evaluiert, welche als Marker für die Autophagosomen(bildung) dienen (*vide supra* 2.3.2, Abbildung 2). Das lösliche, im Cytosol menschlicher Zellen ubiquitär vorhandene Protein LC3-I (1A/1B-*light chain* 3) wird bei der Bildung der Autophagosomen an Phosphatidylethanolamin der Membran konjugiert (LC3-II) und nach der Fusion der Autophagosomen mit den sauren Lysosomen in den Autolysosomen abgebaut. Daher zeigt eine Akkumulation der LC3-II Proteine eine Bildung der Autophagosomen, aber auch eine Inhibition der Autophagie an und kann darüber quantifiziert werden.^[267-269]

Für die Untersuchungen wurden transfizierte eGFP-LC3-MCF-7 Brustkrebszellen verwendet, die das LC3-Protein als Fusionsprotein mit einem eGFP Marker produzierten und somit die Autophagieereignisse mittels Fluoreszenzmikroskopie verfolgt werden konnten. Nach 3 h Inkubation mit allen vier Prodigininen zeigten diese Zellen jeweils eine Akkumulation von den eGFP-LC3 *puncta*, sodass auf eine Akkumulation von Autophagosomen geschlossen werden konnte; die Kontrolle mit DMSO dagegen zeigte lediglich eine homogene Verteilung von eGFP in den Zellen, wie es für unbehandelte Zellen zu erwarten war (exemplarisch für Prodiginin **1d** Abbildung 49A und B).

³³ Detaillierte Angaben zu den Methoden sind der Literatur von *Klein et al.* zu entnehmen.^[4]

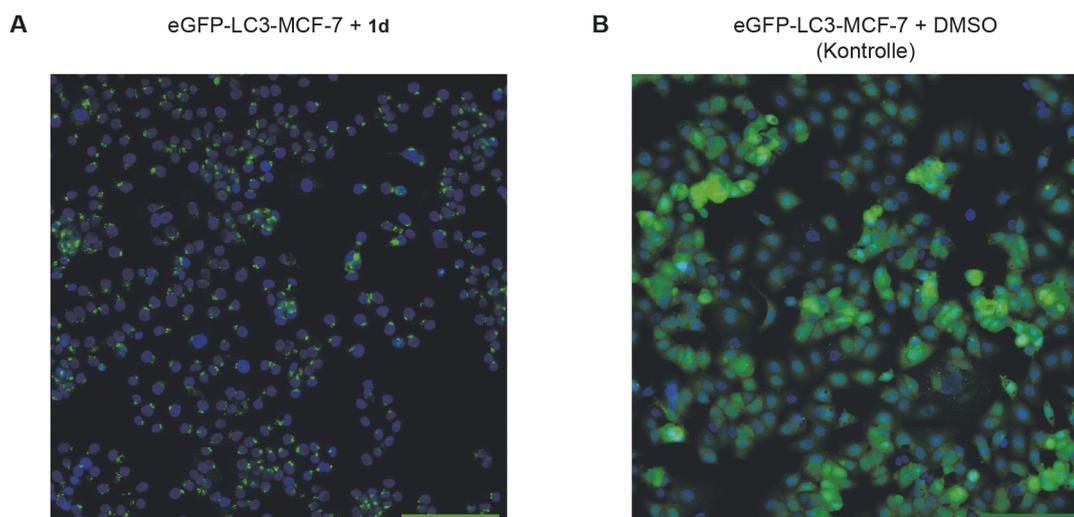


Abbildung 49: Einfluss von Prodiginin **1d** auf die Inhibition der Autophagie und der damit verbundenen Akkumulation von Autophagosomen in MCF-7 Zellen. **A)** MCF-7 Zellen nach 3 h Inkubation mit Prodiginin **1d**. **B)** MCF-7 Zellen nach 3 h Inkubation mit DMSO als Kontrolle. Folgende Fluoreszenzfärbung wurde verwendet: grün – eGFP-LC3 *puncta*; blau – Zellkern mit Hoechst gefärbt. [Der Maßstabsbalken entspricht 150 μm .]

Bei diesen Tests zeigte sich analog zu den bakteriellen Inhibierungsassays, dass das Prodiginin **1d** mit einem EC_{50} Wert von 150 nM das höchste Akkumulationspotential der Autophagosomen aller getesteten Prodiginine aufwies und sogar 2-fach effektiver war als Prodigiosin (**1a**) und Obatoclox (**15**)-Mesylat (Tabelle 14). Ebenfalls hatte die terminale Doppelbindung von Prodiginin **1u** kaum einen Einfluss, jedoch zeigten die Verlängerungen in der 2-Position und in der 3-Position von den Prodigininen **1g** und **1k** wie schon bei den antibakteriellen Tests einen negativen Effekt auf die Wirksamkeit als Autophagie-Inhibitor.

Tabelle 14: EC_{50} Werte für das Akkumulationspotential der Autophagosomen in MCF-7 Zellen nach 3 h Inkubation mit den Prodigininen **1a**, **1d**, **1g**, **1u** und **1q**. Als Vergleich wurde Obatoclox (**15**)-Mesylat getestet.

#	Prodiginin	EC_{50} [nM]
1	1a	293.4 \pm 141.9
2	1d	150.3 \pm 13.5
3	1g	1039.3 \pm 774.2
4	1k	666.1 \pm 311.8
5	1u	347.0 \pm 106.5
6	Obatoclox (15)-Mesylat	349.8 \pm 200.4

Für die nachfolgenden Untersuchungen wurde ausschließlich das Prodiginin **1d** als stärkster Inhibitor für die Autophagie betrachtet. Zunächst wurde die visuell bestätigte Inhibierung der Autophagie mittels Western Blot auf Proteinebene verifiziert. Hierfür wurden die Membran konjugierten, lipidierten LC3-II Proteine über Antikörper von normal genährten- und hungernden Zellen nachgewiesen. Als Kontrolle

für die Autophagieinhibition wurde sowohl der bekannte Fusionsinhibitor für Autophagosomen und Lysosomen Chloroquin³⁴ (**85**, CQ, Abbildung 50A) verwendet, als auch die Inhibierung der autophagischen Proteolyse des Proteins p62 verfolgt.^[270-272] Der Rezeptor p62 kann an ubiquitinierte Proteine und an LC3 binden und unterstützt dadurch den Abbau durch Autophagosomen bzw. Autolysosomen und wird ebenfalls degradiert. Als Expressionskontrolle wurde das Strukturprotein des Zytoskeletts Aktin verwendet.

Wie aus den Fluoreszenzbildern erwartet, zeigte das Prodiginin **1d** auch in den Western Blot Ergebnissen eine Akkumulation des LC3-II Proteins in Relation zur Expressionskontrolle Aktin sowohl in normal genährten- und hungernden Zellen (Abbildung 50B). Die Inhibierung der Fusion aus Autophagosomen und Lysosomen ist dabei sogar deutlich stärker als bei Chloroquin (**85**). Ebenfalls wird die Inhibition durch die autophagische Degradation des Proteins p62 bestätigt.

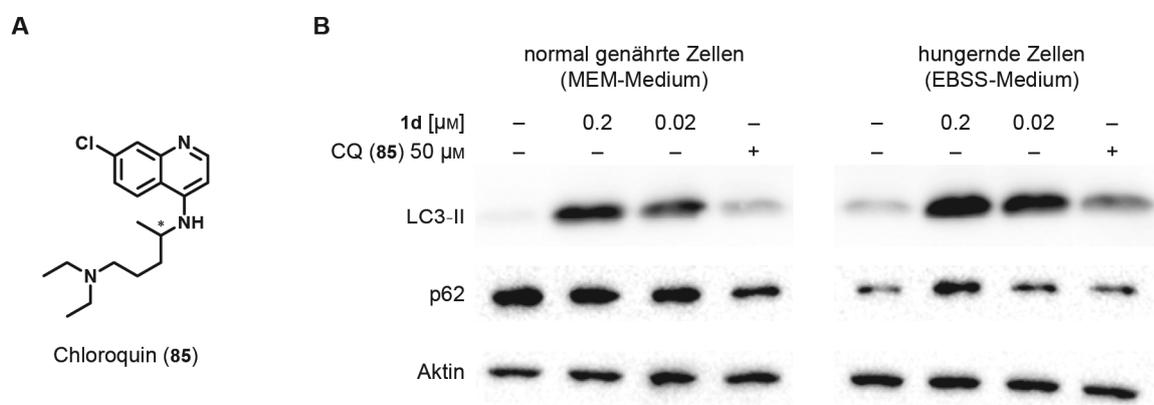


Abbildung 50: Proteinexpressionsanalyse durch Western Blot nach Inhibierung der Autophagie durch Prodiginin **1d** in normal genährten MCF-7 Zellen und hungernden MCF-7 Zellen. **A)** Struktur vom Fusionsinhibitor der Autophagosomen und Lysosomen Chloroquin (**85**). **B)** Western Blot Nachweis der Proteine LC3-II, p62 und der Expressionskontrolle Aktin nach Behandlung der MCF-7 Zellen mit Prodiginin **1d** oder Chloroquin (**85**).

Überdies induzierte das Prodiginin **1d**, wie schon in den bakteriellen Studien, eine Inhibierung des Wachstums bei den humanen MCF-7 Zellen (Abbildung 51A). Dabei war diese Wachstumsinhibierung ebenfalls konzentrationsabhängig und resultierte abschließend im Zelltod – die Apoptose (Abbildung 51B). Beide Parameter wurden durch Lebendzell-Mikroskopie untersucht; die Inhibierung des Wachstums kann dabei durch die Konfluenz, welche die adhärenzte Zell-Bedeckung des Bodens des Kulturgefäßes in Prozent darstellt, gemessen und die Apoptose durch die Anzahl der toten Zellen pro Quadratmillimeter bestimmt werden. Für die Detektion der Apoptose wurden die Zellen zusätzlich mit einem Caspase 3/7 Reagenz inkubiert, wodurch die Apoptose durch die Aktivierung der Caspase-3 sichtbar gemacht werden konnte. Die Ergebnisse aus Abbildung 51 sind zwar erwartungsgemäß,

³⁴ Es sei anzumerken, dass Chloroquin (**85**) ebenfalls als Standard bei den Tests der Antimalariaaktivität von Prodigininen verwendet wird und zur Vorbeugung gegen Malaria verschrieben wird. Einen Zusammenhang der Wirkmechanismen beider Substanzen muss aber nicht gegeben sein.

allerdings zeigte sich für Obatoclox (15)-Mesylat eine höhere Induktion der Apoptose bei gleicher Konzentration (0.11 μM) im Vergleich zum Prodiginin 1d, obwohl dieses die Autophagie deutlich stärker inhibiert. Vermutlich ist dies mit dem Wirkungsmechanismus von Obatoclox (15) zu erklären. Dieses künstliche Prodiginin wurde als Inhibitor von BCL-2 (engl. *B-cell lymphoma 2*), einem Protein aus der gleichnamigen Proteinfamilie mit antiapoptotischer Wirkung, entwickelt und fördert somit die pro-apoptotische Wirkung.^[104, 273, 274] Daher kann der apoptotische Effekt bei Obatoclox (15) stärker ausgeprägt sein, da die Apoptose durch mehrere Mechanismen induziert werden kann.

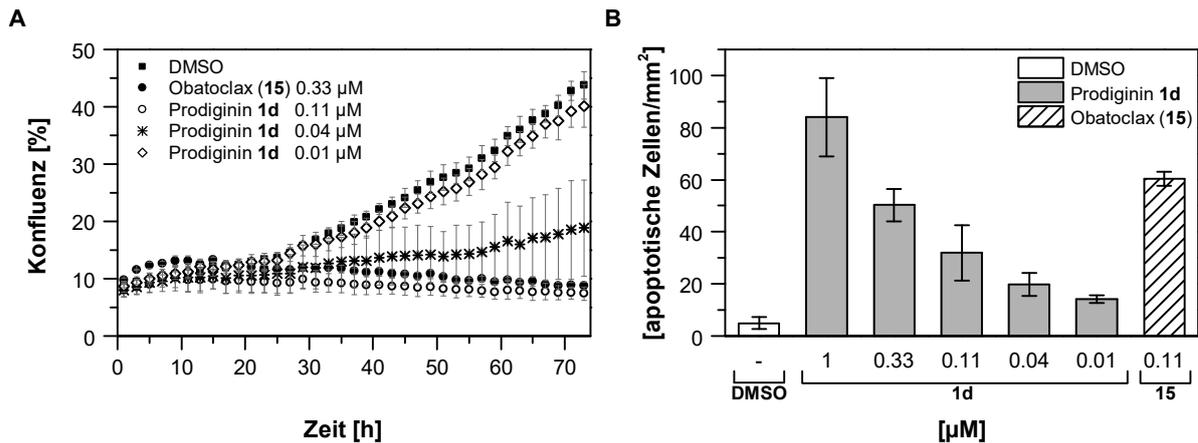


Abbildung 51: Einfluss von Prodiginin 1d und Obatoclox (15)-Mesylat auf die Konfluenz der MCF-7 Zellen und ihre pro-apoptotische Wirkung.

3.6.3 Synopsis des Kapitels

1. Für fünf Prodiginine wurde die Bioaktivität gegenüber gramnegativen- und grampositiven Bakterien und humanen Brustkrebszellen getestet.
2. Die biologische Aktivität ist von der Kettenlänge in 3-Position des Monopyrrols abhängig und steigt mit Abnahme der Alkylkettenlänge.
3. Alle getesteten Prodiginine zeigten in einem neu etablierten Mikrotiterplattenassay eine Wachstumsinhibition gegenüber grampositive Bakterien für Konzentrationen im nanomolaren Bereich; gramnegative Bakterien tolerierten mindestens 10-fach höhere Konzentrationen als die grampositiven Bakterien.
4. *P. putida* KT2440 wurde bei Konzentrationen $\leq 60 \mu\text{M}$ im Wachstum nicht beeinflusst.
5. Gegenüber MCF-7 Brustkrebszellen erwies sich das Prodiginin 1d als wirksamer Inhibitor der Autophagie ($\text{EC}_{50} = 150 \text{ nM}$) und des Zellwachstums und induzierte die Apoptose (50 % apoptotische Zellen bei 0.33 μM).
6. Das Prodiginin 1d ist als Autophagieinhibitor wirksamer als das synthetische Prodiginin Obatoclox (15) und der klinisch verwendete Inhibitor Chloroquin (85).

3.7 Versuche zur Zyklisierung von Undecylprodigiosin (3) durch RedG

Viele der natürlich vorkommenden Prodiginine sind zyklische Varianten von Prodigiosin (1a) oder Undecylprodigiosin (3) wie Butyl-*meta*-cycloheptylprodigiosin (4, Streptorubin B) *Metacycloprodigiosin* (5, Streptorubin A) und Cycloprodigiosin (7). Überdies gibt es mit Prodigiosin R1 (6) und Roseophilin/Dechlororoseophilin (10) noch komplexere zyklische Prodiginine mit verzweigten Alkylketten und Heterozyklen. Allen Biosynthesen dieser Naturstoffe ist eine oxidative Zyklisierung durch eine *Rieske*-Nicht-Häm-Eisen-Oxygenasen der entsprechenden Gencluster gemein.^[39, 41, 57, 60, 65, 134, 135, 275, 276] Ebendiese oxidative Zyklisierung steht im Fokus dieses Kapitels, da sie in viele Biosynthesen den Schlüsselschritt zu verschiedenen bioaktiven Naturstoffen wie Penicillin, Vancomycin und Fosfomycin darstellt.^[277-280] Dabei wird über Eisen-Kofaktoren und der Verwendung von molekularem Sauerstoff als Cosubstrat eine direkte regio- und stereoselektive CH-Aktivierung erreicht, welche über radikalische Mechanismen oder Metallverbindungen ermöglicht wird. Insbesondere aus der Sicht des organischen Chemikers stellen diese Enzyme ein reizvolles Werkzeug dar, da vergleichbare, nicht-enzymatische CH-Aktivierungen in der klassischen Chemie mit ähnlich präzisen Eigenschaften weitgehend fehlen.^[57, 276] Aus diesem Grund stellt schon allein die chemische Synthese der C-Ring Einheiten der entsprechenden zyklischen Prodiginine oftmals ein Hindernis dar, welches nur über aufwändige – aber dennoch elegante – Synthesen erreicht werden kann.^[39, 281-283]

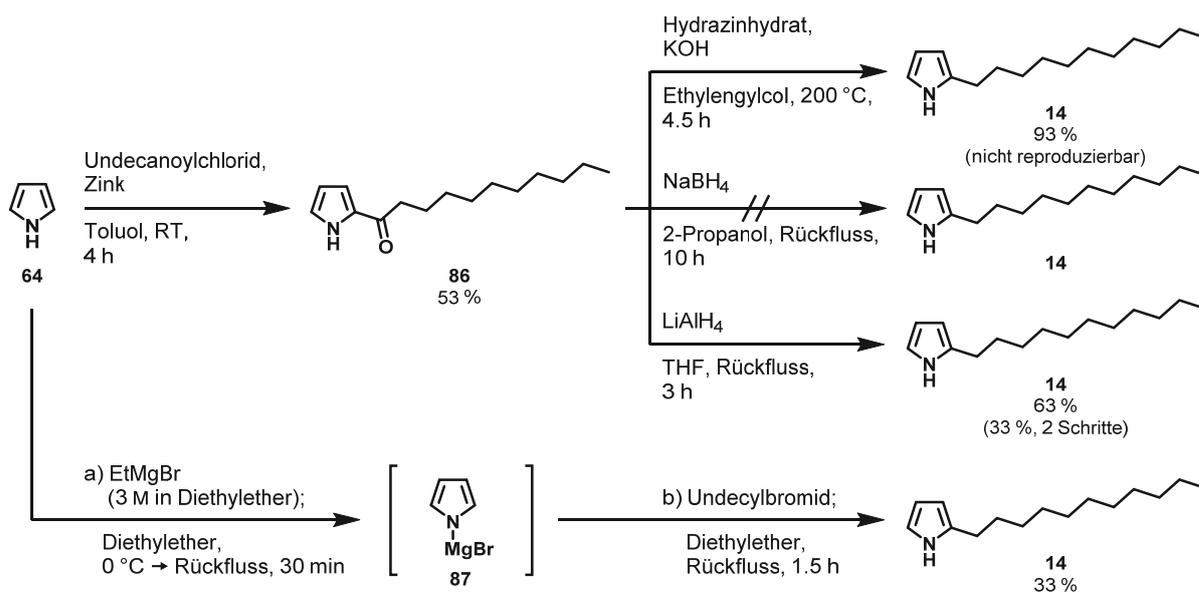
Die bisher am umfangreichsten untersuchte oxidative Zyklisierung der Prodiginine stellt die Biosynthese von Butyl-*meta*-cycloheptylprodigiosin (4, Streptorubin B) dar, welche u.a. durch das Enzym RedG aus *S. coelicolor* A3(2) katalysiert wird. Durch die heterologe Expression in den artverwandten Mikroorganismen *Streptomyces albus* und *Streptomyces venezuelae* und Fütterung von 2-UP (14)-Analoge konnte ein Katalysemechanismus postuliert und die Regio- und Stereoselektivität von *Challis et al.* aufgeklärt werden.^[57, 131, 132, 134] Bisher ausstehend ist jedoch die Etablierung dieser Zykklase und des entsprechenden Elektronentransportsystems für biokatalytische Anwendungen, wodurch folgende Ziele für diese vorliegende Arbeit gesetzt wurden:

1. Ein Screeningsystem sollte für die Evaluation der Aktivität der Zykklase RedG aufgebaut werden.
2. Die heterologe Expression von *redG* aus *S. coelicolor* A3(2) in *E. coli* sollte ermöglicht werden.
3. Mögliche Elektronentransportsysteme aus *S. coelicolor* A3(2) sollten identifiziert und aufgebaut sowie mit der Zykklase in einer analytischen Biokatalyse evaluiert werden.

3.7.1 Synthese von Undecylprodigiosin (3) und Entwicklung eines Screeningsystems

Für die Etablierung eines Screeningsystems für die Zyklisierung von Undecylprodigiosin (3) zum Butyl-*meta*-cycloheptylprodigiosin (4) war die Produktion der Referenzsubstanzen obligatorisch. Undecylprodigiosin (3) wurde sowohl als Referenz für das Screening als auch als Edukt für die biokatalytische Umsetzung benötigt, sodass ausgehend von der etablierten Boc-MBC (46, *vide supra* 3.1.1) und der anschließenden säurekatalytischen Kondensation das Prodiginin adressiert wurde.

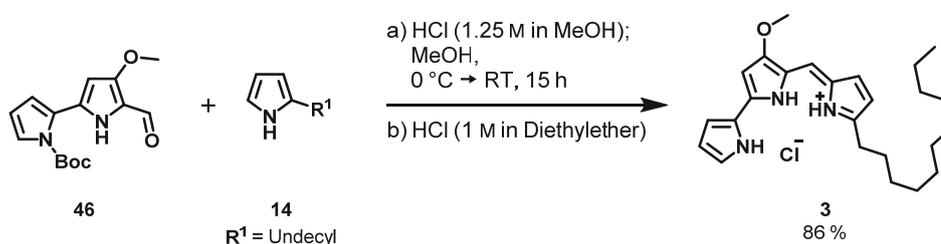
Die Synthese des Monopyrrols 2-UP (14) wurde zunächst durch Acylierung von 1*H*-Pyrrol (64) und anschließender Reduktion zum Alkan realisiert. Da eine Acylierung von 1*H*-Pyrrol (64) über eine gewöhnliche *Friedel-Crafts*-Acylierung auf Grund der Gegenwart der verwendeten Lewis-Säuren und der damit verbundenen raschen Polymerisation des Pyrrols nicht unkritisch ist, wurde eine alternative Zink-vermittelte Acylierung nach *Yadav et al.* herangezogen.^[284, 285] Dabei wird elementares Zink anstelle der Lewis-Säure Zinkchlorid eingesetzt und die Reaktion findet bei Raumtemperatur in Toluol statt, wodurch eine Polymerisation des Edukts möglichst unterdrückt werden soll. Das 1-(1*H*-Pyrrol-2-yl)undecan-1-on (86) konnte mit einer moderaten Ausbeute von 53 % dargestellt werden (Schema 26). Die anschließende Reduktion des Acylpyrrols zum 2-UP (14) konnte zunächst klassisch über eine *Wolff-Kishner*-Reduktion mit einer guten, aber einmaligen Ausbeute von 93 % erreicht werden; eine Reproduktion dieser Reaktion war nicht möglich und die hohen Temperaturen während der Reaktion führten zur Zersetzung oder Polymerisation des Eduktes. Eine mögliche Reduktion mittels Natriumborhydrid, wie sie von *Papireddy et al.* 2011 berichtet wurde, ergab wie schon bei der Synthese der 3-Alkylpyrrole (13n–s, *vide supra* 3.3.4.2) lediglich den sekundären Alkohol.^[76] Analog zur Reduktion der 3-Acylpyrrole (67) konnte 2-UP (14) durch die Verwendung von Lithiumaluminiumhydrid mit einer Ausbeute von 63 % und einer Gesamtausbeute von 33 % synthetisiert werden (Schema 26).



Schema 26: Syntheserouten für die Darstellung von 2-UP (14).

Alternativ gelang die Synthese von 2-UP (**14**) in Anlehnung an die Vorschrift von *Wasserman et al.* (1976) direkt vom 1*H*-Pyrrol (**64**) ausgehend über ein Pyrrol *Grignard* Reagenz (**87**, Schema 26) als Intermediat.^[286] Bereits 1909 hat *Oddo* über die Möglichkeit der Verwendung dieses *N*-geschützten Pyrrylmagnesiumbromids (**87**) für die Herstellung von 2-Pyrrolcarbonsäuren berichtet und später folgten allgemeingültige Arbeiten über die Regioselektivität für die Reaktion mit Elektrophilen und auch die direkte Anwendung für Alkylierungen mittels Halogenalkanen wurde rapportiert.^[287-290] Die direkte Alkylierung von 1*H*-Pyrrol (**64**) gelang mit einer moderaten Ausbeute von 33 % in einem Schritt, sodass diese Reaktion keine Verbesserung zu der zuvor genannten 2-stufigen Synthese darstellte. Da in beiden Optionen jeweils metallorganische Abfälle entstanden, gab es keine Bevorzugung für eine Syntheseroute für die Darstellung von 2-UP (**14**).

Die Kondensation von 2-UP (**14**) mit Boc-MBC (**46**) zu Undecylprodigiosin (**3**) und anschließender Ausfällung als Hydrochlorid konnte mit einer Ausbeute von 86 % durchgeführt werden (Schema 27).



Schema 27: Kondensationsreaktion von Boc-MBC (**46**) und 2-UP (**14**) zu Undecylprodigiosin (**3**).

Da eine Synthese der Referenz von Butyl-*meta*-cycloheptylprodigiosin (**4**) ausgehend vom Undecylprodigiosin (**3**) nicht durchführbar ist und die literaturbekannten Synthesen einen nicht unerheblichen Aufwand für eine Referenz darstellen,³⁵ wurde das Prodiginin aus dem natürlichen Produzenten *S. coelicolor* A3(2) extrahiert. Auch wenn für die vorliegende Arbeit der Fokus nicht auf der Optimierung für die Produktion der Prodiginine in diesem Organismus lagen, so konnten dennoch nachfolgende Beobachtungen festgehalten werden. Da *Streptomycetaceae* in Flüssigmedium oftmals als Myzelkugeln wachsen, wurde die Zellproliferation durch den Einsatz von Metallspiralen in den entsprechenden Fermentationskolben erhöht, indem die Myzelkugeln durch die mechanischen Scherkräfte während des Schüttelns zerteilt wurden. Ebenso wurde eine erhöhte Zellproliferation bei der Verwendung von Pepton aus Soja im Glycerin-Medium statt dem gängig verwendeten Pepton aus Casein beobachtet. Neben der erhöhten Zellproliferation zeigte sich auch eine erhöhte und deutlich frühere Produktion der Prodiginin Sekundärmetabolite (Abbildung 52). Möglicherweise lässt sich dies durch die zeitabhängige Produktion der Sekundärmetabolite erklären, welche erst in der späten Phase des Wachstums oder in der stationären Phase biosynthetisch hergestellt werden. Wie bereits durch *Sevcikova* und *Kormanec* 2004 beschrieben, konnte die Produktion der Prodiginine auch durch

³⁵ *Fürstner et al.* konnten den Makrozyklus des C-Rings binnen 9 Stufen mit einer Gesamtausbeute von 16 % darstellen.^[291]

ionischen Stress erhöht werden;^[292] eine NaCl Konzentration von 0.5–1 % (w/v) erhöht die Produktion, verlangsamt aber auch die Zellproliferation.

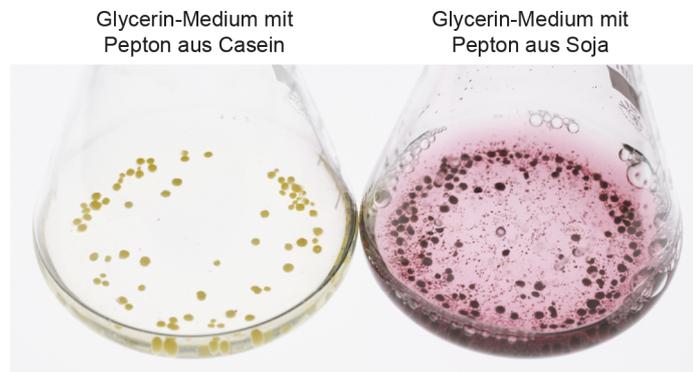


Abbildung 52: Vergleich von zwei *S. coelicolor* A3(2) Kulturen in Glycerin-Medium mit Pepton aus Casein und Pepton aus Soja. Beide Kulturen wurden zeitgleich und identisch inokuliert.

Die extrahierten *S. coelicolor* A3(2) Kulturen enthielten eine Mischung aus Undecylprodigiosin (3) und Butyl-*meta*-cycloheptylprodigiosin (4) und konnten daher als Referenz für beide Prodiginine verwendet werden (Abbildung 53).

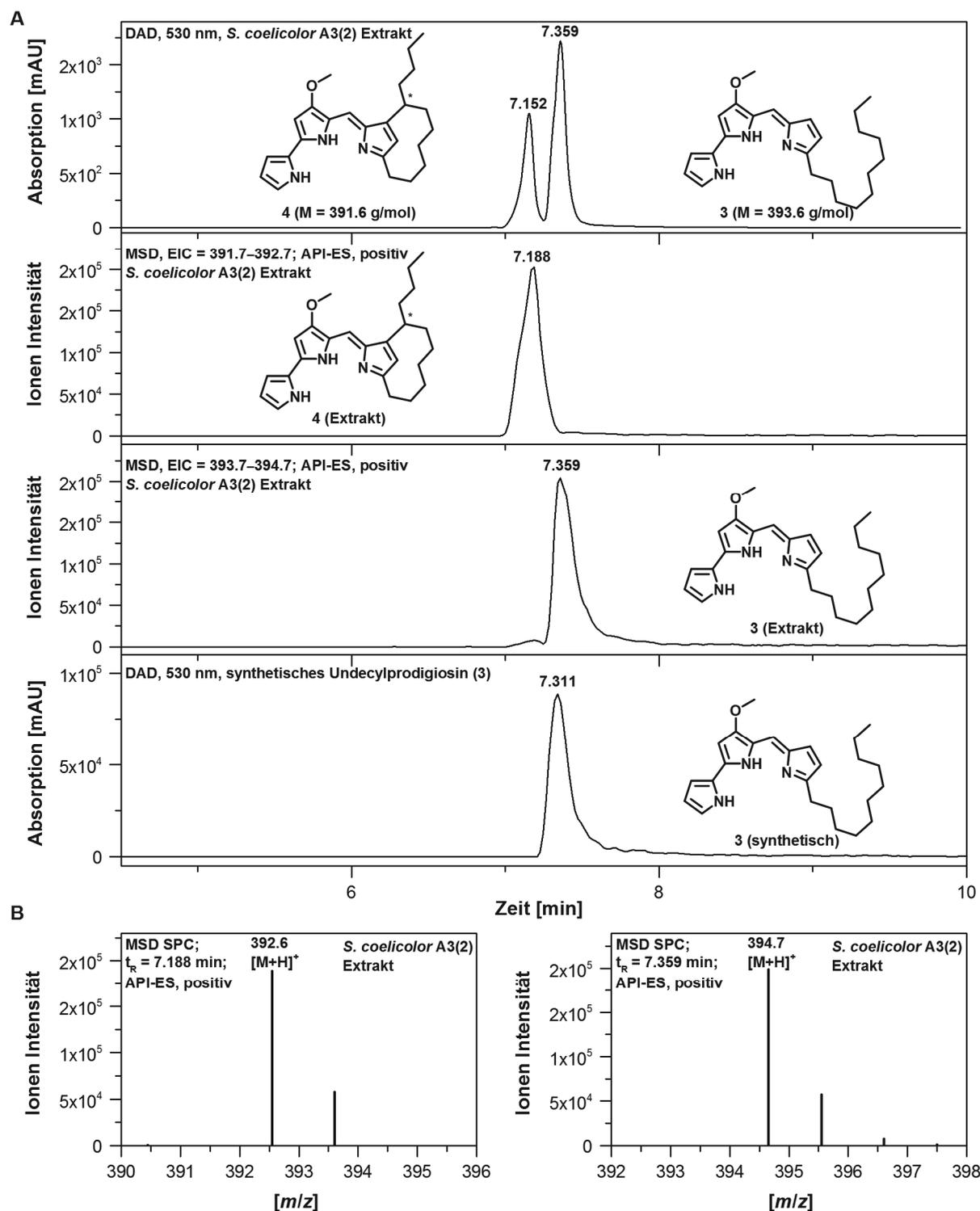


Abbildung 53: LC-MS Chromatogramm, Massenchromatogramme (A) und Massenspektren (B) der *S. coelicolor* A3(2) Extrakte mit Undecylprodiginin (3) und Butyl-*meta*-cycloheptylprodiginin (4) sowie von synthetisch hergestelltem Undecylprodiginin (3).

Der Vergleich der LC-MS Chromatogramme der extrahierten Prodiginine und des synthetisch hergestellten Undecylprodiginins (3) sowie die Bestimmung der Massen der beiden Signale erlaubte

eine eindeutige Zuordnung für Undecylprodigiosin (3) und Butyl-*meta*-cycloheptylprodigiosin (4), sodass eine mögliche biokatalytische *in vitro* Zyklisierung mittels LC-MS beobachtet werden und diese Methode für ein Elektronentransportsystem-Screening angewandt werden konnte.

3.7.2 Expression von *redG* und Aufbau des Elektronentransportsystems

Die Zyklase RedG stammt aus *S. coelicolor* A3(2) und katalysiert den Ringschluss von Undecylprodigiosin (3) zu Butyl-*meta*-cycloheptylprodigiosin (4). *S. coelicolor* A3(2) zählt zu den Modellorganismen der Ordnung der *Actinomyceten* und unterscheidet sich in vielen Eigenschaften grundlegend von den oftmals zur Proteinproduktion verwendeten *E. coli* Stämmen. Grundsätzlich ist eine Enzymgewinnung aus *S. coelicolor* A3(2) möglich, jedoch spricht die schon zuvor erwähnte durchschnittliche Verdopplungszeit von 4–6 h gegen eine ökonomische Nutzung als Produktionswirt (*vide supra* 3.2).^[197] *S. coelicolor* A3(2) (von *coeli* und *color*: lat. = die Himmelsfarbe, himmelsfarbig) ist ein grampositives Bodenbakterium, welches hyphenförmig mit pilzartigen Substratmycelien wächst und im späteren Wachstumszyklus Luftmycelien mit Exosporen zur Verbreitung bildet.³⁶ Das Genom wurde 2002 vom *Sanger Institute* (Cambridge, UK) und angrenzenden Instituten von *Bentley et al.* vollständig sequenziert und besteht aus einem linearen Chromosom mit 8 667 507 bp, welches 7 825 vorhergesagte Protein kodierende Sequenzen und mehr als 20 Gencluster für Sekundärmetabolite enthält.^[293] Der G+C Anteil ist mit 72 % deutlich höher als bei den *E. coli* K12 Stämmen mit 52 % (Anhang: Abbildung 72 und Abbildung 73).

Codon Harmonisierung und Expression von *redG*

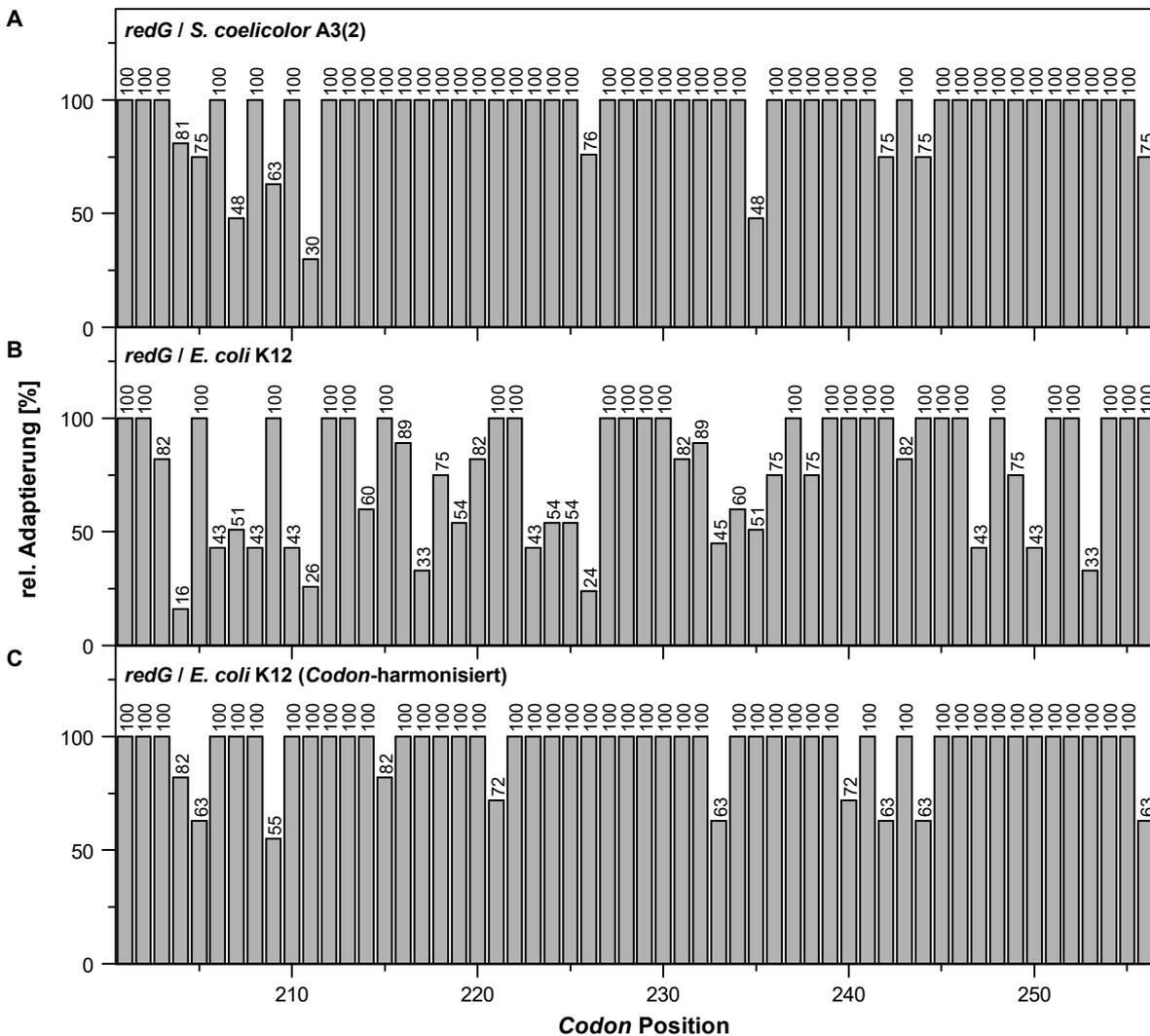
Der großen Differenz im G+C Anteil und der unterschiedlichen *Codon* Nutzung (engl. *codon usage*) zwischen *S. coelicolor* A3(2) und den *E. coli* K12 Stämmen geschuldet wurde das Gen für das Enzym RedG in der *Codon Usage* adaptiert und von *GenScript USA Inc.* (Piscataway, NJ, USA) synthetisiert. Für die *Codon* Adaptierung wurde die Methode der *Codon* Harmonisierung als Variante der allgemeinen *Codon* Optimierung gewählt. Wohingegen bei der allgemeinen *Codon* Optimierung meist das *Codon* mit der höchsten Frequenz des heterologen Produktionsstamms gewählt wird und somit eine „optimale“ Expression gewährleistet werden kann, so verfolgt die *Codon* Harmonisierung die Anpassung der *Codons* an die Frequenz des Ursprungstamms. Dadurch wird gewährleistet, dass Regionen und Domänen mit relativ langsamer Translationsrate auch im neuen heterologen Produktionsstamm ähnlich schnell übersetzt werden und entsprechend Zeit für die Proteinfaltung oder Einlagerung von Cofaktoren eingeräumt wird.^[198, 294] Die Adaptierung der Gensequenz von *redG* erfolgte nach den hinterlegten *Codon* Frequenzen der *Codon Usage Database* für *S. coelicolor* A3(2) und *E. coli* K12³⁷ (Anhang: Abbildung 72 und Abbildung 73). Die *Codon Usage* des neuen Konstruktes wurde nach anschließender Prozessierung durch das Online-Programm *Graphical Codon Usage Analyser (gcu)* von *Fuhrmann et al.* grafisch analysiert.^{38[295]} In Abbildung 54 ist exemplarisch

³⁶ Aus diesem Grund sei gesondert auf die Warnung zur Exposition im Experimentalteil hingewiesen.

³⁷ Juli 2013: <http://www.kazusa.or.jp/codon/>

³⁸ Juli 2013: <http://gcu.schoedl.de/>

ein Ausschnitt des RedG-Gens in den unterschiedlichen Prozessierungsschritten dargestellt; als *Codon* Qualität für die Ordinate wurde hierbei anstatt der absoluten *Codon* Frequenz des Organismus jeweils die relative Adaptierung nach *Sharp* und *Li* gewählt, welche dem *Codon* mit der höchsten Frequenz das Maximum von 100 % zuschreibt.^[296] Die Abbildung 54A zeigt die *Codon Usage* des Gens für RedG im Wirtsorganismus *S. coelicolor* A3(2), die Abbildung 54B zeigt die nicht adaptierte Sequenz unter der *Codon Usage* von *E. coli* K12 wohingegen die Abbildung 54C die harmonisierte *Codon*sequenz darstellt. Das Ergebnis der *Codon* Harmonisierung ergab ein *redG*-Gen mit 100% Aminosäure- und 74% Sequenzidentität³⁹ (Anhang: Abbildung 74). Der G+C Anteil wurde von 68.5% auf 50.9% reduziert und entspricht dadurch dem natürlichen Anteil von *E. coli* K12.



Expression von *redG*

Das synthetische Gen wurde nach der Codon Adaptierung in den pET28a(+)-Vektor über klassische Restriktion und Ligation kloniert (6.1.4; pET28a::*redG*; Tabelle 21; Vektorkarte im Anhang: Abbildung 75). Hierdurch wurde ein C-terminaler Poly-Histidin-Tag (6xHis) fusioniert, um eine spätere Proteinreinigung zu ermöglichen. Das SDS-Gel in Abbildung 55 (Proben 1 + 2) zeigte, dass das Enzym RedG zwar in *E. coli* BL21(DE3) bei 25°C produziert werden konnte, jedoch war es unlöslich und verblieb nach Sedimentierung der Zellen durch Zentrifugation im Zellpellet. Auch eine Expressionsoptimierung durch Temperaturniedrigung bis 10°C und die Supplementierung von Cystein, Ammoniumeisen-III-citrat und Eisen-II-sulfat-7-hydrat als Schwefel und Eisenquelle für dieses Eisen-Schwefel-Cluster Protein konnte keine Verbesserung der Löslichkeit forcieren. In Gegenwart von 8 M der chaotropen Verbindung Harnstoff konnte das Protein zwar solubilisiert und über Ni-NTA-Säulenchromatographie (6.2.5.3) gereinigt werden, allerdings bildete das Enzym bei der anschließenden Entsalzung ein unlösliches Präzipitat. Es sei zudem anzumerken, dass die Zellen einen deutlich dunkleren Phänotyp aufwiesen und nach Zellaufschluss ein tiefbraunes Lysat ergaben, sodass auf einen oxidativen Einfluss des Luftsauerstoffs ausgegangen werden konnte.

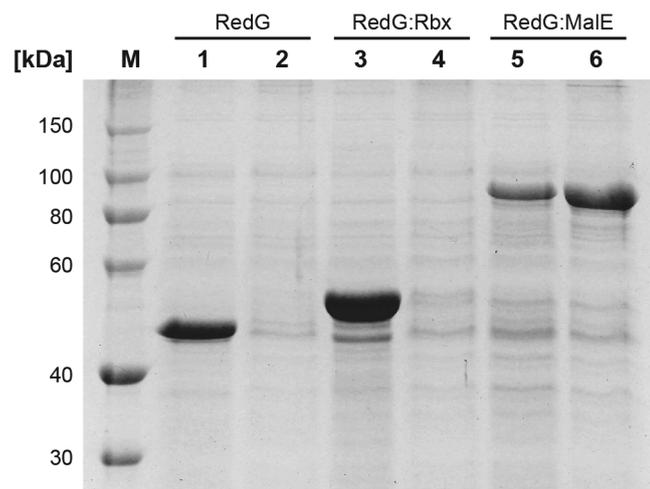


Abbildung 55: SDS-Gel der verschiedenen RedG-Konstrukte dieser Arbeit. Es sind jeweils die Ganzzelllysate (Spalten 1, 3, 5) und die zellfreien Überstände nach Zelllyse (Spalten 2, 4, 6) aufgetragen. [Berechnet $M(\text{RedG}) = 46.1 \text{ kDa}$; $M(\text{RedG:Rbx}) = 54.0 \text{ kDa}$; $M(\text{RedG:MalE}) = 88.6 \text{ kDa}$; bei den Berechnungen wurden ebenfalls die 6x His-Tags und TEV-Proteaseschnittstellen einberechnet. M – Marker]

Zur Verbesserung der Löslichkeit von Proteinen in der heterologen Expression werden oftmals auch Fusionsproteine verwendet.^[297] Hierbei wird an den *N*-Terminus des Zielproteins ein Protein als Löslichkeitsanker fusioniert, welcher zunächst translatiert wird und somit die Löslichkeit des Zielproteins steigert. Diese Strategie wurde auch für die Expression von *redG* in Betracht gezogen. Als Fusionspartner diente hierbei das ubiquitär vorkommende Rubredoxin (Rbx). Rubredoxin ist ein kleines 6–7 kDa Protein, welches einen Eisen-Schwefel-Cluster aus einem zentralen Eisenion mit vier koordinierenden Cysteinen besitzt und bei der Einelektronübertragung zwischen einer Reduktase und

dem Zielprotein beteiligt ist.^[298, 299] Da es überdies hochlöslich, stabil und gut in *E. coli* produzierbar ist, eignet es sich für die Funktion eines Löslichkeitsankers.^[300, 301] Da die Oxygenase RedG zudem von einem Einelektronentransfer abhängig ist und andere Proteine wie die P450 Monooxygenase aus *Bacillus megaterium* P450 BM3 als funktionierendes Fusionsprotein eingesetzt werden, wurde das Gen für RedG in den bereits im Institut verfügbaren Vektor pHR2::YqjM durch klassische Klonierung eingefügt und dadurch das Gen für die Enreduktase YqjM ersetzt (pHR2::redG; Tabelle 21; Vektorkarte im Anhang: Abbildung 76).^[302] Nach erfolgter Expression ist eine Trennung des Rubredoxins vom RedG durch den Einsatz einer TEV Protease möglich. Zwar konnte das Fusionsprotein durch *E. coli* BL21(DE3) hergestellt werden, dennoch zeigte sich das gleiche Löslichkeitsverhalten wie zuvor (Abbildung 55, Proben 3 + 4). Daher wurde für ein weiteres Fusionsprotein auf das häufig verwendete Maltosebindeprotein aus *E. coli* (MBP oder MalE) zurückgegriffen, welches in einer N-terminal truncierten Variante eine durchschnittliche Masse von 41 kDa besitzt und damit annähernd die gleiche Masse wie RedG besitzt.^[297, 303, 304] Mittels MEGAWHOP (engl. *mega primer with whole plasmid*, 6.1.7) PCR wurde das Rubredoxin-Gen im pHR2::redG Vektor gegen das Gen des Maltosebindeproteins aus *E. coli* substituiert. Hierfür wurde zunächst das *malE*-Gen aus dem Genom von *E. coli* BL21(DE3) (6.1.3.1) amplifiziert und in der MEGAWHOP PCR als Megaprimer eingesetzt wodurch der Vektor pHM::redG (Tabelle 21; Vektorkarte im Anhang: Abbildung 77) konstruiert wurde. Da dieser Vektor auf dem pHR2::redG basierte, wäre auch hier eine Trennung zwischen Löslichkeitsprotein und Zielprotein durch eine TEV-Protease möglich. Die Analyse mittels SDS-Gel (Abbildung 55, Proben 5 + 6) bestätigt die Produktion des Fusionsproteins als lösliches Protein in *E. coli* BL21(DE3).

Aufbau des Elektronentransportsystems

Wie bereits im Kenntnisstand erwähnt, wird in der Literatur davon ausgegangen, dass für die Elektronentransportkette auf ein System mit einem Ferredoxin (Fdx) und einer Ferredoxinreduktase (Fnr bzw. FdxR) in *S. coelicolor* A3(2) zurückgegriffen wird (*vide supra* 2.4.4).^[57, 305] Die Elektronen werden dabei von NAD(P)H über eine Ferredoxinreduktase an ein Ferredoxin übertragen, welches anschließend den Transfer auf das *Rieske-Cluster* von RedG übernimmt (Abbildung 56). Da im Biosynthesecluster jedoch keine Gene für ein Ferredoxin oder eine Ferredoxinreduktase annotiert sind, wurden alle Ferredoxine und Ferredoxinreduktasen im Genom von *S. coelicolor* A3(2) als putative Elektronentransportproteine angesehen.

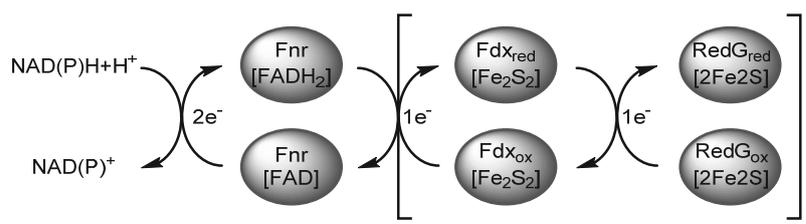


Abbildung 56: Putative Elektronentransportkette für die Zyklastase RedG aus *S. coelicolor* A3(2). Es werden jeweils zwei Elektronen auf die Ferredoxinreduktase übertragen. Anschließend erfolgt zweimal eine Übertragung von einem Elektron auf je ein Ferredoxin und im Anschluss an die Zyklastase RedG. Zur Vereinfachung wurden lediglich Fe₂S₂ Cluster verwendet und das zweite Eisen-Schwefel-Cluster von RedG sowie ein Protonenausgleich für die Gleichung unberücksichtigt gelassen. Der ausführliche Elektronentransport für die Zyklastase kann dem Kenntnisstand entnommen werden (*vide supra* 2.4.4).

Im Genom von *S. coelicolor* A3(2) konnten nach der vollständigen Sequenzierung insgesamt sechs verschiedene putative Ferredoxine und drei Ferredoxinreduktasen in verschiedenen Operons annotiert und auf Sequenzebene durch Vergleiche spezifiziert werden.^[293, 306] Bereits 2007 wurden diese Elektronentransportenzyme von *Chun et al.* in *E. coli* nach *Codon* Optimierung produziert und in verschiedenen Kombinationen mit Ferredoxinen und Ferredoxinreduktasen anderer Organismen und einem Cytochrom P450 Enzym aus *S. coelicolor* A3(2) untersucht.^[307] Über einen Sequenzabgleich (engl. *sequence alignment*) konnte eine weitere putative Ferredoxinreduktase (Gennummer SCO2106) identifiziert werden. Die entsprechenden Ferredoxine und Ferredoxinreduktasen sind der Tabelle 15 zu entnehmen, dabei entsprechen die Nummerierungen in dieser Arbeit jeweils den letzten beiden Ziffern der Protein Referenznummer des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI; Bethesda, MD, USA).

Tabelle 15: Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Ferredoxine und Ferredoxinreduktasen aus *S. coelicolor* A3(2).

	Name (diese Arbeit)	Name (Literatur)	Aminosäure Anzahl	Masse [kDa]	Gen ^[a]	Protein ^[b]
Ferredoxin	Fdx75	soyB2	66	6.7	SCO0773	NP_625075.1
	Fdx24	–	101	10.8	SCO1649	NP_625924.1
	Fdx54	soyB1	70	7.3	SCO3867	NP_628054.1
	Fdx71	<i>fdxA</i>	129	14.4	SCO7110	NP_631171
	Fdx15	–	73	7.4	SCO7676	NP_631715.1
	Fdx84	<i>fdxA1</i>	106	11.9	SCO5135	NP_629284
Ferredoxin- reduktase	Fnr89	–	454	49.8	SCO0681	NP_624989
	Fnr64	–	407	42.2	SCO2106	NP_626364
	Fnr11	–	421	42.2	SCO2469	NP_626711
	Fnr78	–	420	45.2	SCO7117	NP_631178

^[a] entspricht der Annotierung in der *Streptomyces Database* (*StrepDB*)⁴⁰

^[b] entspricht der *NCBI Reference Sequence*^{41[308]}

⁴⁰ April 2014: <http://strepdb.streptomyces.org.uk>

⁴¹ April 2014: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein>

Da die Gene aus genomischer DNA von *S. coelicolor* A3(2) isoliert wurden, konnte keine Optimierung der *Codon Usage* erfolgen. Alle Gene der zehn Proteine wurden über *Gibson Assembly*[®] *Primer* direkt aus der genomischen DNA amplifiziert und dabei mit einem N-terminalen 6xHis-Tag versehen. Mittels *Gibson Assembly*[®] wurden die Gene in den Zielvektor pACYCDuet[™]-1 kloniert, welcher für die Koexpression von zwei Zielgenen durch zwei Polylinker (engl. *multiple cloning site*) mit individuellen T7-Promotor geeignet ist. Dabei erfolgte die Insertion der Ferredoxine in der erste *Multiple Cloning Site* (pX75, pX24, pX54, pX71, pX15, pX84; Tabelle 21; Vektorkarten im Anhang: Abbildung 79–Abbildung 84) und die der Ferredoxinreduktasen in die zweite *Multiple Cloning Site* (pFNR89, pFNR64, pFNR11, pFNR78; Tabelle 21; Vektorkarten im Anhang: Abbildung 85–Abbildung 88), sodass eine spätere Koexpression der richtigen Elektronentransportkette möglich wurde. Die SDS-Gele in Abbildung 57 bestätigten jeweils die heterologe Expression der Ferredoxin- und Ferredoxinreduktase-Gene in *E. coli* BL21(DE3). Bei allen Expressionen der Ferredoxin-Gene wurde dem Nährmedium Cystein, Ammoniumeisen-III-citrat und Eisen-II-sulfat-7-hydrat für die Bildung des Eisen-Schwefel-Clusters supplementiert.

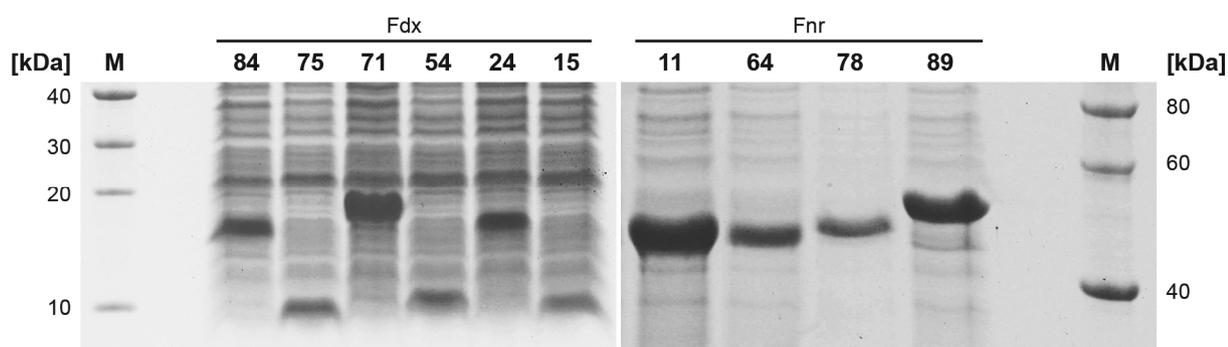
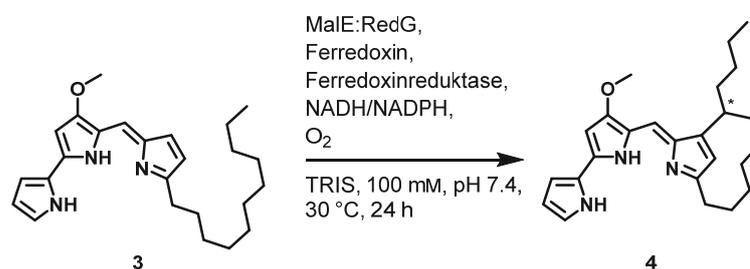


Abbildung 57: SDS-Gele der Ferredoxine und Ferredoxinreduktasen. Die Benennung der Proteine entspricht der Benennung in dieser Arbeit (vgl. Tabelle 15). [M – Marker]

Eine Verbesserung der Produktion der Proteine – insbesondere der kleineren Ferredoxine – wäre durch eine *Codon* Optimierung, wie sie in der Literatur bereits für diese Proteine verwendet wurde, möglich.^[307]

3.7.3 Untersuchung gekoppelter Elektronentransportsysteme in Kombination mit RedG

Für die Untersuchung des Elektronentransportsystems in Kombination mit RedG wurden jeweils alle Permutationen der Proteine evaluiert. Hierfür wurden die Gene mit den entsprechenden Eisen-Schwefel Additive in *E. coli* BL21(DE3) exprimiert und die Zellysate nach dem Zellaufschluss in äquivalenten Mengen vermischt (6.7.11). Da für die meisten Ferredoxinreduktasen die Spezifität bezüglich des Hydridonors nicht bekannt ist, wurden sowohl NADH als auch NADPH in stöchiometrischen Mengen verwendet. Das Substrat Undecylprodigiosin (3) wird mit dem Cosolvens DMSO zu den Ansätzen gegeben und die Reaktion mit der Zuführung von molekularem Sauerstoff gestartet (Schema 28). Nach 24 h wurden die Testansätze jeweils extrahiert und mit dem zuvor verwendeten LC-MS Programm vermessen.



Schema 28: Allgemeines Reaktionsschema der Untersuchungen der Elektronentransportkette der Zykklase RedG.

Keine der getesteten Kombinationen konnte ein eindeutiges Ergebnis zeigen. Zwar konnte die reduzierte Masse des zyklischen Produkts Butyl-*meta*-cycloheptylprodigiosin (4) in einigen Proben nachgewiesen werden, jedoch lag die Ionenintensität dieser Signale nah an der Detektionsgrenze. Die Signale konnten zwar durch Mehrfachmessung der gleichen Probe von der Basislinie differenziert werden, allerdings gab es zwischen den Messungen auch leichte Differenzen in den Retentionszeiten, welche durch eine Äquilibration der Säule nach jedem Lauf mit einem Lösungsmittelgradienten verhindert werden könnten. Überdies zeigte sich für das Substrat Undecylprodigiosin (3) eine Verunreinigung von $\leq 1\%$ mit der übereinstimmenden Masse zum Produktes und ähnlicher Retentionszeit, sodass nach guter wissenschaftlicher Praxis keine eindeutige Aussage getroffen werden konnte.

Neben der Analytik könnten auch die Durchführung des Assays und die Proteinproduktion optimiert werden. So ist zwar der Einsatz von Zellysaten einfach und oft wünschenswert, dennoch erschwert diese Herangehensweise die Aufklärung einer Elektronentransportkette, da unter Umständen die Elektronen nicht an den spezifischen, zu untersuchenden Partner übertragen werden. Durch die Verwendung von gereinigten Enzymen ist zum einen gesichert, dass lediglich die Ferredoxinreduktase durch NAD(P)H reduziert wird, und zum anderen, dass Ferredoxin die Elektronen exklusiv auf die Zykklase RedG überträgt. In dem bisherigen Assay wurde lediglich das löslich produzierte Fusionsprotein aus dem Maltosebindeprotein und RedG eingesetzt. Möglicherweise behindert das Maltosebindeprotein die katalytischen Eigenschaften, sodass durch den Einsatz der TEV Protease die Abspaltung des

Löslichkeitsankers durchzuführen ist. Eine säulenchromatographische Reinigung beider Proteine wäre hier durch die Verwendung einer Amylosesäule, welche exklusiv das Maltosebindeprotein bindet, denkbar. Für eine höhere Expressionsrate der Enzyme kann auf die in der Literatur beschriebene *Codon* Optimierung der Gene für die Ferredoxine und die Ferredoxinreduktasen eingegangen werden. Ein weiterer Gesichtspunkt betrifft die Zuführung des molekularen Sauerstoffs. Zwar ist Sauerstoff für die Zyklisierung obligat – auch wenn bei der Reaktion kein Sauerstoff in das Zielmolekül übertragen wird –, dennoch werden durch den Einsatz von Sauerstoff oftmals die Eisen-Schwefel-*Cluster* oxidiert, wie es zuvor nach der Zellyse von RedG produzierenden Zellen beobachtet wurde. Daher wäre der Einsatz einer strikt anaeroben Enzymaufbereitung nach Gewinnung der Zellen eine mögliche Konsequenz. Unter Umständen kann auch die Ausweitung des verwendeten Elektronentransportsystems auf andere bekannte Elektronentransportketten aus *S. coelicolor* A3(2) oder heterologen Organismen notwendig sein, da bisher kein ausreichender Zusammenhang zwischen den hier verwendeten Enzymen und der Zyklastase belegbar ist.

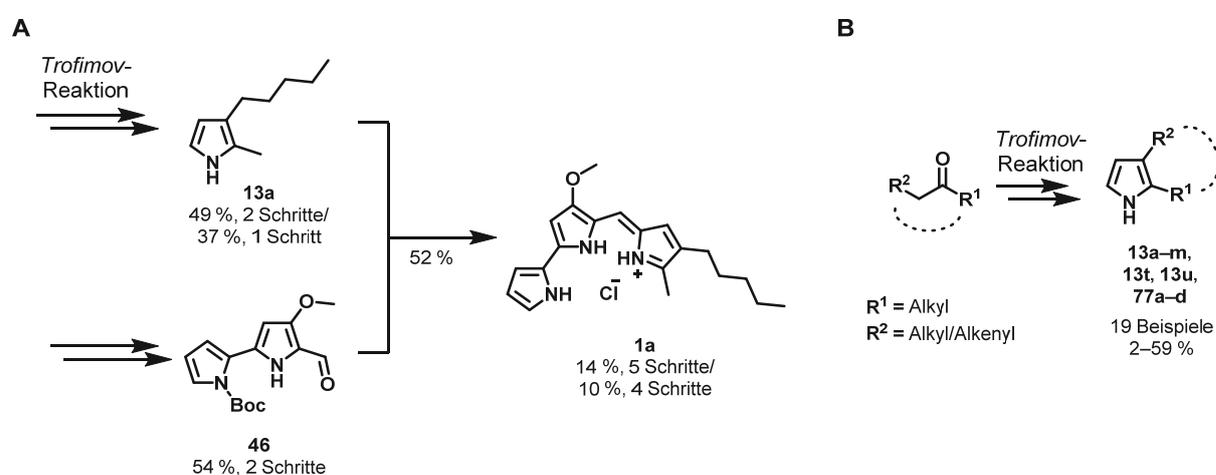
3.7.4 Synopsis des Kapitels

1. Die Analytik für die Zyklisierungsreaktion von Undecylprodigiosin (3) zum Butyl-*meta*-cycloheptylprodigiosin (4) konnte durch Synthese des Substrats und Extraktion des Produktes aus *S. coelicolor* A3(2) etabliert werden.
2. Die Rieske-Nicht-Häm-Eisen-Oxygenasen RedG aus *S. coelicolor* A3(2) konnte nach *Codon* Harmonisierung als Fusionsprotein mit dem Maltosebindeprotein MalE als Löslichkeitsanker in *E. coli* BL21(DE3) als lösliches Protein produziert werden.
3. Für die Untersuchung der Elektronentransportkette gelang die Expression von sechs Ferredoxinen und vier Ferredoxinreduktasen aus *S. coelicolor* A3(2).
4. In den Untersuchungen zur Biokatalyse mit der Zyklastase RedG in Kombination mit den möglichen Elektronentransportsystemen konnte keine eindeutige Aussage getroffen werden, sodass zukünftige Evaluationen unter dem Gesichtspunkt der Optimierung der Genexpression und der Durchführung des Assays sowie dem Einsatz alternativer Elektronentransportketten stehen.

4 Zusammenfassung und Ausblick

Biomimetische Totalsynthese von Prodigiosin (1a)

Das erste Projekt befasste sich mit der Entwicklung neuer Strategien für die Produktion von Prodigiosin (1a) und Derivaten dieses Naturstoffes. Im Rahmen dieses Projektes wurde zunächst das natürliche Pyrrolalkaloid Prodigiosin (1a) mittels einer biomimetischen Totalsynthese als Referenz hergestellt, welches durch die Kondensation der natürlichen Intermediate MBC (12, in der Synthesestrategie als Boc-geschütztes Intermediat 46) und MAP (13a) aufgebaut wird. Die Basis bildete hierbei die von *Lavallée et al.* entwickelte zweistufige Synthese von Boc-MBC (46) und die *Trofimov*-Reaktion für die Darstellung des natürlichen Bausteins MAP (13a; Schema 29A).^[139, 182, 187]



Schema 29: A) Biomimetische Totalsynthese von Prodigiosin (1a). B) Anwendung der *Trofimov*-Reaktion für die Synthese der Pyrrol Präkursor.

Durch die Verwendung der *Trofimov*-Reaktion ergaben sich mehrere Vorteile. Verwehrt die bisherigen Synthesestrategien – durch den Einsatz teils komplexer mehrfach-substituierter Pyrrole als Starteinheit und anschließender Synthese über vier bis fünf Schritte mit moderaten Gesamtausbeuten von 15–43 % – den einfachen Zugang zum Präkursor MAP (13a), so erlaubte die *Trofimov*-Reaktion die Darstellung in zwei Reaktionsstufen ausgehend vom kostengünstigen 2-Octanon (53a) mit einer Gesamtausbeute von 49 %. Eine zusätzliche Verkürzung durch eine konsekutive Eintopfsynthese konnte zwar erzielt werden, verminderte die Ausbeute jedoch auf 37 %. Darauf aufbauend konnte die bisher kürzeste biomimetische Totalsynthese von Prodigiosin (1a) über fünf Schritte mit einer Gesamtausbeute von 14 % respektive über vier Schritte mit 10 % ermöglicht werden. Überdies gewährte die *Trofimov*-Reaktion den schnellen Zugang zu insgesamt 18 weiteren Pyrrolbausteinen dieser Arbeit (13b–m, 13t, 13u, 77a–d, Schema 29B) und zeigte in Kombination mit dem modularen Aufbau der Prodigiosinsynthese das Potential für den einfachen Zugang zu diversen Prodigiosin (1a) Derivaten (Abbildung 58) oder Präkursoren für die spätere Mutasythese; es konnten aber auch Mechanismus-bedingte Grenzen dieser Reaktion aufgeführt werden.

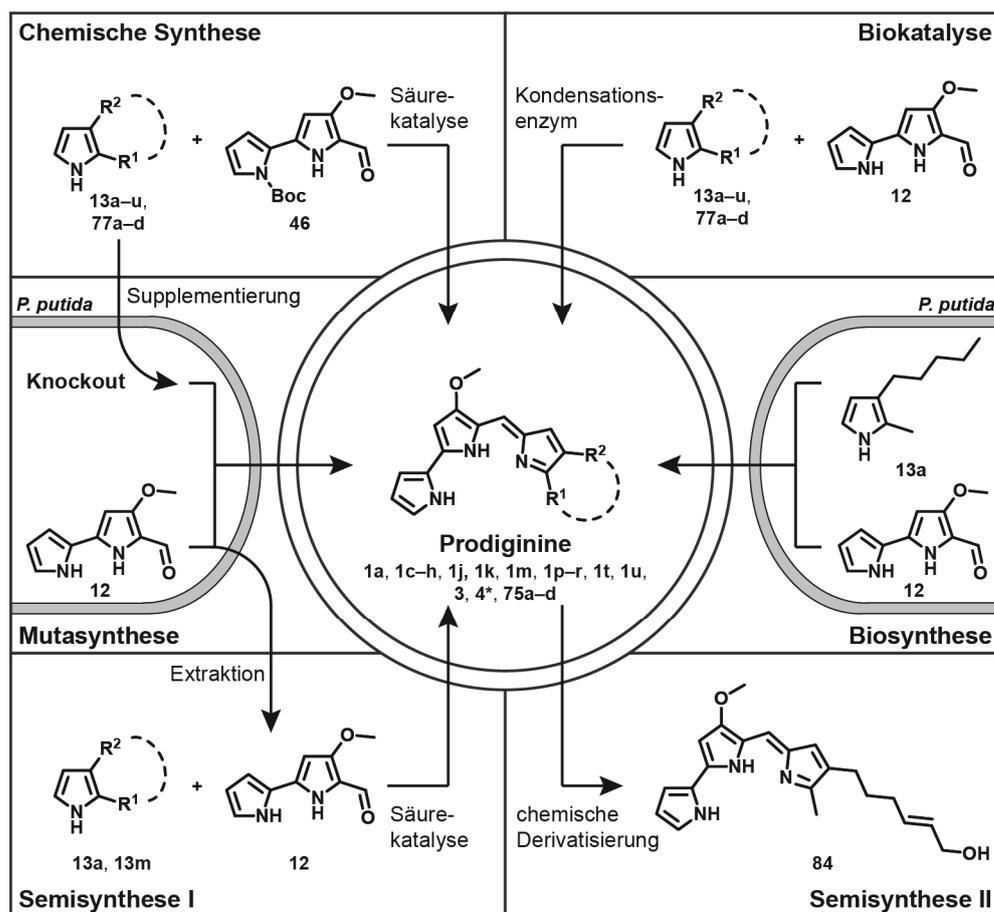


Abbildung 58: Übersicht aller in dieser Arbeit verwendeten Strategien zur Darstellung von Prodigininen. [Butyl-*meta*-cycloheptylprodigiosin (4, Streptorubin B) wurde lediglich aus seiner Fermentation von *S. coelicolor* A3(2) extrahiert.]

Heterologe Produktion und Charakterisierung des Naturstoffes Prodigiosin (1a)

Ein weiterer Zugang für eine nachhaltige, bioökonomische Produktion von Prodigiosin (1a) wurde in einer Kooperation mit Dr. *Andreas Domröse* aus dem Institut für Molekulare Enzymtechnologie (IMET) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf ermöglicht. Durch eine TREX-System (*Transfer and Expression System*) vermittelte Integration des Prodigiosin (1a) Biosyntheseclusters (*pig Cluster*) aus *S. marcescens* in das Genom des GRAS-zertifizierten Stamms *P. putida* KT2440 konnte Dr. *Andreas Domröse* den Stamm *P. putida* pig-r2 erzeugen, welcher ein rotes Pigment produzierte (Abbildung 58).^[5, 207] Bedingt durch den Insertionsort in die 16S-rRNA kodierende Sequenz des rRNA Operons C unter Kontrolle eines starken Promotors war eine konsekutive, heterologe Produktion dieses Farbstoffes möglich. Durch physikochemische Charakterisierungen und einem strukturellen Vergleich mit der chemisch synthetisierten Referenz konnte das rote Pigment eindeutig als Prodigiosin (1a) identifiziert werden. Gestützt durch quantitative NMR-Spektroskopie (qNMR) und Absorptionsspektroskopie wurden stark divergierende, historische Extinktionskoeffizienten für Prodigiosin (1a) revidiert und neu bestimmt, wodurch eine präzisere Quantifizierung des Naturstoffes ermöglicht wurde. Im Zusammenhang einer Produktionsoptimierung konnte nicht nur der Produktionstiter auf 94 ± 1 mg/L erhöht werden, sondern auch eine Korrelation zwischen der zeitlichen

Ausdehnung der exponentiellen Wachstumsphase und der Produktionsrate aufgezeigt werden. Erste Versuche von M.Sc. *Hannah U.C. Braß* zur weiteren zeitlichen Ausdehnung der Wachstumsphase durch den Einsatz von Minimalmedium konnten ebenfalls den Produktionstiter deutlich steigern (unveröffentlichte Ergebnisse). Möglicherweise kann eine erhöhte Transkriptionsrate dieses rRNA kodierenden Genlocus während der Wachstumsphase als Ursache genannt werden. Spätere Ergebnisse einer zeitlich abhängigen Supplementierung des Präkursors MAP (**13a**) unterstützten diese Hypothese. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass für *P. putida* KT2440 bis zu einer getesteten Prodigiosin (**1a**) Konzentration von 300 μM (entspricht 19.4 mg/L) keine Beeinträchtigung der Vitalität vorlag. Diese beeindruckende Toleranz und die Möglichkeit eines genetischen Insertionsorts im Genom für die konstitutive Produktion von Sekundärmetaboliten sprechen für *P. putida* KT2440 als potentiell zukunftssträchtigen *Chassis*-Stamm der synthetischen Biologie. Neben einer möglichen Insertion von Genclustern anderer Naturstoffe sollte das Optimierungspotential für die Sekundärmetabolitproduktion dieses Genlocus in Kombination mit dem starken natürlichen Promotor durch systematische Versuchsplanung (engl. *design of experiments*, DoE) und Analyse einer zeitlich abhängigen Bestimmung der Transkriptmenge analysiert werden.

Polyurethan als Adsorbens in der Prodigiosin (1a) Biosynthese

Für die Extraktion der Prodiginine wurde, basierend auf ihrer Hydrophobizität, eine *in situ* Extraktion durch kostengünstigen Polyurethan Schaum erprobt. Durch die Supplementierung von ca. 1 cm^3 großen PU-Würfeln in das Fermentationsmedium als feste Phase konnten durch Adsorption an deren Oberfläche die Prodiginine von der Zelloberfläche und dem wässrigen Fermentationsmedium nahezu quantitativ extrahiert werden. Aufgrund der hohen Extraktionseffizienz wurde anschließend ein vollständiger *Downstream Process* mit PU-Würfeln entwickelt, welcher nicht nur die Reinheit des Rohextraktes erhöhte, sondern auch den Prodigiosin (**1a**) Titer verdoppelte sowie die aktive Arbeitszeit halbierte. Verglichen mit der Totalsynthese wurde eine Kostenreduktion um 56 % für die äquivalente Menge Prodigiosin (**1a**) erreicht. Die Verwendung von PU-Schaum als Adsorbens eröffnet einen großen Spielraum für Optimierungen sowohl auf der Ebene des Polymermaterials als auch auf der Seite des Prozesses. Da in NMR-Spektren von gelösten PU lediglich zwei symmetrische aromatische Signale erkennbar waren, wird für die Herstellung des kommerziellen PU-Schaums von der Verwendung des Standardbausteins Diphenylmethan-4,4'-diisocyanat (MDI) ausgegangen. Die Polyollinker werden daher aus Polyestern bestehen und tragen kaum zur Adsorption bei. Durch gezielte Synthese bietet sich hier die Möglichkeit der Verwendung von Polyolbausteinen mit hydrophoben, aromatischen Resten, sodass die Adsorptionskapazität gesteigert werden könnte. Im Fermentationsprozess selbst zeigte sich, dass ein Würfel mit einem Volumen von 1 cm^3 nicht der optimalen Größe entsprach, da oftmals die zentrale Schaumstruktur nicht für das Fermentationsmedium adressierbar war. Für die Anwendung im präparativen Maßstab in einem Fermentationsreaktor bilden PU-Würfel ebenfalls nicht die prädestinierte Form eines Adsorbens. Hier wäre über die Verwendung einer externen, mit PU-Schaum gefüllten Festbettsäule nachzudenken, welche kontinuierlich mit Fermentationsmedium durchströmt wird (Abbildung 59). Die Verwendung einer externen Festbettsäule würde den Austausch im laufenden Fermentationsprozess ermöglichen und auch den Betrieb einer *Fed-Batch Culture* oder eines kontinuierlichen Prozesses ermöglichen.

