

**Die farbenfrohe Welt der Prodiginine**  
—  
**Neue Enzyme für die Synthese bioaktiver  
Naturstoffderivate**

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

**Hannah Ursula Clara Braß**  
aus Ratingen

Düsseldorf, Mai 2020





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

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

Berichterstatte:

1. Prof. Dr. Jörg Pietruszka

2. Prof. Dr. Karl-Erich Jaeger

Tag der mündlichen Prüfung: 08.10.2020



## Veröffentlichungen

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht.

### Publikationen

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*'.

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**, *19*, 1545–1552; 'Preparation of cyclic prodiginines by mutasynthesis in *Pseudomonas putida* KT2440'.

H. U. C. Brass, A. S. Klein, S. Nyholt, T. Classen, J. Pietruszka, *Adv. Synth. Catal.* **2019**, *361*, 2659–2667; 'Condensing Enzymes from *Pseudoalteromonadaceae* for Prodiginine Synthesis'.

Samer S. Habash, Hannah U. C. Brass, Andreas S. Klein, David P. Klebl, Tim Moritz Weber, Thomas Classen, Jörg Pietruszka, Florian M. W. Grundler, A. Sylvia S. Schleker; '5826 19 ProdiProPlant', Erfindungsmeldung (Erstellungsdatum Universität Bonn: 11.12.2019).

S. Brands, H. U. C. Brass, J. Pietruszka, A. J. Ruff, U. Schwaneberg, *Chem. Commun.* **2020**, *56*, 8631–8634; 'A colourimetric high-throughput screening system for directed evolution of prodigiosin ligase PigC'.

S. S. Habash, H. U. C. Brass, A. S. Klein, D. P. Klebl, T. M. Weber, T. Classen, J. Pietruszka, F. M. W. Grundler, S. Schleker, *Front. Plant Sci.* **2020**, *11*, 1545; 'Novel prodiginine derivatives demonstrate bioactivities on plants, nematodes, and fungi'

### Konferenzteilnahmen und Vorträge

7th BioSC Spotlight „Modular biotransformations in a circular bioeconomy“, 05.02.2020, Aachen, Deutschland; A. Loeschcke, H. U. C. Brass; '*Pseudomonas putida*-based production of diverse fine chemicals'. (Vortrag)

13<sup>th</sup> International CeBiTec Symposium – Multi-Step Syntheses in Biology & Chemistry, 02.–04.12.2019, Bielefeld, Deutschland; A. S. Klein, H. U. C. Brass, T. Classen, S. Sievers, J. Pietruszka; 'Biology meets chemistry: The safe production of new bioactive prodiginines'. (Poster)

4<sup>th</sup> International BioSC Symposium and the 6th internal BioSC Forum, 18.–19.11.2019, Köln, Deutschland; C. Brehl, J. Gebauer, H. U. C. Brass, R. Weihmann, N. Ihling, T. Classen, J. Ruff, A. Loeschcke, T. Drepper, K.-E. Jaeger, U. Schwaneberg, J. Pietruszka, J. Büchs; '*Pseudomonas putida*-based prodiginine production and biochemical diversification'. (Poster)

BioTrans 2019, 07.–11.07.2019, Groningen, Niederlande; H. U. C. Brass, A. S. Klein, S. Nyholt, T. Classen, J. Pietruszka; 'Ligases in natural product synthesis – A bridge between chemistry and biology' (Vortrag und Poster)

BioTrans 2019, 07.–11.07.2019, Groningen, Niederlande; A. S. Klein, H. U. C. Brass, T. Classen, S. Sievers, J. Pietruszka; 'The safe way to produce bioactive prodiginines – A mutasynthesis strategy'. (Poster)

Annual Conference 2019 of the Association for General and Applied Microbiology, 17.–20.03.2019, Mainz, Deutschland; R. Weihmann, S. Kubicki, S. Thies, A. Domröse, H. U. C. Brass, A. S. Klein, J. Pietruszka, T. Drepper, K.-E. Jaeger, A. Loeschcke; 'Natural product and precursor production by effective TREX-mediated gene cluster expression in *Pseudomonas putida*'. (Poster)

3<sup>rd</sup> International BioSC Symposium „Towards an Integrated Bioeconomy“, 12.–13.11.2018, Bonn, Deutschland; C. Brehl, H. U. C. Brass, J. Pietruszka, A. Loeschcke, N. Ihling, J. Büchs; 'Development of a non-invasive Online Monitoring for Prodigiosin Production in *Pseudomonas putida*'. (Poster)

3<sup>rd</sup> International BioSC Symposium „Towards an Integrated Bioeconomy“, 12.–13.11.2018, Bonn, Deutschland; A. Loeschcke, R. Weihmann, F. Hilgers, T. Drepper, J. Lee, P. Stoffels, K. Schipper, M. Feldbrügge, C. Pfaff, H. Klose, U. Schurr, N. Heucken, L. Hüsemann, M. Zurbrüggen, J. Gebauer, H. U. C. Brass, T. Classen, J. Pietruszka, S. Brands, J. Ruff, J. Schiffels, U. Schwaneberg, C. Brehl, N. Ihling, J. Büchs, S. Habash, S. Schleker, F. Grundler, C. Baum, S. Bröring, K.-E. Jaeger; 'Combinatorial creation of structural diversity for novel high-value compounds in the CombiCom project'. (Poster)

Bayer Science Lunch, 10.10.2018, Leverkusen, Deutschland; A. S. Klein, H. U. C. Brass; 'Mutasyntese zur Produktion von Prodigininen als Wirkstoffe – Eine farbenfrohe Brücke zwischen Chemie und Biologie'. (Vortrag auf Einladung)

2<sup>nd</sup> Aachen Protein Engineering Symposium, AcEs, 7.–10.10.2018, Aachen, Deutschland; A. Loeschcke, R. Weihmann, F. Hilgers, T. Drepper, J. Lee, P. Stoffels, K. Schipper, M. Feldbrügge, C. Pfaff, H. Klose, U. Schurr, N. Heucken, L. Hüsemann, M. Zurbrüggen, J. Gebauer, H. U. C. Brass, T. Classen, J. Pietruszka, S. Brands, J. Ruff, J. Schiffels, U. Schwaneberg, C. Brehl, N. Ihling, J. Büchs, S. Habash, S. Schleker, F. Grundler, C. Baum, S. Bröring, K.-E. Jaeger; 'The CombiCom project: Combinatorial creation of structural diversity for novel high-value compounds'. (Poster)

EMBO Workshop „Enzymes, Biocatalysis and Chemical Biology – The new frontiers“, 09.–12.09.2018, Pavia, Italien; H. U. C. Brass, A. S. Klein, D. P. Klebl, T. Classen, A. Loeschcke, T. Drepper, S. Sievers, K.-E. Jaeger, J. Pietruszka; 'New bioactive prodigiosin derivatives – Biotechnology meets chemistry'. (Poster)

3<sup>rd</sup> European Conference on Natural Products, 02.–05.09.2018, Frankfurt a. M., Deutschland; A. S. Klein, H. U. C. Brass, A. Domröse, A. Loeschcke, T. Drepper, T. Classen, S. Sievers, K.-E. Jaeger, J. Pietruszka; 'New bioactive prodigiosin derivatives – Synthetic Biology meets Organic Chemistry'. (Poster)

9th International Congress on Biocatalysis, 26.–30.08.2018, Hamburg, Deutschland; H. U. C. Brass, A. S. Klein, T. Classen, A. Loeschcke, T. Drepper, S. Sievers, K.-E. Jaeger, J. Pietruszka; 'New bioactive prodigiosin derivatives – A bridge between chemistry and biology'. (Poster und Kurzvortrag)

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)

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'. (Poster und Kurzvortrag)

### **Abschlussarbeiten**

Die vorliegende Arbeit enthält Ergebnisse der nachfolgenden Bachelor- und Masterarbeiten.

B. Sc. *Anne Vogt* (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Bachelorarbeit), **2017**; 'Auf dem Weg zu neuen Prodiginin-Derivaten: Synthese und Untersuchung der biologischen Aktivität'.

M. Sc. *David P. Klebl* (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Masterarbeit), **2017**; 'Wunderbare Derivate: Mutasynthese von Prodiginin-Analoga'.

B. Sc. *Annabel Arens* (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Bachelorarbeit), **2019**; 'Chemoenzymatische Synthese von Undecylprodigiosin und Derivaten – Untersuchungen zum Substratspektrum von Ligasen'.

Die jeweiligen Abschlussarbeiten wurden unter Anleitung der Autorin durchgeführt und sind im Text kenntlich gemacht.







## Inhaltsverzeichnis

|            |                                                                                                             |            |
|------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>1</b>   | <b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>                                                                          | <b>VII</b> |
| <b>2</b>   | <b>Kurzbeschreibung .....</b>                                                                               | <b>1</b>   |
| <b>3</b>   | <b>Abstract.....</b>                                                                                        | <b>3</b>   |
| <b>4</b>   | <b>Einleitung .....</b>                                                                                     | <b>5</b>   |
| 4.1        | Einführung in die Thematik.....                                                                             | 5          |
| 4.2        | Zielsetzung.....                                                                                            | 8          |
| <b>5</b>   | <b>Kenntnisstand.....</b>                                                                                   | <b>11</b>  |
| <b>5.1</b> | <b>Naturstoffe – Klassen der Sekundärmetabolite .....</b>                                                   | <b>11</b>  |
| <b>5.2</b> | <b>Prodiginine – leuchtend rote Sekundärmetabolite .....</b>                                                | <b>13</b>  |
| 5.2.1      | Historie der Prodiginine .....                                                                              | 13         |
| 5.2.2      | Strukturaufklärung von Prodigiosin ( <b>1a</b> ) und Struktur von Prodigininen .....                        | 14         |
| 5.2.3      | Biologische Aktivität.....                                                                                  | 19         |
| <b>5.3</b> | <b>Tambjamine .....</b>                                                                                     | <b>23</b>  |
| 5.3.1      | Struktur von Tambjaminen .....                                                                              | 23         |
| 5.3.2      | Biologische Aktivität.....                                                                                  | 25         |
| <b>5.4</b> | <b>Biosynthese von Prodigininen und Tambjaminen.....</b>                                                    | <b>29</b>  |
| 5.4.1      | Übersicht über die Biosynthese von Prodigininen und Tambjaminen .....                                       | 29         |
| 5.4.2      | Aufklärung der Biosynthese von Prodigininen.....                                                            | 30         |
| 5.4.3      | Biosynthese von 4-Methoxy-2,2'-bipyrrol-5-carbaldehyd ( <b>2</b> , MBC) .....                               | 32         |
| 5.4.4      | Biosynthese von 2-Methyl-3- <i>n</i> -amylpyrrol ( <b>3a</b> , MAP) .....                                   | 34         |
| 5.4.5      | Biosynthese von Undecylpyrrol ( <b>27a</b> , 2-UP) .....                                                    | 34         |
| 5.4.6      | Biosynthese von Dodec-3-en-1-amin ( <b>28a</b> , DDA) .....                                                 | 36         |
| 5.4.7      | Kondensation zu Prodigininen und Tambjaminen.....                                                           | 37         |
| 5.4.8      | Zyklisierungen .....                                                                                        | 38         |
| <b>5.5</b> | <b>Kondensationsenzyme.....</b>                                                                             | <b>39</b>  |
| 5.5.1      | Kondensationsenzyme mit MAP ( <b>3a</b> ) als Edukt – PigC und HapC.....                                    | 41         |
| 5.5.2      | Kondensationsenzyme aus <i>Streptomycetaceae</i> mit 2-UP ( <b>27a</b> ) als Edukt – RedH und Homologe..... | 44         |

|            |                                                                                                               |           |
|------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 5.5.3      | Kondensationsenzyme aus <i>Pseudoalteromonadaceae</i> mit DDA ( <b>28a</b> ) als Edukt – TamQ und TreaP ..... | 45        |
| <b>5.6</b> | <b>Heterologe Produktion von Prodigiosin (1a) und Derivaten in <i>P. putida</i> KT2440 .....</b>              | <b>45</b> |
| 5.6.1      | Produktion von Prodigiosin ( <b>1a</b> ) in <i>P. putida</i> KT2440 – Biosynthese .....                       | 45        |
| 5.6.2      | Produktion von Prodigiosin ( <b>1a</b> ) Derivaten in <i>P. putida</i> KT2440 – Mutasyntese .....             | 47        |
| 5.6.3      | Extraktion und Reinigung von Prodigininen aus <i>P. putida</i> .....                                          | 48        |
| <b>5.7</b> | <b>Biomimetische Synthesen von Prodigininen .....</b>                                                         | <b>49</b> |
| 5.7.1      | Synthese von MBC ( <b>2</b> ) und Boc-MBC ( <b>75</b> ) .....                                                 | 51        |
| 5.7.2      | Synthesen der Monopyrrole .....                                                                               | 53        |
| 5.7.3      | Kondensationsreaktion zu Prodigininen .....                                                                   | 56        |
| <b>6</b>   | <b>Ergebnisse und Diskussion.....</b>                                                                         | <b>59</b> |
| <b>6.1</b> | <b>Synthese von Vorläuferverbindungen und Referenzprodukten.....</b>                                          | <b>59</b> |
| 6.1.1      | Synthese von Vorläuferverbindungen.....                                                                       | 59        |
| 6.1.1.1    | Pyrrolsynthesen.....                                                                                          | 59        |
| 6.1.1.2    | Synthese von DDA ( <b>28a</b> ) .....                                                                         | 63        |
| 6.1.2      | Synthese von Referenzprodukten .....                                                                          | 63        |
| <b>6.2</b> | <b>Neue Kondensationsenzyme – neue Prodiginine?.....</b>                                                      | <b>66</b> |
| 6.2.1.1    | Suche nach neuen putativen Kondensationsenzymen.....                                                          | 66        |
| 6.2.1.2    | Genclusteranalyse von Prodiginin und Tambjamin produzierenden Organismen....                                  | 67        |
| 6.2.2      | Klonierung und Expression ausgewählter Kondensationsenzyme.....                                               | 75        |
| 6.2.2.1    | Anzucht und Genomisolierung von <i>Streptomycetaceae</i> und <i>Pseudoalteromonadaceae</i> .....              | 76        |
| 6.2.2.2    | Klonierung der für Kondensationsenzyme codierenden Gene aus <i>Streptomycetaceae</i> .....                    | 77        |
| 6.2.2.3    | Genexpression und Aktivitätsassays der Kondensationsenzyme aus <i>Streptomycetaceae</i> .....                 | 82        |
| 6.2.2.4    | Genexpression und Aktivitätsassays der Kondensationsenzyme aus <i>Pseudoalteromonadaceae</i> .....            | 89        |
| 6.2.2.5    | Initiale Aktivitätsassays mit Kondensationsenzymen aus <i>Pseudoalteromonadaceae</i> .....                    | 91        |
| 6.2.3      | Substratspektren neuer Kondensationsenzyme .....                                                              | 94        |
| 6.2.3.1    | Bestimmung von Extinktionskoeffizienten zur Quantifizierung von Prodigininen....                              | 94        |
| 6.2.3.2    | Bestimmung der Substratspektren der Kondensationsenzyme .....                                                 | 96        |
| 6.2.3.3    | Erweiterung der Substratspektren – Zugang zu Undecylprodigiosin ( <b>9a</b> ) und Derivaten .....             | 100       |

|            |                                                                                                       |            |
|------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 6.2.3.4    | Regioselektivität der elektrophilen aromatischen Substitution an Pyrrolderivaten.....                 | 102        |
| 6.2.3.5    | Fünfgliedrige Heteroaromaten und Indole <b>102</b> .....                                              | 105        |
| 6.2.4      | Kinetische Untersuchungen der Kondensationsenzyme .....                                               | 110        |
| 6.2.4.1    | Kinetische Untersuchung mit 2,3-dialkylierten Pyrrolen .....                                          | 110        |
| 6.2.4.2    | Kinetische Untersuchung mit 2-alkylierten Pyrrolen .....                                              | 117        |
| 6.2.5      | Interaktionen der Kondensationsenzyme PigC und TamQ mit der Zellmembran .....                         | 120        |
| 6.2.6      | Biokatalyse zur Synthese von Prodigininen .....                                                       | 126        |
| 6.2.7      | Synopsis des Kapitels .....                                                                           | 128        |
| <b>6.3</b> | <b>Biosynthetische Produktion von Prodigiosin (1a) .....</b>                                          | <b>129</b> |
| 6.3.1      | Optimierung der Kultivierungsparameter zur Erhöhung der Prodigiosin (1a) Produktion.....              | 129        |
| 6.3.2      | Fermentation des Stammes <i>P. putida</i> pig-r2 .....                                                | 139        |
| 6.3.3      | Synopsis des Kapitels .....                                                                           | 141        |
| <b>6.4</b> | <b>Bioaktivität von Prodigininen.....</b>                                                             | <b>142</b> |
| 6.4.1      | Antibiotische Aktivität von Prodigininen .....                                                        | 142        |
| 6.4.1.1    | Antibiotische Wirkung gegenüber biotechnologisch relevante Organismen .....                           | 142        |
| 6.4.1.2    | Antibiotische Aktivität gegenüber fakulativ humanpathogenen Erregern .....                            | 146        |
| 6.4.2      | Beeinflussung der Autophagie in MCF7 Brustkrebszellen .....                                           | 148        |
| 6.4.3      | Synopsis des Kapitels .....                                                                           | 154        |
| <b>7</b>   | <b>Zusammenfassung und Ausblick .....</b>                                                             | <b>155</b> |
| <b>7.1</b> | <b>Neue Enzyme für die Prodigininsynthese .....</b>                                                   | <b>155</b> |
| 7.1.1      | Ligasen für die Prodigininsynthese .....                                                              | 155        |
| 7.1.2      | Perspektiven und Anknüpfungspunkte.....                                                               | 158        |
| <b>7.2</b> | <b>Biosynthetische Produktion von Prodigiosin (1a) – Optimierung der Kultivierungsparameter .....</b> | <b>170</b> |
| <b>7.3</b> | <b>Bioaktivität von Prodigininen.....</b>                                                             | <b>171</b> |
| <b>8</b>   | <b>Experimentalteil .....</b>                                                                         | <b>176</b> |
| <b>8.1</b> | <b>Allgemeines.....</b>                                                                               | <b>176</b> |
| 8.1.1      | Geräte und Software.....                                                                              | 176        |
| 8.1.2      | Verbrauchsmaterialien.....                                                                            | 179        |
| 8.1.3      | Chemikalien.....                                                                                      | 179        |
| 8.1.4      | Enzyme .....                                                                                          | 179        |

|            |                                                                                                                                                                 |            |
|------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 8.1.5      | Oligonukleotide und Plasmide .....                                                                                                                              | 180        |
| 8.1.6      | Mikroorganismen .....                                                                                                                                           | 184        |
| <b>8.2</b> | <b>Synthesevorschriften.....</b>                                                                                                                                | <b>185</b> |
| 8.2.1      | Allgemeine chemische Methoden.....                                                                                                                              | 185        |
| 8.2.1.1    | Lösungsmittel .....                                                                                                                                             | 185        |
| 8.2.1.2    | Reaktionsdurchführung, Reaktionskontrolle und präparative Chromatographie ..                                                                                    | 185        |
| 8.2.1.3    | Massenspektrometrie.....                                                                                                                                        | 185        |
| 8.2.1.4    | NMR-Spektroskopie und Quantitative NMR-Spektroskopie .....                                                                                                      | 186        |
| 8.2.1.5    | Infrarot(IR)-Spektroskopie .....                                                                                                                                | 186        |
| 8.2.1.6    | LC-MS Analyse .....                                                                                                                                             | 187        |
| 8.2.1.7    | Schmelzpunktbestimmung .....                                                                                                                                    | 187        |
| 8.2.2      | Synthese von Pyrrolen.....                                                                                                                                      | 187        |
| 8.2.2.1    | Vorschrift A: Synthese der 2,3-Dialkylpyrrole <b>3a, 3b, 3f, 3h, 3i, 57a, 57c, 57e, 57f</b><br>und der zyklischen 2,3-alkylierten Pyrrole <b>82a, 82e</b> ..... | 189        |
| 8.2.2.2    | Vorschrift B: Synthese der 3-Alkylpyrrole <b>56a–56i</b> .....                                                                                                  | 195        |
| 8.2.2.3    | Vorschrift C: Synthese der 2-Alkylpyrrole <b>27a, 27c–27g</b> .....                                                                                             | 201        |
| 8.2.3      | Synthese von Boc-MBC ( <b>75</b> ) und MBC ( <b>2</b> ) .....                                                                                                   | 205        |
| 8.2.4      | Synthese von Prodigininen .....                                                                                                                                 | 208        |
| 8.2.5      | Synthese von Indolprodigiosin ( <b>103a</b> ).....                                                                                                              | 217        |
| 8.2.6      | Synthese von Dodec-3-en-1-amin ( <b>28a, DDA</b> ).....                                                                                                         | 218        |
| <b>8.3</b> | <b>Molekularbiologische Methoden.....</b>                                                                                                                       | <b>221</b> |
| 8.3.1      | Primerdesign .....                                                                                                                                              | 221        |
| 8.3.2      | PCR-Methoden .....                                                                                                                                              | 221        |
| 8.3.2.1    | Kolonie-PCR .....                                                                                                                                               | 222        |
| 8.3.2.2    | Test-PCR.....                                                                                                                                                   | 222        |
| 8.3.2.3    | <i>QuikChange</i> <sup>®</sup> -PCR.....                                                                                                                        | 222        |
| 8.3.2.4    | <i>Nested</i> PCR.....                                                                                                                                          | 223        |
| 8.3.2.5    | <i>Overlap Extension</i> PCR.....                                                                                                                               | 224        |
| 8.3.3      | Isolierung von DNA.....                                                                                                                                         | 225        |
| 8.3.3.1    | Isolierung von Plasmid DNA .....                                                                                                                                | 225        |
| 8.3.3.2    | Isolierung genomischer DNA .....                                                                                                                                | 225        |
| 8.3.4      | Restriktionsverdau und Ligation.....                                                                                                                            | 226        |
| 8.3.5      | Agarosegelelektrophorese .....                                                                                                                                  | 226        |
| 8.3.6      | Gelelution aus dem Agarosegel.....                                                                                                                              | 227        |