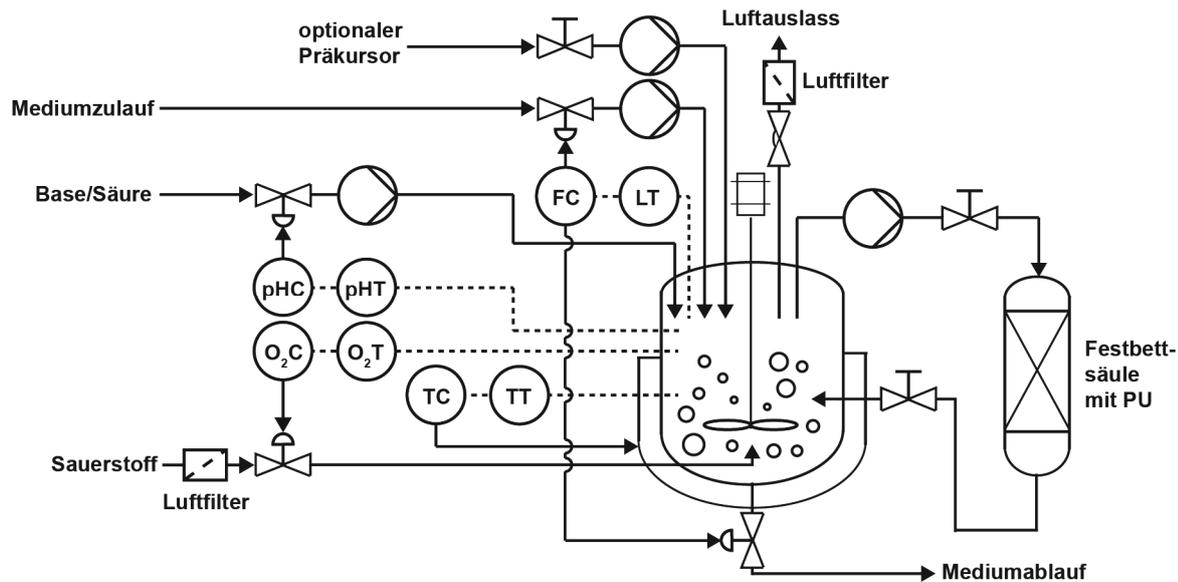


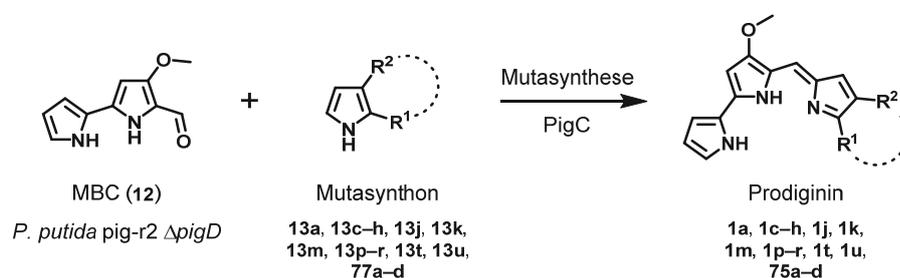
Abbildung 59: Aufbau für eine kontrollierte fermentative Produktion von Prodigininen mit einer externen, mit PU-Schaum gefüllten Festbetsäule zur Extraktion durch Adsorption. Optional sind ein Zulauf für Präkursoren und sowohl ein Zulauf und Ablauf für Medium für die Durchführung von *Fed-Batch* Prozessen oder kontinuierlichen Prozessen installiert. [FC – Durchfluss Regelung; LT – Füllstand Transmitter; O₂T – Sauerstoff Regelung; O₂C – Sauerstoff Transmitter; pHC – pH Regelung; pHT – pH Transmitter; PU – Polyurethan; TC – Temperatur Regelung; TT – Temperatur Transmitter]

Mutasynthese zur Herstellung von Prodigiosin (1a) und Derivaten

Aufbauend auf den Prodigiosin (1a) Produktionsstamm und dem *Downstream Process* wurde für das Ziel der Diversifizierung des Naturstoffes, eine Mutasynthesestrategie entwickelt (Abbildung 58). Die Grundlage hierfür bildete die Akzeptanz der MAP (13a) Derivate 13e und 13f in einer *Precursor-directed* Biosynthese (PDB) und der damit verknüpften Bildung der entsprechenden Prodiginine. Daraufhin wurde von Dr. *Andreas Domröse* ein MAP (13a)-defizienter *P. putida* KT2440 Stamm *P. putida* pig-r2 Δ pigD durch eine partielle Deletion des *pigD* Gens des zuvor verwendeten Prodigiosin (1a) Produktionsstamms erzeugt.^[4, 207] Dieser Stamm produzierte weiterhin das Biosyntheseintermediat MBC (12), sodass mittels Mutasynthese die Produktion von Prodigiosin (1a) Derivaten des C-Rings ermöglicht wurde. Die Entwicklung der Mutasynthesestrategie beinhaltete dabei die Evaluation der Konzentration des Verwendeten Cosolvens, der effektiven Präkursorkonzentration und dem damit verbundenen Supplementierungszeitpunkt, der Adaptation des PU-Schaum Extraktionssystems und der Bereitstellung divers alkylierter Pyrrolanaloga durch differierende Synthesestrategien. Insgesamt wurden 31 verschiedene Pyrrole und Indole in der Mutasynthese getestet; darunter waren 14 2,3-Dialkylpyrrole, vier zyklische 2,3-Dialkylpyrrole, acht 2- bzw. 3-Monoalkylpyrrole, Pyrrol ohne Substituenten und vier Indole. In der Mutasynthese produzierte *P. putida* pig-r2 Δ pigD in der Gesamtheit 18 verschiedene Prodiginine (Tabelle 16) – neben Prodigiosin waren davon fünf literaturbekannt (1d–g, 75b)^[63, 309] und zwölf neuartig (1c, 1h, 1j, 1k, 1p–r, 1t, 1u, 75a, 75c, 75d). Das Akzeptanzspektrum der Mutasynthese ließ dabei Rückschlüsse auf das Substratspektrum des Kondensationsenzym PigC zu und erlaubte dabei Einsicht in die Strukturbeziehung der Substrate. Es konnte gezeigt werden, dass insbesondere die Methylgruppe, wie

sie im natürlichen Intermediat MAP (**13a**) vorliegt, obligat für die Akzeptanz durch PigC ist. Das Fehlen dieses Restes oder eine Expansion der Alkylkettenlänge führte zu einer drastischen Senkung der Konversion. Die Alkylkettenlänge in 3-Position wurde mit einer Spannweite von Methyl bis Decanoyl akzeptiert. Überdies konnte der Einbau der vier zyklischen Alkylpyrrole, von Cyclopentan bis Cyclooctan, beobachtet werden; die Evaluation der Akzeptanzgrenze steht hierbei noch aus. Die Ausgangslage für eine weiterführende Funktionalisierung nach Einbau neuartiger Mutasyntnone wurde durch die Akzeptanz der zwei terminalen Alkenylpyrrole **13t** und **13u** erreicht und in einer späteren Semisynthese nochmals aufgegriffen. Exemplarisch wurde die Mutasyntnese für die vier Mutasyntnone **13a**, **13d**, **13g** und **13u** im präparativen Maßstab durchgeführt und die Möglichkeit des Einsatzes des PU-Schaums in der Mutasyntnese bestätigt.

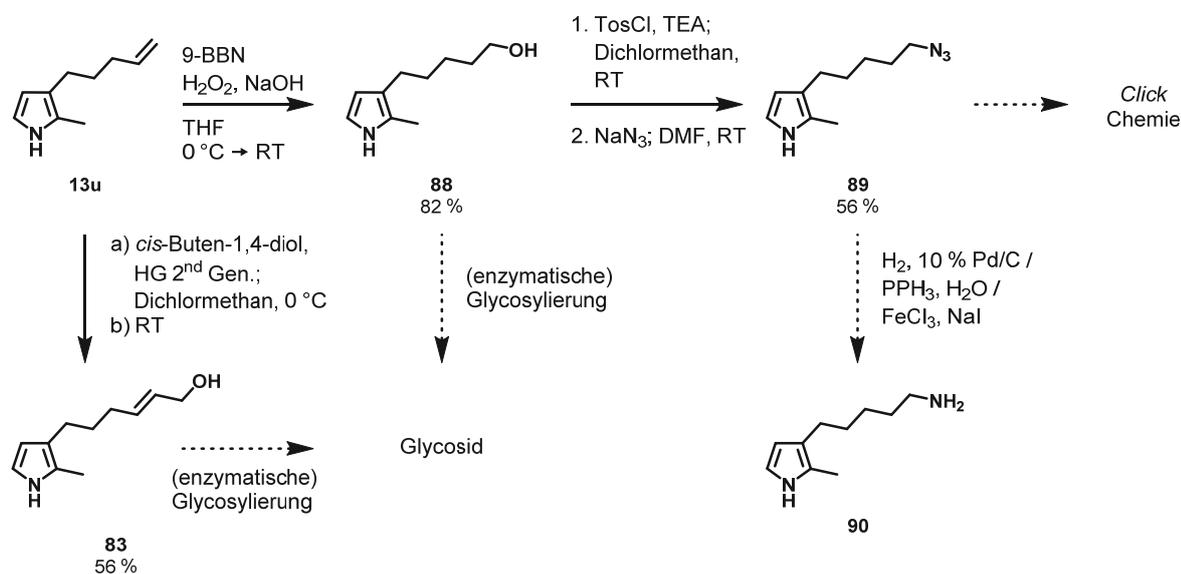
Tabelle 16: Übersicht der Mutasyntnesen der akzeptierten Mutasyntnone. [anal. – analytischer; präp – präparativer]



#	Monopyrrol	R ¹	R ²	Prodiginin	Mutasyntnese im		Neuartiges Prodiginin
					anal. Maßstab	präp. Maßstab	
1	13c	Methyl	Methyl	1c	x		x
2	13d	Methyl	<i>n</i> -Propyl	1d	x	x	– [309]
3	13e	Methyl	<i>n</i> -Butyl	1e	x		– [309]
4	13a	Methyl	<i>n</i> -Pentyl	1a	x	x	– [309]
5	13f	Methyl	<i>n</i> -Hexyl	1f	x		– [309]
6	13g	Methyl	<i>n</i> -Octyl	1g	x	x	– [309]
7	13h	Methyl	<i>n</i> -Decyl	1h	x		x
8	13j	Ethyl	<i>n</i> -Pentyl	1j	x		x
9	13k	<i>n</i> -Butyl	<i>n</i> -Propyl	1k	x		x
10	13p	H	<i>n</i> -Pentyl	1p	x		x
11	13q	H	<i>n</i> -Hexyl	1q	x		x
12	13r	H	<i>n</i> -Octyl	1r	x		x
13	13t	Methyl	2-Propenyl	1t	x		x
14	13u	Methyl	4-Pentenyl	1u	x	x	x
15	77a		Cyclopentyl	75a	x		x
16	77b		Cyclohexyl	75b	x	x (D.K.) ^[a]	– ^[63]
17	77c		Cycloheptyl	75c	x	x (D.K.) ^[a]	x
18	77d		Cyclooctyl	75d	x	x (D.K.) ^[a]	x

^[a] Mutasyntnese im präparativen Maßstab von M.Sc. *David Paul Klebl* in seiner Masterarbeit durchgeführt.

Bis auf die Alkenylpyrrole ließ kein anderer Mutasynton den Zugang für eine weitere Derivatisierung zu. Da für eine zukünftige Mutasyntese die Adressierbarkeit für Folgechemie erreicht werden sollte, kann ausgehend von dem Mutasynton **13u** durch wenige Gruppenumwandlungen eine Vielzahl von möglichen Kopplungsreaktionen angesprochen werden (Schema 30). Die chemische Umwandlung kann dabei sowohl vor der Mutasyntese am Mutasynton selbst oder nach erfolgter Umwandlung am Prodiginin erfolgen. Neben der Möglichkeit einer Kreuzkupplung zum Mutasynton **83** konnte M.Sc. *David Paul Klebl* in seiner Masterarbeit weitere Funktionalisierungen ausgehend von Mutasynton **13u** aufzeigen.^[6] Nach einer adaptierten Vorschrift von *Aldrich* konnte durch eine Hydroborierung des Olefins mit anschließender Oxidation durch Wasserstoffperoxid (*Brown* Hydroborierung) der *anti*-Markovnikov Alkohol **88** erhalten werden.^[174, 310, 311] Die zwei Hydroxypyrrrole **83** und **88** könnten anschließend durch Glycosynthasen oder Glycosyltransferasen glycosyliert werden, wodurch nicht nur eine Steigerung der Wasserlöslichkeit, sondern durchaus auch die Erkennung von physiologischen Zielstrukturen verbessert werden kann.^[312] M.Sc. *David Paul Klebl* gelang anschließend die Konversion der Hydroxygruppe zum Azid **89** nach einer Vorschrift von *Marchal et al.* und eröffnete dadurch den Zugang zur *Click* Chemie.^[6, 313] Das Azid ließe sich wiederum durch eine Palladium-katalysierte Hydrierung, den Einsatz der *Staudinger* Reaktion mit anschließender wässriger Hydrolyse oder milder Reduktion mit einer Lewisäure und NaI in ein primäres Amin **90** überführen.^[314-317]



Schema 30: Geplante Funktionelle Gruppenkonversionen und Kopplungsreaktionen für Präkursoren und Prodiginine.

***In vitro* Biotransformation zur Verifizierung des PigC Substratspektrums**

Das Substratspektrum von PigC wurde erneut durch *in vitro* Biotransformationen mit heterolog exprimierten PigC verifiziert, da die Bestimmung der unterschiedlichen Akzeptanz der exogen supplementierten Präkursoren in der Mutasyntese durchaus einem selektiven Import unterliegen konnte. PigC wurde durch heterologe Expression in *E. coli* BL21(DE3) als membranständiges Protein produziert und zeigte in den *in vitro* Biotransformationen mit den entsprechenden Präkursoren und dem Dipyrrrol MBC (12) ein identisches Substratspektrum im Vergleich zur Mutasyntese (Abbildung 58). Daher konnte eine geminderte Akzeptanz durch einen limitierten Import ausgeschlossen werden. Erste enzymkinetische Untersuchungen von PigC ließen zudem die Erkenntnis über eine Substratüberschussinhibierung in Abhängigkeit der molekularen Struktur der Präkursoren zu.

Die Exklusivität des Substratspektrums von PigC – insbesondere der Selektivität bezüglich der Methylgruppe in 2-Position und einer Substratüberschussinhibierung – lässt jedoch Raum für weitere Investigationen. Weder von PigC noch einem anderen Kondensationsenzym der Prodiginine ist eine Proteinstruktur bekannt, sodass keine Annahmen des Zusammenhangs zwischen Struktur des aktiven Zentrums und des Substrates durch *in silico* Beziehungsanalysen vorliegen. Zwar besteht PigC und auch dessen Homolog RedH aus *S. coelicolor* A3(2) aus den zwei bekannten Domänen (einer ATP-bindenden Domäne, welche homolog zur Domäne aus einer Phosphoenolpyruvatsynthase ist und einer Phosphotransfer-Domäne, welche homolog zu einer Pyruvat-Phosphat-Dikinase ist), aus denen sich Homologiemodelle ableiten lassen, doch ist die Substratspezifität wahrscheinlich durch eine mittlere, strukturell noch unbekannte Domäne festgelegt. Eine Strukturaufklärung von PigC würde daher nicht nur Rückschlüsse der Funktion und Selektivität von PigC zulassen, sondern durchaus auch Hinweise für die homologen Kondensationsenzyme geben. Da PigC vermutlich nur membranassoziiert ist, und nicht als Transmembranprotein vorliegt, gilt zumindest für einen kristallographischen Ansatz zuvor eine Ablösung von der Membran durch Salze oder Detergenzien als nächstliegendes Ziel.^[318] Überdies wäre für Membranproteine (≥ 200 kDa) auch die Kryo-Elektronenmikroskopie eine prädestinierte Methode zur Aufklärung von Sekundärstrukturelementen und weniger hochaufgelösten Teildomänen.^[319, 320] Da Merk *et al.* 2016 die erste Strukturaufklärung einer Isocitrat-Dehydrogenase mit einem Molekulargewicht von 93 kDa mittels Kryo-Elektronenmikroskopie gelang, wäre diese Methode möglicherweise ebenfalls für die Kondensationsenzyme mit einem Molekulargewicht von ca. 100 kDa anwendbar.^[321] Hinsichtlich der natürlichen Limitierung der Chemoselektivität von PigC eignen sich die Methoden des rationalen Proteindesigns und der gerichteten Evolution (engl. *directed evolution*) zur Erstellung von neuen Mutanten des Kondensationsenzym.^[322-325] In diesen Untersuchungen sollte das Augenmerk auf die unnatürliche Derivate gesetzt werden, welche in der Mutasyntese und der Biokatalyse nicht oder nur bedingt umgesetzt wurden. Dabei kann beispielsweise eine Optimierung gegenüber kürzerer oder längerer Ketten in der 2- und 3-Position der Pyrrole oder gar die Akzeptanz von schwierig adressierbaren Heterozyklen wie der Indole durchgeführt werden.

Für die Erweiterung des Substratspektrums in der Mutasyntese und Biokatalyse lohnt sich zudem ein Proteinsequenzabgleich (engl. *protein/sequence alignment*) von PigC mit Sequenzdatenbanken zum Auffinden von noch nicht charakterisierten Enzymen. Die Durchführung eines *Alignments* mit der Datenbank des *National Center for Biotechnology Information (NCBI; Bethesda, MD, USA)* mittels des

BLAST-Algorithmus⁴² ergab zahlreiche homologe Proteine. Eine Auswahl wurde einem multiplen *Alignment* durch das Online-Programms *COBALT* (*Constraint based Multiple Alignment Tool*)^{43[326]} unterzogen und ein phylogenetischer Baum erstellt (Abbildung 60). Dabei zeigten sich drei *Cluster* mit untereinander verwandten Enzymen; neben den Kondensationsenzymen, welche MAP (13a) und 2-UP (14) als natürliche Substrate verwenden, zeigte sich eine dritte Familie mit den marinen *Gammaproteobacteria* *Pseudoalteromonas tunicata* und *Pseudoalteromonas citrea*, welche primäre (aliphatische) Amine als Substrat für die Kondensation mit MBC (12) verwenden und Prodiginin-verwandte, gelbe Tambjamine produzieren.^[90, 173, 327, 328] Eine Ergänzung des bestehenden Biosyntheseclusters der Mutasyntese durch Enzyme wie RedH oder McpH aus den *Actinomyceten* oder TamQ aus *Pseudoalteromonas tunicata* könnte daher das bisherige Substratspektrum durch die Akzeptanz von strukturell komplementären Pyrrolen und neuartigen Substraten erweitern.

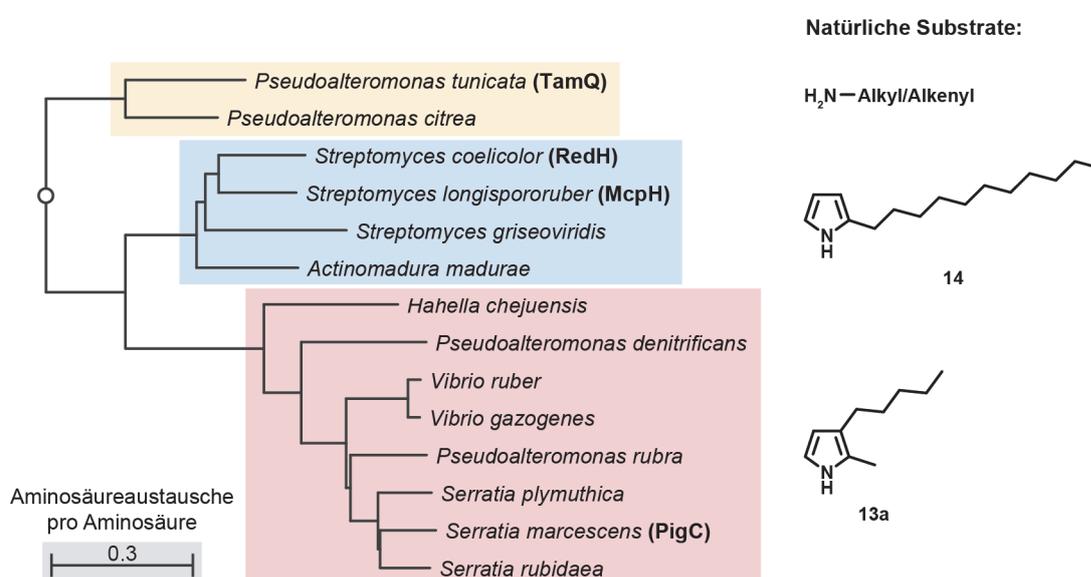


Abbildung 60: Phylogenetischer Baum der Kondensationsenzym-Familie und ihre natürlichen Substrate. Das Protein *Alignment* wurde mit *COBALT* mit den RPS BLAST, BLASTP und PHI-BLAST Algorithmen durchgeführt. [gelb – Tambjamin-Kondensationsenzyme; blau – 2-UP (14) spezifische Kondensationsenzyme; rot – MAP (13a) spezifische Kondensationsenzyme]

Weiterführend bieten computergestützte Untersuchungen von Metagenombibliotheken den direkten Zugang zu einer möglichen Vielfalt von Kondensationsenzymen, selbst wenn die dazugehörigen Organismen nicht im mikrobiologischen Labor kultivierbar sind.^[155, 329-331] Für diese Art von Untersuchungen sind insbesondere Algorithmen, welche auf dem *Hidden Markov Model* basieren, geeignet. Als Grundlage und Trainingsdatensätze dienen dabei die Sequenzen und das Wissen über die einzelnen Domänen der bereits bekannten Kondensationsenzyme.^[332]

⁴² August 2017: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>

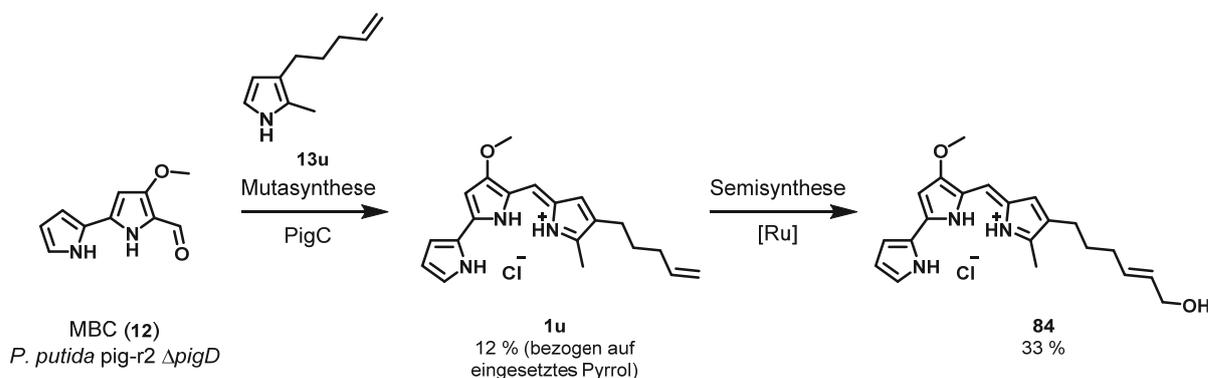
⁴³ August 2017: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/cobalt/re_cobalt.cgi

Semisynthese als ergänzender Zugang zu Prodigininen

Unter dem Begriff der Semisynthese kann sowohl die chemische Umsetzung eines akkumulierten Intermediats der Biosynthese (Abbildung 58, Semisynthese I) als auch die chemische Transformation eines biosynthetisch produzierten Naturstoffes (Abbildung 58, Semisynthese II) verstanden werden. Beide Möglichkeiten wurden für die Adressierung neuer Prodigininderivate durchgeführt.

Es konnte gezeigt werden, dass der MAP (**13a**)-defiziente *P. putida* pig-r2 Δ pigD Stamm nicht nur in der Mutasynthese eingesetzt werden konnte, sondern auch die Möglichkeit der Extraktion des gebildeten Intermediats MBC (**12**) bestand. Dieser Baustein wurde anschließend in der erprobten chemischen Kondensation mit dem Pyrrolpräkursor **13m** zum Prodiginin **1m** umgesetzt, welches weder über Mutasynthese noch Biokatalyse adressierbar war. Allerdings war die Verfügbarkeit des MBC (**12**) nur in analytischen Mengen gegeben, da das Intermediat wahrscheinlich während der Fermentation durch das Kondensationsenzym PigC mit Zellmetaboliten umgesetzt wurde. Weil MBC (**12**) zusätzlich eine sehr geringe Löslichkeit in vielen getesteten organischen Lösungsmitteln aufwies, sollte für eine effektive Bereitstellung des Intermediats durch *P. putida* KT2440 neben der Konstruktion einer obligaten Δ pigC Δ pigD Doppelmutante auch eine Optimierung hinsichtlich der Extraktion durchgeführt werden.

Die chemische Transformation eines biosynthetisch produzierten Prodiginins wurde auf der Basis der Funktionalisierung des Alkenylpyrrols **13u** durchgeführt. In einem konsekutiven Muta- und Semisynthese wurde zunächst das Prodiginin **1u** gewonnenen und dieses anschließend zum hydroxylierten Prodiginin **84** umgesetzt (Schema 31). Alternativen hierzu bieten die in Schema 30 dargestellten Bausteine, welche weiterführende Kopplungsreaktionen ermöglichen.



Schema 31: Konsekutive Muta- und Semisynthese durch Kreuzmetathese unter Verwendung der zuvor eingeführten Vinylfunktion.

Bioaktivität von Prodigiosin (1a) und Derivaten

Im Zusammenhang der Bioaktivität der Prodiginine wurde sowohl die antibakterielle Wirkung gegenüber gramnegativen Bakterien [*E. coli* BL21(DE3), *P. putida* KT2440, *S. aureus*] und grampositiven Bakterien (*B. subtilis* 168, *C. glutamicum*) als auch die Modulation der Autophagie in humanen Brustkrebszellen (MCF-7) untersucht. Die physiologischen Tests zur Autophagie wurden von Dr. Luca Laraia und Dr. Sonja Sievers am Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie in Dortmund in der Abteilung für Chemische Biologie und am Compound Management and Screening Center (COMAS) durchgeführt.

In den antibakteriellen Untersuchungen konnte zunächst festgehalten werden, dass die biosynthetischen Intermediate MAP (13a) und MBC (12) bis zu der evaluierten Konzentration von 300 μM keinen toxischen Einfluss auf das Zellwachstum von *P. putida* KT2440 und *E. coli* BL21 aufwiesen, wodurch der evolutive Vorteil einer konvergente Biosynthese eines bioaktiven Moleküls hervorgehoben wurde. Die Untersuchungen mit den Prodigininen 1a, 1d, 1g, 1k und 1u zeigten einen allgemeinen Trend, dass grampositive Bakterien deutlich sensibler gegenüber einer Zugabe von Prodigininen reagieren. Alle getesteten Prodiginine hatten eine stark wachstumshemmende Wirkung auf die grampositive Bakterien, wogegen gramnegative Bakterien mindestens 10-fach höhere Konzentrationen tolerierten oder gar nicht beeinflusst wurden. *C. glutamicum* wies für alle Prodiginine bei Konzentrationen ≥ 100 nM kein Wachstum mehr auf, für *B. subtilis* 168 konnten IC_{50} -Werte zwischen 240–500 nM gemessen werden wohingegen die IC_{50} -Werte für *E. coli* BL21(DE3) mit 3–23 μM deutlich höher waren und für *P. putida* KT2440 im gemessenen Konzentrationsbereich bis 60 μM überhaupt keine Inhibition des Wachstums festgehalten werden konnte. Dieses Ergebnis bestätigte ebenfalls die Wahl von *P. putida* KT2440 als Produktionsstamm für toxische Sekundärmetabolite. Hinsichtlich einer Struktur-Wirkungs-Beziehung konnte für *E. coli* BL21(DE3) festgehalten werden, dass eine Abnahme der Lipophilie durch Verkürzung der Alkylkettenlänge in 3-Position mit einer Verstärkung der Wachstumshemmung verbunden war. Besonders Prodiginin 1d, welches gegenüber dem natürlichen Prodigiosin (1a) eine kürzere Alkylkette in 3-Position aufweist, zeigte die stärkste Inhibition des Wachstums.

Ebendieser Trend konnte auch für die Modulation der Autophagie bei MCF-7 Brustkrebszellen nachgewiesen werden. Für die Akkumulation der Autophagosomen und somit der Inhibition der Autophagie selbst zeigte Prodiginin 1d in Fluoreszenzbild-basierten Untersuchungen mit einem EC_{50} -Wert von 150 nM das höchste Potential aller getesteten Prodiginine und war damit auch wirksamer als das in den klinischen Testphasen untersuchte Obatoclox (15)-Mesylat mit 350 nM. Diese Ergebnisse wurden auf Proteinebene durch Western Blots verifiziert und Prodiginin 1d zeigte hier eine stärkere Inhibition der Fusion aus Autophagosomen und Lysosomen als der bekannte Fusionsinhibitor Chloroquin (85). Weitere Tests mit humanen MCF-7 Zellen zeigten, analog zur bakteriellen Wachstumshemmung, eine konzentrationsabhängige Inhibition des Wachstums und einen apoptotischen Effekt mit 50 % apoptotische Zellen bei 0.33 μM .

Die vielversprechenden Ergebnisse des Prodiginins 1d im Vergleich zu den anderen getesteten Prodigininen zeigt eine klare Struktur-Wirkungs-Beziehung bezüglich des Alkylierungsmusters. Für eine

genauere Untersuchung dieses Einflusses und für die Eingrenzung der potentiell wirksamsten Struktur ist die Adressierung teilweise neuer Prodiginine und die Einbeziehung der bestehenden Analoga (Abbildung 61) der nächste Schritt in dieser Untersuchungsreihe.

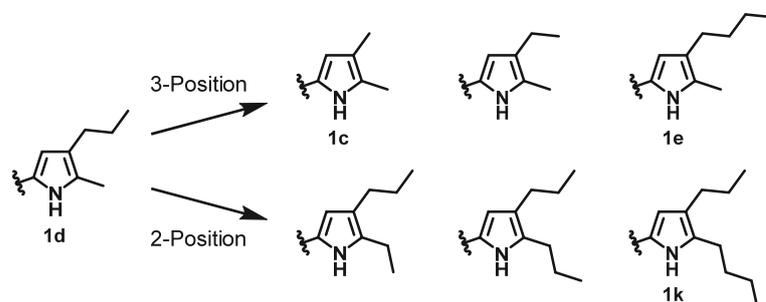


Abbildung 61: Strukturell nah verwandte Analoga von Prodiginin **1d** für die tiefergehende Untersuchung der Struktur-Wirkungs-Beziehung. Für eine Vereinfachte Darstellung wird der MBC (**12**) Molekülteil nicht dargestellt; es wird lediglich der C-Ring gezeigt.

Versuche zur Zyklisierung von Undecylprodigiosin (**3**) durch RedG

Die Zyklisierung stellt für zahlreiche Prodiginine einen essentiellen Schritt in der Biosynthese dar. Für die Zyklisierung des Undecylprodigiosins (**3**) zu Butyl-*meta*-cycloheptylprodigiosin (**4**) durch die Oxygenase RedG aus *S. coelicolor* A3(2) wurde zunächst die Analytik dieser Reaktion durch Extraktion und Synthese der entsprechenden Prodiginine entwickelt. Zwar wurden die Naturstoffreferenzen aus *S. coelicolor* A3(2) extrahiert, jedoch wurde das *redG*-Gen wegen der differierenden *Codon Usage* zu dem Expressionswirt *E. coli* BL21(DE3) nicht aus dem Genom amplifiziert sondern zuvor *Codon*-harmonisiert. Eine lösliche Expression des Gens war dennoch erst nach Fusion mit dem Maltosebindeprotein MalE aus *E. coli* möglich. Ebenfalls konnten durch Literaturrecherche und Sequenzabgleiche auf genomischer und proteingener Ebene die Gesamtheit aller Ferredoxine und Ferredoxinreduktasen im Genom von *S. coelicolor* A3(2) identifiziert werden, welche vermutlich als putative Elektronentransportkette für die Oxygenase fungieren. Zwar war die Expression aller Gene möglich und es wurde auch ein Assay mit der Zyklastase und sämtlicher Permutationen des Elektronentransportsystems durchgeführt, dennoch konnte nach guter wissenschaftlicher Praxis für keine Kombination eine eindeutige Aussage getroffen werden. Zu mögliche Optimierungen und nachfolgenden Arbeiten wie der Anpassung der Analytik, der Durchführung des Assays unter den Gesichtspunkten der *Codon* Optimierung, Expression der Gene, Reinigung der Enzyme und expliziten Assaybedingungen wird im Ergebnis und Diskussionsteil dieser Arbeit hinreichend eingegangen (*vide supra* 3.7.3). Zusätzlich können bei genauerer Betrachtung der bisher publizierten Ergebnisse durch *Challis et al.* vermutlich Rückschlüsse auf die entsprechenden Elektronentransportpartner gezogen werden.^[57, 131, 132, 134] Da *Challis et al.* im analytischen Maßstab zeigen konnten, dass die Zyklisierung durch die heterologe Expression von *redG* in *S. albus* und *S. venezuelae* nachweisbar sind, müssen daher ähnliche Elektronentransportpartner in diesen zu *S. coelicolor* A3(2) nah verwandten Organismen vorkommen. Ein *Alignment* auf Proteinebene kann hierbei in einer hohen Wahrscheinlichkeit drei Ferredoxine ausschließen, da sie entweder keine Homologe in *S. albus*

vorweisen können oder lediglich in einer Untereinheit eines anderen Proteins mit einer schlechten Abdeckung und Identität vorkommen (Tabelle 17).

Tabelle 17: Sequenzvergleich der Ferredoxine und Ferredoxinreduktasen aus *S. coelicolor* A3(2) mit *S. venezuelae* und *S. albus*. Hierfür wurden überwiegend auf die Genome von *Challis et al.* verwendeten Organismen *S. venezuelae* ATCC10712 und *S. albus* J1074 zurückgegriffen.

Name	Aminosäuren	kDa	Protein	Homolog <i>S. venezuelae</i> ^[a]	Abdeckung/Identität%	Homolog <i>S. albus</i> ^[a]	Abdeckung/Identität%
Fdx75	66	6.7	NP_625075.1	WP_015037318	93/52	–	–
Fdx24	101	10.8	NP_625924.1	WP_015032446.1	100/83	EFE80326.1	89/87
Fdx54	70	7.3	NP_628054.1	WP_015037318.1	85/40	EFE80326.1	90/30
Fdx71	129	14.4	NP_631171	WP_015038220.1	57/46	EFE81850.1 ^[b]	34/31
Fdx15	73	7.4	NP_631715.1	WP_015037318.1	82/53	–	–
Fdx84	106	11.9	NP_629284	WP_015035968	99/97	AGI88059.1	100/98
Fnr89	454	49.8	NP_624989	WP_015033508.1	100/84	WP_015507395.1	98/37
Fnr64	407	42.2	NP_626364	WP_015032970.1	99/75	EFE80723.1	99/73
Fnr11	421	42.2	NP_626711	WP_015033461.1	100/79	AGI90801.1	99/79
Fnr78	420	45.2	NP_631178	WP_015033461.1	96/53	AGI90801.1	96/53

^[a]entspricht der *NCBI Reference Sequence*^{44[308]}

^[b]Untereinheit einer NADH-Quinon Oxidoreduktase

Für zukünftige Untersuchungen der Zyklase RedG kann für die Ferredoxinreduktasen durch die *Alignments* mit *S. albus* und *S. venezuelae* allerdings keine ähnliche Exklusion ausgesprochen werden. Hier bietet sich eine weitere Eingrenzung durch computergestützte Genom *Alignments* weiterer Organismen an, welche ebenfalls zyklische Prodiginine wie *Metacycloprodigiosin* (5, Streptorubin A), *Prodigiosin R1* (6) und *Cycloprodigiosin* (7) produzieren. Alternativ kann die Bereitstellung der Elektronen auch durch den Ersatz der Elektronentransportkette durch die Ausweichung auf bekannte Transportsysteme verschiedener Eisen-Schwefel-*Cluster* Oxidasen oder die Verwendung von Bioelektrokatalyse ermöglicht werden.^[333-335]

⁴⁴ April 2014: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein>

5 Materialien

5.1 Geräte

Die in Tabelle 18 aufgeführten Geräte sind solche der regelmäßigen Verwendung im Labor. Spezielle Geräte werden in den entsprechenden Methodenteilen beschrieben. Die für die Arbeit verwendete Software wird gesondert in Tabelle 19 beschrieben.

Tabelle 18: Geräte des regelmäßigen Gebrauchs.

Gerät	Hersteller
Pipetten	
<i>Eppendorf Research</i> , Pipette 0.1–2.5 µL	<i>Eppendorf</i> AG, Hamburg, Deutschland
<i>Eppendorf Research</i> , Pipette 1–10 µL	<i>Eppendorf</i> AG, Hamburg, Deutschland
<i>Eppendorf Research</i> , Pipette 10–100 µL	<i>Eppendorf</i> AG, Hamburg, Deutschland
<i>Gilson Pipetman</i> , Pipette 0.5–5 mL	<i>Gilson</i> , Middleton, WI, USA
Schüttler	
<i>BioCote Stuart rotator SB2</i> , Rotorschüttler in 37°C Konstantraum für Kulturröhrchen	<i>BioCote</i> Ltd, Wolverhampton, UK
<i>Edmund Bühler TiMix</i> , Schüttler mit Inkubationshaube für Reaktionsplatten	<i>Edmund Bühler</i> GmbH, Hechingen, Deutschland
<i>Eppendorf MixMate PCB-11</i> , Schüttelblock für Reaktionsplatten	<i>Eppendorf</i> AG, Hamburg, Deutschland
<i>Eppendorf Thermomixer compact</i> , beheizter Schüttelblock für 1.5–2 mL Reaktionsgefäße	<i>Eppendorf</i> AG, Hamburg, Deutschland
<i>Heidolph Unimax 1010</i> , Plattformschüttler für Flüssigkulturen; mit <i>Heidolph Inkubator 1000</i> , Inkubationshaube	<i>Heidolph Instruments</i> GmbH & Co.KG, Schwabach, Deutschland
Hettich Beleux MKR23, beheizter/gekühlter Schüttelblock für 1.5–50 mL Reaktionsgefäße	<i>Hettich Benelux</i> B.V., Geldermalsen, Niederlande
<i>Infors HT Multitron Standard</i> , beheizbare/kühlbarer Schüttelinkubator für Flüssigkulturen	<i>Infors HT</i> , Bottmingen, Schweiz
VKS-75 control, Plattformschüttler in 37°C Konstantraum für Flüssigkulturen	<i>Edmund Bühler</i> GmbH, Hechingen, Deutschland
Zentrifugen	
<i>Beckman Coulter Optima L-80 XP</i> , Ultrazentrifuge	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
<i>Beckman Coulter Type 50.2 Ti Rotor</i> , Festwinkelzentrifugationsrotor	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
<i>Eppendorf Centrifuge 5424R</i> , gekühlte Zentrifuge mit Festwinkelrotor für Reaktionsgefäße (1.5 + 2 mL)	<i>Eppendorf</i> AG, Hamburg, Deutschland
<i>Eppendorf Centrifuge 5810R</i> , gekühlte Zentrifuge mit Festwinkelrotor für Reaktionsgefäße (15 + 50 mL)	<i>Eppendorf</i> AG, Hamburg, Deutschland
<i>Eppendorf Concentrator 5301</i> , Vakuumzentrifuge	<i>Eppendorf</i> AG, Hamburg, Deutschland

Gerät	Hersteller
Zentrifugen	
<i>Sorvall F10S-4x1000</i> , Festwinkelzentrifugationsrotor	<i>Thermo Fisher Scientific</i> , Waltham, MA, USA
<i>Sorvall F9S</i> , Festwinkelzentrifugationsrotor	<i>Thermo Fisher Scientific</i> , Waltham, MA, USA
<i>Sorvall RC6+</i> , gekühlte Standkühlzentrifuge	<i>Thermo Fisher Scientific</i> , Waltham, MA, USA
Waagen	
<i>Sartorius 2004MP</i> , Ultrafeinwaage	<i>Sartorius AG</i> , Göttingen, Deutschland
<i>Sartorius LA1200S</i> , Feinwaage	<i>Sartorius AG</i> , Göttingen, Deutschland
<i>Sartorius MC1</i> , Laborwaage	<i>Sartorius AG</i> , Göttingen, Deutschland
Sonstiges	
<i>Bandelin Sonorex RK 100 H</i> , Ultraschallbad	<i>Bandelin electronic GmbH & Co. KG</i> , Berlin, Deutschland
<i>Biometra TProfessional Basic Gradient</i> , PCR-Cycler	<i>Analytik Jena AG</i> , Jena, Deutschland
<i>Bio-Rad Mini Protean Tetra System</i> , vertikales Gel-elektrophoresesystem	<i>Bio-Rad Laboratories GmbH</i> , München, Deutschland
<i>Büchi Rotavapor R-205</i> , Rotationsverdampfer	<i>Büchi Labortechnik GmbH</i> , Essen, Deutschland
<i>Camag UV Cabinet 4</i> , UV Kammer für Chromatographie	<i>Camag</i> , Muttenz, Schweiz
<i>Canon EOS 1000D</i> , Digitale Spiegelreflexkamera	<i>Canon Deutschland GmbH</i> , Krefeld, Deutschland
<i>CEM Discover Labmate</i> , Synthesemikrowelle	<i>CEM GmbH</i> , Kamp-Lintfort, Deutschland
<i>Heidolph MR 3001 K</i> , Magnetrührer mit Heizplatte; kombiniert mit <i>EKT HeiCon</i> , Kontaktthermometer	<i>Heidolph Instruments GmbH & Co.KG</i> , Schwabach, Deutschland
<i>INTAS GeliX Imager</i> , Geldokumentationssystem	<i>INTAS Science Imaging Instruments GmbH</i> , Göttingen, Deutschland
<i>Invitrogen Novex MiniCell</i> , vertikales Gelektrophoresesystem für Invitrogen precast SDS-PAGE-gels	<i>Invitrogen GmbH</i> , Darmstadt, Deutschland
<i>Jouan Innovens 234 EU1</i> , Heizschrank für Laborglas	<i>Thermo Fisher Scientific</i> , Waltham, MA, USA
<i>kdScientific Legato™ 100</i> , Spritzenpumpe	<i>kdScientific Inc.</i> , Holliston, MA, USA
<i>Labor-pH-Meter 766 Calimatic</i> , pH-Meter	<i>Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. KG</i> , Berlin, Deutschland
<i>m2p-labs BioLector Pro</i> , Bioreaktor	<i>m2p-labs GmbH</i> , Baesweiler, Deutschland
<i>Nano Drop 2000c</i> , Kleinvolumenphotometer	<i>Thermo Fisher Scientific</i> , Waltham, MA, USA
<i>Nordantec IJ44</i> , pH-Elektrode	<i>Nordantec GmbH</i> , Bremerhaven, Deutschland
<i>Shimadzu UV-1800</i> , kühlbares/beheizbares Spektrophotometer (CPS-240A)	<i>Shimadzu</i> , Duisburg, Deutschland
<i>Sonopuls</i> , Ultraschall Zeldisruptor mit diversen Horngrößen (1.5–50 mL)	<i>Bandelin electronic GmbH & Co. KG</i> , Berlin, Deutschland
<i>Steinel HG3002LCD Typ 3458</i> , Heißluftgebläse für 50-650 °C	<i>Steinel Vertrieb GmbH</i> , Herzebrock-Clarholz, Deutschland
<i>Vacuubrand MD 4C</i> , Vakuum Membranpumpe	<i>Vacuubrand GmbH & Co. KG</i> , Wertheim, Deutschland
<i>Vacuubrand RZ 6</i> , Vakuum Drehschieberpumpe	<i>Vacuubrand GmbH & Co. KG</i> , Wertheim, Deutschland
<i>Zirbus VaCo2</i> , Lyophilisator	<i>Zirbus Technology GmbH</i> , Bad Grund, Deutschland

5.2 Software

Tabelle 19: Software des regelmäßigen Gebrauchs.

Name	Verwendung	Hersteller
Adobe Illustrator CS5.1	Konstruktion von Vektorgrafiken	Adobe Systems
Adobe Photoshop CS5.1	Konstruktion von Abbildungen	Adobe Systems
ChemBioDraw Ultra 12.0 & 16.0	Zeichnen von Strukturformeln	PerkinElmer Informatics
Clone Manager 9.4 Professional	Planung von Klonierungsstrategien/ Überprüfung von Sequenzierungen	Scientific & Educational Software
ensochemLab 7.0.5	Elektronisches Laborjournal	enso Software GmbH
MestReNova 8.0.1-10878	Prozessierung und Auswertung von NMR Daten	Mestrelab Research S.L.
Microsoft Excel 2010	Verarbeitung einfacher Datensätze	Microsoft Corp.
Microsoft PowerPoint 2010	Erstellung von Präsentationen	Microsoft Corp.
Microsoft Word 2010	Verarbeitung von Textdateien	Microsoft Corp.
OriginPro 9.0G	Statistische Auswertungen/lineare und nicht-lineare Regressionen	OriginLab Corp.

5.3 Verbrauchsmaterialien

Pipettenspitzen für Luftpolsterpipetten von 0.1–1 000 μL und Semimikroküvetten (PS), 1.5 mL, 2 mL, 15 mL und 50 mL Reaktionsgefäße, Petrischalen (92 x 16 mm) wurden von *neoLab Migge GmbH* (Heidelberg, Deutschland) bezogen.

Sterile Spritzenvorsatzfilter mit Celluloseacetatmembran und Spritzenvorsatzfilter mit regenerierter Cellulose (*Startorius Minisart RC4*, 0.45 μm) wurde von *VWR International GmbH* (Darmstadt, Deutschland) erworben. Dünnschichtchromatographie Platten mit Kieselgel 60 [Polygram[®] SIL G/UV254; spezifische Oberfläche (BET) \approx 500 m^2/g , mittlere Porenweite 60 \AA , spezifisches Porenvolumen 0.75 mL/g , Partikelgröße 5–17 μm] wurden von *Macherey-Nagel* (Düren, Deutschland) erworben. Kieselgel 60 (Partikelgröße 40–63 μm) für die präparative Säulenchromatographie wurde von *Macherey-Nagel* (Düren, Deutschland) erworben. Einwegspritzen (*Injekt[®]*; Zylinder aus Polypropylen, Kolben aus Polyethylen) wurden von *B. Braun Melsungen AG* (Melsungen, Deutschland) erworben. Mikrotiterplatten (*Nunclon[®]*; Polystyrol, flacher Boden) wurden von *Nunc[™] Thermo Fisher Scientific* (Waltham, MA, USA) und *Deep-Well* Platten (Polypropylen, Lösungsmittelresistent, konischer Boden) wurden von *Eppendorf AG* (Hamburg, Deutschland) erworben.

5.4 Chemikalien

Die in der Arbeit verwendeten Chemikalien wurden von *Carl Roth GmbH & Co KG* (Karlsruhe, Deutschland), *Sigma-Aldrich/Fluka* (Steinheim, Deutschland), *Fermentas GmbH* (St. Leon-Rot, Deutschland), *TCI Europe* (Zwijndrecht, Belgien), *Alfa Aesar* (Karlsruhe, Deutschland) und *VWR International* (Radnor, PA, USA) erworben oder stammen aus Schenkungen.

5.5 Enzyme

T4-Ligase, Restriktionsendonukleasen, alkalischen Phosphatase (FastAP, 1 U/μL) und dNTPs (jeweils 10 mM) wurden bei *Fermentas* GmbH (St. Leon-Rot, Deutschland) erworben. *Phire*TM Hot Start II Polymerase, T5-Exonuklease (10 000 U/mL) und *Taq* DNA Ligase (40 000 U/mL) wurden bei *New England BioLabs* GmbH (Frankfurt a. Main, Deutschland) erworben. Die *Phusion*TM Hot Start II Polymerase (2 U/μL) wurde von *Thermo Fisher Scientific*, (Waltham, MA, USA) und die Proteinase K (> 600 mAU/mL) von *QIAGEN* GmbH (Hilden, Deutschland) erworben.

5.6 Fertigkits

Folgende Fertigkits wurden für gentechnische Arbeiten bezogen:

Plasmid isolation: innuPREP Plasmid Mini Kit, *Analytik Jena AG Life Science* (Jena, Deutschland)

Gelelution: QIAQuik[®] Gel Extraction Kit, *QIAGEN* GmbH (Hilden, Deutschland)

Kolonie PCR: REDTaq[®] ReadyMixTM, *Sigma-Aldrich* (Steinheim, Deutschland)

5.7 Oligonukleotide und synthetische Gene

Oligonukleotide wurden als entsalztes Lyophilisat von *Sigma-Aldrich* (Steinheim, Deutschland) bezogen. Synthetische Gene wurden als *blunt-end* klonierte Konstrukte im pUC57-Vektor von *GenScript USA Inc.* (Piscataway, NJ, USA) erstellt.

5.8 Verwendete Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 20 hinterlegt.

Tabelle 20: Liste der Oligonukleotide dieser Arbeit. Die Sequenzen der Oligonukleotide sind jeweils in 5'→3' Orientierung angegeben. Die zusätzlichen Namensattribute fw (engl. *forward*) und rv (engl. *reverse*) beschreiben jeweils die Orientierung der Anlagerung der Oligonukleotide an den *sense*- bzw. den *antisense*-Strang. Überdies ist vermerkt, für welche Klonierungsmethode die entsprechenden Oligonukleotide eingesetzt wurden. [a – Analyse PCR; ga – *Gibson Assembly*[®]; MW – MEGAWHOP. Unterstrichen ist jeweils der Teil des Oligonukleotids, welcher mit dem Zielgen überlagert und ggf. zu diesem etwas anfügt.]

#	Name	Sequenz (5'→3')	Methode
1	malE_MW_fw	GATATACAT <u>ATGCACCACCATCATCACCACAAAATCGAAGAAGGT</u> <u>AAACTGGTAATCTGG</u>	MW
2	malE_MW_rv	CATGGCGCCCTGAAAATACAGATTTTCCACCTTGGTGATACGAGT <u>CTGTGCATCTTTC</u>	MW
3	HB01_ga_fnr64_fw	AAGAAGGAGATATACA <u>ATGCATCACCATCATCACCACGTGGTGG</u> <u>TCGTGGTGGGCGCCGGGA</u>	ga
4	HB02_ga_fnr64_rv	CAGCGTTTTCTTTACCAGACCTACGCCGTGGCCGCCGTCCG	ga
5	ga_fnr11_fw	TTAGTATATTAGTTAAGTATAAGAAGGAGATATACA <u>ATGCATCAC</u> <u>CATCATCACCACATGGTCCGACCGGATCAGA</u>	ga
6	ga_fnr11_rv	CAGCGTTTTCTTTACCAGACCTATGCGACGAGGCTTTC	ga

Materialien

7	ga_fnr78_fw	<u>TTAGTATATTAGTTAAGTATAAGAAGGAGATATACAATGCATCAC</u> <u>CATCATCACCACATGCCCGCTGCCAAGACGT</u>	ga
8	ga_fnr78_rv	<u>AGCGGTTTCTTTACCAGACTCAGCCTGGTCTCCCGT</u>	ga
9	ga_fnr89_fw	<u>TTAGTATATTAGTTAAGTATAAGAAGGAGATATACACATATGCAT</u> <u>CACCATCATCACCACATGCCCGCCCTCTGCGGG</u>	ga
10	ga_fnr89_rv	<u>CAGCGGTTTCTTTACCAGACCTCGAGTCAGGCGCCGCTCTCGC</u>	ga
11	ga_fdx15_fw	<u>AATAATTTTGTTTAACTTTAATAAGGAGATATACATGCATCACCA</u> <u>TCATCACCACATGACCTTGGCAGGCCAGGCG</u>	ga
12	ga_fdx15_rv	<u>TCTGTTCGACTTAAGCATTATGCCTACCGAAGAGTGAGCGCTCCA</u>	ga
13	ga_fdx24_fw	<u>AATAATTTTGTTTAACTTTAATAAGGAGATATACATGCATCACCA</u> <u>TCATCACCACATGAGCGTGCAGCAGGAGG</u>	ga
14	ga_fdx24_rv	<u>TCTGTTCGACTTAAGCATTATGCTCACTCTGAGTCCGGACCGTA</u>	ga
15	ga_fdx54_fw	<u>AATAATTTTGTTTAACTTTAATAAGGAGATATACATGCATCACCA</u> <u>TCATCACCACATGAGGATCTCCGTCGACCCCGAGC</u>	ga
16	ga_fdx54_rv	<u>TCTGTTCGACTTAAGCATTATGCTCAGCCCCGGACCCCTTC</u>	ga
17	ga_fdx71_fw	<u>CCTGTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAATAAGGAGATATACCA</u> <u>GGCACATCACCATCATCACCACATGACTTACGTATCGCACAGCC</u> <u>CTG</u>	ga
18	ga_fdx71_rv	<u>TGTACAATACGATTACTTTCTGTTTCGACTTAAGCATTATGCGGCC</u> <u>GCTCAGGAGGGGAACCACAGATCCGCG</u>	ga
19	ga_fdx75_fw	<u>AATAATTTTGTTTAACTTTAATAAGGAGATATACATGCATCACCA</u> <u>TCATCACCACATGCACATCGGCATCGACAAGGACA</u>	ga
20	ga_fdx75_rv	<u>TCTGTTTCGACTTAAGCATTATGCTCAGCCGACCCGCTCCGA</u>	ga
21	ga_fdx84_fw	<u>CCTGTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAATAAGGAGATATACCA</u> <u>GGCACATCACCATCATCACCACATGACCTACGTATCGCGCAGCC</u>	ga
22	ga_fdx84_rv	<u>GTGTACAATACGATTACTTTCTGTTTCGACTTAAGCATTATGCGGC</u> <u>CGCTTACTGGTTCTGCGGCGGCAGC</u>	ga
23	ga_pigC_3_fw	<u>GTGCCGCGCGCAGCCACATATGATGAATCCTACCCTGGTGGTT</u>	ga
24	ga_pigC_3_rv	<u>AGTGGTGGTGGTGGTGGTGCCTCGAGCTAGCCATCGGCACGTTTC</u>	ga
25	T7_fw	TAATACGACTCACTATAGGG	a
26	T7_rv	ATGCTAGTTATTGCTCAGC	a
27	pACYCDuetUP1	GGATCTCGACGCTCTCCCT	a
28	pACYCDuetDOWN1	GATTATGCGGCCGTGTACAA	a
29	pACYCDuetUP2	TTGTACACGGCCGCATAATC	a
30	pPIGC_3_seq1	TCATGTTTACCCAAGATCCG	a
31	pPIGC_3_seq2	TGCAAGGCTACGTCTATCT	a
32	pPIGC_3_seq3	AACTGGTCACCGTCCTG	a
33	pPIGC_3_seq4	TATCAGCCCAGGATGAAA	a
34	pPIGC_3_seq5	GCCGATATCGATTTTCAGCG	a
35	pPIGC_3_seq6	TTGGCCGGATGAAGCTG	a

5.9 Verwendete Vektoren

Tabelle 21: Verwendete und erstellte Vektoren dieser Arbeit.

Name	Genotyp-Erläuterung	Herkunft
pUC57	<i>bla</i> (Amp ^R), <i>lacZ</i> , <i>rep</i> (pMB1),	GenScript USA Inc.
pUC19	<i>bla</i> (Amp ^R), <i>lacZ</i> , <i>rep</i> (pMB1),	New England BioLabs GmbH
pET28a(+)	<i>lacI</i> , T7 Prom, T7 Term, f1 Ori, Kan ^R , pBR322 Ori	Novagen
pACYCDuet TM -1	<i>lacI</i> , P15A Ori, Cm ^R , T7 Term, T7 Prom, T7 Prom	Novagen
pHR2::YqjM	<i>lacI</i> , <i>bla</i> (Amp ^R), <i>rbx:yqjM</i>	Institut für Bioorganische Chemie (IBOC), HHU Düsseldorf
pUC19::pig (pPIG)	<i>lacZ</i> , <i>cueR</i> , <i>pigA</i> , <i>pigB</i> , <i>pigC</i> , <i>pigD</i> , <i>pigE</i> , <i>pigF</i> , <i>pigG</i> , <i>pigH</i> , <i>pigI</i> , <i>pigJ</i> , <i>pigK</i> , <i>pigL</i> , <i>pigM</i> , <i>pigN</i> , Lac Prom, <i>bla</i> (Amp ^R)	Institut für Molekulare Enzymtechnologie (IMET), HHU Düsseldorf ^[206]
pET28a::redG	<i>lacI</i> , T7 Prom, T7 Term, f1 Ori, Kan ^R , pBR322 Ori, <i>redG</i>	diese Arbeit
pHR2::redG	<i>lacI</i> , <i>bla</i> (Amp ^R), <i>rbx:redG</i>	diese Arbeit
pHM::redG	<i>lacI</i> , <i>bla</i> (Amp ^R), <i>malE:redG</i>	diese Arbeit
pPIGC_3	<i>lacI</i> , T7 Prom, T7 Term, f1 Ori, Kan ^R , pBR322 Ori, <i>pigC</i>	diese Arbeit
pX15	<i>lacI</i> , P15A Ori, Cm ^R , T7 Term, T7 Prom, T7 Prom, <i>fdx15</i>	diese Arbeit
pX24	<i>lacI</i> , P15A Ori, Cm ^R , T7 Term, T7 Prom, T7 Prom, <i>fdx24</i>	diese Arbeit
pX54	<i>lacI</i> , P15A Ori, Cm ^R , T7 Term, T7 Prom, T7 Prom, <i>fdx54</i>	diese Arbeit
pX71	<i>lacI</i> , P15A Ori, Cm ^R , T7 Term, T7 Prom, T7 Prom, <i>fdx71</i>	diese Arbeit
pX75	<i>lacI</i> , P15A Ori, Cm ^R , T7 Term, T7 Prom, T7 Prom, <i>fdx75</i>	diese Arbeit
pX84	<i>lacI</i> , P15A Ori, Cm ^R , T7 Term, T7 Prom, T7 Prom, <i>fdx84</i>	diese Arbeit
pFNR11	<i>lacI</i> , P15A Ori, Cm ^R , T7 Term, T7 Prom, T7 Prom, <i>fnr11</i>	diese Arbeit
pFNR64	<i>lacI</i> , P15A Ori, Cm ^R , T7 Term, T7 Prom, T7 Prom, <i>fnr64</i>	diese Arbeit
pFNR78	<i>lacI</i> , P15A Ori, Cm ^R , T7 Term, T7 Prom, T7 Prom, <i>fnr78</i>	diese Arbeit
pFNR89	<i>lacI</i> , P15A Ori, Cm ^R , T7 Term, T7 Prom, T7 Prom, <i>fnr89</i>	diese Arbeit

5.10 Stammlösungen

Antibiotika, IPTG und Medien-Zusätze werden mit 0.45 µm Celluloseacetatmembran Filter sterilfiltriert und bei -20 °C gelagert.

Ampicillin (Amp, 1 000x):	100 mg/mL in <i>Aqua dest.</i> (als Ampicillin Natriumsalz)
Chloramphenicol (Cm, 1 000x):	34 mg/mL in EtOH
Gentamicin (Gm, 1 000x):	25 mg/mL (als Gentamicinsulfat)
Kanamycin (Kan, 1 000x):	50 mg/mL in <i>Aqua dest.</i> (als Kanamycinsulfat)
Streptomycin (Sm, 1 000x):	80 mg/mL in <i>Aqua dest.</i> (als Streptomycinsulfat)
IPTG (1 000x):	1 M in <i>Aqua dest.</i>
Ammoniumeisen-III-citrat (200x):	100 mM in <i>Aqua dest.</i>
L-Cystein (200x):	200 mM in <i>Aqua dest.</i>
Eisen-II-sulfat-7-hydrat (200x):	100 mM in <i>Aqua dest.</i>

6 Methoden

6.1 Molekularbiologische Methoden

Die Einteilung und Benennung von Objekten und Stämmen in der Molekularbiologie erfolgte, wenn immer möglich, nach den empfohlenen Richtlinien der *IUBMB (International Union of Biochemistry and Molecular Biology)*.

6.1.1 Amplifikation von Genen aus genomischer DNA oder von Vektoren durch PCR

Die Amplifikation von Genen aus genomischer DNA oder von Vektoren erfolgte in dieser Arbeit über die Polymerasekettenreaktion (PCR; engl. *polymerase chain reaction*). Hierfür wurden neben der *Phire*TM Hot Start II DNA Polymerase auch die *Phusion* Hot Start II- und die *Pfu*-DNA Polymerase getestet; die *Phire*TM Hot Start II DNA Polymerase zeigte jedoch für alle Gene dieser Arbeit die beste Amplifikationsleistung und wurde daher bevorzugt verwendet. Eine zusätzliche Doppelstrang-DNA Bindedomäne erlaubt der *Phire*TM Hot Start II Polymerase eine schnellere Amplifikationsrate (10–15 s/kb) mit höherer Ausbeute und Genauigkeit auch bei längeren Genen im Vergleich zur oft verwendeten *Taq* DNA Polymerase (nach Herstellerangabe). Die Mengenangaben für eine PCR-Reaktion wurden den Herstellerempfehlungen entnommen. Eine Zugabe von 3% (v/v) DMSO zu den PCR-Ansätzen führt zur Senkung des Schmelzpunktes und zur Verbesserung der Anlagerung des Primers, wodurch insbesondere bei längeren MEGAWHOP- und *Gibson Assembly*[®] Primern die Ausbeute des PCR-Produktes deutlich gesteigert werden konnte. Als Template dienten sowohl vektorielle- als auch genomische DNA. Die allgemeine Zusammensetzung der PCR-Reaktionen und das PCR-Programm kann der Tabelle 22 entnommen werden. Abweichende Protokolle sind bei den entsprechenden Methoden vermerkt.

Tabelle 22: A) Allgemeine Zusammensetzung der PCR-Reaktionen; B) Allgemeine PCR-Bedingungen.

A			B		
Komponente	Stammkonzentration	Menge	Schritt	Temp. [°C]	Dauer
dNTP-Mix	je dNTP 10 mM	0.4 µL	init. Denaturierung	98	30 s
<i>forward</i> Primer	10 µM	1 µL	Denaturierung	98	10 s
<i>reverse</i> Primer	10 µM	1 µL	Anlagerung	69.5	30 s
Template DNA	30–50 ng/µL	1 µL	Elongation	72	15 s/kb
<i>Phire</i> TM Reaktionspuffer	5-fach	4 µL	finale Elongation	72	10 min
DMSO		0.6 µL	Lagerung (<i>ad lib.</i>)	10	∞
<i>Phire</i> TM Hot Start II DNA Polymerase		0.4 µL			
<i>ad Aqua dest.</i>		20 µL			

6.1.2 Isolation von Plasmid DNA

Die Isolation von Plasmid DNA aus *E. coli* erfolgte unter Verwendung des innuPREP Plasmid Mini Fertigkits (5.6, *Analytik Jena AG Life Science*, Jena, Deutschland). Dieses Beruht auf dem Prinzip der alkalischen Lyse der Zellen, der Fällung der DNA durch EtOH und einer Affinitätschromatographie über Silikatsäulen. Die Elution der DNA erfolgte, anders als im Protokoll des Fertigkits vermerkt, mit *Aqua dest.* und anschließend wurde eine Konzentrationsbestimmung durch einen *NanoDrop 2000* (6.1.10, *Thermo Fisher Scientific*, Waltham, MA, USA) durchgeführt. Die Plasmide wurden in Lösung bei -20°C oder -80°C gelagert. Für die Plasmidisolation wurden Übernachtskulturen in LB- oder TB-Flüssigmedium (5–10 mL) mit entsprechendem Antibiotikum verwendet.

6.1.3 Isolation genomischer DNA

6.1.3.1 *Enterobacteriaceae*

Lösung A: 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM TRIS-HCl, 0.1 % (w/v) SDS; pH 8.0

Puffer P3: 3 M Natriumacetat; pH 5.0

1x TE Puffer: 10 mM TRIS-HCl, 1 mM EDTA

Für die Isolation genomischer DNA aus *Enterobacteriaceae* wurden 20 mL einer Übernachtskultur (6.2.2.2) durch Zentrifugation sedimentiert (12k rpm, 5 min, RT) und anschließend der Überstand verworfen. Die Zellen wurden in 2 mL Lösung A resuspendiert, 2–3 g Glaskugeln (Ø 0.5 mm) hinzugefügt und für 2 min intensiv mit dem Vortexer durchmischt. **1. Extraktion:** Weitere 1 mL der Lösung A wurden hinzugegeben, das Gemisch mit 300 µL *Roti*®-Phenol (*Carl Roth GmbH & Co KG*, Karlsruhe, Deutschland, TE-Puffer gesättigtes Phenol) versetzt und für 5 min mit dem Vortexer durchmischt. Eine Phasenseparation erfolgte durch Zentrifugation (14k rcf, 2 min, RT) und anschließend wurde die wässrige obere Phase (ca. 2.5 mL) in ein neues Reaktionsgefäß überführt. **2. Extraktion:** Die zweite Extraktion erfolgte analog zur ersten, jedoch wurde die Lösung mit 3 mL *Roti*®-Phenol versetzt. Nach der Phasenseparation durch Zentrifugation (14k rcf, 2 min, RT) wurde die obere Phase wiederum in ein neues Reaktionsgefäß überführt. **3. Extraktion:** Die dritte Extraktion erfolgte durch Zugabe von 2.5 mL einer CHCl₃/Isoamylalkohol Lösung [24:1 (v/v)]. Nach erneutem Durchmischen mit dem Vortexer und Phasenseparation (14k rcf, 2 min, RT) wurde die obere Phase (ca. 2 mL) in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Für die Präzipitation der genomischen DNA wurden 10 % (v/v) Puffer P3 und 25 % (v/v) eiskaltes absolutes EtOH hinzugegeben. Die Pelletierung der DNA erfolgte durch Zentrifugation (17k rcf, 15 min, 4°C). Der Überstand wurde verworfen, das erhaltene Pellet wurde mit 1 mL eiskaltem 70 % (v/v) EtOH gewaschen, bei 40°C getrocknet und in 40 µL *Aqua dest.* oder 1x TE Puffer mit 2 mg/mL RNase A resuspendiert. Nach Inkubation für 30 min bei RT konnte die genomische DNA bei -20°C gelagert werden. Die Reinheit konnte über Agarose Gelelektrophorese überprüft werden (6.1.9).

6.1.3.2 *Streptomycetaceae*

1x TE Puffer: 10 mM TRIS-HCl, 1 mM EDTA; pH 8.0

Die Isolation genomischer DNA aus *Streptomycetaceae* erfolgte nach dem Protokoll von Kumar *et al.* (2010). Das *Streptomycetaceae* Myzel wurde zuvor aus einer Flüssigkultur (6.2.2.2) durch Filtration über einen Whatman™ Filter (Grade 3, Porengröße 6 µm) gewonnen. 100 mg trockenes Myzel wurde mit einem Mörser unter flüssigem Stickstoff zermahlen und das Pulver in ein Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 500 µL 1x TE Puffer und 10 mg Lysozym wurde das Gemisch für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 20 µL einer 10 % (w/v) SDS-Lösung und 20 µL Proteinkinase K hinzugegeben, leicht geschüttelt und für weitere 30 min bei 55°C inkubiert.

1. Extraktion: Nach Abkühlen des Lysats auf RT wurden 500 µL einer Roti®-Phenol/CHCl₃ Lösung [1:1 (v/v)] hinzugegeben, das Gemisch stark für 1 min mit dem Vortexer durchmischt und eine Phasenseparation durch Zentrifugation (10k rcf, 5 min, RT) durchgeführt. **1. Präzipitation:** Die wässrige obere Phase wurde vorsichtig in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die DNA durch Zugabe von 500 µL eiskaltem 90 % (v/v) EtOH präzipitiert. Nach 30 min bei -20°C erfolgte die Pelletierung der DNA durch Zentrifugation (17k rcf, 10 min, 4°C). Der Überstand wurde verworfen, das erhaltene Pellet wurde mit 1 mL eiskaltem 90 % (v/v) EtOH gewaschen und in 500 µL 1x TE Puffer resuspendiert. Es wurden 20 µL einer 20 µg/mL RNase A Lösung hinzugegeben und für 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte eine zweite Extraktion und Präzipitation der DNA (s.o.). Das resultierende DNA Pellet wurde in 50 µL *Aqua dest.* resuspendiert und konnte bei -20°C gelagert werden. Die Reinheit konnte über Agarose Gelelektrophorese überprüft werden (6.1.9).

6.1.4 Restriktionsverdau und Ligation

Der Restriktionsverdau von Vektoren für die Verwendung zur klassischen Klonierung über Ligation, den Gibson Assembly® oder einer Restriktionsanalyse zur Kontrolle für eine korrekte Insertion eines DNA Fragmentes in einen Vektor wurde gemäß den empfohlenen Bedingungen des *DoubleDigest Calculators* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) für die entsprechenden Restriktionsendonukleasen durchgeführt. Der Restriktionsverdau erfolgte jeweils über Nacht bei 37°C in 20 µL Probenvolumen mit anschließender Inaktivierung der Enzyme bei 80°C für 20 min.

Für die Ligation mit der T4-Ligase wurden sowohl der geschnittene Vektor als auch das PCR-Amplifikat zuvor über eine Agarose Gelelektrophorese (6.1.9) gereinigt und mittels Fertigkeit (5.6) aus dem Gel eluiert. Anschließend erfolgte eine Dephosphorylierung des 5'- und 3'-Endes des linearisierten Vektors durch Inkubation mit einer alkalischen Phosphatase (FastAP) für 1 h bei 37°C nach Herstellerangaben. Die Inaktivierung der Phosphatase erfolgte durch Inkubation für 5 min bei 75°C. Durch diese Dephosphorylierung wurde eine Re-Ligation des geschnittenen Vektors mit sich selbst verhindert. Die allgemeine Zusammensetzung der Ligation kann der Tabelle 23 entnommen werden.

Tabelle 23: Zusammensetzung des Ligationsansatzes.

Komponente	Stammkonzentration	Menge
T4-Ligase Puffer	10-fach	2 μ L
T4-Ligase	5 Weiss U/ μ L	1 μ L
Geschnittener Vektor		1 μ L
PCR-Amplifikat		2–10 μ L
<i>ad Aqua dest.</i>		20 μ L

Die Ligation erfolgte für 1.5 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C. Anschließend konnte der Ansatz direkt für die Transformation von Bakterien (6.2.3) verwendet werden.

6.1.5 Primerdesign

Alle Primer wurden so erstellt, dass sie komplementär zum Zielgen sind, jedoch keine Komplementarität zu sich selbst aufwiesen. Die MEGAWHOP- (6.1.7) und *Gibson Assembly*® (6.1.8) Primer waren überdies am 5'-Ende jeweils komplementär zum Zielvektor. Für die Berechnung der Schmelzpunkte wurde das Online-Programm *Oligocalc* mit dem *Nearest Neighbor* Algorithmus verwendet.^[336]

Für eine analytische PCR wurden folgende Parameter für die Primer festgelegt: Länge 17–20 bp; Schmelzpunkt 50–60 °C; maximaler GC-Anteil 60 %. Die Planung der *Gibson Assembly*® Primer erfolgte mit der Software *CloneManager* (5.2, *Scientific & Educational Software*) unter den dort verzeichneten Standardbedingungen: Schmelzpunkt 55–80 °C, minimaler GC-Anteil 10 %, maximaler GC-Anteil 90 %, Anlagerungstemperatur 55 °C, isotherme Assemblierungstemperatur 50 °C.

6.1.6 Kolonie PCR

Die erfolgreiche Ligation des synthetisch hergestellten *redG*-Gens in den pHR2-Vektor (Tabelle 21) wurde über PCR von positiven Transformanden (Kolonie PCR) überprüft. Hierfür wurde der *REDTaq*® *ReadyMix*™ (5.6) verwendet. Im Vergleich zu den Herstellerangaben wurde die Reaktionsansatzgröße auf 10 μ L reduziert. Die allgemeine Zusammensetzung der Kolonie PCR Reaktionen und das PCR-Programm kann der Tabelle 24 entnommen werden.

Tabelle 24: A) Allgemeine Zusammensetzung der Kolonie PCR; B) Kolonie PCR-Bedingungen.

A	Menge	B	Temp. [°C]	Dauer
Komponente		Schritt		
<i>RedTaq</i> [®] Mix ^[a]	5 µL	init. Denaturierung	98	10 min
Bakteriensuspension ^[b]	5 µL	Denaturierung	98	30 s
		Anlagerung	55	30 s
		Elongation	72	1 kb/min
		finale Elongation	72	10 min
		Lagerung (<i>ad lib.</i>)	10	∞

^[a] 40 µL fertiger *REDTaq*[®] Mix wurden zuvor mit je 1 µL T7_fw und T7_rv Primer versetzt (je 100 µM Stammkonzentration)

^[b] Für die Bakteriensuspension wurde eine halbe Bakterienkolonie in 5 µL *Aqua dest.* resuspendiert.