|            |                                                                                          |            |
|------------|------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 8.3.7      | Konzentrationsbestimmung von DNA.....                                                    | 227        |
| 8.3.8      | <i>Gibson Assembly</i> ® .....                                                           | 227        |
| 8.3.9      | DNA-Sequenzierung .....                                                                  | 228        |
| <b>8.4</b> | <b>Mikrobiologische Methoden.....</b>                                                    | <b>228</b> |
| 8.4.1      | Anzucht und Lagerung von Mikroorganismen .....                                           | 228        |
| 8.4.1.1    | Medien und Medienzusätze .....                                                           | 228        |
| 8.4.1.2    | Kultivierungsbedingungen.....                                                            | 232        |
| 8.4.1.3    | Herstellung von Glycerinkulturen zur langfristigen Lagerung von<br>Mikroorganismen ..... | 233        |
| 8.4.2      | Herstellung chemisch kompetenter Zellen .....                                            | 234        |
| 8.4.3      | Hitzeschocktransformation kompetenter Zellen .....                                       | 234        |
| <b>8.5</b> | <b>Proteinbiochemische Methoden .....</b>                                                | <b>235</b> |
| 8.5.1      | Zellaufschluss .....                                                                     | 235        |
| 8.5.2      | SDS-PAGE .....                                                                           | 235        |
| 8.5.3      | Isolierung der Membranfraktion.....                                                      | 236        |
| 8.5.4      | Proteinisolierung.....                                                                   | 236        |
| 8.5.4.1    | Proteinisolierung <i>via</i> Ablösung von der Zellmembran.....                           | 237        |
| 8.5.4.2    | Proteinisolierung <i>via</i> IMAC.....                                                   | 237        |
| 8.5.4.3    | Entsalzen, Umpuffern und Aufkonzentrieren von Proteinlösungen.....                       | 238        |
| 8.5.5      | Abschätzen der Proteinmenge in Membranfraktion <i>via</i> Densitometrie .....            | 239        |
| 8.5.6      | Kondensationsenzym <i>in vitro</i> Assay .....                                           | 240        |
| 8.5.7      | <i>Michaelis-Menten</i> -Kinetik .....                                                   | 241        |
| <b>8.6</b> | <b>Spezieller Experimentalteil .....</b>                                                 | <b>243</b> |
| 8.6.1      | Biokatalyse zur Synthese von Prodigininen .....                                          | 243        |
| 8.6.2      | Biotransformation von Undecylprodigiosin ( <b>9a</b> ).....                              | 244        |
| 8.6.3      | Toxizitätsassays mit biotechnologisch relevanten Organismen .....                        | 244        |
| 8.6.4      | Medienoptimierung für Prodigiosin ( <b>1a</b> ) Produktion .....                         | 245        |
| 8.6.5      | Biosynthetische Produktion von Prodigiosin ( <b>1a</b> ) .....                           | 246        |
| 8.6.6      | Extraktion und Reinigung von Prodigiosin ( <b>1a</b> ) .....                             | 246        |
| 8.6.6.1    | Extraktion aus PU-Würfeln .....                                                          | 246        |
| 8.6.6.2    | Extraktion aus Zellpellets .....                                                         | 246        |
| 8.6.7      | Quantifizierung von Prodigininen und Bestimmung molarer<br>Extinktionskoeffizienten..... | 247        |

|            |                                                                                                    |            |
|------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 8.6.8      | Mutasynthese im präparativen Maßstab.....                                                          | 248        |
| 8.6.9      | Fermentation des Prodigiosin ( <b>1a</b> ) Produzenten <i>P. putida</i> pig-r2 im 1.5 L Maßstab... | 248        |
| <b>9</b>   | <b>Anhang.....</b>                                                                                 | <b>249</b> |
| <b>9.1</b> | <b>Genclusteranalysen .....</b>                                                                    | <b>249</b> |
| <b>9.2</b> | <b><i>In vitro</i> Assays .....</b>                                                                | <b>257</b> |
| <b>9.3</b> | <b>Extraktion der Kondensationsenzyme TamQ und PigC von der Zellmembran.....</b>                   | <b>259</b> |
| <b>9.4</b> | <b>Rohdaten der Optimierung der Kultivierungsparameter .....</b>                                   | <b>261</b> |
| <b>9.5</b> | <b>Toxizitätsassays.....</b>                                                                       | <b>265</b> |
| <b>9.6</b> | <b>Vektorkarten, Nukleotid- und Aminosäuresequenzen .....</b>                                      | <b>273</b> |
| 9.6.1      | Standardexpressionsvektoren.....                                                                   | 273        |
| 9.6.2      | Vektorkarten – Ligasen im pET28a(+) Vektor.....                                                    | 274        |
| 9.6.3      | Vektorkarten – Ligasen im pET32a(+) Vektor.....                                                    | 293        |
| 9.6.4      | Vektorkarten – Zyklasen im pET28a(+) Vektor.....                                                   | 299        |
| 9.6.5      | Vektorkarten – Zyklasen im pET32a(+) Vektor.....                                                   | 301        |
| <b>9.7</b> | <b>Ausgewählte NMR-Spektren.....</b>                                                               | <b>304</b> |
| <b>9.8</b> | <b>Ausgewählte LC-MS Analytik .....</b>                                                            | <b>308</b> |
| 9.8.1      | LC-MS Analytik der <i>in vitro</i> Assays .....                                                    | 308        |
| 9.8.1.1    | Initiale <i>in vitro</i> Assays .....                                                              | 308        |
| 9.8.1.2    | <i>In vitro</i> Assays mit 3-alkylierten Pyrrolen .....                                            | 315        |
| 9.8.1.3    | <i>In vitro</i> Assays mit 2-alkylierten Pyrrolen .....                                            | 316        |
| 9.8.2      | LC-MS Analytik der Biotransformation von Undecylprodigiosin ( <b>9a</b> ) .....                    | 317        |
| <b>9.9</b> | <b>Eigenanteile an den veröffentlichten Publikationen dieser Arbeit.....</b>                       | <b>319</b> |
| <b>10</b>  | <b>Literaturverzeichnis.....</b>                                                                   | <b>321</b> |
| <b>11</b>  | <b>Formelregister.....</b>                                                                         | <b>342</b> |
| <b>12</b>  | <b>Danksagung.....</b>                                                                             | <b>347</b> |
| <b>13</b>  | <b>Erklärung.....</b>                                                                              | <b>349</b> |

# 1 Abkürzungsverzeichnis

## Allgemeine Abkürzungen

|            |                                                                          |                   |                                                       |
|------------|--------------------------------------------------------------------------|-------------------|-------------------------------------------------------|
| +I-Effekt  | Positiver induktiver Effekt                                              | EBSS              | <i>Earle's balanced salt solution</i>                 |
| 2-UP       | 2-Undecylpyrrol                                                          | EC                | <i>enzyme class</i>                                   |
| A          | Adenylierungsdomäne                                                      | EDTA              | Ethylendiamintetraacetat                              |
| Abs.       | Absorption                                                               | eGFP              | <i>enhanced green fluorescent protein</i>             |
| ACP        | Acyl-Carrier Protein                                                     | EIC               | <i>extracted ion chromatogram</i>                     |
| ADH        | Alkoholdehydrogenase                                                     | ER                | Enoylreduktase                                        |
| ADP        | Adenosindiphosphat                                                       | ES                | <i>electrospray</i>                                   |
| AGMO       | Alkylglycerol Monooxygenase                                              | ESI               | Elektronensprayionisation                             |
| Amp        | Ampicillin                                                               | EtOAc             | Essigsäureethylester                                  |
| AMP        | Adenosinmonophosphat                                                     | FAD               | Flavin-Adenin-Dinukleotid                             |
| ANL        | <i>N</i> -terminale-Adenylierungsdomäne                                  | FAS               | Fettsäuresynthase                                     |
| API        | <i>atmospheric pressure ionisation</i>                                   | FMN               | Flavinmononucleotid                                   |
| APS        | Ammoniumperoxodisulfat                                                   | FT-ICR            | Fouriertransformation-Ionenzyklotronresonanz          |
| Äq.        | molares Äquivalent                                                       | fw                | <i>forward</i> (Primer)                               |
| AT         | Acyltransferase                                                          | GA                | <i>Gibson Assembly</i> ®                              |
| ATCC       | <i>American Type Culture Collection</i>                                  | GC                | Gaschromatographie                                    |
| ATP        | Adenosintriphosphat                                                      | GRAS              | <i>generally recognized as safe</i>                   |
| ATR        | <i>attenuated total reflection</i>                                       | HBC               | 4-Hydroxy-2,2'-bipyrrol-5-carbaldehyd                 |
| BioSC      | <i>Bioeconomy Science Center</i>                                         | HBM               | 4-Hydroxy-2,2'-bipyrrol-5-methanol                    |
| Bis-Tris   | Bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methan                       | HEPES             | 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure |
| <i>bla</i> | Gen für $\beta$ -Lactamase                                               | HMBC              | <i>heteronuclear multiple bond correlation</i>        |
| BLAST      | <i>Basic Local Alignment Search Tool</i>                                 | HPLC              | <i>high performance liquid chromatography</i>         |
| Boc        | <i>tert</i> -Butyloxycarbonyl                                            | HRMS              | <i>high-resolution mass spectrometry</i>              |
| bp         | Basenpaare                                                               | HSQC              | <i>heteronuclear single quantum coherence</i>         |
| CDS        | <i>coding sequence</i>                                                   | IC                | <i>inhibitory concentration</i>                       |
| CFE        | <i>cell free extract</i>                                                 | IC <sub>max</sub> | maximale <i>inhibitory concentration</i>              |
| CFU        | <i>colony forming units</i>                                              | IL-2              | Interleukin-2                                         |
| Cm         | Chloramphenicol                                                          | IMAC              | <i>Immobilized metal ion affinity chromatography</i>  |
| CoA        | Coenzym A                                                                | IPM-              | <i>in-plane membrane anchor</i>                       |
| COBALT     | <i>Constraint based Multiple Alignment Tool</i>                          | Anker             |                                                       |
| COMAS      | <i>Compound Management and Screening Center</i>                          | IPTG              | Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid            |
| COSY       | <i>correlation spectroscopy</i>                                          | IR                | Infrarotspektroskopie                                 |
| DA         | Dodecan-1-amin                                                           | Kan               | Kanamycin                                             |
| DAD        | Diodenarraydetektor                                                      | kb                | Kilobase                                              |
| dATP       | Desoxyadenosintriphosphat                                                | kDa               | KiloDalton                                            |
| DC         | Dünnschichtchromatographie                                               | KP <sub>i</sub>   | Kaliumphosphatpuffer                                  |
| dCTP       | Desoxycytidintriphosphat                                                 | KR                | Ketoreduktase                                         |
| DDA        | Dodec-3-en-1-amin                                                        | KS                | Ketosynthase                                          |
| DEPT       | <i>distortionless enhancement by polarization transfer</i>               | LB                | <i>lysogeny broth</i>                                 |
| dest.      | destilliert                                                              | LC                | <i>liquid chromatography</i>                          |
| dGTP       | Desoxyguanosintriphosphat                                                | LV                | Leervektor                                            |
| DH         | Dehydrogenase                                                            | MAP               | 2-Methyl-3- <i>n</i> -amyl-pyrrol                     |
| dNTP       | Desoxyribonukleosidtriphosphate                                          | MBC               | 4-Methoxy-2,2'-bipyrrol-5-carbaldehyd                 |
| DMSO       | Dimethylsulfoxid                                                         | MEM               | <i>minimum essential medium</i>                       |
| DSM        | Stammmummern der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen | MIC               | <i>minimal inhibitory concentratio</i>                |
| DTT        | 1,4-Dithio-D-threitol                                                    | MIDA              | <i>N</i> -Methyliminodiacetat                         |
| dTTP       | Desoxythymidintriphosphat                                                | MOPS              | 3-( <i>N</i> -Morpholino)propansulfonsäure            |
|            |                                                                          | MS                | Massenspektrometrie                                   |

## Abkürzungsverzeichnis

|                |                                                       |                |                                          |
|----------------|-------------------------------------------------------|----------------|------------------------------------------|
| MSD            | <i>mass selective detector</i>                        | TMHMM          | <i>Transmembrane Hidden Markov Model</i> |
| MTBE           | Methyl- <i>tert</i> -butylether                       | TMS            | Tetramethylsilan                         |
| n.b.           | nicht bestimmt                                        | t <sub>R</sub> | Retentionszeit                           |
| NAD            | Nicotinamidadenindinukleotid                          | TR             | Thioesterreduktase                       |
| NADP           | Nicotinamidadenindinukleotidphosphat                  | TREX           | <i>Transfer and Expression</i> System    |
| NCBI           | <i>National Center for Biotechnology Information</i>  | TRIS           | 2-Amino-2-hydroxymethylpropan-1,3-diol   |
| NDO            | Naphthalin-1,2-Dioxygenase                            | UZ             | Ultrazentrifugation                      |
| Ni-NTA         | Nickel(II)-Nitrilotriessigsäure                       |                |                                          |
| NMR            | <i>nuclear magnetic resonance</i>                     |                |                                          |
| NRPS           | nichtribosomale Peptidsynthetase                      |                |                                          |
| OAS            | PLP-abhängige $\alpha$ -Oxamin-Synthase               |                |                                          |
| OD             | optische Dichte                                       |                |                                          |
| OMT            | <i>O</i> -Methyltransferase                           |                |                                          |
| OR             | Oxidoreduktase                                        |                |                                          |
| Ori            | <i>origin of replication</i>                          |                |                                          |
| p.a.           | pro analysi                                           |                |                                          |
| PAGE           | Polyacrylamid-Gelelektrophorese                       |                |                                          |
| PCP            | <i>peptidyl carrier protein</i>                       |                |                                          |
| PCR            | <i>polymerase chain reaction</i>                      |                |                                          |
| PE             | Petrolether                                           |                |                                          |
| PEG            | Polyethylenglycol                                     |                |                                          |
| PEPS           | Phosphoenolpyruvat -Synthase                          |                |                                          |
| P <sub>i</sub> | Anorganisches Phosphat                                |                |                                          |
| PKS            | Polyketidsynthasen                                    |                |                                          |
| PLP            | Pyridoxalphosphat                                     |                |                                          |
| PPDK           | Pyruvat -Phosphat -Dikinasen                          |                |                                          |
| ppm            | <i>parts per million</i>                              |                |                                          |
| PPTase         | Phosphopantetheinyl Transferase                       |                |                                          |
| Prom           | Promotor                                              |                |                                          |
| PT             | Phosphotransferdomäne                                 |                |                                          |
| PU             | Polyurethan                                           |                |                                          |
| rcf            | <i>relative centrifugal force</i>                     |                |                                          |
| rpm            | <i>revolutions per minute</i>                         |                |                                          |
| RT             | Raumtemperatur                                        |                |                                          |
| rv             | <i>reverse</i> (Primer)                               |                |                                          |
| SAM            | S-Adenosylmethionin                                   |                |                                          |
| SAR            | <i>structure-activity-relationship</i>                |                |                                          |
| SDS            | Natriumdodecylsulfat                                  |                |                                          |
| Sm             | Streptomycin                                          |                |                                          |
| SOB            | <i>super optimal broth</i>                            |                |                                          |
| SOC            | <i>super optimal broth with catabolite repression</i> |                |                                          |
| T4             | <i>Escherichia-Virus</i> T4                           |                |                                          |
| T5             | <i>Escherichia-Virus</i> T5                           |                |                                          |
| T7             | <i>Escherichia-Virus</i> T7                           |                |                                          |
| TA             | Transaminase                                          |                |                                          |
| Taq            | <i>Thermus aquaticus</i> Polymerase                   |                |                                          |
| TB             | <i>terrific broth</i>                                 |                |                                          |
| TE             | Thioesterase                                          |                |                                          |
| TEA            | Triethylamin                                          |                |                                          |
| TEMED          | <i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethylendiamin            |                |                                          |
| Term           | Terminator                                            |                |                                          |
| Tet            | Tetracyclin                                           |                |                                          |
| ThDP           | Thiaminpyrophosphat                                   |                |                                          |
| THF            | Tetrahydrofuran                                       |                |                                          |
| TIFF           | <i>Tagged Image File Format</i>                       |                |                                          |



## Organismen

|                                                  |                                         |                                         |                            |
|--------------------------------------------------|-----------------------------------------|-----------------------------------------|----------------------------|
| <i>Actinomadura madurae</i>                      | <i>A. madurae</i>                       | <i>Serratia</i> 39006                   | <i>S.</i> 39006            |
| <i>Actinomadura pelletieri</i>                   | <i>A. pelletieri</i>                    | <i>Serratia marcescens</i>              | <i>S. marcescens</i>       |
| <i>Alteromonas rubra</i><br>(= <i>P. rubra</i> ) | <i>A. rubra</i><br>(= <i>P. rubra</i> ) | <i>Serratia plymuthica</i>              | <i>S. plymuthica</i>       |
| <i>Arabidopsis thaliana</i>                      | <i>A. thaliana</i>                      | <i>Sessibugula translucens</i>          | <i>S. translucens</i>      |
| <i>Artemisia dracunculus</i>                     | <i>A. dracunculus</i>                   | <i>Staphylococcus aureus</i>            | <i>S. aureus</i>           |
| <i>Atapozoa</i> sp                               | <i>Atapozoa</i> sp                      | <i>Staphylococcus epidermis</i>         | <i>S. epidermis</i>        |
| <i>Bacillus prodigiosus</i>                      | <i>B. prodigiosus</i>                   | <i>Streptomyces albus</i>               | <i>S. albus</i>            |
| <i>Bacillus subtilis</i>                         | <i>B. subtilis</i>                      | <i>Streptomyces aureofaciens</i>        | <i>S. aureofaciens</i>     |
| <i>Bacterium prodigiosum</i>                     | <i>B. prodigiosum</i>                   | <i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)    | <i>S. coelicolor</i> A3(2) |
| <i>Botrytis cinerea</i>                          | <i>B. cinerea</i>                       | <i>Streptomyces griseoviridis</i>       | <i>S. griseoviridis</i>    |
| <i>Bugula dentata</i>                            | <i>B. dentata</i>                       | <i>Streptomyces lividans</i>            | <i>S. lividans</i>         |
| <i>Caenorhabditis elegans</i>                    | <i>C. elegans</i>                       | <i>Streptomyces longispororuber</i>     | <i>S. longispororuber</i>  |
| <i>Candida albicans</i>                          | <i>C. albicans</i>                      | <i>Streptomyces</i> sp. BA18591         | <i>S.</i> sp. BA18591      |
| <i>Ciona intestinalis</i>                        | <i>C. intestinalis</i>                  | <i>Streptomyces</i> sp. CNQ 617         | <i>S.</i> sp. CNQ 617      |
| <i>Coffea arabica</i>                            | <i>Coffea arabica</i>                   | <i>Streptomyces</i> sp. Y-42            | <i>S.</i> sp. Y-42         |
| <i>Corynebacterium diptheriae</i>                | <i>C. diptheriae</i>                    | <i>Streptoverticillium rubrreticuli</i> | <i>S. rubrreticuli</i>     |
| <i>Corynebacterium glutamicum</i>                | <i>C. glutamicum</i>                    | <i>Streptomyces venezuelae</i>          | <i>S. venezuelae</i>       |
| <i>Elaeis guineensis</i>                         | <i>E. guineensis</i>                    | <i>Tambja abdere</i>                    | <i>T. abdere</i>           |
| <i>Enterococcus faecium</i>                      | <i>E. faecium</i>                       | <i>Tambja ceutae</i>                    | <i>T. ceutae</i>           |
| <i>Escherichia coli</i>                          | <i>E. coli</i>                          | <i>Tambja eliora</i>                    | <i>T. eliora</i>           |
| <i>Globodera rostochiensis</i>                   | <i>G. rostochiensis</i>                 | <i>Vibrio gazogenes</i>                 | <i>V. gazogenes</i>        |
| <i>Hahella chejuensis</i>                        | <i>H. chejuensis</i>                    | (= <i>Benecka gazogenes</i> )           | (= <i>B. gazogenes</i> )   |
| <i>Heterodera schachtii</i>                      | <i>H. schachtii</i>                     | <i>Vibrio psychoerythreus</i>           | <i>V. psychoerythreus</i>  |
| <i>Komagataella phaffii</i>                      | <i>K. phaffii</i>                       |                                         |                            |
| <i>Malassezia furfur</i>                         | <i>M. furfur</i>                        |                                         |                            |
| <i>Meloidogyne incognita</i>                     | <i>M. incognita</i>                     |                                         |                            |
| <i>Meloidogyne javanica</i>                      | <i>M. javanica</i>                      |                                         |                            |
| <i>Mentha arvensis</i>                           | <i>M. arvensis</i>                      |                                         |                            |
| <i>Monas prodigiosa</i>                          | <i>M. prodigiosa</i>                    |                                         |                            |
| <i>Mycobacterium leprae</i>                      | <i>M. leprae</i>                        |                                         |                            |
| <i>Mycobacterium tuberculosis</i>                | <i>M. tuberculosis</i>                  |                                         |                            |
| <i>Myristica fragrans</i>                        | <i>M. fragrans</i>                      |                                         |                            |
| <i>Nembrotha cristata</i>                        | <i>N. cristata</i>                      |                                         |                            |
| <i>Nembrotha kubaryana</i>                       | <i>N. kubaryana</i>                     |                                         |                            |
| <i>Papaver somniferum</i>                        | <i>P. somniferum</i>                    |                                         |                            |
| <i>Penicillium chrysogenum</i>                   | <i>P. chrysogenum</i>                   |                                         |                            |
| <i>Phoma lingam</i>                              | <i>P. lingam</i>                        |                                         |                            |
| <i>Pichia pastoris</i>                           | <i>P. pastoris</i>                      |                                         |                            |
| <i>Plasmodium falciparum</i>                     | <i>P. falciparum</i>                    |                                         |                            |
| <i>Pseudoalteromonas rubra</i>                   | <i>P. rubra</i>                         |                                         |                            |
| <i>Pseudoalteromonas citrea</i>                  | <i>P. citrea</i>                        |                                         |                            |
| <i>Pseudoalteromonas denitrificans</i>           | <i>P. denitrificans</i>                 |                                         |                            |
| <i>Pseudoalteromonas tunicata</i>                | <i>P. tunicata</i>                      |                                         |                            |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i>                    | <i>P. aeruginosa</i>                    |                                         |                            |
| <i>Pseudomonas magnesorubra</i>                  | <i>P. magnesorubra</i>                  |                                         |                            |
| <i>Pseudomonas protegens</i>                     | <i>P. protegens</i>                     |                                         |                            |
| <i>Pseudomonas putida</i>                        | <i>P. putida</i>                        |                                         |                            |
| <i>Pseudovibrio denitrificans</i>                | <i>P. denitrificans</i>                 |                                         |                            |
| <i>Radopholus similis</i>                        | <i>R. similis</i>                       |                                         |                            |
| <i>Roboastra tigris</i>                          | <i>R. tigris</i>                        |                                         |                            |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i>                  | <i>S. cerevisiae</i>                    |                                         |                            |
| <i>Saccharopolyspora</i> sp. nov.                | <i>S.</i> sp. nov.                      |                                         |                            |
| <i>Salix alba</i>                                | <i>S. alba</i>                          |                                         |                            |
| <i>Salmonella typhimurium</i>                    | <i>S. typhimurium</i>                   |                                         |                            |
| <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>                  | <i>S. sclerotiorum</i>                  |                                         |                            |

---

## 2 Kurzbeschreibung

Im Fokus dieser Arbeit steht der Naturstoff Prodigiosin und die bioökonomische Generierung der Verbindung einschließlich neuer Derivate. Dabei sind zentrale Aspekte der Untersuchungen das Schlüsselenzym der Biosynthese, die Erforschung der Bioaktivität von Prodigininen und die Verbesserung der biosynthetischen Produktion.

Die Flexibilität des Schlüsselenzyms der Prodigiosinbiosynthese – PigC – ermöglichte bereits, wie in der Doktorarbeit von Dr. *Andreas S. Klein* gezeigt, die Herstellung von Prodigiosin Derivaten unter Nutzung der Mutasyntese. Einige Monopyrrole, vor allem Monopyrrole mit längeren Seitenketten, konnten dennoch nicht von der Ligase PigC umgesetzt und in das Zielmolekül eingebaut werden, sodass ein Bedarf an alternativen Enzymen gegeben war. Eine systematische Suche nach PigC Homologen und Analyse der entsprechenden Gencluster bakterieller Prodigiosin- und Tambjamine-Produzenten im Zuge dieser Arbeit zeigte putativ neue Kondensationsenzyme auf. Die entsprechenden Gene wurden heterolog in *E. coli* exprimiert und auf deren Aktivität hin untersucht. Während die Expression von *pigC* Homologen aus *Streptomyetaceae* Schwierigkeiten aufwies, wurden zwei für Kondensationsenzyme codierende Gene aus Tambjamine produzierenden *Pseudoalteromonadaceae* erfolgreich und aktiv heterolog exprimiert. Diese Enzyme konnten für die biokatalytische Produktion von Prodigininen eingesetzt werden. Vergleichende enzymkinetische Untersuchungen und eine Analyse des Substratspektrums wurden durchgeführt. Der Einsatz der Kondensationsenzyme aus *Pseudoalteromonadaceae* konnte schließlich einen Zugang zu biokatalytisch bisher nicht adressierbaren Derivaten ermöglichen und auch ein semipräparativer Biokatalyseansatz wurde etabliert.