6.1.7 MEGAWHOP

Die MEGAWHOP (engl. *mega primer with whole plasmid*) PCR ermöglicht eine Substitution oder Insertion eines DNA Fragments in einen Vektor ohne konventionelle Klonierungsmethoden mittels Restriktion und Ligation.^[337] Für die MEGAWHOP PCR wird zunächst in einer separaten ersten PCR der Megaprimer erstellt. Dabei handelt es sich um einen DNA Doppelstrang mit homologen Regionen zum Zielvektor am 5'- und 3'-Ende, welcher deutlich größer ist als ein Standardprimer (> 50 bp). Diese homologen Regionen können in der MEGAWHOP PCR dann an den Zielvektor binden und somit gewünschte Sequenzen ersetzen oder einfügen (Abbildung 62). In der PCR wird ausgehend von den Megaprimern der gesamte Vektor amplifiziert und der methylierte Parentalstrang anschließend durch das Restriktionsenzym *DpnI* hydrolysiert. Es handelt sich daher um eine PCR mit linearer Amplifikationsrate. Zwei Filialstränge lagern sich danach zusammen und bilden einen zirkulären Vektor mit jeweils einem *nick* am 5'-Ende jedes Megaprimers. Diese werden nach erfolgter Transformation von *E. coli* automatisch repariert.

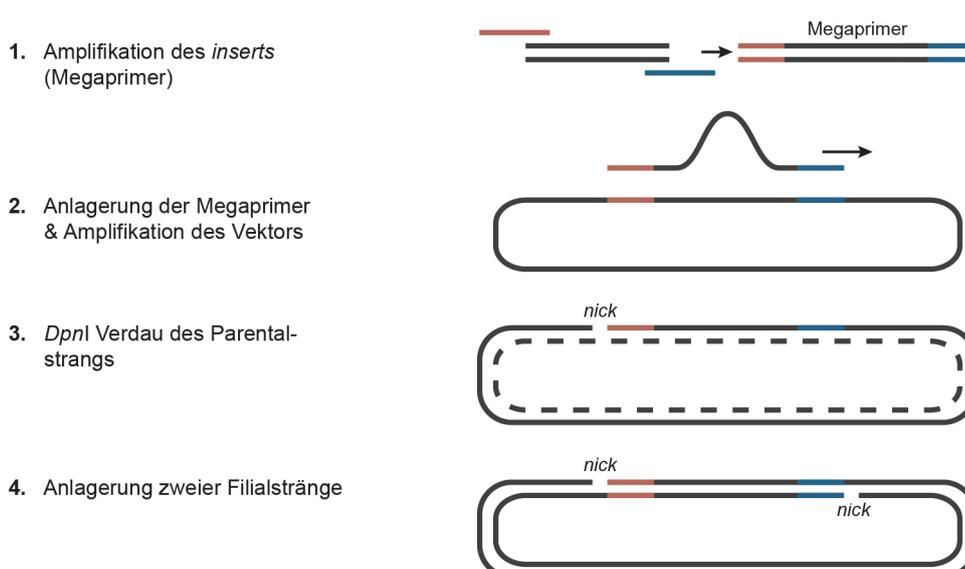


Abbildung 62: MEGAWHOP PCR.

Die allgemeine Zusammensetzung der Megaprimer PCR-Reaktion sowie das PCR-Programm kann der Tabelle 25 und die Zusammensetzung der MEGAWHOP PCR Reaktion und deren PCR-Programm der Tabelle 26 entnommen werden.

Tabelle 25: A) Allgemeine Zusammensetzung der Megaprimer PCR; B) PCR-Bedingungen.

A Komponente	Stamm- konzentration	Menge	B Schritt	Temp. [°C]	Dauer
dNTP-Mix	je dNTP 10 mM	0.4 µL	init. Denaturierung	97	2 min
<i>forward</i> Primer	10 µM	2 µL	Denaturierung	97	30 s
<i>reverse</i> Primer	10 µM	2 µL	Anlagerung	60	30 s
Template DNA	30–50 ng/µL	1 µL	Elongation	72	1 min 40s
Phire™ Reaktions- puffer	5-fach	4 µL	finale Elongation	72	10 min
Phire™ Hot Start II		1 µL	Lagerung (<i>ad lib.</i>)	10	∞
DNA Polymerase <i>ad Aqua dest.</i>		20 µL			

Tabelle 26: A) Allgemeine Zusammensetzung der MEGAWHOP PCR; B) MEGAWHOP PCR-Bedingungen.

A Komponente	Stamm- konzentration	Menge	B Schritt	Temp. [°C]	Dauer
dNTP-Mix	je dNTP 10 mM	0.4 µL	init. Denaturierung	98	2 min
Megaprimer	ca. 10 µM	2 µL	Denaturierung	98	30 s
Template DNA	30–50 ng/µL	1 µL	Anlagerung	60	30 s
Phire™ Reaktions- puffer	5-fach	4 µL	Elongation	72	2 min 20s
Phire™ Hot Start II		1 µL	finale Elongation	72	10 min
DNA Polymerase <i>ad Aqua dest.</i>		20µL	Lagerung (<i>ad lib.</i>)	10	∞

Die MEGAWHOP PCR wurde für die Substitution des Rubredoxin-Gens (*rbx*) im pHR2::*redG* Vektor (Tabelle 21) gegen das Maltosebindeprotein-Gen aus *E. coli* (*mbp* bzw. *malE*) verwendet. Hierfür wurde zunächst das *malE*-Gen als Megaprimer aus dem Genom von *E. coli* BL21(DE3) amplifiziert (6.1.3.1). Das Ergebnis dieser PCR war der Vektor pHM::*redG* (Tabelle 21).

6.1.8 Gibson Assembly® (GA)

Der Gibson Assembly® wurde von Gibson *et al.* am J. Craig Venter Institut entwickelt und ermöglicht die Assemblierung von einzelnen oder mehreren DNA Fragmenten in einer isothermen Ein-Topf-Reaktion.^[338] Überlappende Bereiche an den Enden der DNA Fragmente erlauben dabei eine Restriktionsenzym-unabhängige – aber dennoch gerichtete – Verbindung der einzelnen Sequenzen. Im Vergleich zu klassischen PCR-Methoden können durch den Gibson Assembly® DNA Moleküle von mehreren hundert Kilobasen, wie z. B. künstliche Genome, assembliert werden.

Beim *Gibson Assembly*[®] werden zunächst über *Gibson Primer* überlappende, doppelsträngige DNA Fragmente erstellt (Abbildung 63; bei der Assemblierung von nur einem DNA Fragment in einen Vektor sind beide Enden dieses Fragments überlappend zum Vektor). Nach der Amplifikation der Fragmente werden diese mit dem *Gibson Assembly*[®] Master Mix vermischt und isotherm inkubiert. Die im *Gibson Assembly*[®] Master Mix enthaltenen Enzyme, die T5-Exonuklease, eine DNA Polymerase und die *Taq* DNA Ligase, sind für die Assemblierung der Fragmente verantwortlich. Die T5-Exonuklease hydrolysiert kleine Teile des 5'-Endes jedes DNA Doppelstranges, wodurch *sticky ends* entstehen. Anschließend können sich dadurch die homologen Bereiche anlagern, fehlende Basenpaare werden durch die Polymerase aufgefüllt und die *nicks* durch die Ligase geschlossen.

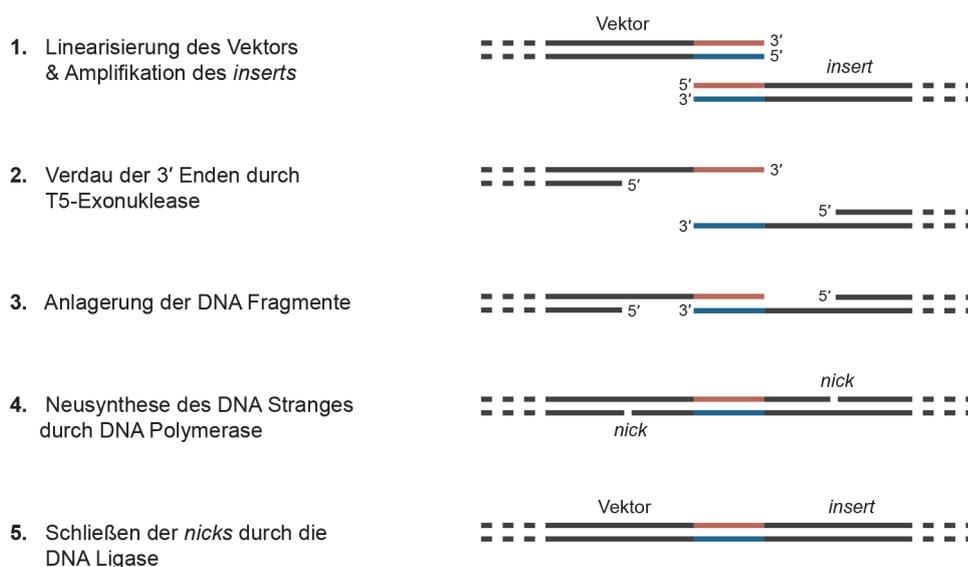


Abbildung 63: *Gibson Assembly*[®].

Die Zusammensetzung des *Gibson Assembly*[®] Master Mixes kann der Tabelle 27 entnommen werden.

Tabelle 27: A) Zusammensetzung des *Gibson Assembly*[®] Master Mixes; B) Zusammensetzung des 5x ISO Puffers; C) Zusammensetzung der *Gibson Assembly*[®] Reaktionen.

A) GA Master Mix	Stamm-	Menge	B) 5x ISO Puffer	Stamm-	Menge
Komponente	konzentration		Komponente	konzentration	
ISO Puffer	5-fach	60 µL	TRIS-HCl	1 M; pH 7.5	500 µL
T5-Exonuklease	100 U/mL	24 µL	MgCl ₂	2 M	25 µL
<i>Phusion</i> [™] Hot Start II	0.4 U/µL	18 µL	dGTP	100 mM	10 µL
DNA Polymerase			dCTP	100 mM	10 µL
<i>Taq</i> DNA Ligase	8000 U/mL	39 µL	dATP	100 mM	10 µL
<i>ad Aqua dest.</i>		450 µL	dTTP	100 mM	10 µL
			DTT	1 M	50 µL
C) <i>Gibson Assembly</i>[®]			PEG-8000		250 mg
Linearisierter Vektor		2 µL	NAD ⁺	100 mM	50 µL
Zielgen		1.5 µL			
GA Master Mix		10 µL			

Alle Vektoren für die Produktion von Ferredoxinen, Ferredoxinreduktasen und des Kondensationsenzym PigC sind mittels *Gibson Assembly*[®] kloniert worden. Für diesen wurde zunächst der Zielvektor (ca. 500–800 ng) durch zwei Restriktionsendonukleasen linearisiert (6.1.4 und Tabelle 28). Die Schnittstellen lagen jeweils innerhalb der neuen Insertionsregion.

Tabelle 28: Linearisierung der Vektoren für den *Gibson Assembly*[®].

Enzym	Zielvektor	Restriktionsenzyme (Verhältnis)	Puffer
Ferredoxine	pACYCDuet TM -1	<i>NcoI/NotI</i> (4:1)	Puffer O
Ferredoxinreduktasen	pACYCDuet TM -1	<i>NdeI/XhoI</i> (2:1)	Puffer R
PigC	pET28a(+)	<i>NdeI/XhoI</i> (2:1)	Puffer R

Die Amplifikation der Gene der Ferredoxine und Ferredoxinreduktasen erfolgte aus genomischer DNA von *Streptomyces coelicolor* A3(2) (6.1.3.2) und des Gens *pigC* von dem Vektor pUC19::*pig* (Tabelle 21) gemäß 6.1.1 mit den Primern #5–#24 (Tabelle 20). Die Amplifikation von *fnr64* wurde durch M.Sc. Hannah U.C. Braß mit den Primern #3 und #4 durchgeführt. Der PCR-Ansatz und die PCR-Bedingungen wurde in Bezug auf 6.1.1 folgendermaßen geändert: 1.4 µL DMSO; Anlagerungstemperatur 79°C.

Der fertige *Gibson Assembly*[®] Ansatz (Tabelle 27) wurde anschließend für 1 h bei 50°C inkubiert und direkt für die Transformation (6.2.3) verwendet.

6.1.9 Agarose-Gelelektrophorese

50x TAE Puffer:	50 mM EDTA, 2 M TRIS-HCl, 2 M Essigsäure
5x Probenpuffer:	100 mM EDTA, 43 % (v/v) Glycerin, 0.05 % (w/v) Bromphenolblau
Agarosegel:	0.5x TAE Puffer, 1–2 % (w/v) Agarose, 0.1 ‰ (v/v) 10000x Gel Red TM / 0.1 ‰ Ethidiumbromid

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde für die Kontrolle der Amplifikation von Genen und die Isolation bzw. Reinigung von Genfragmenten verwendet.

Für die Agarose-Gelelektrophorese wurden 100 mL einer 1–2 % (w/v) NEEO Ultra Qualität Agarose (*Carl Roth GmbH & Co KG*, Karlsruhe, Deutschland) Lösung in 0.5x TAE Puffer angesetzt und aufgeköcht, bis eine klare Lösung entstand. Eine Lagerung dieser Lösung erfolgte bei 60°C. Vor der Polymerisation bei RT wurde der Lösung entweder Ethidiumbromid oder Gel RedTM (*Biotium Inc.*, Hayward, CA, USA) zugesetzt. Diese Zusätze interkalieren mit der DNA, sodass diese Unter UV-Licht sichtbar wird; Gel RedTM ist dabei weniger toxisch als Ethidiumbromid.

Die Proben wurden jeweils mit Probenpuffer versetzt und die Gelelektrophorese bei 135 V für 25 min in 0.5x TAE Puffer durchgeführt. Als Größenstandard wurden 1.5 μ L des 1 kb DNA *Ladders* (*Thermo Fisher Scientific*, Waltham, MA, USA) verwendet. Anschließend wurden die Gele mit dem Geldokumentationssystem (*INTAS Science Imaging Instruments GmbH*, Göttingen, Deutschland) fotografiert bzw. Fragmente für die klassische Klonierung durch Ligation (6.1.4) aus den Gelen ausgeschnitten und die DNA durch ein Fertigkit (5.6) aus der Gelmatrix extrahiert.

6.1.10 DNA Konzentrationsbestimmung

Die DNA Konzentration wurde mit einem *NanoDrop 2000* (*Thermo Fisher Scientific*, Waltham, MA, USA) bei $\lambda = 260$ nm (Absorption der DNA Nukleotide) vermessen. Eine $OD_{260} = 1$ entsprach dabei 50 μ g/mL doppelsträngige DNA. Für die Bestimmung der Reinheit wurde zusätzlich auch die Absorption bei $\lambda = 280$ nm (Absorption aromatischer Aminosäuren) vermessen. Ein Verhältnis $E_{260}/E_{280} = 1.8$ entsprach dabei reiner DNA. Ein Verhältnis unter diesem Wert deutete auf eine Verunreinigung mit Proteinen und ein Verhältnis über diesem Wert deutete auf eine Verunreinigung mit RNA hin. Als Leerprobe wurde *Aqua dest.* verwendet.

6.1.11 DNA Sequenzierung

Isolierte Plasmid DNA wurde mit der Didesoxysequenzierungsmethode nach Sanger mit fluoreszierenden Terminatoren durch den kommerziellen Dienstleister *GATC Biotech AG* (Konstanz, Deutschland) durchgeführt.^[339] Sämtliche *Inserts* aller Konstrukte dieser Arbeit wurden vollständig sequenziert.

6.2 Mikrobielle Methoden

6.2.1 Stämme

Die in dieser Arbeit verwendeten Stämme sind in Tabelle 29 angegeben. Bei Arbeiten mit *Escherichia coli* wurde ausschließlich mit *E. coli* K12 abgeleiteten Bakterienstämmen gearbeitet.

Tabelle 29: Verwendete Bakterienstämme dieser Arbeit. Überdies ist vermerkt, für welche Verwendung die entsprechenden Bakterienstämme eingesetzt wurden. [Biosynthese – Produktionsstamm für Sekundämetabolite; DNA – Plasmidamplifikation; Gene – Templat für die Amplifikation von Zielgenen; Mutasyntese – Verwendung für die Mutasyntese; Protein – Proteinexpression; Semisynthese – Produktionsstamm für die Semisynthese; Toxizität – Verwendung in Toxizitäts-Assays]

Stamm	Genotyp	Referenz	Verwendung
<i>B. subtilis</i> 168 (DSMZ: DSM 23778)	Wildtyp	Burkholder und Giles (1947), ^[340] Barbe <i>et al.</i> (2009) ^[341]	Toxizität
<i>C. glutamicum</i> (ATCC 13032)	Wildtyp	Abe <i>et al.</i> (1967) ^[342]	Toxizität
<i>E. coli</i> BI21(DE3)	F ompT gal dcm lon hsdSB(<i>r_Bm_B</i>) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7p07 ind1 sam7 nin5]) [malB ⁺]K-12(λS)	Studier und Moffatt (1986) ^[343]	Protein, Gene
<i>E. coli</i> DH5α	F Φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (<i>r_K</i> , <i>m_K</i> ⁺) phoA supE44 λ-thi-1 gyrA96 relA1	Hanahan (1983) ^[344]	DNA, Toxizität
<i>E. coli</i> Mach1	ΔrecA1398 endA1 tonA Φ80ΔlacM15 ΔlacX74 hsdR(<i>r_K</i> <i>m_K</i> ⁺)	Bloom <i>et al.</i> (2004) ^[345]	DNA
<i>E. coli</i> Rosetta™ 2	F ompT hsdSB(<i>r_B</i> <i>m_B</i>) gal dcm pRARE2 (Cam ^R argU argW ileX glyT leuW proL metT thrT tyrU thrU)	Novagen	Protein
<i>E. coli</i> XL1blue	endA1 gyrA96(<i>nal</i> ^R) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F'[:Tn10 proAB+ lacIq Δ(lacZ)M15] hsdR17(<i>r_Km_K</i> ⁺)	Stratagene	DNA
<i>P. aeruginosa</i> PAO1 (DSMZ: DSM-19880)	Wildtyp	Migula (1900) ^[346]	Toxizität
<i>P. putida</i> KT2440	<i>r</i> , <i>m</i> ⁺	Nelson <i>et al.</i> (2002) ^[201]	Toxizität
<i>P. putida</i> pig-r2	<i>r</i> , <i>m</i> ⁺ , TRES-LpigR Gm ^R	Domröse, Klein <i>et al.</i> (2015), ^[5] diese Arbeit	Biosynthese
<i>P. putida</i> pig-r2 ΔpigD	<i>r</i> , <i>m</i> ⁺ , pig Cluster, TRES-LpigR ΔpigD Gm ^R Sm ^R	Klein <i>et al.</i> (2017), ^[4] diese Arbeit	Mutasyntese, Semisynthese
<i>S. coelicolor</i> A3(2) (DSM- 40783) (neue Bezeichnung: <i>Streptomyces violaceoruber</i>)	Wildtyp	Kutzner und Waksman (1959) ^[347]	Biosynthese, Gene
<i>Serratia marcescens</i> W838/BIZIO 1823 (DSMZ: DSM-12487)	Wildtyp	Skerman <i>et al.</i> , (1980) ^[348]	Biosynthese
<i>Staphylococcus aureus</i> subs p. aureus ROSENBAACH 1884 (DSMZ: DSM-6148)	Wildtyp	Rosenbach (1884) ^[349]	Toxizität

Die Benennung der Bakterienstämme dieser Arbeit erfolgte gemäß der publizierten Schriften.^[4, 5] Eine abweichende Beschriftung der Stämme gegenüber der Dissertationsschrift von Dr. *Andreas Domröse* kann nachfolgender Tabelle entnommen werden (Tabelle 30).

Tabelle 30: Benennung der Bakterienstämme dieser Arbeit.

Benennung diese Arbeit	Benennung Dissertationsschrift Dr. <i>Andreas Domröse</i> ^[207]
<i>P. putida</i> pig-r1	<i>P. putida</i> pig-r2
<i>P. putida</i> pig-r2	<i>P. putida</i> pig-r1
<i>P. putida</i> pig-r2 Δ pigD	<i>P. putida</i> pig-r1 Δ pigD

6.2.2 Anzucht von Bakterien

6.2.2.1 Nährmedien

LB-Medium:	1 % (w/v) Trypton, 0.5 % (w/v) Hefeextrakt, 1 % (w/v) NaCl
TB-Medium:	1.2 % (w/v) Trypton, 2.4 % (w/v) Hefeextrakt, 0.4 % (v/v) Glycerin, 0.231 % (w/v) KH ₂ PO ₄ , 1.254 % (w/v) K ₂ HPO ₄ ; KPi-Puffer wurde als 10x Lösung separat autoklaviert
65. GYM-Medium (M65):	0.4 % (w/v) Glucose, 0.4 % (w/v) Hefeextrakt, 1 % (w/v) Malzextrakt, 2 % (w/v) CaCO ₃ , 1.2 % (w/v) Agar; vor der Zugabe von Agar werde der pH-Wert auf 7.2 eingestellt; wenn das Medium für Flüssigkulturen verwendet wurde, wurde kein CaCO ₃ zugegeben
Glycerin-Medium:	3 % (v/v) Glycerin, 0.25 % (w/v) Pepton aus Soja, 0.1 % (w/v) NaCl, 0.15 % (w/v) Fleischextrakt
M63-Minimalmedium:	2 % (w/v) (NH ₄) ₂ SO ₄ , 13.6 % (w/v) KH ₂ PO ₄ , 0.2 % (v/v) 1 M MgSO ₄ ·7 H ₂ O, 0.83 % (w/v) HCl [37 % (w/v)], 0.487 % (w/v) FeSO ₄ ·7 H ₂ O, 0.412 % (w/v) CaCl ₂ ·2 H ₂ O, 0.187 % (w/v) ZnSO ₄ ·7 H ₂ O, 0.15 % (w/v) MnCl ₂ ·4 H ₂ O, 0.084 % (w/v) Na ₂ EDTA·2 H ₂ O, 0.03 % (w/v) H ₃ BO ₃ , 0.025 % (w/v) Na ₂ MoO ₄ ·2 H ₂ O, 0.015 % (w/v) CuCl ₂ ·2 H ₂ O; der pH-Wert wurde mit KOH auf 7.0 eingestellt

Alle Flüssigmedien wurden nach der Herstellung ohne Antibiotika autoklaviert (20 min 121 °C) und bei RT gelagert. Für Nährbodenplatten wurde den Flüssigmedien vor dem Autoklavieren 1.5 % (w/v) Agarose zugesetzt. Vor dem Gebrauch der Flüssigmedien wurde diesen, falls nötig, das entsprechende Antibiotikum zugesetzt. Bei Nährbodenplatten erfolgte die Zugabe im handwarmen, flüssigen Zustand.

Bakterienzellen wurden unter Zuhilfenahme eines *Drigalski*-Spatels auf Nährbodenplatten (Petrischale 92 x 16 mm, 10 mL Nährbodenvolumen) ausplattiert. Für Vorkulturen wurden das entsprechende Flüssigmedium (5 mL) in Kulturröhrchen (10 mL) inokuliert.

6.2.2.2 Kultivierungsbedingungen

E. coli

Die Kultivierung von *E. coli* für Vorkulturen und für die Plasmid Isolation wurde in LB-Flüssigmedium (5 mL) mit oder ohne Antibiotikum in Kulturröhrchen (10 mL) bei 37°C in einem Rotorschüttler über Nacht durchgeführt. Für Expressionen (6.2.5) mit einem Kulturvolumen von 100 mL wurden 500 mL Kolben mit Schikane verwendet, für 500–1000 mL Kulturvolumen wurden 3 L *Fernbach*-Kolben mit Schikane verwendet. Die Schüttelfrequenz lag jeweils bei 120 rpm. Für Nährbodenplatten wurde LB-Agar mit entsprechendem Antibiotikum mit *E. coli* inokuliert und für ca. 16 h bei 37°C inkubiert. Toxizitäts-Assays (6.7.10) wurden in Mikrotiterplatten in LB-Flüssigmedium bei 30°C durchgeführt.

P. putida KT2440

Die Kultivierung von *P. putida* Stämmen für Vorkulturen wurde in LB-Flüssigmedium (5 mL) mit oder ohne Antibiotikum in Kulturröhrchen (10 mL) bei 25°C in einem Schüttelblock mit 700 rpm über Nacht durchgeführt. Für Nährbodenplatten wurde LB-Agar mit oder ohne entsprechendem Antibiotikum mit den *P. putida* Stämmen inokuliert und für ca. 16 h bei 30°C inkubiert. Detaillierte Angaben zur Biosynthese von Prodigiosin (**1a**; 6.7.1) sind im entsprechenden Abschnitt vermerkt. Die Biosynthese von MBC (**12**; 6.7.9) und die Mutasynthesen (6.7.4) wurden in *Deep-Well* Platten oder Kolben mit Schikanen bei 25°C durchgeführt. Toxizitäts-Assays (6.7.10) wurden in Mikrotiterplatten in LB-Flüssigmedium bei 30°C durchgeführt. Wachstumskurven von *P. putida* Stämmen wurden entweder in Schüttelkolben-Kulturen oder in FlowerPlates (MTP-48-B; *m2p-labs* GmbH, Baesweiler, Deutschland) in einem *BioLector Pro* (*m2p-labs* GmbH, Baesweiler, Deutschland) unter den Kultivierungsbedingungen gemessen. Detaillierte Angaben sind im jeweiligen Experiment vermerkt.

S. coelicolor A3(2) (DSM 40783)

Die Kultivierung von *S. coelicolor* A3(2) für Vorkulturen wurde in M65- oder Glycerin-Medium (20 mL) ohne Antibiotikum in 100 mL Kolben ohne Schikane bei 28°C mit 160 rpm über 3–5 Tage auf einem Plattformschüttler durchgeführt. Für die Herstellung von Biomasse für die Genom-Isolation (6.1.3.2) wurden 500 mL Kolben mit Metallspirale verwendet.⁴⁵ Dafür wurde M65- oder Glycerin-Medium (200 mL) mit einer Vorkultur (5 mL) innokuliert und bei 28°C mit 160 rpm für mindestens 5 Tage auf einem Plattformschüttler inkubiert. Für die Biosynthese von Undecylprodigiosin (**3**) und Butyl-*meta*-cycloheptylprodigiosins (**4**) wurde ausschließlich Glycerin-Medium verwendet.⁴⁶ Für Nährbodenplatten wurde M65-Agar ohne Antibiotikum mit den *S. coelicolor* inokuliert und für

⁴⁵ Durch die mechanischen Scherkräfte der Metallspirale werden die Myzelkugeln zerteilt, so dass eine stärkere Zellproliferation zu beobachten ist.

⁴⁶ Die Verwendung von Pepton aus Soja erhöht die Produktion der Prodiginine deutlich; eine erhöhte NaCl Konzentration von 0.5–1% (w/v) erhöht zwar die Produktion, verlangsamt aber die Zellproliferation.

ca. 3–5 Tage bei 28°C inkubiert. Für die Herstellung von Kulturen für die Kryokonservierung (6.2.4) wurden die Sporen von *S. coelicolor* A3(2) verwendet.



Sicherheitshinweis: *S. coelicolor* besitzt die Fähigkeit der starken Sporulation durch Segmentierung des Luftmycels der Hyphen. Um eine unkontrollierte Exposition der Sporen zu vermeiden, ist daher besondere Vorsicht beim Arbeiten mit sporulierenden Kulturen geboten.

***B. subtilis* 168 (DSM 23778)**

Die Kultivierung von *B. subtilis* für Vorkulturen wurde in LB-Flüssigmedium (5 mL) ohne Antibiotikum in Kulturröhrchen (10 mL) bei 37°C in einem Rotorschüttler über Nacht durchgeführt. Toxizitäts-Assays (6.7.10) wurden in Mikrotiterplatten in LB-Flüssigmedium bei 30°C durchgeführt.

***C. glutamicum* (ATCC 13032)**

Die Kultivierung von *C. glutamicum* für Vorkulturen wurde in LB-Flüssigmedium (5 mL) ohne Antibiotikum in Kulturröhrchen (10 mL) bei 28°C in einem Schüttelblock mit 700 rpm über Nacht durchgeführt. Toxizitäts-Assays (6.7.10) wurden in Mikrotiterplatten in LB-Flüssigmedium bei 30°C durchgeführt.

***P. aeruginosa* PAO1 (DSM 19880)**

Die Kultivierung von *P. aeruginosa* für Vorkulturen wurde in LB-Flüssigmedium (5 mL) ohne Antibiotikum in Kulturröhrchen (10 mL) bei 30°C in einem Rotorschüttler über Nacht durchgeführt. Toxizitäts-Assays (6.7.10) wurden in Mikrotiterplatten in LB-Flüssigmedium bei 30°C durchgeführt.

***S. marcescens* W838 (DSM 12487)**

Die Kultivierung von *S. marcescens* für Vorkulturen wurde in LB-Flüssigmedium (5 mL) ohne Antibiotikum in Kulturröhrchen (10 mL) bei 30°C in einem Rotorschüttler über Nacht durchgeführt. Toxizitäts-Assays (6.7.10) wurden in Mikrotiterplatten in LB-Flüssigmedium bei 30°C durchgeführt. Für Nährbodenplatten wurde LB-Agar ohne Antibiotikum mit *S. marcescens* inokuliert und für ca. 16 h bei 30°C inkubiert.

6.2.3 Herstellung und Transformation chemisch kompetenter *E. coli* Zellen

Lösung 1: 100 mM MgCl₂

Lösung 2: 100 mM CaCl₂, 15 % (w/v) Glycerin

Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* Zellen

Für die Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* Zellen wurden 400 mL LB-Flüssigmedium mit 2 mL einer Vorkultur (6.2.2.2) innokuliert und die Zellen bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ = 0.4–0.6 inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation pelletiert (10 min, 1230 rcf, 4 °C), der Überstand verworfen und das Pellet vorsichtig in Lösung 1 (10 mL) bei 0 °C resuspendiert. Nach 20–30 min Inkubation bei 0 °C wurden die Zellen erneut durch Zentrifugation pelletiert (10 min, 1230 rcf, 4 °C), der Überstand verworfen und das Pellet vorsichtig in Lösung 2 (2 mL) resuspendiert. Die chemisch kompetenten Zellen wurden in Aliquots (50 µL) sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Die Überprüfung der Aufnahmefähigkeit von Plasmiden fand anschließend über eine Transformation (*vide infra*) mit einem pUC19-Vektor statt; als Kontrolle diente Wasser. Nach der Transformation wurden die Zellen auf LB_{Amp} ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Bei erfolgreicher Transformation war nur ein Bakterienwachstum bei *E. coli* Zellen mit aufgenommenen pUC19-Vektor zu erkennen, wohingegen die Transformation mit Wasser kein Wachstum zeigte. Anhand der Anzahl der Bakterien wurde die Transformationseffizienz über die Bestimmung des CFU-Wertes (engl. *colony forming units*, Formel 1) angegeben:

$$\text{CFU} = \frac{\text{Anzahl Kolonien pro Agarplatte} \cdot 1000}{m(\text{Plasmid DNA})[\mu\text{g}]}$$

Formel 1: Berechnung des CFU-Wertes für die Bestimmung der Transformationseffizienz

Überdies wurde ein Antibiotogramm der kompetenten Zellen gegenüber Kanamycin, Ampicillin, Chloramphenicol, Tetracyclin und Streptomycin aufgenommen. Dafür wurden Übernachtskulturen mit den entsprechenden Antibiotika supplementiert und auf Wachstum kontrolliert.

Transformation chemisch kompetenter *E. coli* Zellen

Die Transformation wurde über einen Hitzeschock durchgeführt. Dafür wurden Plasmid DNA (50–100 ng) oder ein Ligationsansatz (20 µL, 6.1.4) zu gefrorenen kompetenten Zellen hinzugegeben und diese für 30 min auf Eis aufgetaut. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock für 90 s bei 42 °C in einem temperierten Heizbad. Nach dieser Zeit wurden die Zellen sofort auf Eis gelagert, LB-Flüssigmedium (700 µL) ohne Antibiotikum zugegeben und folgend für 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen durch Zentrifugation sedimentiert (2 min, 2 350 rcf, RT), der Überstand verworfen und das Pellet in LB-Flüssigmedium (100 µL) resuspendiert. Die Zellen konnten entweder zur Innokulation von Agarplatten oder von Vorkulturen verwendet werden.

6.2.4 Herstellung von Kulturen zur Langzeitlagerung durch Kryokonservierung

Glycerin-Lösung 1: 80 % (v/v) Glycerin in Wasser (steril)

Glycerin-Lösung 2: 50 % (v/v) Glycerin in Wasser (steril)

Für die Langzeitlagerung von Bakterien [exklusiv *S. coelicolor* A3(2)] bei -80 °C wurden Kulturen für die Kryokonservierung erstellt. Hierfür wurde eine Übernachtskultur (200 µL) des entsprechenden Bakterienstamms mit der sterilen Glycerin-Lösung 1 (800 µL) vermischt, sofort mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Für die Langzeitlagerung von *S. coelicolor* A3(2) wurden Kulturen von den Sporen für die Kryokonservierung angelegt. Hierfür wurde zu stark sporulierenden Zellen auf einer Agarplatte steriles Wasser (8 mL) zugetropft und vorsichtig die Sporen mit einem *Drigalski*-Spatel gelöst. Die Sporensuspension wurde in ein steriles Reaktionsgefäß überführt und die Sporen durch Zentrifugation (5 min 8250 rcf, RT) abgetrennt. Der Überstand wurde verworfen, die Sporen in sterilem Wasser (800 µL) resuspendiert, diese mit der sterilen Glycerin-Lösung 2 (200 µL) vermischt, sofort mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

6.2.5 Genexpression und Reinigung

6.2.5.1 Heterologe Genexpression in *E. coli*

Für eine Genexpression wurden 500 mL–1000 mL TB-Flüssigmedium mit entsprechendem Antibiotikum versetzt und mit einer *E. coli* BL21(DE3) Vorkultur auf eine $OD_{600} = 0.05$ inokuliert. Die Kultur wurde bei 37 °C auf einem Plattformschüttler bis zu einer $OD_{600} = 0.6$ inkubiert, mit 0.1 mM IPTG induziert und anschließend für weitere 14 h über Nacht bei 25 °C inkubiert. Abweichungen von dieser Methode sind im entsprechenden Kapitel oder Experiment vermerkt.

6.2.5.2 Zellaufschluss

Die Zellen wurden im 5-fachen Volumen an KP_i-Puffer (50 mM, pH 7.0) resuspendiert und unter Eiskühlung mittels Ultraschall (2 x 5 min, 40 % Leistung) über eine Sonotrode (*Bandelin electronic* GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland) aufgeschlossen. Zwischen den beiden Ultraschallbehandlungen wurde die Zellsuspension für 5 min gekühlt. Für zellfreien Überstand wurde die Suspension anschließend durch Zentrifugation separiert (15 min, 18.5k rcf, 4 °C).

6.2.5.3 Reinigung mittels Poly-Histidin-Tag (IMAC)

Für die Reinigung von Poly-Histidin-Tag Proteinen wurde die Immobilisierte-Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC; engl. *immobilization metal affinity chromatography*) verwendet. Hierfür wurden Zellen im 5-fachen Volumen an KP_i-Puffer (20 mM, pH 7.0) aufgeschlossen (6.2.5.2).

Der Zelldebris wurde durch Zentrifugation (15 min, 12 850 rcf, 4 °C) sedimentiert und der Überstand in einem zyklischen Beladungsprozess innerhalb von 20 min auf eine Ni-NTA-Säule (*Superflow Cartridge*, 5 mL; QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland) aufgetragen. Die Reinigung erfolgte über ein ÄKTA™-Reinigungssystem (GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland). Zunächst wurde ein Waschschrift mit 20 mM Imidazol in KP_i-Puffer (40 mL, 20 mM, pH 7.0) durchgeführt und das Protein anschließend mit 250 mM Imidazol in KP_i-Puffer (20 mM, pH 7.0) eluiert.

6.2.5.4 Expressionskontrolle durch SDS-PAGE

Stammlösungen

Probenpuffer: 12 % (w/v) SDS, 30 % (w/v) Glycerin, 0.05 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250, 50 mM DTT, ad 150 mM TRIS-HCl (pH 7.0)

10x Anoden Puffer: 1 M TRIS, 0.225 M HCl; pH 8.9

10x Kathoden Puffer: 1 M TRIS, 1 M Tricin, 1 % (w/v) SDS; pH 8.25 (pH nicht einstellen)

3x Gelpuffer: 3 M TRIS, 1 M HCl, 0.3 % (w/v) SDS; pH 8.45

APS-Lösung: 10 % (w/v) APS in *Aqua dest.*

Mischlösungen

Sammelgel Lösung: 1.6 mL Acrylamid/Bisacrylamid Lösung (30 %, 37.5:1), 3.0 mL 3x Gelpuffer, 7.4 mL *Aqua dest.*, 100 µL APS-Lösung, 10 µL TEMED

Trenngel Lösung: 10 mL Acrylamid/Bisacrylamid Lösung (30 %, 37.5:1), 10 mL 3x Gelpuffer, 70 mL *Aqua dest.*, 3 g Glycerin, 150 µL APS-Lösung, 15 µL TEMED

Färbelösungen

Fixierlösung: 30 % (v/v) Ethanol, 10 % (v/v) Essigsäure

Kolloidales Coomassie: 2 % (v/v) H₃PO₄, 5 % (w/v) Al₂(SO₄)₃, 0.02 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250, 10 % (v/v) EtOH

Zur Kontrolle der Genexpression und der Löslichkeit der Proteine wurden diese über SDS-Gelelektrophorese mit Tricin SDS-Gelen nach *Schägger et al.* getrennt und mittels kolloidalem Coomassie Brilliant Blue G-250 gefärbt.^[350]

Probenvorbereitung für SDS-PAGE

Für Proben aus Bakterienpellets wurde das Pellet aus 0.5 mL Kultur in 200 µL Probenpuffer resuspendiert und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Das Pellet wurde anschließend durch Zentrifugation (2 min, 21k rcf, RT) sedimentiert und 20 µL des Überstandes mit Probenpuffer (80 µL) verdünnt.

Für Proteinproben vom zellfreien Überstand nach dem Zellaufschluss (6.2.5.2) wurden 10 µL des Überstandes mit dem Probenpuffer (90 µL) vermischt und für 15 min bei 37 °C inkubiert.

SDS-PAGE

Die Tricin SDS-Gele wurden in einem *Mini-Protein® Tetra Cell Casting Stand* (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) gegossen, wobei zunächst das Trenngel und nach dessen Polymerisation das Sammelgel gegossen wurde. Für einen graden abschließenden Rand des Trenngels wurde dieses während der Polymerisation mit 2-Propanol überschichtet. Der Probenkamm für das Sammelgel definierte ein Taschenvolumen von ca. 15 µL. Als Proteinstandard wurde der Protein-Molekulargewichtsmarker *Roti®-Mark 10–150* (10 µL, Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland) verwendet. Es wurden jeweils 12 µL Probe aufgetragen (ggf. wurden Verdünnungen der Proben angesetzt). Unter folgenden Konditionen wurden die Elektrophorese durchgeführt: 30 V, 20 min; 60 V, 6 min; 190 V, 50 min. Die SDS-PAGE wurde anschließend für 30 min in der Fixierlösung inkubiert, für 10 min mit Wasser gewaschen und über Nacht mit einer kolloidalen Coomassie-Lösung angefärbt. Die Entfärbung erfolgte mit Wasser.

Die Geldokumentation erfolgte auf einem Weißlicht Tisch (*Edvotek Inc.*, Washington, DC, USA) durch eine digitale EOS 1000D Spiegelreflexkamera mit einem EFS 60 mm Objektiv (*Canon Deutschland GmbH*, Krefeld, Deutschland) mit folgenden Einstellungen: ISO 400, Belichtungszeit 1/250 s, Blende F/8.0.

6.3 Chemische Methoden

6.3.1 Allgemeine chemische Methoden

6.3.1.1 Kenngrößen chemischer Eigenschaften und Konstanten

Wenn nicht anders angegeben, wurden alle Kenngrößen chemischer Eigenschaften von Substanzen und Konstanten dieser Arbeit den Datenbanken des *National Institute of Standards and Technology (NIST)* des *U.S. Departments of Commerce* entnommen oder abgeleitet.

6.3.1.2 Lösungsmittel

Petrolether, Essigsäureethylester, Diethylether und Dichlormethan wurden vor der Verwendung mittels Rotationsverdampfern destilliert. Alle anderen Lösungsmittel wurden ohne weitere Reinigung in den Experimenten verwendet. Auf die Verwendung von vergälltem oder absolutem EtOH wird bei den entsprechenden Experimenten gesondert hingewiesen. Für die Analytik durch GC-MS, NMR, IR, LC-MS und HRMS wurden ausschließlich Lösungsmittel mit entsprechender Reinheit gemäß den Anforderungen verwendet. Absolute Lösungsmittel wie Tetrahydrofuran, Dichlormethan, Diethylether und Toluol wurden durch eine Lösungsmitteltrocknungsanlage (MB-SPS-800; *M. Braun Inertgas-Systeme GmbH*, Garching, Deutschland) bereitgestellt.

Für die Biosynthesen von Prodigiosin (**1a**), Undecylprodigiosin (**3**) und Butyl-*meta*-cycloheptylprodigiosin (**4**), für die Quantifizierung von Prodigininen und die Extraktionen in der Mutasynthese, Semisynthese und Biokatalyse wurde acidisches EtOH verwendet. Für die Herstellung von acidem EtOH wurden eine Mischung aus 4 % (v/v) 1 N HCl in absolutem EtOH hergestellt.

6.3.1.3 Durchführung von Reaktionen, Reaktionskontrolle und präparative Chromatographie

KMnO₄ Lösung: 1.5 g KMnO₄, 10 g K₂CO₃, 1.25 mL 10 % (v/v) NaOH, 200 mL H₂O

***p*-Anisaldehyd Lösung:** 3 mL *p*-Anisaldehyd, 6 mL konz. H₂SO₄, 300 mL Essigsäure

Alle Reaktionen wurden, wenn nicht anders angegeben, unter inerten Bedingungen in ausgeheizten Glasgeräten unter Schutzgasatmosphäre (Stickstoff oder Argon) durchgeführt. Die Trocknung der Glasgeräte erfolgte über Nacht bei 120 °C im Trockenschrank und durch Verwendung eines Heißluftgebläses. Inerte Reaktionen wurden üblicherweise in *Schlenk*-Kolben durchgeführt. Der Reaktionsverlauf wurde durch Dünnschichtchromatographie (DC) verfolgt. Die DC-Folien wurden entweder durch oxidative Färbung mit einer KMnO₄ Lösung oder einer *p*-Anisaldehyd Lösung gefärbt, anschließend mit einem Heißluftgebläse getrocknet und entwickelt. Die destillative Entfernung der Lösungsmittel erfolgte bei 40 °C Badtemperatur (abweichende Angaben werden im jeweiligen Experiment vermerkt) durch einen Rotationsverdampfer und Hochvakuumdrehchieberpumpen. Für die präparative Säulenchromatographie wurden Glassäulen unterschiedlicher Größe, gefüllt mit Kieselgel 60M (5.3), verwendet.

6.3.1.4 Massenspektrometrie

Die Massenanalyse der Verbindungen dieser Arbeit wurde durch GC-MS und/oder FT-ICR-MS durchgeführt.

Die GC-MS Analyse erfolgte an einem *HP 6890 Series* Gaschromatographen (*Hewlett Packard Inc.*, Palo Alto, CA, USA) mit einer *HP-5ms* Säule (30 m x 0.25 mm, 0.25 µm, *Agilent Technologies*, Santa Clara, CA, USA) gekoppelt mit einem *HP 5973* Massenspektrometer (*Agilent Technologies*, Santa Clara, CA, USA). Die Temperatur des Injektors und des Detektors waren konstant bei 250 °C und 230 °C. Als Trägergas wurde Helium bei 0.57 bar verwendet. Die Ionisation erfolgte durch Elektronenionisation bei 70 eV. Folgendes Säulenprogramm wurde verwendet: 60 °C, 1 min; 60–185 °C mit $\Delta 15$ °C/min; 185 °C–280 °C mit $\Delta 120$ °C/min; 280 °C, 5 min. Die Proben wurden jeweils in MTBE gelöst.

Die hochauflösenden Massenspektren wurden vom *Zentralinstitut für Engineering, Elektronik und Analytik (ZEA-3)* des *Forschungszentrum Jülich GmbH* durchgeführt. Für die Aufnahme der Spektren wurde ein *Fouriertransformation-Ionenzyklotronresonanz-Massenspektrometer (FT-ICR-MS)* eingesetzt und die in MeOH gelösten Proben mittels Elektronensprühionisation ionisiert.

Für die jeweiligen Verbindungen werden die berechneten und gemessenen Massen angegeben.

6.3.1.5 NMR-Spektroskopie/Quantitative NMR-Spektroskopie

Alle NMR-Datensätze wurden an einem *Advance/DRX 600* NMR Spektrometer (*Bruker Corporation*, Billerica, MA, USA) bei 297 K in CDCl_3 bzw. $\text{DMSO-}d_6$ bei 600 MHz bzw. 151 MHz aufgenommen. Die chemischen Verschiebungen sind in ppm relativ zu den charakteristischen Signalen von CDCl_3 , $\text{DMSO-}d_6$ oder TMS [^1H : $\delta(\text{CDCl}_3) = 7.26$ ppm und ^{13}C : $\delta(\text{CDCl}_3) = 77.2$ ppm; ^1H : $\delta(\text{DMSO-}d_6) = 2.50$ ppm und ^{13}C : $\delta(\text{DMSO-}d_6) = 39.5$ ppm; ^1H : $\delta(\text{TMS}) = 0.00$ ppm und ^{13}C : $\delta(\text{TMS}) = 0.0$ ppm] angegeben. Für die Zuordnung der Signale wurden neben ^1H - und ^{13}C - auch DEPT-135° Puls-, $^1\text{H-}^1\text{H-COSY}$ -, $^1\text{H-}^{13}\text{C-HSQC}$ - und $^1\text{H-}^{13}\text{C-HMBC}$ Spektren verwendet. Die Multiplizitäten der Signale wurden als Singulett (s), Dublett (d), Triplett (t), Quartett (q), Multiplett M, zentriertes Multiplett (m_c) und breites Singulett (brs) bezeichnet. Die Kopplungskonstanten (J) sind in Hz angegeben.

Quantitative NMR-Messungen wurden zur Kontrolle der Reinheit von Substanzen mit dem internen Standard 4-Methoxyphenol durchgeführt. Hierbei wurde die Peakfläche der Methoxygruppe bei 3.76 ppm im $^1\text{H-NMR}$ als Referenz verwendet und die Masse des zu messenden Analyten über folgende Gleichung bestimmt:

$$m_{\text{Prod}} = m_{\text{Std}} \cdot \frac{N_{\text{Std}}}{N_{\text{Prod}}} \cdot \frac{M_{\text{Prod}}}{M_{\text{Std}}} \cdot \frac{I_{\text{Prod}}}{I_{\text{Std}}}$$

Formel 2: Gleichung zur Quantifizierung eines Produktes durch quantitative NMR-Analyse. [Prod = Produkt; Std = interner Standard; m = Masse; N = Anzahl der absorbierenden Protonen; M = molare Masse; I = Integral des Signals]

6.3.1.6 IR-Spektroskopie

Die Infrarotspektren sind an einem *SpectrumOne* Infrarot Spektrometer (*Perkin Elmer Inc.*, Waltham, MA, USA) über ATR-IR (engl. *attenuated total reflection*, abgeschwächte Totalreflexion) über einen dünnen Film aufgenommen worden. Flüssigkeiten wurden direkt vermessen, wohingegen Feststoffe zunächst gelöst, aufgetragen und das Lösungsmittel verdampft wurde. Die Signale sind in Wellenzahlen $\tilde{\nu}$ (1/cm) angegeben.

6.3.1.7 HPLC Analyse

Die HPLC (engl. *high-performance-liquid chromatographie*) Analyse von Prodigiosin (**1a**) und MBC (**12**) erfolgte an einer *Dionex UltiMate™ 3000* HPLC Anlage (*Dionex/Thermo Fisher Scientific*, Waltham, MA, USA) ausgestattet mit einer Pumpe mit einem Gradientenmischer und einem Entgaser, einem WPS-3000TSL *Autosampler* und einem DAD-3000 *Diodenarray*-Detektor. Die Substanzen wurden auf einer *Chiralpak® IA* Säule (250 mm x 4.6 mm, 5 μ m) getrennt. *n*-Heptan und 2-Propanol (80:20) wurden als Eluenten verwendet. Die Flussrate betrug 0.5 mL/min und die Detektionswellenlänge war $\lambda = 465$ nm [Prodigiosin (**1a**)] oder $\lambda = 365$ nm [MBC (**12**)].

Die HPLC Analyse von MAP (**13a**) erfolgte an einer *JASCO LC-2000Plus* HPLC Anlage (*JASCO Germany GmbH*, Groß-Umstadt, Deutschland) ausgestattet mit einer PU-2080Plus Pumpe und einem DG-2080-53 3-Line Entgaser, einem LG-2080-02 Gradientenmischer, einem AS-2057Plus *Autosampler*, einem CO-2060Plus Säulenthermostat und einem MD-2010Plus *Diodenarray*-Detektor. Die Substanz wurde auf einer *Phenomenex HyperClone™ ODS (C 18) 120 Å* Säule (125 mm x 4 mm, 5 μ m) getrennt. Acetonitril und Wasser (70:30) wurden als Eluenten verwendet. Die Flussrate betrug 0.5 mL/min und die Detektionswellenlänge war $\lambda = 220$ nm.

6.3.1.8 LC-MS Analyse

Die LC-MS Analyse erfolgte an einer *Agilent 1100 Series LC-MS* (*Agilent Technologies*, Santa Clara, CA, USA) ausgestattet mit einem *Diodenarray*- und einem API (engl. *atmospheric pressure ionisation*) Elektronenspray Massen-Detektor. Die Substanzen wurden auf einer Umkehrphasen-(*reversed phase*) *Atlantis T3* Säule (1 m x 3.0 mm, 3 μ m) getrennt. Wasser und MeOH mit je 0.1 % (*v/v*) Ameisensäure wurden als Eluenten verwendet. Folgendes Säulenprogramm wurde verwendet: 0.00 min – Wasser/MeOH (90:10); 4.00 min – Wasser/MeOH (40:60); 6.00 min – MeOH. Das Programm wurde nach 10 min gestoppt und die Flussrate betrug konstant 0.6 mL/min. Die Säulentemperatur wurde konstant bei 203.15 K gehalten. Die Detektionswellenlängen waren $\lambda = 510$ nm, 520 nm, 530 nm, 540 nm und 3D Feld ($\lambda = 190$ –800 nm). Das Injektionsvolumen betrug 10 μ L. Die Massendetektion erfolgte im positiven Modus für $m/z = 100$ –1000. Die Substanzen wurden nach ihrer UV-Absorption und dem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis (m/z) oder anhand von Referenzen identifiziert.

6.3.1.9 Drehwert

Optisch aktive Substanzen wurden an einem *Series 341* Polarimeter (*Perkin Elmer Inc.*, Waltham, MA, USA) bei einer Wellenlänge von $\lambda = 589$ nm (Natrium-D-Linie) gemessen. Die Proben wurden in dem angegebenen Lösungsmittel gelöst und bei 20 °C in einer Messzelle mit einer Schichtdicke von $l = 1$ dm vermessen.

6.3.1.10 Schmelzpunktbestimmung

Die Schmelzpunkte sind in einem *Büchi Melting Point B-540* Gerät (*Büchi Labortechnik GmbH*, Essen, Deutschland) aufgenommen worden.

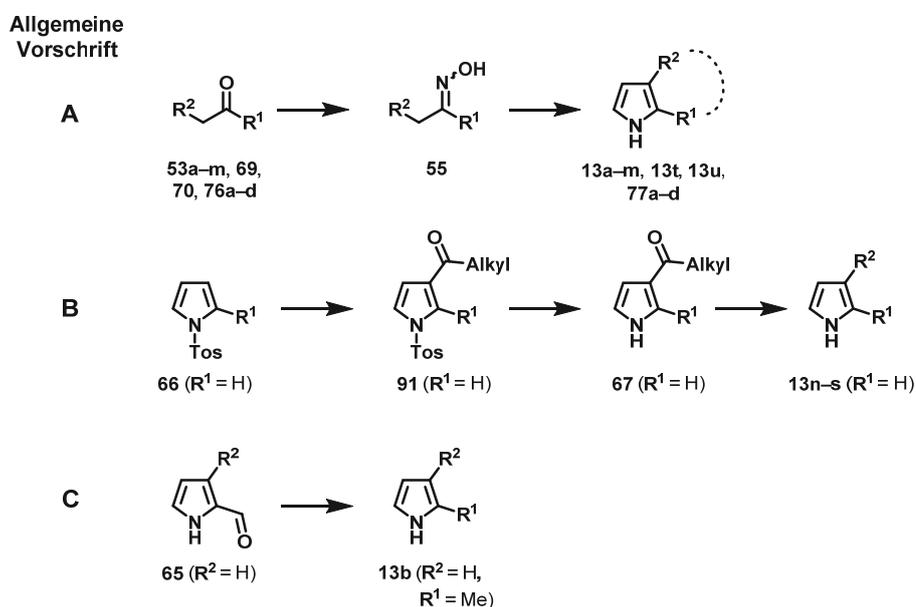
6.3.1.11 Benennung von Verbindungen

Die Benennung der Verbindungen erfolgte, wenn immer möglich, nach der *IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry)* Nomenklatur. Die Nummerierung der Atome in Verbindungen erfolgte ausschließlich für die Charakterisierung und kann von der *IUPAC* Nomenklatur abweichen. Die Nomenklatur der heterocyclischen Verbindungen erfolgte nach dem *Hantzsch-Widman-System*, welches auch für die Nummerierung der Atome herangezogen wurde.^[351-353]

6.4 Synthesen von Pyrrolen als Präkursoren

Die Synthese von Pyrrolen erfolgte ausschließlich unter Schutzgasatmosphäre und möglichst unter Lichtausschluss, da Sauerstoff und Licht zur Bildung von Polypyrrolen führen. Die säulenchromatographische Reinigung erfolgte durch Zugabe von 0.5–1% (v/v) der schwachen Base Triethylamin (TEA) zum Laufmittel für die Inaktivierung des sauren Kieselgels, welches ebenfalls eine Polymerisation begünstigt. Der Grad der Polymerisation kann anhand der Farbigkeit von Pyrrolen erkannt werden – Mono-Pyrrole sind meist farblose Öle.

Das Schema 32 und die Tabelle 31 veranschaulichen die allgemeinen Vorschriften zur Synthese der Pyrrole.



Schema 32: Übersichtsschema für die Synthesen der Monopyrrole dieser Arbeit.

Tabelle 31: Übersichtstabelle für die Synthese der Monopyrrole dieser Arbeit. Angegeben sind jeweils die Monopyrrole, die Synthesevorschrift und die Gesamtausbeute aller konsekutiv verlaufenden Schritte.

#	Monopyrrol	R ¹	R ²	Synthesevorschrift	Gesamtausbeute [%]
1	13b	Methyl	H	A/C	22/47
2	13c	Methyl	Methyl	A	47
3	13d	Methyl	<i>n</i> -Propyl	A	59
4	13e	Methyl	<i>n</i> -Butyl	A	48
5	13a	Methyl	<i>n</i> -Pentyl	A	49
6	13f	Methyl	<i>n</i> -Hexyl	A	49
7	13g	Methyl	<i>n</i> -Octyl	A	49
8	13h	Methyl	<i>n</i> -Decyl	A	36
9	13i	Methyl	<i>n</i> -Dodecyl	A	41
10	13j	Ethyl	<i>n</i> -Pentyl	A	7
11	13k	<i>n</i> -Butyl	<i>n</i> -Propyl	A	14
12	13l	<i>n</i> -Pentyl	<i>n</i> -Butyl	A	27
13	13m	<i>n</i> -Hexyl	<i>n</i> -Pentyl	A	35
14	13n	H	Ethyl	B	57
15	13o	H	<i>n</i> -Propyl	B	66
16	13p	H	<i>n</i> -Pentyl	B	40
17	13q	H	<i>n</i> -Hexyl	B	67
18	13r	H	<i>n</i> -Octyl	B	58
19	13s	H	<i>n</i> -Undecyl	B	46
20	13t	Methyl	2-Propenyl	A	21
21	13u	Methyl	4-Pentenyl	A ^[a]	45 ^[b]
22	77a		Cyclopentyl	A	2
23	77b		Cyclohexyl	A	44
24	77c		Cycloheptyl	A	36
25	77d		Cyclooctyl	A	41

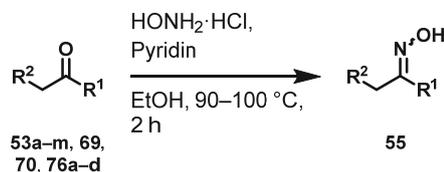
^[a] Das Ausgangsmaterial 7-Octen-2-on (**70**) wurde zuvor aus 6-Heptensäure (**71**) hergestellt.

^[b] Die Gesamtausbeute ist für die Synthese beginnend von 6-Heptensäure(**71**) angegeben.

6.4.1 Vorschrift A für die Synthese der 2,3-Dialkylpyrrole 13a–m, 2-Alkyl-3-Alkenylpyrrole 13t, 13u und der zyklischen 2,3-Dialkylpyrrole 77a–d

Allgemeine Vorschrift für die Synthese von Ketoximen

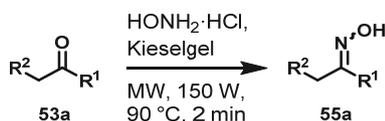
Methode 1



Die Ketoxime **55** wurden unter normaler Atmosphäre in einem Rundkolben mit Rückflusskühler in unvergälltem EtOH⁴⁷ hergestellt.

Eine Mischung des Ketons **53a–m, 69, 70, 76a–d** (1.0 Äq.), gemörsertem Hydroxylaminhydrochlorid (1.5 Äq.) und Pyridin (0.8 Äq.) in unvergälltem EtOH (0.5 mL/mmol Keton) wurde für 2 h bei 90–100°C zum Rückfluss erhitzt. Der vollständige Umsatz des Eduktes wurde über DC mit einer KMnO₄ Lösung verfolgt. Die Reaktion wurde mit EtOAc (3 x 25 mL) extrahiert und die organische Phase mehrfach mit 1 N HCl und Wasser gewaschen. Die leicht gelblich-braune organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Die Ketoxime **55** wurden in quantitativer Ausbeute erhalten und ohne weitere Reinigung für das Folgeexperiment verwendet. Der Reaktionsfortschritt wurde durch Dünnschichtchromatographie mit einer KMnO₄ Färbelösung verfolgt.

Methode 2

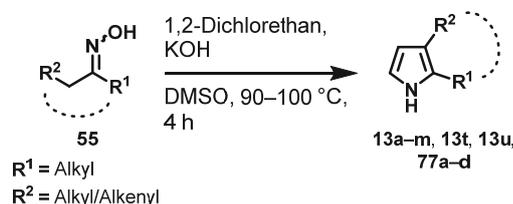


2-Octanonoxim (**55a**) wurde unter normaler Atmosphäre in einer Synthesemikrowelle *CEM Discover* in einem geschlossenem 10 mL Mikrowellengefäß nach einer modifizierten Vorschrift von *Durchschein et al.* (2010) und *Hajipour et al.* (1999) hergestellt.^[189, 354]

Eine Mischung des Ketons **53a** (157 µL, 1.00 mmol, 1.00 Äq.), gemörsertem Hydroxylaminhydrochlorid (0.14 g, 2.0 mmol, 2.0 Äq.) und Kieselgel (0.5 g, 8 mmol, 8 Äq.) wurde in einem geschlossenen Mikrowellengefäß für 2 min bei 90°C (150 W) erhitzt. Beim anschließenden Abkühlen auf RT wurden 5 mL 1 N HCl zugegeben, die Mischung über Celite filtriert und mit EtOAc (3 x 5 mL) extrahiert. Die leicht gelblich-braune organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das Ketoxim **55a** wurde in quantitativer Ausbeute erhalten und ohne weitere Reinigung für das Folgeexperiment verwendet. Der Reaktionsfortschritt wurde durch Dünnschichtchromatographie mit einer KMnO₄ Färbelösung verfolgt.

⁴⁷ Die Verwendung von unvergälltem EtOH ist hier ausdrücklich erforderlich, da das Vergällungsmittel 2-Butanon (Methylethylketon, MEK) ebenfalls als Edukt der Synthese verwendet werden kann.

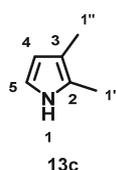
Allgemeine Vorschrift zur Synthese der 2,3-Dialkylpyrrole 13a–m, 2-Alkyl-3-Alkenylpyrrole 13t, 13u und der zyklischen 2,3-Dialkylpyrrole 77a–d



2,3-Dialkylpyrrole **13a–m**, 2-Alkyl-3-Alkenylpyrrole **13t**, **13u** und die zyklischen 2,3-Dialkylpyrrole **77a–d** wurden nach einer Vorschrift von *Klein et al.* (2017) hergestellt.^[4]

Eine Mischung aus dem Ketoxim (**55**, 1 Äq.), KOH (5 Äq.), DMSO (2.13 mL/mmol Ketoxim) und Wasser (13.7 μL /mmol Ketoxim) wurde unter Schutzgasatmosphäre in einem Dreihalskolben mit Rückflusskühler auf 90–100 °C erhitzt. Der Kolben wurde mit Aluminiumfolie vor Licht geschützt. Eine Lösung aus 1,2-Dichlorethan (3.5 Äq.) in DMSO (0.21 mL/mmol Ketoxim) wurde über eine Spritzenpumpe über 2 h langsam hinzugegeben. Eine zweite Charge KOH (5 Äq.) wurde vorsichtig nach 1 h Zugabe des 1,2-Dichlorethans zum Reaktionsgemisch gegeben. Nach Rühren für weitere 2 h wurde die Reaktion mit Eiswasser versetzt und mit Diethylether extrahiert (3 x 20 mL). Die vereinten organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Die anschließende säulenchromatographische Reinigung [PE/Dichlormethan, verschiedene Gemische + 0.5–1 % (v/v) TEA] ergaben die Monopyrrole **13a–m**, **13t**, **13u** und **77a–d** als leicht gelbes Öl oder Feststoff. Der Reaktionsfortschritt wurde durch Dünnschichtchromatographie mit einer sauren *p*-Anisaldehyd Färbelösung verfolgt.

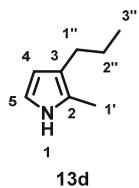
2,3-Dimethyl-1H-pyrrol (**13c**)



Der Vorschrift A für die Synthese von 2,3-Dialkylpyrrolen (6.4.1) folgend, wurde das Pyrrol **13c** aus 2-Butanon hergestellt und nach säulenchromatographischer Reinigung [PE/Dichlormethan, 85:15 + 1 % (v/v) TEA] als leicht gelbes Öl (507 mg, 5.33 mmol, 47 %) erhalten. ¹H-NMR (600 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 2.02 (s, 3H, 1''-H), 2.17 (s, 3H, 1'-H), 5.98 (t, $^3J_{4,5} = 2.9$ Hz, $^4J_{4,1} = 2.9$ Hz, 1H, 4-H), 6.57 (t, $^3J_{5,4} = 2.7$ Hz, $^3J_{5,1} = 2.7$ Hz, 1H, 5-H), 7.70 (brs, 1H, 1-NH); ¹³C-NMR (151 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 10.9 (C-1''), 11.0 (C-1'), 110.0 (C-4), 114.1 (C-3), 114.8 (C-5), 123.6 (C-2); IR (ATR-Film): $\tilde{\nu}$ [1/cm] = 3374, 2921, 2866, 1590, 1465, 1386, 1279, 1246, 1169, 1102, 1058, 954, 898, 831, 707; MS (EI, 70 eV): m/z = 95 [M^+], 94, 80, 67, 53; t_R = 4.5 min.

Die ¹H-NMR Daten stimmen mit der Literatur überein.^[355]

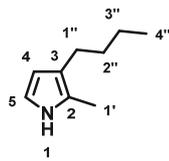
2-Methyl-3-propyl-1H-pyrrol (13d)



13d

Der Vorschrift A für die Synthese von 2,3-Dialkylpyrrolen (6.4.1) folgend, wurde das Pyrrol **13d** aus 2-Hexanon hergestellt und nach säulenchromatographischer Reinigung [PE/Dichlormethan, 85:15 + 0.5 % (v/v) TEA] als leicht gelbes Öl (1.27 g, 10.3 mmol, 59 %) erhalten. $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 0.94 (t, $^3J_{3'',2''} = 7.3$ Hz, 3H, 3''-H), 1.51-1.60 (m, 2H, 2''-H), 2.18 (s, 3H, 1'-H), 2.36 (t, $^3J_{1'',2''} = 7.6$ Hz, 2H, 1''-H), 6.01 (t, $^3J_{4,5} = 2.8$ Hz, $^4J_{4,1} = 2.8$ Hz, 1H, 4-H), 6.59 (t, $^3J_{5,4} = 2.7$ Hz, $^3J_{5,1} = 2.7$ Hz, 1H, 5-H), 7.70 (brs, 1H, 1-NH); $^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 11.0 (C-1'), 14.10 (C-3''), 24.4 (C-2''), 28.08 (C-1''), 108.9 (C-4), 114.8 (C-5), 119.58 (C-3), 123.3 (C-2); **IR** (ATR-Film): $\tilde{\nu}$ [1/cm] = 3380, 2957, 2927, 2871, 1713, 1584, 1464, 1377, 1277, 1106, 1068, 956, 904, 832, 801, 709; **MS** (EI, 70 eV): $m/z = 123$ [M^+], 108, 94, 80, 67, 53; $t_R = 6.3$ min; **HRMS** (ESI-FTMS, positiv-Ion): Berechnet für $\text{C}_8\text{H}_{14}\text{N}$ ($\text{M} + \text{H}$) $^+ = 124.11208$, gefunden = 124.11203.

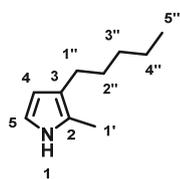
3-Butyl-2-methyl-1H-pyrrol (13e)



13e

Der Vorschrift A für die Synthese von 2,3-Dialkylpyrrolen (6.4.1) folgend, wurde das Pyrrol **13e** aus 2-Heptanon hergestellt und nach säulenchromatographischer Reinigung [PE/Dichlormethan, 80:20 + 1 % (v/v) TEA] als leicht gelbes Öl (813 mg, 5.92 mmol, 48 %) erhalten. $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 0.92 (t, $^3J_{4'',3''} = 7.4$ Hz, 3H, 4''-H), 1.32-1.39 (m, 2H, 3''-H), 1.47-1.55 (m, 2H, 2''-H), 2.18 (s, 3H, 1'-H), 2.38 (t, $^3J_{1'',2''} = 7.7$ Hz, 2H, 1''-H), 6.01 (t, $^3J_{4,5} = 2.7$ Hz, $^4J_{4,1} = 2.7$ Hz, 1H, 4-H), 6.58 (t, $^3J_{5,4} = 2.7$ Hz, $^3J_{5,1} = 2.7$ Hz, 1H, 5-H), 7.69 (brs, 1H, 1-NH); $^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 11.0 (C-1'), 14.0 (C-4''), 22.6 (C-3''), 25.6 (C-1''), 33.6 (C-2''), 108.9 (C-4), 114.8 (C-5), 119.7 (C-3), 123.2 (C-2); **IR** (ATR-Film): $\tilde{\nu}$ [1/cm] = 3379, 2957, 2926, 2857, 1585, 1465, 1378, 1274, 1247, 1106, 1065, 955, 902, 832, 709, 666; **MS** (EI, 70 eV): $m/z = 137$ [M^+], 122, 120, 108, 106, 94, 80, 67, 53; $t_R = 7.3$ min; **HRMS** (ESI-FTMS, positiv-Ion): Berechnet für $\text{C}_9\text{H}_{16}\text{N}$ ($\text{M} + \text{H}$) $^+ = 138.12773$, gefunden = 138.12773.

2-Methyl-3-pentyl-1H-pyrrol (2-Methyl-3-amyl-1H-pyrrol, 13a, MAP)



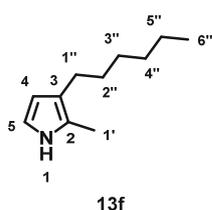
13a

Methode 1) Der Vorschrift A für die Synthese von 2,3-Dialkylpyrrolen (6.4.1) folgend, wurde das Pyrrol **13a** aus 2-Octanon hergestellt und nach säulenchromatographischer Reinigung [PE/Dichlormethan, 80:20 + 1 % (v/v) TEA] als leicht gelbes Öl (1.13 g, 7.47 mmol, 49 %) erhalten. **Methode 2)** Der Vorschrift für die sequentielle Eintopfsynthese von MAP (**13a**, 6.4.1) folgend, wurde das Pyrrol **13a** aus 2-Octanon (**53a**) hergestellt und nach säulenchromatographischer Reinigung [PE/Dichlormethan, 85:15 + 1 % (v/v) TEA] als leicht gelbes Öl (671 mg, 4.40 mmol, 37 %) erhalten. $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 0.89 (t, $^3J_{5'',4''} = 6.9$ Hz, 2H, 5''-H), 1.28-1.37 (m, 4H, 3'', 4''-H), 1.53 (m, 2H, 2''-H), 2.18 (s, 3H, 1'-H), 2.37 (t, $^3J_{1'',2''} = 7.7$ Hz, 2H, 1''-H), 6.01 (t, $^3J_{4,5} = 2.7$ Hz, $^4J_{4,1} = 2.6$ Hz, 1H, 4-H), 6.58 (t, $^3J_{5,4} = 2.7$ Hz, $^4J_{5,1} = 2.6$ Hz, 1H, 5-H), 7.70 (brs, 1H, 1-NH);

$^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 11.0 (C-1'), 14.1 (C-5''), 22.6 (C-4''), 25.9 (C-1''), 31.0 (C-2''), 31.8 (C-3''), 108.9 (C-4), 114.8 (C-5), 119.8 (C-3), 123.2 (C-2); **IR** (ATR-Film): $\tilde{\nu}$ [$1/\text{cm}$] = 3381, 2957, 2856, 1464, 1378, 1108, 901, 832, 711, 667; **MS** (EI, 70 eV): m/z = 151 [M^+], 94, 80, 67; t_{R} = 7.9 min; **HPLC** [*Phenomenex HyperClone*TM ODS (C 18) 120 Å; 125 mm x 4 mm, 5 μm ; Acetonitril/Wasser 70:30; Flussrate 0.5 mL/min; λ = 220 nm]: t_{R} = 5.18 min.

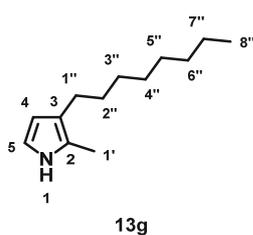
Die NMR-, IR- und MS Daten stimmen mit der Literatur überein.^[129]

3-Hexyl-2-methyl-1H-pyrrol (13f)

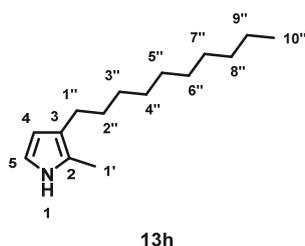


Der Vorschrift A für die Synthese von 2,3-Dialkylpyrrolen (6.4.1) folgend, wurde das Pyrrol **13f** aus 2-Nonanon hergestellt und nach säulenchromatographischer Reinigung [PE/Dichlormethan, 80:20 + 1 % (v/v) TEA] als leicht gelbes Öl (771 mg, 4.66 mmol, 49 %) erhalten. $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 0.88 (t, $^3J_{6'',5''}$ = 6.3 Hz, 3H, 6''-H), 1.26–1.37 (m, 6H, 3'', 4'', 5''-H), 1.48–1.56 (m, 2H, 2''-H), 2.17 (s, 3H, 1'-H), 2.37 (t, $^3J_{1'',2''}$ = 7.7 Hz, 2H, 1''-H), 6.01 (t, $^3J_{4,5}$ = 2.8 Hz, $^4J_{4,1}$ = 2.8 Hz, 1H, 4-H), 6.58 (t, $^3J_{5,4}$ = 2.7 Hz, $^3J_{5,1}$ = 2.7 Hz, 1H, 5-H), 7.68 (brs, 1H, 1-NH); $^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 11.0 (C-1'), 14.2 (C-6''), 22.7, 25.9 (C-1''), 29.3, 31.3 (C-2''), 31.9, 108.9 (C-4), 114.8 (C-5), 119.8 (C-3), 123.2 (C-2); **IR** (ATR-Film): $\tilde{\nu}$ [$1/\text{cm}$] = 3379, 2957, 2924, 2854, 1585, 1465, 1378, 1245, 1108, 1065, 954, 902, 832, 709, 667; **MS** (EI, 70 eV): m/z = 165 [M^+], 136, 122, 106, 94, 80, 53; t_{R} = 9.2 min; **HRMS** (ESI-FTMS, positiv-Ion): Berechnet für $\text{C}_{11}\text{H}_{20}\text{N}$ ($\text{M} + \text{H}$)⁺ = 166.15903, gefunden = 166.15898.

2-Methyl-3-octyl-1H-pyrrol (13g)

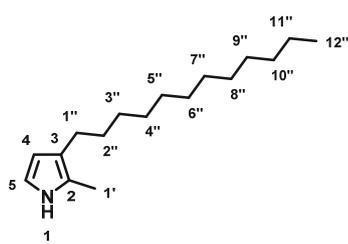


Der Vorschrift A für die Synthese von 2,3-Dialkylpyrrolen (6.4.1) folgend, wurde das Pyrrol **13g** aus 2-Undecanon hergestellt und nach säulenchromatographischer Reinigung [PE/Dichlormethan, 85:15 + 1 % (v/v) TEA] als leicht gelbes Öl (1.03 g, 5.33 mmol, 49 %) erhalten. $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 0.88 (t, $^3J_{8'',7''}$ = 6.9 Hz, 3H, 8''-H), 1.21–1.37 (m, 10H, 3'', 4'', 5'', 6'', 7''-H), 1.48–1.56 (m, 3H, 2''-H), 2.18 (s, 3H, 1'-H), 2.34–2.40 (t, $^3J_{1'',2''}$ = 7.7 Hz, 2H, 1''-H), 6.01 (t, $^3J_{4,5}$ = 2.8 Hz, $^4J_{4,1}$ = 2.8 Hz, 1H, 4-H), 6.58 (t, $^3J_{5,4}$ = 2.7 Hz, $^3J_{5,1}$ = 2.7 Hz, 1H, 5-H), 7.69 (brs, 1H, 1-NH); $^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 11.0 (C-1'), 14.1 (C-8''), 22.7, 25.9 (C-1''), 29.4, 29.6, 29.6, 31.4 (C-2''), 32.0, 108.9 (C-4), 114.8 (C-5), 119.8 (C-3), 123.2 (C-2); **IR** (ATR-Film): $\tilde{\nu}$ [$1/\text{cm}$] = 3379, 2957, 2923, 2854, 1720, 1464, 1378, 1279, 1109, 1076, 955, 901, 832, 709, 671; **MS** (EI, 70 eV): m/z = 193 [M^+], 178, 164, 150, 136, 122, 120, 108, 94, 80, 67, 53; t_{R} = 10.4 min; **HRMS** (ESI-FTMS, positiv-Ion): Berechnet für $\text{C}_{13}\text{H}_{24}\text{N}$ ($\text{M} + \text{H}$)⁺ = 194.19033, gefunden = 194.19026.

3-Decyl-2-methyl-1*H*-pyrrol (13h)

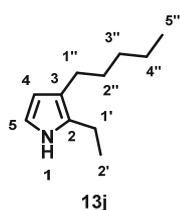
13h

Der Vorschrift A für die Synthese von 2,3-Dialkylpyrrolen (6.4.1) folgend, wurde das Pyrrol **13h** aus 2-Tridecanon hergestellt und nach säulenchromatographischer Reinigung [PE/Dichlormethan, 85:15 + 1 % (v/v) TEA] als leicht gelber Feststoff (754 mg, 3.41 mmol, 36 %) erhalten. $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 0.88 (t, $^3J_{10'',9''} = 6.8$ Hz, 3H, 10''-H), 1.22–1.35 (m, 14H, 3'', 4'', 5'', 6'', 7'', 8''-H), 1.48–1.55 (m, 2H, 2''-H), 2.18 (s, 3H, 1'-H), 2.37 (t, $^3J_{1'',2''} = 7.7$ Hz, 2H, 1''-H), 6.01 (t, $^3J_{4,5} = 2.8$ Hz, $^4J_{4,1} = 2.8$ Hz, 1H, 4-H), 6.58 (t, $^3J_{5,4} = 2.7$ Hz, $^3J_{5,1} = 2.7$ Hz, 1H, 5-H), 7.69 (brs, 1H, 1-NH); $^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 11.0 (C-1'), 14.1 (C-10''), 22.7, 25.9 (C-1''), 29.4, 29.6, 29.7, 29.7, 31.4, 31.9, 108.9 (C-4), 114.8 (C-5), 119.8 (C-3), 123.2 (C-2); **IR** (ATR-Film): $\tilde{\nu}$ [1/cm] = 3379, 2922, 2853, 1465, 1378, 1246, 1110, 953, 901, 832, 709, 670; **MS** (EI, 70 eV): $m/z = 221$ [M^+], 206, 192, 178, 164, 150, 136, 122, 120, 108, 94, 80, 67, 53; $t_R = 11.2$ min; **HRMS** (ESI-FTMS, positiv-Ion): Berechnet für $\text{C}_{15}\text{H}_{28}\text{N}$ ($\text{M} + \text{H}$) $^+ = 222.22163$, gefunden = 222.22157.

3-Dodecyl-2-methyl-1*H*-pyrrol (13i)

13i

Der Vorschrift A für die Synthese von 2,3-Dialkylpyrrolen (6.4.1) folgend, wurde das Pyrrol **13i** aus 2-Tridecanon hergestellt und nach säulenchromatographischer Reinigung [PE/Dichlormethan, 80:20 + 0.5 % (v/v) TEA] als leicht gelber Feststoff (1.06 g, 4.25 mmol, 41 %) erhalten. $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 0.88 (t, $^3J_{12'',11''} = 6.9$ Hz, 3H, 12''-H), 1.22–1.34 (m, 18H, 3'', 4'', 5'', 6'', 7'', 8'', 9'', 10'', 11''-H), 1.48–1.56 (m, 2H, 2''-H), 2.18 (s, 3H, 1'-H), 2.37 (t, $^3J_{1'',2''} = 7.7$ Hz, 2H, 1''-H), 6.01 (t, $^3J_{4,5} = 2.8$ Hz, $^4J_{4,1} = 2.8$ Hz, 1H, 4-H), 6.58 (t, $^3J_{5,4} = 2.7$ Hz, $^3J_{5,1} = 2.7$ Hz, 1H, 5-H), 7.69 (brs, 1H, 1-NH); $^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 11.0 (C-1'), 14.1 (C-12''), 22.7, 25.9 (C-1''), 29.4, 29.6, 29.7, 29.7, 31.4 (C-2''), 32.0, 108.9 (C-4), 114.8 (C-5), 119.8 (C-3), 123.2 (C-2); **IR** (ATR-Film): $\tilde{\nu}$ [1/cm] = 3379, 2922, 2853, 1465, 1378, 1246, 1110, 901, 831, 710, 670; **MS** (EI, 70 eV): $m/z = 249$ [M^+], 234, 220, 206, 192, 178, 164, 150, 136, 122, 120, 108, 94, 80, 67, 53; $t_R = 11.7$ min; **HRMS** (ESI-FTMS, positiv-Ion): Berechnet für $\text{C}_{17}\text{H}_{32}\text{N}$ ($\text{M} + \text{H}$) $^+ = 250.25293$, gefunden = 250.25286.

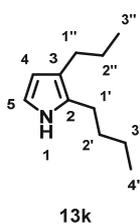
2-Ethyl-3-pentyl-1*H*-pyrrol (13j)

13j

Der Vorschrift A für die Synthese von 2,3-Dialkylpyrrolen (6.4.1) folgend, wurde das Pyrrol **13j** aus 3-Nonanon hergestellt und nach säulenchromatographischer Reinigung [PE/EtoAc, 98:2 + 1 % (v/v) TEA] als leicht gelbes Öl (121 mg, 0.73 mmol, 7 %) erhalten. $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 0.89 (t, $^3J_{5'',4''} = 7.0$ Hz, 3H, 5''-H), 1.19 (t, $^3J_{2',1'} = 7.6$ Hz, 3H, 2'-H), 1.26–1.39 (m, 4H, 3'', 4''-H), 1.49–1.58 (m, 2H, 2''-H),

2.39 (t, $^3J_{1'',2''} = 7.7$ Hz, 2H, 1''-H), 2.58 (q, $^3J_{1',2'} = 7.6$ Hz, 2H, 1'-H), 6.02 (t, $^3J_{4,5} = 2.8$ Hz, $^4J_{4,1} = 2.8$ Hz, 1H, 4-H), 6.60 (t, $^3J_{5,4} = 2.7$ Hz, $^3J_{5,1} = 2.7$ Hz, 1H, 5-H), 7.74 (brs, 1H, 1-NH); $^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 14.1 (C-5''), 14.4 (C-2'), 18.9 (C-1'), 22.7 (C-3''), 25.8 (C-1''), 31.3 (C-2''), 31.9 (C-4''), 108.8 (C-4), 114.8 (C-5), 119.0 (C-3), 129.3 (C-2); **IR** (ATR-Film): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3386, 2960, 2926, 2855, 1684, 1465, 1377, 1326, 1110, 1064, 1010, 956, 900, 831, 713; **MS** (EI, 70 eV): $m/z = 165$ [M^+], 150, 136, 122, 108, 94, 80, 67, 53; $t_{\text{R}} = 8.8$ min; **HRMS** (ESI-FTMS, positiv-Ion): Berechnet für $\text{C}_{11}\text{H}_{20}\text{N}$ ($\text{M} + \text{H}$) $^+ = 166.15903$, gefunden = 166.15899.

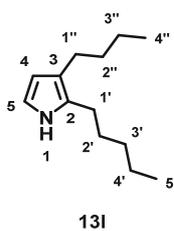
2-Butyl-3-propyl-1H-pyrrol (13k)



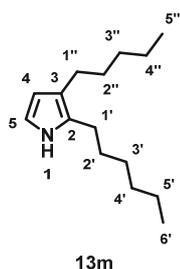
Der Vorschrift A für die Synthese von 2,3-Dialkylpyrrolen (6.4.1) folgend, wurde das Pyrrol **13k** aus 5-Nonanon hergestellt und nach säulenchromatographischer Reinigung [PE/Dichlormethan, 90:10 + 1% (v/v) TEA] als leicht gelbes Öl (248 mg, 1.50 mmol, 14%). $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 0.92 (t, $^3J_{3'',2''} = 7.4$ Hz, 3H, 3''-H), 0.94 (t, $^3J_{4',3'} = 7.3$ Hz, 3H, 4'-H), 1.30–1.41 (m, 2H, 3'-H), 1.46–1.61 (m, 4H, 2', 2''-H), 2.36 (t, $^3J_{1'',2''} = 7.7$ Hz, 2H, 1''-H), 2.54 (t, $^3J_{1',2'} = 7.7$ Hz, 2H, 1'-H), 6.01 (t, $^3J_{4,5} = 2.8$ Hz, $^4J_{4,1} = 2.8$ Hz, 1H, 4-H), 6.60 (t, $^3J_{5,4} = 2.7$ Hz, $^3J_{5,1} = 2.7$ Hz, 1H, 5-H), 7.72 (brs, 1H, 1-NH); $^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 13.9 (C-3''), 14.2 (C-4'), 22.5 (C-3'), 24.6 (C-2''), 25.5 (C-1'), 28.0 (C-1''), 32.4 (C-2'), 108.7 (C-4), 114.8 (C-5), 119.2 (C-3), 128.2 (C-2); **IR** (ATR-Film): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3386, 2956, 2929, 2872, 2159, 1696, 1579, 1457, 1403, 1378, 1251, 1111, 1074, 1018, 905, 831, 803, 709; **MS** (EI, 70 eV): $m/z = 165$ [M^+], 136, 122, 106, 94, 80, 67, 53; $t_{\text{R}} = 8.7$ min.

Die $^1\text{H-NMR}$ - und $^{13}\text{C-NMR}$ Daten stimmen mit der Literatur überein.^[181]

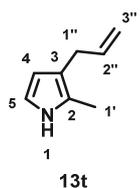
3-Butyl-2-pentyl-1H-pyrrol (13l)



Der Vorschrift A für die Synthese von 2,3-Dialkylpyrrolen (6.4.1) folgend, wurde das Pyrrol **13l** aus 6-Undecanon hergestellt und nach säulenchromatographischer Reinigung [PE/Dichlormethan, 90:10 + 1% (v/v) TEA] als leicht gelbes Öl (456 mg, 2.36 mmol, 27%). $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 0.89 (t, $^3J_{4'',3''} = 6.8$ Hz, 3H, 4''-H), 0.92 (t, $^3J_{5',4'} = 7.4$ Hz, 3H, 5'-H), 1.26–1.42 (m, 6H, 3', 4', 3''-H), 1.47–1.59 (m, 4H, 2', 2''-H), 2.39 (t, $^3J_{1'',2''} = 7.7$ Hz, 2H, 1''-H), 2.53 (t, $^3J_{1',2'} = 7.7$ Hz, 2H, 1'-H), 6.01 (t, $^3J_{4,5} = 2.8$ Hz, $^4J_{4,1} = 2.8$ Hz, 1H, 4-H), 6.60 (t, $^3J_{5,4} = 2.7$ Hz, $^3J_{5,1} = 2.7$ Hz, 1H, 5-H), 7.71 (brs, 1H, 1-NH); $^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 14.0 (C-4''), 14.1 (C-5'), 22.5 (C-3''), 22.7 (C-4'), 25.5 (C-1''), 25.7 (C-1'), 29.9 (C-2'), 31.7 (C-3'), 33.8 (C-2''), 108.7 (C-4), 114.8 (C-5), 119.4 (C-3), 128.1 (C-2); **IR** (ATR-Film): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3387, 2957, 2926, 2857, 1459, 1378, 1246, 1112, 1078, 1031, 960, 903, 832, 708; **MS** (EI, 70 eV): $m/z = 193$ [M^+], 150, 136, 94, 106, 94, 80, 67, 53; $t_{\text{R}} = 10.1$ min; **HRMS** (ESI-FTMS, positiv-Ion): Berechnet für $\text{C}_{13}\text{H}_{24}\text{N}$ ($\text{M} + \text{H}$) $^+ = 194.19033$, gefunden = 194.19025.

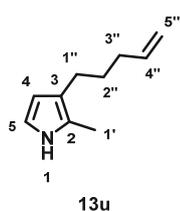
2-Hexyl-3-pentyl-1*H*-pyrrol (13m)

Der Vorschrift A für die Synthese von 2,3-Dialkylpyrrolen (6.4.1) folgend, wurde das Pyrrol **13m** aus 7-Tridecanon hergestellt und nach säulenchromatographischer Reinigung [PE/Dichlormethan, 85:15 + 1% (v/v) TEA] als leicht gelbes Öl (781 mg, 3.50 mmol, 35%). **¹H-NMR** (600 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 0.86–0.92 (m, 6H, 6'-, 5''-H), 3.1.25–1.37 (m, 10H, 3'-, 4'-, 5'-, 3''-, 4''-H), 1.50–1.58 (m, 4H, 2'-, 2''-H), 2.38 (t, ³J_{1'',2''} = 7.8 Hz, 2H, 1''-H), 2.53 (t, ³J_{1',2'} = 7.7 Hz, 2H, 1'-H), 6.01 (t, ³J_{4,5} = 2.8 Hz, ⁴J_{4,1} = 2.8 Hz, 1H, 4-H), 6.60 (t, ³J_{5,4} = 2.7 Hz, ³J_{5,1} = 2.7 Hz, 1H, 5-H), 7.71 (brs, 1H, 1-NH); **¹³C-NMR** (151 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 14.1 (C-5''), 14.1 (C-6'), 22.6, 22.7, 25.8 (C-1'), 25.8 (C-1''), 29.2, 30.2, 31.3, 31.7, 31.9, 108.7 (C-4), 114.8 (C-5), 119.4 (C-3), 128.1 (C-2); **IR** (ATR-Film): $\tilde{\nu}$ [1/cm] = 3385, 2956, 2925, 2855, 1460, 1378, 1113, 1075, 901, 831, 708; **MS** (EI, 70 eV): *m/z* = 221 [M⁺], 206, 192, 178, 164, 150, 136, 120, 106, 94, 80, 67, 53; *t_R* = 10.8 min; **HRMS** (ESI-FTMS, positiv-Ion): Berechnet für C₁₅H₂₈N (M + H)⁺ = 222.22163, gefunden = 222.22157.

3-Allyl-2-methyl-1*H*-pyrrol (13t)

Der Vorschrift A für die Synthese von 2,3-Dialkylpyrrolen (6.4.1) folgend, wurde das Pyrrol **13t** aus 5-Hexen-2-on hergestellt und nach säulenchromatographischer Reinigung [PE/EtOAc, 98:2 + 1% (v/v) TEA] als leicht gelbes Öl (440 mg, 3.63 mmol, 21%) erhalten. **¹H-NMR** (600 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 2.18 (s, 3H, 1'-H), 3.14–3.20 (d, ³J_{1'',2''} = 6.4 Hz, 2H, 1''-H), 4.97 (d, ³J_{3'',2''} = 10.1 Hz, 1H, 3''-H_a), 5.03 (dd, ³J_{3'',2''} = 17.1 Hz, ²J_{3a'',3b''} = 1.8 Hz, 1H, 3''-H_b), 5.93 (ddt, ³J_{2'',3b''} = 16.6 Hz, ³J_{2'',3a''} = 10.0 Hz, ³J_{2'',1''} = 6.5 Hz, 1H, 2''-H), 6.00 (t, ³J_{4,5} = 2.8 Hz, ⁴J_{4,1} = 2.7 Hz, 1H, 4-H), 6.59 (t, ³J_{5,4} = 2.7 Hz, ⁴J_{5,1} = 2.6 Hz, 1H, 5-H), 7.74 (brs, 1H, 1-NH); **¹³C-NMR** (151 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 11.0 (C-1'), 30.7 (C-1''), 109.2 (C-4), 114.0 (C-3''), 115.1 (C-5), 116.8 (C-3), 123.7 (C-2), 138.4 (C-2''); **IR** (ATR-Film): $\tilde{\nu}$ [1/cm] = 3379, 3077, 2977, 2912, 1638, 1585, 1464, 1432, 1275, 1250, 1107, 993, 956, 910, 834, 771, 708, 672; **MS** (EI, 70 eV): *m/z* = 121 [M⁺], 106, 94, 80, 53; *t_R* = 6.3 min.

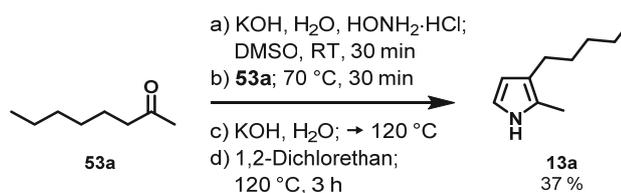
Die ¹H-NMR- und ¹³C-NMR Daten stimmen mit der Literatur überein.^[191]

2-Methyl-3-(pent-4-en-1-yl)-1*H*-pyrrol (13u)

Der Vorschrift A für die Synthese von 2,3-Dialkylpyrrolen (6.4.1) folgend, wurde das Pyrrol **13u** aus 7-Octen-2-on (**70**) hergestellt und nach säulenchromatographischer Reinigung [PE/Dichlormethan, 80:20 + 0.5% (v/v) TEA] als leicht gelbes Öl (470 mg, 3.19 mmol, 45%) erhalten. **¹H-NMR** (600 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 1.59–1.66 (m, 2H, 2''-H), 2.05–2.13 (m, 2H, 3''-H), 2.18 (s, 3H, 1'-H), 2.40 (t, ³J_{1'',2''} = 7.8 Hz, 2H, 1''-H), 4.95 (dd, ³J_{5'',4''} = 10.2 Hz, ²J_{5a'',5b''} = 1.8 Hz, 1H, 5''-H_a), 5.02 (dd, ³J_{5'',4''} = 17.2 Hz, ²J_{5a'',5b''} = 1.8 Hz, 1H, 5''-H_b), 5.85 (ddt, ³J_{4'',5b''} = 17.0 Hz, ³J_{4'',5a''} = 10.2 Hz, ³J_{4'',3''} = 6.6 Hz, 1H, 4''-H), 6.01 (t,

$^3J_{4,5} = 2.8$ Hz, $^4J_{4,1} = 2.7$ Hz, 1H, 4-H), 6.59 (t, $^3J_{5,4} = 2.7$ Hz, $^4J_{5,1} = 2.6$ Hz, 1H, 5-H), 7.70 (brs, 1H, 1-NH); $^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 11.0 (C-1'), 25.4 (C-1''), 30.5 (C-2''), 33.6 (C-3''), 108.9 (C-4), 114.3 (C-5''), 114.9 (C-5), 119.3 (C-3), 123.3 (C-2), 139.1 (C-4''); IR (ATR-Film): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3380, 3077, 2977, 2927, 2855, 1708, 1640, 1586, 1442, 1246, 1108, 991, 907, 832, 710; MS (EI, 70 eV): $m/z = 149$ [M^+], 134, 121, 107, 94, 80, 67, 53; $t_R = 8.2$ min; HRMS (ESI-FTMS, positiv-Ion): Berechnet für $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}$ ($\text{M} + \text{H}$) $^+ = 150.12773$, gefunden = 150.12771.

2-Methyl-3-pentyl-1H-pyrrol (13a, MAP): Sequentielle Eintopfsynthese

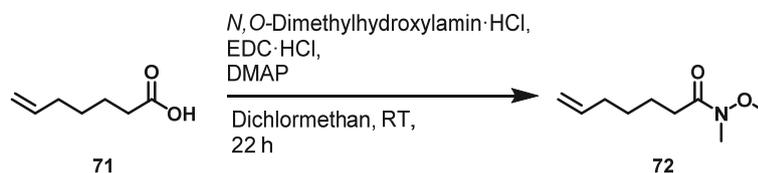


2-Methyl-3-pentyl-1H-pyrrol (**13a**) wurde in einer sequentiellen Eintopfsynthese nach einer modifizierten Vorschrift von *Trofimov et al.* (2015) unter Schutzgasatmosphäre hergestellt.^[181]

Eine Mischung aus KOH (673 mg, 12.0 mmol, 1.0 Äq.), Wasser (108 μL , 6.00 mmol, 0.50 Äq.) und gemörsertem Hydroxylaminhydrochlorid (834 mg, 12.0 mmol, 1.0 Äq.) in DMSO (830 μL /mmol Keton) wurde für 30 min bei Raumtemperatur gerührt und anschließend 2-Octanon (**53a**, 1.54 g, 12.0 mmol, 1.00 Äq.) in DMSO (420 μL /mmol Keton) zugegeben und für 30 min bei 70 °C gerührt. Nach einer weiteren Zugabe von KOH (1.68 g, 30.0 mmol, 2.50 Äq.) und Wasser (270 μL , 15.0 mmol, 1.25 Äq.) wurde das Reaktionsgemisch auf 120 °C erwärmt. Eine Lösung aus 1,2-Dichlorethan (1.58 mL, 20.0 mmol, 1.67 Äq.) in DMSO (250 μL /mmol Keton) wurde über eine Spritzenpumpe über 2 h langsam hinzugegeben. Nach Rühren für eine weitere Stunde wurde die Reaktion mit Eiswasser versetzt und mit Diethylether extrahiert (3 x 20 mL). Die vereinten organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Die anschließende säulenchromatographische Reinigung [PE/Dichlormethan, 85:15 + 1 % (v/v) TEA] ergab MAP (**13a**) als leicht gelbes Öl. Der Reaktionsfortschritt wurde durch Dünnschichtchromatographie mit einer sauren *p*-Anisaldehyd Färbelösung verfolgt.

6.4.1.1 Synthese von 7-Octen-2-on (70)

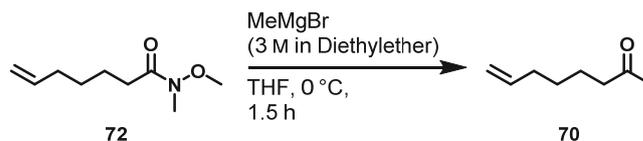
Das Keton 7-Octen-2-on (70) dient als Edukt für die Synthese von 2-Methyl-3-(pent-4-en-1-yl)-1*H*-pyrrol (13u).

N-Methoxy-*N*-methylhept-6-enamid (72)

N-Methoxy-*N*-methylhept-6-enamid (72) wurde in einem *Schlenk*-Kolben unter Schutzgasatmosphäre hergestellt. Die Synthese des *Weinreb-Nahm* Amids basiert auf einer *Steglich* Veresterung. Zu einer Lösung aus 6-Heptensäure (71, 2.00 mL, 14.8 mmol, 1.00 Äq.) in Dichlormethan (50 mL) wurden *N,O*-Dimethylhydroxylamin·HCl (2.16 g, 22.1 mmol, 1.50 Äq.), *N*-(3-Dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimid·HCl (4.25 g, 22.1 mmol, 1.50 Äq.) und 4-(Dimethylamino)pyridin (2.71 g, 22.1 mmol, 1.50 Äq.) zugegeben. Der Reaktionsansatz wurde für 22 h bei RT gerührt, anschließend mit einer gesättigten NaCl-Lösung gequench und mit Dichlormethan (3 x 30 mL) extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden zunächst mit 1 N HCl und danach mit einer gesättigten NaHCO₃-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. *N*-Methoxy-*N*-methylhept-6-enamid (72) wurde als leicht gelbes Öl in quantitativen Ausbeuten erhalten. Das Produkt wurde ohne weitere Reinigung für das Folgeexperiment verwendet. Der Reaktionsfortschritt wurde durch Dünnschichtchromatographie mit einer sauren *p*-Anisaldehyd Färbelösung verfolgt.

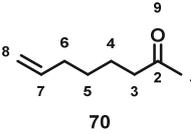
¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 1.45 (tt, ³J_{4,3} = 9.8 Hz, ³J_{4,5} = 6.5 Hz, 2H, 4-H), 1.66 (p, ³J_{3,2} = 7.6 Hz, ³J_{3,4} = 7.6 Hz, 2H, 3-H), 2.08 (dt, ³J_{5,6} = 7.2 Hz, ³J_{5,4} = 7.1 Hz, 2H, 5-H), 2.43 (t, ³J_{2,3} = 7.9 Hz, 2H, 2-H), 3.18 (s, 3H, 12-H), 3.68 (s, 3H, 10-H), 4.95 (dd, ³J_{7a,6} = 10.2 Hz, ²J_{7a,7b} = 1.1 Hz, 1H, 7-H_a), 5.01 (dd, ³J_{7b,6} = 17.2 Hz, ²J_{7b,7a} = 1.5 Hz, 1H, 7-H_b), 5.81 (ddt, ³J_{6,7b} = 16.9 Hz, ³J_{6,7a} = 10.2 Hz, ³J_{6,5} = 6.7 Hz, 1H, 6-H); ¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 24.1 (C-3), 28.7 (C-4), 31.7 (C-2), 32.2 (C-12), 33.6 (C-5), 61.2 (C-10), 114.5 (C-7), 138.6 (C-6); IR (ATR-Film): $\tilde{\nu}$ [1/cm] = 2937, 1664, 1442, 1415, 1385, 1319, 1178, 1118, 994, 911, 720; MS (EI, 70 eV): 171 [M⁺], 140, 111, 93, 83, 69, 55; t_R = 8.2 min.

7-Octen-2-on (70)



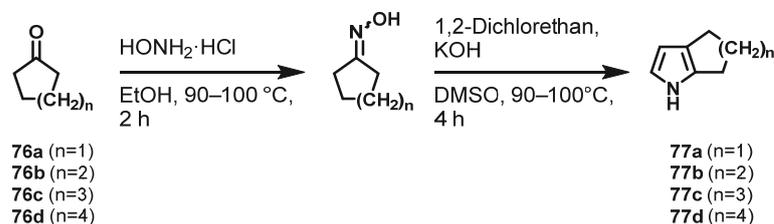
7-Octen-2-on (70) wurde in einem Zweihalskolben unter Schutzgasatmosphäre hergestellt. Zu einer Lösung des *N*-Methoxy-*N*-methylhept-6-enamids (72, 1.0 g, 5.8 mmol, 1.0 Äq.) in trockenem THF

(30 mL) wurde innerhalb 15 min bei 0 °C Methylmagnesiumbromid (3 M in Diethylether, 5.84 mL, 17.5 mmol, 3.00 Äq.) zugetropft. Der Reaktionsansatz wurde für 1.5 h bei 0 °C gerührt, anschließend mit einer gesättigten NH₄Cl-Lösung gequenchet und mit EtOAc (3 x 20 mL) extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. 7-Octen-2-on (**70**) wurde als leicht gelbes Öl in quantitativen Ausbeuten erhalten. Das Produkt wurde ohne weitere Reinigung für die Synthese von 2-Methyl-3-(pent-4-en-1-yl)-1*H*-pyrrol (**13u**) mittels Vorschrift A (6.4.1) verwendet. Der Reaktionsfortschritt wurde durch Dünnschichtchromatographie mit einer sauren *p*-Anisaldehyd Färbelösung verfolgt.



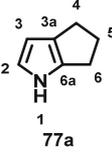
¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 1.35–1.43 (m, 2H, 5-H), 1.59 (p, ³J_{4,3} = 7.5 Hz, ³J_{4,5} = 7.5 Hz, 3H, 4-H), 2.0 (dt, ³J_{6,7} = 7.2 Hz, ³J_{6,5} = 7.2 Hz, 2H, 6-H), 2.14 (s, 3H, 1-H), 2.43 (t, ³J_{3,4} = 7.4 Hz, 2H, 3-H), 4.95 (dd, ³J_{8a,7} = 10.3 Hz, ²J_{8a,8b} = 1.2 Hz, 1H, 8-H_a), 5.01 (dd, ³J_{8b,7} = 17.1 Hz, ²J_{8b,8a} = 1.8 Hz, 1H, 8-H_b), 5.79 (ddt, ³J_{7,8b} = 16.9 Hz, ³J_{7,8a} = 10.2 Hz, ³J_{7,6} = 6.7 Hz, 1H, 7-H); **¹³C-NMR** (151 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 23.3 (C-4), 28.4 (C-5), 29.9 (C-1), 33.5 (C-6), 43.6 (C-3), 114.7 (C-8), 138.5 (C-7), 209.1 (C-2); **IR** (ATR-Film): $\tilde{\nu}$ [1/cm] = 3078, 2933, 2860, 1714, 1641, 1413, 1359, 1223, 1163, 995, 910, 722; **MS** (EI, 70 eV): 126 [M⁺], 111, 97, 83, 68, 58; t_R = 5.0 min.

6.4.1.2 Synthese der zyklischen Alkylpyrrole 77a–d



Die Synthese der zyklischen Alkylpyrrole (**77a–d**) erfolgte entsprechend der allgemeinen Vorschrift A für die Synthese der 2,3-Dialkylpyrrole (6.4.1) ausgehend von den zyklischen Ketonen **76a–d** als Edukte über die zyklische Oxime zum entsprechenden Pyrrol. Der Reaktionsfortschritt wurde durch Dünnschichtchromatographie mit einer sauren *p*-Anisaldehyd Färbelösung verfolgt.

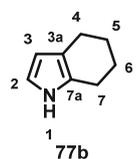
1,4,5,6-Tetrahydrocyclopenta[*b*]pyrrol (**77a**)



Der Vorschrift A für die Synthese von 2,3-Dialkylpyrrolen (6.4.1) folgend, wurde das Pyrrol **77a** aus Cyclopentanon hergestellt und nach säulenchromatographischer Reinigung [PE/Dichlormethan, 90:10 + 0.5 % (v/v) TEA] als oranger Feststoff (84 mg, 0.78 mmol, 2 %) erhalten. **¹H-NMR** (600 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 2.42 (tt, ³J_{5,4} = 7.1 Hz, ³J_{5,6} = 7.1 Hz, 2H, 5-H), 2.62 (t, ³J_{4,5} = 7.0 Hz, 2H, 4-H), 2.68 (t, ³J_{6,5} = 7.1 Hz, 2H, 6-H), 5.99 (dd, ³J_{3,2} = 3.0 Hz, ⁴J_{3,1} = 2.0 Hz, 1H, 3-H), 6.68 (dd, ³J_{2,3} = 3.0 Hz, ⁴J_{2,1} = 2.7 Hz, 1H, 2-H), 7.82 (brs, 1H, 1-NH); **¹³C-NMR** (151 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 25.2 (C-6), 25.3 (C-4), 29.4 (C-5), 104.0 (C-3), 120.2 (C-2),

126.7 (C-3a), 136.5 (C-6a); **IR** (ATR-Film): $\tilde{\nu}$ [1/cm] = 3373, 2946, 2853, 1674, 1576, 1489, 1451, 1337, 1300, 1132, 1061, 1036, 918, 828, 706; **MS** (EI, 70 eV): m/z = 107 [M^+], 106, 80; t_R = 7.5 min; **HRMS** (ESI-FTMS, positiv-Ion): Berechnet für $C_7H_{10}N$ ($M + H$)⁺ = 108.08078, gefunden = 108.08068.

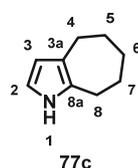
4,5,6,7-Tetrahydro-1H-indol (77b)



Der Vorschrift A für die Synthese von 2,3-Dialkylpyrrolen (6.4.1) folgend, wurde das Pyrrol **77b** aus Cyclohexanon hergestellt und nach säulenchromatographischer Reinigung [PE/Dichlormethan, 90:10 + 0.5 % (v/v) TEA] als oranger Feststoff (980 mg, 8.07 mmol, 44 %) erhalten. **¹H-NMR** (600 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 1.70–1.78 (m, 2H, 5-H), 1.78–1.86 (m, 2H, 6-H), 2.52 (t, $^3J_{4,5}$ = 6.1 Hz, 2H, 4-H), 2.57 (t, $^3J_{7,6}$ = 6.2 Hz, 2H, 7-H), 5.95–6.01 (m, 1H, 3-H), 6.58–6.64 (m, 1H, 2-H), 7.68 (brs, 1H, 1-NH); **¹³C-NMR** (151 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 22.8 (C-7), 22.9 (C-4), 23.5 (C-6), 23.9 (C-5), 107.4 (C-3), 115.6 (C-2), 116.9 (C-3a), 126.9 (C-7a); **IR** (ATR-Film): $\tilde{\nu}$ [1/cm] = 3354, 3100, 2919, 2846, 1661, 1585, 1539, 1479, 1467, 1443, 1360, 1315, 1235, 1206, 1166, 1140, 1086, 1051, 954, 914, 905, 833, 821, 707, 691, 663; **MS** (EI, 70 eV): m/z = 121 [M^+], 93, 80, 65; t_R = 8.6 min.

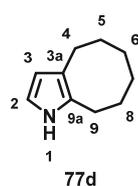
Die ¹H-NMR- und ¹³C-NMR Daten stimmen mit der Literatur überein.^[181]

1,4,5,6,7,8-Hexahydrocyclohepta[b]pyrrol (77c)



Der Vorschrift A für die Synthese von 2,3-Dialkylpyrrolen (6.4.1) folgend, wurde das Pyrrol **77c** aus Cycloheptanon hergestellt und nach säulenchromatographischer Reinigung [PE/Dichlormethan, 85:15 + 0.5 % (v/v) TEA] als oranger Feststoff (733 mg, 5.42 mmol, 36 %) erhalten. **¹H-NMR** (600 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 1.67 (m_c, 4H, 6-, 5-H), 1.76–1.82 (m, 2H, 7-H), 2.58 (m_c, 2H, 4), 2.67 (m_c, 2H, 8-H), 5.97 (dd, $^3J_{3,2}$ = 3.2 Hz, $^4J_{3,1}$ = 2.6 Hz, 1H, 3-H), 6.46 (dd, $^3J_{2,3}$ = 3.0 Hz, $^4J_{2,1}$ = 2.6 Hz, 1H, 2-H), 7.71 (brs, 1H, 1-NH); **¹³C-NMR** (151 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 27.9, 28.4, 29.2, 29.3, 32.0 (C-7), 110.3 (C-3), 113.2 (C-2), 121.4 (C-3a), 130.4 (C-8a); **IR** (ATR-Film): $\tilde{\nu}$ [1/cm] = 3348, 2918, 2878, 2837, 1558, 1476, 1441, 1368, 1335, 1235, 1195, 1156, 1127, 1096, 1079, 1053, 958, 903, 834, 823, 796, 720, 693, 660; **MS** (EI, 70 eV): m/z = 135 [M^+], 106, 93, 80, 65; t_R = 9.6 min.

4,5,6,7,8,9-Hexahydro-1H-cycloocta[b]pyrrol (77d)



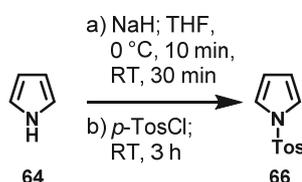
Der Vorschrift A für die Synthese von 2,3-Dialkylpyrrolen (6.4.1) folgend, wurde das Pyrrol **77d** aus Cyclooctanon hergestellt und nach säulenchromatographischer Reinigung [PE/Dichlormethan, 90:10 + 0.5 % (v/v) TEA] als oranger Feststoff (646 mg, 4.33 mmol, 41 %) erhalten. **¹H-NMR** (600 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 1.43 (m_c, 4H, 7-, 6-H), 1.54 (m_c, 4H, 8-, 5-H), 2.58 (m_c, 2H, 4-H), 2.68 (m_c, 2H, 9-H), 5.95 (dd, $^3J_{3,2}$ = 4.1 Hz,

$^4J_{3,1} = 2.7$ Hz, 1H, 3-H), 6.56 (dd, $^3J_{2,3} = 4.0$ Hz, $^4J_{2,1} = 2.7$ Hz, 1H, 2-H), 7.69 (brs, 1H, 1-NH); $^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 25.0 (C-4), 25.6 (C-9), 25.6 (C-6), 26.0 (C-7), 29.7 (C-8), 30.7 (C-5), 109.2 (C-3), 114.2 (C-2), 119.1 (C-3a), 128.5 (C-9a); IR (ATR-Film): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3329, 2915, 2846, 1678, 1565, 1481, 1453, 1438, 1362, 1337, 1265, 1233, 1201, 1171, 1129, 1103, 1067, 1052, 975, 951, 902, 883, 861, 843, 778 746, 723, 695, 669; MS (EI, 70 eV): $m/z = 149$ [M^+], 34, 120, 106, 93, 94, 80, 65, 53; $t_{\text{R}} = 10.2$ min.

Die $^1\text{H-NMR}$ Daten stimmen mit der Literatur überein.^[356]

6.4.2 Vorschrift B für die Synthese der 3-Alkylpyrrole 13n–s

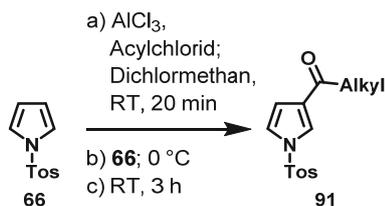
N-Tosylpyrrol (66)



N-Tosylpyrrol (**66**) wurde unter Schutzgasatmosphäre in einem Zweihalskolben hergestellt. Zu einer Lösung aus Natriumhydrid (1.43 g, 59.6 mmol, 2.00 Äq.) in trockenem THF (16 mL) wurde vorsichtig 1*H*-Pyrrol (**64**, 2.07 mL, 29.8 mmol, 1.00 Äq.) innerhalb 10 min bei 0 °C hinzugegeben. Der Reaktionsansatz wurde für 30 min bei RT gerührt und anschließend in THF (8 mL) gelöstes *p*-Toluolsulfonsäurechlorid (5.68 g, 29.8 mmol, 1.00 Äq.) hinzugegeben. Die Reaktionsmischung wurde für 3 h bei RT gerührt, danach durch langsame und vorsichtige Zugabe von Wasser bei 0 °C gequenchet und mit Dichlormethan (3 x 30 mL) extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das *N*-Tosylpyrrol (**66**) wurde als weißlich-grauer Feststoff (6.13 g, 28.0 mmol, 93 %) erhalten. Der Reaktionsfortschritt wurde durch Dünnschichtchromatographie mit einer sauren *p*-Anisaldehyd Färbelösung verfolgt.

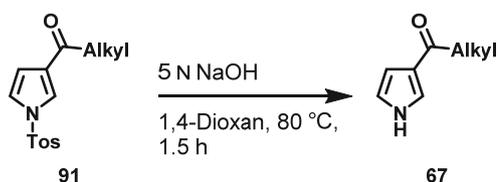
$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 2.40 (s, 3H, 7'-H), 6.28 (dd, $^3J_{3,2} = 2.3$ Hz, $^3J_{3,4} = 2.3$ Hz, $^3J_{4,3} = 2.3$ Hz, $^3J_{4,5} = 2.3$ Hz, 2H, 3-, 4-H), 7.15 (dd, $^3J_{2,3} = 2.3$ Hz, $^3J_{2,4} = 2.3$ Hz, $^3J_{5,3} = 2.3$ Hz, $^3J_{5,4} = 2.3$ Hz, 2H, 2-, 5-H), 7.28 (d, $^3J_{3',2'} = 8.3$ Hz, $^3J_{5',6'} = 8.3$ Hz, 2H, 3'-, 5'-H), 7.74 (d, $^3J_{2',3'} = 8.3$ Hz, $^3J_{6',5'} = 8.3$ Hz, 2H, 2'-, 6'-H); $^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 21.6 (C-7'), 113.5 (C-3, -4), 120.7 (C-2, -5), 126.8 (C-2', -6'), 130.0 (C-3', -5'), 136.2 (C-1'), 144.9 (C-4'); IR (ATR-Film): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3142, 1596, 1538, 1494, 1459, 1401, 1360, 1309, 1292, 1182, 1169, 1078, 1058, 1034, 1016, 935, 812, 797, 755, 717, 702, 671; MS (EI, 70 eV): $m/z = 221$ [M^+], 155, 91, 65; $t_{\text{R}} = 11.0$ min.

Die $^1\text{H-NMR}$ -, $^{13}\text{C-NMR}$ -, IR- und MS Daten stimmen mit der Literatur überein.^[357]

Allgemeine Vorschrift zur Synthese von 3-Acyl-*N*-tosylpyrrolen **91**

3-Acyl-*N*-tosylpyrrole **91** wurden nach einer modifizierten Vorschrift von *Katritzky et al.* (2003) und *Huffmann et al.* (2008) hergestellt.^[358, 359]

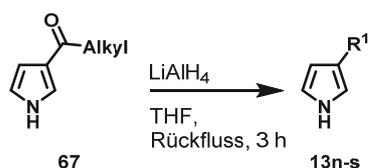
Die Reaktion wurde in einem *Schlenk*-Kolben unter Schutzgasatmosphäre durchgeführt. Zu einer Lösung aus wasserfreiem AlCl_3 (3 Äq.) in trockenem Dichlormethan [3.32 mL/mmol *N*-Tosylpyrrol (**66**)] wurde bei RT langsam das entsprechende Acylchlorid (2 Äq.) hinzugegeben. Die resultierende Lösung wurde für 20 min gerührt; anschließend wird eine Lösung des *N*-Tosylpyrrols (**66**, 1 Äq.) in trockenem Dichlormethan [2.21 mL/mmol *N*-Tosylpyrrol (**66**)] bei 0 °C langsam hinzugegeben. Der Reaktionsansatz wurde für 3 h bei RT gerührt, danach durch langsame und vorsichtige Zugabe von Eiswasser gequenchet und das Produkt mit Dichlormethan (3 x 15 mL) extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Die 3-Acyl-*N*-tosylpyrrole **91** wurden ohne weitere Reinigung für das Folgeexperiment verwendet. Der Reaktionsfortschritt wurde durch Dünnschichtchromatographie mit einer sauren *p*-Anisaldehyd Färbelösung verfolgt.

Allgemeine Vorschrift für die Synthese von 3-Acylpyrrolen **67**

3-Acylpyrrole **67** wurden nach einer modifizierten Vorschrift von *Kakushima et al.* (1983) hergestellt.^[360]

Eine Lösung aus 3-Acyl-*N*-tosylpyrrol **91** (1 Äq.) in 1,4-Dioxan (3.33 mL/mmol 3-Acyl-*N*-tosylpyrrol) und 5 N NaOH (3.33 mL/mmol 3-Acyl-*N*-tosylpyrrol) wurde für 1.5 h bei 80 °C in einem Rundkolben unter Schutzgasatmosphäre gerührt. Der Reaktionsansatz wurde mit Dichlormethan (3 x 10 mL) und EtOAc (1 x 10 mL) extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Die 3-Acylpyrrole **67** wurden ohne weitere Reinigung für das Folgeexperiment verwendet. Der Reaktionsfortschritt wurde durch Dünnschichtchromatographie mit einer sauren *p*-Anisaldehyd Färbelösung verfolgt.

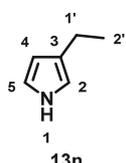
Allgemeine Vorschrift für die Synthese von 3-Alkylpyrrolen 13n–s



3-Alkylpyrrole **13n–s** wurden nach einer modifizierten Vorschrift von *He et al.* (2011) hergestellt.^[361]

Die Reaktion wurde in einem *Schlenk*-Kolben mit Rückflusskühler unter Schutzgasatmosphäre durchgeführt. Zu einer Lösung des 3-Acylpyrrols (**67**, 1 Äq.) in trockenem THF (4 mL/mmol 3-Acylpyrrol) wurde langsam LiAlH₄ (2 Äq.) bei 0°C hinzugegeben. Anschließend wurde der Reaktionsansatz für 1.5 h zum Rückfluss erhitzt und eine zweite Charge LiAlH₄ (2 Äq.) bei 0°C hinzugegeben. Der Reaktionsansatz wurde erneut für 1.5 h zum Rückfluss erhitzt und anschließend mit einer gesättigten NaSO₄-Lösung bei 0°C gequenchet. Das Reaktionsgemisch wurde mit Dichlormethan (3 x 30 mL) extrahiert, die vereinten organischen Phasen über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Die anschließende säulenchromatographische Reinigung [PE/Dichlormethan, 75:25 + 1% (v/v) TEA] ergab die 3-Alkylpyrrole **13n–s** als leicht gelbe Öle oder Feststoffe. Der Reaktionsfortschritt wurde durch Dünnschichtchromatographie mit einer sauren *p*-Anisaldehyd Färbelösung verfolgt.

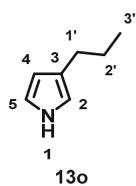
3-Ethyl-1H-pyrrol (13n)



Der Vorschrift B für die Synthese von 3-Alkylpyrrolen (6.4.2) folgend, wurde das Pyrrol **13n** aus 1-Tosyl-1H-pyrrol und Acetylchlorid hergestellt und nach säulenchromatographischer Reinigung [PE/Dichlormethan, 85:15 + 1% (v/v) TEA] als leicht gelbes Öl (123 mg, 1.29 mmol, 57%) erhalten.

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 1.21 (t, ³J_{2,1'} = 7.6 Hz, 3H, 2'-H), 2.53 (q, ³J_{1',2'} = 7.6 Hz, 2H, 1'-H), 6.09–6.15 (m, 1H, 4-H), 6.57–6.61 (m, 1H, 2-H), 6.71–6.75 (m, 1H, 5-H), 7.98 (brs, 1H, 1-NH); ¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 15.3 (C-2'), 20.0 (C-1'), 108.2 (C-4), 114.3 (C-2), 117.7 (C-5), 126.3 (C-3); IR (ATR-Film): $\tilde{\nu}$ [1/cm] = 3402, 2962, 2928, 2858, 1718, 1462, 1379, 1279, 1127, 1068, 965, 930, 888, 837, 762, 704, 665; MS (EI, 70 eV): *m/z* = 95 [M⁺], 80, 53; t_R = 4.6 min.

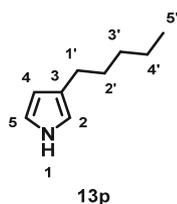
Die ¹H-NMR Daten stimmen mit der Literatur überein.^[362]

3-Propyl-1*H*-pyrrol (13o)

Der Vorschrift B für die Synthese von 3-Alkylpyrrolen (6.4.2) folgend, wurde das Pyrrol **13o** aus 1-Tosyl-1*H*-pyrrol und Propionsäurechlorid hergestellt und nach säulenchromatographischer Reinigung [PE/Dichlormethan, 75:25 + 1% (v/v) TEA] als leicht gelbes Öl (161 mg, 1.48 mmol, 66%) erhalten.

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 0.95 (t, ³J_{3',2'} = 7.3 Hz, 3H, 3'-H), 1.54–1.66 (m, 2H, 2'-H), 2.46 (t, ³J_{1',2'} = 7.6 Hz, 2H, 1'-H), 6.07–6.11 (m, 1H, 4-H), 6.55–6.59 (m, 1H, 2-H), 6.69–6.74 (m, 1H, 5-H), 7.97 (brs, 1H, 1-NH); ¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 14.1 (C-3'), 24.3 (C-2'), 29.1 (C-1'), 108.6 (C-4), 114.9 (C-2), 117.6 (C-5), 124.5 (C-3); IR (ATR-Film): $\tilde{\nu}$ [1/cm] = 3395, 2958, 2928, 2872, 1684, 1485, 1457, 1378, 1263, 1138, 1062, 961, 888, 839, 767, 710; MS (EI, 70 eV): *m/z* = 109 [M⁺], 94, 80, 67, 53; t_R = 5.6 min.

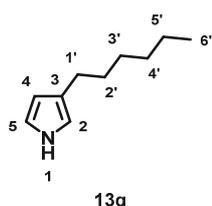
Die ¹³C-NMR Daten stimmen mit der Literatur überein.^[363]

3-Pentyl-1*H*-pyrrol (13p)

Der Vorschrift B für die Synthese von 3-Alkylpyrrolen (6.4.2) folgend, wurde das Pyrrol **13p** aus 1-Tosyl-1*H*-pyrrol und Pentansäurechlorid hergestellt und nach säulenchromatographischer Reinigung [PE/Dichlormethan, 75:25 + 1% (v/v) TEA] als leicht gelbes Öl (233 mg, 1.70 mmol, 40%) erhalten.

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 0.89 (t, ³J_{5',4'} = 6.2 Hz, 3H, 5'-H), 1.30–1.38 (m, 4H, 3', 4'-H), 1.54–1.64 (m, 2H, 2'-H), 2.48 (t, ³J_{1',2'} = 7.7 Hz, 2H, 1'-H), 6.07–6.12 (m, 1H, 4-H), 6.55–6.59 (m, 1H, 2-H), 6.69–6.74 (m, 1H, 5-H), 7.97 (brs, 1H, 1-NH); ¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 14.1 (C-5'), 22.6 (C-4'), 26.9 (C-1'), 30.9 (C-2'), 31.8 (C-3'), 108.6 (C-4), 114.8 (C-2), 117.6 (C-5), 124.7 (C-3); IR (ATR-Film): $\tilde{\nu}$ [1/cm] = 3396, 2957, 2925, 2856, 1710, 1485, 1466, 1379, 1290, 1138, 1061, 960, 920, 887, 841, 766, 707; MS (EI, 70 eV): *m/z* = 137 [M⁺], 122, 108, 94, 80, 67, 53; t_R = 7.7 min; HRMS (ESI-FTMS, positiv-Ion): Berechnet für C₉H₁₆N (M + H)⁺ = 138.12773, gefunden = 138.12780.

Die ¹³C-NMR Daten stimmen mit der Literatur überein.^[363]

3-Hexyl-1*H*-pyrrol (13q)

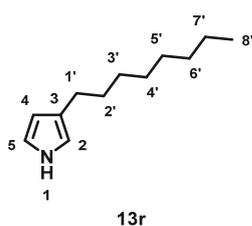
Der Vorschrift B für die Synthese von 3-Alkylpyrrolen (6.4.2) folgend, wurde das Pyrrol **13q** aus 1-Tosyl-1*H*-pyrrol und Hexansäurechlorid hergestellt und nach säulenchromatographischer Reinigung [PE/EtOAc, 95:5 + 1% (v/v) TEA] als leicht gelbes Öl (96 mg, 0.64 mmol, 67%) erhalten.

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 0.88 (t, ³J_{6',5'} = 6.9 Hz, 3H, 6'-H), 1.27–1.39 (m, 6H, 3', 4', 5'-H), 1.52–1.61 (m, 2H, 2'-H), 2.48 (t, ³J_{1',2'} = 7.8 Hz, 2H, 1'-H), 6.07–6.11 (m, 1H, 4-H), 6.55–6.58 (m, 1H, 2-H), 6.70–6.74 (m, 1H, 5-H), 7.97 (brs, 1H, 1-NH);

$^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 14.2 (C-6'), 22.7 (C-5'), 27.0 (C-1'), 29.3 (C-3'), 31.2 (C-2'), 31.8 (C-4'), 108.6 (C-4), 114.8 (C-2), 117.6 (C-5), 124.7 (C-3); **IR** (ATR-Film): $\tilde{\nu}$ [$1/\text{cm}$] = 3396, 2957, 2924, 2855, 1485, 1466, 1378, 1138, 1061, 955, 887, 840, 771, 707; **MS** (EI, 70 eV): m/z = 151 [M^+], 136, 122, 108, 94, 80, 67, 53; t_{R} = 8.7 min.

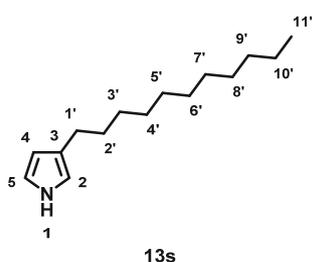
Die $^{13}\text{C-NMR}$ Daten stimmen mit der Literatur überein.^[363]

3-Octyl-1H-pyrrol (13r)



Der Vorschrift B für die Synthese von 3-Alkylpyrrolen (6.4.2) folgend, wurde das Pyrrol **13r** aus 1-Tosyl-1H-pyrrol und Octansäurechlorid hergestellt und nach säulenchromatographischer Reinigung [PE/Dichlormethan, 75:25 + 1% (v/v) TEA] als leicht gelber Feststoff (235 mg, 1.31 mmol, 58%) erhalten. $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 0.88 (t, $^3J_{8',7'} = 6.8$ Hz, 3H, 8'-H), 1.23–1.37 (m, 10H, 3', 4', 5', 6', 7'-H), 1.54–1.61 (m, 2H, 2'-H), 2.48 (t, $^3J_{1',2'} = 7.8$ Hz, 2H, 1'-H), 6.07–6.11 (m, 1H, 4-H), 6.55–6.59 (m, 1H, 2-H), 6.69–6.74 (m, 1H, 5-H), 7.97 (brs, 1H, 1-NH); $^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 14.1 (C-8'), 22.7 (C-7'), 27.0 (C-1'), 29.4, 29.6, 29.6, 31.3 (C-2'), 31.9 (C-6'), 108.6 (C-4), 114.8 (C-2), 117.6 (C-5), 124.7 (C-3); **IR** (ATR-Film): $\tilde{\nu}$ [$1/\text{cm}$] = 3394, 2956, 2923, 2854, 1465, 1378, 1062, 958, 887, 839, 767, 708; **MS** (EI, 70 eV): m/z = 179 [M^+], 150, 136, 122, 108, 94, 80, 67, 53; t_{R} = 10.1 min; **HRMS** (ESI-FTMS, positiv-Ion): Berechnet für $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{N}$ ($\text{M} + \text{H}$) $^+$ = 180.17468, gefunden = 180.17468.

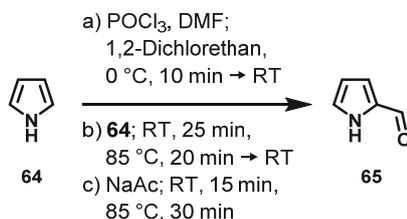
3-Undecyl-1H-pyrrol (13s)



Der Vorschrift B für die Synthese von 3-Alkylpyrrolen (6.4.2) folgend, wurde das Pyrrol **13s** aus 1-Tosyl-1H-pyrrol und Undecansäurechlorid hergestellt und nach säulenchromatographischer Reinigung [PE/EtOAc, 95:5 + 1% (v/v) TEA] als leicht gelber Feststoff (120 mg, 0.54 mmol, 46%) erhalten. $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 0.88 (t, $^3J_{11',10'} = 6.9$ Hz, 3H, 11'-H), 1.24–1.36 (m, 16H, 3', 4', 5', 6', 7', 8', 9', 10'-H), 1.53–1.60 (m, 2H, 2'-H), 2.48 (t, $^3J_{1',2'} = 7.8$ Hz, 2H, 1'-H), 6.07–6.11 (m, 1H, 4-H), 6.55–6.59 (m, 1H, 2-H), 6.69–6.74 (m, 1H, 5-H), 7.97 (brs, 1H, 1-NH); $^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 14.1 (C-11'), 22.7, 27.0 (C-1'), 29.4, 29.6, 29.6, 29.7, 29.7, 29.7, 31.3 (C-2'), 31.9, 108.6 (C-4), 114.8 (C-2), 117.6 (C-5), 124.7 (C-3); **IR** (ATR-Film): $\tilde{\nu}$ [$1/\text{cm}$] = 3393, 2922, 2853, 1466, 1378, 1138, 1062, 957, 887, 838, 768, 708; **MS** (EI, 70 eV): m/z = 221 [M^+], 192, 178, 164, 150, 136, 122, 108, 106, 94, 80, 67, 53; t_{R} = 11.3 min; **HRMS** (ESI-FTMS, positiv-Ion): Berechnet für $\text{C}_{15}\text{H}_{28}\text{N}$ ($\text{M} + \text{H}$) $^+$ = 222.22163, gefunden = 222.22171.

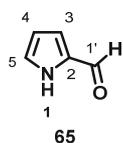
6.4.3 Vorschrift C für die Synthese von 2-Methyl-1H-pyrrol (13b)

1H-Pyrrol-2-carbaldehyd (65)



1H-Pyrrol-2-carbaldehyd (**65**) wurde nach einer Vorschrift von *Law* und *McErlean* (2013) hergestellt.^[364]

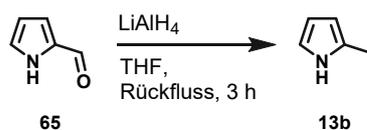
Die Reaktion wurde unter Schutzgasatmosphäre in einem Zweihalskolben mit Rückflusskühler durchgeführt. POCl₃ (1.03 mL, 11.0 mmol, 1.10 Äq.) wurde langsam zu *N,N*-Dimethylformamid (848 µL, 11.0 mmol, 1.10 Äq.) bei 0 °C zugegeben und nach 10 min auf RT erwärmt. Das resultierende *Vilsmeier* Reagenz wurde mit 1,2-Dichlorethan (5 mL) verdünnt und nach 10 min erneut auf 0 °C abgekühlt. 1H-Pyrrol (**64**, 707 µL, 10.0 mmol, 1.00 Äq.) wurde mit 1,2-Dichlorethan (4 mL) verdünnt und langsam zum *Vilsmeier* Reagenz über 25 min mittels einer Spritzenpumpe zugetropft. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch für 20 min bei 85 °C zum Rückfluss erhitzt und daraufhin auf RT abgekühlt. NaOAc (7.4 g, 90 mmol, 9.0 Äq.) wurde in Wasser (15 mL) gelöst, langsam innerhalb 15 min zum Reaktionsansatz zugegeben und dieser wiederum für 30 min auf 85 °C erhitzt. Anschließend wurde der Reaktionsansatz auf RT abgekühlt, und mit Diethylether (3 x 15 mL) extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden mit einer gesättigten NaHCO₃-Lösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Die anschließende säulenchromatographische Reinigung [PE/EtOAc, 80:20 + 1 % (v/v) TEA] ergab 1H-Pyrrol-2-carbaldehyd (**65**, 901 mg, 9.47 mmol, 95 %) als farbloses Öl, welches langsam als farbloser Feststoff auskristallisierte. Der Reaktionsfortschritt wurde durch Dünnschichtchromatographie mit einer sauren *p*-Anisaldehyd Färbelösung verfolgt.



¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 6.33–6.38 (m, 1H, 4-H), 6.98–7.03 (m, 1H, 3-H), 7.15–7.19 (m, 1H, 5-H), 9.52 (s, 1H, 1'-H), 10.14 (brs, 1H, 1-NH); **¹³C-NMR** (151 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 111.4 (C-4), 121.6 (C-3), 126.7 (C-5), 132.9 (C-2), 179.4 (C-1'); **IR** (ATR-Film): $\tilde{\nu}$ [1/cm] = 3266, 2983, 2831, 1726, 1623, 1551, 1439, 1402,

1351, 1310, 1251, 1133, 1091, 1035, 965, 880, 847, 745; **MS** (EI, 70 eV): m/z = 95 [M⁺], 66; t_R = 5.4 min.

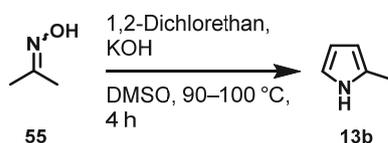
Die ¹H-NMR- und ¹³C-NMR Daten stimmen mit der Literatur überein.^[364]

2-Methyl-1*H*-pyrrol (**13b**)

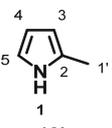
Methode 1

2-Methyl-1*H*-pyrrol (**13b**) wurde nach der allgemeinen Vorschrift für die Synthese von 3-Alkylpyrrolen **13n–s** aus 1*H*-Pyrrol-2-carbaldehyd (**65**) hergestellt. Die säulenchromatographische Reinigung [PE/Dichlormethan, 75:25 + 1 % (v/v) TEA] des Rohproduktes ergab 2-Methyl-1*H*-pyrrol (**13b**, 667 mg, 8.22 mmol, 49%) als leicht gelbes Öl. Der Reaktionsfortschritt wurde durch Dünnschichtchromatographie mit einer sauren *p*-Anisaldehyd Färbelösung verfolgt.

Methode 2



Der Vorschrift A für die Synthese von 2,3-Dialkylpyrrolen (6.4.1) folgend, wurde das Pyrrol **13b** aus Acetonoxim (**55b**) hergestellt und nach säulenchromatographischer Reinigung [PE/Dichlormethan, 75:25 + 1 % (v/v) TEA] als leicht gelbes Öl (243 mg, 3.00 mmol, 22 %) erhalten.

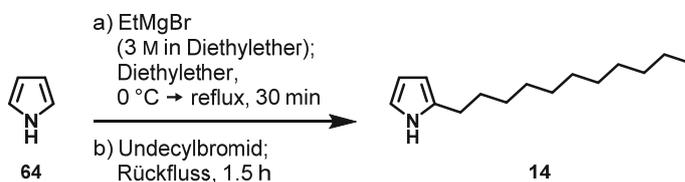

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 2.28 (s, 3H, 1'-H), 5.87–5.92 (m, 1H, 4-H), 6.09–6.14 (m, 1H, 3-H), 6.62–6.67 (m, 1H, 5-H), 7.86 (brs, 1H, 1-NH);
¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 13.0 (C-1'), 105.9 (C-4), 108.5 (C-3), 116.2 (C-5), 127.6 (C-2); IR (ATR-Film): $\tilde{\nu}$ [1/cm] = 3379, 3098, 2918, 1717, 1572, 1460, 1413, 1381, 1270, 1234, 1118, 1095, 1026, 978, 951, 885, 781, 706; MS (EI, 70 eV): *m/z* = 81 [M⁺], 80, 53; *t_R* = 3.5 min.

Die ¹H-NMR- und ¹³C-NMR Daten stimmen mit der Literatur überein.^[181]

6.4.4 Synthesen von 2-Undecyl-1H-pyrrol (14, 2-Undecylpyrrol, 2-UP)

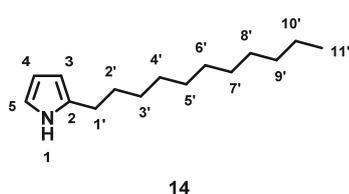
Methode 1: Einstufige Synthese

2-Undecyl-1H-pyrrol (14)



2-Undecyl-1H-pyrrol (14) wurde nach einer modifizierten Vorschrift von *Wasserman et al.* (1976) hergestellt.^[286]

Die Synthese wurde in einem *Schlenk*-Kolben unter Schutzgasatmosphäre hergestellt. Pyrrol (64, 294 μ L, 4.25 mmol, 1.00 Äq.) wurde langsam zu einer Lösung von EtMgBr (3 M in Diethylether, 51.4 mL, 4.25 mmol, 1.00 Äq.) bei 0 °C zugetropft (Vorsicht: Gasentwicklung) und anschließend für 30 min zum Rückfluss erhitzt. Undecylbromid (948 μ L 4.25 mmol, 1.00 Äq.) wurde in trockenem Diethylether (1.7 mL) gelöst und über 30 min zum Reaktionsansatz zugetropft. Dieser wurde für eine weitere Stunde zum Rückfluss erhitzt und änderte seine Farbe von dunkelbraun nach schwarz. Die Reaktion wurde mit einer gesättigten NH_4Cl -Lösung gequenchet und mit Diethylether (3 x 20 mL) extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Die anschließende säulenchromatographische Reinigung [PE/EtOAc, 99:1 + 1 % (v/v) TEA → PE/EtOAc, 80:20 + 1 % (v/v) TEA] des schwarzen Rohproduktes ergab 2-Undecyl-1H-pyrrol (14, 313 mg, 1.41 mmol, 33 %) als leicht hellbraunes Öl, welches langsam als hellbrauner Feststoff auskristallisierte. Der Reaktionsfortschritt wurde durch Dünnschichtchromatographie mit einer sauren *p*-Anisaldehyd Färbelösung verfolgt.



$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 0.88 (t, $^3J_{11',10'} = 6.9$ Hz, 3H, 11'-H), 1.21–1.38 (m, 16H, 3', 4', 5', 6', 7', 8', 9', 10'-H), 1.61 (p, $^3J_{2',1'} = 7.5$ Hz, $^3J_{2',3'} = 7.5$ Hz, 2H, 2'-H), 2.59 (t, $^3J_{1',2'} = 7.7$ Hz, 2H, 1'-H), 5.89–5.93 (m, 1H, 3-H), 6.11–6.15 (m, 1H, 4-H), 6.64–6.67 (m, 1H, 5-H), 7.88 (brs, 1H, 1-NH);

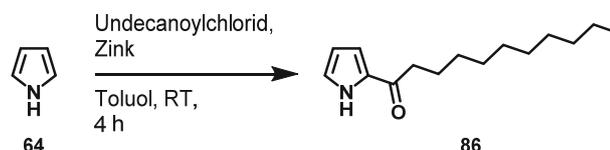
$^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 14.1 (C-11'), 22.7 (C-10'), 27.8 (C-1'), 29.4*, 29.4*, 29.5, 29.6*, 29.6*, 29.7*, 29.7*, 29.7*, 31.9 (C-9'), 104.9 (C-3), 108.2 (C-4), 115.9 (C-5), 132.9 (C-2);

IR (ATR-Film): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3352, 3107, 2957, 2918, 2873, 2848, 1566, 1473, 1464, 1423, 1376, 1357, 1322, 1252, 1168, 1113, 1095, 1077, 1022, 995, 958, 886, 867, 781, 770, 729, 718; MS (EI, 70 eV): $m/z = 221$ [M^+], 206, 192, 178, 164, 150, 136, 122, 108, 94, 80, 67, 53; $t_R = 10.9$ min.

* Die Signale haben eine sehr geringe Differenz.

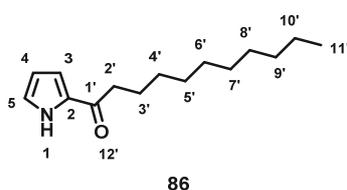
Die $^1\text{H-NMR}$ - und $^{13}\text{C-NMR}$ Daten stimmen mit der Literatur überein.^[365]

Methode 2: Zweistufige Synthese

1-(1*H*-Pyrrol-2-yl)undecan-1-on (**86**)

1-(1*H*-Pyrrol-2-yl)undecan-1-on (**86**) wurde nach einer Vorschrift von *Yadav et al.* (2002) hergestellt.^[284]

Die Synthese wurde in einem Rundkolben unter Schutzgasatmosphäre durchgeführt. 1*H*-Pyrrol (**64**, 213 μ L, 3.08 mmol, 1 Äq.), Undecanoylchlorid (1.02 mL, 4.62 mmol, 1.50 Äq.) und Zinkpulver (403 mg, 6.16 mmol, 2.00 Äq.) wurden bei 0°C zu Toluol (5 mL) hinzugeben und anschließend für 4 h bei RT gerührt. Die Reaktion wurde mit einer gesättigten NaHCO₃-Lösung (6 mL) gequenchet und mit EtOAc (3 x 10 mL) extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Die anschließende säulenchromatographische Reinigung [PE/EtOAc, 90:10 + 1% (v/v) TEA] ergab 1-(1*H*-Pyrrol-2-yl)undecan-1-on (**86**, 387 mg, 1.64 mmol, 53%) als braunen Feststoff. Der Reaktionsfortschritt wurde durch Dünnschichtchromatographie mit einer sauren *p*-Anisaldehyd Färbelösung verfolgt.

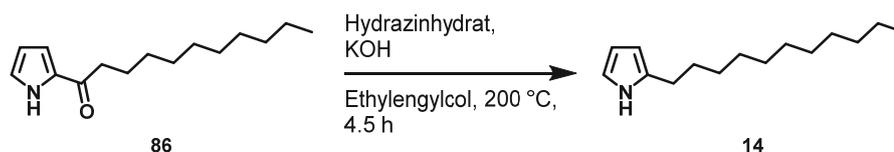


¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 0.88 (t, ³*J*_{11',10'}} = 7.0 Hz, 3H, 11'-H), 1.23–1.38 (m, 14H, 4', 5', 6', 7', 8', 9', 10'-H), 1.72 (p, ³*J*_{3',2'}} = 7.2 Hz, ³*J*_{3',4'}} = 7.2 Hz, 2H, 3'-H), 2.75 (t, ³*J*_{2',3'}} = 7.6 Hz, 2H, 2'), 6.25–6.30 (m, 1H, 4-H), 6.91 (ddd, ³*J*_{3,4}} = 3.8 Hz, ⁴*J*_{3,5}} = 2.4 Hz, ⁵*J*_{3,1}} = 1.3 Hz, 1H, 3-H), 6.88–6.92 (m, 1H, 5-H), 9.52 (brs, 1H, 1-NH);

¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 14.1 (C-11'), 22.7, 25.3 (C-3'), 29.3, 29.5, 29.5*, 29.5*, 29.6, 31.9, 38.1 (C-2'), 110.5 (C-4), 115.9 (C-3), 124.3 (C-5), 132.1 (C-2), 191.2 (C-1'); IR (ATR-Film): $\tilde{\nu}$ [1/cm] = 3281, 2924, 2854, 1637, 1546, 1404, 1304, 1136, 1102, 1045, 924, 841, 746; MS (EI, 70 eV): *m/z* = 235 [M⁺], 178, 164, 150, 136, 122, 109, 94, 80, 66, 55; *t_R* = 11.4 min.

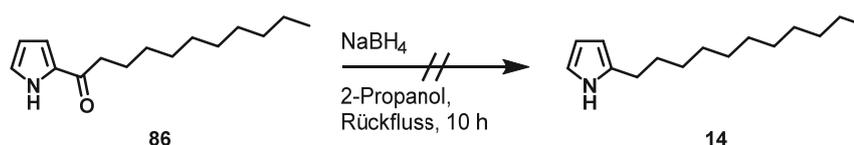
* Die Signale haben eine sehr geringe Differenz.

Die ¹H-NMR- und ¹³C-NMR Daten stimmen mit der Literatur überein.^[365]

2-Undecyl-1*H*-pyrrol (14)

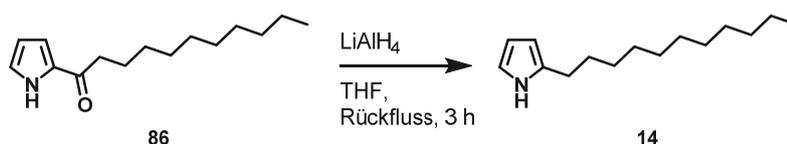
2-Undecyl-1*H*-pyrrol (14) wurde über eine *Wolff-Kishner*-Reduktion hergestellt.^[240, 241]

Die Reduktion von 1-(1*H*-Pyrrol-2-yl)undecan-1-on (86) wurde unter normaler Atmosphäre in einem Rundkolben mit Rückflusskühler durchgeführt. 1-(1*H*-Pyrrol-2-yl)undecan-1-on (86, 50 mg, 0.21 mmol, 1.0 Äq.) wurde mit Hydrazinhydrat [55 % (v/v) in Wasser, 240 µL, 4.25 mmol, 20.0 Äq.] und KOH (83 mg, 1.6 mmol, 7.5 Äq.) in Ethylenglycol (1.6 mL) für 4.5 h bei 200 °C gerührt. Anschließend wurde der Reaktionsansatz auf RT abgekühlt, mit Wasser verdünnt und mit Diethylether (3 x 10 mL) extrahiert. Die anschließende säulenchromatographische Reinigung [PE/EtOAc, 80:20 + 1 % (v/v) TEA] ergab 2-Undecyl-1*H*-pyrrol (14, 43 mg, 0.19 mmol, 91 %) als braunen Feststoff. Die Reaktion war nicht reproduzierbar und neigte zur Polymerisation.



2-Undecyl-1*H*-pyrrol (14) wurde nach einer Vorschrift von *Papireddy et al.* (2011) hergestellt.^[76]

Die Reduktion von 1-(1*H*-Pyrrol-2-yl)undecan-1-on (86) wurde in einem *Schlenk*-Kolben mit Rückflusskühler unter Schutzgasatmosphäre durchgeführt. 1-(1*H*-Pyrrol-2-yl)undecan-1-on (86, 50 mg, 0.21 mmol) wurde mit NaBH₄ (103 mg, 2.73 mmol, 13 Äq.) in 2-Propanol (1 mL) für 10 h zum Rückfluss erhitzt. Der Reaktionsansatz wurde durch Zugabe von Eiswasser (50 mL) gequenchet, die Lösung mit HCl [10 % (v/v)] angesäuert und mit Dichlormethan (3 x 10 mL) extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Anschließende Reaktionskontrolle mit IR und NMR zeigten nur die Bildung des sekundären Alkohols.

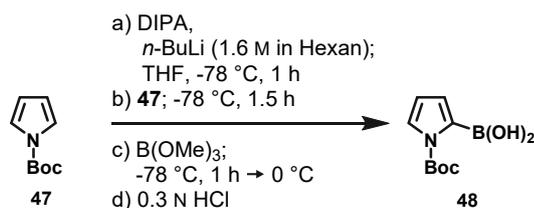


2-Undecyl-1*H*-pyrrol (14) wurde durch die Reduktion von 1-(1*H*-Pyrrol-2-yl)undecan-1-on (86, 597 mg, 2.54 mmol) nach der allgemeinen Vorschrift für die Synthese von 3-Alkylpyrrolen (6.4.2) hergestellt.

Die säulenchromatographische Reinigung [PE/Dichlormethan, 75:25 + 1% (v/v) TEA] des Rohproduktes ergab 2-Undecyl-1*H*-pyrrol (**14**, 355 mg, 1.60 mmol, 63%) als leicht brauner Feststoff. Der Reaktionsfortschritt wurde durch Dünnschichtchromatographie mit einer sauren *p*-Anisaldehyd Färbelösung verfolgt.