Die in vorgehenden Arbeiten bereits etablierte nachhaltige Produktion von Prodigiosin unter Nutzung des sicheren bakteriellen Prodigiosinproduzenten *P. putida* pig-r2 wurde im Zuge der vorliegenden Arbeit verbessert. Durch systematische Untersuchungen der Kultivierungsparameter war eine Verbesserung der Produktionsleistung und somit eine höhere Prodigiosin Produktion möglich.

Die Bioaktivität von Prodigiosin und verschiedenen Derivaten wurde gegenüber zwei biotechnologisch relevanten Hefen und somit eukaryotischen Organismen untersucht, wobei Hefen weniger sensitiv auf Prodiginine reagierten als Gram-positive Bakterien, jedoch eine nicht so hohe Toleranz aufwiesen wie Gram-negative Bakterien. Im Rahmen unterschiedlicher Kooperationen wurden weitere Aspekte der Bioaktivität von Prodigininen untersucht. In Bezug auf die antibiotische Wirkung konnte M. Sc. *Jennifer Hage-Hülsmann* (Institut für Molekulare Enzymtechnologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) die Aktivität von Prodigiosin und Derivaten auf einige fakultativ humanpathogene Bakterien nachweisen. Durch eine Zusammenarbeit mit Dr. *Sonja Sievers* und Dr. *Luca Laraia* am Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie in Dortmund in der Abteilung für Chemische Biologie und am *Compound Management and Screening Center* wurde festgestellt, dass Prodiginine eine Beeinflussung der Autophagie Prozesse in Brustkrebszellen und Apoptose auslösen. Dabei zeigten vor

allen Derivate mit kürzeren Alkylketten erhöhte Wirksamkeit. Ein neuer Gesichtspunkt der Bioaktivität von Prodigininen wurde durch die Kooperation mit dem Institut für Nutzpflanzenwissenschaften und Ressourcenschutz, Abteilung Molekulare Phytomedizin der Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn aufgezeigt. So konnten durch Untersuchungen, durchgeführt von Dr. *Samer S. Habash*, Prodiginine in Bezug auf ihre Wirkung gegenüber pflanzenpathogene Nematoden und Pilze erforscht werden, wobei ein Teil der Pflanzenschädlinge durch Prodiginine im Wachstum inhibiert wurde.

### 3 Abstract

This work focuses on the natural product prodigiosin and the bioeconomic generation of the compound including new derivatives. Central aspects of this research were the key enzyme of the biosynthesis, the examination of the bioactivity of prodiginines, and the improvement of biosynthetic production.

The flexibility of the key enzyme of prodigiosin biosynthesis – PigC – has already enabled the production of prodigiosin derivatives using a mutasynthesis approach, as shown in the doctoral thesis of Dr. *Andreas S. Klein*. However, some monopyrroles, especially monopyrroles with longer side chains, could not be converted and incorporated into the target molecule by the ligase PigC, and thus there was a need for alternative enzymes. A systematic search for PigC homologues and analysis of the corresponding gene clusters of bacterial prodigiosin and tambjamine producers in the course of this work revealed new putative condensing enzymes. The corresponding genes were heterologously expressed in *E. coli* and their activity investigated. While facing difficulties during the expression of *pigC* homologues from *Streptomycetaceae*, two genes coding for condensing enzymes from Tambjamine producing *Pseudoalteromonadaceae* were successfully and actively expressed heterologously. These enzymes could be used for the biocatalytic production of prodiginines. Comparative enzyme kinetic studies and an analysis of the substrate spectrum were performed. Finally, the use of condensing enzymes from *Pseudoalteromonadaceae* provided access to biocatalytically previously non-addressable derivatives and a semi-preparative biocatalytic approach was also established.

The sustainable production of prodigiosin by the safe bacterial prodigiosin producer *P. putida* pig-r2, which had already been established in previous work, was improved during the course of this work. Systematic examinations of the cultivation parameters allowed an improvement of the production performance and thus a higher prodigiosin production.

The bioactivity of prodigiosin and various derivatives was investigated towards two biotechnologically relevant yeasts and hence eukaryotic organisms. The examined yeasts reacted less sensitively to prodigiosin than Gram-positive bacteria, but showed a lower tolerance than Gram-negative bacteria. Together with various cooperations partners further aspects of the bioactivity of prodiginines were investigated. With regard to the antibiotic effect, M. Sc. *Jennifer Hage-Hülsmann* (Institute of Molecular Enzyme Technology, Heinrich Heine University Düsseldorf) was able to demonstrate the activity of prodigiosin and derivatives towards some facultatively human pathogenic bacteria. In a collaboration with Dr. *Sonja Sievers* and Dr. *Luca Laraia* at the Max-Planck-Institute of Molecular Physiology in Dortmund in the Department of Chemical Biology and at the *Compound Management and Screening Center*, it was discovered that prodiginines influence autophagy processes in breast cancer cells and induce apoptosis. In particular, derivatives with shorter alkyl chains showed increased efficacy. A new aspect of the bioactivity of prodiginines was

demonstrated by the cooperation with the Institute of Crop Science and Resource Conservation, Department Molecular Phytomedicine of the University of Bonn. In studies carried out by Dr. *Samer S. Habash*, prodiginines were examined with regard to their effect on plant pathogenic nematodes and fungi, whereby some of the plant pests were inhibited in growth by prodiginines.

## 4 Einleitung

### 4.1 Einführung in die Thematik

#### Bioökonomie

Nicht erst seit dem Wissenschaftsjahr 2020 mit dem Thema Bioökonomie<sup>1</sup> wird in der Politik und der breiten Öffentlichkeit immer stärker diskutiert, dass unsere heutige Wirtschaft, die auf der Nutzung nicht-nachwachsender fossiler Rohstoffe fußt, in der jetzigen Form nicht langfristig tragbar ist und die heute nutzbaren Ressourcen enden werden. Diese Probleme und die daraus folgenden vielschichtigen Konsequenzen stellen die Menschheit vor enorme Herausforderungen und die Frage, wie eine weitere Sicherung oder gar Verbesserung der Lebensstandards überhaupt ermöglicht werden kann, ohne die Erde durch z.B. Überbeanspruchung und nicht nachhaltige Nutzung von Ackerflächen, zu hohe Emission klimaschädlicher Gase oder die Zerstörung der Artenvielfalt weiter zu schädigen. Deutlich scheint, dass eine Abkehr von einer Ökonomie, die auf der Nutzung fossiler Ressourcen fußt, unabdingbar ist. Ein zur erdölbasierten Wirtschaft konträres Konzept verfolgt die Bioökonomie, die auf die Nutzung nachwachsender Rohstoffe z.B. als Energiequelle setzt und so eine Unabhängigkeit von fossilen Materialien schaffen will.<sup>[1, 2]</sup> Die Bioökonomie, die häufig auch wissensbasierte Bioökonomie genannt wird, umfasst dabei alle Bereiche der Wirtschaft. Biologische Ressourcen sollen ebenso wie Abfallprodukte in höherwertige Produkte umgewandelt werden. So können z.B. biologische Systeme wie Mikroorganismen genutzt werden, um Feinchemikalien oder Arzneimittel herzustellen.<sup>[3]</sup>

Sowohl auf Ebene der Europäischen Union als auch auf Bundes- und Landesebene in Deutschland wird die Bioökonomie als Ziel angestrebt.<sup>[3-5]</sup> Seitens der EU werden fünf Punkte im Kontext der Bioökonomie in den Fokus gesetzt und verfolgt:

1. Gewährleistung der Nahrungsmittel- und Ernährungssicherheit
2. nachhaltige Bewirtschaftung natürlicher Ressourcen
3. Verringerung der Abhängigkeit von nicht erneuerbaren Energien, nicht-nachhaltigen Ressourcen, ob aus dem Inland oder aus dem Ausland
4. Eindämmung des Klimawandels und Anpassung an ihn
5. Stärkung der europäischen Wettbewerbsfähigkeit und Schaffung von Arbeitsplätzen.<sup>[4]</sup>

In der „Nationalen Forschungsstrategie BioÖkonomie 2030“ aus dem Jahr 2010 wird auf Ebene der Bundesregierung in Deutschland die Vision der Bioökonomie erklärt als „eine am natürlichen Stoffkreislauf orientierte, nachhaltige bio-basierte Wirtschaft, deren vielfältiges Angebot die Welt ausreichend und gesund ernährt sowie uns mit hochwertigen Produkten aus nachwachsenden Rohstoffen versorgt“.<sup>[3]</sup> Unter anderem auf der „Nationalen Forschungsstrategie BioÖkonomie 2030“ und der daraus zuvor zitierten Vision baut auch die im Jahr 2020 beschlossene Fassung der

---

<sup>1</sup> März 2020: <https://www.wissenschaftsjahr.de/2020/>

„*Nationale Bioökonomiestrategie*“ der Bundesregierung auf und gibt folgende zwei politische Leitlinien vor.<sup>[1]</sup>

„Leitlinie 1: Mit biologischem Wissen und verantwortungsvollen Innovationen zu einer nachhaltigen, klimaneutralen Entwicklung“

„Leitlinie 2: Mit biogenen Rohstoffen zu einer nachhaltigen, kreislauforientierten Wirtschaft“

Auf Ebene der Bundesländer wird ebenfalls die Bioökonomie als Ziel verfolgt und politische Strategien ausgearbeitet, jedoch mit unterschiedlichen Schwerpunkten innerhalb der Länder.<sup>[6]</sup> Eine wichtige Voraussetzung für Bioökonomie ist die Zusammenarbeit verschiedener Fachrichtungen und Expertisen. In Nordrhein-Westfalen ist das vom Land geförderte *Bioeconomy Science Center* (BioSC) ansässig, ein bisher einmaliges Kompetenzzentrum zum Thema Bioökonomie. In diesem Zusammenschluss forschen die Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, die Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule Aachen (RWTH Aachen), die Friedrich-Wilhelms Universität Bonn und das Forschungszentrum Jülich gemeinsam. Die interdisziplinäre Verbindung von Grundlagenforschung und industrienaher Forschung sowie die Zusammenlegung von Ressourcen und Infrastruktur kann so eine Basis schaffen, die für nachhaltige Bioökonomie nötig sind. Thematisch sind innerhalb des BioSC vier zentrale Themenfelder von Bedeutung: Nachhaltige pflanzliche Bioproduktion und Ressourcenschutz, mikrobielle und molekulare Stoffumwandlung, Verfahrenstechnik nachwachsender Rohstoffe, Ökonomie und gesellschaftliche Implikationen.<sup>[7]</sup> Im Fokusthemenfeld „*Modular biotransformations for high-value chemicals*“ ist das FocusLab CombiCom angesiedelt, ein Kooperationsprojekt mit Expertise aus Biologie, Chemie und Verfahrenstechnik und dem gemeinsamen Ziel der nachhaltigen Produktion von Naturstoffen als Quelle neuer Arzneimittel.<sup>[8]</sup> Auch die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen des FocusLabs CombiCom durchgeführt.

### Die Natur als Quelle und Inspiration für Arzneistoffe

Seit frühesten Zeiten nutzen Menschen die Natur als Quelle für Linderung ihrer Krankheiten. Ein sehr frühes Beispiel dafür findet sich in der Zeit des alten Ägypten in Form eines Papyrus. Der deutsche Ägyptologe *Georg Ebers* erwarb im Jahr 1873 dieses knapp 19 m lange Papyrus, welches auf das letzte Viertel des 16. Jahrhundert vor Christus datiert wird und heute als *Papyrus Ebers* bezeichnet wird. Diese Papyrusrolle dokumentiert Wissen der altägyptischen Heilkunde mit rund 876 Heilmitteln und Rezepturen, wobei viele dieser Mittel pflanzlichen Ursprungs sind.<sup>[9-11]</sup> Das *Papyrus Ebers* ist allerdings nur ein Beispiel von vielen anderen früheren und späteren Funden, die antikes Wissen über (Pflanzen-)Heilmittel überliefern.

Nur ein Teil der Namen von Heilpflanzen, die im *Papyrus Ebers* erwähnt werden, konnten bisher sicher übersetzt werden, während ein Großteil unbekannt ist und somit viel Wissen der alten Ägypter über den pharmazeutischen Nutzen von Pflanzen noch im Verborgenen liegt. Ungeklärt bleibt, ob Nachtschattengewächsen (*Solanaceae*) genutzt wurden, von denen viele einen hohen Gehalt an



pharmakologisch wirksamen Alkaloiden aufweisen. In der ägyptischen Volksmedizin werden gegenwärtig jedoch einige *Solanaceae* wie das Ägyptische Bilsenkraut (*Hyoscyamus muticus*) genutzt und gehören zur heimischen Flora, sodass zumindest über eine Verwendung im alten Ägypten spekuliert werden kann. Trotz vieler fehlender Übersetzungen wird anhand des *Papyrus Ebers* dennoch sehr deutlich, dass Pflanzen gezielt als Heilmittel genutzt wurden. So findet man in diesem Papyrus das Rezept eines Heilmittels für den Bauch, das u. a. Kümmel enthält, der auch heute noch als herkömmliches Hausmittel bei Beschwerden des Magen-Darm-Traktes Anwendung findet. Auch z. B. Granatapfel, Rizinus, Wacholder, Echter Sellerie oder Zwiebeln wurden zur Heilung von Beschwerden gebraucht. Deren Wirkung ist bis heute bekannt und diese Pflanzen finden Anwendung in der Volksmedizin.<sup>[11, 12]</sup>

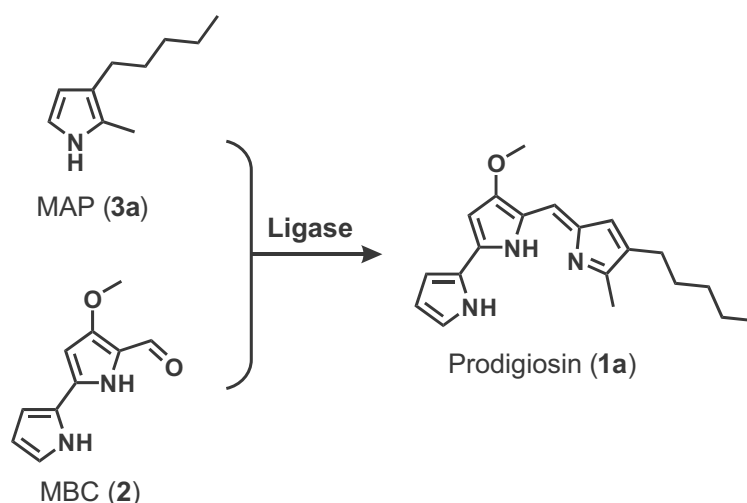
Nicht nur Pflanzen sind Quelle von Heilmitteln, sondern auch Mikroorganismen produzieren verschiedene Stoffe, die als Arzneimittel genutzt werden können. Springt man in der Geschichte vom letzten Viertel des 16. Jahrhundert vor Christus, und somit der Entstehungszeit des *Papyrus Ebers*, etliche Jahrhunderte weiter in das 13. Jahrhundert nach Christus, begegnet einem ein leuchtend roter Naturstoff, der von Bakterien produziert wird und später den Namen Prodigiosin erhält. Während Prodigiosin produzierende Bakterien zur damaligen Zeit als Blutwunder gedeutet wurden und so mit verschiedenen historischen Ereignissen der Menschheitsgeschichte verknüpft sind, ist heute bekannt, dass dieser Naturstoff antibiotische Eigenschaften hat und gegen Krebszellen wirkt.<sup>[13]</sup>

Auch mehr als 3500 Jahre nach der Entstehungszeit des *Papyrus Ebers* und über 800 Jahre nach der Entdeckung Prodigiosin produzierender Bakterien sind Naturstoffe in der modernen Medizin immer noch Quelle und Inspiration für Arzneistoffe, auch wenn neue Methoden wie die kombinatorische Chemie zur Entdeckung neuer Wirkstoffe beitragen können. Zwischen 1981 und 2014 waren dennoch über 40 % aller neu zugelassenen Medikamente Naturstoffe oder von ihnen abgeleitete Substanzen.<sup>[14]</sup> Da die Natur uns offenkundig viele Naturstoffe mit pharmakologischer Wirkung darbietet, stellt sich die Frage wie diese Verbindungen einfach und effizient erhalten werden können. Eine Isolierung des pharmakologisch interessanten Naturstoffs aus dem natürlichen Produzenten ist sicher naheliegend, aber nicht zwangsläufig eine effiziente und skalierbare Methode. Darüber hinaus bleibt der Zugang zu Derivaten des Naturstoffs verwehrt, sofern nachfolgend keine chemische Derivatisierung erfolgt. Die chemische Synthese von Naturstoffen ist natürlich möglich und bietet auch den Vorteil Derivate zu erzeugen, bleibt jedoch auch mit modernen chemischen Methoden herausfordernd, da die Verbindungen strukturell häufig hoch komplex sind.<sup>[15]</sup> Hier kann oftmals eine geschickte Kombination chemischer, biologischer und verfahrenstechnischer Ansätze zum Ziel führen. Unter bioökonomischen Gesichtspunkten sind z. B. Mutasynthese- oder Semisynthesekonzepte vielversprechend und werden zunehmend verfolgt. Auch die Nutzung von (isolierten) Enzymen, die eine hohe Regio- und Stereoselektivität aufweisen, welche chemisch teilweise nur schwer zu erzielen ist, kann zur erfolgreichen Synthese des Naturstoffs beitragen.<sup>[15]</sup>

## 4.2 Zielsetzung

Der leuchtend rote Naturstoff Prodigiosin (**1a**) steht im Zentrum des Interesses dieser Arbeit, doch der Weg hin zu diesem Molekül wird aus unterschiedlichen Richtungen beschriftet. Chemie, Biologie und auch Teile der Verfahrenstechnik bieten verschiedene bioökonomische Wege, diese Verbindung und Derivate zu erhalten.

Im Falle des roten Naturstoffs Prodigiosin (**1a**) ist das Schlüsselenzym eine Ligase, die den finalen Schritt zum Prodigiosin katalysiert (Schema 1). Ein Bipyrrrol-Baustein [4-Methoxy-2,2'-bipyrrrol-5-carbaldehyd, MBC, (**2**)] und ein Monopyrrol [2-Methyl-3-*n*-amylpyrrol, MAP, (**3a**)] werden durch die Ligase zum roten Prodigiosin kondensiert, weshalb dieses Enzym auch als Kondensationsenzym bezeichnet wird.<sup>[16]</sup> Ein Fokus dieser Arbeit soll auf der Suche und Identifizierung von Kondensationsenzymen liegen, die bislang noch nicht auf ihre Chemo Selektivität hin untersucht wurden. Diese können den Zugang zu bisher nicht enzymatisch adressierbaren Prodigiosin (**1a**) Derivaten ermöglichen und so zur Generierung neuer Derivate beitragen.



**Schema 1.** Schlüsselschritt der bakteriellen Prodigiosin (**1a**) Synthese, katalysiert durch eine Ligase.

Die Erweiterung des Enzymportfolios soll durch eine Suche nach homologen Proteinen des Kondensationsenzyms PigC aus dem Bakterium *Serratia marcescens* erfolgen, dessen Substratspektrum durch verschiedene Arbeiten bereits bekannt ist.<sup>[17-20]</sup> Die Identifizierung potentiell neuer Kondensationsenzyme sollte durch BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) Analysen und der Betrachtung der Gencluster ermöglicht werden. Bei erfolgreicher Herstellung neuer Kondensationsenzyme in aktiver Form soll eine Charakterisierung der Enzyme mit Hinblick auf das Substratspektrum und kinetische Untersuchungen stattfinden, die durch die chemische Synthese der Vorläufermoleküle und Referenzverbindungen unterstützt und ermöglicht werden soll.

Da aus den Arbeiten der Dissertation von Dr. *Andreas S. Klein* bereits bekannt war, dass unterschiedliche Prodigiosin (**1a**) Derivate zu Bioaktivität verschiedener Ausprägung führen, sollen im Rahmen dieser Arbeit neue Derivate des Naturstoffs **1a** (chemo)enzymatisch erstellt und diese im Kontext von Struktur-Wirkungs-Beziehungen auf ihre biologische Wirkung hin untersucht werden.

Neben der Produktion neuer Prodigiosin (**1a**) Derivate und Testung gegenüber Bakterien und humanen Krebszellen sollte auch die Aufmerksamkeit auf bisher noch nicht untersuchte Testorganismen wie eukaryotische Systeme gelegt und die antimikrobiellen Testungen auf fakultativ humanpathogene Organismen ausgeweitet werden.

Untersuchungen der biologischen Aktivität von Prodigiosin (**1a**) Derivaten bedürfen Substanzmengen im Milligramm-Bereich, sodass eine enzymatische Synthese im größeren Maßstab evaluiert werden sollte. Die unter bioökonomischen Gesichtspunkten vorteilhafte Herstellung von Prodigiosin (**1a**) durch einen Prodigiosin (**1a**) produzierenden *Pseudomonas putida* KT2440 Stamm soll zusätzlich durch Erhöhung der Produkttiter effizienter gestaltet werden. Dies sollte durch Änderung der Kultivierungsparameter erzielt werden.