6.5 Synthesen von Boc-MBC (**46**) und MBC (**12**)

N-Boc-1*H*-Pyrrol-2-boronsäure (**48**)

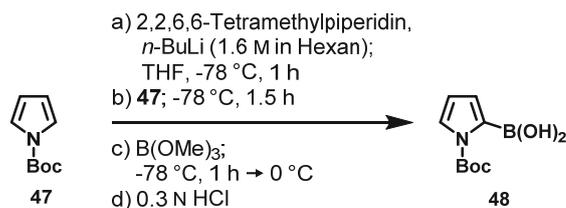


N-Boc-1*H*-Pyrrol-2-boronsäure (**48**) wurde nach einer modifizierten Vorschrift von *Böttger et al.* (2012) hergestellt.^[366]

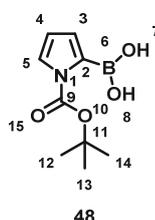
Methode 1

Die Reaktion wurde in einem *Schlenk*-Kolben mit Rückflusskühler unter Schutzgasatmosphäre durchgeführt. Zu *N,N*-Diisopropylamin (0.99 mL, 7.2 mmol, 1.1 Äq.) in trockenem THF (10 mL) wurde bei -78 °C langsam *n*-Butyllithium (1.6 M in Hexan, 4.5 mL, 7.2 mmol, 1.1 Äq.) zugetropft und für 1 h gerührt. Anschließend wurde *N*-Boc-1*H*-Pyrrol (**47**, 1.1 mL, 6.6 mmol, 1.0 Äq.) über 30 min zugegeben (der Reaktionsansatz wurde gelb) und für eine weitere Stunde bei -78 °C gerührt. Trimethylborat (1.1 mL, 9.7 mmol, 1.5 Äq.) wurde langsam zum Reaktionsansatz zugetropft und dieser über 1 h auf 0 °C gebracht. Es folgte eine Zugabe von 0.3 N HCl (15 mL) für die Freisetzung der Boronsäure. Das THF wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der Reaktionsansatz mit Diethylether (3 x 15 mL) extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer eingengt. Aus der Mutterlauge fiel bei 0 °C *N*-Boc-1*H*-Pyrrol-2-boronsäure (**48**) als farbloser Feststoff aus, welcher über einen *Whatman*TM Filter (Grade 3, Porengröße 6 µm) abfiltriert wurden. Der Feststoff wurde mit eiskaltem Diethylether gewaschen und *N*-Boc-1*H*-Pyrrol-2-boronsäure (**48**, 229 mg, 1.09 mmol, 17%) erhalten.

Methode 2



Die Reaktion wurde äquivalent zu Methode 1 durchgeführt, jedoch wurde statt *N,N*-Diisopropylamin 2,2,6,6-Tetramethylpiperidin für die Herstellung der Base verwendet. Aus der Mutterlauge fiel bei 0 °C *N*-1*H*-Boc-Pyrrol-2-boronsäure (**48**, 1.26 g, 6.95 mmol, 33 %) als farbloser Feststoff aus.



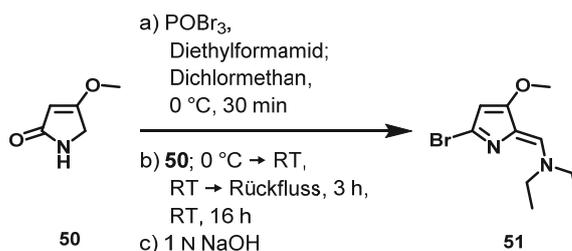
¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 1.62 (s, 9H, 12-, 13-, 14-H), 6.26 (dd, ³J_{4,3} = 3.2 Hz, ³J_{4,5} = 3.2 Hz, 1H, 4-H), 7.10 (dd, ³J_{3,4} = 3.3 Hz, ⁴J_{3,5} = 1.7 Hz, 1H, 3-H), 7.11–7.18 (m, 2H, 7-, 8-H), 7.45 (dd, ³J_{5,4} = 3.1 Hz, ⁴J_{5,3} = 1.6 Hz, 1H, 5-H); ¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 28.0 (C-14, -12, -13), 85.6 (C-11), 112.0 (C-4), 127.1 (C-5), 128.7 (C-3), 152.2 (C-9); IR (ATR-Film): $\tilde{\nu}$ [1/cm] = 3374, 3175, 2986, 1705, 1556, 1464, 1336, 1287, 1259, 1224, 1198, 1168, 1135, 1032, 987, 850, 775,

748; MS (EI, 70 eV): 167, 111, 94, 67, 57; t_R = 7.4 min.

Das ¹H-NMR Signal für die Hydroxygruppen variiert sehr stark zwischen unterschiedlichen Messungen.

Die ¹H-NMR-, ¹³C-NMR und IR Daten stimmen mit der Literatur überein.^[124]

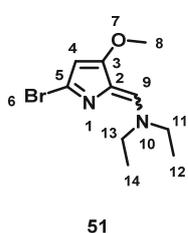
N-[(5-Brom-3-methoxy-2*H*-pyrrol-2-yliden)methyl]-*N*-diethylamin (**51**)



N-[(5-Brom-3-methoxy-2*H*-pyrrol-2-yliden)methyl]-*N*-diethylamin (**51**) wurde nach einer Vorschrift von *Dairi et al.* (2006) und *Haynes et al.* (2008) hergestellt.^[124, 139]

Die Reaktion wurde in einem *Schlenk*-Kolben mit Rückflusskühler unter Schutzgasatmosphäre durchgeführt. Zu einer Lösung aus POBr₃ (12.67 g, 44.20 mmol, 2.50 Äq.) in trockenem Dichlormethan (60 mL) wurde bei 0 °C langsam eine Lösung aus Diethylformamid (5.91 mL, 53.0 mmol, 3.00 Äq.) in trockenem Dichlormethan (20 mL) zugetropft. Der Reaktionsansatz wurde für 30 min bei 0 °C gerührt, wurde stark gelb und der *Vilsmeier* Komplex fiel als farbloser Feststoff aus. Eine Lösung aus 4-Methoxy-3-pyrrolin-2-on (**50**, 2.00 g, 17.7 mmol, 1.00 Äq.) in trockenem

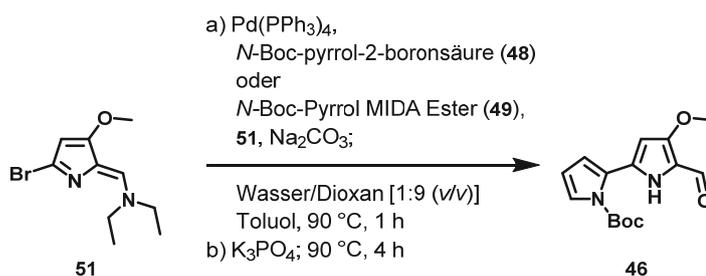
Dichlormethan (15 mL) wurde zum Reaktionsansatz zugetropft, dieser langsam auf RT erwärmt, für 2 h auf 40 °C erhitzt und für eine weitere Stunde bei 50 °C zum Rückfluss erhitzt. Anschließend wurde der Reaktionsansatz auf RT abgekühlt und für 16 h gerührt. Die Reaktion wurde mit Eiswasser (200 mL) verdünnt und die wässrige Phase mit 1 N NaOH neutralisiert. Nach Zugabe von EtOAc (80 mL) wurde das ausgefallene Phosphorsalz abfiltriert und der Reaktionsansatz mit EtOAc (3 x 80 mL) extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden mit einer gesättigten NaCl-Lösung (2 x 50 mL) und Wasser gewaschen, mit MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Die anschließende säulenchromatographische Reinigung [PE/EtOAc, 85:15 + 1 % (v/v) TEA] ergab das Produkt **51** (3.31 g, 12.8 mmol, 72 %, Lit. 59–83 %) [124, 130, 139, 140, 172] als leicht braunes Öl, welches langsam bei RT als Feststoff auskristallisierte. Der Reaktionsfortschritt wurde durch Dünnschichtchromatographie mit einer sauren *p*-Anisaldehyd Färbelösung verfolgt.



¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 1.27 (t, ³J_{14,13} = 7.1 Hz, 3H, 14-H), 1.30 (t, ³J_{12,11} = 7.1 Hz, 3H, 12-H), 3.39 (q, ³J_{11,12} = 7.1 Hz, 2H, 11-H), 3.76 (s, 3H, 8-H), 4.12 (q, ³J_{13,14} = 7.1 Hz, 2H, 13-H), 5.59 (s, 1H, 4-H), 6.99 (s, 1H, 9-H); **¹³C-NMR** (151 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 12.5 (C-14), 14.6 (C-12), 44.5 (C-13), 51.1 (C-11), 58.0 (C-8), 96.5 (C-4), 120.8 (C-2), 133.7 (C-5), 138.6 (C-9), 165.3 (C-3); **IR** (ATR-Film): $\tilde{\nu}$ [1/cm] = 2976, 2936, 1626, 1528, 1447, 1408, 1381, 1351, 1291, 1263, 1195, 1140, 1115, 1072, 995, 906, 856, 818, 737, 681, 668; **MS** (EI, 70 eV): *m/z* = 258 [M⁺], 243, 229, 215, 201, 185, 179, 163, 149, 135, 123, 108, 92, 78, 56; *t_R* = 11.5 min; **Schmelzpunkt**: 44–45 °C.

Die ¹H-NMR- und ¹³C-NMR Daten stimmen mit der Literatur überein. [140]

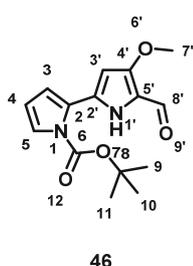
tert-Butyloxycarbonyl-5'-formyl-4'-methoxy-1*H*,1'*H*-(2,2'-bipyrrol) (**46**, Boc-MBC)



Boc-MBC (**46**) wurde nach einer modifizierten Vorschrift von Domröse, Klein *et al.* (2015) durch eine *Suzuki*-Kupplung hergestellt. [5]

Vor der Reaktion wurde aus Toluol und ein Gemisch aus Wasser/Dioxan [1:9 (v/v)] der Sauerstoff durch Begasen für 1 h mit Stickstoff entfernt. Die Reaktion wurde in einem *Schlenk*-Kolben mit Rückflusskühler unter Schutzgasatmosphäre durchgeführt. Tetrakis(triphenylphosphine)-palladium(0) (558 mg, 0.48 mmol, 5 mol-%) wurde in Toluol (4 mL) gelöst, *N*-Boc-1*H*-Pyrrol-2-boronsäure MIDA Ester (**49**, 4.91 g, 14.5 mmol, 1.50 Äq.) bzw.

N-Boc-1*H*-Pyrrol-2-boronsäure (**48**, 3.06 g, 14.5 mmol, 1.50 Äq.) und *N*-[(5-Brom-3-methoxy-4*H*-pyrrol-2-yliden)methyl]-*N*-diethylamin (**51**, 2.5 g, 9.7 mmol, 1.0 Äq.) hinzugegeben und in Dioxan/Wasser [9:1 (v/v), 73.2 mL] gelöst. Anschließend wurde Na₂CO₃ (3.07 g, 28.4 mmol, 3.00 Äq.) hinzugegeben und für 1 h auf 90 °C erhitzt, woraufhin der Reaktionsansatz dunkelgelb wurde. Anschließend wird K₃PO₄ (4.10g, 19.3 mmol, 2.00 Äq.) hinzugegeben und für eine weitere Stunde bei 90 °C gerührt, wobei die Farbe des Reaktionsansatzes sich zu dunkelorange veränderte. Es folgte eine zweite Zugabe von Tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (558 mg, 0.48 mmol, 5 mol-%) und der Reaktionsansatz wurde für weitere 1.5 h bei 90 °C gerührt. Der Reaktionsansatz wurde nach insgesamt 5 h durch Zugabe von Wasser (100 mL) und 2 N HCl (15 mL) gequencht (es entstand leichter weißer Rauch). Der Reaktionsansatz wurde mit Dichlormethan (3 x 100 mL) extrahiert, das Palladiumsalz über Celite abfiltriert, die vereinten organischen Phasen über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer eingengt. Das Rohprodukt wurde in Celite aufgenommen und nach säulenchromatographischer Reinigung [PE/EtOAc, 85:15 + 1 % (v/v) TEA] das Boc-MBC (**46**, 2.09 g, 7.20 mmol, 75 %, Lit. 48–95 %) [139, 172] erhalten. Der Reaktionsfortschritt wurde durch Dünnschichtchromatographie mit einer sauren *p*-Anisaldehyd Färbelösung verfolgt.

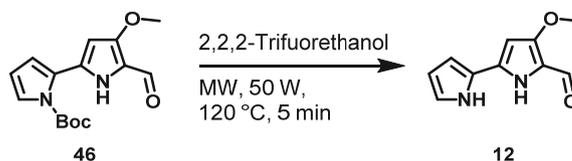


¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 1.62 (s, 9H, 9-, 10-, 11-H), 3.89 (s, 3H, 7'-H), 6.08 (d, ⁴J_{3',1'} = 2.9 Hz, 1H, 3'-H), 6.25 (dd, ³J_{4,3} = 3.5 Hz, ³J_{4,5} = 3.5 Hz, 1H, 4-H), 6.67 (dd, ³J_{3,4} = 3.6 Hz, ⁴J_{3,5} = 1.8 Hz, 1H, 3-H), 7.33 (dd, ³J_{5,4} = 3.4 Hz, ⁴J_{5,3} = 1.8 Hz, 1H, 5-H), 9.54 (s, 1H, 8'-H), 10.70 (brs, 1H, 1'-NH); ¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 27.9 (C-9, -10, -11), 57.9 (C-7'), 85.8 (C-8), 94.8 (C-3'), 111.5 (C-4), 116.9 (C-3), 118.3 (C-5'), 124.5 (C-5), 126.0 (C-2), 130.2 (C-2'), 149.7 (C-6), 157.6 (C-4'), 174.4 (C-8');

IR (ATR-Film): $\tilde{\nu}$ [1/cm] = 3206, 3156, 3013, 2978, 1744, 1597, 1545, 1504, 1477, 1460, 1445, 1429, 1389, 1366, 1304, 1285, 1254, 1231, 1190, 1171, 1159, 1140, 1082, 1059, 1015, 918, 878, 8429, 820, 768, 733, 593, 685, 640; MS (EI, 70 eV): *m/z* = 190 [(M-C₅H₉O₂)⁺], 172, 161, 146, 143, 131, 116, 108, 91, 63; t_R = 14.5 min; Schmelzpunkt: 146–148 °C.

Die ¹H-NMR-, ¹³C-NMR, MS und IR Daten stimmen mit der Literatur überein.^[172]

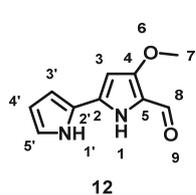
4-Methoxy-1*H*,1'*H*-(2,2'-bipyrrol)-5-carbaldehyd (**12**, MBC)



MBC (**12**) wurde unter normaler Atmosphäre in einer Synthesemikrowelle *CEM Discover* in einem geschlossenen 10 mL Mikrowellengefäß hergestellt.

Boc-MBC (**46**, 419 mg, 1.44 mmol) wurde in einem geschlossenen Mikrowellengefäß für 5 min bei 120 °C (50 W) in 2,2,2-Trifluoroethanol (3 mL) erhitzt. Beim anschließenden Abkühlen auf RT

kristallisierte das Produkt aus, die Reaktionslösung selbst war dunkel. Die anschließende säulenchromatographische Reinigung [Gradient PE/EtOAc, 60:40–100% EtOAc; anschließend Dichlormethan, + Gradient 2–10% (v/v) MeOH] ergab MBC (**12**, 247 mg, 1.30 mmol, 90%) als leicht gelbgrünlichen Feststoff.



¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 3.83 (s, 3H, 7-H), 6.12 (m_c, 1H, 4'-H), 6.27 (d, ⁴J_{3,1} = 2.3 Hz, 1H, 3-H), 6.75 (s, 1H, 3'-H), 6.90 (m_c, 1H, 5'-H), 9.30 (s, 1H, 8-H), 11.24 (brs, 1H, 1'-NH), 11.42 (brs, 1H, 1-NH); ¹³C-NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 57.8 (C-7), 90.9 (C-3), 108.3 (C-3'), 109.3 (C-4'), 117.4 (C-5), 120.4 (C-5'), 123.4 (C-2'), 133.3 (C-2), 158.7 (C-4),

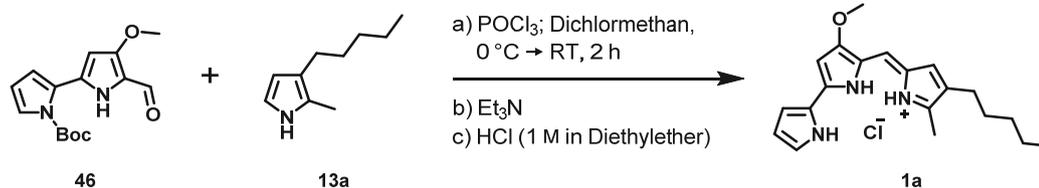
171.6 (C-8); IR (ATR-Film): $\tilde{\nu}$ [1/cm] = 3246, 3195, 2952, 2842, 1736, 1599, 1545, 1518, 1504, 1456, 1423, 1345, 1302, 1277, 1235, 1187, 1155, 1117, 1040, 1013, 974, 891, 829, 809, 771, 740, 694; MS (EI, 70 eV): *m/z* = 190 [M⁺], 172, 161, 143, 108, 91, 63; *t_R* = 14.5 min; HPLC (Chiralpak® IA; 250 mm x 4.6 mm, 5 μm; *n*-Heptan/2-Propanol 80:20; Flussrate 0.5 mL/min; λ = 365 nm): *t_R* = 14.65 min.

Die ¹H-NMR- und ¹³C-NMR Daten stimmen mit der Literatur überein.^[132]

6.6 Synthesen von Prodigininen

6.6.1 Vorschriften für die Kondensationsreaktion zu Prodigininen

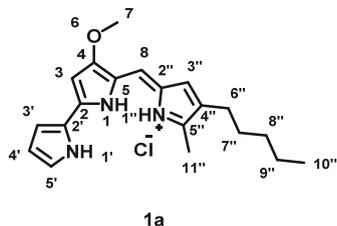
Methode 1



Prodigiosin (**1a**) wurde nach einer modifizierten Vorschrift von *Yu et al.* (2012) in einem Schlenk-Kolben unter Schutzgasatmosphäre hergestellt.^[193]

Zu einer Lösung aus Boc-MBC (**46**, 1 Äq.) und MAP (**13a**, 1.2 Äq.) in trockenem Dichlormethan [38.5 mL/mmol Boc-MBC (**46**)] wurde langsam Phosphoroxychlorid (10 Äq.) bei 0°C zugetropft. Der tiefrote Reaktionsansatz wurde für 2 h bei RT gerührt, durch Zugabe von TEA (1 Äq.) gequencht und mit Dichlormethan (3 x 50 mL) extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden mit einer gesättigten NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Die anschließende säulenchromatographische Reinigung [Dichlormethan, + Gradient 0.5–1% (v/v) 7 N NH₃ in MeOH] ergab das entsprechende Prodiginin als dunkelroten Feststoff. Das Produkt wurde in einer geringen Menge Diethylether aufgenommen, wenige Tropfen HCl (1 M in Diethylether) zugegeben und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Prodigiosin (**1a**) fiel als amorphes Hydrochlorid aus.

**4-Methoxy-5-[(5-methyl-4-pentyl-2*H*-pyrrol-2-ylidene)methyl]-1*H*,1'*H*-2,2'-bipyrrole·HCl
(1a, Prodigiosin)**



Chemische Synthese: Der Vorschrift für die Kondensationsreaktion zu Prodigininen (6.4.2, Methode 1) folgend, wurde das Prodiginin **1a** aus Boc-MBC (**46**) und MAP (**13a**) hergestellt und nach säulenchromatographischer Reinigung [Dichlormethan, + Gradient 0.5–2 % (v/v) MeOH] und Ausfällung als Hydrochlorid als tiefroter Feststoff (97.0 mg, 270 μ mol, 52 %) erhalten.

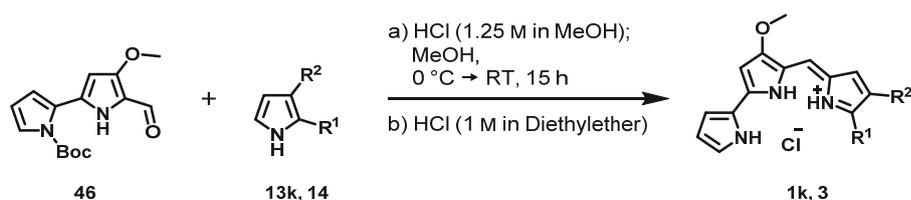
Biosynthese: Der Vorschrift für die Biosynthese und Extraktion von Prodigiosin (6.7.1, präparativer Maßstab) folgend, wurde Prodigiosin (**1a**) mit *P. putida* pig-r2 hergestellt und nach säulenchromatographischer Reinigung [Dichlormethan, + Gradient 0.5–2 % (v/v) MeOH] als tiefroter Feststoff (47 \pm 6 mg/L, 145 \pm 19 μ mol) erhalten.

Mutasyntese: Der allgemeinen Vorschrift für Mutasyntesen (6.7.4, präparativer Maßstab) folgend, wurde Prodigiosin (**1a**) aus MAP (**13a**) hergestellt und nach säulenchromatographischer Reinigung [Dichlormethan, + Gradient 0.5–2 % (v/v) MeOH] als tiefroter Feststoff (17.2 mg/L, 53 μ mol, 11 %) erhalten.

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 0.90 (t, ³J_{10'',9''} = 6.9 Hz, 3H, 10''-H), 1.22–1.39 (m, 4H, 8''-H, 9''-H), 1.50–1.57 (m, 2H, 7''-H), 2.39 (t, ³J_{6'',7''} = 7.6 Hz, 2H, 6''-H), 2.54 (s, 3H, 11''-H), 3.99 (s, 3H, 7-H), 6.07 (d, ⁴J_{3,1} = 1.7 Hz, 1H, 3-H), 6.28 (m_c, 1H, 4'-H), 6.68 (d, ⁴J_{3'',1''} = 1.7 Hz, 1H, 3''-H), 6.91 (ddd, ³J_{3',4'} = 4.0 Hz, ⁴J_{3',5'} = 2.4 Hz, ⁵J_{3',1'} = 1.2 Hz, 1H, 3'-H), 6.94 (s, 1H, 8-H), 7.22 (m_c, 1H, 5'-H), 12.55 (brs, 1H, 1'-NH), 12.64–12.77 (brs, 2H, 1-, 1''-NH); **¹³C-NMR** (151 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 12.4 (C-11''), 14.0 (C-10''), 22.5 (C-9''), 25.3 (C-6''), 29.8 (C-7''), 31.4 (C-8''), 58.7 (C-7), 92.8 (C-3), 111.7 (C-4'), 116.0 (C-8), 117.0 (C-3'), 120.7 (C-5), 122.2 (C-2'), 125.1 (C-2''), 126.9 (C-5'), 128.4 (C-3''), 128.5 (C-4''), 146.9 (C-5''), 147.7 (C-2), 165.7 (C-4); **IR** (ATR-Film): $\tilde{\nu}$ [1/cm] = 3150, 3102, 3071, 2955, 2922, 2855, 1628, 1605, 1578, 1545, 1508, 1449, 1412, 1387, 1356, 1339, 1329, 1261, 1252, 1200, 1138, 1082, 1067, 1043, 1026, 997, 989, 959, 891, 835, 808, 785, 777, 745, 737, 718, 698, 648, 623; **HRMS** (ESI-FTMS, positiv-Ion): Berechnet für C₂₀H₂₆N₃O (M + H)⁺ = 324.20704, gefunden = 324.20696; ϵ_{535} [1/M·cm] = 139 800 \pm 5 100; **LC-MS** (API-ES, 70 eV): t_R = 6.48 min; **HPLC** (Chiralpak® IA; 250 mm x 4.6 mm, 5 μ m; *n*-Heptan/2-Propanol 80:20; Flussrate 0.5 mL/min; λ = 465 nm): t_R = 69.95 min; **Schmelzpunkt:** 144–146 °C.

Die ¹H-NMR- und ¹³C-NMR Daten stimmen mit der Literatur überein.^[367]

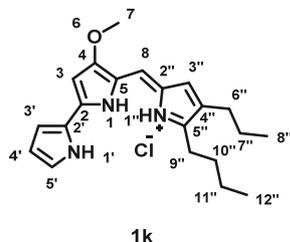
Methode 2



Die **Prodiginine 1k** und **3** wurde nach einer modifizierten Vorschrift von *Dairi et al.* (2007) in einem *Schlenk*-Kolben unter Schutzgasatmosphäre hergestellt.^[140]

Zu einer Lösung aus Boc-MBC (**46**, 1 Äq.) und dem entsprechendem Pyrrol **13k** oder **14** (1.2 Äq.) in MeOH [14.5 mL/mmol Boc-MBC (**46**)] wurde langsam HCl (1.25 M in MeOH, 1.3 Äq.) bei 0 °C zugetropft, 15 min bei RT gerührt und mit einer NH₃-Lösung [25 % (v/v) in Wasser] gequenchet (bis der Reaktionsansatz eine orange Farbe zeigt). Der Reaktionsansatz wurde mit Dichlormethan (3 x 20 mL) extrahiert, die vereinten organischen Phasen wurden mit einer gesättigten NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Die anschließende säulenchromatographische Reinigung [Dichlormethan, + Gradient 0.5–1 % (v/v) 7 N NH₃ in MeOH] ergab das entsprechende Prodiginin als dunkelroten Feststoff. Das Produkt wurde in einer geringen Menge Diethylether aufgenommen, wenige Tropfen HCl (1 M in Diethylether) zugegeben und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Die entsprechenden Prodiginine **1k** und **3** fielen als amorphe Hydrochloride aus.

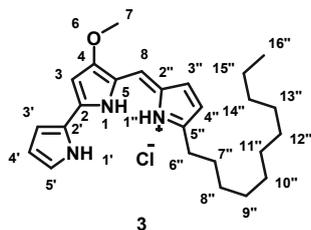
5-[(5-Butyl-4-propyl-2H-pyrrol-2-yliden)methyl]-4-methoxy-1H,1'H-2,2'-bipyrrole·HCl (Prodiginin **1k**)



Der Vorschrift für die Kondensationsreaktion zu Prodigininen (6.4.2, Methode 2) folgend, wurde das Prodiginin **1k** aus Boc-MBC (**46**) und 2-Butyl-3-propyl-1H-pyrrol (**13k**) hergestellt und nach säulenchromatographischer Reinigung [Gradient PE/Dichlormethan, 75:25–25:75] und Ausfällung als Hydrochlorid als tiefroter Feststoff (24 mg, 64 μmol, 41 %) erhalten.

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 0.96 (t, ³J_{12'',11''} = 7.3 Hz, ³J_{8'',7''} = 7.3 Hz, 6H, 8''-, 12''-H), 1.41–1.46 (m, 2H, 11''-H), 1.56–1.62 (m, 2H, 7''-H), 1.72–1.79 (m, 2H, 10''-H), 2.39 (t, ³J_{6'',7''} = 7.6 Hz, 2H, 6''-H), 2.86–2.92 (t, ³J_{9'',10''} = 7.7 Hz, 2H, 9''-H), 4.00 (s, 3H, 7-H), 6.08 (d, ⁴J_{3,1} = 2.0 Hz, 1H, 3-H), 6.34 (m_c, 1H, 4'-H), 6.69 (d, ⁴J_{3'',1''} = 2.6 Hz, 1H, 3''-H), 6.91 (ddd, ³J_{3',4'} = 3.8 Hz, ⁴J_{3',5'} = 2.5 Hz, ⁵J_{3',1'} = 1.4 Hz, 1H, 3'-H), 6.95 (s, 1H, 8-H), 7.21 (m_c, 1H, 5'-H), 12.63 (brs, 2H, 1'-, 1''-NH), 12.83 (brs, 1H, 1-NH); ¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 13.9 (C-8'', C-12''), 22.7 (C-11''), 23.5 (C-7''), 26.6 (C-9''), 27.4 (C-6''), 32.0 (C-10''), 58.7 (C-7), 92.8 (C-3), 111.7 (C-4'), 116.0 (C-8), 117.0 (C-3'), 120.8 (C-5), 122.3 (C-2'), 125.3 (C-2''), 126.9 (C-5'), 127.9 (C-4''), 128.6 (C-3''), 147.8 (C-2), 151.7 (C-5''), 165.8 (C-4); IR (ATR-Film): $\tilde{\nu}$ [1/cm] = 2925, 2855, 1742, 1630, 1574, 1546, 1509, 1464, 1363, 1263, 1244, 1157, 1137, 1067, 1042, 992, 961, 838, 748; HRMS (ESI-FTMS, positiv-Ion): Berechnet für C₂₁H₂₈N₃O (M + H)⁺ = 338.22269, gefunden = 338.22262; LC-MS (API-ES, 70 eV): t_R = 6.17 min.

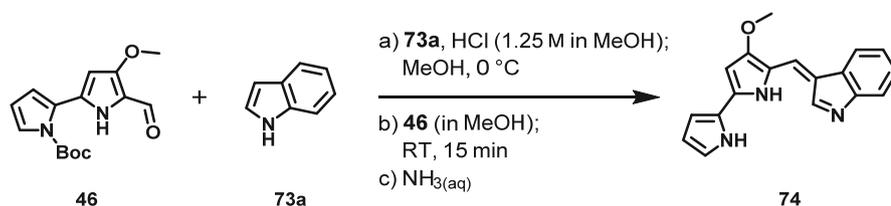
4-Methoxy-5-[(5-undecyl-2*H*-pyrrol-2-ylidene)methyl]-1*H*,1'*H*-2,2'-bipyrrol·HCl (3, 2-UP, „Undecylprodigiosin“)



Der Vorschrift für die Kondensationsreaktion zu Prodigininen (6.4.2, Methode 2) folgend, wurde das Prodiginin **3** aus Boc-MBC (**46**) und 2-Undecyl-1*H*-pyrrol (**14**) hergestellt und nach säulenchromatographischer Reinigung [Dichlormethan, + Gradient 0.5–1 % (v/v) 7 N NH₃ in MeOH] und Ausfällung als Hydrochlorid als tieferer Feststoff (174 mg, 405 μmol, 86 %) erhalten. ¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 0.87 (t,

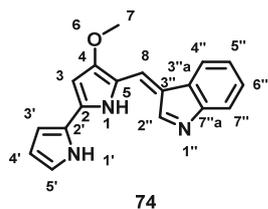
³J_{16'',15''} = 6.9 Hz, 3H, 16''-H), 1.22–1.35 (m, 14H, 9'', 10'', 11'', 12'', 13'', 14'', 15''-H), 1.37–1.44 (m, 2H, 8''-H), 1.77 (p, ³J_{7'',6''} = 7.7 Hz, ³J_{7'',8''} = 7.7 Hz, 2H, 7''-H), 2.95 (t, ³J_{6'',7''} = 7.7 Hz, 2H, 6''-H), 4.02 (s, 3H, 7-H), 6.09 (d, ⁴J_{3,1} = 1.9 Hz, 1H, 3-H), 6.21 (dd, ³J_{4'',3''} = 3.8 Hz, ⁴J_{4'',1''} = 1.7 Hz, 1H, 4''-H), 6.37 (m_c, 1H, 4'-H), 6.85 (m_c, 1H, 3''-H), 6.95 (m_c, 1H, 3'-H), 7.01 (s, 1H, 8-H), 7.24–7.26 (m, 1H, 5'-H), 12.69 (brs, 1H, 1'-NH), 12.74 (brs, 1H, 1''-NH), 12.93 (brs, 1H, 1-NH); ¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 14.1 (C-16''), 22.7, 28.5 (C-6''), 29.3, 29.4, 29.4, 29.4, 29.6, 29.7, 31.9, 58.8 (C-7), 93.0 (C-3), 112.0 (C-4'), 112.6 (C-4''), 116.4 (C-8), 117.8 (C-3'), 121.4 (C-5), 122.2 (C-2'), 126.0 (C-2''), 127.6 (C-5'), 129.3 (C-3''), 148.8 (C-2), 153.3 (C-5''), 166.3 (C-4); IR (ATR-Film): $\tilde{\nu}$ [1/cm] = 3105, 2925, 2854, 1631, 1605, 1573, 1548, 1515, 1465, 1410, 1373, 1285, 1184, 1137, 1041, 988, 959, 880, 838, 777, 673; HRMS (ESI-FTMS, positiv-Ion): Berechnet für C₂₅H₃₆N₃O (M + H)⁺ = 394.28529, gefunden = 394.28527; LC-MS (API-ES, 70 eV): t_R = 6.36 min.

3-[[4-Methoxy-1*H*,1'*H*-(2,2'-bipyrrol)-5-yl]metylen}-3*H*-indol·HCl (**74**, „Indolprodigiosin“)



Das Indolprodigiosin (**74**) wurde in einem *Schlenk*-Kolben unter Schutzgasatmosphäre im analytischen Maßstab hergestellt.

Zu einer Lösung aus Indol (**73a**, 23 mg, 0.20 mmol, 5.0 Äq.) in trockenem MeOH (2 mL) wurde langsam HCl (1.25 M in MeOH, 16 μL, 20 μmol, 50 mol-%) bei 0 °C zugetropft. Anschließend erfolgte die Zugabe einer Lösung aus Boc-MBC (**46**, 11 mg, 40 μmol, 1.0 Äq.) in MeOH (2 mL) über 15 min mittels Spritzenpumpe bei 0 °C. Der Reaktionsansatz wurde mit einer NH₃-Lösung [25 % (w/w) in Wasser] gequench (bis der Reaktionsansatz eine orange Farbe zeigte) und für weitere 2 h bei RT gerührt. Der Reaktionsansatz wurde mit Dichlormethan (3 x 5 mL) extrahiert, die vereinten organischen Phasen wurden mit einer gesättigten NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Die anschließende säulenchromatographische Reinigung [Dichlormethan, + Gradient 1–5 % (v/v) MeOH] ergab das Indolprodigiosin (**74**, 6.1 mg, 21 μmol, ca. 53 %) als pinken Feststoff.

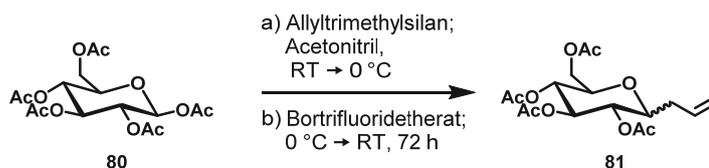


Bei den NMR-Messungen lag das Molekül vollständig deprotoniert vor.
 $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 4.09 (s, 3H, 7-H), 6.15 (s, 1H, 3-H), 6.41 (dd, $^3J_{4',3'} = 3.9$ Hz, $^3J_{4',5'} = 2.2$ Hz, 1H, 4^l-H), 7.07 (dd, $^3J_{3',4'} = 4.0$ Hz, $^4J_{3',5'} = 1.3$ Hz, 1H, 3'-H), 7.27–7.31 (m, 2H, 6^{''}-, 5^{''}-H), 7.32–7.36 (m, 1H, 5'-H), 7.48–7.52 (m, 1H, 4^{''}-H), 7.62 (s, 1H, 8-H), 7.75–7.80 (m, 1H, 7^{''}-H), 9.70 (s, 1H, 2^{''}-H); $^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 59.0 (C-7), 94.0 (C-3), 112.7 (C-4'), 112.8 (C-4''), 118.1 (C-7''), 120.1 (C-3'), 120.2 (C-8), 122.0 (C-2'), 122.5 (C-5''), 124.0 (C-6''), 127.7 (C-5), 129.5 (C-5'), 135.8 (C-2''), 136.3 (C-3''), 152.1 (C-2), 166.9 (C-4);
HRMS (ESI-FTMS, positiv-Ion): Berechnet für $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{N}_3\text{O}$ ($\text{M} + \text{H}$)⁺ = 290.12879, gefunden = 290.12884.

6.6.2 Synthesen zur Derivatisierung von Prodiginin 1u

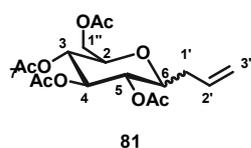
6.6.2.1 Synthesen zur Derivatisierung von Pyrrol 13u

(2R,3R,4R,5S)-2-(Acetoxymethyl)-6-allyltetrahydro-2H-pyran-3,4,5-triyltriacetat (81)



(2R,3R,4R,5S)-2-(Acetoxymethyl)-6-allyltetrahydro-2H-pyran-3,4,5-triyltriacetat (**81**) nach einer modifizierten Vorschrift von *Giannis* und *Sandhoff* (1985) hergestellt.^[250]

Die Reaktion wurde in einem *Schlenk*-Kolben unter Schutzgasatmosphäre durchgeführt. Allyltrimethylsilan (4.89 mL, 30.7 mmol, 3.00 Äq.) und β -D-Glucosepentaacetat (**80**, 4.00 g, 10.3 mmol, 1.00 Äq.) wurde bei RT in trockenem Acetonitril (40 mL) gelöst und das Reaktionsgemisch auf 0 °C gekühlt. Anschließend wurde Bortrifluoridetherat (6.49 mL, 51.2 mmol, 5.00 Äq.) langsam zum Reaktionsansatz zugetropft und dieser bei für 72 h bei RT gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Wasser (25 mL) gequenchet, mit EtOAc (3 x 20 mL) extrahiert und die organische Phase mit einer NaHCO_3 -Lösung [5 % (v/v)] gewaschen. Die vereinten organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Die anschließende säulenchromatographische Reinigung (PE/EtOAc, 60:40) ergab das C-Glycosid **81** (1.45 g, 3.90 mmol, 38 %) als weißen Feststoff.



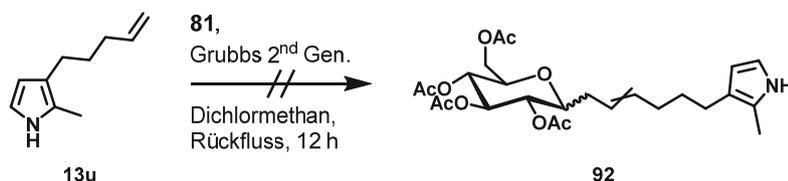
$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 2.04 (s, 3H, OAc), 2.04 (s, 3H, OAc), 2.05 (s, 3H, OAc), 2.08 (s, 3H, OAc), 2.30–2.38 (m, 1H, 1'-H_a), 2.56 (ddd, $J = 15.4$ Hz, 10.8 Hz, 7.5 Hz, 1H, 1'-H_b), 3.86 (ddd, $J = 8.9$ Hz, 5.5 Hz, 2.4 Hz, 1H, 2-H), 4.08 (dd, $J = 12.1$ Hz, 2.5 Hz, 1H, 1''-H_a), 4.21 (dd, $J = 12.1$ Hz, 5.3 Hz, 1H,

1"-H_b), 4.28 (dt, $^3J_{6,5} = 10.5$ Hz, $^3J_{6,1'} = 5.0$ Hz, 1H, 6-H), 4.98 (dd, $^3J_{3,2/3,4} = 9.1$ Hz, 1H, 3-H), 5.09 (dd, $^3J = 9.6$ Hz, $^3J = 5.6$ Hz, 1H, 5-H), 5.11–5.18 (m, 2H, 3'-H), 5.34 (dd, $^3J_{4,3/4,5} = 9.1$ Hz, 1H, 4-H), 5.75 (ddt, $^3J_{2,3'a} = 17.0$ Hz, $^3J_{2,3'b} = 10.0$ Hz, $^3J_{2,1'} = 6.8$ Hz, 1H, 2'-H); $^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 20.7, 20.7, 20.7, 30.6 (C-1'), 62.2 (C-1''), 68.8 (C-2), 68.8 (C-3), 70.3 (C-5), 70.4 (C-4), 71.9 (C-6), 117.8 (C-3'), 133.0 (C-2'), 169.6, 169.6, 170.2, 170.7; **IR** (ATR-Film): $\tilde{\nu}$ [$1/\text{cm}$] = 2956, 1736, 1641, 1513, 1430, 1361, 1221, 1156, 1116, 1095, 1031, 985, 936, 918.25, 909, 891, 815, 718; **Drehwert** $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = 67.4$ ($c = 1.0$; CHCl_3).

(2R,3R,4R,5S)-2-(Acetoxymethyl)-6-[6-(2-methyl-1H-pyrrol-3-yl)hex-2-en-1-yl]tetrahydro-2H-pyran-3,4,5-triyltriacetat (92)

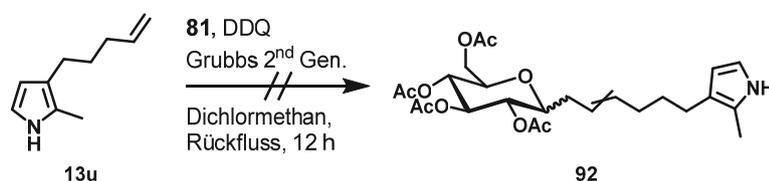
(2R,3R,4R,5S)-2-(Acetoxymethyl)-6-[6-(2-methyl-1H-pyrrol-3-yl)hex-2-en-1-yl]tetrahydro-2H-pyran-3,4,5-triyltriacetat (**93**) wurde in einem *Schlenk*-Kolben unter Schutzgasatmosphäre hergestellt.

Methode 1



Zu einer Lösung aus 2-Methyl-3-(pent-4-en-1-yl)-1H-pyrrol (**13u**, 16.0 mg, 107 μmol , 2.00 Äq.) und (2R,3R,4R,5S)-2-(Acetoxymethyl)-6-allyltetrahydro-2H-pyran-3,4,5-triyltriacetat (**81**, 20 mg, 54 μmol , 1.0 Äq.) in trockenem Dichlormethan (2 mL) wurde der *Grubbs Catalyst*TM 2nd Generation Katalysator (6.7 mg, 11 μmol , 20 mol-%) in trockenem Dichlormethan (1 mL) bei RT zugegeben und anschließend der Reaktionsansatz für 12 h zum Rückfluss erhitzt. Der Reaktionsansatz wurde über Celite filtriert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Nach anschließender säulenchromatographischer Reinigung (PE/EtOAc, 85:15) konnte kein Produkt isoliert werden. Der Reaktionsfortschritt wurde durch Dünnschichtchromatographie mit einer sauren *p*-Anisaldehyd Färbelösung verfolgt.

Methode 2

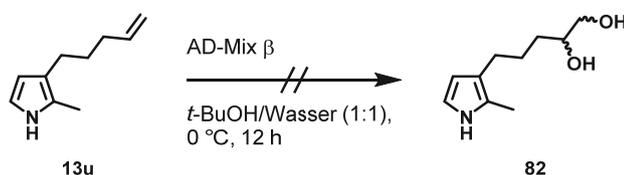


Die Synthese wurde entsprechend Methode 1 angesetzt, jedoch die eingesetzten Stoffmengen verdoppelt und zusätzlich DDQ (1.4 mg, 11 μmol , 0.20 Äq.) hinzugegeben. Nach anschließender säulenchromatographischer Reinigung (PE/EtOAc, 85:15) konnte kein Produkt isoliert werden. Der eingesetzte Zucker konnte wiedergewonnen werden. Der Reaktionsfortschritt wurde durch Dünnschichtchromatographie mit einer sauren *p*-Anisaldehyd Färbelösung verfolgt.

5-(2-Methyl-1*H*-pyrrol-3-yl)pentan-1,2-diol (**82**)

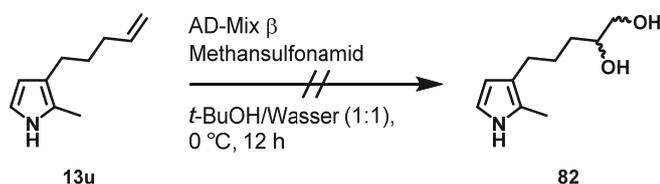
5-(2-Methyl-1*H*-pyrrol-3-yl)pentan-1,2-diol (**82**) wurde in einem *Schlenk*-Kolben unter Schutzgasatmosphäre hergestellt.

Methode 1

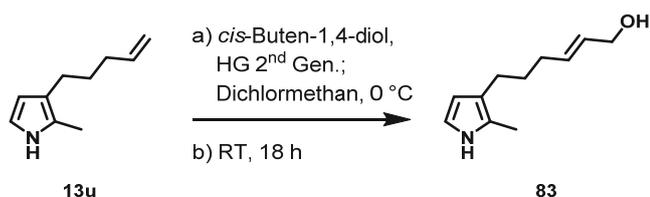


Zu einer Lösung aus AD-Mix β (390 mg) in *t*-BuOH und Wasser (2 mL, 1:1) wurde bei 0 °C 2-Methyl-3-(pent-4-en-1-yl)-1*H*-pyrrol (**13u**, 40 mg, 0.27 mmol, 1.0 Äq.) zugegeben und für 12 h bei 0 °C gerührt. Der Reaktionsansatz wurde durch Zugabe von gesättigter Na₂SO₃-Lösung gequencht und mit Diethylether (3 x 10 mL) extrahiert. Die vereinten organischen Phasen werden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der Reaktionsfortschritt wurde durch Dünnschichtchromatographie mit einer sauren *p*-Anisaldehyd Färbelösung verfolgt. Durch Reaktionskontrolle mittels NMR konnte keine Produktformation nachgewiesen werden; lediglich die Bildung eines Polymergemisches konnte beobachtet werden.

Methode 2

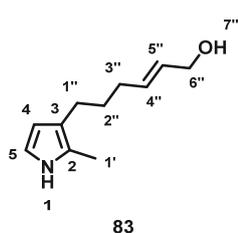


Die Synthese wurde entsprechend Methode 1 angesetzt, jedoch wurde zusätzlich Methansulfonamid (26 mg, 0.27 mmol, 1.0 Äq.) hinzugegeben. Durch Reaktionskontrolle mittels NMR konnte keine Produktformation nachgewiesen werden; lediglich die Bildung eines Polymergemisches konnte beobachtet werden.

(E)-6-(2-Methyl-1*H*-pyrrol-3-yl)hex-2-en-1-ol (**83**, „Hydroxypyrrrol“)

Das Hydroxypyrrrol **83** wurde nach einer modifizierten Vorschrift von *Taber* und *Frankowski* (2012) in einem *Schlenk*-Kolben unter Schutzgasatmosphäre hergestellt.^[254]

Zu einer Lösung aus 2-Methyl-3-(pent-4-en-1-yl)-1*H*-pyrrol (**13u**, 40 mg, 0.27 mmol, 1.0 Äq.) und *cis*-2-Buten-1,4-diol (88 μ L, 1.1 mmol, 4.0 Äq.) in trockenem Dichlormethan (5 mL) wurde der *Hoveyda-Grubbs Catalyst*TM 2nd Generation Katalysator (3 mg, 5 μ mol, 2 mol-%) bei 0 °C hinzugegeben und der Reaktionsansatz für 18 h bei RT gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und nach säulenchromatographischer Reinigung [PE/EtOAc, 70:30 + 1 % (v/v) TEA] konnte das Hydroxypyrrrol **83** (27.0 mg, 150 μ mol, 56 %) als leicht gelbes Öl erhalten werden.

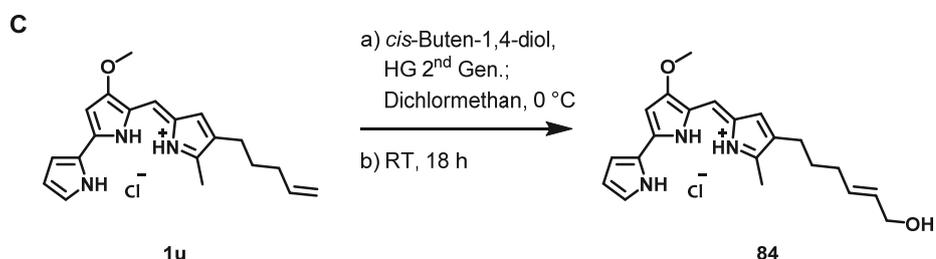


¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 1.56 (tt, ³J_{2'',1''} = 7.6 Hz, ³J_{2'',3''} = 7.6 Hz, 2H, 2''-H), 1.97 (s, 1H, 7''-OH), 1.97–2.07 (m, 2H, 3''-H), 2.10 (s, 3H, 1'-H), 2.33 (t, ³J_{1'',2''} = 7.6 Hz, 2H, 1''-H), 4.01 (d, ³J_{6'',5''} = 5.9 Hz, 2H, 6''-H), 5.53–5.71 (m, 2H, 4''-, 5''-H), 5.88–5.97 (m, 1H, 4-H), 6.47–6.55 (m, 1H, 5-H), 7.72 (brs, 1H, 1-NH); ¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 11.1 (C-1'), 25.4 (C-1''), 30.6 (C-2''), 32.0 (C-3''), 63.9 (C-6''), 108.8 (C-4), 114.9 (C-5), 119.1 (C-3), 123.3 (C-2), 128.9 (C-4''), 133.5 (C-5'');

MS (EI, 70 eV): m/z = 179 [M⁺], 161, 122, 108, 94, 80, 65, 55; t_R = 12.0 min.

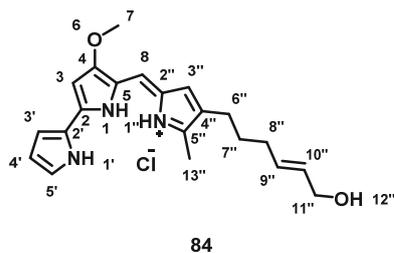
6.6.2.2 Derivatisierung von Prodiginin 1u

(*E*)-6-(2-{[4-Methoxy-1*H*,1'*H*-(2,2'-bipyrrol)-5-yl]methylen}-5-methyl-2*H*-pyrrol-4-yl)hex-2-en-1-ol·HCl (**84**, „Hydroxyprodiginin“)



Das Hydroxyprodiginin **84** wurde nach der Vorschrift für das (*E*)-6-(2-Methyl-1*H*-pyrrol-3-yl)hex-2-en-1-ol (**83**) in einem *Schlenk*-Kolben unter Schutzgasatmosphäre hergestellt.

Zu einer Lösung aus dem Prodiginin **1u** (50.0 mg, 140 μ mol, 1.00 Äq.) und *cis*-2-Buten-1,4-diol (46 μ L, 0.56 mmol, 4.0 Äq.) in trockenem Dichlormethan (5 mL) wurde der *Hoveyda-Grubbs Catalyst*TM 2nd Generation Katalysator (9 mg, 10 mol-%) bei 0 °C hinzugegeben und der Reaktionsansatz für 18 h bei RT gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und nach säulenchromatographischer Reinigung [Dichlormethan, + Gradient 0.5–4 % (v/v) 7 N NH₃ in MeOH] konnte das Produkt erhalten werden. Das Produkt wurde in einer geringen Menge Diethylether aufgenommen, wenige Tropfen HCl (1 M in Diethylether) zugegeben und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das Hydroxyprodiginin **84** (18 mg, 46 μ mol, 33 %) fiel als tiefrotes amorphes Hydrochlorid aus.



¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 1.64 (tt, $^3J_{7'',6''} = 7.6$ Hz, $^3J_{7'',8''} = 7.6$ Hz, 2H, 7''-H), 2.09 (dt, $^3J_{8'',7''} = 7.1$ Hz, $^3J_{8'',9''} = 7.1$ Hz, 2H, 8''-H), 2.41 (t, $^3J_{6'',7''} = 7.6$ Hz, 2H, 6''-H), 2.53 (s, 3H, 13''-H), 4.00 (s, 3H, 7-H), 4.11 (d, $^3J_{11'',10''} = 5.2$ Hz, 2H, 11''-H), 5.68 (m_c, 2H, 9''-, 10''-H), 6.08 (s, 1H, 3-H), 6.35 (m_c, 1H, 4'-H), 6.66 (s, 1H, 3''-H), 6.92 (dd, $^3J_{3',4'} = 4.0$ Hz, $^4J_{3',5'} = 2.0$ Hz, 1H, 3'-H), 6.93 (s, 1H, 8-H), 7.22 (s, 1H, 5'-H), 12.55 (brs, 1H, 1'-NH), 12.69 (brs, 2H, 1-, 1''-NH);

¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 12.4 (C-13''), 24.8 (C-6''), 29.5 (C-7''), 31.7 (C-8''), 58.8 (C-7), 63.7 (C-11''), 92.9 (C-3), 111.8 (C-4'), 115.9 (C-3'), 117.3 (C-8), 120.9 (C-5), 122.2 (C-2'), 125.1 (C-2''), 127.1 (C-5'), 127.7 (C-4''), 128.2 (C-3''), 129.6 (C-9''), 132.4 (C-10''), 146.6 (C-5''), 147.9 (C-2), 165.9 (C-4); **IR** (ATR-Film): $\tilde{\nu}$ [1/cm] = 3161, 2919, 1631, 1603, 1573, 1544, 1511, 1409, 1358, 1261, 1135, 1119, 1067, 1040, 993, 961, 837, 753; **HRMS** (ESI-FTMS, positiv-Ion): Berechnet für C₂₁H₂₆N₃O₂ (M + H)⁺ = 352.20189, gefunden = 352.20195; **LC-MS** (API-ES, 70 eV): t_R = 6.50 min.

6.7 Spezieller Experimentalteil

6.7.1 Biosynthese und Extraktion von Prodigiosin (1a)

Für die Biosynthese von Prodigiosin (1a) wurden Übernachtskulturen von *P. putida* pig-r2 16 h in einem 100 mL Kolben ohne Schikane mit einem finalen Volumen von 10 mL LB_{Gm}-Flüssigmedium bei 30 °C und 120 rpm inkubiert. Alternativ wurde LB_{Gm}-Flüssigmedium (5 mL) in Kulturröhrchen (10 mL) bei 25 °C in einem Schüttelblock mit 700 rpm inkubiert. Das entsprechende Flüssigmedium wurde mit einer Übernachtskultur mit einer OD₆₅₀ = 0.05 inokuliert.

Analytischer Maßstab

Die Biosynthese im analytischen Maßstab wurde in 500 mL Kolben mit und ohne Schikane in LB_{Gm}- oder TB_{Gm}-Flüssigmedium durchgeführt. Dabei wurden zusätzlich das Füllvolumen (50, 100 mL) und die Kultivierungstemperatur (20, 25, 30 °C) variiert. Der Kolben wurde mit Alufolie verschlossen und die Inkubation erfolgte über 48 h bei 120 rpm. Für die Quantifizierung von Prodigiosin wurden die Zellen (einer OD₆₅₀ = 1 entsprechend) mittels Zentrifugation geerntet (10 min 21k rcf, RT) und der Überstand verworfen. Die Zellpellets wurden mit 1 mL acidem EtOH (6.3.1.2) extrahiert. Anschließend wurde der farblose Zelldebris durch Zentrifugation (10 min, 21.1k rcf, 40 °C) entfernt und die Extrakte für Quantifizierungen photometrisch vermessen (6.7.3). Über eine Kalibriergrade wurde eine Korrelation von einer OD₆₅₀ = 1 mit 0.717 mgDCW definiert.⁴⁸

Präparativer Maßstab

Die Biosynthese im präparativen Maßstab wurde in 5 L Kolben mit Schikane in TB_{Gm}-Flüssigmedium (500 mL) durchgeführt. Der Kolben wurde mit Alufolie verschlossen und die Inkubation erfolgte über 48 h bei 20 °C und 120 rpm. Die Gewinnung von Prodigiosin (1a) erfolgte entweder direkt aus

⁴⁸ Details sind der Dissertationsschrift von Dr. Andreas Domröse zu entnehmen.^[207]

Zellpellets oder über PU-Schaum, welcher vor der Kultivierung zum Kulturmedium zugefügt wurde (5 g). Der verwendete PU-Schaum (*Softpur* GmbH, Göllheim, Deutschland: *Softpur*, 25 kg/m³ Dichte, 4 kPa Kompressionshärte; weitere Angaben im Anhang: Tabelle 33) wurde vor der Anwendung in Würfel mit einem Volumen von ca. 1 cm³ geschnitten, mit Wasser ausgewaschen, autoklaviert (20 min, 121 °C) und für mindestens fünf Tage im Trockenschrank bei 60 °C getrocknet.

Für die Extraktion aus Zellpellets wurden die Kulturen durch Zentrifugation (15 min, 16k rcf, 4 °C) sedimentiert und die Pellets mit acidem EtOH (2 x 50 mL; 6.3.1.2) extrahiert. Anschließend wurde der farblose Zelldebris durch Zentrifugation (15 min, 16k rcf, 4 °C) entfernt.

Die Extraktion des Prodigiosins (**1a**) aus den PU-Würfeln wurde in einem *Soxhlet*-Extraktor durchgeführt. Dafür wurden die PU-Würfel aus der Kultur durch ein Sieb aus rostfreiem Stahl ausgesiebt, ausgewrungen, mit Wasser gut ausgespült und in einem 250 mL *Soxhlet*-Extraktor mit Rückflusskühler mit acidem Ethanol [4% (v/v) 1 N HCl in EtOH] oder Diethylether (300 mL) extrahiert (die Schwämme waren anschließend farblos).

Das Lösungsmittel der Prodigiosin (**1a**) Extrakte wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand mit Dichlormethan extrahiert (3 x 30 mL) und die organische Phase mit Wasser und einer gesättigten NaCl-Lösung gewaschen. Die vereinten organische Phase wurden anschließend über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Die Quantifizierung (6.7.3) des Prodigiosins (**1a**) erfolgte aus dem Rohextrakt. Optional erfolgte eine säulenchromatographische Reinigung [Dichlormethan, + Gradient 0.5–2 % (v/v) MeOH] des Rohextraktes.

6.7.2 Biosynthese und Extraktion von Undecylprodigiosin (3) und Butyl-*meta*-cycloheptylprodigiosin (4)

Die Biosynthese von Undecylprodigiosin (3) und Butyl-*meta*-cycloheptylprodigiosin (4) in *S. coelicolor* A3(2) erfolgte in einem 250 mL Kolben ohne Schikane mit Metallspirale in Glycerin-Flüssigmedium (50 mL, mit Pepton aus Soja) ohne Antibiotikum. Das Flüssigmedium wurde mit einer Vorkultur (5 mL) inokuliert und für fünf Tage auf einem Plattformschüttler mit 160 rpm bei 28 °C inkubiert. Die *S. coelicolor* A3(2) Myzelien wurden anschließend durch Filtration der Kultur über einen *Whatman*TM Filter (*Grade* 3, Porengröße 6 µm) gewonnen und mit acidem EtOH (2 x 20 mL; 6.3.1.2) extrahiert. Die Extraktion wurde durch ein Ultraschallbad (5 min) unterstützt. Der Extrakt wurde über Celite filtriert, das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt, der Rückstand mit Dichlormethan extrahiert (3 x 30 mL) und die organische Phase mit Wasser und einer gesättigten NaCl-Lösung gewaschen. Die vereinten organische Phase wurden anschließend über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der resultierende Feststoff war eine Mischung aus Undecylprodigiosin (3) und Butyl-*meta*-cycloheptylprodigiosin (4).

6.7.3 Quantifizierung von Prodigininen/Molare Extinktionskoeffizienten

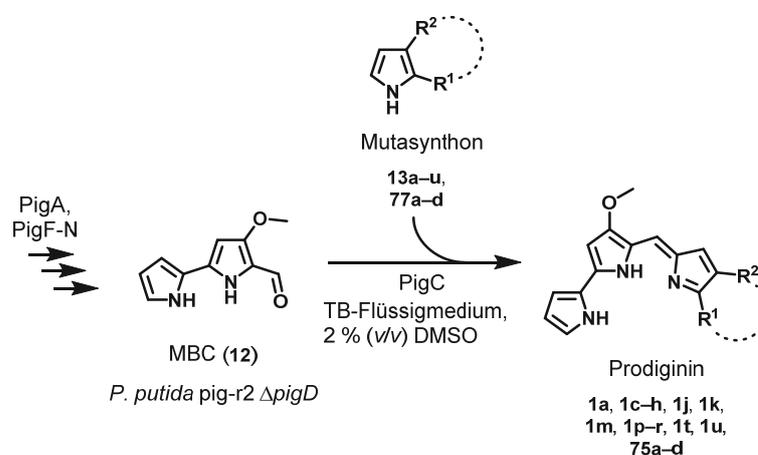
Die Prodiginine wurden entweder photometrisch durch die Absorption bei $\lambda = 535$ nm in acidem EtOH (6.3.1.2), gravimetrisch nach säulenchromatographischer Reinigung oder über quantitative NMR-Spektroskopie (6.3.1.5) quantifiziert. Die molaren Extinktionskoeffizienten (ϵ) wurden durch lineare Regression durch abtragen der Absorption des entsprechenden Pigments gegen die Konzentration bei $\lambda = 535$ nm in acidem EtOH (6.3.1.2) ermittelt. Dem *Lambert-Beer'schem* Gesetz folgend, entspricht der molaren Extinktionskoeffizienten der Steigung dieser Graden (bei konstanter Schichtdicke d der Küvette:

$$A = \epsilon \cdot c \cdot d$$

Formel 3: *Lambert-Beer'sches* Gesetz. [A = Absorption; ϵ = molarer Extinktionskoeffizient; c = Konzentration; d = Schichtdicke der Küvette]

Die molaren Extinktionskoeffizienten einiger Prodiginine wurden durch lineare Regression von bekannten molaren Extinktionskoeffizienten gegen die entsprechende Kettenlänge berechnet.

6.7.4 Allgemeine Vorschrift für Mutasythesen



Abweichungen von den allgemeinen Vorschriften für die Mutasythesen sind in den entsprechenden Experimenten bzw. im Ergebnisteil vermerkt. Der verwendete PU-Schaum (*Softpur* GmbH, Göllheim, Deutschland: *Softpur*, 25 kg/m³ Dichte, 4 kPa Kompressionshärte) wurde vor der Verwendung in Würfel mit einem Volumen von ca. 1 cm³ geschnitten, mit Wasser ausgewaschen, autoklaviert (20 min, 121 °C) und für mindestens fünf Tage im Trockenschrank bei 60 °C getrocknet. Alle verwendeten Medien und Hilfsmittel wurden entweder autoklaviert, sterilfiltriert oder wurden steril bezogen.

Analytischer Maßstab

Monopyrrol-Lösung: 62.5 mM in DMSO

Die Mutasynthesen im analytischen Maßstab wurden in 96 x 2 000 μL *Deep-Well* Platten (Polypropylen, Lösungsmittelresistent, konischer Boden; *Eppendorf* AG, Hamburg, Deutschland) in einem finalen Volumen von 750 μL TB-Flüssigmedium mit 1.25 mM Pyrrol Präkursor und 2 % (v/v) DMSO durchgeführt. **Detaillierte Vorschrift:** Das TB_{sm}-Flüssigmedium wurde mit einer Übernachtskultur von *P. putida* pig-r2 Δ pigD mit einer OD₆₀₀ = 0.02 inokuliert. Der Pyrrol Präkursor wurde zunächst in DMSO gelöst (62.5 mM) und 15 μL zum Kulturmedium hinzugegeben [Endkonzentration: 1.25 mM, 2 % (v/v) DMSO]. Die *Deep-Well* Platte wurde mit einem luftdurchlässigen *AeraSeal*TM Film (*Excel Scientific*, Victorville, CA, USA) abgeklebt und in einem Plattformschlüttler für 24 h bei 25 °C und 1 000 rpm inkubiert. Die Zellen wurden mittels Zentrifugation sedimentiert (10 min, 21 100 rcf, RT) und der Überstand verworfen. Die entsprechenden *Wells* der Zellen wurden mit 300 μL acidem EtOH (6.3.1.2) gespült und die Platte auf einem Schüttelblock für Reaktionsplatten geschüttelt (10 min, 1 600 rpm). Dieses EtOH wurde ebenfalls für die Extraktion der Zellpellets verwendet. Die Extraktion wurde durch ein Ultraschallbad (5 min) unterstützt. Anschließend wurde der farblose Zelldebris durch Zentrifugation (10 min, 21 100 rcf, 40 °C) entfernt und die Extrakte für die Quantifizierung photometrisch vermessen oder für LC-MS Analysen (6.3.1.8) die Extrakte aus drei *Wells* vereint. Das EtOH wurde in einer Vakuumzentrifuge (30 °C, ca. 10–20 mbar, 240 rcf) entfernt. Zur Entfernung der wasserlöslichen Substanzen wurden 200 μL *Aqua dest.* zum Rückstand hinzugegeben und dieser mit Dichlormethan (2 x 200 μL) extrahiert. Das Dichlormethan wurde in einer Vakuumzentrifuge (RT bis 45 °C, ca. 10–20 mbar, 240 rcf) entfernt und die Analyten für die LC-MS durch lösen des Rückstandes in MeOH erhalten.

Um eine HCl-katalysierte Kondensation bei der Extraktion auszuschließen, wurden einige Ansätze mit MeOH extrahiert.

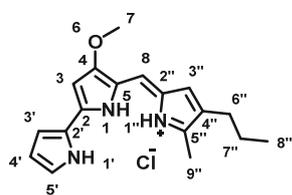
Präparativer Maßstab

Monopyrrol-Lösung: 62.5 mM oder 25 mM in DMSO

Die Mutasynthesen im präparativen Maßstab wurden in 100 mL Kolben oder 3 L *Fernbach*-Kolben mit Schikane in einem finalen Volumen von 20 mL oder 500 mL TB_{sm}-Flüssigmedium mit 1.25 mM Pyrrol Präkursor (für 20 mL Maßstab) oder 0.5 mM Pyrrol Präkursor (für 500 mL Maßstab) und 2 % (v/v) DMSO durchgeführt. Sterile PU-Würfel mit einem Volumen von 1 cm³ wurde als Adsorber für die *in situ* Extraktion von Prodigininen (275 mg für 20 mL Maßstab, 5 g für 500 mL Maßstab) verwendet.^[4] **Detaillierte Vorschrift:** Das TB_{sm}-Flüssigmedium wurde mit einer Übernachtskultur von *P. putida* pig-r2 Δ pigD mit einer OD₆₀₀ = 0.02 inokuliert. Der Pyrrol Präkursor wurde zunächst in DMSO gelöst (62.5 mM bzw. 25 mM) und 400 μL bzw. 10 mL zum Kulturmedium hinzugegeben [Endkonzentration: 1.25 mM bzw. 0.5 mM, 2 % (v/v) DMSO]. Nach der Zugabe der PU-Würfel wurde der Kolben mit Alufolie verschlossen und die Kultur 24 h bei 25 °C und 125 rpm inkubiert. Die PU-Würfel des 20 mL Maßstabes wurden ausgewrungen und mit Diethylether (10 mL) durch

auswaschen in einem Becherglas extrahiert. Die Extraktion der Prodiginine aus den PU-Würfeln des 500 mL Maßstabes wurde in einem *Soxhlet*-Extraktor durchgeführt. Dafür wurden die PU-Würfel aus der Kultur durch ein Sieb aus rostfreiem Stahl ausgesiebt, ausgewrungen, mit Wasser gut ausgespült und in einem 250 mL *Soxhlet*-Extraktor mit Rückflusskühler mit Diethylether (300 mL) extrahiert (die Schwämme waren anschließend farblos). Nach der Extraktion wurde die organische Phase mit Wasser gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Anschließend erfolgte eine säulenchromatographische Reinigung [Dichlormethan, + Gradient 0.5–2 % (v/v) MeOH] des Rohextraktes und eine Ausfällung des Prodiginins als Hydrochlorid (*vide supra* 6.6.1)

4-Methoxy-5-[(5-methyl-4-propyl-2*H*-pyrrol-2-yliden)methyl]-1*H*,1'*H*-2,2'-bipyrrole·HCl (Prodiginin 1d)

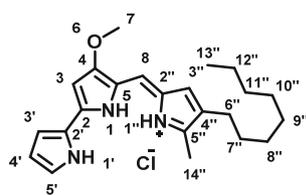


1d

Der allgemeinen Vorschrift für Mutasyntesen (6.7.4, präparativer Maßstab) folgend, wurde das Prodiginin **1d** aus 2-Methyl-3-propyl-1*H*-pyrrol (**13d**) hergestellt und nach säulenchromatographischer Reinigung [Dichlormethan, + Gradient 0.5–1 % (v/v) 7 N NH_3 in MeOH] und Ausfällung als Hydrochlorid als tiefroter Feststoff (10.5 mg/L, 35.5 μmol , 7 %) erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 0.94 (t, $^3J_{8'',7''} = 7.3$ Hz, 3H, 8''-H), 1.53–1.61 (m, 2H, 7''-H), 2.38 (t, $^3J_{6'',7''} = 7.6$ Hz, 2H, 6''-H), 2.55 (s, 3H, 9''-H), 4.00 (s, 3H, 7-H), 6.08 (d, $^4J_{3,1} = 1.9$ Hz, 1H, 3-H), 6.35 (mc, 1H, 4'-H), 6.68 (d, $^4J_{3'',1''} = 2.6$ Hz, 1H, 3''-H), 6.92 (ddd, $^3J_{3',4'} = 3.7$ Hz, $^4J_{3',5'} = 2.4$ Hz, $^5J_{3',1'} = 1.2$ Hz, 1H, 3'-H), 6.95 (s, 1H, 8-H), 7.23 (mc, 1H, 5'-H), 12.57 (brs, 1H, 1'-NH), 12.73 (brs, 2H, 1-, 1''-NH); $^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 12.5 (C-9''), 13.8 (C-8''), 23.3 (C-7''), 27.5 (C-6''), 58.7 (C-7), 92.8 (C-3), 111.7 (C-4'), 116.0 (C-8), 117.0 (C-3'), 120.7 (C-5), 122.3 (C-2'), 125.1 (C-2''), 127.0 (C-5'), 128.3 (C-4''), 128.5 (C-3''), 147.0 (C-5''), 147.7 (C-2), 165.8 (C-4); IR (ATR-Film): $\tilde{\nu}$ [1/cm] = 3157, 3100, 2959, 2926, 1724, 1635, 1607, 1575, 1542, 1513, 1451, 1416, 1338, 1279, 1263, 1250, 1157, 1135, 1083, 1067, 1043, 987, 960, 901, 881, 838, 816, 783, 745, 736, 697, 665; HRMS (ESI-FTMS, positiv-Ion): Berechnet für $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{N}_3\text{O}$ ($\text{M} + \text{H}$) $^+$ = 296.17574, gefunden = 296.17565; ϵ_{535} [1/M·cm] = 125 776 \pm 6 450; LC-MS (API-ES, 70 eV): t_R = 5.92 min.

4-Methoxy-5-[(5-methyl-4-octyl-2*H*-pyrrol-2-yliden)methyl]-1*H*,1'*H*-2,2'-bipyrrole·HCl (Prodiginin 1g)



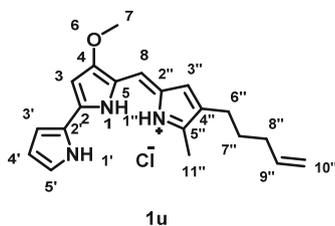
1g

Der allgemeinen Vorschrift für Mutasyntesen (6.7.4, präparativer Maßstab) folgend, wurde das Prodiginin **1g** aus 2-Methyl-3-octyl-1*H*-pyrrol (**13g**) hergestellt und nach säulenchromatographischer Reinigung [Dichlormethan, + Gradient 0.5–1 % (v/v) 7 N NH_3 in MeOH] und Ausfällung als Hydrochlorid als tiefroter Feststoff (3.80 mg/L, 10.4 μmol , 2 %) erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 0.88 (t, $^3J_{13'',12''} = 6.9$ Hz, 3H, 13''-H), 1.24–1.33 (m, 10H, 8'', 9'', 10'', 11'', 12''-H), 1.50–1.56 (m, 2H, 7''-H), 2.39 (t, $^3J_{6'',7''} = 7.6$ Hz, 2H, 6''-H), 2.54 (s, 3H, 14''-H), 4.00 (s,

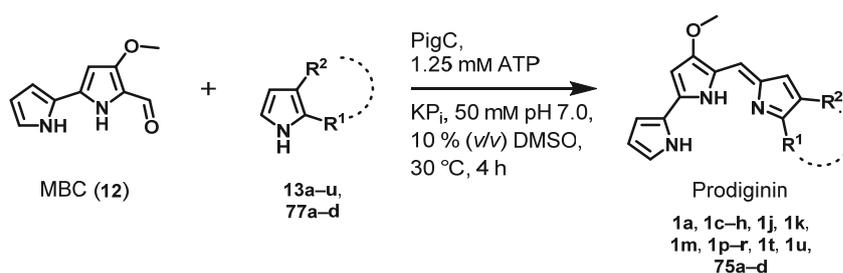
3H, 7-H), 6.08 (d, $^4J_{3,1} = 1.8$ Hz, 1H, 3-H), 6.35 (m_c, 1H, 4'-H), 6.68 (d, $^4J_{3'',1''} = 2.5$ Hz, 1H, 3''-H), 6.92 (m_c, 1H, 3'-H), 6.95 (s, 1H, 8-H), 7.23 (m_c, 1H, 5'-H), 12.56 (brs, 1H, 1'-NH), 12.72 (brs, 2H, 1-, 1''-NH); $^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 12.5 (C-14''), 14.1 (C-13''), 22.7, 25.4 (C-6''), 29.3, 29.3, 29.4, 30.1 (C-7''), 31.9, 58.7 (C-7), 92.8 (C-3), 111.7 (C-4'), 116.0 (C-8), 117.0 (C-3'), 120.7 (C-5), 122.3 (C-2'), 125.2 (C-2''), 126.9 (C-5'), 128.4 (C-3''), 128.5 (C-4''), 147.0 (C-5''), 147.7 (C-2), 165.8 (C-4); **IR** (ATR-Film): $\tilde{\nu}$ [1/cm] = 3162, 3100, 2955, 2921, 2852, 1635, 1607, 1577, 1544, 1512, 1456, 1413, 1387, 1354, 1328, 1279, 1264, 1251, 1144, 1135, 1107, 1066, 1043, 1000, 988, 958, 887, 838, 813, 745, 718, 697; **HRMS** (ESI-FTMS, positiv-Ion): Berechnet für C₂₃H₃₂N₃O (M + H)⁺ = 366.25399, gefunden = 366.25400; ϵ_{535} [1/M·cm] = 189 904 ± 2 950; **LC-MS** (API-ES, 70 eV): t_R = 7.23 min.

4-Methoxy-5-[[5-methyl-4-(pent-4-en-1-yl)-2H-pyrrol-2-ylidene]methyl]-1H,1'H-2,2'-bipyrrol·HCl (Prodiginin 1u)



Der allgemeinen Vorschrift für Mutasyntesen (6.7.4, präparativer Maßstab) folgend, wurde das Prodiginin **1u** aus 2-Methyl-3-(pent-4-en-1-yl)-1H-pyrrol (**13u**) hergestellt und nach säulenchromatographischer Reinigung [Dichlormethan, + Gradient 0.5–2 % (v/v) MeOH] und Ausfällung als Hydrochlorid als tiefroter Feststoff (19.8 mg/L, 62.0 μmol , 12 %) erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 1.65 (tt, $^3J_{7'',8''} = 7.5$ Hz, $^3J_{7'',6''} = 7.5$ Hz, 2H, 7''-H), 2.10 (dd, $^3J_{8'',9''} = 7.2$ Hz, $^3J_{8'',7''} = 7.2$ Hz, 2H, 8''-H), 2.42 (t, $^3J_{6'',7''} = 7.7$ Hz, 2H, 6''-H), 2.54 (s, 3H, 11''-H), 4.01 (s, 3H, 7-H), 4.99 (dd, $^3J_{10''a,9''} = 10.3$ Hz, $^2J_{10''a,10''b} = 1.8$ Hz, 1H, 10''-H_a), 5.03 (dd, $^3J_{10''b,9''} = 17.1$ Hz, $^2J_{10''b,10''a} = 1.8$ Hz, 1H, 10''-H_b), 5.82 (ddt, $^3J_{9'',10''b} = 17.0$ Hz, $^3J_{9'',10''a} = 10.2$ Hz, $^3J_{9'',8''} = 6.6$ Hz, 1H, 9''-H), 6.08 (d, $^4J_{3',1'} = 1.9$ Hz, 1H, 4-H), 6.39 (m_c, 1H, 4'-H), 6.68 (d, $^4J_{3'',1''} = 2.6$ Hz, 1H, 3''-H), 6.93 (m_c, 1H, 3'-H), 6.95 (s, 1H, 8-H), 7.24 (m_c, 1H, 5'-H), 12.57 (brs, 1H, 1'-NH), 12.73 (brs, 2H, 1-, 1''-NH); $^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 12.4 (C-11''), 24.7 (C-6''), 29.3 (C-7''), 33.2 (C-8''), 58.7 (C-7), 92.9 (C-3), 111.8 (C-4'), 114.9 (C-10''), 116.0 (C-8), 117.2 (C-3'), 120.8 (C-5), 122.2 (C-2'), 125.1 (C-2''), 127.0 (C-5'), 127.9 (C-4''), 128.3 (C-3''), 138.3 (C-9''), 146.8 (C-5''), 147.9 (C-2), 165.8 (C-4); **IR** (ATR-Film): $\tilde{\nu}$ [1/cm] = 2958, 2928, 2858, 1728, 1631, 1605, 1577, 1545, 1514, 1464, 1377, 1277, 1123, 1071, 1041, 989, 961, 743; **HRMS** (ESI-FTMS, positiv-Ion): Berechnet für C₂₀H₂₄N₃O (M + H)⁺ = 322.19139, gefunden = 322.19129; **LC-MS** (API-ES, 70 eV): t_R = 6.89 min.

6.7.5 *PigC in vitro Assay*

Heteroaromaten-Lösung: 20 mM in DMSO

MBC (12)-Lösung: 20 mM in DMSO

ATP-Lösung: 62.5 mM ATP·Na₂ in Wasser

Die enzymatische Kondensation von ungeschütztem MBC (12) und einem Heteroaromaten wurde im analytischen Maßstab (500 μ L) in 1.5 mL Reaktionsgefäßen durchgeführt und mittels LC-MS (6.3.1.8) analysiert. Als Löslichkeitsvermittler wurde DMSO verwendet; die Reaktion selbst wurde durch Zugabe von ATP gestartet. Die Endkonzentration der Substrate betrug jeweils 1 mM (1 Äq.) und die von ATP jeweils 1.25 mM (1.25 Äq.). Die Expression von *pigC* und der Zellaufschluss erfolgten gemäß 6.2.5.1 und 6.2.5.2.

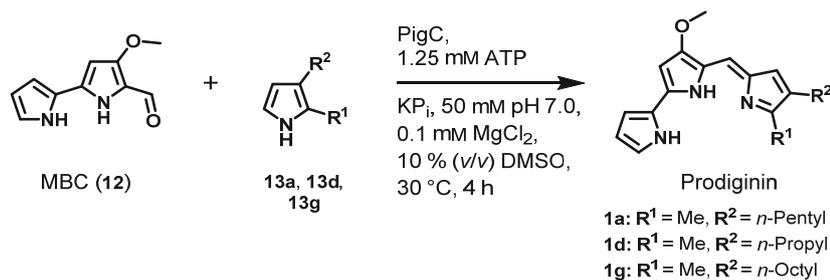
Der Reaktionsansatz bestand aus aufgeschlossenen Zellen (6.2.5.2) oder zellfreiem Überstand (440 μ L in KP_i-Puffer, 50 mM, pH 7.0) bzw. der Membranfraktion, der Lösung des Heteroaromaten (25 μ L), der Lösung von MBC (12, 25 μ L) und einer ATP-Lösung (10 μ L). Der Reaktionsansatz wurde für 4 h bei 300 rpm bei 30 °C geschüttelt. Anschließend wurde der Ansatz sedimentiert (10 min, 21 100 rcf, RT), der Überstand verworfen und das Prodiginin in acidem EtOH (6.3.1.2) resuspendiert. Die ethanolischen Extrakte wurden durch Zentrifugation (10 min, 21 100 rcf, RT) separiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Das EtOH wurde in einer Vakuumzentrifuge (30 °C, ca. 10–20 mbar, 240 rcf) entfernt und die Analyten für die LC-MS (6.3.1.8) durch lösen des Rückstandes in MeOH erhalten.

Um eine Selbstkondensation des Monopyrrols und MBC (12) auszuschließen, wurde der Assay ebenfalls ohne die Zugabe von zellfreiem Überstand exemplarisch mit MAP (13a) durchgeführt. Überdies wurde für eine zweite Negativkontrolle der Assay ohne die Zugabe von ATP durchgeführt. Um eine HCl-katalysierte Kondensation bei der Extraktion auszuschließen, wurden einige Ansätze mit MeOH extrahiert.

6.7.6 *PigC* Expression und Isolation der Membranfraktion

Für die Isolation der Membranfraktion wurden alle nachfolgenden Arbeitsschritte bei 4 °C durchgeführt. Den allgemeinen Vorschriften zur Produktion von Proteinen (6.2.5.1) und dem Zellaufschluss mittels Ultraschall (6.2.5.2) folgend, wurde *pigC* in *E. coli* Bl21(DE3) exprimiert und der zellfreie Überstand erhalten. Anschließend wurde die Membranfraktion durch Ultrazentrifugation (1.5 h, 40k rpm bzw. 107k g, 4 °C) vom Medium separiert, der Überstand verworfen und die leicht braune Membranfraktion in KP_i-Puffer (50 mM, pH 7.5) resuspendiert. Für SDS-PAGE Proben (6.2.5.4) erfolgte die Resuspension durch vorsichtige Behandlung mit einer Ultraschall-Sonotrode.

6.7.7 Michaelis-Menten-Kinetik von PigC



Monopyrrol-Lösung:	20 mM in DMSO
MBC (12)-Lösung:	2 mM in DMSO
ATP-Lösung:	62.5 mM ATP • Na ₂ in Wasser

Die Aufnahme der Kinetiken für das Kondensationsenzym PigC erfolgte nach einer modifizierten Vorschrift von *Chawrai et al.*^[127]

Die Aufnahme der Kinetiken der enzymatischen Kondensation von ungeschütztem MBC (12) und den Monopyrrolen 13a, 13d und 13g wurde im analytischen Maßstab (200 µL) in 96 x 300 µL Mikrotiterplatten (*Nunclon*[®]; Polystyrol, transparent, flacher Boden; *Nunc*[™] *Thermo Fisher Scientific*, Waltham, MA, USA) durchgeführt und mittels Absorptionsspektroskopie analysiert. Als Löslichkeitsvermittler wurde DMSO verwendet. Die Endkonzentration von ungeschütztem MBC (12) betrug jeweils 0.1 mM und die von ATP jeweils 1.25 mM. Für die Monopyrrole wurden zunächst Verdünnungsreihen erstellt und die Endkonzentration betrug ≤ 1 mM. Die Expression von *pigC* und der Zellaufschluss erfolgten gemäß 6.2.5.1 und 6.2.5.2 und die Isolation der Membranfraktion gemäß 6.7.6. Die Membranfraktion von jeweils 1 mL zellfreiem Überstand wurde in 3 mL KP_i-Puffer (50 mM, pH 7.0, 0.1 mM MgCl₂) vorsichtig resuspendiert. Alle Arbeitsschritte bis zur Aufnahme von den Kinetiken wurden bei 4 °C durchgeführt.

Der Reaktionsansatz bestand aus resuspendierter Membranfraktion (176 µL in KP_i-Puffer, 50 mM, pH 7.0, 0.1 mM MgCl₂), der Lösung des Monopyrrols (10 µL) und der Lösung von MBC (12, 10 µL). Die Reaktion wurde durch Zugabe der ATP-Lösung (4 µL) gestartet. Der Reaktionsansatz wurde für 4 h bei 30 °C inkubiert.

Die Datenaufnahme erfolgte durch die Messung der Absorption bei $\lambda = 535$ nm in Intervallen von 5 min in einem *Tecan Infinite*[®] M1000 PRO Mikrotiterplatten Lesegerät (*Tecan Trading AG*, Männedorf, Schweiz) in Dreifachbestimmung. Jeweils 1 min vor der Messung erfolgte eine Schüttelsequenz (1 s, 306 rpm) in orbitalen Kreisbewegungen. Für die Datenauswertung wurde jeweils die Absorption bei $\lambda = 535$ nm bei $t = 0$ min von den Messwerten subtrahiert, anschließend die Absorption gegen die Zeit in Minuten abgetragen und die Anfangsgeschwindigkeit jedes Reaktionsansatzes durch lineare Regression unter Verwendung des *Lambert-Beer'schem* Gesetzes (Formel 3) und der entsprechenden Extinktionskoeffizienten der Prodiginine ermittelt. Die Datenauswertung der *Michaelis-Menten*-Kinetik erfolgte in *Origin Pro 9.0G* (*OriginLab Corporation*, Northampton, MA, USA) durch einen nichtlinearen

Fit unter Verwendung eines Modells der *Michaelis-Menten*-Kinetik mit Substratüberschussinhibierung (Formel 4, Abbildung 42) mit dem *Levenberg-Marquardt* Iterationsalgorithmus.^[368-370]

$$v = \frac{v_{max}[S]}{K_m + [S] \left(1 + \frac{[S]}{K_i}\right)}$$

Formel 4: Modell einer *Michaelis-Menten*-Kinetik mit Substratüberschussinhibierung. [v – Reaktionsgeschwindigkeit; v_{max} – maximale Reaktionsgeschwindigkeit; S – Substrat; K_m – Michaeliskonstante; K_i – Dissoziationskonstante des Substrats als Inhibitor]

6.7.8 Semisynthese mit extrahierten Prodigininen

Die aus der Mutasythese (6.7.4) gewonnenen Prodiginine wurden nach säulenchromatographischer Reinigung als Hydrochlorid dargestellt und in der chemischen Synthese (6.6.2, Hydroxyprodiginin **84**) eingesetzt.

6.7.9 Biosynthese und Extraktion von MBC (**12**) und anschließender Semisynthese

6.7.9.1 Biosynthese von MBC (**12**)

Die Produktion von MBC (**12**) im präparativen Maßstab wurden in einem 3 L *Fernbach*-Kolben mit Schikane in einem finalen Volumen 500 mL TB_{Sm}-Flüssigmedium oder M63_{Sm}-Minimalmedium hergestellt. Das Kulturmedium wurde mit einer Übernachtskultur von *P. putida* pig-r2 Δ pigD mit einer OD₆₀₀ = 0.05 inokuliert, der Kolben mit Alufolie verschlossen und die Kultur 48 h bei 20 °C und 120 rpm inkubiert. Diese Bedingungen sind durch M.Sc. *Hannah U.C. Braß* für die Prodigiosin (**1a**) Produktion optimiert worden (unveröffentlichte Ergebnisse). Die Zellen wurden mittels Zentrifugation geerntet (20 min, 12k rcf, 4 °C) und der Überstand verworfen bzw. gefriergetrocknet.

6.7.9.2 Extraktion von MBC (**12**)

Für die Extraktion von MBC (**12**) aus den Zellen wurden je 4 g Zellen in EtOH (30 mL) resuspendiert und im Ultraschallbad (1 h bei 30 °C) aufgeschlossen. Der Zelldebris wurde durch Zentrifugation (15 min, 12 850 rcf, 16 °C) entfernt und aufbewahrt. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Der Zelldebris wurde in Chloroform (20 mL) erneut mittels Ultraschallbad (20 min bei 30 °C) extrahiert und durch Zentrifugation (15 min, 12 850 rcf, 16 °C) entfernt. Der Chloroformextrakt wurde mit dem Ethanol extrakt vereint und die Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt (Badtemperatur am Ende 50 °C; 15 mbar). Der Rückstand wurde in Dichlormethan (5 mL) aufgenommen und vollständig für die anschließende Semisynthese verwendet.

6.7.9.3 Semisynthese mit extrahiertem MBC (12)

Die Semisynthese wurde nach der Methode 1 der Vorschrift für die Kondensationsreaktion zu Prodigininen (6.6.1) in einem *Schlenk*-Kolben unter Schutzgasatmosphäre durchgeführt. Für die Semisynthese wurde der Präkursor MAP (13a) verwendet und somit Prodigiosin (1a) hergestellt. Dabei wurde MAP (13a, 10 mg, 66 µmol) im Überschuss eingesetzt. Nach erfolgter Kondensation wurde der Reaktionsansatz durch Zugabe von Wasser und gesättigter NaCl-Lösung (je 5 mL) gequenchet, mit Dichlormethan (3 x 5 mL) extrahiert, die vereinten organischen Phasen über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde in acidem EtOH (5 ml, 6.3.1.2) aufgenommen und Prodigiosin durch die Absorption bei $\lambda = 535$ nm quantifiziert.

6.7.10 Toxizitäts-Assay von Prodigininen und Präkursoren

Die Toxizitäts-Assays wurden in 96 x 300 µL Mikrotiterplatten (*Nunclon*[®]; Polystyrol, transparent, flacher Boden; *Nunc*[™] Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) in einem finalen Volumen von 150 µL LB-Flüssigmedium mit Prodigininen und Präkursoren mit 3% (v/v) DMSO als Cosolvens durchgeführt. **Detaillierte Vorschrift:** Das LB-Flüssigmedium ohne Antibiotikum wurde mit einer Übernachtskultur von *P. putida* KT2440, *E. coli* BL21(DE3), *B. subtilis* 168, *C. glutamicum* oder *P. aeruginosa* PAO1 mit einer OD₆₀₀ = 0.02 inokuliert. Die Prodiginine 1a, 1d, 1g, 1k, 1u oder die Präkursoren MAP (13a) und MBC (12) wurde zunächst in DMSO gelöst (≤ 10 mM) und Verdünnungsreihen erstellt (Verdünnung: 6:4). 4.5 µL dieser DMSO-Lösungen wurden zum Kulturmedium (145.5 µL) hinzugegeben [Endkonzentration ≤ 300 µM, 3% (v/v) DMSO]. Als Absorptionskontrolle wurde LB-Flüssigmedium mit Testsubstratzusatz verwendet. Die Mikrotiterplatten wurde mit einem luftdurchlässigen *AeraSeal*[™] Film (*Excel Scientific*, Victorville, CA, USA) abgeklebt und in einem Plattformschüttler für 16 h bei 30 °C und 800 rpm inkubiert. Die Datenaufnahme erfolgte durch die Messung der OD₇₅₀ in einem *Tecan Infinite*[®] M1000 PRO Mikrotiterplatten Lesegerät (*Tecan Trading AG*, Männedorf, Schweiz) in Dreifachbestimmung. Für die Datenauswertung wurde jeweils die OD₇₅₀ der Absorptionskontrolle von den Kulturwerten subtrahiert und anschließend die OD₇₅₀ gegen die Substratkonzentration halblogarithmisch abgetragen. Die Datenauswertung erfolgte in *Origin Pro 9.0G* (*OriginLab Corporation*, Northampton, MA, USA) durch einen nichtlinearen Fit unter Verwendung einer Dosis-Wirkungs-Kurve (Formel 5, Abbildung 64, engl. *dose-response relationship*) mit dem *Levenberg-Marquardt* Iterationsalgorithmus:^[368, 369]

$$y_{dr} = A_1 + \frac{A_2 - A_1}{1 + 10^{(x_0 - x)^p}}$$

Formel 5: Funktion zur Auswertung einer Dosis-Wirkungs-Kurve. [y_{dr} = Wirkungs-Wert; x = Dosis; A_1 = untere Asymptote; A_2 = obere Asymptote; x_0 = x-Koordinate des Mittelpunkts der sigmoidalen Kurve; p = Hill-Steigung in x_0]

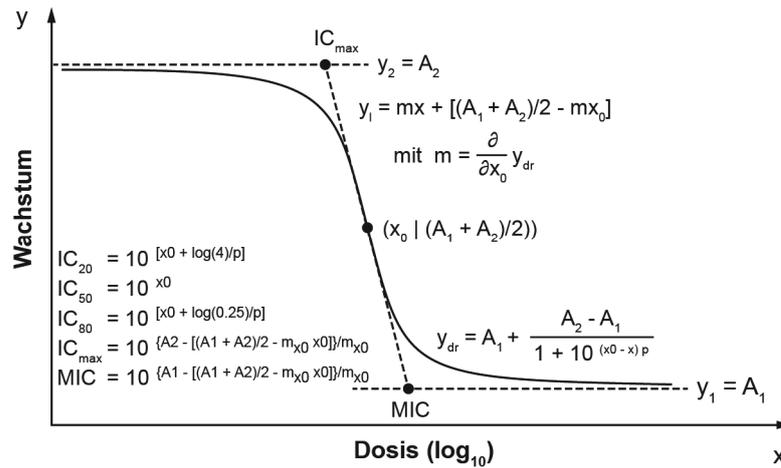


Abbildung 64: Schema einer Dosis-Wirkungs-Kurve. Es sei zu beachten, dass die x-Werte logarithmisch abgetragen sind. [y_{dr} – Wirkungs-Wert; x – Dosis; A_1 – untere Asymptote; A_2 – obere Asymptote; x_0 – x-Koordinate des Mittelpunkts der sigmoidalen Kurve; p – Hill-Steigung in x_0 ; m – Steigung der Graden y_l ; IC – inhibitorische Konzentration; MIC – minimale inhibitorische Konzentration]

Nach *du Toit* und *Rautenbach* wurden die minimale inhibitorische Konzentration (MIC ; engl. *minimal inhibitory concentration*) und die maximale inhibitorische Konzentration (IC_{max}) aus den Dosis-Wirkungs-Kurven abgeleitet.^[262, 263] Hierfür wurden die x-Werte der Schnittpunkte der Graden durch den IC_{50} -Wert und den beiden Asymptoten berechnet (Abbildung 64). Die Grade hat die Steigung der Dosis-Wirkungs-Kurve. Folgende Herleitung der Formeln ergeben sich bei Verwendung der logarithmischen Werte für die Dosis.

Die Grade y_l mit der Steigung m durch den IC_{50} -Punkt ($x_0 | (A_1 + A_2)/2$) mit ist wie folgt definiert:

$$y_l = mx + \left(\frac{A_1 + A_2}{2} - mx_0 \right) \quad \text{Formel 6}$$

Die Steigung m dieser Graden entspricht der ersten partiellen Ableitung der Funktion y_{dr} der Dosis-Wirkungs-Kurve nach x :

$$m = \frac{\partial}{\partial x} y_{dr} = \frac{\ln(10)(A_2 - A_1)p 10^{p(x_0 - x)}}{[10^{p(x_0 - x)} + 1]^2} \quad \text{Formel 7}$$

Für die Grade y_l durch den IC_{50} -Punkt mit $x := x_0$ kann daher folgende Gleichung deduziert werden:

$$m_{x_0} = \frac{\ln(10)(A_2 - A_1)p}{4} \quad \text{Formel 8}$$

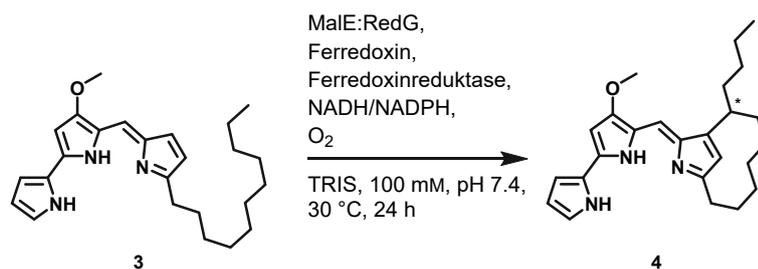
Die Definitionen für die MIC und IC_{max} Werte lassen sich anschließend aus den Schnittpunkten der Graden y_l mit den Asymptoten A_1 und A_2 ableiten:

$$MIC = 10^{\frac{A_1 - \left(\frac{A_1 + A_2}{2} - m_{x_0} x_0\right)}{m_{x_0}}} \quad \text{Formel 9}$$

$$IC_{max} = 10^{\frac{A_2 - \left(\frac{A_1 + A_2}{2} - m_{x_0} x_0\right)}{m_{x_0}}} \quad \text{Formel 10}$$

Diese Formeln geben hierbei bereits die reale Konzentration wieder.

6.7.11 Zyklisierung von Undecylprodigiosin (3) durch RedG



NADH-Lösung:	95.3 mM in TRIS-Puffer (100 mM, pH 7.4)
NADPH-Lösung:	95.3 mM in TRIS-Puffer (100 mM, pH 7.4)
Undecylprodigiosin (3)-Lösung:	127 mM Undecylprodigiosin (3) in DMSO

Die enzymatische Zyklisierung von Undecylprodigiosin (3) zu Butyl-*meta*-cycloheptylprodigiosin (4) wurde im analytischen Maßstab (500 µL) in 1.5 mL Reaktionsgefäßen durchgeführt und mittels LC-MS (6.3.1.8) analysiert. Als Löslichkeitsvermittler wurde DMSO verwendet; die Reaktion selbst wurde durch Zugabe von NAD(P)H und molekularem Sauerstoff gestartet. Die Endkonzentration des Substrats betrug 2.5 mM (1 Äq.), die der Cofaktoren jeweils 3.8 mM (1.5 Äq.). Die Proteinproduktion der Ferredoxine, Ferredoxinreduktasen und des Fusionsproteins RedG:MalE und der Zellaufschluss erfolgten gemäß 6.2.5.1 und 6.2.5.2.

Der Reaktionsansatz bestand aus aufgeschlossenen Zellen der Proteinproduktion der Ferredoxine, Ferredoxinreduktasen und des Fusionsproteins RedG:MalE (6.2.5.2; jeweils 150 µL in TRIS-Puffer, 100 mM, pH 7.4), der Undecylprodigiosin (3)-Lösung (10 µL) und der NAD(P)H-Lösungen (je 20 µL). Anschließend erfolgte die Zuführung von molekularem Sauerstoff über 1 min. Der Reaktionsansatz wurde für 24 h bei 300 rpm bei 30 °C geschüttelt. Anschließend wurde der Ansatz sedimentiert (10 min, 21 100 rcf, RT), der Überstand verworfen und die Prodiginine in EtOH (400 µL) resuspendiert. Die ethanolischen Extrakte wurden durch Zentrifugation (10 min, 21 100 rcf, RT) separiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Das EtOH wurde in einer Vakuumzentrifuge (30 °C, ca. 10–20 mbar, 240 rcf) entfernt und die Analyten für die LC-MS (6.3.1.8) durch lösen des Rückstandes in MeOH erhalten.

7 Anhänge

7.1 Allgemeine Anhänge

Tabelle 32: Absorptionsmaxima von Prodigiosin (**1a**) in verschiedenen Lösungsmitteln unterschiedlicher relativen Permittivität ϵ_r . [n. b. – nicht bestimmt]

	rel. Permittivität ϵ_r	1a A	1a AH ⁺ ·(H ⁺ Cl)
		λ_{\max}^A (gelb) [nm]	$\lambda_{\max}^{AH^+}$ (rot) [nm]
Aceton	20.70	–	532
Acetonitril	37.50	468	530
Chloroform	4.81	–	540
Dichlormethan	8.93	–	536
Diethylether	4.33	464	535
DMSO	46.68	473	547
EtOAc	6.02	468	533
EtOH	24.50	471	540
<i>n</i> -Heptan	1.92	–	540
MeOH	32.70	–	536
MTBE	2.60	465	535
2-Propanol	19.92	–	536
acides EtOH	n. b.	–	535

Tabelle 33: Herstellerangaben des kommerziellen Polyurethan Schaumstoffs *Softpur* mit der Bezeichnung „24/40“.

Prüfung	Prüfnorm	Werte
Raumgewicht (<i>brutto</i>) [kg/m ³]	DIN 53 420 ISO 845	25 (± 10 %)
Raumgewicht (<i>netto</i>) [kg/m ³]	DIN 53 420 ISO 845	24 (± 10 %)
Stauchhärte [N]	DIN 53 577 (40 %) ISO 2439 B	160 (± 15 %)
Stauchhärte	DIN 53 577 (40 %) ISO 3386-1	4 (± 15 %)
Zugfestigkeit [kPa]	DIN 53 571 ISO 1798	min. 80
Bruchdehnung [%]	DIN 53 571 ISO 1798	min. 100
Druckverformungsrest [%]	DIN 53 572 ISO 1856 A	max. 6
Elastizität [%]	DIN 53 573 ISO 8307	min. 40

Tabelle 34: Biosynthese von Prodigiosin (**1a**) in *P. putida* pig-r2 unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen (6.7.1). Die Quantifizierung ist jeweils als Produktionstiter [mg/L], als volumetrische Produktivität [mg/L/h] und als spezifische Produktionsausbeute pro Zellmasse [mg/gDCW] angegeben. Die Daten wurden von Dr. *Andreas Domröse* erhoben.^[5, 207] [1/5 und 1/10 – Füllvolumen des Kolbens; - - Kolben ohne Schikane; + - Kolben mit Schikane]

1a [mg/L]		LB												TB											
		6 h				24 h				48 h				6 h				24 h				48 h			
		1/5 -	1/10 -	1/5 +	1/10 +	1/5 -	1/10 -	1/5 +	1/10 +	1/5 -	1/10 -	1/5 +	1/10 +	1/5 -	1/10 -	1/5 +	1/10 +	1/5 -	1/10 -	1/5 +	1/10 +	1/5 -	1/10 -	1/5 +	1/10 +
30°C	\bar{x}	1.21	4.19	8.58	9.01	5.26	8.53	14.25	17.25	3.52	7.24	13.68	15.81	0.76	1.92	5.38	10.12	3.07	5.79	17.02	35.48	2.61	4.83	16.07	30.92
	σ	0.09	0.68	0.24	0.78	0.50	0.84	1.29	1.39	0.13	0.90	1.30	0.91	0.11	0.30	0.85	0.97	0.12	0.23	1.04	4.54	0.07	0.74	1.24	3.14
25°C	\bar{x}	0.36	0.76	0.73	0.42	5.97	13.58	20.52	18.94	8.36	14.99	19.90	16.91	0.38	0.46	0.46	0.30	2.97	9.14	28.05	48.02	4.17	8.85	31.93	46.87
	σ	0.02	0.02	0.01	0.03	0.41	0.83	0.51	1.48	0.81	0.09	0.79	2.27	0.01	0.02	0.04	0.02	0.51	0.70	2.62	3.70	0.40	1.15	1.77	4.76
20°C	\bar{x}	0.73	0.70	0.37	0.28	13.75	20.03	22.97	22.41	19.21	23.91	26.03	20.87	0.39	0.35	0.13	0.10	8.62	24.97	51.66	83.94	10.23	30.29	82.01	93.74
	σ	0.14	0.15	0.01	0.04	0.51	1.19	2.22	3.62	1.35	1.94	1.12	1.77	0.04	0.03	0.03	0.02	0.69	2.49	6.36	15.78	0.64	5.20	11.57	0.55

1a [mg/L/h]		LB												TB											
		6 h				24 h				48 h				6 h				24 h				48 h			
		1/5 -	1/10 -	1/5 +	1/10 +	1/5 -	1/10 -	1/5 +	1/10 +	1/5 -	1/10 -	1/5 +	1/10 +	1/5 -	1/10 -	1/5 +	1/10 +	1/5 -	1/10 -	1/5 +	1/10 +	1/5 -	1/10 -	1/5 +	1/10 +
30°C	\bar{x}	0.20	0.70	1.43	1.50	0.22	0.36	0.59	0.72	0.07	0.15	0.28	0.33	0.13	0.32	0.90	1.69	0.13	0.24	1.48	0.71	0.05	0.10	0.33	0.64
	σ	0.02	0.11	0.04	0.13	0.02	0.04	0.05	0.06	0.00	0.02	0.03	0.02	0.02	0.05	0.14	0.16	0.01	0.01	0.19	0.04	0.00	0.02	0.03	0.07
25°C	\bar{x}	0.06	0.13	0.12	0.07	0.25	0.57	0.86	0.79	0.17	0.31	0.41	0.35	0.06	0.08	0.08	0.05	0.12	0.38	1.17	2.00	0.09	0.18	0.67	0.98
	σ	0.00	0.00	0.00	0.01	0.02	0.03	0.02	0.06	0.02	0.00	0.02	0.05	0.00	0.00	0.01	0.00	0.02	0.03	0.11	0.15	0.01	0.00	0.04	0.10
20°C	\bar{x}	0.12	0.12	0.06	0.05	0.57	0.83	0.96	0.93	0.40	0.50	0.54	0.43	0.07	0.06	0.02	0.02	0.36	1.04	2.15	3.50	0.21	0.63	1.71	1.95
	σ	0.02	0.03	0.00	0.01	0.02	0.05	0.09	0.15	0.03	0.04	0.02	0.04	0.01	0.01	0.01	0.00	0.03	0.10	0.27	0.66	0.01	0.11	0.24	0.01

1a [mg/gDCW]		LB												TB											
		6 h				24 h				48 h				6 h				24 h				48 h			
		1/5 -	1/10 -	1/5 +	1/10 +	1/5 -	1/10 -	1/5 +	1/10 +	1/5 -	1/10 -	1/5 +	1/10 +	1/5 -	1/10 -	1/5 +	1/10 +	1/5 -	1/10 -	1/5 +	1/10 +	1/5 -	1/10 -	1/5 +	1/10 +
30°C	\bar{x}	2.71	5.35	6.91	5.49	2.92	3.79	7.09	9.19	1.30	3.09	6.37	8.03	1.56	1.78	2.87	3.22	1.41	1.33	2.37	4.62	0.82	0.93	2.20	4.69
	σ	0.40	1.08	0.39	0.53	0.29	0.36	1.01	0.33	0.05	0.36	0.87	0.37	0.27	0.30	0.65	0.38	0.13	0.03	0.12	0.60	0.02	0.10	0.14	0.54
25°C	\bar{x}	1.44	1.83	1.65	1.00	3.86	6.40	10.44	10.07	3.05	6.14	10.18	10.67	1.31	0.77	0.49	0.31	1.71	2.89	4.03	6.08	1.37	1.77	3.75	6.17
	σ	0.01	0.04	0.03	0.06	0.05	0.19	0.11	0.41	0.20	0.23	0.40	0.66	0.04	0.02	0.03	0.02	0.24	0.20	0.29	0.39	0.08	0.09	0.13	0.51
20°C	\bar{x}	1.92	1.77	1.09	0.88	8.98	9.39	9.31	9.82	6.50	13.06	11.35	10.75	1.28	1.14	0.40	0.28	4.06	6.43	8.32	10.70	2.71	4.85	10.10	13.90
	σ	0.28	0.32	0.03	0.08	0.61	0.33	0.74	1.34	0.72	1.26	0.24	0.14	0.04	0.07	0.06	0.04	0.51	0.67	0.43	1.80	0.17	0.84	1.74	1.12

Tabelle 35: Detaillierte Kostenaufstellung der Chemikalien und Lösungsmittel für die Produktion von 97 mg Prodigiosin (**1a**)-HCl durch die biomimetische Totalsynthese (3.1) und die Fermentation mit PU-Schaum (3.2.3). Die Kosten für die Chemikalien sind von *Sigma-Aldrich/Fluka* und *Carl Roth GmbH & Co KG* am 25. Juli 2017 abgerufen worden und enthalten keine Vergünstigungen. Die Berechnung für die Totalsynthese stützt sich auf die Ausbeuten in Schema 17 und bezieht sich auf 270 μmol (**1a**), 520 μmol (**46**), 690 μmol (**51**) und 620 μmol (**13a**).

Totalsynthese						
Chemikalie	Menge	Kosten	Verbrauch		Kosten	
2-Octanon (99.5%)	25 g	40.90€	1.27 mmol	163 mg		0.27€
Pyridin (99.8%)	1.0 L	198.50€	1.02 mmol	80 μL		0.02€
Hydroxylaminhydrochlorid ($\geq 99.9\%$)	50 g	132.50€	1.91 mmol	132 mg		0.35€
Kaliumhydroxid ($\geq 85\%$)	500 g	20.30€	6.23 mmol	349 mg		0.01€
1,2-Dichlorethan (99.8%)	1.0 L	114.50€	2.18 mmol	216 μL		0.02€
Phosphoroxybromid	25 g	130.50€	2.40 mmol	689 mg		3.60€
Diethylformamid	25 g	33.80€	2.88 mmol	292 mg		0.39€
4-Methoxy-3-pyrrolin-2-on (99%)	1 g	83.40€	0.96 mmol	109 mg		9.07€
Tetrakis(triphenylphosphin)-palladium(0) (99.0%)	5 g	126.50€	0.07 mmol	80 mg		2.02€
N-Boc-1H-Pyrrol-2-boronsäure (95.0%)	5 g	177.50€	1.04 mmol	334 mg		11.87€
Natriumcarbonat ($\geq 99.5\%$), trocken	1000 g	107.00€	2.08 mmol	220 mg		0.02€
Kaliumphosphat ($\geq 99.0\%$), trocken	500 g	86.40€	1.38 mmol	294 mg		0.05€
Phosphoroxychlorid ($\geq 99.0\%$)	25 mL	28.30€	5.19 mmol	484 mg		0.55€
Lösungsmittel:						
Dichlormethan ($\geq 99.5\%$)	2.5 L	41.00€		562.300 mL		9.22€
Diethylether ($\geq 99.5\%$)	2.5 L	76.10€		10.000 mL		0.30€
Dioxan (99.8%), trocken	1.0 L	99.20€		4.706 mL		0.47€
DMSO ($\geq 99.5\%$)	1.0 L	73.50€		1.450 mL		0.11€
EtOH ($\geq 99.8\%$) absolut	1.0 L	138.00€		0.636 mL		0.09€
Essigsäureethylester ($\geq 99.0\%$)	22371 kg	148.00€		123.500 mL		0.82€
7 N NH_3 in MeOH	100 mL	94.20€		5.000 mL		4.71€
Petrolether 40–60°C (min. 75%)	6.0 L	181.00€		255.000 mL		7.69€
Toluol ($\geq 99.7\%$)	10.0 L	303.50€		0.286 mL		0.01€
Triethylamin ($\geq 99.5\%$)	1.0 L	51.90€		3.072 mL		0.16€
Gesamtkosten						51.82€
Biosynthese mit PU-Schaum						
TB-Flüssigmedium	21.0 L	98.50€		2.0 L		9.38€
Glycerin	1.0 L	32.90€	109.5 mmol	8.000 mL		0.26€
PU	10.0 g	0.28€		10.0 g		0.28€
Lösungsmittel:						
Dichlormethan ($\geq 99.5\%$)	2.5 L	41.00€		5.300 mL		8.20€
7 N NH_3 in MeOH	100 mL	94.20€		5.000 mL		4.71€
Gesamtkosten						22.83€

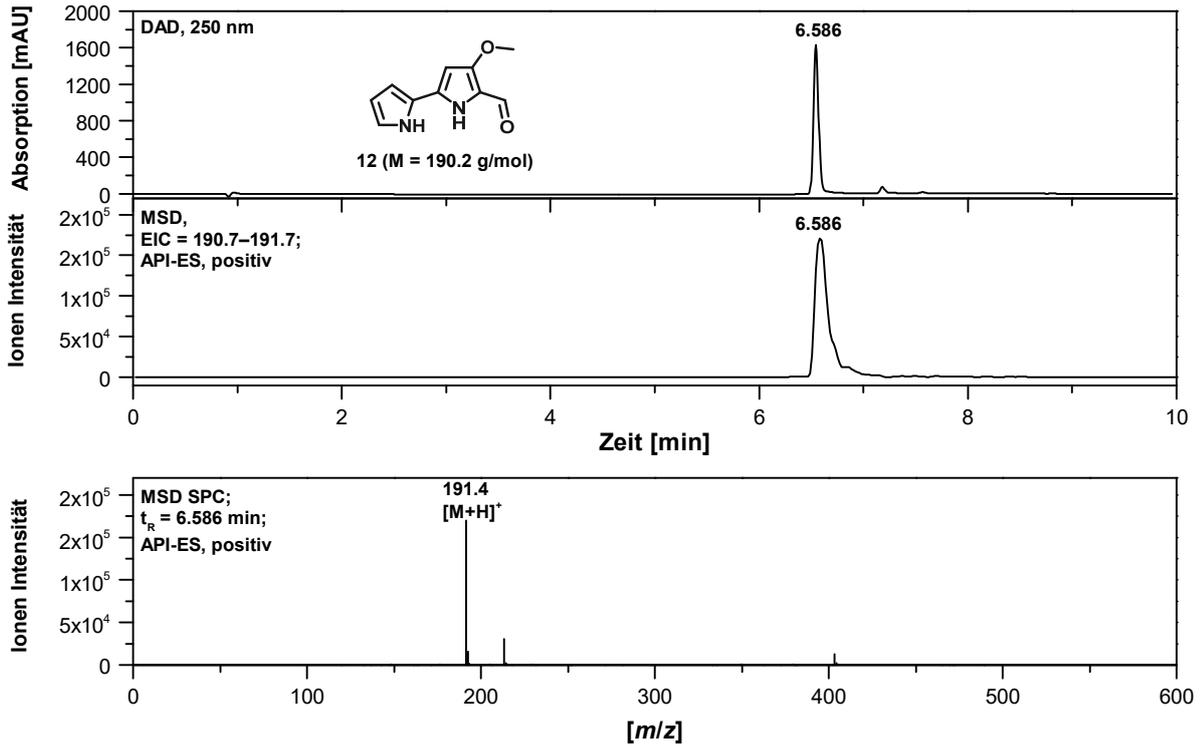


Abbildung 65: LC-MS Chromatogramm, Massenchromatogramm und Massenspektrum von synthetisch hergestelltem MBC (12).

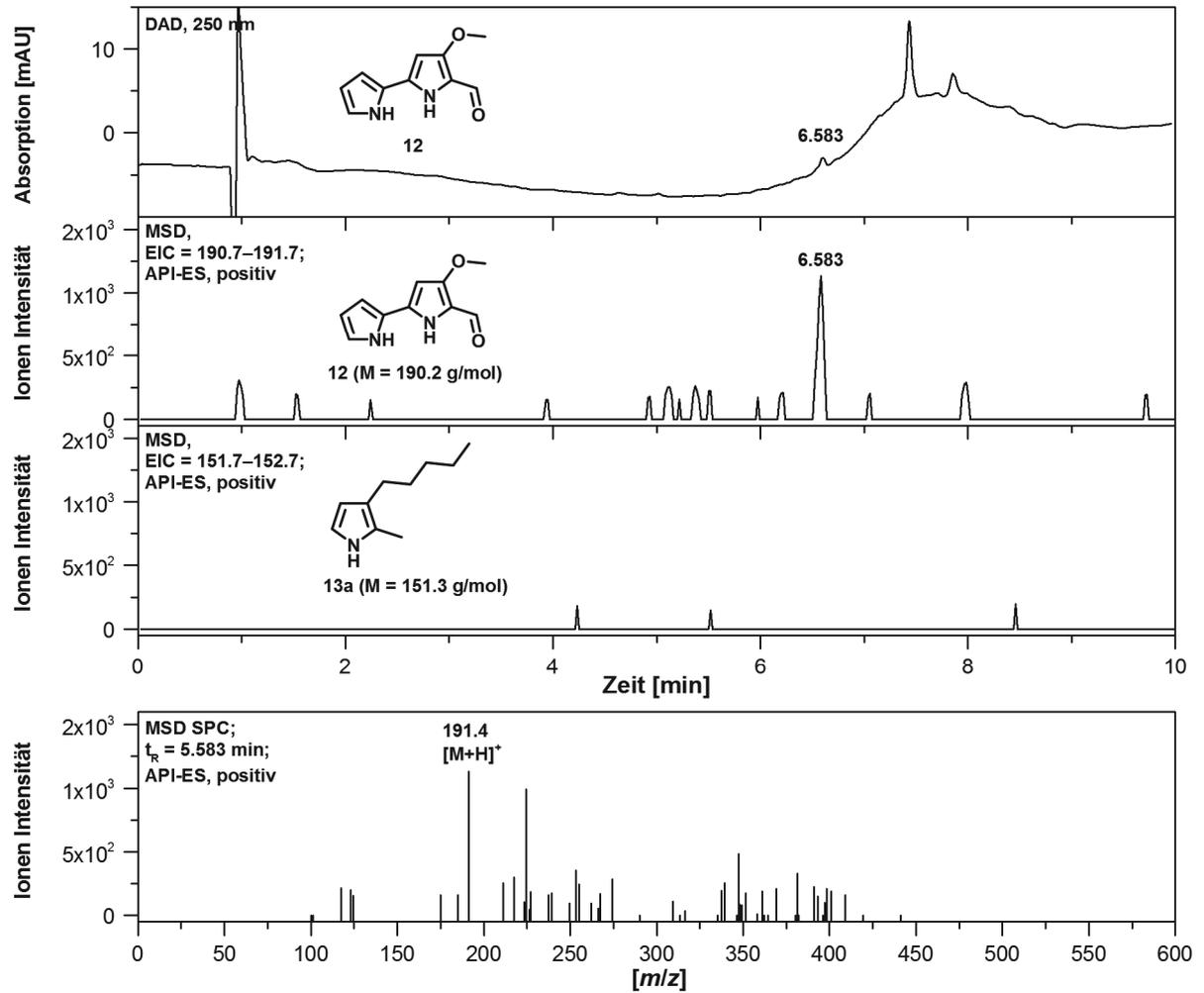


Abbildung 66: LC-MS Chromatogramme, Massenchromatogramme und Massenspektren von extrahierten MBC (12) aus *P. putida* pig-r2 Δ pigD. Als Kontrolle für die MAP (13a) Defizienz wurde ebenfalls dessen Masse aus dem Massenspektrum extrahiert.

7.2 Dosis-Wirkungs-Kurven & Auswertung

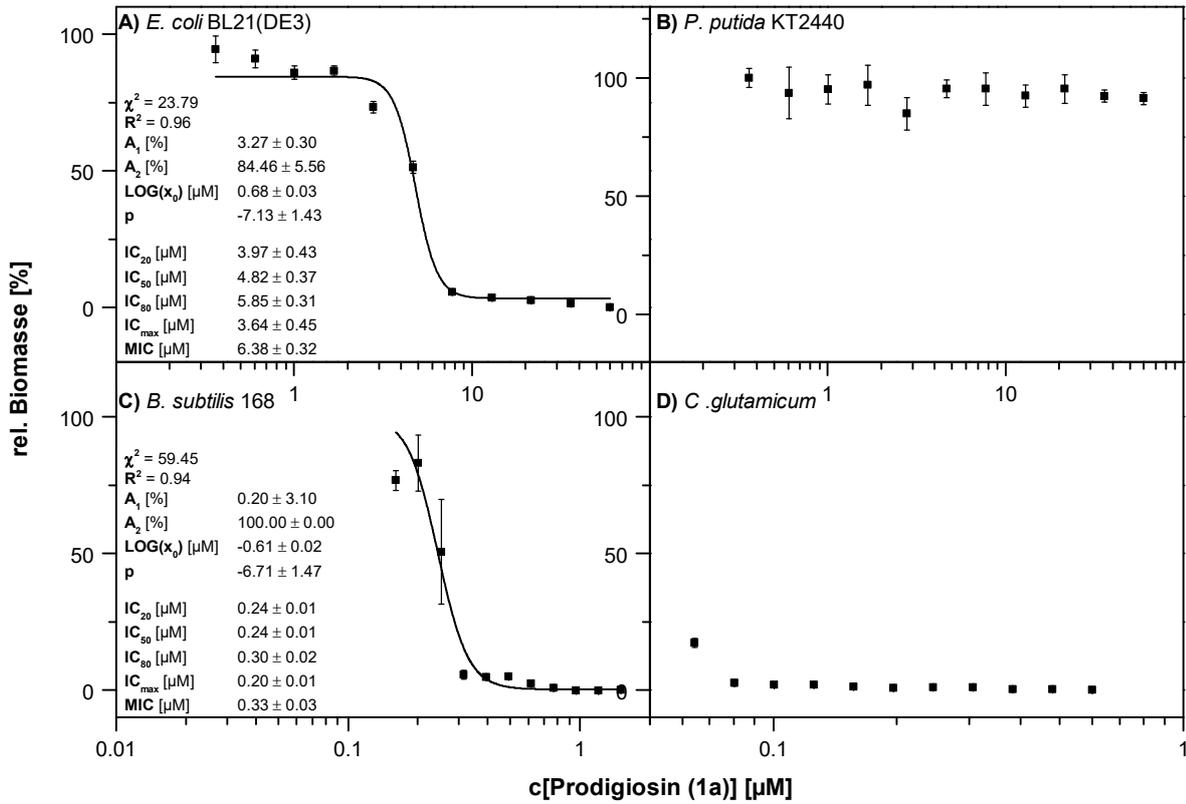


Abbildung 67: Toxizitäts-Assay für Prodigiosin (1a).

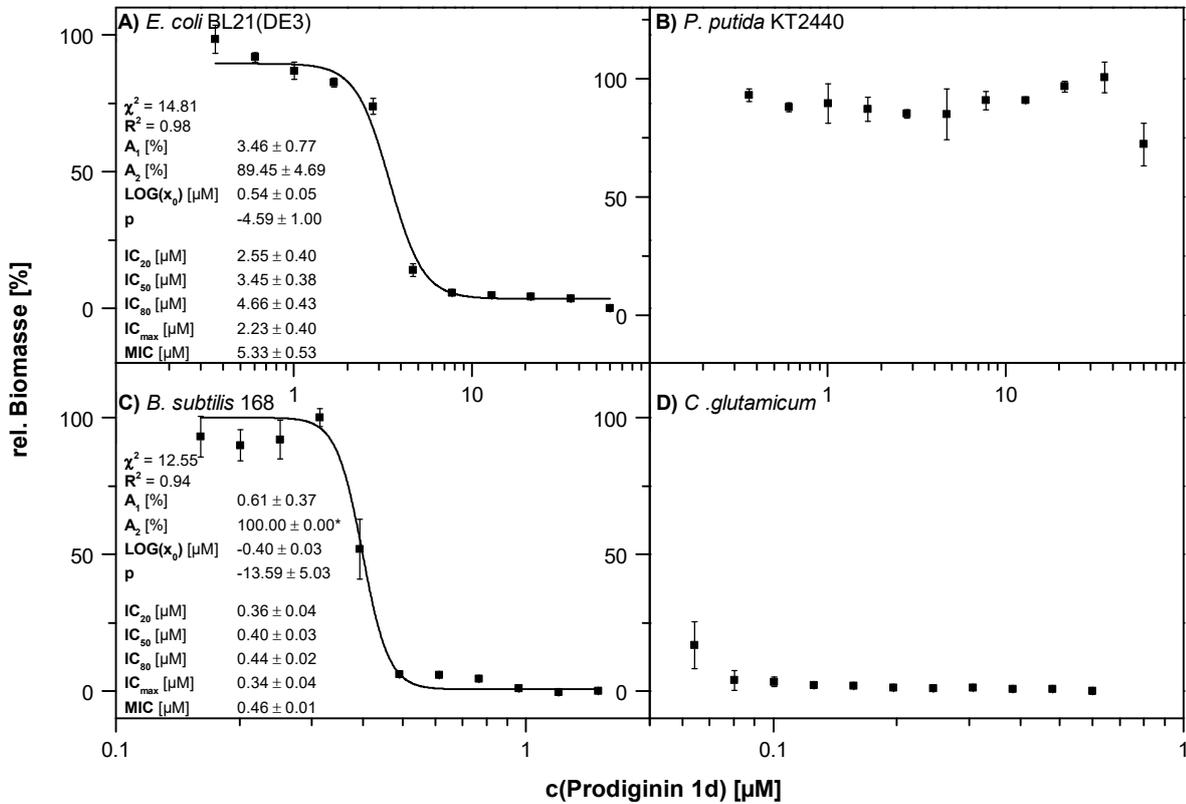


Abbildung 68: Toxizitäts-Assay für Prodiginin 1d.

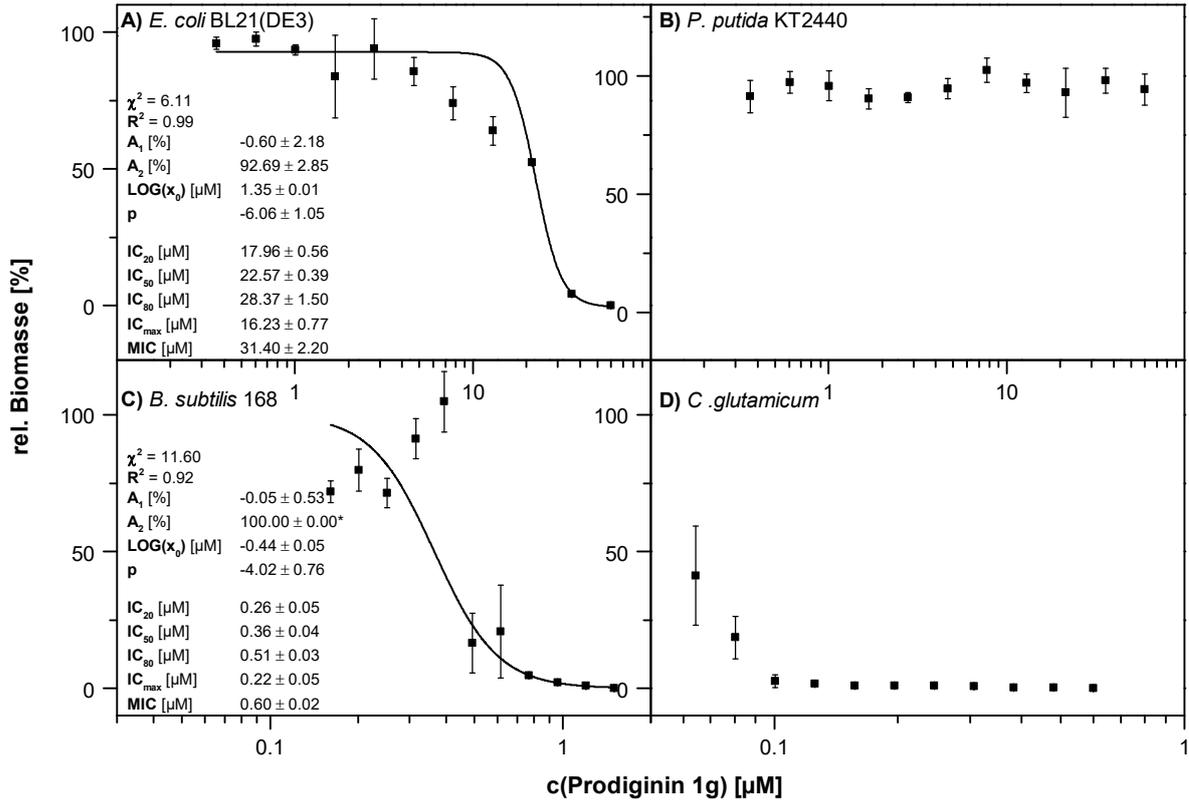


Abbildung 69: Toxizitäts-Assay für Prodiginin 1g.

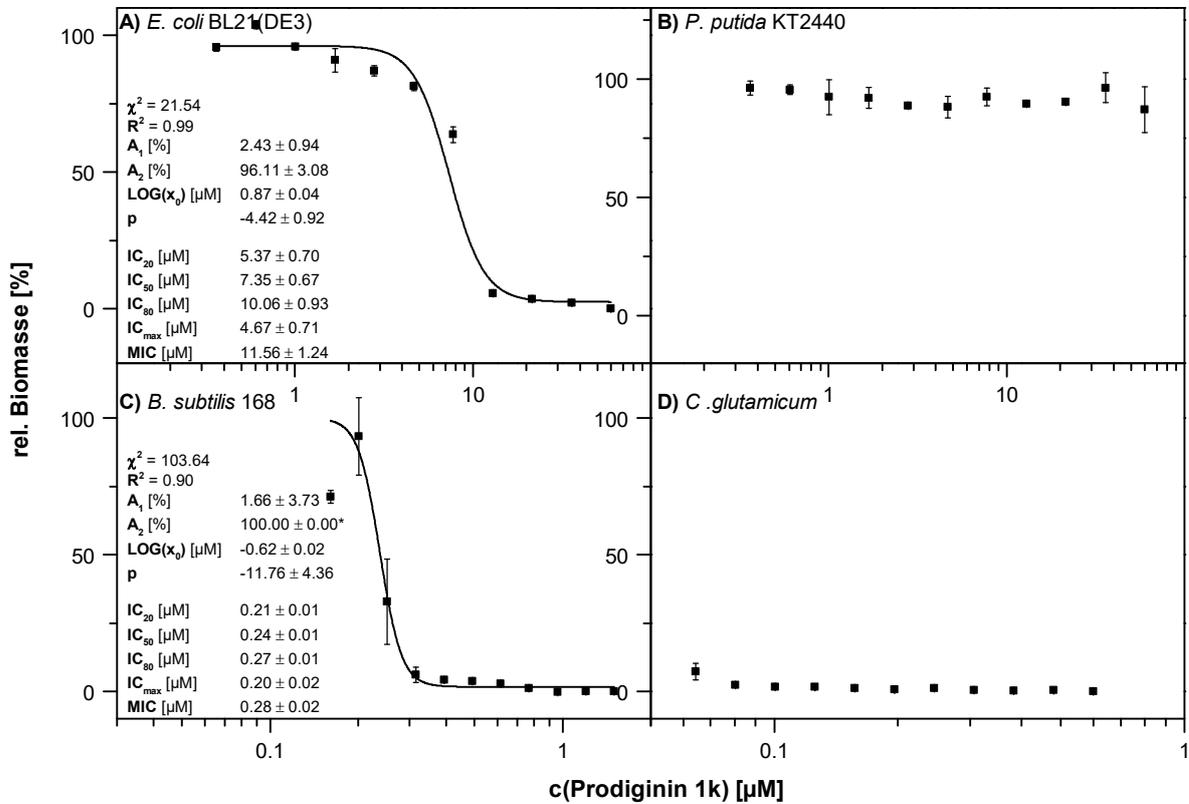


Abbildung 70: Toxizitäts-Assay für Prodiginin 1k.

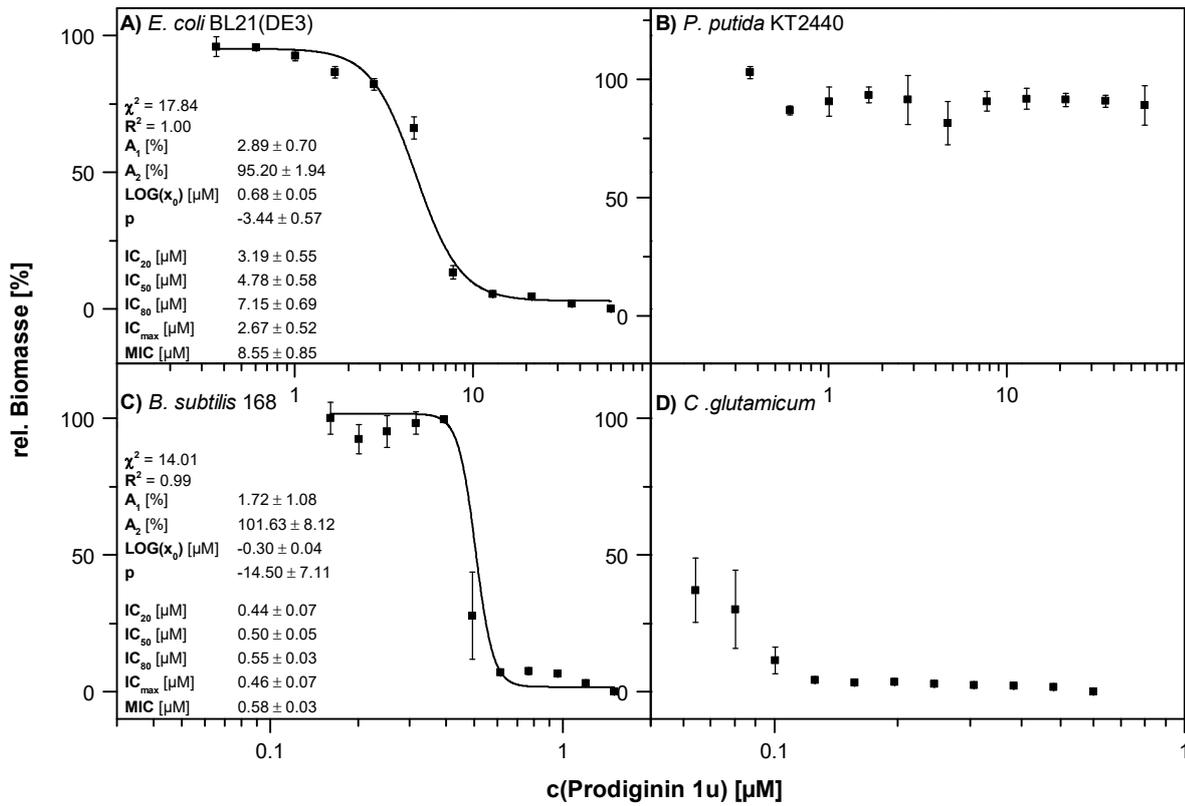


Abbildung 71: Toxizitäts-Assay für Prodiginin 1u.

Tabelle 36: Auswertung der Toxizitäts-Assays der Prodiginine **1a**, **d**, **g**, **k** und **u** für *E. coli* BL21(DE3) und *B. subtilis* 168. Die Werte sind als Konzentration in μM angegeben.

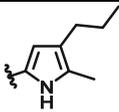
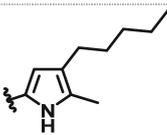
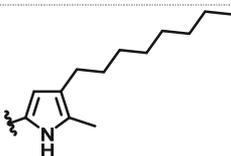
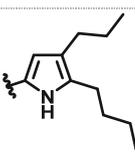
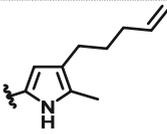
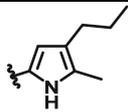
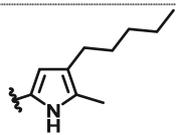
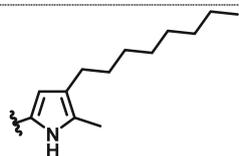
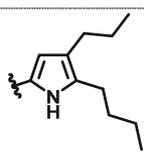
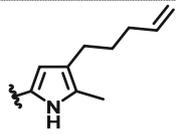
Prodiginin	<i>E. coli</i> BL21(DE3)		<i>B. subtilis</i> 168	
	IC ₂₀ IC ₅₀ IC ₈₀ [μM]	IC _{max} MIC [μM]	IC ₂₀ IC ₅₀ IC ₈₀ [μM]	IC _{max} MIC [μM]
 1d	2.55 ± 0.40 3.45 ± 0.38 4.66 ± 0.43	2.22 ± 0.40 5.33 ± 0.53	0.36 ± 0.04 0.40 ± 0.03 0.44 ± 0.02	0.34 ± 0.04 0.46 ± 0.01
 1a	3.97 ± 0.43 4.82 ± 0.36 5.85 ± 0.31	3.64 ± 0.45 6.38 ± 0.32	0.20 ± 0.01 0.24 ± 0.01 0.30 ± 0.02	0.18 ± 0.01 0.33 ± 0.03
 1g	17.96 ± 0.56 22.57 ± 0.39 28.37 ± 1.50	16.23 ± 0.77 31.40 ± 2.20	0.26 ± 0.05 0.36 ± 0.04 0.51 ± 0.03	0.22 ± 0.05 0.60 ± 0.02
 1k	5.37 ± 0.70 7.35 ± 0.67 10.06 ± 0.93	4.67 ± 0.71 11.56 ± 1.24	0.21 ± 0.01 0.24 ± 0.01 0.27 ± 0.01	0.20 ± 0.02 0.28 ± 0.02
 1u	3.19 ± 0.55 4.78 ± 0.58 7.15 ± 0.69	2.67 ± 0.52 8.55 ± 0.85	0.44 ± 0.07 0.50 ± 0.05 0.55 ± 0.03	0.46 ± 0.07 0.58 ± 0.03

Tabelle 37: Auswertung der Toxizitäts-Assays der Prodiginine **1a**, **d**, **g**, **k** und **u** für *E. coli* BL21(DE3) und *B. subtilis* 168. Die Werte sind als Konzentration in µg/mL angegeben.

Prodiginin	<i>E. coli</i> BL21(DE3)		<i>B. subtilis</i> 168	
	IC ₂₀ IC ₅₀ IC ₈₀ [µg/ml]	IC _{max} MIC [µg/ml]	IC ₂₀ IC ₅₀ IC ₈₀ [µg/ml]	IC _{max} MIC [µg/ml]
 1d	0.75 ± 0.12 1.02 ± 0.11 1.38 ± 0.13	0.66 ± 0.12 1.57 ± 0.16	0.11 ± 0.01 0.12 ± 0.01 0.13 ± 0.01	0.10 ± 0.01 0.14 ± 0.00
 1a	1.28 ± 0.14 1.56 ± 0.12 1.89 ± 0.10	1.18 ± 0.15 2.06 ± 0.10	0.06 ± 0.00 0.08 ± 0.00 0.10 ± 0.01	0.06 ± 0.06 0.11 ± 0.00
 1g	6.56 ± 0.20 8.25 ± 0.14 10.37 ± 0.55	5.93 ± 0.28 11.48 ± 0.80	0.10 ± 0.02 0.13 ± 0.01 0.19 ± 0.01	0.08 ± 0.02 0.22 ± 0.01
 1k	1.81 ± 0.24 2.48 ± 0.23 3.39 ± 0.31	1.58 ± 0.24 3.90 ± 0.42	0.07 ± 0.00 0.08 ± 0.00 0.09 ± 0.00	0.07 ± 0.01 0.09 ± 0.01
 1u	1.03 ± 0.18 1.54 ± 0.19 2.30 ± 0.22	0.86 ± 0.17 2.75 ± 0.27	0.14 ± 0.02 0.16 ± 0.02 0.18 ± 0.01	0.15 ± 0.02 0.19 ± 0.01

7.3 Codon Harmonisierung

***Streptomyces coelicolor* A3(2): 8375 CDS's (2743050 Codons)**

[Triplet]	[Aminosäure]	[Anteil des Codons]	[Codon-Frequenz pro 1000 Basen]	[Anzahl des Codons]
UUU	F	0.02	0.4 (1222)	
UUC	F	0.98	25.9 (71022)	
UUA	L	0.00	0.1 (175)	
UUG	L	0.02	2.4 (6706)	
UCU	S	0.01	0.6 (1781)	
UCC	S	0.41	20.2 (55452)	
UCA	S	0.02	1.1 (2987)	
UCG	S	0.28	13.7 (37630)	
UAU	Y	0.05	1.0 (2696)	
UAC	Y	0.95	19.5 (53525)	
UAA	*	0.05	0.1 (383)	
UAG	*	0.18	0.5 (1468)	
UGU	C	0.09	0.7 (1986)	
UGC	C	0.91	7.1 (19435)	
UGA	*	0.78	2.4 (6523)	
UGG	W	1.00	15.2 (41567)	
CUU	L	0.02	1.6 (4399)	
CUC	L	0.36	36.5 (100256)	
CUA	L	0.00	0.4 (981)	
CUG	L	0.60	60.9 (167041)	
CCU	P	0.03	1.6 (4261)	
CCC	P	0.41	25.5 (69887)	
CCA	P	0.02	1.4 (3706)	
CCG	P	0.54	33.4 (91515)	
CAU	H	0.07	1.7 (4680)	
CAC	H	0.93	21.8 (59920)	
CAA	Q	0.05	1.4 (3708)	
CAG	Q	0.95	25.2 (69255)	
CAU	H	0.07	1.7 (4680)	
CAU	H	0.07	1.7 (4680)	
CGU	R	0.07	5.5 (15031)	
CGC	R	0.47	39.1 (107385)	
CGA	R	0.03	2.6 (7101)	
CGG	R	0.38	31.9 (87371)	
AAU	N	0.04	0.7 (1985)	
AAC	N	0.96	16.3 (44627)	
AAA	K	0.05	1.1 (2921)	
AAG	K	0.95	19.6 (53671)	
AGU	S	0.03	1.5 (4180)	
AGC	S	0.25	12.5 (34157)	
AGA	R	0.01	0.8 (2129)	
AGG	R	0.04	3.7 (10061)	
GUU	V	0.02	1.5 (4008)	
GUC	V	0.55	46.9 (128649)	
GUA	V	0.03	2.7 (7306)	
GUG	V	0.41	35.0 (95906)	
GCU	A	0.02	3.1 (8453)	
GCC	A	0.57	78.4 (215055)	
GCA	A	0.04	5.6 (15417)	
GCG	A	0.36	49.5 (135712)	
GAU	D	0.05	3.1 (8438)	
GAC	D	0.95	58.2 (159730)	
GAA	E	0.15	8.7 (23997)	
GAG	E	0.85	48.2 (132351)	
GGU	G	0.10	9.2 (25257)	
GGC	G	0.64	60.9 (167167)	
GGA	G	0.08	7.2 (19677)	
GGG	G	0.19	18.2 (49822)	

GC-Gehalt: 72.30 %; 1. Base GC: 72.67 %; 2. Base GC: 51.39 %; 3. Base GC: 92.83 %

Abbildung 72: Codon Usage von *S. coelicolor* A3(2). Die Daten wurden aus der Codon Usage Database entnommen.⁴⁹

***Escherichia coli* K12: 14 CDS's (5122 Codons)**

[Triplet]	[Aminosäure]	[Anteil des Codons]	[Codon-Frequenz pro 1000 Basen]	[Anzahl des Codons]
UUU	F	0.02	0.4 (1222)	
UUC	F	0.98	25.9 (71022)	
UUA	L	0.00	0.1 (175)	
UUG	L	0.02	2.4 (6706)	
UCU	S	0.01	0.6 (1781)	
UCC	S	0.41	20.2 (55452)	
UCA	S	0.02	1.1 (2987)	
UCG	S	0.28	13.7 (37630)	
UAU	Y	0.05	1.0 (2696)	
UAC	Y	0.95	19.5 (53525)	
UAA	*	0.05	0.1 (383)	
UAG	*	0.18	0.5 (1468)	
UGU	C	0.09	0.7 (1986)	
UGC	C	0.91	7.1 (19435)	
UGA	*	0.78	2.4 (6523)	
UGG	W	1.00	15.2 (41567)	
CUU	L	0.02	1.6 (4399)	
CUC	L	0.36	36.5 (100256)	
CUA	L	0.00	0.4 (981)	
CUG	L	0.60	60.9 (167041)	
CCU	P	0.03	1.6 (4261)	
CCC	P	0.41	25.5 (69887)	
CCA	P	0.02	1.4 (3706)	
CCG	P	0.54	33.4 (91515)	
CAU	H	0.07	1.7 (4680)	
CAC	H	0.93	21.8 (59920)	
CAA	Q	0.05	1.4 (3708)	
CAG	Q	0.95	25.2 (69255)	
CAU	H	0.07	1.7 (4680)	
CAU	H	0.07	1.7 (4680)	
CGU	R	0.07	5.5 (15031)	
CGC	R	0.47	39.1 (107385)	
CGA	R	0.03	2.6 (7101)	
CGG	R	0.38	31.9 (87371)	
AAU	N	0.04	0.7 (1985)	
AAC	N	0.96	16.3 (44627)	
AAA	K	0.05	1.1 (2921)	
AAG	K	0.95	19.6 (53671)	
AGU	S	0.03	1.5 (4180)	
AGC	S	0.25	12.5 (34157)	
AGA	R	0.01	0.8 (2129)	
AGG	R	0.04	3.7 (10061)	
GUU	V	0.02	1.5 (4008)	
GUC	V	0.55	46.9 (128649)	
GUA	V	0.03	2.7 (7306)	
GUG	V	0.41	35.0 (95906)	
GCU	A	0.02	3.1 (8453)	
GCC	A	0.57	78.4 (215055)	
GCA	A	0.04	5.6 (15417)	
GCG	A	0.36	49.5 (135712)	
GAU	D	0.05	3.1 (8438)	
GAC	D	0.95	58.2 (159730)	
GAA	E	0.15	8.7 (23997)	
GAG	E	0.85	48.2 (132351)	
GGU	G	0.10	9.2 (25257)	
GGC	G	0.64	60.9 (167167)	
GGA	G	0.08	7.2 (19677)	
GGG	G	0.19	18.2 (49822)	

GC-Gehalt: 52.35 %; 1. Base GC: 60.82 %; 2. Base GC: 40.61 %; 3. Base GC: 55.62 %

Abbildung 73: Codon Usage von *E. coli* K12. Die Daten wurden aus der Codon Usage Database entnommen.⁵⁰

⁴⁹ Juli 2013: <http://www.kazusa.or.jp/codon/>

⁵⁰ Juli 2013: <http://www.kazusa.or.jp/codon/>

Anhänge

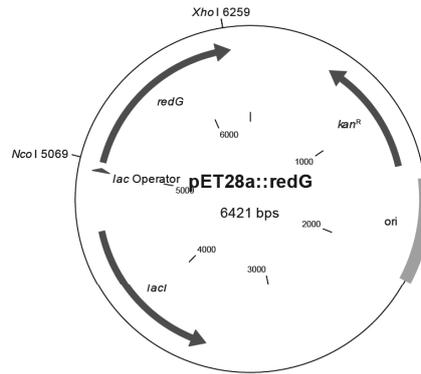
Zusammenfassung des Sequenz-Alignments:

Vollständige Länge der verglichenen Sequenz mit Lücken: 1188 bps
 Übereinstimmende Basen: 888 / 1188 (74%)
 Lücken: 0 / 1188 (0%)

redG (S. coel.)	1	atgatccc	aaaccagtgg	tatcc	catcgtc	gagcgc	caggaggt	ggc	aacga	aaa	accg
redG (Cod. harm.)	1t.gc.g	..t..t..a	..a.....a	..t..t.....t.g
redG (S. coel.)	61	ctcgg	tgtgcg	ccgcat	gggc	caggact	ctcgt	ctctgg	cgacat	cgacgg	aacctc
redG (Cod. harm.)	61	..g..g	..t..t..ttt	..g..t..gt	..t..t..tggg
redG (S. coel.)	121	gtctg	ccaggg	cgccg	ctgccc	gcaca	aggggc	ccaacct	ggcgac	ggccg	catgaag
redG (Cod. harm.)	121	..t..tt	..a..t..ttt	..a.....g	..t..t..tttt
redG (S. coel.)	181	ggcaac	caccatg	aatgccc	gtaccac	ggcctt	ccgctac	ggagcc	gacgg	gtcctg	ccgg
redG (Cod. harm.)	181	..t.....t	..g..tt	..t..t..t	..t..t..t	..t..t..g	..a..t	..g..a	..t..t	..t
redG (S. coel.)	241	gtgat	ccggc	gatggg	ctccag	ggccg	catccc	ggctc	gctgc	gggtacc	acctac
redG (Cod. harm.)	241	..t..tatag	..a..a	..t..t..g	..tagttgtt
redG (S. coel.)	301	ccggt	ccggag	cagttc	ggcctg	gtggt	gtggat	gtggg	gcag	gagcg	cccac
redG (Cod. harm.)	301t	..t..attttt	..t..a	..t.....c	..a
redG (S. coel.)	361	gacct	gccg	ccggtgg	cgcc	ccggc	cgaggt	acgg	aca	ccgga	agctgt
redG (Cod. harm.)	361	..t.....t	..a..aa	..a..t	..c..ttttt	..a...
redG (S. coel.)	421	aagcg	ctggacc	gcccg	tgcact	acacc	gttacc	atcag	agagc	ctgct	cgagtt
redG (Cod. harm.)	421ttt	..t..ta	..t..t	..atctg	..a..t	..t
redG (S. coel.)	481	cacgt	gacct	agtg	caccgg	gaccact	ggttca	actac	atcga	ctact	ctgct
redG (Cod. harm.)	481	..t..tt	..t..tttttttg
redG (S. coel.)	541	ggc	accccg	agca	agttc	ggc	ctcga	ccg	cgag	cggtac	ctggc
redG (Cod. harm.)	541	..t.....t	ctct	..t.g	..t..t	..t..t	..a..t	..t.....a	..a.....t	..t
redG (S. coel.)	601	accaac	caccg	ggtgg	agac	ggag	ggcgg	gggag	accat	ccgct	actc
redG (Cod. harm.)	601t	..t..t	..a..c	..a..a	..a..ct	..t..tag	..t..t	..t..t	..t
redG (S. coel.)	661	tgcc	caggag	gacg	acc	accaac	accaccca	ctac	gtcat	cagtt	ca
redG (Cod. harm.)	661	..t.....a	..t..t	..g.....t	..t..t	..t..t	..c..ttttt
redG (S. coel.)	721	atggt	gcacgt	gcagacc	gagcag	ttc	gagacc	acctc	ctgg	ctggt	gccat
redG (Cod. harm.)	721t	..t..tat	..a.....agtg	..t..t	..t..t	..t
redG (S. coel.)	781	cagaac	accgag	ccatc	ctgcg	ctggt	acgata	cgaa	caggt	caagc	cgct
redG (Cod. harm.)	781a	..t..ttt	..a..t	..g.....tg	..t.....ttt
redG (S. coel.)	841	ttcga	accg	ctgcg	ccgtc	ctgct	gccct	ggg	ctc	ctac	atgga
redG (Cod. harm.)	841	..t..gt	..a.....gaag	..g..tatttt
redG (S. coel.)	901	gaccc	ccagg	agtc	ccgcat	atgga	aca	ccagga	acc	aatc	agcgc
redG (Cod. harm.)	901	..t..gt	..t..tg	..t.....g	..g.....t	ttct	..a..t	..t..t	..t
redG (S. coel.)	961	aaca	agttc	atccc	gctc	gacg	agatg	aacgc	caag	tacat	ctc
redG (Cod. harm.)	961t	..t..g	..t..tatat	..tagtt	..a.....t
redG (S. coel.)	1021	atcgc	ggac	gcctc	ggccg	cgcc	ctcgt	cacc	ggc	ggcgg	ggcgg
redG (Cod. harm.)	1021	..t..a	..t..a	aggt	..a..a	..gagt	..g.....a	..t..a	..a..a	..a..g	..a.....g
redG (S. coel.)	1081	gcgg	cggg	cggg	cggt	atcag	cgcc	cgctg	ccac	ggg	caac
redG (Cod. harm.)	1081	..a..a	..c..t	..t..g	..g..a	..a..a	..a..c	..t.....tg	..a..a	..t
redG (S. coel.)	1141	ggac	gacg	cgcc	acca	agccc	aa	gagga	cgcc	cgcc	cgcc
redG (Cod. harm.)	1141	..ga	g..t	..t.....gga	..t..a	..a..a	..t.....ttt

Abbildung 74: Vergleich der natürlichen Gensequenz von *redG* aus *S. coelicolor* A3(2) und der Sequenz nach Codon Harmonisierung. In grau sind jeweils die Abweichungen markiert. [S. coel. – *S. coelicolor* A3(2); Cod. Harm. – Codon Harmonisierung]

7.4 Vektorkarten

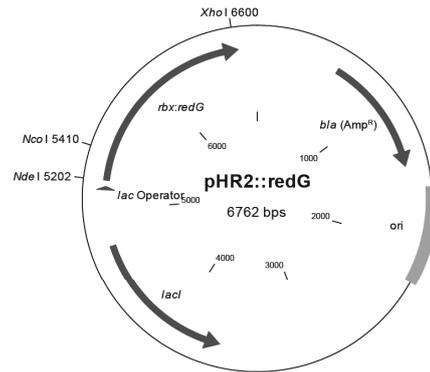


```

4951  gcgtagagga  tcgagatctc  gatcccgcga  aattaatacg  actcactata  ggggaattgt  gagcggataa  caattcccct  ctagaataaa
      cgcctctcct  agctctagag  ctaggggcgt  ttaattatgc  tgagtgatat  ccccttaaca  ctcgcctatt  gtaaagggga  gatctttatt
                                     T7-Prom                               lac Operator
5041  ttttgtttaa  ctttaagaag  gagatatacc  atggcgattc  cgaaccagtg  gtaccggatt  gttgaagcac  aggaagtggg  taacgataag
      aaaaacaatt  gaaattcttc  ctctatatgg  taccgctaag  gcttggtcac  catgggctaa  caacttcgtg  tccttcaacc  attgtattc
      >>.....redG.....>>
      m a i p n q w y p i v e a q e v g n d k
5131  ccgctggggg  ttcgctgcat  gggtcaggat  ctggttctgt  ggcgtgatat  tgatggtaac  ctggtttgtc  aggggtgcacg  ttgtccgcat
      ggcgaccccc  aagcagcata  cccagtccta  gaccaagaca  ccgcactata  actaccattg  gaccaaacag  tcccacgtgc  aacaggcgta
      >.....redG.....>
      p l g v r r m g q d l v l w r d i d g n l v c q g a r c p h
5221  aagggtgcaa  acctgggtga  tggctgatg  aagggttaaca  ccattgagtg  tccgtatcat  ggttttcgtt  atggggcaga  tgggcatgt
      ttcccagttt  tggacccact  accagcatac  ttcccattgt  ggtaactcac  aggcatagta  ccaaaagcaa  taccccgctc  accccgtaca
      >.....redG.....>
      k g a n l g d g r m k g n t i e c p y h g f r y g a d g a c
5311  cgtgttattc  cggcaatggg  tagcgaagca  cgtattccgg  gtagtctcgg  tgtaccgacc  tatccggttc  gtgaacagtt  tggctggtt
      gcacaataag  gccgttacc  atcgcctcgt  gcataaggcc  catcagacgc  acatggctgg  ataggccaag  cacttgcata  accagacca
      >.....redG.....>
      r v i p a m g s e a r i p g s l r v p t y p v r e q f g l v
5401  tggatgtggt  ggggtgatga  acgtccgacc  gcagatctgc  cgccggttgc  agcaccggca  gaagttaccg  ataaccgtaa  gctgtatgca
      acctaccca  ccccactact  tgcaggctgg  cgtctagacg  gggccaacg  tcgtggcgt  ottcaatggc  tattggcatt  cgacatacgt
      >.....redG.....>
      w m w w g d e r p t a d l p p v a a p a e v t d n r k l y a
      [...]
5761  accattatg  ttattaccct  tacctttccg  tgtatggttc  atgttcagac  cgaacagttt  gaaaccacca  gctggctggt  tccgattgat
      tgggtaatac  aataatggaa  atggaaagcc  acataccaag  tacaagtctg  gcttgcataa  ctttgggtgt  cgaccacca  aggtaacta
      >.....redG.....>
      t h y v i t f t f p c m v h v q t e q f e t t s w l v p i d
5851  gatacagaac  cgaacatat  tctcgttgg  tatgaatg  agcaggttaa  gccggttctg  aggtttgagc  cgctgcctgc  actgtgcgc
      ctagtcttgt  ggcttgata  agacgcaacc  atacttatac  tctgtccaatt  cggccaagac  tccaaactcg  gcgacgcagc  tgacgacggc
      >.....redG.....>
      d q n t e h i l r w y e y e q v k p v l r f e p l r r l l p
5941  tgggcaagcc  tgtatatgga  aaagtgggtt  caggatccgc  aggatgttcg  tattatggag  catcaggagc  cgaagatttc  tgcaggtgt
      accgcttcgg  acatatacct  ttccaccaa  gtcctaggcg  tctacaagc  ataatacctc  gtagtctcgc  gcttctaaag  acgtccacca
      >.....redG.....>
      w a s l y m e k w v q d p q d v r i m e h q e p k i s a g g
6031  gtaacaagt  ttattccggt  tgatgaaatg  aacgcaaagt  atattagtat  gcgtgcaaag  ctgattgcag  atgcaagtcg  agcaccgagt
      caattgttca  aataaggcca  actactttac  ttgcgtttca  tataatcata  cgcacgtttc  gactaacgto  tacgttcacg  tcgtggctca
      >.....redG.....>
      v n k f i p v d e m n a k y i s m r a k l i a d a s a a p s
6121  tcgccggcac  gtgcagcaga  accggaaccg  gaggcagcag  gccgtggttg  gtcggcagca  cgagcaaccg  gtaacggtag  gggggcagca
      ageggccgtg  cacgtcgtct  tggccttggc  ctccgtcgtc  cggcaccacc  cagccgtcgt  gctcgttggc  cattgccatc  cccccgtcgt
      >.....redG.....>
      s p a r a a e p e p e a a g r g g s a a r a t g n g r g a a
6211  ggtgggagcc  gtggtaacca  gccgaaggaa  gatgcagcag  cacgtccgct  cgagcaccac  caccaccacc  actgagatcc  ggctgctaac
      ccaccctccg  caccatggtt  cggcttccct  ctacgtcgtc  gtgcaggcga  gctcgtgggt  gtgggtgggt  tgactctagg  ccagcagttt
      >.....redG.....>
      g g r r g t k p k e d a a a r p l e h h h h h h -
    
```

Abbildung 75: Vektorkarte von pET28a::redG.