---

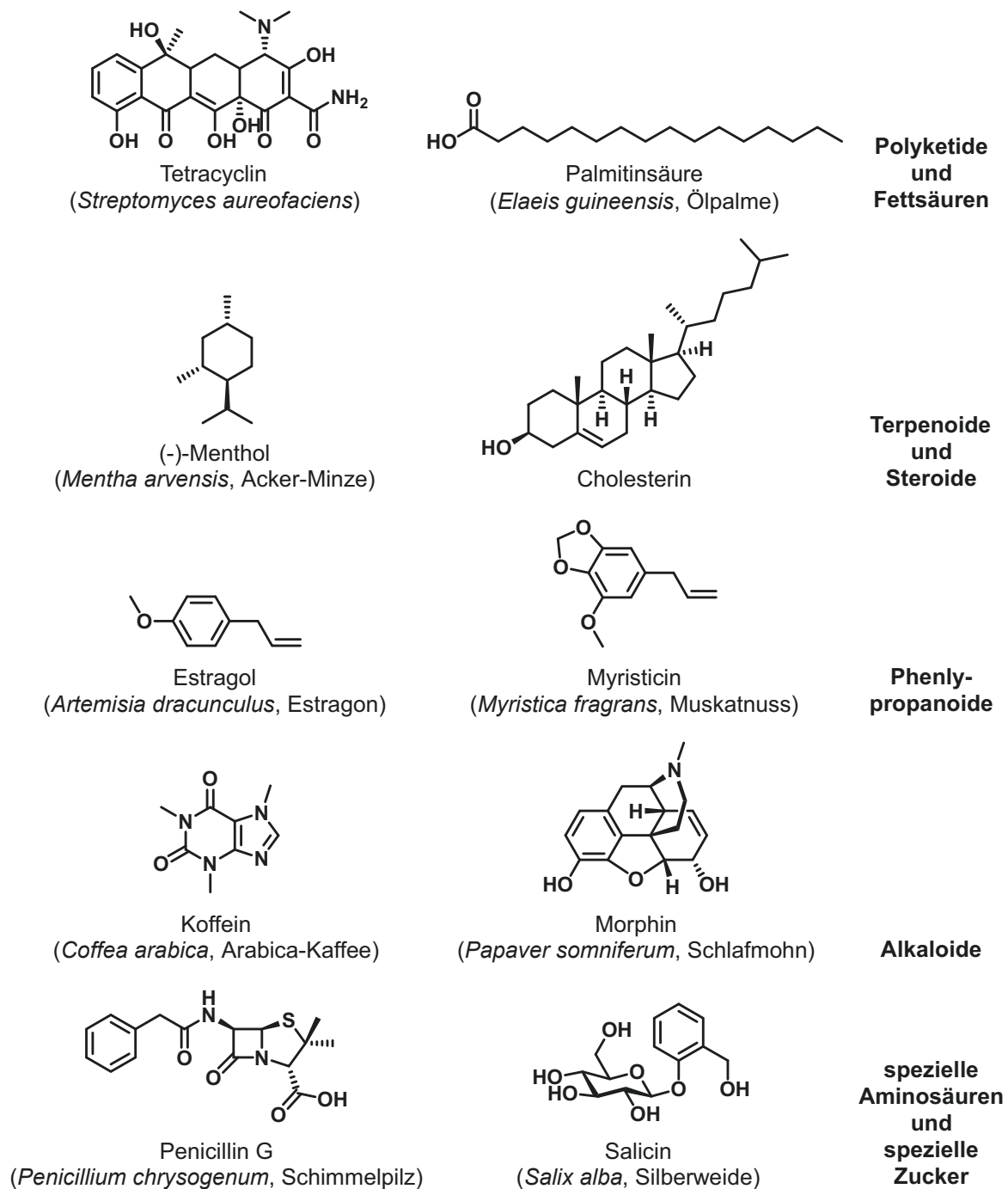
## 5 Kennntnisstand

### 5.1 Naturstoffe – Klassen der Sekundärmetabolite

Jeder lebende Organismus bildet organische Verbindungen, welche als Naturstoffe bezeichnet werden.<sup>[21]</sup> Spielen diese Naturstoffe eine zentrale Rolle im Metabolismus und kommen sie in allen lebenden Zellen vor, so spricht man von Primärmetaboliten. Zu diesen essentiellen Metaboliten gehören u. a. Nukleinsäuren, Aminosäuren und Zucker. Im Gegensatz dazu sind Sekundärmetabolite – eine weitere Gruppe der Naturstoffe – nicht lebensnotwendig für den Organismus. Zwar sind die Sekundärmetabolite nicht unentbehrlich für die produzierenden Organismen, spielen aber trotzdem eine wichtige Rolle im Überleben in der Natur.<sup>[22]</sup> Auch wenn in vielen Fällen die biologische Funktion der Sekundärmetabolite noch nicht bekannt ist, so tragen sie oftmals zur Abwehr von Konkurrenz und Fressfeinden bei, dienen in Form von Duft- oder Farbstoffen als Lockmittel oder können als Hormone fungieren.<sup>[22, 23]</sup> Weithin bekannte Sekundärmetabolite sind z. B. Antibiotika.

Die große und vielfältige Gruppe der Sekundärmetabolite kann in verschiedene Naturstoffklassen gegliedert werden. Diese Unterteilung ist zumeist auf die charakteristischen Strukturelemente der Naturstoffe zurückzuführen, welche durch die Biosynthese der Sekundärmetabolite bedingt sind. Namentlich sind diese Klassen die folgenden: Polyketide und Fettsäuren, Terpenoide und Steroide, Phenylpropanoide, Alkaloide, spezielle Zucker, spezielle Aminosäuren und Peptide (Abbildung 1).<sup>[21]</sup>

Die hohe strukturelle Vielfalt und die Eigenschaft der Sekundärmetabolite einen biologischen Effekt auf andere Organismen zu haben, macht diese Naturstoffe besonders interessant. Sie dienen selbst als Medikamente oder als Inspiration für solche.<sup>[21]</sup> So sind über 40 % aller neu zugelassenen Medikamente (1981–2014) Naturstoffe oder davon abgeleitete Substanzen.<sup>[14]</sup>



**Abbildung 1.** Klassen der Sekundärmetabolite und bekannte Beispiele.

## 5.2 Prodiginine – leuchtend rote Sekundärmetabolite

Aus der großen Vielfalt der Sekundärmetabolite sind Alkaloide diejenigen Naturstoffe, die Anfang des 19. Jahrhunderts als eine der ersten aus Arzneipflanzen isoliert wurden. Viele der weithin geläufigen Alkaloide haben neuroaktive Wirkung, da ihre Struktur Neurotransmittern ähnelt und sie so mit Rezeptoren interagieren können. Morphin, 1806 aus Opium extrahiert, ist eines dieser sicherlich bekannten Alkaloide, bei dem Nutzen und Missbrauch nahe beieinanderliegen. Die aus der Zeit der ersten Isolierungen von Alkaloiden stammende Definition besagt, dass es sich bei diesen um stickstoffhaltige Basen handelt, die mit Säuren Salze bilden, also pflanzliche Alkalisalze oder Alkaloide. Es finden sich viele Möglichkeiten, die Alkaloide zu gruppieren. Mögliche Unterteilung der Alkaloide basieren u.a. auf der Pflanzenquelle, aus denen sie isoliert wurden oder auf der Art des biosynthetischen Ursprungs. Alternativ können Alkaloide auch nach ihrer chemischen Struktur und der Art des Ringsystems klassifiziert werden, welches das Stickstoffatom enthält, wie Tropan-Alkaloide, Indol-Alkaloide oder auch Pyrrol-Alkaloide, um nur einige zu nennen.<sup>[21]</sup> Aus der Naturstoffklasse der Pyrrol-Alkaloide treten die Prodiginine mit ihrer leuchtend roten Farbe hervor, welche mit einigen Ereignissen der Menschheitsgeschichte verknüpft ist.

### 5.2.1 Historie der Prodiginine

Die Geschichte der Prodiginine zieht sich durch viele Jahrtausende der Menschheitsgeschichte. Diese leuchtend (blut)roten Pigmente werden von einigen Proteobakterien wie der Gattung *Pseudomonas* oder *Serratia* produziert sowie von verschiedenen Arten der Gattung *Streptomyces*, die zu den Actinomyceten gehören. Wachsen diese Mikroorganismen nun auf stärkehaltigen Medien wie Brot, entstehen rote Kolonien, die an Blutstropfen erinnern. Viele Berichte, Geschichten und Mythen von Blutwundern erzählen von „blutendem“ Brot oder „blutenden“ Hostien. Eines dieser Hostienwunder soll sich im heutigen Italien im 13. Jahrhundert zugetragen haben. Ein an der Transsubstantiation, der Wandlung von Brot und Wein in Leib und Blut Christi, zweifelnder deutscher Priester habe auf seiner Pilgerreise nach Rom im Jahre 1263 in der Kirche der Heiligen Christina in Bolsena die Messe gefeiert und dabei bemerkt, dass Blut von der Hostie auf das Altarleinen und seine Kleidung tropfte. Dieses Geschehnis legte seine Glaubenszweifel an der Transsubstantiation bei. Papst *Urban IV* bestätigte kurz nach den Geschehnissen in Bolsena die Echtheit dieses Wunders und als Gedenken wurde per päpstlicher Bulle das Fronleichnamfest begründet. Die als „Wunder von Bolsena“ bezeichnete Begebenheit findet sich heute noch verbildlicht als Fresko „Die Messe von Bolsena“ des italienischen Malers Raffaels in der *Stanza di Eliodoro* im Apostolischen Palast im Vatikan. Auch führte das „Wunder von Bolsena“ zum Neubau einer Kirche in der nicht weit entfernten Stadt Orvieto, in welcher das blutbefleckte Altarleinen als Reliquie bis heute aufbewahrt wird.<sup>[13, 24, 25]</sup>

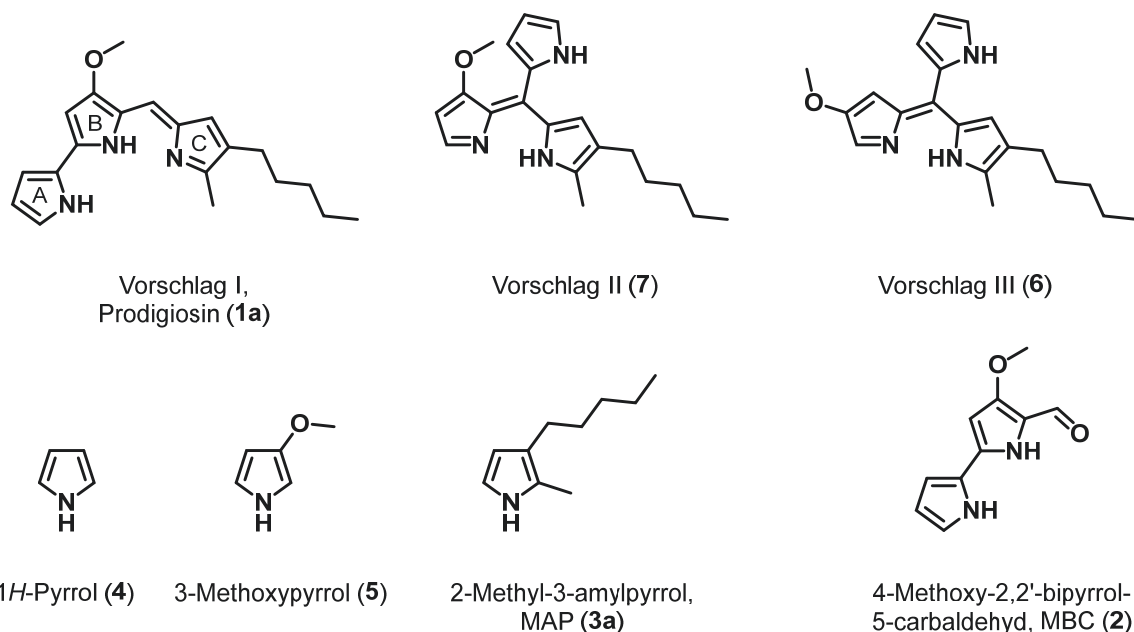
Ebenfalls in Italien, aber erst mehrere hundert Jahre später, wurde das Geheimnis der Blutwunder gelüftet. So untersuchten unabhängig voneinander und nahezu zeitgleich der Pharmazeut *Bartolomeo Bizio* sowie *Pietro Melo*, ein Geistlicher und Botaniker, und der Mediziner *Vincenzo Sette* ein gehäuftes Auftreten von „blutenden“ Lebensmitteln und vermuteten hinter diesem Phänomen einen Keim als Ursache. Zwar wurde fälschlicherweise ein Pilz als Grund angenommen, aber dennoch

wurde nachgewiesen, dass ein lebender Organismus ursächlich für die blutähnlichen Flecken auf den Lebensmitteln war. Bemerkenswert ist, dass die Übertragung des Mikroorganismus von einem Medium zum anderen nachgewiesen werden konnte und systematische Studien zur Auswirkungen äußerer Einflüsse wie z.B. Temperatur auf das Wachstum durchgeführt wurden, ebenso wie Untersuchungen am Mikroskop – all dies in einer Zeit, vor den Arbeiten von *Louis Pasteur* oder *Robert Koch*.<sup>[13, 24]</sup> *Bartolomeo Bizio* benannte den entdeckten Organismus *Serratia marcescens*, wobei *Serratia* zu Ehren von *Serafino Serrati*, einem italienischen Physiker gewählt wurde, während *marcescens* (lat. *marcescere* = welken, erschlaffen) auf die viskose, schleimartige Beschaffenheit der Kolonien zurückzuführen ist. Dieser Name hat sich bis heute durchgesetzt, während andere Benennungen wie u.a. *Monas prodigiosa*, *Bacillus prodigiosus* oder *Bacterium prodigiosum* (lat. *prodigiosus* = wundersam) nicht erhalten blieben. Lediglich die Bezeichnung der Pigmente als Prodigiosin (**1a**) bzw. allgemein als Prodiginine erinnert an diese Namensgebung.<sup>[24]</sup> Ob nun wirklich *S. marcescens* für all die Blutwunder verantwortlich ist, kann jedoch nicht endgültig bewiesen werden. Auch andere Mikroorganismen weisen rote Kolonien auf wie z.B. einige Hefen. Allerdings scheint lediglich das charakteristische und markante dickflüssige Tropfen und Fließen von *S. marcescens* Kolonien zu einer leichten Verwechslung mit Blut zu führen.<sup>[13, 24]</sup>

### 5.2.2 Strukturaufklärung von Prodigiosin (1a) und Struktur von Prodigininen

Prodigiosin (**1a**) wurde in reiner Form erstmalig im Jahre 1929 von *Wrede* und *Hettche* aus *S. marcescens* isoliert.<sup>[26]</sup> *Wrede* und *Hettche* kannten bald die einzelnen Bausteine, aus denen das Pigment Prodigiosin (**1a**) aufgebaut ist, nämlich drei Pyrroleinheiten. Unklar war jedoch in welcher Art und Weise die drei Pyrrolgruppen 1*H*-Pyrrol (**4**), 3-Methoxypyrrol (**5**) und MAP (**3a**) verknüpft sind, sodass drei mögliche Strukturvorschläge von *Wrede* und *Rothhaas* postuliert wurden (Abbildung 2), wobei Vorschlag III (Verbindung **6**) favorisiert wurde.<sup>[16, 27, 28]</sup> Synthetische Bemühungen Strukturvorschlag III (Verbindung **6**) zu verifizieren oder falsifizieren schlugen allerdings fehl. Erst im Jahre 1956 konnten *Santer* und *Vogel* aus einer *S. marcescens* Mutante, deren Prodigiosinbiosynthese unterbrochen war, die MBC (**2**) Einheit isolieren und mittels einer zweiten Mutante zu Prodigiosin (**1a**) umsetzen.<sup>[29]</sup> *Wasserman et al.* publizierten 1960 die Synthese von Prodigiosin (**1a**) durch Umsetzung von MBC (**2**) mit MAP (**3a**) unter sauren Bedingungen.<sup>[30]</sup> Die endgültige Aufklärung der Struktur erfolgte dann Anfang der 1960er Jahre mittels Totalsynthesen und Vergleichen mit dem natürlichen Prodigiosin (**1a**) durch *Rapoport* und *Holden*.<sup>[31]</sup> Diese Synthesen klärten die Struktur von MBC (**2**) in Bezug auf die Position der Methoxygruppe auf und brachten den Beweis, dass Vorschlag I und nicht Vorschlag II (Verbindung **7**) oder III (Verbindung **6**) der tatsächlichen Struktur von Prodigiosin (**1a**) entspricht.<sup>[31-33]</sup>





**Abbildung 2.** Strukturvorschläge von *Wrede* und *Rothhass* für Prodigiosin (**1a**) und Einheiten aus denen **1a** aufgebaut ist.<sup>[28]</sup> Vorschlag I entspricht der tatsächlichen Struktur von Prodigiosin (**1a**).

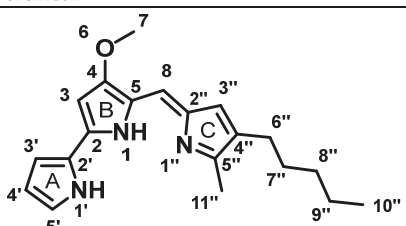
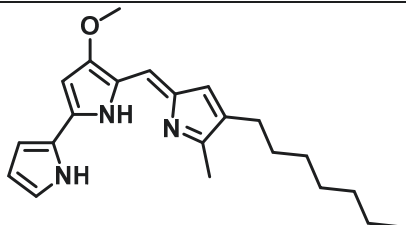
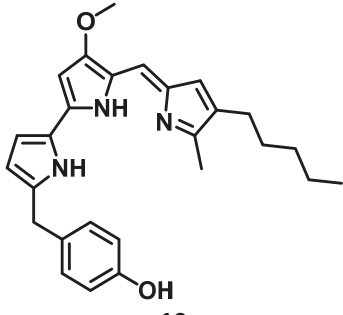
Die Prodigiosinfamilie der Pyrrolalkaloide beinhaltet nicht nur Prodigiosin (**1a**) selbst, sondern auch andere strukturell verwandte Moleküle. Die historisch gewachsene Nomenklatur dieser Verbindungen ist recht inkonsistent und es gibt keine allgemeingültige Übereinkunft über die Benennung.<sup>[13, 34]</sup> In dieser Arbeit wird der von *Gerber et al.* vorgeschlagene Trivialname „Prodiginine“ als Sammelbezeichnung<sup>2</sup> genutzt und nur Prodigiosin (**1a**) selbst als solches bezeichnet, so wie es verbreitet in der Literatur zu finden ist.<sup>[35, 36]</sup> Die Prodiginine besitzen eine Tripyrroleinheit (A-, B-, C-Ring, Abbildung 2), wobei das Pyrrolylpyrromethen-Chromophor eine konstante Einheit (B- und C-Ring, Azafulven) bildet.

Prodiginine werden von einer Vielzahl terrestrischer aber auch mariner Gram-negativer und Gram-positiver Bakterien produziert, darunter finden sich Proteobakterien der Gattungen *Serratia*, *Hahella*, *Pseudoalteromonas* und *Vibrio*. Aber auch viele Gattungen des Phylums der Actinobakterien wie *Streptomyceten*, *Saccharopolyspora* oder *Actinomadura* bilden Prodiginine.<sup>[13, 37]</sup> Strukturelle Diversität innerhalb der Prodiginine natürlicher Herkunft findet sich in erster Linie in Form von Variationen am C-Ring, während A- und B-Ring konserviert sind. In Bezug auf ihre Struktur kann eine Gliederung der Prodiginine in vier große Gruppen vorgenommen werden (Tabelle 1). Eine Gruppe bilden Prodiginine mit unverzweigten Alkylsubstituenten am C-Ring zu denen auch Prodigiosin (**1a**) selbst gezählt wird, welches einen Methyl- und *n*-Pentylrest aufweist. Neben **1a** zählen auch Heptylprodigiosin (**8**) sowie Undecylprodigiosin (**9a**) zu den Prodigininen mit unverzweigten Alkylketten. 2-(*p*-Hydroxybenzyl)-prodigiosin (**10**) ist ein Derivat des Prodigiosins (**1a**) mit Substituentem am A-Ring.<sup>[34, 38-40]</sup> Die Vertreter der verbleibenden drei Gruppen weisen

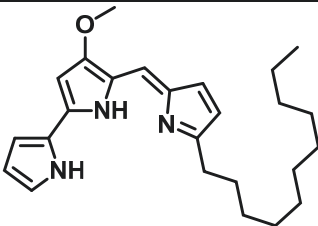
<sup>2</sup> Als Prodiginine werden in dieser Arbeit die Gesamtheit der Moleküle bezeichnet, die eine intakte Tripyrroleinheit wie z.B. der Naturstoff Prodigiosin und dessen Derivate besitzen. Eine allgemeine Molekülnummer wird nicht vergeben.

unterschiedliche zyklische Strukturen auf.<sup>[24, 37]</sup> Viele dieser Strukturen entstehen durch enzymatische Zyklisierungen von Undecylprodigiosin (**9a**), wie bei *Metacycloprodigiosin* (**11**, Streptorubin A) oder Butyl-*meta*-cycloprodigiosin (**12**, Streptorubin B).<sup>[41-45]</sup> Neben beiden vorgenannten Prodigininen zählt auch Prodigiosin R1 (**13**) zur Gruppe der Prodigininen mit Ringbildung zwischen 3''- und 5''-Position des C-Rings.<sup>[46, 47]</sup> Die Ringbildung im Falle von Cycloprodigiosin (**14**) erfolgt dagegen zwischen 3''- und 4''-Position des C-Rings, während bei Cyclononylprodigiosin (**15**) und den verwandten Strukturen **16**, **17** und **18** eine Verknüpfung zwischen A- und C-Ring gebildet wird.<sup>[48-52]</sup> Komplexere Molekülstrukturen zeigen Roseophilin (**19**), Dechlororoseophilin (**20**) sowie Marineosin A (**21**) und B (**22**).<sup>[46, 53, 54]</sup> Auffällig sind hier Halogenierungen, verzweigte Alkylketten, Spirozentren und Substitution des Pyrrolmotivs durch ein Furanmotiv.

**Tabelle 1.** Übersicht über eine Auswahl natürlicher Prodiginine und deren Produzenten. Die Einteilung der Prodiginine erfolgte in Anlehnung an *Bennet et al.*<sup>[24]</sup> Die Informationen stammen aus den Übersichtsartikeln von *Williamson et al.* und *Hu et al.* sowie den entsprechend zitierten Artikeln.<sup>[16, 28]</sup>

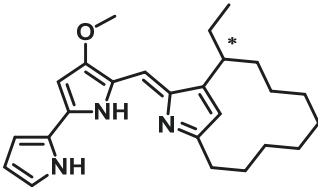
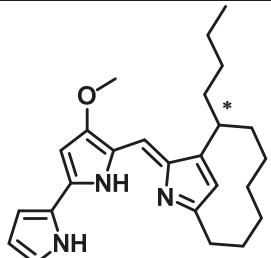
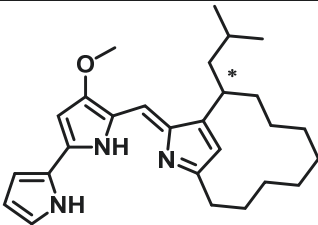
| Geradkettige Alkylsubstituenten                                                                      |                                        |                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Alkylsubstituenten an 4''- und 5''-Position des C-Rings                                              |                                        |                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| Struktur                                                                                             | Name                                   | Produzenten                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|  <p><b>1a</b></p>  | <b>Prodigiosin</b>                     | <i>Serratia</i> 39006 <sup>[55]</sup><br><i>S. marcescens</i> <sup>[56]</sup><br><i>Serratia plymuthica</i> <sup>[57]</sup><br><i>Hahella chejuensis</i> <sup>[58, 59]</sup><br><i>Pseudomonas magnesorubra</i> <sup>[60]</sup><br><i>Vibrio psychoerythreus</i> <sup>[61]</sup> |
|  <p><b>8</b></p>  | <b>Heptylprodigiosin</b>               | <i>Pseudovibrio denitrificans</i> Z143-1 <sup>[38]</sup>                                                                                                                                                                                                                         |
|  <p><b>10</b></p> | <b>2-(p-Hydroxybenzyl)-prodigiosin</b> | <i>Pseudoalteromonas rubra</i> <sup>[34]</sup>                                                                                                                                                                                                                                   |

**Alkylsubstituenten nur an 5"-Position des C-Rings**

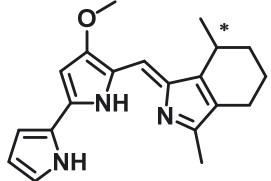
| Struktur                                                                                    | Name                      | Produzenten                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  <p>9a</p> | <b>Undecylprodigiosin</b> | <i>Streptomyces longispororuber</i> <sup>[42]</sup><br><i>Streptoverticillium rubrircetuli</i> <sup>[62]</sup><br><i>Actinomadura madurae</i> <sup>[51]</sup><br><i>Actinomadura pelletieri</i> <sup>[51]</sup><br><i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2) <sup>[63]</sup><br><i>Saccharopolyspora</i> sp. nov. <sup>[64]</sup> |