Anhänge



```

5131 ataggggaat tgtgagcggg taacaattcc cctctagaaa taattttggt taactttaag aaggagatat acatatgac caccatcatc
tatcccotta acactgcct attgtaagg ggagatcttt attaaaaaa attgaaattc ttctctata tgtatacgtg gtggtagtag
lac Operator
>>..rbx:redG...>
m h h h h

5221 accacatgaa aaaataccgt tgcaaacgtg gcggttacat ctacgatccg gaacaagggtg atccggactc gggtatcgaa cgggtaecg
tgggtacttt ttttatggca acgtttgaca cgccaatgta gatgtaggc cttgttccac taggcctgag cccatagctt ggcccacgg
RBX
>.....rbx:redG.....>
h h m k k y r c k l c g y i y d p e q g d p d s g i e p g t

5311 cgttcgaaga cctgccggac gactgggttt gcccgctgtg cgggtgcttg aaagaagact tcgaaccggg tgaggtggaa aatctgtatt
gcaagcttct ggacggcctg ctgaccctaa cgggogacac gccacgaagc ttcttctga agcttggcca actccactt ttagacataa
TEV
>.....rbx:redG.....>
p f e d l p d d w v c p l c g a s k e d f e p v e v e n l y

5401 ttcagggcgc catggcgatt ccgaaccagt ggtaccgat tgttgaagca caggaagttg gtaacgataa gccgctgggg gtcgctgta
aagtcocgcg gtaccgctaa ggcttggta ccatgggcta acaacttcgt gtccttcaac cattgctatt cggcgacccc caagcagcat
>.....rbx:redG.....>
f q g a m a i p n q w y p i v e a q e v g n d k p l g v r r

[...]

6031 aaaccgaagc agaaggccag accattcgtt atagctttga tcattgtcag gaagatgac cgaccaacac caccattat gttattacct
tttggcttcg tcttcggctc tggtaaagca tatcgaaact agtaacagtc cttctactag gctgggtgtg gtgggtaata caataatgga
>.....rbx:redG.....>
e t e a e g q t i r y s f d h c q e d d p t n t t h y v i t

6121 ttacttttc gtgatgggt catgttcaga cgaacagtt tgaaacacc agctggctgg ttccgattga tgatcagaac accgaacata
aatggaagg cacatacaca gtacaagtct ggcttgcata acitttggtg tcgaccgacc aaggctaact actagtcttg ttgcttgtat
>.....rbx:redG.....>
f t f p c m v h v q t e q f e t t s w l v p i d d q n t e h

6211 ttctgcgttg gtatgaatat gacgagttta agccggttct gaggtttgag ccgctgcgtc gactgctgcc gtgggcaagc ctgtatatgg
aagaccgaac cataactata ctgtccaat tcggccaaga ctccaactc ggcgacgag ctgacgacgg cacccttgc gacataacc
>.....rbx:redG.....>
i l r w y e y e q v k p v l r f e p l r r l l p w a s l y m

6301 aaaagtgggt tcaggatccg caggatgttc gtattatgga gcatcaggag ccgaagattt ctgcaggtgg tgtaacaag tttattccgg
ttttaccca agtccatgag gtcctacaag cataataact cgtagtcttc ggcttctaaa gacgtccacc acaattgttc aaataaggcc
>.....rbx:redG.....>
e k w v q d p q d v r i m e h q e p k i s a g g v n k f i p

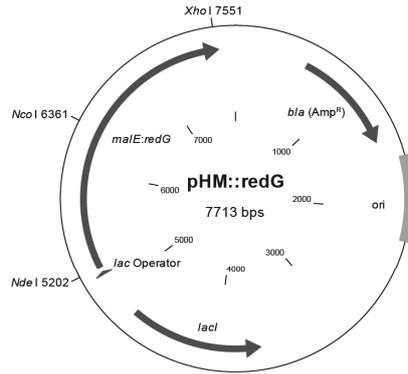
6391 ttgatgaaat gaacgcaag tatattagta tgcgtgcaaa gctgattgca gatgcaagtg cagcaccgag ttcccgccga cgtgcagcag
aactacttta ctgctgttc atataatcat acgcacgttt cgactaacgt ctacgttccac gtcgtggctc aagcggcctg gcacgtctc
>.....rbx:redG.....>
v d e m n a k y i s m r a k l i a d a s a a p s s p a r a a

6481 aaccggaacc ggaggcagca gccctgggtg ggtcggcagc acgagcaacc ggtaacggta gggggcagc aggtgggagg cgtggtacca
ttggccttgg cctccgtctg ccggcaccac ccagccgtcg tgcctgttgg ccattgccat cccccctg tocaccctcc gcaccatggt
>.....rbx:redG.....>
e p e p e a a g r g g s a a r a t g n g r g a a g g r r g t

6571 agccgaagga agatgcagca gcacgtccc tcgagcaca ccaccaccac cactgagatc cggctgctaa caaagcccga aaggaagctg
tcggcttct tctacgtctg cgtcagcgg agctcgtggt ggtggtggtg gtgactctag gccgacgatt gtttcgggct ttctctcag
>.....rbx:redG.....>
k p k e d a a a r p l e h h h h h h -

```

Abbildung 76: Vektorkarte von pHR2::redG.



```

5131 ataggggaat tgtgagcgga taacaattcc cctctagaaa taattttggt taactttaag aaggagata acatatgcac caccatcatc
tatoccccta aactcgccct attgttaagg ggagatcttt attaaaaaaa attgaaattc ttctctata tgtatcgtg gtggtagtag
lac Operator
>>..malE:redG...>
m h h h h

5221 accacaaaat cgaagaaggt aaactggtaa tctggattaa cgcgataaaa ggctataacg gtctcgctga agtcggtaag aaattcgaga
tgggtgttta gcttctcca ttgaccatt agacctaat gcgcctatt ccgatattgc cagagcgact tcagccattc ttaagctct
>.....malE:redG.....>
h h k i e e g k l v i w i n g d k g y n g l a e v g k k f e

5311 aagataccgg aattaaagtc accgttgagc atccgataaa actggaagag aaattccctc aggttgccgc aactggcgat gccctgaca
ttctatggcc ttaatttcag tggcaactcg taggcctatt tgacctctc tttaaggagg tccaacgccg ttgaccgcta ccgggactgt
malE
>.....malE:redG.....>
k d t g i k v t v e h p d k l e e k f p q v a a t g d g p d
[...]

6301 ctgctgtaa agatgcacag actcgtatca ccaagtgga aaatctgtat ttccagggcg ccatggcgat tccgaaccag tggtaaccga
gacgcgactt tctacgtgtc tgagcatagt ggttccacct tttagacata aaagtccgcg ggtaccgcta agccttgctc accatggct
TEV
>.....malE:redG.....>
a a l k d a q t r i t k v e n l y f q g a m a i p n q w y p

6391 ttgttaagc acaggaagtt ggtaacgata agccctggg ggttcgctg atgggtcagg atctggttct gtggcgatg attgatgga
aacaacttcg tgccttcaa ccattgctat tcggcgacc ccaagcagca taccagctc tagaccaaga caccgacta taactaccat
>.....malE:redG.....>
i v e a q e v g n d k p l g v r r m g q d l v l w r d i d g
[...]

7201 tgaggtttga gccctgctg cgaactgctc cgtgggcaag cctgtatag gaaaagtggg ttcaggatcc gcaggatgtt cgtattatgg
actocaaact cgcgacgca gctgacgac gcaccggctt ggacatatac ctttcacc aagtcctagg cgtcctacaa gcataatacc
>.....malE:redG.....>
l r f e p l r r l l p w a s l y m e k w v q d p q d v r i m

7291 agcatcagga gccgaagatt tctcaggtg gtgttaacaa gttattccg gttgatgaaa tgaacgcaa gtatattagt atgcgtgcaa
tcgtagctct cggcttctaa agacgtccac cacaaattgt caaataaggc caactacttt acttgcttt catataatca tacgcagctt
>.....malE:redG.....>
e h q e p k i s a g g v n k f i p v d e m n a k y i s m r a

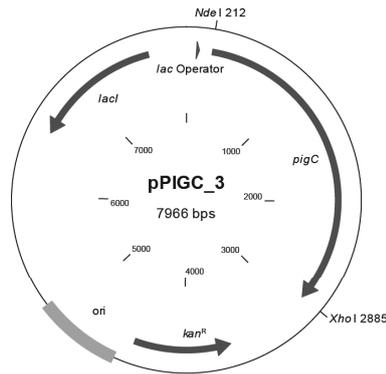
7381 agctgattgc agatgcaagt gcagcaccga gttcgcggc acgtgcagca gaaccggaac cggagcgagc aggcctggtt gggtcggcag
tcgactaacg tctacgttca cgtcgtggct caagcggccg tgacgtcgt cttggccttg gctccgctg tccggcacca cccagccgctc
>.....malE:redG.....>
k l i a d a s a a p s s p a r a a e p e p e a a g r g g s a

7471 cagcagcaac cggtaacggt aggggggag caggtgggag gctggttacc aagccgaagg aagatgcagc agcacgtccg ctcgagcacc
gtgctcgttg gccattgcca tcccccgct gtccaccctc cgcaccatgg ttcggcttcc ttctacgtcg tctgacggc gagctcgtgg
>.....malE:redG.....>
a r a t g n g r g a a g g r r g t k p k e d a a a r p l e h

7561 accaccacca ccactgagat ccggctgcta aaaaagcccg aaaggaagct gagttggctg ctgccaccgc tgagcaataa ctagcataac
tgggtgggtt ggtgactcta ggccgacgat tgttccggc ttctctega ctcaaccgac gacggtggcg actcgttatt gatcgtattg
>..malE:redG...>
h h h h h -
    
```

Abbildung 77: Vektorkarte von pHM::redG.

Anhänge

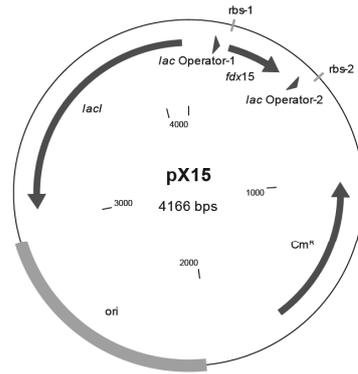


```

91  gtgagcggat aacaattccc ctctagaaat aatthttgtt aactttaaga aggagatata ccatgggcag cagccatcat catcatcatc
   cactcgcta ttgttaaggg gagatcttta ttaaaacaaa ttgaaattct tcctctatat ggtaccgctc gtcggtagta gtatagtagt
      lac Operator
181  acagcagcgg cctggtgccc gcgcgcagcc acatatgatg aatcctaccc tgggtggtga actttccggc gataaaacgc tggaaaccca
   tgtcgtcgcc ggaccacggc gcgcgcgtcg tgtatactac ttaggatggg accaccaact tgaaggccg ctatthttgc accttggggt
   >>.....pigC.....>
      m n p t l v v e l s g d k t l e p
271  tcgcctgggc ggcaaaagccc attcgttgaa tcatttgatt caggcgggct tgcctgggccc gccggcgttt tgcataccgc cgcaggccta
   agcggacccc ccgtttcggg taagcaactt agtaactaa gtcgcgccga acggccaacg cggccgcaaa acgtagtggc gcgtccgaat
   >.....pigC.....>
      h r l g g k a h s l n h l i q a g l p v p p a f c i t a q a
      [...]
901  accgcactat tgccaacgcg atccgcaggg acgggtcacg ctgctgcaaa cacctgaagc caggcgagac gcccccagcc taaccccgga
   tggcgtgata acggttgccc taggcgtccc tgcccagtcg gacgacgttt gtggacttcg gtcctgctct cgggggtcgg attggggcct
   >.....pigC.....>
      k p h y c q r d p q g r v t l l q t p e a r r d a p s l t p
      [...]
2341 ggccgatctg ccctatgtgg acttcgagcg cttccgcgcg tttatggcgg ggaacagtc gccgcaggag gcgttcgccc ccgatctgat
   ccggctagac gggatacacc tgaagctcgc gaaggcgcgc aaataccgcc ccctgtgcag ccgcgtcctc ccgaagcggc ggctagacta
   >.....pigC.....>
      q a d l p y v d f e r f r a f m a g e q s a q e a f a a d l
2431 cgagcgcagt cgcaccagc atctgctgaa cctgcattgc gaagagccgc cgtggtgcat cgtcgggggg tatcagccca ggatgaaagc
   gctcgcgcta gcggtgctgc tagacgactt ggacgtacgc cttctcggcg gctaccgcta gcagccccc atagtcgggt cctactttcg
   >.....pigC.....>
      i e r n r h q h l l n l h a e e p p m a i v g g y q p r m k
2521 ccccacggcg gaaaacgccc ccggcatgct gtcggcgctc gcggccagcc ccggcaaatg ggtggcgaaa gcgcgcgtca tcaccgatct
   ggggtgccc cttttgccc gcccgtaaca caggccggac cgcggtcgg ggccgtttca ccaccgcttt cgcgcgcagt agtggctaga
   >.....pigC.....>
      a p t a e n a a g m l s g l a a s p g k v v a k a r v i t d
2611 gctggcgcag gccggcgcgc tgcagcccaa cgaatcctg ttggcgcgct ttaccgcgc cagctggacc ccgctcttcg cgtggcggcc
   cgaccgcgtc cggccgctcg acgtcgggtt gctttaggac caccgcgcga aatggctcgc gtcgacctgg ggcgagaagc gcgaccgccc
   >.....pigC.....>
      l l a q a g e l q p n e i l v a r f t d a s w t p l f a l a
2701 gggcatcgtc acgatatcgc gtcctcgcgt gtcaccagc tgcatcgtcg cagcgaatt cggcaccccc gcggcggta atctcaagaa
   ccgtagcag ttgctatagc cgaggcgcga cagggtgctg acgtagcagc gtgcgctaa ccgtagggg ccgccccagt tagagtctt
   >.....pigC.....>
      a g i v t d i g s a l s h s c i v a r e f g i p a a v n l k
2791 cgccaccag ctgatcaaca gcggcgacac cttgattctc gaecgcgaca gcgggacggt cattattcaa cgcggagaac gtgccgatgg
   gcggtgggct gactagtgtg cgcgctgtg gaactaagag ctgcgctgtg cgcctgcca gtaataagtt gcgctcttg cagcgtacc
   >.....pigC.....>
      n a t q l i n s g d t l i l d g d s g t v i i q r g e r a d
2881 ctactcagag gcaccaccac caccaccact gagatccggc tgctaacaaa gcccgaaagg aagctgagtt ggctgctgcc accgctgagc
   gatcagctc cgtggtggtg gtggtggtga ctctaggccc acgattgttt cggcctttcc ttcgactcaa ccgacgcagc tggcgcactg
      His Tag
>>> pigC
g -

```

Abbildung 78: Vektorkarte von pPIGC_3. An der Position 952 befindet sich eine stille Mutation (Guanin wurde gegen Adenin ausgetauscht, siehe Markierung).



```

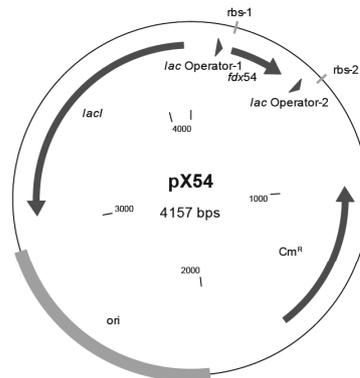
91  attaatacga ctcactatag ggggaattgt agcgataaac aattcccctg tagaataat ttgtttaac ttaataaagg agataacat
    taattatgct gactgataac cccttaaac tcgctattg ttaaggggac atctttatta aaacaaattg aaattattcc tctatatgta
        T7 prom-1          lac operator-1                                rbs-1          fdx15 >>

181  gcatcaccat catcaccaca tgacctggc aggcaggcg ttccgatccg ggagagtcgg ccgagagcgg gaccggtgtg tcggggcggg
    cgtagtggta gtagtggtgt actggaaccg tccggctcgc aagcctagcc cctctcagcc gcggtctcgc ctggccacac agccccgcc
    >.....fdx15.....>
    m h h h h h h m t l a g q a f g s g r v g a e r d r c v g a

271  gcagtgcgc ctgcgcgcg cgggtgtctt cgaccaggac gaggaggacg ggctcgtgcg cgtcctcgc gagaggccct ccgcccgcga
    cgtcacgcag gagcggcgcg gccacacaaa gctggctcgt cctcctcgc ccgagcacgc gcaggagcgg ctctccggga gccgcccgtt
    >.....fdx15.....>
    g q c v l a a p g v f d q d e e d g l v r v l a e r p s a a

361  gtcggagcc gtgcgcgcg ccgtgcgggc ctgcccgtct ggagcgtca ctcttcgga gccataatg ttaagtcgaa cagaaagtaa
    cagcctgcgg cacgcgcgcc gccacgccc gacggcaga cctcgcgagt gagaagccat ccgtattacg aattcagctt gtctttcatt
    >.....fdx15.....>
    e s d a v r a a v r a c p s g a l t l r -
    
```

Abbildung 79: Vektorkarte von pX15.



```

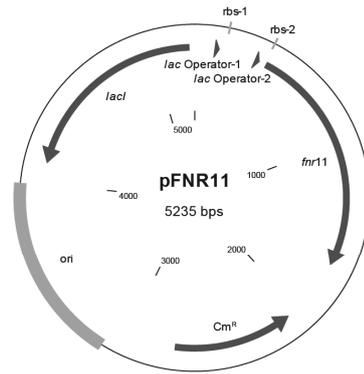
91  attaatacga ctcactatag ggggaattgt agcgataaac aattcccctg tagaataat ttgtttaac ttaataaagg agataacat
    taattatgct gactgataac cccttaaac tcgctattg ttaaggggac atctttatta aaacaaattg aaattattcc tctatatgta
        T7 prom-1          lac operator-1                                rbs-1          fdx54 >>

181  gcatcaccat catoaccaca tgaggatetc cgtcgacccc gagcagtggt acggctccgg agaetgcgto cacggggccc cgtccgttct
    cgtagtggta gtagtggtgt actcctagag gcagctgggg ctcgctcaaa tgccgagcgc tctgacgcag gtggcccggg gcaggcagaa
    >.....fdx54.....>
    m h h h h h h m r i s v d p e q c y g s g d c v h r a p s v

271  caccagggtg ggcggcctcg gcgccgtcat acccgccggg gagcagcagc tcgacgcccc gcgggtgcgc gaggcggcgg aagggtgtcc
    gtgggtccac ccgcccagc ccgcccagta tggcccggcc ctcgctcgtc agctgcgggg ccgccacgcg ctccgcccgc tcccacagg
    >.....fdx54.....>
    f t q v g g l g a v i p g r e h d v d a p r v r e a a e g c

361  gtcgcgcgcg atcaccatcg ccgcacgga agcggaaggg gtcgggggct gagcataatg cttaagtcga acagaaagta atcgtattgt
    caggcggcgc tagtgtagc gggcgtgcct tcgcttccc caggcccoga ctcgattac gaattcagct tgtctttcat tagcataaca
    >.....fdx54.....>
    p s a a i t i a r t e a e g v r g -
    
```

Abbildung 80: Vektorkarte von pX54.



```

361 aattccocat cttagtatat tagttaagta taagaaggag atatacaatg catcaccatc atcaccacat ggtcgcgcg gatcagacat
    ttaaggggta gaatcatata atcaattcat attcttctct tatatgttac gtagtggtag tagtggtgta ccagctgcgc ctagtctgta
                                rbs-2
                                >>.....fmr11.....>
                                m h h h h h h m v d a d q t

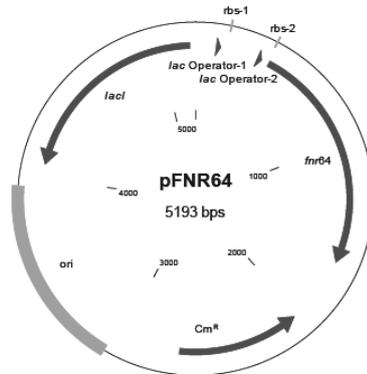
451 tcgtcatcgt cggagcgcgc ctggcggcgc cgaagcgcgc cgagacgcgc cgcacggagg gcttcaccgc ccgggtgacg ctgctcgcg
    agcagtagca gcctccgcgc gaccgccgcg gcttcgcgcg gctctgcgag gcgtgcctcc cgaagtgccc ggcccactag gacagacgcg
    >.....fmr11.....>
    f v i v g g g l a g a k a a e t l r t e g f t g r v i l v c

    [...]

1531 agttcatcgc cttctgggtg aaggaggccc gggtgctggc cgggatgaac gtcaacgtgt gggacgtcac ggagccgacg cagcagctga
    tcaagtagcg gaagaccac ttctctccgc cccacgaccg gccctacttg cagttgcaca cctgcagtg cctcggctag gtcgtcgact
    >.....fmr11.....>
    e f i a f w v k e g r v l a g m n v n v w d v t e p i q q l

1621 tccgctcgaa gaccgggtg gacacggagg acctggcgaa cccgcacgta tcctcgaaa gcctcgtcgc ataggtctgg taagaaac
    agcgagctt ctggcccac ctgtgcctcc tggaccgctt gggcgtgcat agggagcttt cggagcagcg tatccagacc attcttttg
    >.....fmr11.....>
    i r s k t r v d t e d l a n p h v s l e s l v a -
    
```

Abbildung 85: Vektorkarte von pFNR11.



```

361 aattccocat cttagtatat tagttaagta taagaaggag atatacaatg catcaccatc atcaccacgt ggtcgtggtg ggcgcgggga
    ttaaggggta gaatcatata atcaattcat attcttctct tatatgttac gtagtggtag tagtggtgca ccagcaccac ccgcgccct
                                rbs-2
                                >>.....fmr64.....>
                                m h h h h h h v v v v g a g

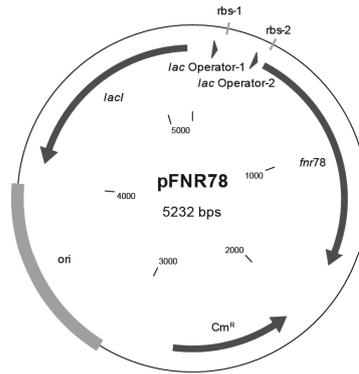
451 tggcggcgt gcagaccgcg gtcgcctcgc gggaacaggg cttcaccgcg ccggtgacce tgatcgggtc ggagccgac cagccgtacg
    accgcccga cgtctggcgc cagcgggacg cccttgctcc gaagtggccg ggccactggg actagccacg cctcggcgtg gtcggcatgc
    >.....fmr64.....>
    m a g v q t a v a l r e q g f t g p v t l i g a e p h q p y

    [...]

1531 tggcggccc ccgcgacctg gcgcagggca ggcgctgat ccagcggggc acgcgatgg acccggacct gctggccgac ccggcgaagc
    acccggcggg ggcgctggac cgcgtccctg ccgcggacta ggtccgcccg tgcggctacc tgggcctgga cgaccggctg ggcgcttcg
    >.....fmr64.....>
    v g r p r d l a q g r r l i q a g t p m d p d l l a d p a k

1621 cgttgaagc ggagcgcgc gccacggcgt aggtctggtg aagaaacccg tgctcgaaa ttgaaagcc agcacatgga ctgctact
    gcaacttcg ccgctgcgc cgtgcgcga tccagaccat ttctttggcg acgacgctt aaacttgcg tcgtgtacct gacgagatga
    >.....fmr64.....>
    p l k a a t a a t a -
    
```

Abbildung 86: Vektorkarte von pFNR64.



```

361 aattcccat cttagtatat tagttaagta taagaaggag atatacaatg catcaccatc atcaccacat gccgcgtgcg aagacgttcg
    ttaaggggta gaatcatata atcaattcat attcttctctc tatatgttac gtagtggtag tagtggtgta cgggcgcgcg ttctgcaagc
                                rbs-2
                                >>.....fnr78.....>>
                                m h h h h h h h m p r a k t f

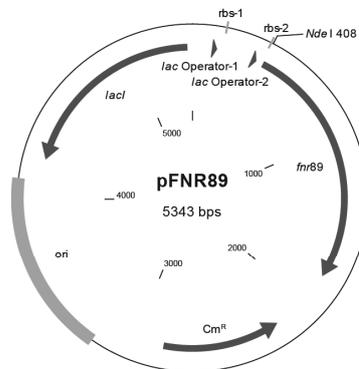
451 tgatcgtcgg gggcggcctg gccgccgca aggccgcgga ggaactcgcg gagcacggcc acgacgggcc gcttctcgtg atcggggacg
    actagcagcc ccgcgcggac cgccggcctg tccggcgcct ccttgacgcg ctctgtgccg tgctgcccgg cgaagagcac tagcccctgc
    >.....fnr78.....>
    v i v g g g l a a g k a a e e l r e h g h d g p l l v i g d

[...]

1531 tgctggcggg gatgagcgtc aacctgtggg acgtgatcgg gacgatccgc gccctgatcg agtcggggcg ggagacggac gacgccgccc
    acgaccgccc ctactcgcag ttggacaccc tgcactagcc ctgctagcgg cgggactagc tcagcccgcg cctctgcctg ctgcccgggg
    >.....fnr78.....>
    v l a g m s v n l w d v i g t i r a l i e s g a e t d d a a

1621 tggccgaccc ctgcgtcccg ctggagagcc tgcttcccc gcacgcgcgg ccgacgggag accagggcgtg agtctggtaa agaaaccgct
    accggctggg gagccagggc gacctctcgg acgaaggggg cgtgcgcgcc ggctgccctc tggctccgac tcagaccatt tctttggcga
    >.....fnr78.....>>
    l a d p s v p l e s l l p p h a r p t g d q a -
    
```

Abbildung 87: Vektorkarte von pFNR78.



```

361 aattcccat cttagtatat tagttaagta taagaaggag atatacacat atgcatcacc atcatcacca catgccccgc cctctgcggg
    ttaaggggta gaatcatata atcaattcat attcttctctc tatatgtgta tacgtagtgg tagtagtggt gtacggggcg ggagacggcc
                                rbs-2
                                >>.....fnr89.....>>
                                m h h h h h h h m p r p l r

451 taqccatcgt cggatccggc ccggccggga tctacgccgc cgacgccctg ctcaaagtcg aagtggcccg cgaccocggt gtttccatcg
    atcggtagca gcctaggccc ggccggccct agatgcggcg gctgcgggac gagttcaggg ttcaccggcg gctggggcca caaaggtagc
    >.....fnr89.....>
    v a i v g s g p a g i y a a d a l l k s e v a a d p g v s i

[...]

1621 cctccccgcg tcccgaggcc gtggacgctg tctctgccga gcggaacgct cgcttcacca cctgggacgg ctggtaccgg ctgcagcccg
    ggagggggcg agggctccgg cacctgcgca aggagcggct cgcttgtagc gcgaagtggg ggaccctgcc gaccatggcc gagctgcggc
    >.....fnr89.....>
    s s p a p e a v d a f l a e r n v r f t t w d g w y r l d a

1711 cggagaagc gcaggcgaa ccgcaaggcc gtgagcgtg gaagtacgct gagcgcgagg acatgctccg cgagagcggc gcctgactcg
    gcctctctcg cgtcccgcctt ggcgtgcccg cactcgcgca cttcatgcag ctccgcctcc tgtacgaggg gctctcggcg cggactgagc
    >.....fnr89.....>>
    a e k a q g e p h g r e r v k y v e r e d m l r e s g a -
    
```

Abbildung 88: Vektorkarte von pFNR89.

7.5 Inhaltlicher Eigenanteil an den veröffentlichten Publikationen dieser Arbeit

A. Domröse,* A. S. Klein,* J. Hage-Hülsmann, S. Thies, V. Svensson, T. Classen, J. Pietruszka, K.-E. Jaeger, T. Drepper, A. Loeschcke, *Front. Microbiol.* **2015**, *6*, 972; 'Efficient recombinant production of prodigiosin in *Pseudomonas putida*'.^[5]

Die o.g. Publikation enthält folgende inhaltliche Eigenanteile: Prodigiosin (**1a**) wurde als Referenzsubstanz und für die Etablierung der Analytik synthetisch dargestellt. Die (biomimetische) Totalsynthese zum Naturstoff Prodigiosin (**1a**) wurde über fünf Syntheseschritte mit den Intermediaten MAP (**13a**) und Boc-MBC (**46**) durchgeführt, wodurch zusätzlich die *Trofimov*-Reaktion eingeführt wurde. Die etablierte Analytik beinhaltet die entsprechenden Intermediate der Totalsynthese sowie Prodigiosin (**1a**) selbst. Die verwendeten Methoden sind: Absorptionsspektroskopie, HPLC, HRMS, Dünnschicht-chromatographie, (q)NMR-Spektroskopie, IR-Spektroskopie, Schmelzpunktbestimmung und Gaschromatographie. Mittels qNMR wurde die Reinheit von Prodigiosin (**1a**) evaluiert und anschließend der molare Extinktionskoeffizient durch Absorptionsspektroskopie ermittelt. Dieser wurde für die Quantifizierung des Naturstoffes aus Rohextrakten der Prodigiosin (**1a**) produzierenden *Pseudomonas putida* KT2440 Stämme eingesetzt. Überdies wurde ein Prozess der Produktreinigung aus ganzen Zellen und Fermentationsansätzen mit supplementierten Polyurethan etabliert und diese Methoden verglichen. Diese Prozesse enthalten die Biosynthese von Prodigiosin (**1a**), die *in situ* Adsorption des Naturstoffes, die Extraktion und die Reinigung zum Produkt.

A. S. Klein, A. Domröse, P. Bongen, H.U.C. Brass, T. Classen, A. Loeschcke, T. Drepper, L. Laraia, S. Sievers, K.-E. Jaeger, J. Pietruszka, *ACS Synth. Biol.* **2017**, *6*, 1757–1765; 'New Prodigiosin Derivatives Obtained by Mutasynthesis in *Pseudomonas putida*'.^[4]

Die o.g. Publikation enthält folgende inhaltliche Eigenanteile: Die Methoden der Biosynthese, der *Precursor-directed* Biosynthese und der Mutasynthese von Prodigininen wurden entwickelt und angewandt. Dies beinhaltete die Synthese der entsprechenden Präkursoren **13a–u**, die Entwicklung sämtlicher Randparameter der *Precursor-directed* Biosynthese und der Mutasynthese (Präkursorkonzentration, Toxizität des Lösungsmittels, Kultivierungsbedingungen), die Durchführung der Mutasynthese im analytischen- und präparativen Maßstab sowie die Produktion, die Produktreinigung und die Analytik der entsprechenden Prodiginine durch die zuvor genannten Methoden. Die Quantifizierung der Prodiginine erfolgte durch die Bestimmung der molaren Extinktionskoeffizienten und die Analyse der Produktbildung wurde zusätzlich mittels LC-MS ausgewertet. Die Produktion von MBC (**12**) im MAP (**13a**)-defizienten *P. putida* KT2440 Stamm wurde über HPLC nachgewiesen. Für den Ausschluss eines gehinderten Imports der Präkursoren in der Mutasynthese wurden *in vitro* Biotransformationen mit dem Kondensationsenzym PigC durchgeführt, welches nach Klonierung und Expression des Gens in *E. coli* BL21(DE3) hergestellt wurde. Für die physiologischen Tests mit Brustkrebszellen wurden die Prodiginine **1a**, **1d**, **1g**, **1q** und **1u** im präparativen Maßstab hergestellt.

A. S. Klein, A. Loeschcke, K.-E. Jaeger, J. Pietruszka, *GIT Labor-Fachzeitschrift* **2018**, *4*, 41–43; 'Neue bioaktive Naturstoff-Derivate – Nachhaltige Produktion von Prodigiosinderivaten mittels Mutasyntese'.^[3]

Die o.g. Publikation stellt eine Zusammenfassung der Publikationen „Efficient recombinant production of prodigiosin in *Pseudomonas putida*“ und „New Prodigiosin Derivatives Obtained by Mutasyntesis in *Pseudomonas putida*“ dar.^[4, 5] Der inhaltliche Eigenanteil ist entsprechend äquivalent zu den beschriebenen Eigenanteilen ebendieser Publikationen.

A. S. Klein,* H. U. C. Brass,* D. P. Klebl, T. Classen, A. Loeschcke, T. Drepper, S. Sievers, K.-E. Jaeger, J. Pietruszka, *ChemBioChem* **2018**, DOI: 10.1002/cbic.201800154; 'Preparation of cyclic prodiginines by mutasyntesis in *Pseudomonas putida* KT2440'.^[2]

Die o.g. Publikation enthält folgende inhaltliche Eigenanteile: Die Methoden der Mutasyntese und der *in vitro* Biotransformationen mit dem Kondensationsenzym PigC wurde auf die zyklischen 2,3-Dialkylpyrrole **77a–d** als Mutasyntese angewandt. Dies beinhaltet die Synthese der entsprechenden Präkursoren **77a–d**, die Durchführung der Mutasyntese im analytischen Maßstab sowie die Produktion, die Produktreinigung und die Analytik der entsprechenden Prodiginine **75a–d** durch die zuvor genannten Methoden. Die Analyse der Produktbildung wurde zusätzlich mittels LC-MS ausgewertet. Für den Ausschluss eines gehinderten Imports der Präkursoren in der Mutasyntese wurden *in vitro* Biotransformationen mit dem Kondensationsenzym PigC durchgeführt, welches nach Klonierung und Expression des Gens in *E. coli* BL21(DE3) hergestellt wurde. Die Evaluation der Bioaktivität gegenüber biotechnologisch relevante Mikroorganismen wurde auf die Hefen *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*) und *Saccharomyces cerevisiae* ausgeweitet.

J. Hage-Hülsmann, A. Grünberger, S. Thies, B. Santiago-Schübel, A. S. Klein, J. Pietruszka, D. Binder, F. Hilgers, A. Domröse, T. Drepper, D. Kohlheyer, K.-E. Jaeger, A. Loeschcke, *PLOS One* **2018**; 'Natural biocide cocktails: Combinatorial antibiotic effects of prodigiosin and biosurfactants'.^[1]

Die o.g. Publikation enthält folgende inhaltliche Eigenanteile: Prodigiosin (**1a**) wurde heterolog in *P. putida* pig-r2 produziert und über den Prozess der Produktreinigung mit Polyurethan sowie anschließender kontinuierlicher Extraktion und säulenchromatographischer Reinigung gewonnen. Die Reinheit des Naturstoffes wurde mittels Absorptionsspektroskopie, qNMR und HRMS bestimmt.

8 Literaturverzeichnis

- [1] J. Hage-Hülsmann, A. Grünberger, S. Thies, B. Santiago-Schübel, A. S. Klein, J. Pietruszka, D. Binder, F. Hilgers, A. Domröse, T. Drepper, D. Kohlheyer, K.-E. Jaeger, A. Loeschcke, *PLOS One* **2018**; 'Natural biocide cocktails: Combinatorial antibiotic effects of prodiginosin and biosurfactants'.
- [2] A. S. Klein, H. U. C. Brass, D. P. Klebl, T. Classen, A. Loeschcke, T. Drepper, S. Sievers, K.-E. Jaeger, J. Pietruszka, *ChemBioChem* **2018**; 'Preparation of cyclic prodiginines by mutasynthesis in *Pseudomonas putida* KT2440'.
- [3] A. S. Klein, A. Loeschcke, K.-E. Jaeger, J. Pietruszka, *GIT Labor-Fachzeitschrift* **2018**, *4*, 41-43; 'Neue bioaktive Naturstoff-Derivate - Nachhaltige Produktion von Prodiginosinderivaten mittels Mutasynthese'.
- [4] A. S. Klein, A. Domröse, P. Bongen, H. U. C. Brass, T. Classen, A. Loeschcke, T. Drepper, L. Laraia, S. Sievers, K.-E. Jaeger, J. Pietruszka, *ACS Synth. Biol.* **2017**, *6*, 1757-1765; 'New Prodiginosin Derivatives Obtained by Mutasynthesis in *Pseudomonas putida*'.
- [5] A. Domröse, A. S. Klein, J. Hage-Hülsmann, S. Thies, V. Svensson, T. Classen, J. Pietruszka, K.-E. Jaeger, T. Drepper, A. Loeschcke, *Front. Microbiol.* **2015**, *6*, 972; 'Efficient recombinant production of prodiginosin in *Pseudomonas putida*'.
- [6] D. P. Klebl, Masterarbeit, 'Wunderbare Derivate: Mutasynthese von Prodiginin-Analoga', Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (Düsseldorf), **2017**.
- [7] C. Friedrich, *Pharm. Unserer Zeit* **2006**, *35*, 392-398; 'Die Geschichte der β -Lactam-Antibiotika: Zwischen Zufall und gezielter Entwicklung'.
- [8] C. Gradmann, *Krankenh. hyg. up2date* **2014**, *09*, 109-121; 'Antibiotika und Antibiotikaresistenz – Infektionskrankheiten und ihre Kontrolle im 20. Jahrhundert'.
- [9] A. E. Clatworthy, E. Pierson, D. T. Hung, *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3*, 541-548; 'Targeting virulence: a new paradigm for antimicrobial therapy'.
- [10] 'Antibiotika-Forschung: Probleme und Perspektiven Stellungnahme', de Gruyter (Deutsche Akademie der Naturforscher Leopoldina, Akademie der Wissenschaften Hamburg), Berlin, **2012**.
- [11] K. M. Overbye, J. F. Barrett, *Drug Discov. Today* **2005**, *10*, 45-52; 'Antibiotics: where did we go wrong?'.
- [12] K. C. Nicolaou, J. S. Chen, D. J. Edmonds, A. A. Estrada, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 670-732; 'Fortschritte in der Chemie und Biologie natürlicher Antibiotika'; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 660-719; 'Recent Advances in the Chemistry and Biology of Naturally Occurring Antibiotics'.
- [13] C. Walsh, *Nat. Rev. Microbiol.* **2003**, *1*, 65-70; 'Where will new antibiotics come from?'.
- [14] F. von Nussbaum, M. Brands, B. Hinzen, S. Weigand, D. Häbich, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 5194-5254; 'Antibakterielle Naturstoffe in der medizinischen Chemie – Exodus oder Renaissance?'; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 5072-5129; 'Antibacterial Natural Products in Medicinal Chemistry—Exodus or Revival?'.
- [15] B. Nosse, *Chem. Unserer Zeit* **2006**, *40*, 164-172; 'Tumorthérapien im Umbruch. Zielen lernen!'.
- [16] V. T. DeVita, E. Chu, *Cancer Res.* **2008**, *68*, 8643-8653; 'A history of cancer chemotherapy'.
- [17] M. Galanski, B. K. Keppler, *Pharm. Unserer Zeit* **2006**, *35*, 118-123; 'Tumorhemmende Metallverbindungen: Entwicklung, Bedeutung und Perspektiven'.
- [18] D. M. Petibone, W. Majeed, D. A. Casciano, *J. Appl. Toxicol.* **2017**, *37*, 23-37; 'Autophagy function and its relationship to pathology, clinical applications, drug metabolism and toxicity'.

- [19] 'Innovating for sustainable growth - A bioeconomy for Europe', European Commission, Brüssel, **2012**.
- [20] 'Nationale Forschungsstrategie BioÖkonomie 2030 - Unser Weg zu einer bio-basierten Wirtschaft', Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) Referat Bioökonomie, Bonn, Berlin, **2010**.
- [21] 'Bioökonomie in Deutschland - Chancen für eine biobasierte und nachhaltige Zukunft', Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) Referat Bioökonomie, Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL), Bonn, Berlin, **2014**.
- [22] 'Eckpunkte einer Bioökonomiestrategie für Nordrhein-Westfalen', Seitenaufruf: 21. September 2017, Ministerium für Kultur und Wissenschaft des Landes Nordrhein-Westfalen, https://www.mkw.nrw/fileadmin/Medien/Dokumente/Forschung/Fortschritt/Biooekonomiestrategie_NRW.pdf, **2013**.
- [23] F. E. Koehn, G. T. Carter, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2005**, *4*, 206; 'The evolving role of natural products in drug discovery'.
- [24] G. Appendino, A. Minassi, O. Tagliatela-Scafati, *Nat. Prod. Rep.* **2014**, *31*, 880-904; 'Recreational drug discovery: natural products as lead structures for the synthesis of smart drugs'.
- [25] G. M. Cragg, D. J. Newman, *Biochim. Biophys. Acta* **2013**, *1830*, 3670-3695; 'Natural products: A continuing source of novel drug leads'.
- [26] D. J. Newman, G. M. Cragg, *J. Nat. Prod.* **2012**, *75*, 311-335; 'Natural Products As Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010'.
- [27] D. J. Newman, G. M. Cragg, *J. Nat. Prod.* **2016**, *79*, 629-661; 'Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014'.
- [28] J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, 'Biochemistry', 5th ed., W.H. Freeman, New York, **2002**.
- [29] J. R. Hanson, 'Natural products: The secondary metabolites', *Vol. 17*, Royal Society of Chemistry, **2003**.
- [30] I. Konczak, W. Zhang, *BioMed Res. Int.* **2004**, *2004*, 239-240; 'Anthocyanins—more than nature's colours'.
- [31] R. Verpoorte, A. Contin, J. Memelink, *Phytochem. Rev.* **2002**, *1*, 13-25; 'Biotechnology for the production of plant secondary metabolites'.
- [32] K. M. Davies, Plant Colour and Fragrance, in *Metabolic Engineering of Plant Secondary Metabolism* (Eds.: R. Verpoorte, A. W. Alfermann), Springer Netherlands, Dordrecht, **2000**, pp. 127-163.
- [33] D. J. Chadwick, J. Whelan, 'Secondary metabolites: their function and evolution', *Vol. 171*, John Wiley & Sons, **2008**.
- [34] Q. C. Rufus, 'Geschichte Alexanders des Grossen: lateinisch und deutsch', Walter de Gruyter, **1954**.
- [35] L. Garlaschelli, *Chem. Unserer Zeit* **1999**, *33*, 152-157; 'Chemie der Wunder'.
- [36] E. R. Gaughran, *Trans. N. Y. Acad. Sci.* **1969**, *31*, 3-24; 'Division of microbiology: From superstition to science: the history of a bacterium'.
- [37] F. Wrede, A. Rothhaas, *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie* **1933**, *222*, 203-206; 'Über das Prodigiosin, den roten Farbstoff des *Bacillus prodigiosus*. V'.
- [38] F. Wrede, A. Rothhaas, *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie* **1934**, *226*, 95-107; 'Über das Prodigiosin, den roten Farbstoff des *Bacillus prodigiosus*, VI'.
- [39] A. Fürstner, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 3706-3728; 'Chemie und Biologie des Roseophilins und der Prodigiosin-Alkaloide: 2500 Jahre im Überblick'; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 3582-3603; 'Chemistry and Biology of Roseophilin and the Prodigiosin Alkaloids: A Survey of the Last 2500 Years'.

- [40] N. R. Williamson, P. C. Fineran, F. J. Leeper, G. P. C. Salmond, *Nat. Rev. Microbiol.* **2006**, *4*, 887-899; 'The biosynthesis and regulation of bacterial prodiginines'.
- [41] D. X. Hu, D. M. Withall, G. L. Challis, R. J. Thomson, *Chem. Rev.* **2016**, *116*, 7818-7853; 'Structure, Chemical Synthesis, and Biosynthesis of Prodiginine Natural Products'.
- [42] N. N. Gerber, *Crit Rev Microbiol* **1975**, *3*, 469-485; 'Prodigiosin-Like Pigments'.
- [43] R. Hubbard, C. Rimington, *Biochem. J.* **1950**, *46*, 220-225; 'The biosynthesis of prodigiosin, the tripyrrylmethene pigment from *Bacillus prodigiosus* (*Serratia marcescens*)'.
- [44] D. Kim, J. S. Lee, Y. K. Park, J. F. Kim, H. Jeong, T. K. Oh, B. S. Kim, C. H. Lee, *J. Appl. Microbiol.* **2007**, *102*, 937-944; 'Biosynthesis of antibiotic prodiginines in the marine bacterium *Hahella chejuensis* KCTC 2396'.
- [45] D. Kim, J. F. Kim, J. H. Yim, S. K. Kwon, C. H. Lee, H. K. Lee, *J. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, *18*, 1621-1629; 'Red to red - the marine bacterium *Hahella chejuensis* and its product prodigiosin for mitigation of harmful algal blooms'.
- [46] K. K. Nisha, V. Kumar, *RSC Adv.* **2015**, *5*, 10899-10920; 'Prodigiosin alkaloids: recent advancements in total synthesis and their biological potential'.
- [47] A. A. Sertan-de Guzman, R. Z. Predicala, E. B. Bernardo, B. A. Neilan, S. P. Elardo, G. C. Mangalindan, D. Tasdemir, C. M. Ireland, W. L. Barraquio, G. P. Concepcion, *FEMS Microbiol. Lett.* **2007**, *277*, 188-196; '*Pseudovibrio denitrificans* strain Z143-1, a heptylprodigiosin-producing bacterium isolated from a Philippine tunicate'.
- [48] J. E. Lazaro, J. Nitcheu, R. Z. Predicala, G. C. Mangalindan, F. Nessler, D. Marzin, G. P. Concepcion, B. Diquet, *J. Nat. Toxins* **2002**, *11*, 367-377; 'Heptyl prodigiosin, a bacterial metabolite, is antimalarial *in vivo* and non-mutagenic *in vitro*'.
- [49] P. S. Crowley, F. Gara, O. Sullivan, D. P. Cotter, D. A. Dobson, *Mar. Drugs* **2014**, *12*; 'Marine *Pseudovibrio* sp. as a Novel Source of Antimicrobials'.
- [50] S. W. Tsao, B. A. Rudd, X. G. He, C. J. Chang, H. G. Floss, *J. Antibiot.* **1985**, *38*, 128-131; 'Identification of a red pigment from *Streptomyces coelicolor* A3(2) as a mixture of prodigiosin derivatives'.
- [51] H. H. Wasserman, C. K. Shaw, R. J. Sykes, R. J. Cushley, *Tetrahedron Lett.* **1974**, *15*, 2787-2790; 'The biosynthesis of metacycloprodigiosin and undecylprodigiosin'.
- [52] R. Liu, C.-B. Cui, L. Duan, Q.-Q. Gu, W.-M. Zhu, *Arch. Pharmacol. Res.* **2005**, *28*, 1341-1344; 'Potent *in Vitro* anticancer activity of metacycloprodigiosin and undecylprodigiosin from a sponge-derived actinomycete *Saccharopolyspora* sp. nov'.
- [53] S. Songia, A. Mortellaro, S. Taverna, C. Fornasiero, E. A. Scheiber, E. Erba, F. Colotta, A. Mantovani, A. M. Isetta, J. Golay, *J. Immunol.* **1997**, *158*, 3987-3995; 'Characterization of the new immunosuppressive drug undecylprodigiosin in human lymphocytes: retinoblastoma protein, cyclin-dependent kinase-2, and cyclin-dependent kinase-4 as molecular targets'.
- [54] R. D'Alessio, A. Rossi, *Synlett* **1996**, *1996*, 513-514; 'Short synthesis of undecylprodigiosine. A new route to 2,2'-bipyrryl-pyrromethene systems'.
- [55] R. D'Alessio, A. Bargiotti, O. Carlini, F. Colotta, M. Ferrari, P. Gnocchi, A. Isetta, N. Mongelli, P. Motta, A. Rossi, M. Rossi, M. Tibolla, E. Vanotti, *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 2557-2565; 'Synthesis and immunosuppressive activity of novel prodigiosin derivatives'.
- [56] R. Perez-Tomas, B. Montaner, R. Llagostera, V. Soto-Cerrato, *Biochem. Pharmacol.* **2003**, *66*, 1447-1452; 'The prodigiosins, proapoptotic drugs with anticancer properties'.
- [57] P. K. Sydor, S. M. Barry, O. M. Odulate, F. Barona-Gomez, S. W. Haynes, C. Corre, L. J. Song, G. L. Challis, *Nat. Chem.* **2011**, *3*, 388-392; 'Regio- and stereodivergent antibiotic oxidative carbocyclizations catalysed by Rieske oxygenase-like enzymes'.
- [58] P. K. Sydor, Dissertation, 'Elucidation of the Prodiginine Biosynthetic Pathway in *Streptomyces coelicolor* A3(2)', University of Warwick (Warwick), **2010**.

- [59] A. Fürstner, J. Grabowski, C. W. Lehmann, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 8275-8280; 'Total synthesis and structural refinement of the cyclic tripyrrole pigment nonylprodigiosin'.
- [60] S. Kimata, M. Izawa, T. Kawasaki, Y. Hayakawa, *J. Antibiot.* **2017**, *70*, 196-199; 'Identification of a prodigiosin cyclization gene in the roseophilin producer and production of a new cyclized prodigiosin in a heterologous host'.
- [61] H. H. Wasserman, G. C. Rodgers, D. D. Keith, *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, *91*, 1263-1264; 'Metacycloprodigiosin, a tripyrrole pigment from *Streptomyces longisporus ruber*'.
- [62] J. Magae, M. W. Miller, K. Nagai, G. M. Shearer, *J. Antibiot.* **1996**, *49*, 86-90; 'Effect of metacycloprodigiosin, an inhibitor of killer T cells on murine skin and heart transplants'.
- [63] C. M. Baldino, J. Parr, C. J. Wilson, S.-C. Ng, D. Yohannes, H. H. Wasserman, *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 701-704; 'Indoloprodigiosins from the C-10 bipyrrolic precursor: New antiproliferative prodigiosin analogs'.
- [64] T. Kawasaki, F. Sakurai, Y. Hayakawa, *J. Nat. Prod.* **2008**, *71*, 1265-1267; 'A prodigiosin from the roseophilin producer *Streptomyces griseoviridis*'.
- [65] T. Kawasaki, F. Sakurai, S. Y. Nagatsuka, Y. Hayakawa, *J. Antibiot.* **2009**, *62*, 271-276; 'Prodigiosin biosynthesis gene cluster in the roseophilin producer *Streptomyces griseoviridis*'.
- [66] R. E. Johnson, T. de Rond, V. N. Lindsay, J. D. Keasling, R. Sarpong, *Org. Lett.* **2015**, *17*, 3474-3477; 'Synthesis of Cycloprodigiosin Identifies the Natural Isolate as a Scalemic Mixture'.
- [67] K. Kawauchi, K. Shibutani, H. Yagisawa, H. Kamata, S. i. Nakatsuji, H. Anzai, Y. Yokoyama, Y. Ikegami, Y. Moriyama, H. Hirata, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1997**, *237*, 543-547; 'A Possible Immunosuppressant, Cycloprodigiosin Hydrochloride, Obtained from *Pseudoalteromonas denitrificans*'.
- [68] D. Yamamoto, Y. Kiyozuka, Y. Uemura, C. Yamamoto, H. Takemoto, H. Hirata, K. Tanaka, K. Hioki, A. Tsubura, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **2000**, *126*, 191-197; 'Cycloprodigiosin hydrochloride, a H⁺/Cl⁻ symporter, induces apoptosis in human breast cancer cell lines'.
- [69] N. N. Gerber, *Tetrahedron Lett* **1970**, 809-812; 'A novel, cyclic, tripyrrole pigment from *Actinomadura (nocardia) madurae*'.
- [70] A. E. T. Silva, L. A. Guimarães, E. G. Ferreira, M. d. C. M. Torres, A. B. d. Silva, P. C. Branco, F. A. S. Oliveira, G. G. Z. Silva, D. V. Wilke, E. R. Silveira, O. D. L. Pessoa, P. C. Jimenez, L. V. Costa-Lotufo, *J. Braz. Chem. Soc.* **2017**, *28*, 465-474; 'Bioprospecting Anticancer Compounds from the Marine-Derived Actinobacteria *Actinomadura* sp. Collected at the Saint Peter and Saint Paul Archipelago (Brazil)'.
- [71] D. Fehér, R. S. Barlow, P. S. Lorenzo, T. K. Hemscheidt, *J. Nat. Prod.* **2008**, *71*, 1970-1972; 'A 2-Substituted Prodiginine, 2-(*p*-Hydroxybenzyl)prodigiosin, from *Pseudoalteromonas rubra*'.
- [72] A. Fürstner, E. J. Grabowski, *ChemBioChem* **2001**, *2*, 706-709; 'Studies on DNA Cleavage by Cytotoxic Pyrrole Alkaloids Reveal the Distinctly Different Behavior of Roseophilin and Prodigiosin Derivatives'.
- [73] D. L. Boger, J. Hong, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 8515-8519; 'Asymmetric Total Synthesis of ent(-)-Roseophilin: Assignment of Absolute Configuration'.
- [74] C. Boonlarpradab, C. A. Kauffman, P. R. Jensen, W. Fenical, *Org. Lett.* **2008**, *10*, 5505-5508; 'Marineosins A and B, Cytotoxic Spiroaminals from a Marine-Derived Actinomycete'.
- [75] K. Yang, Q. Chen, D. Zhang, H. Zhang, X. Lei, Z. Chen, Y. Li, Y. Hong, X. Ma, W. Zheng, Y. Tian, T. Zheng, H. Xu, *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 7750; 'The algicidal mechanism of prodigiosin from *Hahella* sp. KA22 against *Microcystis aeruginosa*'.
- [76] K. Papireddy, M. Smilkstein, J. X. Kelly, Shweta, S. M. Salem, M. Alhamadsheh, S. W. Haynes, G. L. Challis, K. A. Reynolds, *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 5296-5306; 'Antimalarial Activity of Natural and Synthetic Prodiginines'.

- [77] M. Isaka, A. Jaturapat, J. Kramyu, M. Tanticharoen, Y. Thebtaranonth, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2002**, *46*, 1112-1113; 'Potent *In Vitro* Antimalarial Activity of Metacycloprodigiosin Isolated from *Streptomyces spectabilis* BCC 4785'.
- [78] E. Marchal, D. A. Smithen, M. I. Uddin, A. W. Robertson, D. L. Jakeman, V. Mollard, C. D. Goodman, K. S. MacDougall, S. A. McFarland, G. I. McFadden, A. Thompson, *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 4132-4142; 'Synthesis and antimalarial activity of prodigiosenes'.
- [79] N. Stankovic, V. Radulovic, M. Petkovic, I. Vuckovic, M. Jadranin, B. Vasiljevic, J. Nikodinovic-Runic, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2012**, *96*, 1217-1231; '*Streptomyces* sp JS520 produces exceptionally high quantities of undecylprodigiosin with antibacterial, antioxidative, and UV-protective properties'.
- [80] J. C. Lapenda, P. A. Silva, M. C. Vicalvi, K. X. F. R. Sena, S. C. Nascimento, *World. J. Microbiol. Biotechnol.* **2015**, *31*, 399-406; 'Antimicrobial activity of prodigiosin isolated from *Serratia marcescens* UFPEDA 398'.
- [81] C. Gulani, S. Bhattacharya, A. Das, *Malays. J. Microbiol.* **2012**, *8*, 116-122; 'Assessment of process parameters influencing the enhanced production of prodigiosin from *Serratia marcescens* and evaluation of its antimicrobial, antioxidant and dyeing potentials'.
- [82] A. Samrot, K. Chandana, P. Senthilkumar, G. Narendra Kumar, *Int. Res. J. Biotechnol.* **2011**, *2*, 128-133; 'Optimization of prodigiosin production by *Serratia marcescens* SU-10 and evaluation of its bioactivity'.
- [83] R. K. Suryawanshi, C. D. Patil, H. P. Borase, B. K. Salunke, S. V. Patil, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2014**, *173*, 1209-1221; 'Studies on Production and Biological Potential of Prodigiosin by *Serratia marcescens*'.
- [84] K.-I. A. R. Lund, C. Figliola, A. K. Kajetanowicz, A. Thompson, *RSC Adv.* **2017**, *7*, 18617-18627; 'Synthesis and anticancer activity of prodigiosenes bearing C-ring esters and amides'.
- [85] N. R. Williamson, P. C. Fineran, T. Gristwood, S. R. Chawrai, F. J. Leeper, G. P. C. Salmond, *Future Microbiol.* **2007**, *2*, 605-618; 'Anticancer and immunosuppressive properties of bacterial prodiginines'.
- [86] G. Park, J. T. Tomlinson, M. S. Melvin, M. W. Wright, C. S. Day, R. A. Manderville, *Org. Lett.* **2003**, *5*, 113-116; 'Zinc and Copper Complexes of Prodigiosin: Implications for Copper-Mediated Double-Strand DNA Cleavage'.
- [87] R. I. S. Diaz, J. Regourd, P. V. Santacrose, J. T. Davis, D. L. Jakeman, A. Thompson, *Chem. Commun.* **2007**, 2701-2703; 'Chloride anion transport and copper-mediated DNA cleavage by C-ring functionalized prodigiosenes'.
- [88] P. A. Gale, 'Anion recognition in supramolecular chemistry', *Vol. 24*, Springer Science & Business Media, **2010**.
- [89] M. S. Melvin, M. W. Calcutt, R. E. Noftle, R. A. Manderville, *Chem. Res. Toxicol.* **2002**, *15*, 742-748; 'Influence of the A-Ring on the Redox and Nuclease Properties of the Prodigiosins: Importance of the Bipyrrrole Moiety in Oxidative DNA Cleavage'.
- [90] M. S. Melvin, D. C. Ferguson, N. Lindquist, R. A. Manderville, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 6861-6869; 'DNA Binding by 4-Methoxypyrrolic Natural Products. Preference for Intercalation at AT Sites by Tambjamine E and Prodigiosin'.
- [91] M. S. Melvin, J. T. Tomlinson, G. Park, C. S. Day, G. R. Saluta, G. L. Kucera, R. A. Manderville, *Chem. Res. Toxicol.* **2002**, *15*, 734-741; 'Influence of the A-Ring on the Proton Affinity and Anticancer Properties of the Prodigiosins'.
- [92] M. S. Melvin, J. T. Tomlinson, G. R. Saluta, G. L. Kucera, N. Lindquist, R. A. Manderville, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 6333-6334; 'Double-Strand DNA Cleavage by Copper-Prodigiosin'.

- [93] M. S. Melvin, K. E. Wooton, C. C. Rich, G. R. Saluta, G. L. Kucera, N. Lindquist, R. A. Manderville, *J. Inorg. Biochem.* **2001**, *87*, 129-135; 'Copper-nuclease efficiency correlates with cytotoxicity for the 4-methoxypyrrrolic natural products'.
- [94] E. Marchal, S. Rastogi, A. Thompson, J. T. Davis, *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 7515-7522; 'Influence of B-ring modifications on proton affinity, transmembrane anion transport and anti-cancer properties of synthetic prodigiosenes'.
- [95] S. Rastogi, E. Marchal, I. Uddin, B. Groves, J. Colpitts, S. A. McFarland, J. T. Davis, A. Thompson, *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 3834-3845; 'Synthetic prodigiosenes and the influence of C-ring substitution on DNA cleavage, transmembrane chloride transport and basicity'.
- [96] J. L. Seganish, J. T. Davis, *Chem. Commun.* **2005**, 5781-5783; 'Prodigiosin is a chloride carrier that can function as an anion exchanger'.
- [97] P. A. Gale, E. N. W. Howe, X. Wu, *Chem* **2016**, *1*, 351-422; 'Anion Receptor Chemistry'.
- [98] J. L. Sessler, L. R. Eller, W. S. Cho, S. Nicolaou, A. Aguilar, J. T. Lee, V. M. Lynch, D. J. Magda, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 5989-5992; 'Synthesis, anion-binding properties, and *in vitro* anticancer activity of prodigiosin analogues'.
- [99] D. C. Rubinsztein, P. Codogno, B. Levine, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2012**, *11*, 709-730; 'Autophagy modulation as a potential therapeutic target for diverse diseases'.
- [100] C. A. Lamb, T. Yoshimori, S. A. Tooze, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2013**, *14*, 759-774; 'The autophagosome: origins unknown, biogenesis complex'.
- [101] V. A. Stamelos, N. Fisher, H. Bamrah, C. Voisey, J. C. Price, W. E. Farrell, C. W. Redman, A. Richardson, *PLOS One* **2016**, *11*, e0150696; 'The BH3 Mimetic Obatoclox Accumulates in Lysosomes and Causes Their Alkalinization'.
- [102] T. Kataoka, M. Muroi, S. Ohkuma, T. Waritani, J. Magae, A. Takatsuki, S. Kondo, M. Yamasaki, K. Nagai, *FEBS Lett.* **1995**, *359*, 53-59; 'Prodigiosin 25-C uncouples vacuolar type H⁺-ATPase, inhibits vacuolar acidification and affects glycoprotein processing'.
- [103] W. Castillo-Ávila, M. Abal, S. Robine, R. Pérez-Tomás, *Life Sci.* **2005**, *78*, 121-127; 'Non-apoptotic concentrations of prodigiosin (H⁺/Cl⁻ symporter) inhibit the acidification of lysosomes and induce cell cycle blockage in colon cancer cells'.
- [104] A. D. Schimmer, S. O'Brien, H. Kantarjian, J. Brandwein, B. D. Cheson, M. D. Minden, K. Yee, F. Ravandi, F. Giles, A. Schuh, V. Gupta, M. Andreeff, C. Koller, H. Chang, S. Kamel-Reid, M. Berger, J. Viallet, G. Borthakur, *Clin. Cancer Res.* **2008**, *14*, 8295-8301; 'A Phase I Study of the Pan Bcl-2 Family Inhibitor Obatoclox Mesylate in Patients with Advanced Hematologic Malignancies'.
- [105] A. D. Schimmer, A. Raza, T. H. Carter, D. Claxton, H. Erba, D. J. DeAngelo, M. S. Tallman, C. Goard, G. Borthakur, *PLOS One* **2014**, *9*, e108694; 'A multicenter phase I/II study of obatoclox mesylate administered as a 3- or 24-hour infusion in older patients with previously untreated acute myeloid leukemia'.
- [106] C. J. Langer, I. Albert, H. J. Ross, P. Kovacs, L. J. Blakely, G. Pajkos, A. Somfay, P. Zatloukal, A. Kazarnowicz, M. M. Moezi, M. T. Schreeder, J. Schnyder, A. Ao-Baslock, A. K. Pathak, M. S. Berger, *Lung Cancer* **2014**, *85*, 420-428; 'Randomized phase II study of carboplatin and etoposide with or without obatoclox mesylate in extensive-stage small cell lung cancer'.
- [107] M. L. Arellano, G. Borthakur, M. Berger, J. Luer, A. Raza, *Clin. Lymphoma, Myeloma Leuk.* **2014**, *14*, 534-539; 'A Phase II, Multicenter, Open-Label Study of Obatoclox Mesylate in Patients With Previously Untreated Myelodysplastic Syndromes With Anemia or Thrombocytopenia'.
- [108] Y. Oki, A. Copeland, F. Hagemester, L. E. Fayad, M. Fanale, J. Romaguera, A. Younes, *Blood* **2012**, *119*, 2171-2172; 'Experience with obatoclox mesylate (GX15-070), a small molecule pan-Bcl-2 family antagonist in patients with relapsed or refractory classical Hodgkin lymphoma'.

- [109] A. Nakamura, J. Magae, R. F. Tsuji, M. Yamasaki, K. Nagai, *Transplantation* **1989**, *47*, 1013-1016; 'Suppression of cytotoxic T cell induction *in vivo* by prodigiosin 25-C'.
- [110] S. M. Stepkowski, Z. S. Nagy, M. E. Wang, F. Behbod, R. Erwin-Cohen, B. D. Kahan, R. A. Kirken, *Transplant. Proc.*, **33**, 3272-3273; 'PNU156804 inhibits Jak3 tyrosine kinase and rat heart allograft rejection'.
- [111] V. Rizzo, A. Morelli, V. Pincioli, D. Sciangula, R. D'Alessio, *J. Pharm. Sci.* **1999**, *88*, 73-78; 'Equilibrium and kinetics of rotamer interconversion in immunosuppressant prodigiosin derivatives in solution'.
- [112] A. Mortellaro, S. Songia, P. Gnocchi, M. Ferrari, C. Fornasiero, R. D'Alessio, A. Isetta, F. Colotta, J. Golay, *J. Immunol.* **1999**, *162*, 7102-7109; 'New Immunosuppressive Drug PNU156804 Blocks IL-2-Dependent Proliferation and NF- κ B and AP-1 Activation'.
- [113] N. Darshan, H. K. Manonmani, *J. Food Sci. Technol.* **2015**, *52*, 5393-5407; 'Prodigiosin and its potential applications'.
- [114] P. Kancharla, W. Lu, S. M. Salem, J. X. Kelly, K. A. Reynolds, *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 11674-11689; 'Stereospecific synthesis of 23-hydroxyundecylprodiginines and analogues and conversion to antimalarial premarineosins via a Rieske oxygenase catalyzed bicyclization'.
- [115] F. Wrede, O. Hettche, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1929**, *62*, 2678-2685; 'Über das Prodigiosin, den roten Farbstoff des *Bacillus Prodigiosus* (I. Mitteil.)'.
- [116] U. V. Santer, H. J. Vogel, *Biochim. Biophys. Acta* **1956**, *19*, 578-579; 'Prodigiosin synthesis in *Serratia marcescens*: isolation of a pyrrole-containing precursor'.
- [117] H. H. Wasserman, J. E. McKeon, L. Smith, P. Forgione, *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, *82*, 506-507; 'Prodigiosin. Structure and Partial Synthesis'.
- [118] H. Rapoport, K. G. Holden, *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, *82*, 5510-5511; 'The synthesis of Prodigiosin'.
- [119] H. Rapoport, K. G. Holden, *J. Am. Chem. Soc.* **1962**, *84*, 635-642; 'The Synthesis of Prodigiosin'.
- [120] H. Rapoport, C. D. Willson, *J. Am. Chem. Soc.* **1962**, *84*, 630-635; 'The Preparation and Properties of Some Methoxypyrroles'.
- [121] D. A. Morrison, *J. Bacteriol.* **1966**, *91*, 1599-1604; 'Prodigiosin Synthesis in Mutants of *Serratia marcescens*'.
- [122] H. H. Wasserman, R. J. Sykes, P. Peverada, C. K. Shaw, R. J. Cushley, S. R. Lipsky, *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 6874-6875; 'Biosynthesis of prodigiosin. Incorporation patterns of carbon-13-labeled alanine, proline, glycine, and serine elucidated by Fourier transform nuclear magnetic resonance'.
- [123] A. M. Cerdeño, M. J. Bibb, G. L. Challis, *Chemistry & Biology* **2001**, *8*, 817-829; 'Analysis of the prodiginine biosynthesis gene cluster of *Streptomyces coelicolor* A3(2): new mechanisms for chain initiation and termination in modular multienzymes'.
- [124] S. W. Haynes, P. K. Sydor, A. E. Stanley, L. Song, G. L. Challis, *Chem. Commun.* **2008**, 1865-1867; 'Role and substrate specificity of the *Streptomyces coelicolor* RedH enzyme in undecylprodiginine biosynthesis'.
- [125] S. Mo, P. K. Sydor, C. Corre, M. M. Alhamadsheh, A. E. Stanley, Stuart W. Haynes, L. Song, K. A. Reynolds, G. L. Challis, *Chemistry & Biology* **2008**, *15*, 137-148; 'Elucidation of the *Streptomyces coelicolor* Pathway to 2-Undecylpyrrole, a Key Intermediate in Undecylprodiginine and Streptorubin B Biosynthesis'.
- [126] A. E. Stanley, L. J. Walton, M. Kourdi Zerikly, C. Corre, G. L. Challis, *Chem. Commun.* **2006**, 3981-3983; 'Elucidation of the *Streptomyces coelicolor* pathway to 4-methoxy-2,2'-bipyrrole-5-carboxaldehyde, an intermediate in prodiginine biosynthesis'.