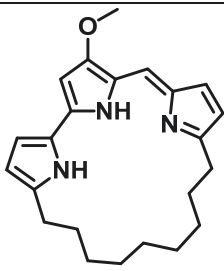
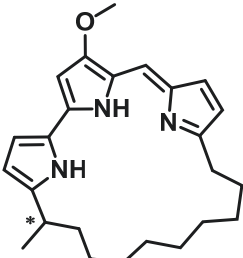
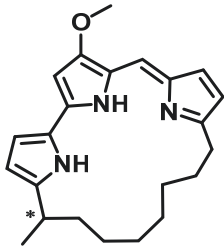
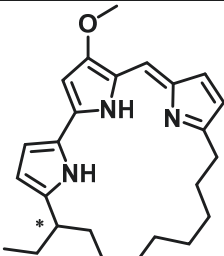
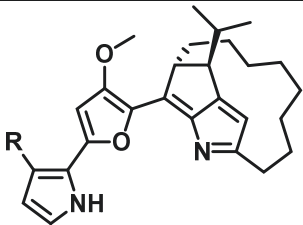
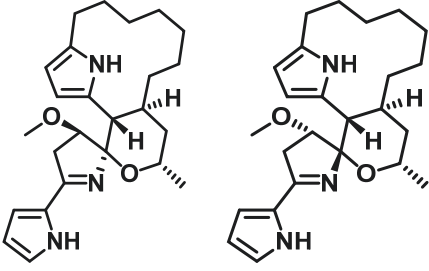
**Zyklische Strukturen**

**Ringbildung zwischen 3"- und 5"-Position des C-Rings**

| Struktur                                                                                      | Name                                                | Produzenten                                                                                                                                                    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  <p>11</p>   | <b>Metacycloprodigiosin (Streptorubin A)</b>        | <i>S. longispororuber</i> <sup>[41, 42]</sup><br><i>S. sp. nov.</i> <sup>[64]</sup>                                                                            |
|  <p>12</p>  | <b>Butyl-meta-cycloprodigiosin (Streptorubin B)</b> | <i>S. coelicolor</i> A3(2) <sup>[45, 65]</sup><br><i>S. sp. nov.</i><br><i>Streptomyces</i> sp. Y-42 <sup>[43]</sup><br><i>S. rubrircetuli</i> <sup>[62]</sup> |
|  <p>13</p> | <b>Prodigiosin R1</b>                               | <i>Streptomyces griseoviridis</i> <sup>[46]</sup>                                                                                                              |

**Ringbildung zwischen 3"- und 4"-Position des C-Rings und Methylgruppe an 5"-Position des C-Rings**

| Struktur                                                                                      | Name                    | Produzenten                                                                                                                                                                                         |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  <p>14</p> | <b>Cycloprodigiosin</b> | <i>Vibrio gazogenes</i><br>(= <i>Benecke gazogenes</i> ) <sup>[48]</sup><br><i>Alteromonas rubra</i> (= <i>P. rubra</i> ) <sup>[66]</sup><br><i>Pseudoalteromonas denitrificans</i> <sup>[67]</sup> |

| Ringbildung zwischen 5''-Position des C-Rings und 5'-Position des A-Rings                                             |                                               |                                                                                               |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|
| Struktur                                                                                                              | Name                                          | Produzenten                                                                                   |
|  <p>15</p>                           | Cyclononylprodigiosin                         | <i>Actinomadura pelletieri</i> <sup>[51]</sup><br><i>Actinomadura madurae</i> <sup>[50]</sup> |
|  <p>16</p>                           | Methylcyclodecylprodigiosin                   | <i>A. pelletieri</i> <sup>[51]</sup><br><i>A. madurae</i> <sup>[51]</sup>                     |
|  <p>17</p>                          | Methylcyclooctylprodigiosin                   | <i>A. madurae</i> <sup>[52]</sup>                                                             |
|  <p>18</p>                         | Ethylcyclononylprodigiosin                    | <i>A. pelletieri</i> <sup>[52]</sup>                                                          |
| Komplexere zyklische Strukturen                                                                                       |                                               |                                                                                               |
| Struktur                                                                                                              | Name                                          | Produzenten                                                                                   |
|  <p>R = Cl (19), R = H (20)</p>    | Roseophilin (19)/<br>Dechlororoseophilin (20) | <i>S. griseoviridis</i> <sup>[46, 68]</sup>                                                   |
|  <p>21                      22</p> | Marineosin A (21) und B (22)                  | <i>Streptomyces</i> sp. CNQ-617 <sup>[54]</sup>                                               |

### 5.2.3 Biologische Aktivität

Die biologische Aktivität der Prodiginine ist äußerst vielfältig und reicht von antibiotischer Wirkung über zytotoxische Effekte z.B. gegenüber Krebszelllinien bis hin zu Immunsuppression, Anti-Malaria Wirkung oder Beeinflussung des Zellzyklus und der Autophagie. In diesem Kapitel werden bei weitem nicht alle Facetten der biologischen Aktivität der Prodiginine beschrieben, sondern lediglich ausgewählte Beispiele präsentiert.

#### Antibiotische Wirkung

Prodiginine weisen ein sehr breites Spektrum antibakterieller und antibiotischer Wirkung auf und wirken gegen eine Vielzahl von Organismen wie Gram-positive und Gram-negative Bakterien, Hefen und Pilze, darunter auch viele Humanpathogene.<sup>[13, 36, 69-79]</sup> Die offenbar enge therapeutische Breite schränkt dabei allerdings die Anwendung als Humanantibiotikum ein, da die toxischen Eigenschaften (vgl. Zytotoxizität) bei effektiver Dosis überwiegen.<sup>[13, 70]</sup> Dennoch wurden die antibiotischen Eigenschaften seit Entdeckung der Prodiginine wiederholt untersucht, auch wenn der Fokus der Forschung häufig vornehmlich auf die zytotoxische Wirkung gelegt wurde.<sup>[70]</sup> Dabei scheint die Wirkung mit der Struktur der Prodiginine verknüpft zu sein. So wird die antibiotische Wirkung von Cycloprodigosin (**14**), der zyklischen Variante von Prodigosin (**1a**), gegenüber *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* und *Candida albicans* im Gegensatz zum linear alkylierten Prodigosin (**1a**) als etwa 1.5× höher beschrieben.<sup>[80]</sup>

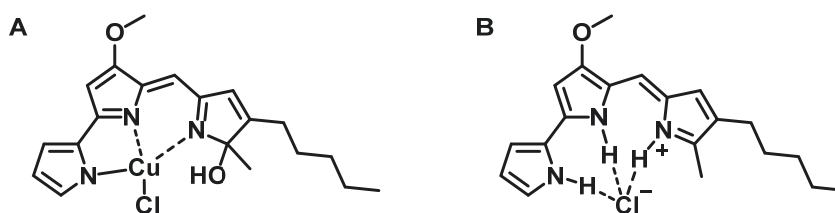
Doch nicht nur Prodiginine alleine haben antibiotische Wirkung, sondern auch Prodigosin (**1a**) in Verbindung mit Biotensiden wie dem ebenfalls von *S. marcescens* produzierten Biotensid Serrawettin W1 hat einen sogar gesteigerten antibakteriellen Effekt gegenüber *Corynebacterium glutamicum*. Neben Serrawettin W1 konnte auch eine kombinatorische inhibierende Wirkung mit anderen Tensiden wie Rhamnolipiden oder besonders ausgeprägt auch mit *N*-Myristoyltyrosin gezeigt werden. So wurde die MIC (engl. *minimal inhibitory concentration*) von Prodigosin (**1a**) im Vergleich zur Kombination von Prodigosin (**1a**) mit *N*-Myristoyltyrosin um drei Größenordnungen gesenkt.<sup>[81]</sup>

#### Zytotoxizität

Wie zuvor erwähnt, wurde ein Augenmerk auf die zytotoxische Wirkung der Prodiginine gelegt, was sich in einer großen Vielzahl an Publikationen zur zytotoxischen Wirkung gegen unterschiedliche Krebszelllinien widerspiegelt, die in dieser Arbeit jedoch nicht resümiert werden. Erwähnt werden sollte dennoch, dass Prodiginine, sowohl natürliche als auch synthetische Derivate, durch das *National Cancer Institute* (Nationales Krebsinstitut, USA) an über 60 Krebszelllinien getestet wurden, die von neun Krebszellarten abstammen. Dabei wurde eine mittlere inhibitorische Konzentration (IC<sub>50</sub>; engl. *inhibitory concentration*) von 2.1 µM für Prodigosin (**1a**) ermittelt.<sup>[13, 70, 82-84]</sup>

Ein Teil der Zytotoxizität der Prodiginine rührt von ihrer DNA-schädigenden Wirkung her. In Anwesenheit von Cu(II)-Ionen können Prodiginine sowohl Einzel- als auch Doppelstrangbrüche induzieren. Die Prodiginine interagieren dabei mit der kleinen Furche der DNA und besitzen eine

Präferenz für AT-reiche Regionen.<sup>[13, 85-88]</sup> Das Kupferion wird von den drei Stickstoffen des Prodiginins koordiniert (Abbildung 3) und durch Oxidation des Pyrrolylpyrromethen-Chromophors (B- und C-Ring) letztlich der DNA-Strangbruch ausgelöst. Das Bipyrrrol MBC (**2**) kann ebenfalls DNA-Strangbruch induzieren, allerdings kommt es nur zu Einzelstrangbrüchen, da für Doppelstrangbrüche das intakte Pyrrolylpyrromethen-Chromophor notwendig ist und MBC (**2**) Kupferionen nicht so effektiv koordiniert wie Prodigine.<sup>[13, 85, 89, 90]</sup> Wird der A-Ring oder B-Ring durch andere Aromaten oder Heteroaromaten ersetzt, mit elektronenziehenden Substituenten modifiziert, oder die Methoxygruppe entfernt, nimmt die Fähigkeit zum DNA-Strangbruch deutlich ab, ebenso wie die Zytotoxizität.<sup>[89, 91, 92]</sup>



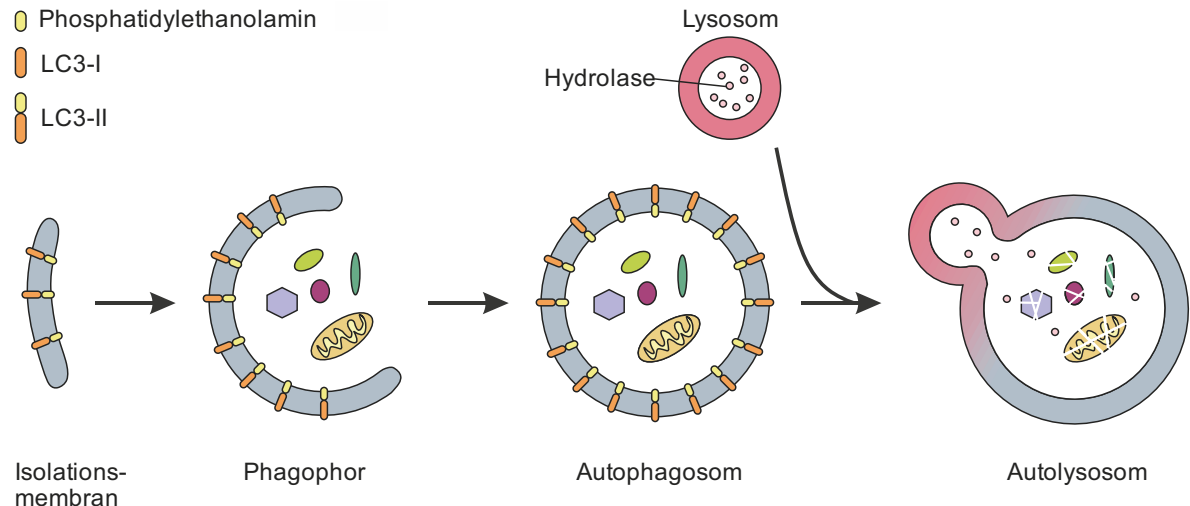
**Abbildung 3.** Prodigiosin (**1a**) bildet mit Anionen und Kationen Komplexe. **A:** Komplexierung von Cu(II)-Ionen durch die drei Stickstoffe des Prodigiosins (**1a**) – hierbei handelt es sich um die DNA-schädigende Struktur mit oxidiertem Pyrrolylpyrromethen-Chromophor (B- und C-Ring). **B:** Prodigiosin (**1a**) kann durch Protonierung als H<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup>-Symporter agieren und den Protonengradienten beeinflussen.

Neben ihrer Fähigkeit DNA-Strangbruch auszulösen, können Prodiginine durch ihre Fähigkeit in protonierter Form Chloridionen zu komplexieren, (Abbildung 3 B) als H<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup>-Symporter agieren. Sowohl der durch Prodiginine vermittelte H<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup>-Symport als auch die biologischen Folgen sind intensiv untersucht worden. Da Prodiginine hydrophobe Moleküle sind, können sie frei durch Membranen diffundieren und in diversen Kompartimenten agieren. So können Prodiginine F-ATPasen entkoppeln wie die bakterielle F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATPase ebenso auch V-ATPasen wie die H<sup>+</sup>-ATPase in Vakuolen. Durch ihre Funktion als H<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup>-Symport verändern Prodiginine den Protonengradienten und den intrazellulären pH-Wert. Eine Änderung im intrazellulären pH-Wert kann letztlich Apoptose auslösen, den programmierten Zelltod.<sup>[87, 88, 93-106]</sup>

### Einfluss der Prodiginine auf die Autophagie

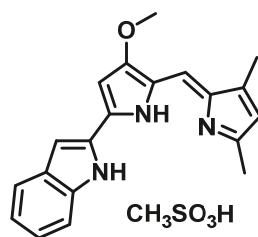
Aminhaltige Moleküle mit einem basischen Stickstoff wie z. B. Prodiginine können eine Alkalisierung der Lysosomen verursachen und so den letzten Schritt des Recyclingprozesses der Autophagie verhindern.<sup>[107]</sup> Autophagie ist ein wichtiger Recycling Mechanismus der Zellen, um toxische Komponenten wie aggregierte Proteine oder beschädigte Zellorganellen zu entfernen, aber auch um Stress in Form von Nährstoffmangel zu überleben. Generell wird Autophagie als nicht selektiver Prozess betrachtet, auch wenn es spezialisierte Arten der Autophagie gibt. Der Autophagieprozess der Makroautophagie (Abbildung 4) beginnt mit Ausbildung der Isolationsmembran, die in einer Reihe von Schritten vergrößert wird, sich letztlich schließt und eine Doppelmembran um cytoplasmatisches Material und Organellen bildet. Dieser Komplex wird Autophagosom genannt. Fusion mit sauren Lysosomen bildet das Autolysosom, in dem die innere Membran des Autophagosoms abgebaut wird

und saure Hydrolasen ins Innere des Autolysosoms entlassen werden. Die Makromoleküle im Inneren werden schließlich degradiert und recycelt und z.B. in Form von Aminosäuren zurück ins Cytoplasma gegeben.<sup>[108-110]</sup> Eine Modulation der Autophagie ist ein Ansatzpunkt für die Behandlung vieler Erkrankungen, wie neurodegenerative Störungen, Stoffwechsel- oder Krebserkrankungen.<sup>[111-113]</sup>



**Abbildung 4.** Stark vereinfachte Übersicht über die Autophagie. Phosphatidylethanolamin wird an das cytoplasmatische Protein LC3-I (Microtubuli assoziiertes Protein 1A/1B-light chain 3) konjugiert und bildet so die lipidierte Form LC3-II (dient als Marker für Autophagosomen), die in die wachsende Membran eingebaut wird. Die zum Abbau markierten Elemente werden vom Phagophor umschlossen, so dass schließlich das Autophagosom entsteht. Das Autophagosom fusioniert mit einem Lysosom zum Autolysosom. In diesem findet schließlich der Abbau der umschlossenen Moleküle einschließlich der LC3-II statt mit anschließender Freisetzung der Abbauprodukte.

Da Prodiginine als  $H^+/Cl^-$ -Symporter agieren und ATPasen wie die  $H^+$ -ATPase in Vakuolen (V-ATPasen) entkoppeln können, sind sie in der Lage eine Neutralisierung von sauren Zellkompartimenten zu verursachen.<sup>[100, 103, 106]</sup> Das synthetische Prodigiosin (**1a**) Derivat Obatoclax (**23**) (Abbildung 5) verursacht die Alkalisierung von Lysosomen und inhibiert so die Autophagie, was einen Aspekt der zytotoxischen Wirkung ausmacht.<sup>[114]</sup>



Obatoclax Mesylat (**23**)

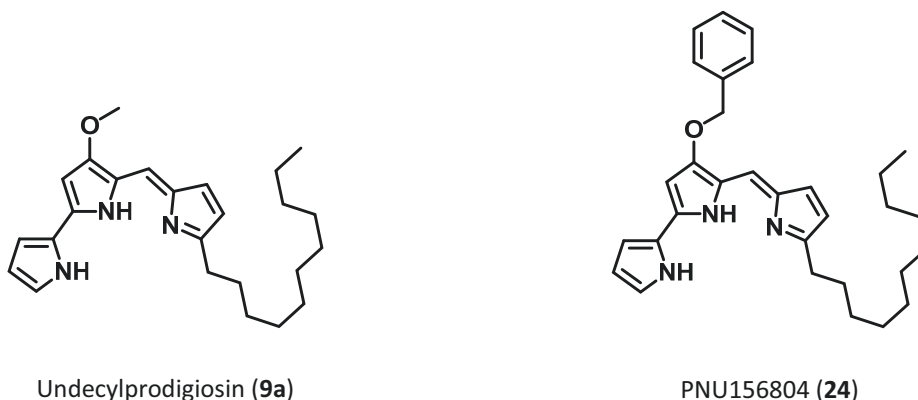
**Abbildung 5.** Das synthetische Prodigiosin (**1a**) Derivat Obatoclax (**23**).

Obatoclax (**23**), entwickelt von der Firma *Gemin X Pharmaceuticals*, wurde in Phase I und II klinischer Studien untersucht als Medikament gegen das Myelodysplastische Syndrom (Erkrankungen des Knochenmarks), das Hodgkin-Lymphom (Tumor des Lymphsystems), die akute myeloische Leukämie (Form der Leukämie) oder gegen kleinzelligen Lungenkrebs.<sup>[114-119]</sup> Über die Inhibierung der Autophagie

durch Alkalisierung der Lysosomen hinaus, ist Obactoclax (**23**) ein BH3 Mimik und somit ein Antagonist von Bcl-2 Proteinen (engl. *B-cell lymphoma 2*), die Regulatoren der Apoptose sind. In dieser Funktion als Inhibitor von Bcl-2 Proteinen bewirkt Obactoclax (**23**) den apoptotischen Zelltod.<sup>[112, 114]</sup>

### Immunsuppressive Wirkung

Immunsuppressiva wie Cyclosporin A, Rapamycin oder FK-506 werden genutzt, um Abstoßung von transplantierten Geweben oder Organen zu unterdrücken und finden Anwendung bei Autoimmunerkrankungen. (Williamson 2007) Verschiedene Prodiginine, darunter auch Prodigiosin (**1a**) und Undecylprodigiosin (**9a**), zeigen immunsuppressive Eigenschaften und blockieren die Proliferation humaner Lymphozyten.<sup>[120-123]</sup> Auch wenn das molekulare Target der Prodiginine nicht klar bekannt ist, so ist doch sicher, dass die Art der Wirkung sich von der bekannter Immunsuppressiva wie Cyclosporin A, Rapamycin oder FK-506 unterscheidet.<sup>[82, 120, 122]</sup> So konnte die Nutzung von Prodigininen zusammen mit herkömmlichen Immunsuppressiva wie Cyclosporin A oder Rapamycin eine synergistische Wirkung zeigen.<sup>[82, 124]</sup> Zwar besitzen die Prodiginine immunsuppressive Wirkung, dennoch ist die Toxizität der Prodiginine durchaus problematisch, so dass eine SAR (engl. *structure-activity-relationship*) Studie durchgeführt wurde, bei der verschiedene synthetische Undecylprodigiosin (**9a**) Derivate untersucht wurden, auf der Suche nach Substanzen mit verbesserter immunsuppressiver Aktivität, bei gleichzeitig niedrigerer Toxizität. Als Leitsubstanz wurde dabei PNU156804 (**24**) identifiziert (Abbildung 6), welches die T-Lymphozyten Aktivierung *in vitro* im Vergleich zu Undecylprodigiosin (**9a**) mit gleicher Effektivität unterdrückt, dabei aber eine geringere Toxizität aufweist.<sup>[82, 122, 123]</sup>



**Abbildung 6.** Struktur von Undecylprodigiosin (**9a**) und dem Derivat PNU156804 (**24**).

Im Gegensatz zu Cyclosporin A verhindert PNU156804 (**24**) nicht die Produktion von Interleukin-2 (IL-2), einem T-Lymphozyten Wachstumsfaktor, jedoch unterbindet es deren biologische Aktivität durch Inhibierung der IL-2 Signaltransduktion. Durch die Prodiginine wird die Phosphorylierung und Aktivierung der Janus-Tyrosin-Kinase 3 inhibiert, so dass die Signalweiterleitung gestört ist und eine Immunantwort über diesen Weg unterbunden wird.<sup>[122, 123, 125]</sup>



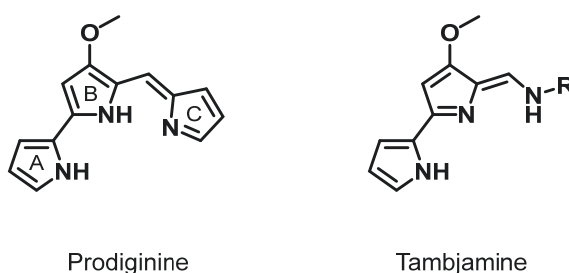
## Anti-Malaria Aktivität

Für eine Vielzahl natürlicher und synthetischer Prodiginine konnte eine Anti-Malaria Wirkung u. a. gegen *Plasmodium falciparum*, dem Erreger der *Malaria tropica*, nachgewiesen werden.<sup>[43, 126-131]</sup> Trotz vielzähliger Versuche Malaria zu bekämpfen, ist Malaria immer noch für viele Todesfälle weltweit verantwortlich. Resistenzen gegen gängige Medikamente wie Chloroquin (**25**) häufen sich und erschweren die Behandlung.<sup>[132]</sup> Daher wurden viele SAR Studien mit natürlichen und synthetischen Prodigininen durchgeführt und die Aktivität der Prodiginine gegenüber *P. falciparum* getestet.<sup>[126, 127, 130]</sup> Dabei zeigte sich u. a., dass ein Entfernen des A-Rings oder ein Austausch des Stickstoffs im A-Ring der Prodiginine eine deutliche Reduktion der Wirksamkeit zur Folge hat, während Änderungen am C-Ring – verschiedene Alkyl- oder Arylsubstituenten – eine Verbesserung erbringen (vgl. Kapitel 5.3.2).<sup>[126, 130]</sup> In vielen Fällen konnte zudem gezeigt werden, dass die wirksame Konzentration der Prodiginine weit unter der toxischen Konzentration liegen. So liegt der IC<sub>50</sub>-Wert von Cycloprodigosin (**14**) gegenüber *P. falciparum* bei 11 nM, während der IC<sub>50</sub>-Wert diverser humaner Zelllinien bei ca. 6–7 µM liegt.<sup>[131]</sup> Auch für Metacycloprodigosin (**11**, IC<sub>50</sub> = 5 ± 1 ng/mL gegenüber *P. falciparum* K1) liegen wirksame Konzentration und zytotoxische Konzentration weit auseinander.<sup>[128]</sup> Über den Wirkmechanismus der Prodiginine ist jedoch bisher nichts bekannt.

## 5.3 Tambjamine

### 5.3.1 Struktur von Tambjaminen

Der Prodigininfamilie strukturell nahe verwandt ist die Familie der Tambjamine<sup>3</sup>. Diese Naturstoffe besitzen wie Prodiginine auch das MBC (**2**) Motiv, allerdings weisen Tambjamine anstelle des dritten Pyrrolrings (C-Ring) ein azyklisches Enamin auf, welches anfällig für Hydrolyse ist (Abbildung 7).<sup>[13, 85, 133]</sup> Im Gegensatz zum dunklen Rot der Prodigininen, aufgrund des Pyrrolylpyrromethen-Chromophors, besitzen Tambjamine eine gelbe Farbe.



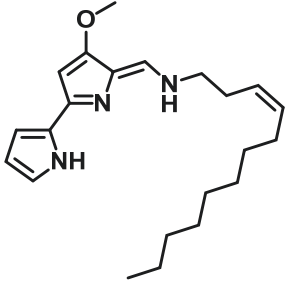
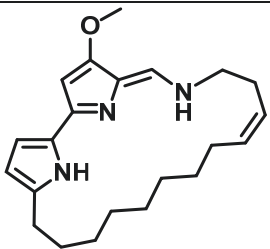
**Abbildung 7.** Grundstruktur der Prodiginine (links) und allgemeine Struktur der Tambjamine (rechts).

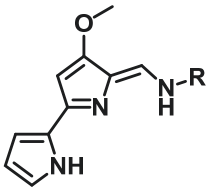
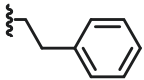
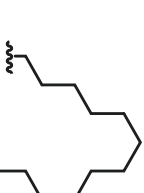
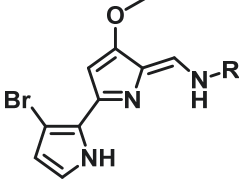
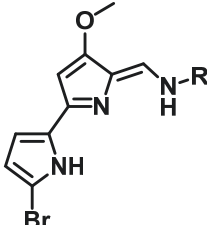
Die strukturelle Diversität der Tambjamine beschränkt sich größtenteils auf diverse verzweigte und unverzweigte Alkylketten sowie eine Alkylphenylgruppe (Tabelle 2).<sup>[134]</sup> Tambjamin YP1 (**26a**) besitzt eine Doppelbindung in der Alkylkette, ebenso wie Tambjamin MYP1 (**26b**) – im Falle von **26b** ist allerdings zusätzlich eine Ringbildung zum A-Ring zu beobachten, ähnlich dem

<sup>3</sup> Aus Gründen der Konsistenz werden Tambjamine ebenfalls nicht mit einer allgemeinen Molekülnummer benannt. Tambjamine bezeichnet in dieser Arbeit die Gesamtheit der Moleküle, deren Grundstruktur in Abbildung 7 dargestellt ist.

Cyclononylprodigiosin (**15**) (Tabelle 1).<sup>[135-137]</sup> Diverse Tambjamine weisen Bromsubstituenten am A-Ring auf. Während Brom und andere Halogene in terrestrischen Systemen nur in Spuren vorkommen, sind die marinen natürlichen Vorkommen deutlich größer, sodass halogenierte und insbesondere auch bromierte Naturstoffe typischerweise von marinen Lebewesen stammen.<sup>[138, 139]</sup> So wurden auch Tambjamine größtenteils aus marinen Organismen (Tabelle 2) isoliert, im Gegensatz zu Prodigininen, die überwiegend aus terrestrischen Mikroorganismen entstammen (Tabelle 1). Viele marine *Invertebrata* wie marine Schnecken (diverse *Nudibranchia*) und Seescheiden (*Ascidacea*) sowie deren Nahrung, Moostierchen (Phylum *Bryozoa*) sind Quelle von Tambjamine-Isolaten.<sup>[140-143]</sup> Ob diese Organismen tatsächlich auch selbst Tambjamine produzieren ist nicht vollständig geklärt. *Pseudoalteromonas tunicata* D2 und *Pseudoalteromonas citrea* hingegen sind Gram-negative Proteobakterien ebenfalls marinen Ursprungs, welche Tambjamine produzieren.<sup>[136, 137, 144, 145]</sup> Neben Bakterien der Gattung *Pseudoalteromonas* findet sich auch ein *Streptomyces* Stamm unter den Tambjamine Produzenten.<sup>[146, 147]</sup>

**Tabelle 2.** Übersicht über natürliche Tambjamine und die Organismen, aus denen sie isoliert wurden bzw. deren Produzenten. Die bakteriellen Produktionsorganismen sind in fett hervorgehoben.

| Tambjamine                                                                                     |                       |                                                   |
|------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|---------------------------------------------------|
| Struktur                                                                                       | Name                  | Produzent bzw. isoliert aus                       |
|  <p>26a</p> | Tambjamine YP1 (26a)  | <i>P. tunicata</i> D2 <sup>[a]</sup> , [135, 136] |
|  <p>26b</p> | Tambjamine MYP1 (26b) | <i>P. citrea</i> <sup>[137]</sup>                 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <div style="display: flex; align-items: center;">  <div style="margin-left: 20px;"> <p><b>26c</b> R = H</p> <p><b>26d</b> R = </p> <p><b>26e</b> R = </p> <p><b>26f</b> R = </p> <p><b>26g</b> R = </p> <p><b>26h</b> R = </p> </div> </div> | <p><b>Tambjamin A (26c)</b><br/> <b>Tambjamin C (26d)</b><br/> <b>Tambjamin E (26e)</b><br/> <b>Tambjamin F (26f)</b><br/> <b>Tambjamin K (26g)</b><br/> <b>Tambjamin BE-18591 (26h)</b><sup>[b]</sup></p> | <p><i>Sessibugula translucens</i>,<br/> <i>Roboastra tigris</i>,<br/> <i>Tambja eliora</i>, <i>Tambja abdere</i><br/>                     [Tambjamin A (<b>26c</b>),<br/>                     Tambjamin C (<b>26d</b>)]<sup>[140]</sup></p> <p><i>Bugula dentata</i><br/>                     [Tambjamin A (<b>26c</b>)]<sup>[141]</sup></p> <p><i>Atapozoa</i> sp.,<br/> <i>Nembrotha cristata</i>,<br/> <i>Nembrotha kubaryana</i><br/>                     [Tambjamin A (<b>26c</b>),<br/>                     Tambjamin C (<b>26d</b>),<br/>                     Tambjamin E (<b>26e</b>),<br/>                     Tambjamin F (<b>26f</b>)]<sup>[142]</sup></p> <p><i>Tambja ceutae</i>, <i>B. dentata</i><br/>                     [Tambjamin K (<b>26g</b>)]<sup>[141]</sup></p> <p><b><i>Streptomyces</i> sp. BA18591</b><br/>                     (BE-18591, <b>26h</b>)<sup>[146, 147]</sup></p> |
| <div style="display: flex; align-items: center;">  <div style="margin-left: 20px;"> <p><b>26i</b> R = </p> <p><b>26j</b> R = </p> <p><b>26k</b> R = </p> </div> </div>                                                                                                                                                                                                                                   | <p><b>Tambjamin D (26i)</b><br/> <b>Tambjamin G (26j)</b><br/> <b>Tambjamin H (26k)</b></p>                                                                                                                | <p><i>S. translucens</i>, <i>R. tigris</i>,<br/> <i>T. eliora</i>, <i>T. abdere</i><br/>                     [Tambjamin D (<b>26i</b>)]<sup>[140]</sup></p> <p><i>B. dentata</i> [Tambjamin G (<b>26j</b>),<br/>                     Tambjamin H (<b>26k</b>)]<sup>[143]</sup></p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| <div style="display: flex; align-items: center;">  <div style="margin-left: 20px;"> <p><b>26l</b> R = H</p> <p><b>26m</b> R = </p> <p><b>26n</b> R = </p> </div> </div>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | <p><b>Tambjamin B (26l)</b><br/> <b>Tambjamin I (26m)</b><br/> <b>Tambjamin J (26n)</b></p>                                                                                                                | <p><i>B. dentata</i> [Tambjamin B (<b>26l</b>),<br/>                     Tambjamin I (<b>26m</b>),<br/>                     Tambjamin J (<b>26n</b>)]<sup>[141, 143]</sup></p> <p><i>S. translucens</i>, <i>R. tigris</i>,<br/> <i>T. eliora</i>, <i>T. abdere</i><br/>                     [Tambjamin B (<b>26l</b>)]<sup>[140]</sup></p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |

<sup>[a]</sup> In der Publikation von *Burke et al.* wird eine aus *P. tunicata* D2 isolierte zyklische Variante des Tambjamins YP1 (**26a**) erwähnt, jedoch nicht weiter beschrieben.<sup>[135]</sup>

<sup>[b]</sup> Zum jetzigen Wissensstand wurde bis *dato* noch kein Buchstabe für Tambjamin BE-18591 (**26h**) vergeben.

### 5.3.2 Biologische Aktivität

Die biologische Aktivität von Prodigininen und Tambjaminen ist grundsätzlich ähnlich, jedoch sind die physiologischen Wirkungen der Tambjamine meist etwas schwächer. Ein grundlegender Unterschied zwischen beiden Naturstoffen wird ersichtlich, wenn man den marinen Ursprung der Tambjamine und deren Produzenten betrachtet. So ist eine der biologischen Funktionen von Tambjaminen die Abwehr von Fressfeinden sowie die *Antifouling* Wirkung, bei der ein Bewuchs durch Bakterien, Algen oder Würmern auf nassen Oberflächen oder Oberflächen unter Wasser verhindert wird.<sup>[13, 148]</sup>

Die biologische Funktion der Tambjamine liegt darin, dass Eukaryoten ohne entsprechende Abwehrmechanismen die von oberflächenassoziierten Bakterien produzierten Metabolite als

Schutzmechanismus nutzen können, um zu verhindern, dass sie von anderen *fouling* Organismen wie u. a. Bakterien, Algen oder Würmern besiedelt werden

### **Antifouling Wirkung und chemische Abwehr von Fressfeinden**

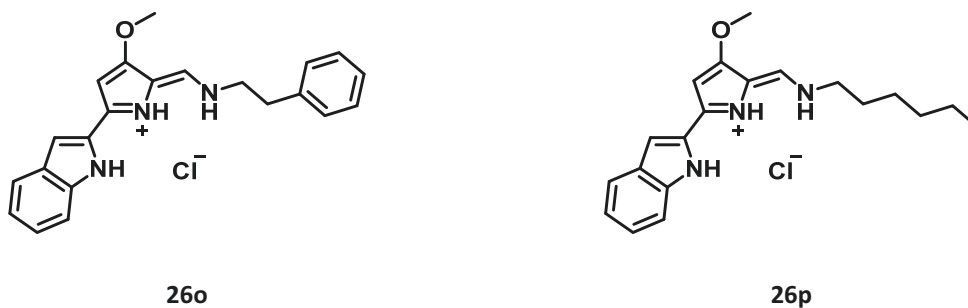
Diverse *Pseudoalteromonas* Stämme wurden von der Oberfläche verschiedener mariner Eukaryoten isoliert und scheinen assoziiert mit ihnen zu wachsen wie z.B. *P. tunicata* D2, welches von der Schlauchseescheide *Ciona intestinalis* (Phylum *Chordata*), einem Manteltier (*Tunicata*), isoliert wurde.<sup>[149]</sup> Neben anderen Sekundärmetaboliten wie Violacein produziert *P. tunicata* D2 Tambjamine YP1 (**26a**), das *antifouling*, also anwuchsverhindernde Eigenschaften aufweist. Die biologische Funktion der Tambjamine liegt darin, dass Eukaryoten ohne entsprechende Abwehrmechanismen die von oberflächenassoziierten Bakterien produzierten Metabolite als Schutzmechanismus nutzen können. So verhindern diese Metabolite einen Bewuchs von anderen *fouling* Organismen wie u. a. Bakterien, Algen oder Würmern. Darüber hinaus kann die Fähigkeit, das Wachstum anderer oberflächenassoziierten Mikroorganismen zu hemmen, *P. tunicata* D2 einen Wettbewerbsvorteil bei der Kolonisierung neuer Oberflächen geben.<sup>[145, 148-150]</sup> Einige Tambjamine scheinen des Weiteren in die chemischen Abwehrmechanismen der Organismen involviert zu sein, aus denen sie gewonnen werden. Im Falle der Tambjamine **26c**, **26d**, **26i** und **26l** (Tambjamine A–D) soll der Tambjamine Produzent *S. translucens* sein, wobei es sich um ein Moostierchen (Phylum *Bryozoa*) handelt. *S. translucens* wird von marinen Schnecken wie *T. eliora* und *T. abdere* (Phylum *Mollusca*, Weichtiere) gefressen. Diese *Nudibranchia* wiederum dienen ihrem Prädator *R. tigris* (= *Tyrannodoris tigris*, Phylum *Mollusca*, Unterordnung *Nudibranchia*), einer marinen Schnecke, die sich von kleineren Arten ernährt, als Nahrung.<sup>[140]</sup> Bei Attacken durch *R. tigris* sekretiert *T. abdere* Tambjamine-haltigen gelben *Mucus*, welcher *R. tigris* oder andere Prädatoren abhält, so dass die Tambjamine hier wohl zur Abwehr von Fressfeinden produziert werden. Auch die Inhibition von Fischen als Fressfeinde konnte für Tambjamine gezeigt werden.<sup>[151]</sup> Ebenso wurden bei den Räuber-Beute-Beziehungen zwischen der Seescheide *Atapozoa* sp. (Phylum *Chordata*) und deren Prädator, den marinen Schnecken *N. cristata*, *N. kubaryana* sowie *B. dentata* (Phylum *Bryozoa*) und deren Prädator *T. ceutae* aus allen Organismen Tambjamine isoliert, die wohl dem Schutz vor Fressfeinden dienen.<sup>[141, 142]</sup> Für das Tambjamine YP1 (**26a**), produziert von *P. tunicata* D2, wurde auch eine toxische und inhibitorische Wirkung gegenüber *Caenorhabditis elegans*, einem Fadenwurm (Phylum *Nematoda*), nachgewiesen. Dieser Fadenwurm zeigt ein angeborenes Vermeidungsverhalten gegenüber u. a. Tambjamine YP1 (**26a**), sodass auch hier wieder die Funktion der Tambjamine als chemische Abwehr von Räubern im Vordergrund zu stehen scheint.<sup>[152]</sup>

### **Antibiotische Wirkung und Zytotoxizität**

Die antibiotische und antimikrobielle Wirkung der Tambjamine wurde vor allem im Hinblick auf die Antifouling Wirkung von Tambjaminen untersucht (s.o.), darüber hinaus wurden Tambjamine aber auch hinsichtlich weiterer antimikrobieller Wirkung erforscht. So inhibieren alle der von Pinkerton et al. untersuchten Tambjamine **26a**, **26d**, **26e**, **26f**, **26h**, **26j**, **26k**, **26m** und **26n** das Wachstum von *E. coli* und *S. aureus* bei niedrigen Konzentrationen nur schwach, aber inhibieren

*Malassezia furfur*, einen humanpathogenen Pilz, stärker. Ebenso konnte eine Inhibierung der Hefe *C. albicans* festgestellt werden.<sup>[153]</sup>

Tambjamine wurden bisher noch nicht so intensiv wie Prodiginine auf ihre Wirkung gegenüber Krebszelllinien und ihre Zytotoxizität hin getestet, dennoch finden sich viele Publikationen, die auch diese biologische Wirkung der natürlichen und unnatürlichen Tambjamine beleuchten.<sup>[134, 141, 147, 153-161]</sup> Im Falle der zwei synthetischen Indol-basierten Tambjamine Analoga **26o** und **26p** (Abbildung 8) wurde der zytotoxische Effekt und der induzierte Zelltod in verschiedenen humanen Lungenkrebszelllinien und Mausmodellen untersucht sowie der putative zugrunde liegende molekulare Mechanismus. Die IC<sub>50</sub>-Werte lagen dabei unter den Werten für Cisplatin, einem Chemotherapeutikum, welches Anwendung bei Patienten mit Lungenkrebs findet. Der induzierte Zelltod erfolgt durch Apoptose, die wahrscheinlich durch p38-mitogenaktivierte Proteinkinasen und reaktive Sauerstoffspezies (engl. *reactive oxygen species*, ROS) induziert wird.<sup>[160]</sup>



**Abbildung 8.** Struktur der synthetischen Tambjamine Derivate **26o** und **26p** mit zytotoxischer Wirkung gegenüber verschiedenen humanen Lungenkrebszelllinien sowie von Lungenkrebspatienten stammende Primärkulturen. Die IC<sub>50</sub>-Werte lagen bei 3–10 µmol/L.<sup>[160]</sup> [Untersuchte Zelllinien: A549 (Adenokarzinom), DMS53 (kleinzelliges Bronchialkarzinom), SW900 (Plattenepithelkarzinom), H460 (Großzelliges Bronchialkarzinom)].

Auch ein Einfluss auf die Autophagie und die Mitophagie, eine Form der Autophagie, bei welcher hauptsächlich Mitochondrien abgebaut werden, konnte für andere Tambjamine Analoga gezeigt werden. So scheinen die Tambjamine Derivate das zelluläre Ionen-Gleichgewicht zu stören, so mitochondriale Dysfunktion zu induzieren sowie eine Entsäuerung der Lysosomen hervorzurufen, was letztendlich zu Nekrose in Lungenkrebszelllinien und Krebsstammzellen führt.<sup>[154, 162]</sup>

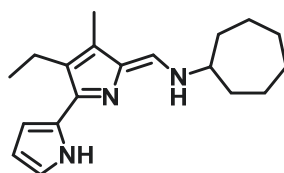
Die Grundlagen für die zytotoxische und antibiotische Wirkung der Tambjamine ähneln denen der Prodiginine sehr stark. Ebenso wie Prodiginine (Kapitel 5.2.3) können Tambjamine in der Anwesenheit von Cu(II)-Ionen oxidativen DNA-Strangbruch herbeiführen, und auch sie interkalieren mit der kleinen Furche an AT-Regionen.<sup>[85, 163]</sup> Allerdings induzieren Tambjamine lediglich Einzelstrangbrüche, was auf die schwächere Bindung von Kupfer zurückgeführt werden kann.<sup>[90]</sup> Nicht nur Prodiginine, sondern auch Tambjamine – natürliche und synthetische Derivate – agieren als Ionophore und vermitteln Anionentransport über Membranen mit vergleichbaren biologischen Folgen, wie Veränderung des intrazellulären pH-Wertes und schlussendlich Apoptose.<sup>[154, 157, 158]</sup>

### Immunsuppressive Wirkung

Die immunsuppressive Wirkung von Prodigininen durch Unterbindung der Proliferation von Lymphozyten wurde vielfach beschrieben (vgl. Kapitel 5.2.3), aber auch für das Tambjamine BE-18591 (**26h**) (Tabelle 2) wurde eine Inhibierung der Lymphozyten Proliferation in der Milz von Mäusen gezeigt. Allerdings war die wirksame Konzentration um eine Größenordnung höher verglichen mit Undecylprodigiosin (**9a**), ebenso konnte für Tambjamine **26h** im Vergleich nur eine geringere Spezifität gegenüber Lymphozyten Mitogenen nachgewiesen werden. Auch der genaue Wirkmechanismus von Tambjamine BE-18591 (**26h**) ist bisher unbekannt.<sup>[161]</sup>

### Anti-Malaria Aktivität

Im Zuge einer SAR Studie zur B-Ring Funktionalisierung von Prodigininen und der Auswirkung auf die Wirksamkeit dieser Derivate gegenüber *P. falciparum* wurden Tambjamine und ebenfalls eine Vielzahl an nicht natürlichen Derivaten synthetisiert. Die Anti-Malaria-Aktivität von Tambjaminen war bis zu diesem Zeitpunkt noch nicht untersucht worden. *Kancharla et al.* konnten zeigen, dass ein Ersetzen des C-Rings der Prodiginine durch ein Alkyl- oder Cycloalkylamin – also dem typischen Strukturmotiv der Tambjamine – zu gleichbleibender oder verbesserte Anti-Malaria Aktivität führt. Ein synthetisches Tambjaminderivat mit der Bezeichnung KAR425 (**26q**, Abbildung 9), wies sogar deutlich bessere Wirksamkeit auf, als bisher für jedes Prodiginin beobachtet werden konnte. KAR425 (**26q**) führte in Malaria infizierten Mäusen letztlich zu einem 100%igen Schutz sowie zur Heilung.<sup>[127]</sup>

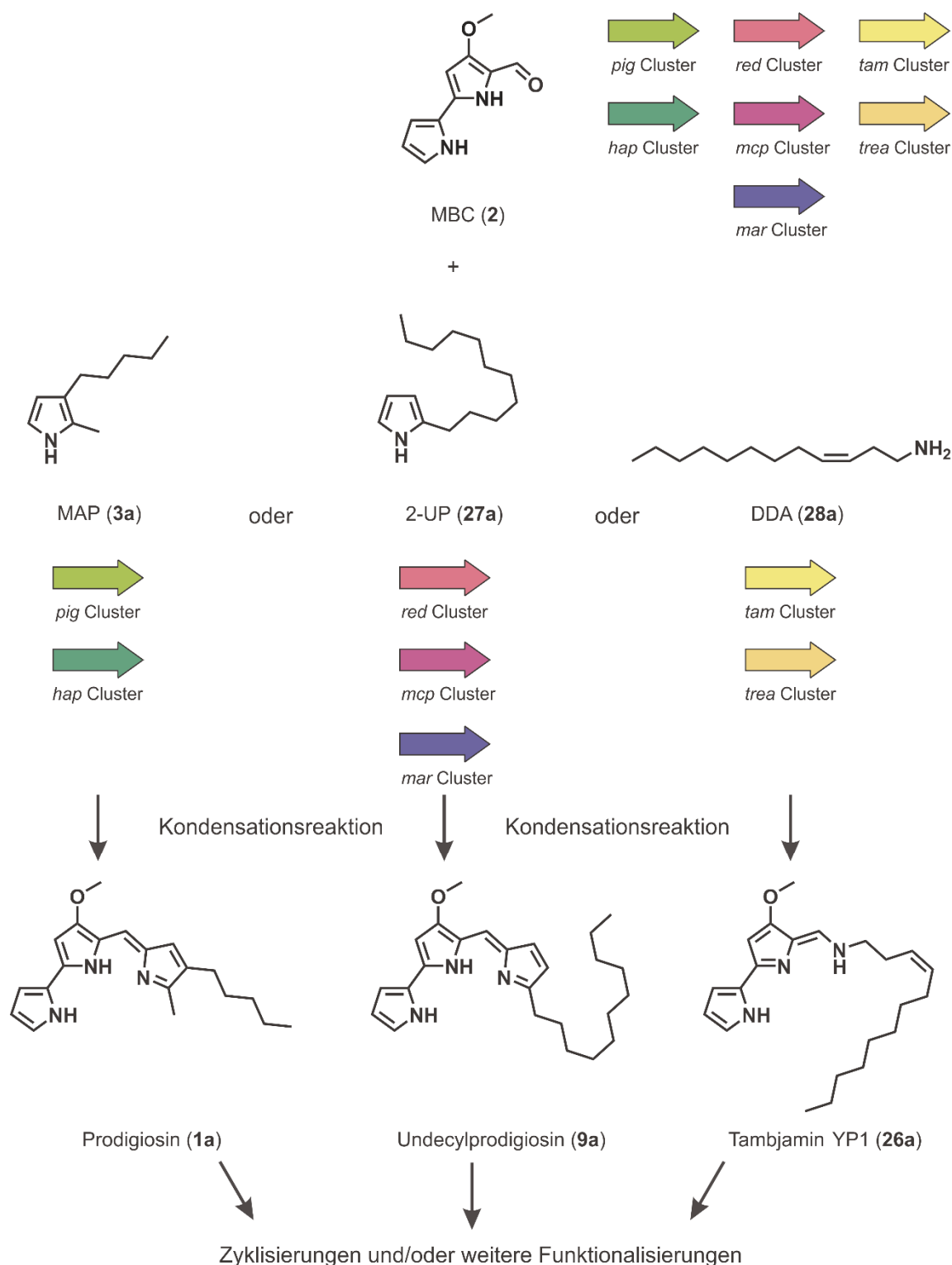


**26q**

**Abbildung 9.** Struktur des Tambjaminderivats KAR425 (**26q**), welches Anti-MalariaAktivität aufweist.<sup>[127]</sup>