- [127] S. R. Chawrai, N. R. Williamson, T. Mahendiran, G. P. C. Salmond, F. J. Leeper, *Chem. Sci.* **2012**, *3*, 447-454; 'Characterisation of PigC and HapC, the prodigiosin synthetases from *Serratia* sp and *Hahella chejuensis* with potential for biocatalytic production of anticancer agents'.
- [128] A. K. P. Harris, N. R. Williamson, H. Slater, A. Cox, S. Abbasi, I. Foulds, H. T. Simonsen, F. J. Leeper, G. P. C. Salmond, *Microbiology* **2004**, *150*, 3547-3560; 'The *Serratia* gene cluster encoding biosynthesis of the red antibiotic, prodigiosin, shows species-and strain-dependent genome context variation'.
- [129] N. R. Williamson, H. T. Simonsen, R. A. A. Ahmed, G. Goldet, H. Slater, L. Woodley, F. J. Leeper, G. P. C. Salmond, *Mol. Microbiol.* **2005**, *56*, 971-989; 'Biosynthesis of the red antibiotic, prodigiosin, in *Serratia*: identification of a novel 2-methyl-3-*n*-amyl-pyrrole (MAP) assembly pathway, definition of the terminal condensing enzyme, and implications for undecylprodigiosin biosynthesis in *Streptomyces*'.
- [130] S. R. Chawrai, N. R. Williamson, G. P. C. Salmond, F. J. Leeper, *Chem. Commun.* **2008**, 1862-1864; 'Chemoenzymatic synthesis of prodigiosin analogues-exploring the substrate specificity of PigC'.
- [131] P. K. Sydor, G. L. Challis, Chapter Ten - Oxidative Tailoring Reactions Catalyzed by Nonheme Iron-Dependent Enzymes: Streptorubin B Biosynthesis as an Example, in *Methods Enzymol.*, Vol. 516 (Ed.: A. H. David), Academic Press, **2012**, pp. 195-218.
- [132] D. M. Withall, S. W. Haynes, G. L. Challis, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 7889-7897; 'Stereochemistry and Mechanism of Undecylprodigiosin Oxidative Carbocyclization to Streptorubin B by the Rieske Oxygenase RedG'.
- [133] D. M. Withall, Dissertation, 'Mechanistic investigation of the RedG-catalysed oxidative carbocyclisation of undecylprodigiosin to streptorubin B', University of Warwick (Warwick), **2014**.
- [134] S. W. Haynes, P. K. Sydor, C. Corre, L. Song, G. L. Challis, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 1793-1798; 'Stereochemical Elucidation of Streptorubin B'.
- [135] S. M. Barry, G. L. Challis, *ACS Catal.* **2013**, *3*, 2362-2370; 'Mechanism and Catalytic Diversity of Rieske Non-Heme Iron-Dependent Oxygenases'.
- [136] D. L. Boger, M. Patel, *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 1405-1415; 'Total synthesis of prodigiosin, prodigiosene, and desmethoxyprodigiosin: Diels-Alder reactions of heterocyclic azadienes and development of an effective palladium(II)-promoted 2,2'-bipyrrole coupling procedure'.
- [137] H. H. Wasserman, L. J. Lombardo, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 1725-1728; 'The chemistry of vicinal tricarbonyls a total synthesis of prodigiosin'.
- [138] H. H. Wasserman, A. K. Petersen, M. Xia, J. Wang, *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 7587-7589; 'Pyrrole-singlet oxygen reactions leading to α,α' -bipyrroles. Synthesis of prodigiosin and analogs'.
- [139] K. Dairi, S. Tripathy, G. Attardo, J. F. Lavalley, *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 2605-2606; 'Two-step synthesis of the bipyrrole precursor of prodigiosins'.
- [140] K. Dairi, Y. Yao, M. Faley, S. Tripathy, E. Rioux, X. Billot, D. Rabouin, G. Gonzalez, J.-F. Lavallée, G. Attardo, *Org. Process Res. Dev.* **2007**, *11*, 1051-1054; 'A Scalable Process for the Synthesis of the Bcl Inhibitor Obatoclox'.
- [141] D. J. Newman, G. M. Cragg, *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 461-477; 'Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years'.
- [142] J. Shendure, S. Balasubramanian, G. M. Church, W. Gilbert, J. Rogers, J. A. Schloss, R. H. Waterston, *Nature* **2017**, *Advance online publication*; 'DNA sequencing at 40: past, present and future'.

- [143] A. Kirschning, F. Taft, T. Knobloch, *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 3245-3259; 'Total synthesis approaches to natural product derivatives based on the combination of chemical synthesis and metabolic engineering'.
- [144] O. Bilyk, A. Luzhetskyy, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2016**, *42*, 98-107; 'Metabolic engineering of natural product biosynthesis in actinobacteria'.
- [145] J. R. King, S. Edgar, K. Qiao, G. Stephanopoulos, *F1000Research* **2016**, *5*; 'Accessing Nature's diversity through metabolic engineering and synthetic biology'.
- [146] L. B. Pickens, Y. Tang, Y.-H. Chooi, *Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng.* **2011**, *2*, 211-236; 'Metabolic Engineering for the Production of Natural Products'.
- [147] A. Loeschcke, S. Thies, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2015**, *99*, 6197-6214; '*Pseudomonas putida*—a versatile host for the production of natural products'.
- [148] R. D. Finn, C. G. Jones, *Nat. Prod. Rep.* **2003**, *20*, 382-391; 'Natural products—a simple model to explain chemical diversity'.
- [149] R. Ledesma-Amaro, C. Serrano-Amatriain, A. Jiménez, J. L. Revuelta, *Microb. Cell Fact.* **2015**, *14*, 163; 'Metabolic engineering of riboflavin production in *Ashbya gossypii* through pathway optimization'.
- [150] L. Eggeling, M. Bott, 'Handbook of *Corynebacterium glutamicum*', CRC press, **2005**.
- [151] K. Madhavan Nampoothiri, N. R. Nair, R. P. John, *Bioresour. Technol.* **2010**, *101*, 8493-8501; 'An overview of the recent developments in polylactide (PLA) research'.
- [152] E. T. H. Vink, K. R. Rábago, D. A. Glassner, B. Springs, R. P. O'Connor, J. Kolstad, P. R. Gruber, *Macromol. Biosci.* **2004**, *4*, 551-564; 'The Sustainability of NatureWorks™ Polylactide Polymers and Ingeo™ Polylactide Fibers: an Update of the Future'.
- [153] C. D. Reeves, *Crit. Rev. Biotechnol.* **2003**, *23*, 95-147; 'The Enzymology of Combinatorial Biosynthesis'.
- [154] S. Eichner, T. Knobloch, H. G. Floss, J. Fohrer, K. Harmrolfs, J. Hermans, A. Schulz, F. Sasse, P. Spiteller, F. Taft, A. Kirschning, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 752-757; 'The Interplay between Mutasythesis and Semisynthesis: Generation and Evaluation of an Ansamitocin Library'.
- [155] J. Kennedy, *Nat. Prod. Rep.* **2008**, *25*, 25-34; 'Mutasythesis, chemobiosynthesis, and back to semi-synthesis: combining synthetic chemistry and biosynthetic engineering for diversifying natural products'.
- [156] K. P. P. Mahoney, D. R. M. Smith, E. J. A. Bogosyan, R. J. M. Goss, *Synthesis* **2014**, *46*, 2122-2132; 'Access to High Value Natural and Unnatural Products through Hyphenating Chemical Synthesis and Biosynthesis'.
- [157] R. N. Patel, *Annu. Rev. Microbiol.* **1998**, *52*, 361-395; 'Tour de Paclitaxel: Biocatalysis for Semisynthesis'.
- [158] P. M. O'Neill, N. L. Searle, K.-W. Kan, R. C. Storr, J. L. Maggs, S. A. Ward, K. Raynes, B. K. Park, *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 5487-5493; 'Novel, Potent, Semisynthetic Antimalarial Carba Analogues of the First-Generation 1,2,4-Trioxane Artemether'.
- [159] S. Boecker, S. Zobel, V. Meyer, R. D. Süßmuth, *Fungal Genet. Biol.* **2016**, *89*, 89-101; 'Rational biosynthetic approaches for the production of new-to-nature compounds in fungi'.
- [160] P. A. S. Lowden, G. A. Böhm, S. Metcalfe, J. Staunton, P. F. Leadlay, *ChemBioChem* **2004**, *5*, 535-538; 'New Rapamycin Derivatives by Precursor-Directed Biosynthesis'.
- [161] F. Taft, M. Brunjes, H. G. Floss, N. Czempinski, S. Grond, F. Sasse, A. Kirschning, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 1057-1060; 'Highly active ansamitocin derivatives: mutasythesis using an AHBA-blocked mutant'.

- [162] A. Kirschning, F. Hahn, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 4012-4022; 'Merging Chemical Synthesis and Biosynthesis: A New Chapter in the Total Synthesis of Natural Products and Natural Product Libraries'.
- [163] A. Birch, *Pure Appl. Chem.* **1963**, *7*, 527-538; 'The biosynthesis of antibiotics'.
- [164] K. L. Rinehart, *Pure Appl. Chem.* **1977**, *49*, 1361-1384; 'Mutasyntesis of new antibiotics'.
- [165] K. J. Weissman, *Trends Biotechnol.* **2007**, *25*, 139-142; 'Mutasyntesis – uniting chemistry and genetics for drug discovery'.
- [166] S. Eichner, H. G. Floss, F. Sasse, A. Kirschning, *ChemBioChem* **2009**, *10*, 1801-1805; 'New, Highly Active Nonbenzoquinone Geldanamycin Derivatives by Using Mutasyntesis'.
- [167] M. A. Gregory, H. Petkovic, R. E. Lill, S. J. Moss, B. Wilkinson, S. Gaisser, P. F. Leadlay, R. M. Sheridan, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 4835-4838; 'Mutasyntesis of Rapamycin Analogues through the Manipulation of a Gene Governing Starter Unit Biosynthesis'; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 4757-4760; 'Mutasyntesis of Rapamycin Analogues through the Manipulation of a Gene Governing Starter Unit Biosynthesis'.
- [168] S. Weist, C. Kittel, D. Bischoff, B. Bister, V. Pfeifer, G. J. Nicholson, W. Wohlleben, R. D. Süßmuth, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 5942-5943; 'Mutasyntesis of Glycopeptide Antibiotics: Variations of Vancomycin's AB-Ring Amino Acid 3,5-Dihydroxyphenylglycine'.
- [169] L. B. Dong, J. D. Rudolf, B. Shen, *Org. Lett.* **2016**, *18*, 4606-4609; 'A Mutasyntetic Library of Platensimycin and Platencin Analogues'.
- [170] W. R. Hearn, M. K. Elson, R. H. Williams, J. Medina-Castro, *J. Org. Chem.* **1970**, *35*, 142-146; 'Prodigiosene [5-(2-pyrrolyl)-2,21-dipyrrolylmethene] and some substituted prodigiosenes'.
- [171] S. Mo, B. S. Kim, K. A. Reynolds, *Chemistry & Biology* **2005**, *12*, 191-200; 'Production of Branched-Chain Alkylprodiginines in *S. coelicolor* by Replacement of the 3-Ketoacyl ACP Synthase III Initiation Enzyme, RedP'.
- [172] L. N. Aldrich, E. S. Dawson, C. W. Lindsley, *Org. Lett.* **2010**, *12*, 1048-1051; 'Evaluation of the Biosynthetic Proposal for the Synthesis of Marineosins A and B'.
- [173] L. N. Aldrich, S. L. Stoops, B. C. Crews, L. J. Marnett, C. W. Lindsley, *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 5207-5211; 'Total synthesis and biological evaluation of tambjamine K and a library of unnatural analogs'.
- [174] L. N. Aldrich, Dissertation, 'Progress toward the total synthesis of Marineosins A & B; Total Synthesis of Tambjamine K and unnatural analogs with improved anticancer activity, and discovery of selective M1 antagonists', Vanderbilt University (Nashville, Tennessee), **2012**.
- [175] H. H. Wasserman, D. J. Friedland, D. A. Morrison, *Tetrahedron Lett.* **1968**, *9*, 641-644; 'A novel dipyrrolyldipyrromethene prodigiosin analog from *Serratia marcescens*'.
- [176] A. Hantzsch, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1890**, *23*, 1474-1476; 'Neue Bildungsweise von Pyrrolderivaten'.
- [177] C. Paal, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1885**, *18*, 367-371; 'Synthese von Thiophen- und Pyrrolderivaten'.
- [178] L. Knorr, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1885**, *18*, 299-311; 'Einwirkung des Diacetbernsteinsäureesters auf Ammoniak und primäre Aminbasen'.
- [179] E. Y. Schmidt, A. I. Mikhaleva, A. M. Vasil'tsov, A. B. Zaitsev, N. V. Zorina, *ARKIVOC* **2005**, *VII*, 11-17; 'A straightforward synthesis of pyrroles from ketones and acetylene: a one-pot version of the Trofimov reaction'.
- [180] O. V. Petrova, L. N. Sobenina, I. Ushakov, A. I. Mikhaleva, S. H. Hyun, B. A. Trofimov, *ARKIVOC* **2009**, *IV*, 14-20; 'Reaction of acetophenone and benzylphenylketone oximes with phenylacetylene: synthesis of di- and triphenylpyrroles'.

- [181] B. A. Trofimov, A. b. I. Mikhaleva, A. V. Ivanov, V. S. Shcherbakova, I. A. Ushakov, *Tetrahedron* **2015**, *71*, 124-128; 'Expedient one-pot synthesis of pyrroles from ketones, hydroxylamine, and 1,2-dichloroethane'.
- [182] B. A. Trofimov, A. I. Mikhaleva, A. N. Vasil'ev, S. E. Korostova, S. G. Shevchenko, *Chem. Heterocycl. Compd.* **1985**, *21*, 46-49; 'Pyrroles from ketoximes and acetylene. 29. Synthesis of alkylpyrroles from dialkylketoximes and dichloroethane by reaction with KOH-DMSO'.
- [183] B. A. Trofimov, A. S. Atavin, A. I. Mikhaleva, G. A. Kalbin, E. G. Chebotareva, *Zhur. Org. Khim.* **1973**, *9*, 2205.
- [184] B. A. Trofimov, *Russ. Chem. Rev.* **1981**, *50*, 138-150; 'Reactions of acetylene in superbasic media'.
- [185] O. V. Petrova, L. N. Sobenina, A. I. Mikhaleva, *Chem. Heterocycl. Compd.* **2013**, *48*, 1628-1633; '3-Alkyl-2-phenyl-1-vinylpyrroles from ketoximes and acetylene: an improved synthesis by the Trofimov reaction'.
- [186] B. A. Trofimov, *Sulfur reports* **1992**, *11*, 207-227; 'Chalcogenation in Multiphase Superbase Systems'.
- [187] B. A. Trofimov, I. M. Al'bina, E. Y. Schmidt, L. N. Sobenina, 'Chemistry of pyrroles', CRC Press, **2014**.
- [188] W. M. D. Bryant, D. M. Smith, *J. Am. Chem. Soc.* **1935**, *57*, 57-61; 'Improved Hydroxylamine Method for the Determination of Aldehydes and Ketones. Displacement of Oxime Equilibria by Means of Pyridine'.
- [189] A. R. Hajipour, S. E. Mallakpour, G. Imanzadeh, *J. Chem. Res.* **1999**, 228-229; 'A rapid and convenient synthesis of oximes in dry media under microwave irradiation'.
- [190] A. M. Vasil'tsov, E. A. Polubentsev, A. I. Mikhaleva, B. A. Trofimov, *Bull. Acad. Sci. USSR, Div. Chem. Sci.* **1990**, *39*, 773-776; 'Cycloalka[b]pyrroles from ketoximes and acetylene: Synthesis and kinetic investigation'.
- [191] A. M. Vasil'tsov, A. I. Mikhaleva, R. N. Nesterenko, M. V. Sigalov, *Chem. Heterocycl. Compd.* **1992**, *28*, 400-402; 'Alkenylation by 5-hexen-2-one oxime: Prototropic isomerization under trofimov reaction conditions'.
- [192] G. A. Hunter, H. McNab, K. Withell, *Synthesis* **2010**, *2010*, 1707-1711; 'The Meldrum's Acid Route to Prodigiosin Analogues'.
- [193] C. Yu, L. Jiao, X. Tan, J. Wang, Y. Xu, Y. Wu, G. Yang, Z. Wang, E. Hao, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 7688-7691; 'Straightforward acid-catalyzed synthesis of pyrrolyldipyrromethenes'.
- [194] J. Li, Q. Zhang, J. Yin, C. Yu, K. Cheng, Y. Wei, E. Hao, L. Jiao, *Org Lett* **2016**; 'Metal-Free and Versatile Synthetic Routes to Natural and Synthetic Prodiginines from Boron Dipyrin'.
- [195] J. A. van Koeveringe, J. Lugtenburg, *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* **1977**, *96*, 55-57; 'Novel pyrromethenes. 1-Oxygen and 1-sulfur analogues; evidence for photochemical Z-E isomerization'.
- [196] K. Lewis, S. Epstein, A. D'Onofrio, L. L. Ling, *J. Antibiot.* **2010**, *63*, 468-476; 'Uncultured microorganisms as a source of secondary metabolites'.
- [197] M. D. Shepherd, M. K. Kharel, M. A. Bosserman, J. Rohr, *Curr. Protoc. Microbiol.* **2010**; 'Laboratory Maintenance of *Streptomyces* species'.
- [198] E. Angov, C. J. Hillier, R. L. Kincaid, J. A. Lyon, *PLOS One* **2008**, *3*, e2189; 'Heterologous Protein Expression Is Enhanced by Harmonizing the Codon Usage Frequencies of the Target Gene with those of the Expression Host'.
- [199] B. L. Adams, *ACS Synth. Biol.* **2016**, *5*, 1328-1330; 'The Next Generation of Synthetic Biology Chassis: Moving Synthetic Biology from the Laboratory to the Field'.
- [200] L. M. Blank, B. E. Ebert, K. Buehler, B. Bühler, *Antioxid. Redox Signal.* **2010**, *13*, 349-394; 'Redox biocatalysis and metabolism: molecular mechanisms and metabolic network analysis'.

- [201] K. Nelson, C. Weinel, I. Paulsen, R. Dodson, H. Hilbert, V. Martins dos Santos, D. Fouts, S. Gill, M. Pop, M. Holmes, *Environ. Microbiol.* **2002**, *4*, 799-808; 'Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440'.
- [202] X. Wu, S. Monchy, S. Taghavi, W. Zhu, J. Ramos, D. van der Lelie, *FEMS Microbiol. Rev.* **2011**, *35*, 299-323; 'Comparative genomics and functional analysis of niche-specific adaptation in *Pseudomonas putida*'.
- [203] M. Fernández, E. Duque, P. Pizarro-Tobías, P. Van Dillewijn, R. M. Wittich, J. L. Ramos, *Microb. Biotechnol.* **2009**, *2*, 287-294; 'Microbial responses to xenobiotic compounds. Identification of genes that allow *Pseudomonas putida* KT2440 to cope with 2, 4, 6-trinitrotoluene'.
- [204] O. Simon, I. Klaiber, A. Huber, J. Pfannstiel, *J. Proteom.* **2014**, *109*, 212-227; 'Comprehensive proteome analysis of the response of *Pseudomonas putida* KT2440 to the flavor compound vanillin'.
- [205] T. Gong, R. Liu, Z. Zuo, Y. Che, H. Yu, C. Song, C. Yang, *ACS Synth. Biol.* **2016**, *5*, 434-442; 'Metabolic Engineering of *Pseudomonas putida* KT2440 for Complete Mineralization of Methyl Parathion and γ -Hexachlorocyclohexane'.
- [206] A. Loeschcke, A. Markert, S. Wilhelm, A. Wirtz, F. Rosenau, K. E. Jaeger, T. Drepper, *ACS Synth. Biol.* **2013**, *2*, 22-33; 'TREX: A Universal Tool for the Transfer and Expression of Biosynthetic Pathways in Bacteria'.
- [207] A. Domröse, Dissertation, 'Anwendung und Optimierung des TREX-Systems zur effektiven heterologen Sekundärmetabolit-Produktion in *Pseudomonas putida*', Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (Düsseldorf), **2017**.
- [208] A. Loeschcke, Dissertation, 'Funktionelle Koexpression geclusterter Gene in verschiedenen Bakterien mithilfe des TREX-Systems', Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (Düsseldorf), **2012**.
- [209] R. Simon, U. Priefer, A. Pühler, *Nat. Biotechnol.* **1983**, *1*, 784-791; 'A Broad Host Range Mobilization System for *In Vivo* Genetic Engineering: Transposon Mutagenesis in Gram Negative Bacteria'.
- [210] M.-J. Song, J. Bae, D.-S. Lee, C.-H. Kim, J.-S. Kim, S.-W. Kim, S.-I. Hong, *J. Biosci. Bioeng.* **2006**, *101*, 157-161; 'Purification and characterization of prodigiosin produced by integrated bioreactor from *Serratia* sp. KH-95'.
- [211] A. Castro, J. Deck, M. Hugo, L. Williams, M. Zingg, *J. Org. Chem.* **1958**, *23*, 1232-1233; 'Notes. Prodigiosin Hydrochloride'.
- [212] L. E. McDaniel, E. G. Bailey, *Appl. Microbiol.* **1969**, *17*, 286-290; 'Effect of Shaking Speed and Type of Closure on Shake Flask Cultures'.
- [213] J. Büchs, S. Lotter, C. Milbradt, *Biochem. Eng. J.* **2001**, *7*, 135-141; 'Out-of-phase operating conditions, a hitherto unknown phenomenon in shaking bioreactors'.
- [214] T. S. Lankiewicz, M. T. Cottrell, D. L. Kirchman, *The ISME Journal* **2016**, *10*, 823-832; 'Growth rates and rRNA content of four marine bacteria in pure cultures and in the Delaware estuary'.
- [215] M. Bergkessel, D. W. Basta, D. K. Newman, *Nat. Rev. Microbiol.* **2016**, *14*, 549-562; 'The physiology of growth arrest: uniting molecular and environmental microbiology'.
- [216] H. Kobayashi, K. Uematsu, H. Hirayama, K. Horikoshi, *J. Bacteriol.* **2000**, *182*, 6451-6455; 'Novel toluene elimination system in a toluene-tolerant microorganism'.
- [217] T. Baumgarten, S. Sperling, J. Seifert, M. von Bergen, F. Steiniger, L. Y. Wick, H. J. Heipieper, *Appl. Environ. Microbiol.* **2012**, *78*, 6217-6224; 'Membrane vesicle formation as a multiple-stress response mechanism enhances *Pseudomonas putida* DOT-T1E cell surface hydrophobicity and biofilm formation'.
- [218] T. Baumgarten, J. Vazquez, C. Bastisch, W. Veron, M. G. J. Feuilloley, S. Nietzsche, L. Y. Wick, H. J. Heipieper, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2012**, *93*, 837-845; 'Alkanols and chlorophenols

- cause different physiological adaptive responses on the level of cell surface properties and membrane vesicle formation in *Pseudomonas putida* DOT-T1E'.
- [219] C.-W. Choi, E. C. Park, S. H. Yun, S.-Y. Lee, Y. G. Lee, Y. Hong, K. R. Park, S.-H. Kim, G.-H. Kim, S. I. Kim, *J. Proteome Res.* **2014**, *13*, 4298-4309; 'Proteomic Characterization of the Outer Membrane Vesicle of *Pseudomonas putida* KT2440'.
- [220] H. Beuttler, J. Hoffmann, M. Jeske, B. Hauer, R. D. Schmid, J. Altenbuchner, V. B. Urlacher, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, *89*, 1137-1147; 'Biosynthesis of zeaxanthin in recombinant *Pseudomonas putida*'.
- [221] C.-H. Kim, S.-W. Kim, S.-I. Hong, *Process Biochem.* **1999**, *35*, 485-490; 'An integrated fermentation–separation process for the production of red pigment by *Serratia* sp. KH-95'.
- [222] J. Bae, H. Moon, K.-K. Oh, C.-H. Kim, D. Sil Lee, S.-W. Kim, S.-I. Hong, *Biotechnol. Lett.* **2001**, *23*, 1315-1319; 'A novel bioreactor with an internal adsorbent for integrated fermentation and recovery of prodigiosin-like pigment produced from *Serratia* sp. KH-95'.
- [223] X. Wang, J. Tao, D. Wei, Y. Shen, W. Tong, *Biotechnol. Appl. Biochem.* **2004**, *40*, 277-280; 'Development of an adsorption procedure for the direct separation and purification of prodigiosin from culture broth'.
- [224] R.-S. Juang, C.-L. Yeh, *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **2014**, *19*, 159-168; 'Adsorptive recovery and purification of prodigiosin from methanol/water solutions of *Serratia marcescens* fermentation broth'.
- [225] D. J. Heyes, A. V. Ruban, C. N. Hunter, *Biochemistry* **2003**, *42*, 523-528; 'Protochlorophyllide Oxidoreductase: “Dark” Reactions of a Light-Driven Enzyme'.
- [226] H. Heipieper, J. De Bont, *Appl. Environ. Microbiol.* **1994**, *60*, 4440-4444; 'Adaptation of *Pseudomonas putida* S12 to ethanol and toluene at the level of fatty acid composition of membranes'.
- [227] S. W. Jacob, D. C. Wood, *Am. J. Surgery* **1967**, *114*, 414-426; 'Dimethyl sulfoxide (DMSO) toxicology, pharmacology, and clinical experience'.
- [228] G. Storz, R. Hengge, 'Bacterial stress responses', American Society for Microbiology Press, **2010**.
- [229] R. Simon, M. O'Connell, M. Labes, A. Pühler, *Methods Enzymol.* **1986**, *118*, 640-659; 'Plasmid vectors for the genetic analysis and manipulation of *rhizobia* and other gram-negative bacteria'.
- [230] A. K. Ghose, G. M. Crippen, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **1987**, *27*, 21-35; 'Atomic physicochemical parameters for three-dimensional-structure-directed quantitative structure-activity relationships. 2. Modeling dispersive and hydrophobic interactions'.
- [231] T. Fujita, J. Iwasa, C. Hansch, *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, *86*, 5175-5180; 'A New Substituent Constant, π , Derived from Partition Coefficients'.
- [232] A. J. Leo, C. Hansch, *Perspect. Drug Discovery Des.* **1999**, *17*, 1-25; 'Role of hydrophobic effects in mechanistic QSAR'.
- [233] S. A. Dauenhauer, R. A. Hull, R. P. Williams, *J. Bacteriol.* **1984**, *158*, 1128-1132; 'Cloning and expression in *Escherichia coli* of *Serratia marcescens* genes encoding prodigiosin biosynthesis'.
- [234] V. Singh, S. Haque, R. Niwas, A. Srivastava, M. Pasupuleti, C. K. M. Tripathi, *Front. Microbiol.* **2017**, *7*; 'Strategies for Fermentation Medium Optimization: An In-Depth Review'.
- [235] S. Gupta, V. Lakshmanan, B. S. Kim, R. Fecik, K. A. Reynolds, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 1609-1616; 'Generation of Novel Pikromycin Antibiotic Products Through Mutasynthesis'.
- [236] A. Kimbaris, G. Varvounis, *Tetrahedron* **2000**, *56*, 9675-9682; 'Reduction of 2- and 3-Acylpyrroles. A New Synthesis of the Pyrrolo[1,2-*b*]cinnolin-10-one Ring System from 1-(4-Methylphenyl)sulfonyl-1*H*-pyrrole'.
- [237] S. Gracia, J. Schulz, S. Pellet-Rostaing, M. Lemaire, *Synlett* **2008**, *2008*, 1852-1856; 'Synthesis of New Pyrrolobenzazepines via Pictet-Spengler Cyclization'.

- [238] A. Treibs, H. Scherer, *Liebigs Ann.* **1952**, 577, 139-146; 'Reduktionen mit Lithium-aluminiumhydrid in der Pyrrol-Reihe. Di-alkylpyrrol-methane und Polymethane'.
- [239] A. Treibs, H. Derra-Scherer, *Liebigs Ann.* **1954**, 589, 188-195; 'Reduktionen mit Lithium-aluminiumhydrid in der Pyrrol-Reihe, 2. Mitteilung'.
- [240] N. Kishner, *J. Russ. Phys.-Chem. Soc.* **1911**, 43, 582-595; 'Wolff-Kishner reduction; Huang-Minlon modification'.
- [241] L. Wolff, *Eur. J. Org. Chem.* **1912**, 394, 86-108; 'Chemischen Institut der Universität Jena: Methode zum Ersatz des Sauerstoffatoms der Ketone und Aldehyde durch Wasserstoff. [I. Abhandlung.]'.
- [242] J. A. Joule, K. Mills, 'Heterocyclic Chemistry', John Wiley & Sons, **2010**.
- [243] C. W. Chiu, L. H. Lee, C. Y. Wang, G. T. Bryan, *Mutat. Res.* **1978**, 58, 11-22; 'Mutagenicity of some commercially available nitro compounds for *Salmonella typhimurium*'.
- [244] P. A. Escobar, R. A. Kemper, J. Tarca, J. Nicolette, M. Kenyon, S. Glowienke, S. G. Sawant, J. Christensen, T. E. Johnson, C. McKnight, G. Ward, S. M. Galloway, L. Custer, E. Gocke, M. R. O'Donovan, K. Braun, R. D. Snyder, B. Mahadevan, *Mutat. Res., Rev. Mutat. Res.* **2013**, 752, 99-118; 'Bacterial mutagenicity screening in the pharmaceutical industry'.
- [245] N. Kobayashi, Y. Ichikawa, *Microbiol. Immunol.* **1989**, 33, 257-263; 'A Protein Associated with Prodigiosin Formation in *Serratia marcescens*'.
- [246] A. Krogh, B. Larsson, G. von Heijne, E. L. L. Sonnhammer, *J. Mol. Biol.* **2001**, 305, 567-580; 'Predicting transmembrane protein topology with a hidden markov model: application to complete genomes'.
- [247] N. Sapay, Y. Guermeur, G. Deléage, *BMC Bioinf.* **2006**, 7, 255; 'Prediction of amphipathic in-plane membrane anchors in monotopic proteins using a SVM classifier'.
- [248] A. J. de Jesus, T. W. Allen, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembranes* **2013**, 1828, 864-876; 'The role of tryptophan side chains in membrane protein anchoring and hydrophobic mismatch'.
- [249] Katheryn M. Sanchez, G. Kang, B. Wu, Judy E. Kim, *Biophys. J.* **2011**, 100, 2121-2130; 'Tryptophan-Lipid Interactions in Membrane Protein Folding Probed by Ultraviolet Resonance Raman and Fluorescence Spectroscopy'.
- [250] A. Giannis, K. Sandhoff, *Tetrahedron Lett.* **1985**, 26, 1479-1482; 'Stereoselective synthesis of α -C-allyl-glycopyranosides'.
- [251] S. Manzini, A. Poater, D. J. Nelson, L. Cavallo, A. M. Z. Slawin, S. P. Nolan, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, 53, 8995-8999; 'Insights into the Decomposition of Olefin Metathesis Precatalysts'.
- [252] K. B. Sharpless, W. Amberg, Y. L. Bennani, G. A. Crispino, J. Hartung, K. S. Jeong, H. L. Kwong, K. Morikawa, Z. M. Wang, *J. Org. Chem.* **1992**, 57, 2768-2771; 'The osmium-catalyzed asymmetric dihydroxylation: a new ligand class and a process improvement'.
- [253] M. H. Junttila, O. O. E. Hormi, *J. Org. Chem.* **2009**, 74, 3038-3047; 'Methanesulfonamide: a Cosolvent and a General Acid Catalyst in Sharpless Asymmetric Dihydroxylations'.
- [254] D. F. Taber, K. J. Frankowski, *J. Chem. Educ.* **2006**, 83, 283; 'Grubbs's Cross Metathesis of Eugenol with *cis*-2-Butene-1,4-diol To Make a Natural Product. An Organometallic Experiment for the Undergraduate Lab'.
- [255] C. R. Harwood, *Bacillus subtilis* as a Model for Bacterial Systems Biology, in *eLS*, John Wiley & Sons, Ltd, **2001**.
- [256] A. Burkovski, *Arch. Microbiol.* **2003**, 179, 83-88; 'I do it my way: regulation of ammonium uptake and ammonium assimilation in *Corynebacterium glutamicum*'.
- [257] A. Burkovski, 'Corynebacteria: genomics and molecular biology', Horizon Scientific Press, **2008**.
- [258] A. Burkovski, 'Corynebacterium glutamicum: from systems biology to biotechnological applications', Caister Academic Press Norfolk, **2015**.

- [259] M. Seidel, L. J. Alderwick, H. Sahm, G. S. Besra, L. Eggeling, *Glycobiology* **2007**, *17*, 210-219; 'Topology and mutational analysis of the single Emb arabinofuranosyltransferase of *Corynebacterium glutamicum* as a model of Emb proteins of *Mycobacterium tuberculosis*'.
- [260] J. Krawczyk, T. A. Kohl, A. Goesmann, J. Kalinowski, J. Baumbach, *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, e97; 'From *Corynebacterium glutamicum* to *Mycobacterium tuberculosis*—towards transfers of gene regulatory networks and integrated data analyses with MycoRegNet'.
- [261] D. McDougald, J. Klebensberger, T. Tolker-Nielsen, J. S. Webb, T. Conibear, S. A. Rice, S. M. Kirov, C. Matz, S. Kjelleberg, *Pseudomonas aeruginosa: A Model for Biofilm Formation*, in *Pseudomonas*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, **2008**, pp. 215-253.
- [262] E. A. du Toit, M. Rautenbach, *J. Microbiol. Methods* **2000**, *42*, 159-165; 'A sensitive standardised micro-gel well diffusion assay for the determination of antimicrobial activity'.
- [263] M. Rautenbach, G. D. Gerstner, N. M. Vlok, J. Kulenkampff, H. V. Westerhoff, *Anal. Biochem.* **2006**, *350*, 81-90; 'Analyses of dose–response curves to compare the antimicrobial activity of model cationic α -helical peptides highlights the necessity for a minimum of two activity parameters'.
- [264] E. Marchal, M. I. Uddin, D. A. Smithen, C. L. A. Hawco, M. Lanteigne, D. P. Overy, R. G. Kerr, A. Thompson, *RSC Adv.* **2013**, *3*, 22967-22971; 'Antimicrobial activity of non-natural prodigiosenes'.
- [265] H. Soule, J. Vazquez, A. Long, S. Albert, M. Brennan, *J. Natl. Cancer Inst.* **1973**, *51*, 1409-1416; 'A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma 2'.
- [266] D. L. Holliday, V. Speirs, *Breast Cancer Res.* **2011**, *13*, 215-215; 'Choosing the right cell line for breast cancer research'.
- [267] H. R. Pugsley, *Methods* **2017**, *112*, 147-156; 'Quantifying autophagy: Measuring LC3 puncta and autolysosome formation in cells using multispectral imaging flow cytometry'.
- [268] L. Wang, M. Chen, J. Yang, Z. Zhang, *Autophagy* **2013**, *9*, 756-769; 'LC3 fluorescent puncta in autophagosomes or in protein aggregates can be distinguished by FRAP analysis in living cells'.
- [269] H. Xu, L. Laraia, L. Schneider, K. Louven, C. Strohmam, A. P. Antonchick, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **2017**, *129*, 11384-11388; 'Highly Enantioselective Catalytic Vinylogous Propargylation of Coumarins Yields a Class of Autophagy Inhibitors'; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 11232-11236; 'Highly Enantioselective Catalytic Vinylogous Propargylation of Coumarins Yields a Class of Autophagy Inhibitors'.
- [270] T. Kimura, Y. Takabatake, A. Takahashi, Y. Isaka, *Cancer Res.* **2013**, *73*, 3-7; 'Chloroquine in Cancer Therapy: A Double-Edged Sword of Autophagy'.
- [271] S. Pankiv, T. H. Clausen, T. Lamark, A. Brech, J.-A. Bruun, H. Outzen, A. Øvervatn, G. Bjørkøy, T. Johansen, *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 24131-24145; 'p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy'.
- [272] L. Laraia, K. Ohsawa, G. Konstantinidis, L. Robke, Y.-W. Wu, K. Kumar, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **2017**, *129*, 2177-2182; 'Discovery of Novel Cinchona-Alkaloid-Inspired Oxazastane Autophagy Inhibitors'; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 2145-2150; 'Discovery of Novel Cinchona-Alkaloid-Inspired Oxazastane Autophagy Inhibitors'.
- [273] M. H. Kang, C. P. Reynolds, *Clin. Cancer Res.* **2009**, *15*, 1126-1132; 'Bcl-2 Inhibitors: Targeting Mitochondrial Apoptotic Pathways in Cancer Therapy'.
- [274] S. M. O'Brien, D. F. Claxton, M. Crump, S. Faderl, T. Kipps, M. J. Keating, J. Viallet, B. D. Cheson, *Blood* **2009**, *113*, 299-305; 'Phase I study of obatoclax mesylate (GX15-070), a small molecule pan-Bcl-2 family antagonist, in patients with advanced chronic lymphocytic leukemia'.
- [275] M.-C. Tang, Y. Zou, K. Watanabe, C. T. Walsh, Y. Tang, *Chem. Rev.* **2016**; 'Oxidative Cyclization in Natural Product Biosynthesis'.

- [276] S. D. Bruner, *Nat. Chem.* **2011**, *3*, 342-343; 'Enzyme catalysis C-H activation is a Reiske business'.
- [277] T. Konomi, S. Herchen, J. E. Baldwin, M. Yoshida, N. A. Hunt, A. L. Demain, *Biochem. J.* **1979**, *184*, 427-430; 'Cell-free conversion of δ -(L- α -aminoadipyl)-L-cysteinyl-D-valine into an antibiotic with the properties of isopenicillin N in *Cephalosporium acremonium*'.
- [278] H. Seto, T. Hidaka, T. Kuzuyama, S. Shibahara, T. Usui, O. Sakanaka, S. Imai, *J. Antibiot.* **1991**, *44*, 1286-1288; 'Studies on the biosynthesis of fosfomycin'.
- [279] F. Hammerschmidt, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1991**, 1993-1996; 'Biosynthesis of natural products with a P-C bond. Part 8: on the origin of the oxirane oxygen atom of fosfomycin in *Streptomyces fradiae*'.
- [280] K. Zerbe, K. Woithe, D. B. Li, F. Vitali, L. Bigler, J. A. Robinson, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 6709-6713; 'An Oxidative Phenol Coupling Reaction Catalyzed by OxyB, a Cytochrome P450 from the Vancomycin-Producing Microorganism'; *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 6877-6881; 'An Oxidative Phenol Coupling Reaction Catalyzed by OxyB, a Cytochrome P450 from the Vancomycin-Producing Microorganism'.
- [281] A. Fürstner, K. Radkowski, H. Peters, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 2837-2841; 'Chasing a Phantom by Total Synthesis: The Butylcycloheptylprodigiosin Case'.
- [282] B. M. Trost, G. A. Doherty, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 3801-3810; 'An Asymmetric Synthesis of the Tricyclic Core and a Formal Total Synthesis of Roseophilin via an Enyne Metathesis'.
- [283] T. Mochizuki, E. Itoh, N. Shibata, S. Nakatani, T. Katoh, S. Terashima, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 6911-6914; 'Studies toward the total synthesis of antibiotic roseophilin: A novel synthesis of the macrotricyclic part'.
- [284] J. S. Yadav, B. V. S. Reddy, G. Kondaji, R. S. Rao, S. P. Kumar, *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 8133-8135; 'Zinc-mediated acylation and sulfonation of pyrrole and its derivatives'.
- [285] J. S. Yadav, B. V. S. Reddy, P. M. Reddy, C. Srinivas, *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 5185-5187; 'Zinc-mediated Barbier reactions of pyrrole and indoles: a new method for the alkylation of pyrrole and indoles'.
- [286] H. H. Wasserman, G. C. Rodgers, D. D. Keith, *Tetrahedron* **1976**, *32*, 1851-1854; 'Undecylprodigiosin'.
- [287] B. Oddo, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1910**, *43*, 1012-1021; 'Synthesen mittels Magnesium-Pyrrol-Verbindungen. II. Mitteilung: Alkyl-Pyrryl-Ketone'.
- [288] M. G. Reinecke, H. W. Johnson, J. F. Sebastian, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2859-2860; 'The Structure of the Pyrrole Grignard Reagent'.
- [289] A. J. Castro, J. F. Deck, N. C. Ling, J. P. Marsh Jr, G. E. Means, *J. Org. Chem.* **1965**, *30*, 344-350; 'Alkylation Reactions of the Pyrrole Grignard Reagent'.
- [290] K. Schofield, K. Schofield, 'Hetero-aromatic nitrogen compounds: pyrroles and pyridines', Butterworths London, **1967**.
- [291] A. Fürstner, H. Szillat, B. Gabor, R. Mynott, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 8305-8314; 'Platinum- and Acid-Catalyzed Enyne Metathesis Reactions: Mechanistic Studies and Applications to the Syntheses of Streptorubin B and Metacycloprodigiosin'.
- [292] B. Sevcikova, J. Kormanec, *Arch. Microbiol.* **2004**, *181*, 384-389; 'Differential production of two antibiotics of *Streptomyces coelicolor* A3(2), actinorhodin and undecylprodigiosin, upon salt stress conditions'.
- [293] S. D. Bentley, K. F. Chater, A. M. Cerdeno-Tarraga, G. L. Challis, N. R. Thomson, K. D. James, D. E. Harris, M. A. Quail, H. Kieser, D. Harper, A. Bateman, S. Brown, G. Chandra, C. W. Chen, M. Collins, A. Cronin, A. Fraser, A. Goble, J. Hidalgo, T. Hornsby, S. Howarth, C. H. Huang, T. Kieser, L. Larke, L. Murphy, K. Oliver, S. O'Neil, E. Rabbinowitsch, M. A. Rajandream, K. Rutherford, S. Rutter, K. Seeger, D. Saunders, S. Sharp, R. Squares, S. Squares, K. Taylor, T. Warren, A.

- Wietzorrek, J. Woodward, B. G. Barrell, J. Parkhill, D. A. Hopwood, *Nature* **2002**, *417*, 141-147; 'Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2)'.
- [294] E. Angov, P. M. Legler, R. M. Mease, Adjustment of Codon Usage Frequencies by Codon Harmonization Improves Protein Expression and Folding, in *Heterologous Gene Expression in E. coli: Methods and Protocols* (Eds.: J. T. C. Evans, M.-Q. Xu), Humana Press, Totowa, NJ, **2011**, pp. 1-13.
- [295] M. Fuhrmann, A. Hausherr, L. Ferbitz, T. Schödl, M. Heitzer, P. Hegemann, *Plant Mol. Biol.* **2004**, *55*, 869-881; 'Monitoring dynamic expression of nuclear genes in *Chlamydomonas reinhardtii* by using a synthetic luciferase reporter gene'.
- [296] P. M. Sharp, W. H. Li, *Nucleic Acids Res.* **1987**, *15*, 1281-1295; 'The codon Adaptation Index - a measure of directional synonymous codon usage bias, and its potential applications'.
- [297] S. Costa, A. Almeida, A. Castro, L. Domingues, *Front. Microbiol.* **2014**, *5*, 63; 'Fusion tags for protein solubility, purification and immunogenicity in *Escherichia coli*: the novel Fh8 system'.
- [298] W. Lovenberg, B. E. Sobel, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1965**, *54*, 193-199; 'Rubredoxin: a new electron transfer protein from *Clostridium pasteurianum*'.
- [299] G. Hagelueken, L. Wiehlmann, T. M. Adams, H. Kolmar, D. W. Heinz, B. Tümmler, W.-D. Schubert, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2007**, *104*, 12276-12281; 'Crystal structure of the electron transfer complex rubredoxin-rubredoxin reductase of *Pseudomonas aeruginosa*'.
- [300] I. Mathieu, J. Meyer, J. M. Moulis, *Biochem. J.* **1992**, *285*, 255-262; 'Cloning, sequencing and expression in *Escherichia coli* of the rubredoxin gene from *Clostridium pasteurianum*'.
- [301] B. M. Kohli, C. Ostermeier, *PREP* **2003**, *28*, 362-367; 'A Rubredoxin based system for screening of protein expression conditions and on-line monitoring of the purification process'.
- [302] C. J. C. Whitehouse, S. G. Bell, L.-L. Wong, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 1218-1260; 'P450_{BM3} (CYP102A1): connecting the dots'.
- [303] R. B. Kapust, D. S. Waugh, *Protein Sci.* **1999**, *8*, 1668-1674; '*Escherichia coli* maltose-binding protein is uncommonly effective at promoting the solubility of polypeptides to which it is fused'.
- [304] J. D. Fox, D. S. Waugh, Maltose-Binding Protein as a Solubility Enhancer, in *E. coli Gene Expression Protocols* (Ed.: P. E. Vaillancourt), Humana Press, Totowa, NJ, **2003**, pp. 99-117.
- [305] D. M. Withall, Dissertation, 'Mechanistic investigation of the RedG-catalysed oxidative carbocyclisation of undecylprodigiosin to streptorubin B', University of Warwick (Warwick), **2014**.
- [306] D. C. Lamb, T. Skaug, H. L. Song, C. J. Jackson, L. M. Podust, M. R. Waterman, D. B. Kelly, S. L. Kelly, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 24000-24005; 'The cytochrome P450 complement (CYPome) of *Streptomyces coelicolor* A3(2)'.
- [307] Y. J. Chun, T. Shimada, R. Sanchez-Ponce, M. V. Martin, L. Lei, B. Zhao, S. L. Kelly, M. R. Waterman, D. C. Lamb, F. P. Guengerich, *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 17486-17500; 'Electron transport pathway for a *Streptomyces* Cytochrome P450: Cytochrome P450 105D5-catalyzed fatty acid hydroxylation in *Streptomyces coelicolor* A3(2)'.
- [308] K. Pruitt, G. Brown, T. Tatusova, D. Maglott, *The NCBI Handbook* **2002**; 'Chapter 18: The Reference Sequence (RefSeq) Database'.
- [309] J. S. Lee, Y. S. Kim, S. Park, J. Kim, S. J. Kang, M. H. Lee, S. Ryu, J. M. Choi, T. K. Oh, J. H. Yoon, *Appl. Environ. Microbiol.* **2011**, *77*, 4967-4973; 'Exceptional production of both prodigiosin and cycloprodigiosin as major metabolic constituents by a novel marine bacterium, *Zooshikella rubidus* S1-1'.
- [310] H. Brown, B. C. Rao, *J. Org. Chem.* **1957**, *22*, 1137-1138; 'Communications - Selective Conversion of Olefins into Organoboranes Through Competitive Hydroboration, Isomerization and Displacement Reactions'.

- [311] H. C. Brown, G. Zweifel, *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, *81*, 247-247; 'A stereospecific *cis* hydration of the double bond in cyclic derivatives'.
- [312] M. R. Hayes, J. Pietruszka, *Molecules* **2017**, *22*, 1434; 'Synthesis of Glycosides by Glycosynthases'.
- [313] E. Marchal, C. Figliola, A. Thompson, *Org. Biomol. Chem.* **2017**; 'Prodigiosenes conjugated to tamoxifen and estradiol'.
- [314] M. Morita, E. Sawa, K. Yamaji, T. Sakai, T. Natori, Y. Koezuka, H. Fukushima, K. Akimoto, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1996**, *60*, 288-292; 'Practical Total Synthesis of (2*S*,3*S*,4*R*)-1-*O*-(α -D-Galactopyranosyl)-*N*-hexacosanoyl-2-amino-1,3,4-octadecanetriol, the Antitumoral and Immunostimulatory α -Galactosylceramide, KRN7000'.
- [315] E. J. Corey, J. O. Link, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 1906-1908; 'A general, catalytic, and enantioselective synthesis of α -amino acids'.
- [316] Y. G. Gololobov, L. F. Kasukhin, *Tetrahedron* **1992**, *48*, 1353-1406; 'Recent advances in the Staudinger reaction'.
- [317] A. Kamal, K. V. Ramana, H. B. Ankati, A. V. Ramana, *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 6861-6863; 'Mild and efficient reduction of azides to amines: synthesis of fused [2,1-*b*]quinazolinones'.
- [318] I. Moraes, G. Evans, J. Sanchez-Weatherby, S. Newstead, P. D. S. Stewart, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembranes* **2014**, *1838*, 78-87; 'Membrane protein structure determination — The next generation'.
- [319] S. Rawson, S. Davies, J. D. Lippiat, S. P. Muench, *Mol. Membr. Biol.* **2016**, *33*, 12-22; 'The changing landscape of membrane protein structural biology through developments in electron microscopy'.
- [320] K. R. Vinothkumar, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2015**, *33*, 103-114; 'Membrane protein structures without crystals, by single particle electron cryomicroscopy'.
- [321] A. Merk, A. Bartesaghi, S. Banerjee, V. Falconieri, P. Rao, M. I. Davis, R. Pragani, M. B. Boxer, L. A. Earl, J. L. S. Milne, S. Subramaniam, *Cell* **2016**, *165*, 1698-1707; 'Breaking Cryo-EM Resolution Barriers to Facilitate Drug Discovery'.
- [322] U. T. Bornscheuer, M. Pohl, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2001**, *5*, 137-143; 'Improved biocatalysts by directed evolution and rational protein design'.
- [323] T. W. Johannes, H. Zhao, *Curr. Opin. Microbiol.* **2006**, *9*, 261-267; 'Directed evolution of enzymes and biosynthetic pathways'.
- [324] A. V. Shivange, J. Marienhagen, H. Mundhada, A. Schenk, U. Schwaneberg, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2009**, *13*, 19-25; 'Advances in generating functional diversity for directed protein evolution'.
- [325] N. J. Turner, *Nat. Chem. Biol.* **2009**, *5*, 567-573; 'Directed evolution drives the next generation of biocatalysts'.
- [326] J. S. Papadopoulos, R. Agarwala, *Bioinformatics* **2007**, *23*, 1073-1079; 'COBALT: constraint-based alignment tool for multiple protein sequences'.
- [327] C. Burke, T. Thomas, S. Egan, S. Kjelleberg, *Environ. Microbiol.* **2007**, *9*, 814-818; 'The use of functional genomics for the identification of a gene cluster encoding for the biosynthesis of an antifungal tambjamine in the marine bacterium *Pseudoalteromonas tunicata*'.
- [328] P. I. Hernandez, D. Moreno, A. A. Javier, T. Torroba, R. Perez-Tomas, R. Quesada, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 1556-1558; 'Tambjamine alkaloids and related synthetic analogs: efficient transmembrane anion transporters'.
- [329] J. Kennedy, B. Flemer, S. A. Jackson, D. P. H. Lejon, J. P. Morrissey, F. O'Gara, A. D. W. Dobson, *Mar. Drugs* **2010**, *8*, 608-628; 'Marine Metagenomics: New Tools for the Study and Exploitation of Marine Microbial Metabolism'.

- [330] A. Tchigvintsev, H. Tran, A. Popovic, F. Kovacic, G. Brown, R. Flick, M. Hajjghasemi, O. Egorova, J. C. Somody, D. Tchigvintsev, A. Khusnutdinova, T. N. Chernikova, O. V. Golyshina, M. M. Yakimov, A. Savchenko, P. N. Golyshin, K.-E. Jaeger, A. F. Yakunin, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2015**, *99*, 2165-2178; 'The environment shapes microbial enzymes: five cold-active and salt-resistant carboxylesterases from marine metagenomes'.
- [331] S. Thies, S. C. Rausch, F. Kovacic, A. Schmidt-Thaler, S. Wilhelm, F. Rosenau, R. Daniel, W. Streit, J. Pietruszka, K.-E. Jaeger, *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 27035; 'Metagenomic discovery of novel enzymes and biosurfactants in a slaughterhouse biofilm microbial community'.
- [332] B.-J. Yoon, *Curr. Genomics* **2009**, *10*, 402-415; 'Hidden Markov Models and their Applications in Biological Sequence Analysis'.
- [333] J. E. Frew, H. A. O. Hill, *FEBS J.* **1988**, *172*, 261-269; 'Direct and indirect electron transfer between electrodes and redox proteins'.
- [334] T. S. Wong, U. Schwaneberg, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2003**, *14*, 590-596; 'Protein engineering in bioelectrocatalysis'.
- [335] S. Shleev, J. Tkac, A. Christenson, T. Ruzgas, A. I. Yaropolov, J. W. Whittaker, L. Gorton, *Biosens. Bioelectron.* **2005**, *20*, 2517-2554; 'Direct electron transfer between copper-containing proteins and electrodes'.
- [336] W. A. Kibbe, *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, W43-46; 'OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator'.
- [337] K. Miyazaki, *Methods Enzymol* **2011**, *498*, 399-406; 'MEGAWHOP cloning: a method of creating random mutagenesis libraries via megaprimer PCR of whole plasmids'.
- [338] D. G. Gibson, Enzymatic Assembly of Overlapping DNA Fragments, in *Methods Enzymol.*, Vol. 498 (Ed.: V. Christopher), Academic Press, **2011**, pp. 349-361.
- [339] F. Sanger, S. Nicklen, A. R. Coulson, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1977**, *74*, 5463-5467; 'DNA sequencing with chain-terminating inhibitors'.
- [340] P. R. Burkholder, N. H. Giles, Jr., *Am. J. Bot.* **1947**, *34*, 345-348; 'Induced biochemical mutations in *Bacillus subtilis*'.
- [341] V. Barbe, S. Cruveiller, F. Kunst, P. Lenoble, G. Meurice, A. Sekowska, D. Vallenet, T. Wang, I. Moszer, C. Medigue, A. Danchin, *Microbiology* **2009**, *155*, 1758-1775; 'From a consortium sequence to a unified sequence: the *Bacillus subtilis* 168 reference genome a decade later'.
- [342] S. Abe, K.-I. Takayama, S. Kinoshita, *J. Gen. Appl. Microbiol.* **1967**, *13*, 279-301; 'Taxonomical studies on glutamic acid-producing bacteria'.
- [343] F. W. Studier, B. A. Moffatt, *J. Mol. Biol.* **1986**, *189*, 113-130; 'Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes'.
- [344] D. Hanahan, *J. Mol. Biol.* **1983**, *166*, 557-580; 'Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids'.
- [345] F. R. Bloom, B. J. Schmidt, J. J. Lin, *United States Patent US6,709,852 B1* **2011**; 'Rapid growing microorganisms for biotechnology applications'.
- [346] W. Migula, '*Pseudomonas aeruginosa* (Schröter) Migula', Jena, **1900**.
- [347] H. J. Kutzner, S. A. Waksman, *J. Bacteriol.* **1959**, *78*, 528-538; '*Streptomyces coelicolor* Müller and *Streptomyces violaceoruber* Waksman and Curtis, two distinctly different organisms'.
- [348] V. B. D. Skerman, V. McGowan, P. H. A. Sneath, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **1980**, *30*, 225-420; 'Approved Lists of Bacterial Names'.
- [349] A. J. F. Rosenbach, 'Mikro-Organismen bei den Wund-Infektions-Krankheiten des Menschen', J. F. Bergmann, **1884**.
- [350] H. Schägger, *Nat. Protoc.* **2006**, *1*, 16-22; 'Tricine-SDS-PAGE'.
- [351] A. Hantzsch, J. H. Weber, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1887**, *20*, 3118-3132; 'Ueber Verbindungen des Thiazols (Pyridins der Thiophenreihe)'.

- [352] O. Widman, *J. prakt. Chem.* **1888**, 38, 185-201; 'Zur Nomenclatur der Verbindungen, welche Stickstoffkerne enthalten'.
- [353] W. H. Powell, *Pure Appl. Chem.* **1993**, 65, 1357-1455; 'Revised nomenclature for radicals, ions, radical ions and related species (IUPAC Recommendations 1993)'.
- [354] K. Durchschein, B. Ferreira-da Silva, S. Wallner, P. Macheroux, W. Kroutil, S. M. Glueck, K. Faber, *Green Chem.* **2010**, 12, 616-619; 'The flavoprotein-catalyzed reduction of aliphatic nitro-compounds represents a biocatalytic equivalent to the Nef-reaction'.
- [355] A. Poirel, A. De Nicola, P. Retailleau, R. Ziessel, *J. Org. Chem.* **2012**, 77, 7512-7525; 'Oxidative coupling of 1,7,8-unsubstituted BODIPYs: synthesis and electrochemical and spectroscopic properties'.
- [356] D. Dhanak, C. B. Reese, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1987**, 2829-2832; 'Synthesis of [6](2,4)pyridinophanes'.
- [357] B. Schmidt, S. Krehl, E. Jablowski, *Org. Biomol. Chem.* **2012**, 10, 5119-5130; 'Assisted tandem catalytic RCM-aromatization in the synthesis of pyrroles and furans'.
- [358] A. R. Katritzky, S. Ledoux, S. K. Nair, *J. Org. Chem.* **2003**, 68, 5728-5730; 'Benzannulation of 3-Substituted Pyrroles to Indoles'.
- [359] J. W. Huffman, V. J. Smith, L. W. Padgett, *Tetrahedron* **2008**, 64, 2104-2112; 'Acylation of *N-p*-toluenesulfonylpyrrole under Friedel–Crafts conditions: evidence for organoaluminum intermediates'.
- [360] M. Kakushima, P. Hamel, R. Frenette, J. Rokach, *J. Org. Chem.* **1983**, 48, 3214-3219; 'Regioselective synthesis of Acylpyrroles'.
- [361] Y. He, M. Lin, Z. Li, X. Liang, G. Li, J. C. Antilla, *Org. Lett.* **2011**, 13, 4490-4493; 'Direct Synthesis of Chiral 1,2,3,4-Tetrahydropyrrolo[1,2-*a*]pyrazines via a Catalytic Asymmetric Intramolecular Aza-Friedel–Crafts Reaction'.
- [362] D. M. Hodgson, M. W. P. Bebbington, P. Willis, *Org. Biomol. Chem.* **2003**, 1, 3787-3798; 'Development of two processes for the synthesis of bridged azabicyclic systems: intermolecular radical addition-homoallylic rearrangements leading to 2-azanorborn-5-enes and neophyl-type radical rearrangements to 2-azabenzonorbornanes'.
- [363] D. O. A. Garrido, G. Buldain, M. I. Ojea, B. Frydman, *J. Org. Chem.* **1988**, 53, 403-407; 'Synthesis of 2-alkylputrescines from 3-alkylpyrroles'.
- [364] K. R. Law, C. S. McErlean, *Chemistry* **2013**, 19, 15852-15855; 'Extending the Stetter reaction with 1,6-acceptors'.
- [365] A. Morgenstern, Dissertation, 'Induktion neuer Prodigiosin-Derivate in *Streptomyces coelicolor* M145 durch Kobaltionen-Stress', Friedrich-Schiller-Universität Jena (Jena), **2013**.
- [366] M. Böttger, B. Wiegmann, S. Schaumburg, P. G. Jones, W. Kowalsky, H. H. Johannes, *Beilstein J. Org. Chem.* **2012**, 8, 1037-1047; 'Synthesis of new pyrrole-pyridine-based ligands using an in situ Suzuki coupling method'.
- [367] I. D. Arthaud, F. A. Rodrigues, P. C. Jimenez, R. C. Montenegro, A. L. Angelim, V. M. Maciel, E. R. Silveira, H. P. Freitas, T. S. Sousa, O. D. Pessoa, T. M. Lotufo, L. V. Costa-Lotufo, *Chem. Biodiversity* **2012**, 9, 418-427; 'Studies on the secondary metabolites of a *Pseudoalteromonas* sp. isolated from sediments collected at the northeastern coast of Brazil'.
- [368] K. Levenberg, *Q. Appl. Math.* **1944**, 2, 164-168; 'A method for the solution of certain non-linear problems in least squares'.
- [369] D. W. Marquardt, *J. Soc. Ind. Appl. Math.* **1963**, 11, 431-441; 'An Algorithm for Least-Squares Estimation of Nonlinear Parameters'.
- [370] M. C. Reed, A. Lieb, H. F. Nijhout, *BioEssays* **2010**, 32, 422-429; 'The biological significance of substrate inhibition: A mechanism with diverse functions'.

9 Danksagung

Mein erster Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Jörg Pietruszka. Er ermöglichte mir nicht nur mein erwünschtes Thema an der Schnittstelle zwischen der Organischen Chemie und der Biotechnologie, sondern brachte mir auch die viele Freiheit und das Vertrauen entgegen, den Grundstein in dem Themenfeld der Prodiginine nach meinen eigenen Vorstellungen zu prägen. Seine unerschöpfliche Begeisterung für das Thema und seine Unterstützung motivierten für das tiefe sowie facettenreiche Eintauchen in die farbenfrohe Welt der Prodiginine und gaben mir auch in schwierigen Projektphasen den nötigen Rückhalt. Nicht weniger dankbar bin ich für die Möglichkeit, dass ich auch abseits dieses Kernthemas meine Fußabdrücke in der Ausbildung junger Menschen und der Einbringung neuer Ideen für das Institut hinterlassen konnte – hierdurch habe ich sehr viel über mich selbst gelernt.

Bei Prof. Dr. Karl-Erich Jaeger möchte ich mich für die Übernahme des Korreferats bedanken und ebenfalls für seine starke Begeisterung und der Freude an dem gemeinsamen Kooperationsprojekt. Die hierdurch entstandene Brücke zwischen der Biologie und der Chemie war maßgeblich an der Entwicklung des Projektes federführend.

Ein weiterer Dank geht an die Graduiertenschule „CLIB-Graduate Cluster Industrial Biotechnology“ und deren Förderer für das Promotionsstipendium, die zahlreichen Lehrangebote und die Möglichkeit des regen Austausches der eigenen Arbeit mit Kollegen. Ein ganz besonderer Dank geht dabei an die Koordinatoren Dr. Jennifer Pahlke, Dr. Jessica Hilbig, Dr. Martina Holz und Dr. Sonja Meyer zu Berstenhorst, welche mich fortwährend bei Fragen unterstützen konnten.

Ein ganz besonderer Dank geht an das Prodiginin-Team aus dem Institut für Molekulare Enzymtechnologie mit meinem Kooperationspartner Dr. Andreas Domröse sowie Dr. Anita Loeschcke, Dr. Thomas Drepper, Dr. Stephan Thies, M.Sc. Jennifer Hage-Hülsmann und M.Sc. Robin Weihmann, welche die vorliegende Arbeit erst möglich gemacht haben.

Da es mir nicht möglich ist, jede einzelne Person aus dem Institut für Bioorganische Chemie namentlich zu erwähnen, möchte ich allen für die schöne und lehrreiche Zeit danken – ihr wart mir Freunde und eine Familie.

Vielen Dank an die Leute aus meiner Ruhe-Oase Labor 308; allen voran möchte ich hier Dr. Claudia Holec nennen, die über zehn Jahre unserer gemeinsamen Ausbildung immer an meiner Seite war und einen besonderen Platz in meinem Leben eingenommen hat, meinen Sangesbruder Dr. Benjamin Lauinger, M.Sc. Marc Hayes, der sicher über einige englische Schriftstücke schauen musste, sowie unseren tatkräftigen Praktikanten und Auszubildenden M.Sc. Lavinia Dunsmore, M.Sc. David Paul Klebl, Ute Hartrampf, Kevin Bochinsky und Silke Nyholt. An der Entstehung dieser Arbeit maßgeblich beteiligt waren M.Sc. Roxanne Krug und M.Sc. Hannah Braß, die nicht nur in einem rasenden Tempo meine Arbeit korrigiert haben, sondern auch während der Schreibphase wichtige Inseln der Ruhezeit waren – vielen Dank für Alles! Überdies bin ich Hannah dankbar, dass sie so tapfer ist und das Prodiginin-Thema weiterführt und nicht während meiner anfänglichen OC-Grundausbildung gleich wieder Reißaus genommen hat. Ein weiterer Dank geht an meine Kollegen Beatrix Paschold, Birgit Henßen, Erik Kranz, Monika Gehsing, Rainer Goldbaum und Vera Ophoven, welche das tägliche Arbeiten im Institut überhaupt ermöglichen. Dr. Thomas Classen gilt ein ganz besonderer Dank. Er hat mich und das Thema über die Jahre mit voller Begeisterung begleitet und immer unterstützt. Neben unzähligen gemeinsamen Projekten hat er mir auch die Faszination der Naturstoffe nähergebracht und war mir ein Vorbild.

Abschließend danke ich meinen Freunden und meiner Familie, die mich auf meinem Weg begleitet und mir ihre Unterstützung und ihr Vertrauen geschenkt haben.

10 Erklärung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation von mir selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist.

Die vorliegende Dissertation wurde ausschließlich an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf vorgelegt. Es wurde zuvor kein weiterer Promotionsversuch unternommen.

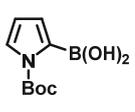
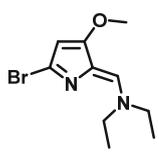
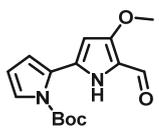
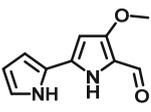
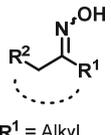
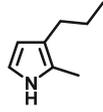
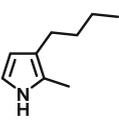
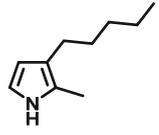
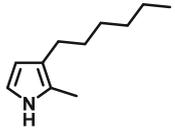
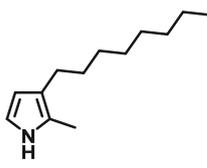
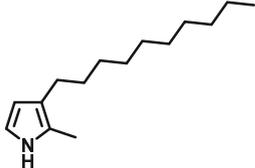
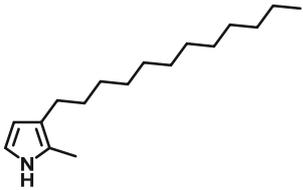
Andreas Sebastian Klein

Düsseldorf, den

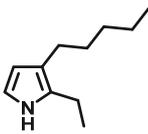
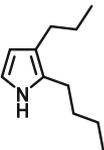
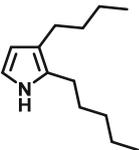
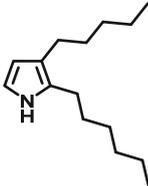
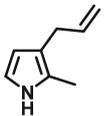
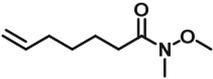
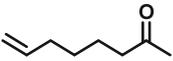
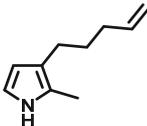
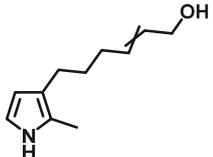
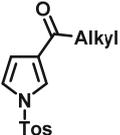
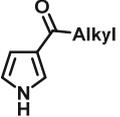
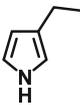
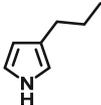
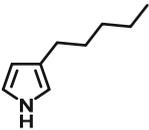
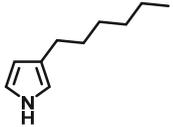
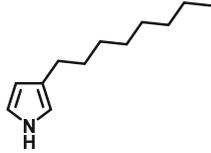
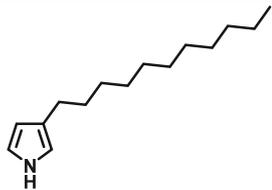
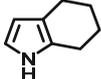
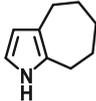
11 Formelregister

In der Tabelle 38 sind alle in dieser Arbeit hergestellten Verbindungen mit entsprechendem Verweis auf die Strukturnummer, das Kapitel im Material- und Methodenteil und die jeweilige Abkürzung im Laborjournal verzeichnet. [BK – Biokatalyse; BS – Biosynthese; MS – Mutasythese; SS – Semisythese]

Tabelle 38: Formelregister

								
48	6.5	003_Z2	51	6.5	003_Z1	46	6.5	003_P
						 R ¹ = Alkyl R ² = Alkyl/Alkenyl		
12	6.5	014_P	65	6.4.3	010_Z1	55	6.4.1, 6.4.1.2	017_Z1.X
								
13b	6.4.1, 6.4.3	010_P.1, 017_P.24	13c	6.4.1	017_P.9	13d	6.4.1	017_P.8
								
13e	6.4.1	017_P.1	13a	6.4.1	002_P	13f	6.4.1	017_P.2
								
13g	6.4.1	017_P.10	13h	6.4.1	017_P.12	13i	6.4.1	017_P.11

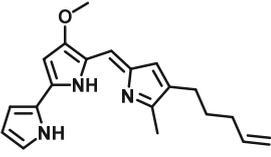
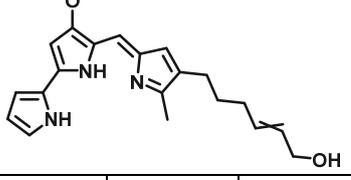
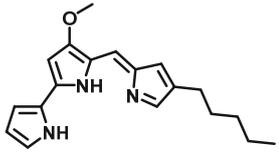
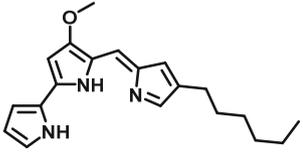
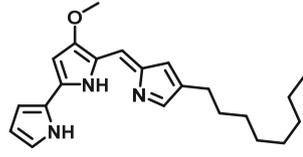
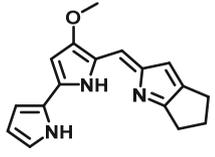
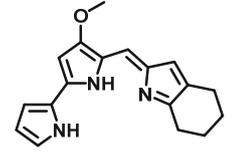
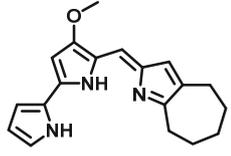
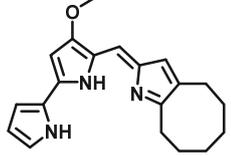
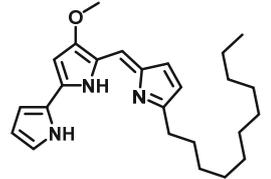
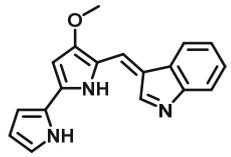
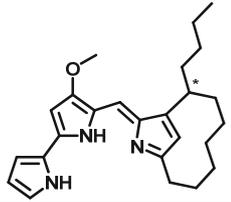
Formelregister

		
13j 6.4.1 017_P.5	13k 6.4.1 017_P.14	13l 6.4.1 017_P.13
		
13m 6.4.1 017_P.6	13t 6.4.1 017_P.3	72 6.4.1.1 017_Z1.4
		
70 6.4.1.1 017_Z2.4	13u 6.4.1 017_P.4	83 6.6.2.1 019_P.2
		
66 6.4.2 012_Z1	91 6.4.2 012_Z2.X	67 6.4.2 012_Z3.X
		
13n 6.4.2 012_P.1	13o 6.4.2 012_P.2	13p 6.4.2 012_P.5
		
13q 6.4.2 012_P.3	13r 6.4.2 012_P.6	13s 6.4.2 012_P.4
		
77a 6.4.1.2 017_P.18	77b 6.4.1.2 017_P.15	77c 6.4.1.2 017_P.16

Formelregister

77d	6.4.1.2	017_P.19	86	6.4.4	001_Z1	14	6.4.4	004_P, 009_P
81	6.6.2.1	018_Z1	1c	6.7.4	MS	1d	6.6.1, 6.7.4	015_P.7, MS
1e	6.7.4, 6.7.5	MS, BK	1a	6.6.1, 6.7.1, 6.7.4, 6.7.5, 6.7.9	005_P, MS, SS, BS, BK	1f	6.7.4, 6.7.5	MS, BK
1g	6.6.1, 6.7.4, 6.7.5	015_P.5, MS, BK	1h	6.7.4, 6.7.5	MS, BK	1j	6.7.4, 6.7.5	MS, BK
1k	6.6.1, 6.7.4, 6.7.5	015_P.6, MS, BK	1m	6.7.9	SS	1t	6.7.4, 6.7.5	MS, BK

Formelregister

								
1u	6.6.1, 6.7.4, 6.7.5	015_P.4, MS, BK	84	6.6.2, 6.7.8	019_P.3	1p	6.7.4, 6.7.5	MS, BK
								
1q	6.7.4, 6.7.5	MS, BK	1r	6.7.4, 6.7.5	MS, BK	75a	6.7.4, 6.7.5	MS, BK
								
75b	6.7.4, 6.7.5	MS, BK	75c	6.7.4, 6.7.5	MS, BK	75d	6.7.4, 6.7.5	MS, BK
								
3	6.6.1, 6.7.2	015_P.8, BS	74	6.6.1	015_P.1	4	6.7.2	BS