## 5.4 Biosynthese von Prodigininen und Tambjaminen

### 5.4.1 Übersicht über die Biosynthese von Prodigininen und Tambjaminen



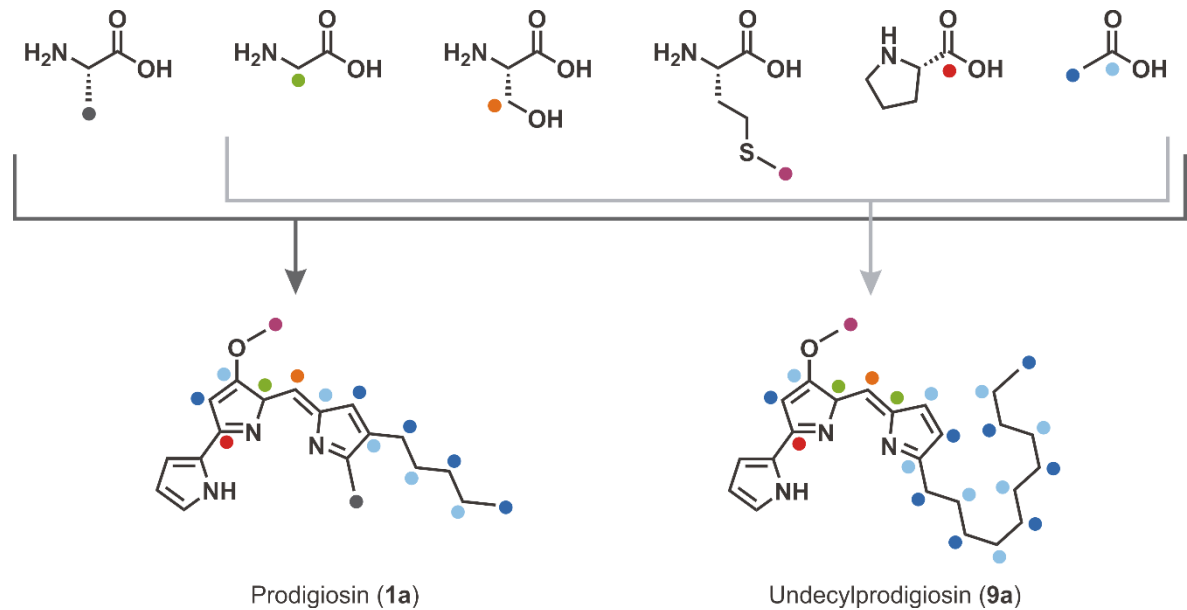
**Abbildung 10.** Überblick über die Biosynthese von Prodigininen und Tambjaminen anhand ausgewählter Beispiele. [*pig* Cluster: *S. marcescens*, *hap* Cluster: *H. chejuensis*, *red* Cluster: *S. coelicolor* A3(2), *mcp* Cluster: *S. longispororuber* (Gencluster noch nicht vollständig benannt), *mar* Cluster: *S. sp.* CNQ 617, *tam* Cluster: *P. tunicata* D2, *trea* Cluster: *P. citrea*]<sup>[19, 20, 37, 44, 45, 59, 135, 137, 164-177]</sup>

Die strukturellen Ähnlichkeiten der Prodiginine untereinander, als auch zu Tambjaminen, liegt in der modularen, verzweigten Biosynthese beider Verbindungen begründet. Ein Überblick über die finalen Schritte der Biosynthese von Prodigininen und Tambjaminen ist in Abbildung 10 dargestellt. So weisen nicht nur Prodiginine, sondern auch Tambjamine das MBC (**2**) Strukturmotiv auf, dessen Biosynthese in gleicher Weise in den verschiedenen Organismen abläuft (5.4.3). In der Kondensationsreaktion (5.4.7) zum Naturstoff können nun verschiedene Monopyrrole wie MAP (**3a**) (5.4.4) oder 2-Undecylpyrrol (**27a**, 2-UP) (5.4.5) oder bei Tambjaminen primäre Amine wie Dodec-3-en-1-amin (**28a**, DDA) (5.4.6) mit MBC (**2**) verknüpft werden. Entsprechend der strukturellen Unterschiede des Edukts der Kondensationsreaktion mit **2** unterscheiden sich die Biosynthesen folglich untereinander. Innerhalb der Prodigiosin (**1a**), Undecylprodigiosin (**9a**) oder Tambjamin produzierenden Organismen finden sich jedoch Gencluster mit homologen Enzymen. Die Produkte der enzymatisch katalysierten Kondensation von MBC (**2**) mit Pyrrolen bzw. Aminen können je nach Gencluster und Organismus noch weiter modifiziert werden. Sowohl Zyklisierungsreaktionen durch Rieske-Nicht-Häm-Eisen-Oxygenasen (Kapitel 5.4.8) als auch weitere Funktionalisierungen können erfolgen.<sup>[16, 19, 20, 37, 44, 45, 59, 135, 137, 167-169, 172, 176, 177]</sup>

#### 5.4.2 Aufklärung der Biosynthese von Prodigininen

Aufgrund der ursprünglichen Annahme, dass Prodigiosin (**1a**) eine Tripyrrylmethanstruktur besitzt (Abbildung 2), vermutete man eine ähnliche Biosynthese von Prodigiosin (**1a**) und Porphyrin.<sup>[28, 56, 178]</sup> Diese Hypothese wurde jedoch später widerlegt, da Zufütterung von radioaktiv markierter 5-Aminolävulinsäure, einem wichtigen Intermediat in der Porphyrin Biosynthese, zu *S. marcescens* nicht zum Einbau der Markierung in Prodigiosin (**1a**) führte.<sup>[16, 179]</sup> Die Isolierung von MBC (**2**) aus Prodigiosin (**1a**) defizienten *S. marcescens* Mutanten und die Erkenntnis, dass **1a** über einen gegabelten Biosyntheseweg hergestellt wird sowie die Markierungsexperimente von Wasserman *et al.* führten schließlich zur Aufklärung der Biosynthese von Prodigiosin (**1a**) und Undecylprodigiosin (**9a**).<sup>[16, 29, 42, 180, 181]</sup> So ergab die Nutzung <sup>13</sup>C- und <sup>14</sup>C-markierter *Precursor*, dass die A-Ringe von Prodigiosin (**1a**) und Undecylprodigiosin (**9a**) aus L-Prolin stammen, wohingegen die B-Ringe aus L-Serin, Acetat und der Methylgruppe aus L-Methionin hervorgehen (Abbildung 11). Im Falle der C-Ringe von Prodigiosin (**1a**) und Undecylprodigiosin (**9a**) unterscheiden sich die Markierungsmuster allerdings, da dieser bei Prodigiosin (**1a**) aus Acetat und L-Alanin Einheiten aufgebaut wird, bei Undecylprodigiosin (**9a**) hingegen aus Acetat und Glycin.<sup>[16, 42, 180]</sup>

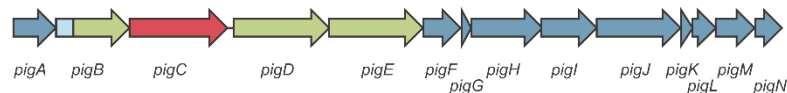




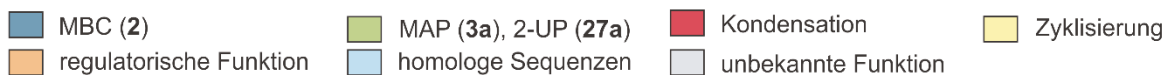
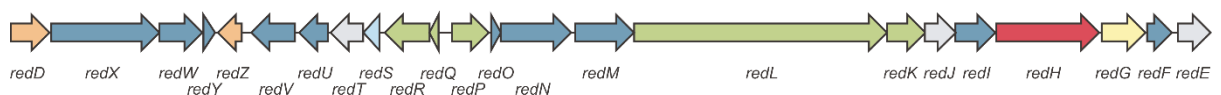
**Abbildung 11.** Muster des Einbaus von Metaboliten in der Biosynthese von Prodigiosin (1a) und Undecylprodigiosin (9a), welches von Wasserman *et al.* bestimmt wurde.<sup>[42, 180]</sup> Die farbigen Punkte entsprechen <sup>13</sup>C- oder <sup>14</sup>C-Markierungen der Metabolite. Abbildung in Anlehnung an Hu *et al.*<sup>[16]</sup>. [grau = L-Alanin; grün = Glycin; orange = L-Serin; violett = L-Methionin; rot = L-Prolin; hell- und dunkelblau = Acetat].

Die spätere Entdeckung des *red*- und nachfolgend des *pig*-Genclusters (Abbildung 12) durch neuere molekularbiologische und biochemische Methoden und Studien belegen ebenso die homologe Biosynthese von MBC (2), aber den unterschiedlichen biosynthetischen Aufbau von MAP (3a) und 2-UP (27a). Auch die Funktion der beteiligten Enzyme konnte entschlüsselt werden.<sup>[19, 37, 167, 172, 182]</sup>

#### *S. marcescens* WW4



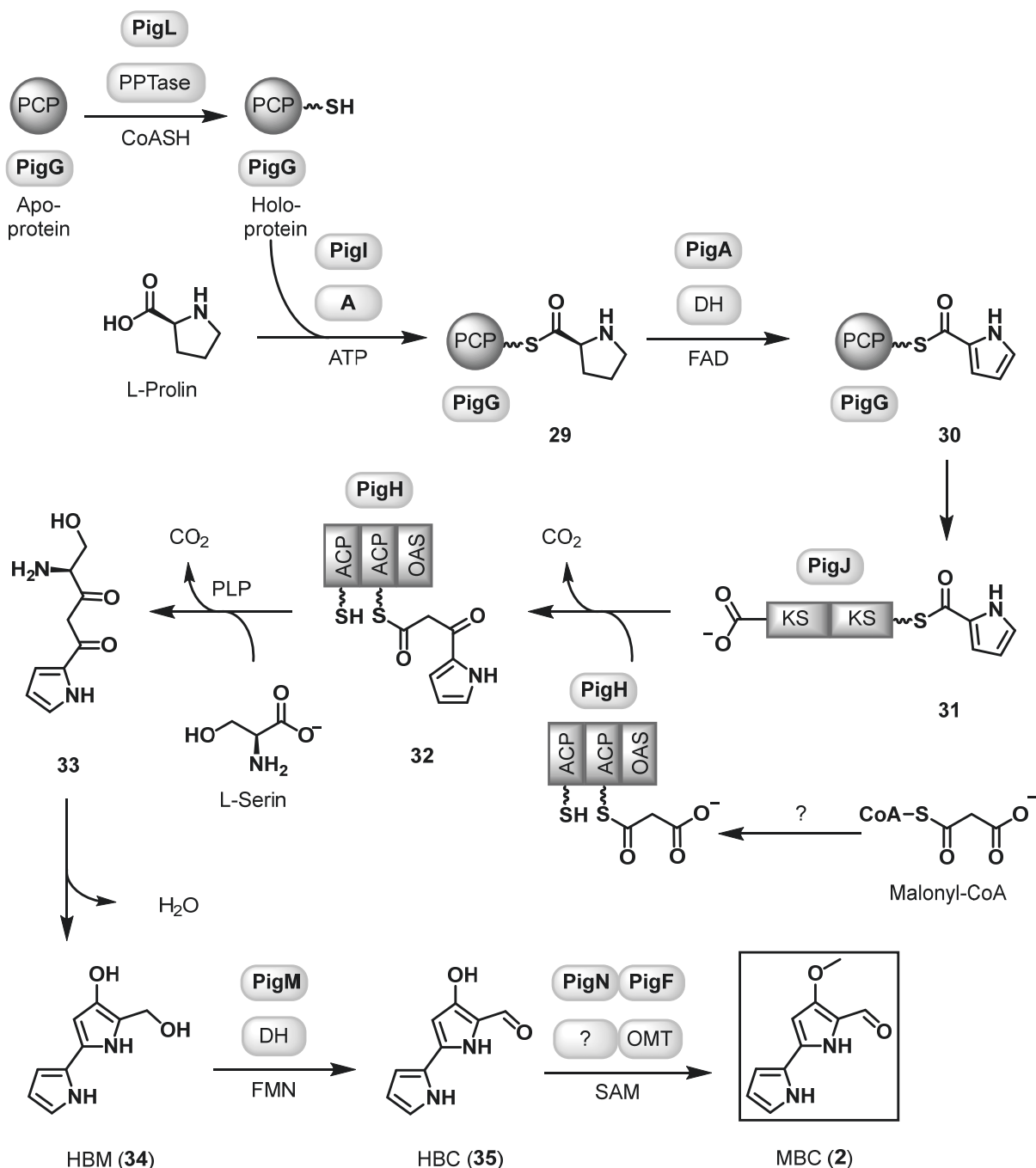
#### *S. coelicolor* A3(2)



**Abbildung 12.** Vergleich des *pig*-Genclusters aus *S. marcescens* WW4 und des *red*-Genclusters aus *S. coelicolor* A3(2). *S. marcescens* produziert Prodigiosin (1a), während *S. coelicolor* A3(2) Undecylprodigiosin (9a) herstellt.

### 5.4.3 Biosynthese von 4-Methoxy-2,2'-bipyrrol-5-carbaldehyd (2, MBC)

Im Folgenden wird die Biosynthese von MBC (**2**) exemplarisch anhand der Enzyme des *pig* Clusters aus *S. marcescens* beschrieben (Schema 2), ist aber aufgrund der homologen Enzyme sicher ebenso gültig für andere Prodiginine und Tambjamine produzierenden Organismen wie z.B. *S. coelicolor* A3(2) (*red* Cluster), *H. chejuensis* (*hap* Cluster) oder *P. tunicata* D2 (*tam* Cluster).

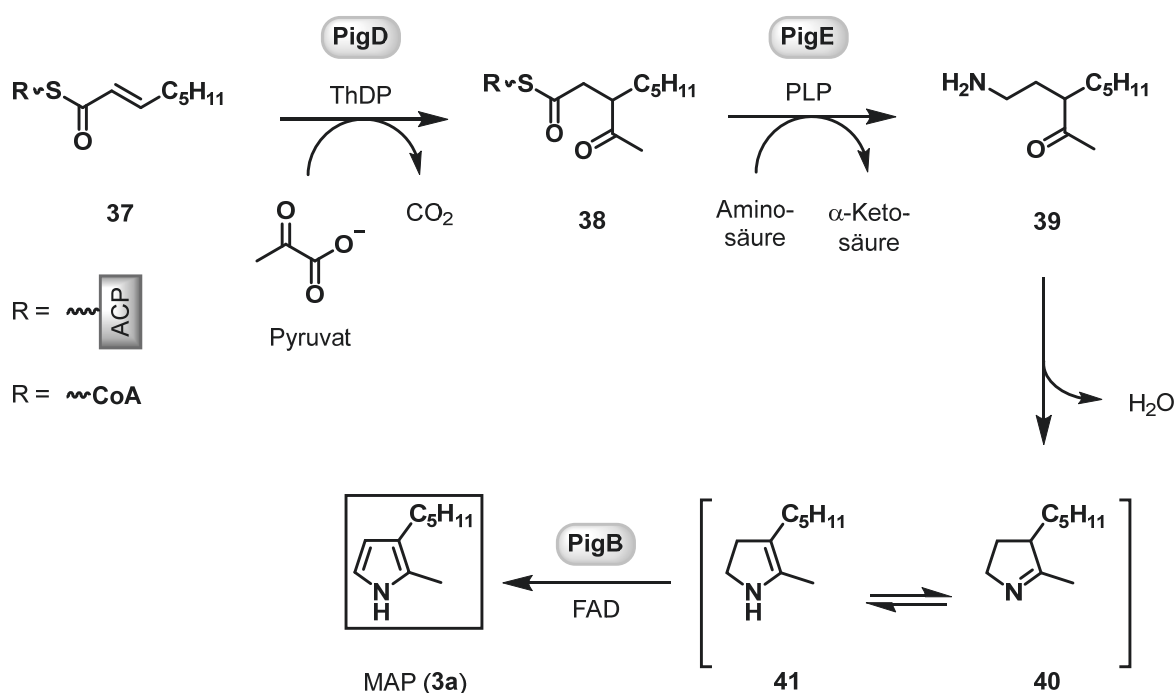


**Schema 2.** Übersicht über die Biosynthese von MBC (**2**). Gezeigt sind nur die Enzyme des *pig* Clusters von *S. marcescens*. Ein Überblick über homologe Enzyme ist in Kapitel 9.1, Tabelle A 1–Tabelle A 5 zu finden. [Abbildung modifiziert nach <sup>[17]</sup>; A = Adenylierungsdomäne einer nichtribosomalen Peptidsynthetase NRPS; ACP = Acyl-Carrier Protein; DH = Dehydrogenase; ATP = Adenosintriphosphat; CoA = Coenzym A; FAD = Flavin-Adenin-Dinukleotid; FMN = Flavinmononukleotid; KS = Ketosynthase; OAS = PLP-abhängige  $\alpha$ -Oxamin-Synthase; OMT = O-Methyltransferase; PCP = Peptidyl-Carrier Protein; PLP = Pyridoxalphosphat; PPTase = Phosphopantetheinyl Transferase; SAM = S-Adenosylmethionin]

Die Biosynthese von MBC (**2**) beginnt mit der Aktivierung von L-Prolin als Thioester und der darauffolgenden Umwandlung in das entsprechende Pyrrol. Dafür wird zunächst eine Phosphopantetheinyl-Domäne auf das Enzym PigG übertragen, katalysiert durch eine Phosphopantetheinyl Transferase (PPTase), sodass PigG von seiner inaktiven Apoform in die aktive Holoform überführt wird. PigI, eine eigenständige Adenylierungsdomäne einer nichtribosomale Peptidsynthetase (NRPS), aktiviert L-Prolin unter Adenosintriphosphat (ATP) Verbrauch und überträgt die L-Prolyl Gruppe auf die Thiolgruppe der Phosphopantetheinyl Domäne des Peptidyl-Carrier Proteins (PCP) von PigG. Die Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD)-abhängige Dehydrogenase PigA katalysiert im Folgenden die Oxidation des L-Prolylthioester (**29**) zum Pyrrolylthioester (**30**). Die Kettenverlängerung von Verbindung **30** im nächsten Schritt erfolgt vergleichbar zu Ketosynthasen (KS) und Acyl-Carrier Proteinen (ACP) in Polyketidsynthasen (PKS) und startet mit Transfer des Pyrrolylthioester (**30**) von PigG auf PigJ. Darauf folgend wird die Malonylgruppe von Malonyl-CoA auf eines der ACPs von PigH übertragen. Unter Decarboxylierung wird die Malonylgruppe auf den Pyrrolylthioester (**31**) übertragen und bildet so einen Pyrrolyl-β-ketothioester (**32**). Die putative Pyridoxalphosphat (PLP)-abhängige α-Oxoamin-Synthase (OAS) von PigH katalysiert die decarboxylative Kondensation von L-Serin mit dem PigH gebundenen Pyrrolyl-β-ketothioester (**32**) zum Intermediat **33**. Durch nachfolgende Zyklisierung, Dehydratisierung und Tautomerisierung wird 4-Hydroxy-2,2'-bipyrrol-5-methanol (**34**, HBM) gebildet. Die Flavinmononukleotid (FMN)-abhängige Dehydrogenase PigM oxidiert den primären Alkohol des HBMs, sodass 4-Hydroxy-2,2'-bipyrrol-5-carbaldehyd (**35**, HBC) entsteht. Im finalen Schritt wird die Hydroxygruppe von **35** durch PigF, eine S-Adenosylmethionin-abhängige O-Methyltransferase (OMT), methyliert, was in der Bildung von MBC (**2**) resultiert. Die genaue Funktion von PigN ist bisher ungeklärt, allerdings wird vermutet, dass dieses Enzym ebenfalls an der Methylierung beteiligt ist, da in PigN-defizienten Mutanten Norprodigiosin (**36**) akkumuliert, dem Kondensationsprodukt aus HBC (**35**) und MAP (**3a**). Somit scheint PigN eine – wenn auch unbekannte – Rolle in der Bildung von MBC (**2**) zu spielen.<sup>[16, 37, 169]</sup> Erwähnenswert ist, dass in *S. coelicolor* A3(2) jedoch nur das PigF Homolog RedI an der Transformation von HBC (**35**) zu MBC (**2**) beteiligt zu sein scheint, nicht jedoch das PigN Homolog RedF.<sup>[19, 45]</sup>

#### 5.4.4 Biosynthese von 2-Methyl-3-*n*-amylpyrrol (3a, MAP)

Für die Biosynthese von MAP (**3a**) in *S. marcescens*, dargestellt in Schema 3, sind lediglich drei Enzyme nötig – PigD, PigE und PigB –, die jeweils Homologe in *H. chejuensis* haben, sodass die Biosynthese in diesem Organismus wohl analog erfolgt. Unter decarboxylativer Kondensation wird Pyruvat im ersten Schritt auf den 2-Octenoylthioester **37** übertragen, katalysiert in einer enzymatischen *Stetter* Reaktion durch PigD, ein Thiamindiphosphat (ThDP)-abhängiges Enzym.<sup>[183]</sup> Nachfolgend katalysiert die PLP-abhängige Transaminase PigE die Transaminierung des  $\gamma$ -Ketothioesters **38** zum Aminoketon **39**, welches spontan zyklisiert und unter Wasserabspaltung Dihydropyrrol **40** bildet. Abschließend wird das Enamintautomer von Verbindung **41** von der FAD-abhängigen Oxidase PigB zu MAP (**3a**) oxidiert.<sup>[16, 37]</sup>

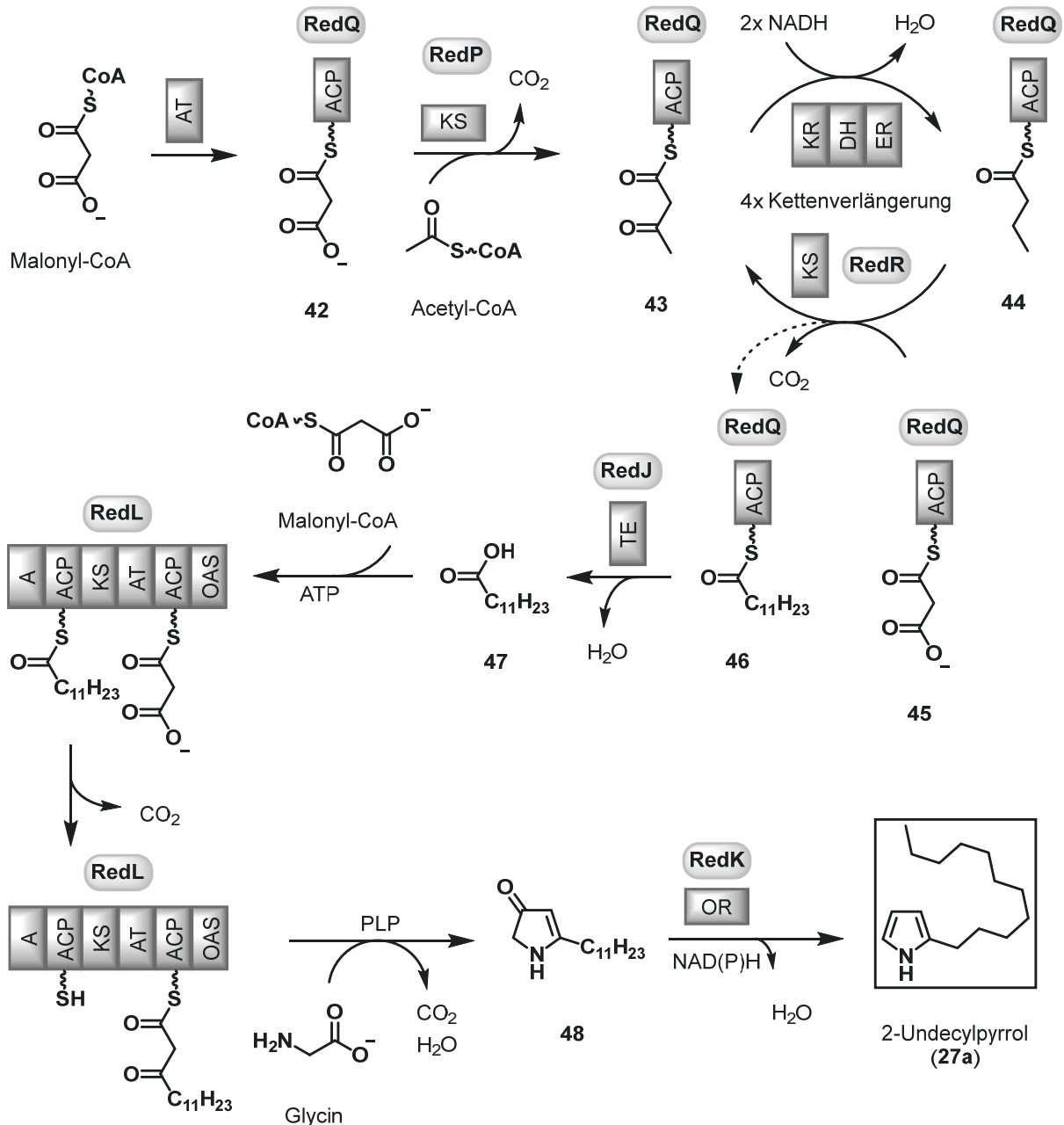


**Schema 3.** Übersicht über die Biosynthese von MAP (**3a**) durch Enzyme des *pig* Clusters (*S. marcescens*). [Abbildung modifiziert nach <sup>[17]</sup>; ACP = Acyl-Carrier Protein; CoA = Coenzym A; FAD = Flavin-Adenin-Dinukleotid; PLP = Pyridoxalphosphat; ThDP = Thiamindiphosphat]

#### 5.4.5 Biosynthese von Undecylpyrrol (27a, 2-UP)

Die Biosynthese von 2-Undecylpyrrol (**27a**), dargestellt in Schema 4, beginnt mit der Übertragung von Malonyl-CoA auf das ACP von RedQ und bildet so **42**. Im Anschluss erfolgt die decarboxylative Kondensation mit Acetyl-CoA durch die KS RedP zu Acetoacetyl-RedQ (**43**). Durch die Ketoreduktase (KR), Dehydratase (DH) und die Enoylreduktase (ER) erfolgt die Reduktion der Ketogruppe des  $\beta$ -Ketothioesters (**43**) zur Methylengruppe, sodass der Thioester (**44**) entsteht. Die oben erwähnten KR, DH und ER sind Bestandteile der Fettsäuresynthese (FAS) des Zentralstoffwechsels. Die Gene, die für diese Enzyme codieren, sind nicht Teil des *red* Clusters. Nach Reduktion der Ketogruppe entsteht eine Butanoylgruppe, welche auf ein Cystein von RedR übertragen wird, wo im Folgenden die Kettenverlängerung durch iterative decarboxylative Kondensation mit Malonyl-CoA von Malonyl-ACP-RedQ (**45**), Ketoreduktion, Dehydratisierung und anschließende Enoylreduktion durch

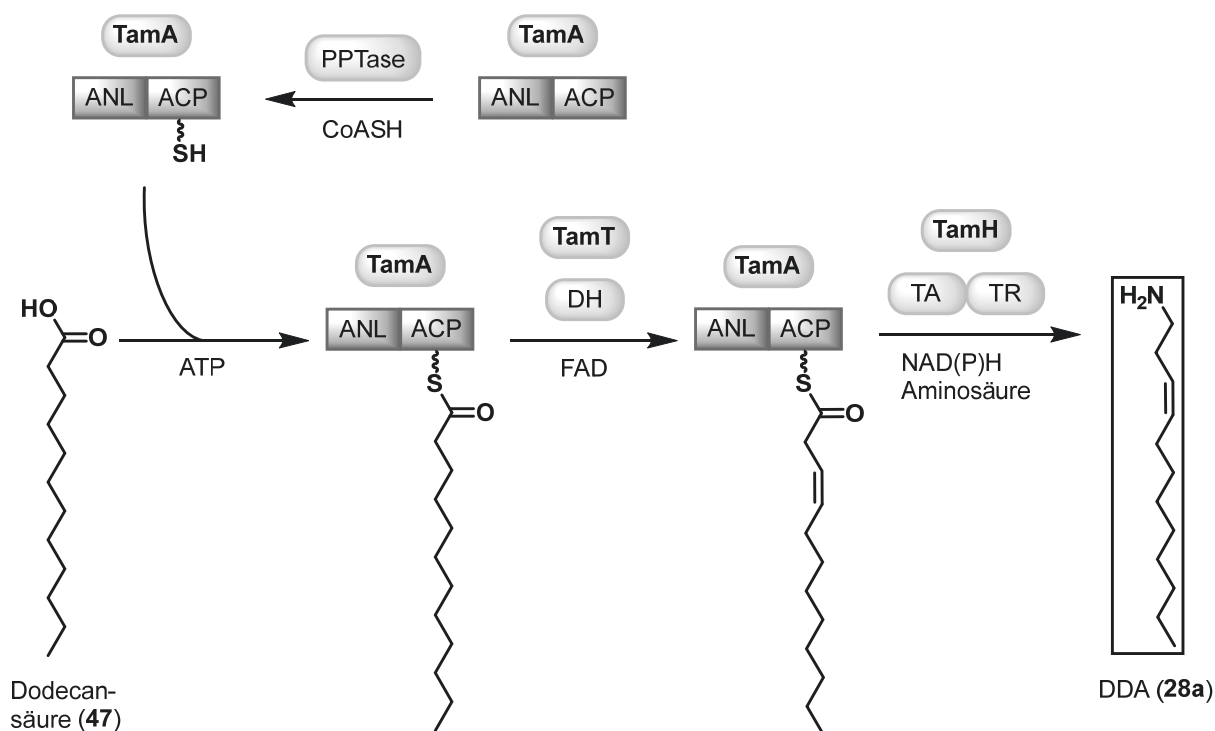
die Komponenten der FAS stattfindet. Insgesamt vier Wiederholungen des Zyklus resultieren in Thioester (**46**), welcher anschließend hydrolytisch durch die Thioesterase RedJ gespalten wird, so dass Dodecansäure (**47**) entsteht. Es folgt die Übertragung von Dodecansäure (**47**) und Malonyl-CoA auf RedL sowie eine decarboxylative Kondensation katalysiert durch die KS Domäne, sodass eine weitere Kettenverlängerung stattfindet. Die PLP-abhängige OAS Domäne katalysiert darauffolgend die Kondensation mit Glycin unter CO<sub>2</sub>-Abspaltung. Zyklisierung und Dehydratisierung resultieren in der Bildung von 2-Undecan-2-pyrrolin-4-on (**48**), welches im Anschluss durch RedK, einer putative NAD(P)H-abhängigen Oxidoreduktase (OR), zum 2-Undecylpyrrol (**27a**) reduziert wird.<sup>[16, 37, 44, 167]</sup>



**Schema 4.** Übersicht über die Biosynthese von 2-Undecylpyrrol (**27a**) durch Enzyme des *red* Clusters [*S. coelicolor* A3(2)]. [Abbildung modifiziert nach <sup>[17]</sup>; A = Adenylierungsdomäne; ACP = Acyl-Carrier Protein; AT = Acyltransferase; ATP = Adenosintriphosphat; CoA = Coenzym A; DH = Dehydratase; ER = Enoylreduktase; KS = Ketosynthase; KR = Ketoreduktase; NAD(P)H = Nicotinamadenindinukleotid; OAS = PLP-abhängige α-Oxamin-Synthase; OR = Oxidoreduktase; PLP = Pyridoxalphosphat; TE = Thioesterase]

### 5.4.6 Biosynthese von Dodec-3-en-1-amin (28a, DDA)

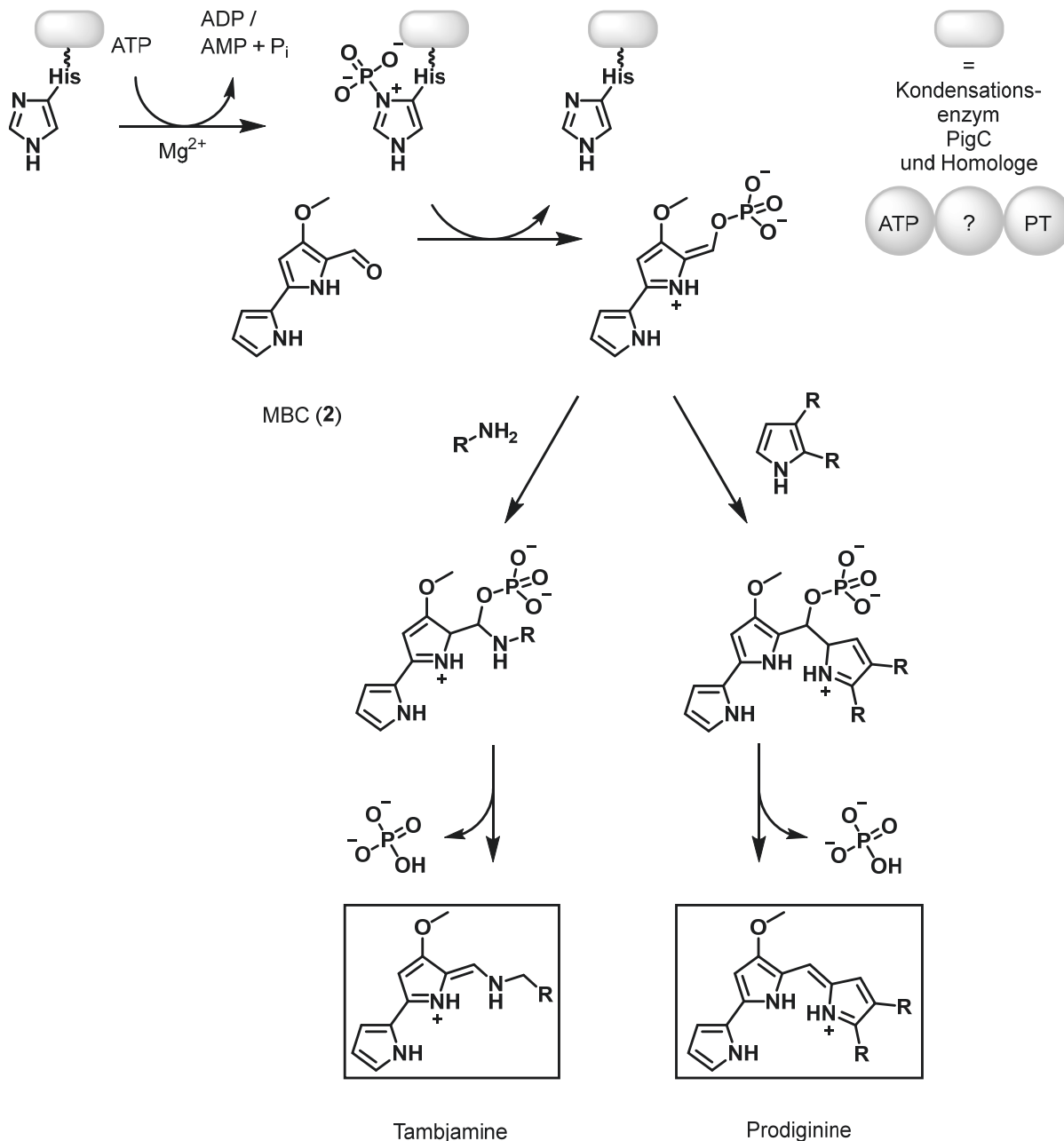
Die postulierte Biosynthese von DDA (**28a**) durch Enzyme des *tam* Clusters aus *P. tunicata* D2 ist in Schema 5 dargestellt. Dodecansäure (**47**) wird initial von der AcylCoA-Synthetase TamA aktiviert. Dabei katalysiert die N-terminale-Adenylierungsdomäne (ANL) von TamA zum einen die Acyl-Adenylat-Bildung und zum anderen den Transfer der Fettsäure auf die ACP-Domäne. Durch eine Phosphopantetheinyl Transferase wird die ACP-Domäne von TamA unter Nutzung von Coenzym A (CoA) zur Phosphopantethein Form umgewandelt. Es wird angenommen, dass die FAD-abhängige Dehydrogenase TamT die Dehydrierung und so das Einfügen einer Doppelbindung in die Alkylkette katalysiert. Anzumerken ist hier, dass in einigen Publikationen eine *trans*-Doppelbindung dargestellt wird, von *Franks et al.* jedoch durch NMR-Studien nachgewiesen wurde, dass aus *P. tunicata* D2 isoliertes Tambjamin YP1 (**26a**) eine (*Z*)-konfigurierte Doppelbindung besitzt.<sup>[136]</sup> Ebenso wurde von *Picott et al.* im zyklischen Tambjamin MYP1 (**26b**) die (*Z*)-Konfiguration bewiesen.<sup>[137]</sup> Daher ist anzunehmen, dass DDA (**28a**) ebenfalls eine (*Z*)-konfigurierte Doppelbindung aufweist. Die Reduktion des Thioesters und Transaminierung wird vermutlich durch das bifunktionale Enzym TamH katalysiert und das langkettige Amin **28a** so letztendlich freigesetzt.<sup>[135, 184]</sup>



**Schema 5.** Übersicht über die vorgeschlagene Biosynthese von DDA (**28a**) durch Enzyme des *tam* Clusters (*P. tunicata* D2). [ACP = Acyl-Carrier Protein; ANL = N-terminale-Adenylierungsdomäne; ATP = Adenosintriphosphat; CoA = Coenzym A; DH = Dehydrogenase; FAD = Flavin-Adenin-Dinukleotid; NAD(P)H = Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-(Phosphat); PPTase = Phosphopantetheinyl Transferase; TA = Transaminase; TR = Thioesterreduktase]

### 5.4.7 Kondensation zu Prodigininen und Tambjaminen

Der letzte Schritt in der Biosynthese von Prodigininen und Tambjaminen, sofern keine Zyklisierungsreaktionen oder weiteren Funktionalisierungen folgen, ist die Kondensationsreaktion von MBC (2) mit einem Pyrrol oder primären Amin (Schema 6).



**Schema 6.** Übersicht über die Kondensationsreaktion zu Prodigininen und Tambjaminen. Der abgebildete Mechanismus wurde für PigC (*S. marcescens*) und Homologe wie RedH [*S. coelicolor* A3(2)] vorgeschlagen, es ist aber anzunehmen, dass dieser auch gültig für die Kondensationsreaktion in der Tambjamin Biosynthese durch PigC Homologe wie TamQ (*P. tunicata* D2) ist. [Abbildung modifiziert nach <sup>[17]</sup>; ADP = Adenosindiphosphat; AMP = Adenosinmonophosphat; ATP = Adenosintriphosphat; PT = Phosphotransferdomäne]

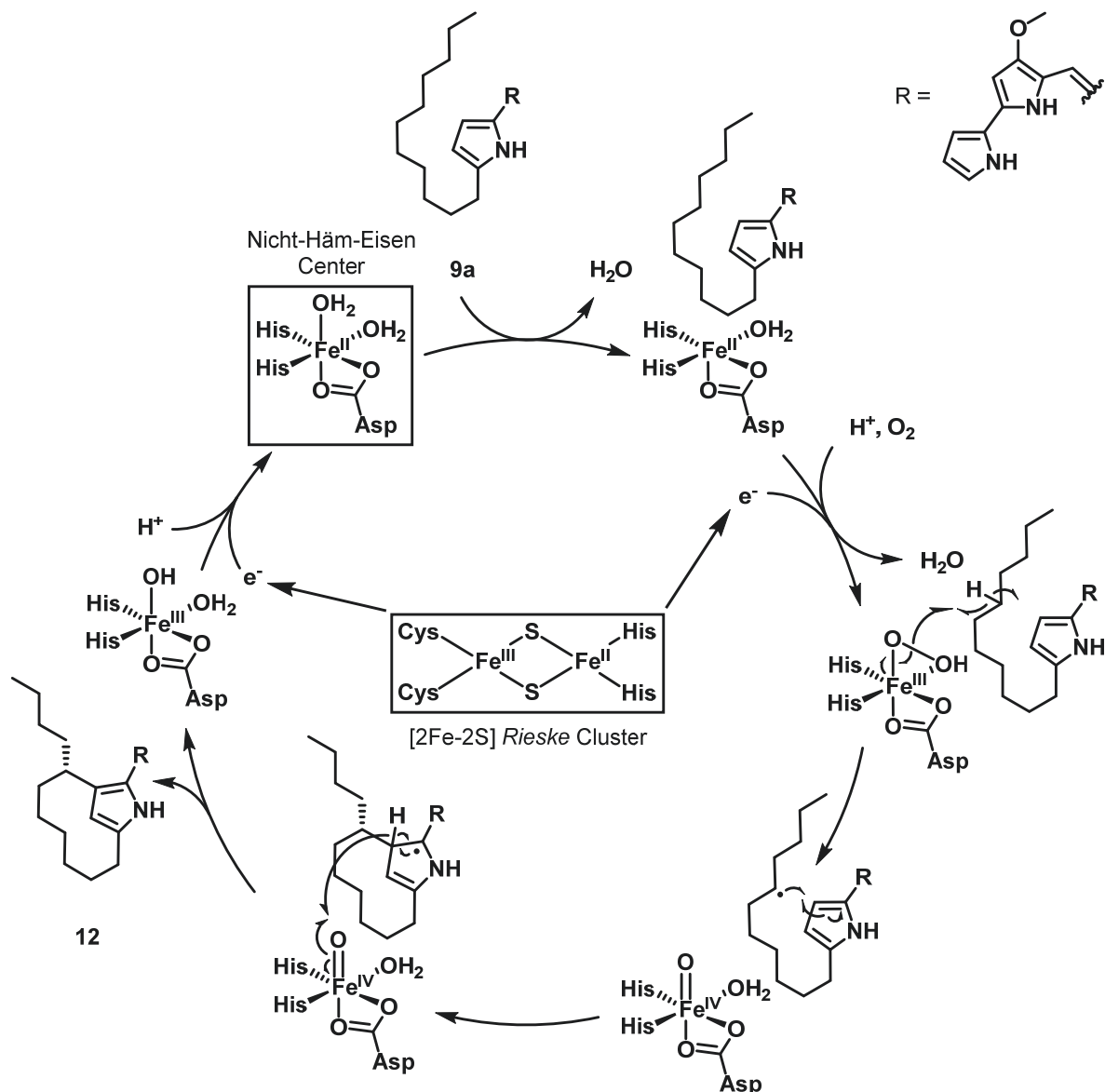
Sequenzanalysen der Kondensationsenzyme RedH [*S. coelicolor* A3(2)] und PigC (*S. marcescens*) zeigten, dass diese aus drei Domänen bestehen, wovon die N-terminale Domäne Sequenzähnlichkeiten zur ATP-Bindedomäne einer Phosphoenolpyruvat-Synthase (PEPS) aufweist,

wohingegen der C-Terminus einer Phosphotransferdomäne von Pyruvat-Phosphat-Dikinasen (PPDK) ähnelt. Der mittlere Sequenzbereich hingegen entspricht keinem Protein bekannter Funktion, spekuliert wird jedoch, ob diese Domäne für die Bindung von MBC (**2**) zuständig ist. Basierend auf den bekannten Funktionen und Mechanismen der zu den Kondensationsenzymen homologen Proteinen PEPS und PPDK, wurde der Reaktionsmechanismus der Kondensationsreaktion postuliert.<sup>[16, 19, 37, 167, 168, 185]</sup> Im Folgenden wird die Kondensationsreaktion am Beispiel der Prodiginine beschrieben. So reagiert bei dieser Kondensationsreaktion (Schema 6) ein konservierter Histidin-Rest (vgl. Kapitel 5.5) des Kondensationsenzyms mit der  $\gamma$ -Phosphatgruppe des ATPs und bildet ein Phosphoryl-Histidin Intermediat, welches wiederum den Aldehyd von MBC (**2**) phosphoryliert. Das phosphorylierte MBC (**2**) Intermediat wurde im Falle von RedH (*S. lividans*) und PigC (*S. marcescens*) bereits nachgewiesen.<sup>[186]</sup> Daraufhin kann der nukleophile Angriff des Pyrrols an dem aktivierten Carbonyl erfolgen, gefolgt von Eliminierung von Phosphat und gleichzeitiger Deprotonierung, um das aromatische System wiederherzustellen, sodass final das Prodiginin entsteht.

#### 5.4.8 Zyklisierungen

Ein großer Teil der zyklischen Prodiginine wie *Metacycloprodigiosin* (**11**, Streptorubin A) oder Butyl-*meta*-cycloprodigiosin (**12**, Streptorubin B) resultieren aus enzymatischen Zyklisierungen des Undecylprodiginins (**9a**). Die C-C Knüpfung wird dabei von Enzymen der Familie der *Rieske*-Nicht-Häm-Eisen-Oxygenasen katalysiert, wie RedG [*S. coelicolor* A3(2)], welches die Zyklisierung von Undecylprodigiosin (**9a**) zu Butyl-*meta*-cycloprodigiosin (**12**) katalysiert und McpG (*S. longispororuber*), das für die C-C Knüpfung in *Metacycloprodigiosin* (**11**) verantwortlich ist. Die *Rieske*-Nicht-Häm-Eisen-Oxygenasen RedG und McpG besitzen ein konserviertes Eisen-Schwefel-Cluster [2Fe-2S], das sogenannte *Rieske* Cluster, sowie Nicht-Häm-Eisen-Bindestellen und weisen große Sequenzähnlichkeiten mit der Naphthalin Dioxygenase (NDO) aus *P. putida* auf. Da diese Dioxygenase und ihr Reaktionsmechanismus gut bekannt sind, konnte basierend darauf der katalytische Mechanismus für RedG von Barry und Challis postuliert werden (Schema 7).<sup>[187]</sup> Zu erwähnen ist, dass *Rieske* Oxygenasen einen Redoxpartner wie z. B. eine Reduktase benötigen, welche die nötigen Elektronen von NAD(P)H meistens über ein Ferredoxin auf das *Rieske* Cluster und letztlich auf das Nicht-Häm-Eisen Center im aktiven Zentrum übertragen. Der in Schema 7 abgebildete Mechanismus zeigt die Version, die *via* radikalischer Abstraktion von Wasserstoffatomen verläuft. Auch andere Katalysemechanismen z.B. *via* kationischer Intermediate, die durch Abstraktion eines Hydridions von der Alkylkette entstehen, sind möglich.<sup>[16, 45, 65, 187-191]</sup>





**Schema 7.** Reaktionsmechanismus postuliert von Barry und Challis für die Umsetzung von Undecylprodigiosin (9a) zu Streptorubin B (12) katalysiert durch die Rieske-Nicht-Häm-Eisen-Oxygenase RedG [*S. coelicolor* A3(2)].<sup>[187]</sup> [Abbildung modifiziert nach <sup>[17]</sup>]

## 5.5 Kondensationsenzyme

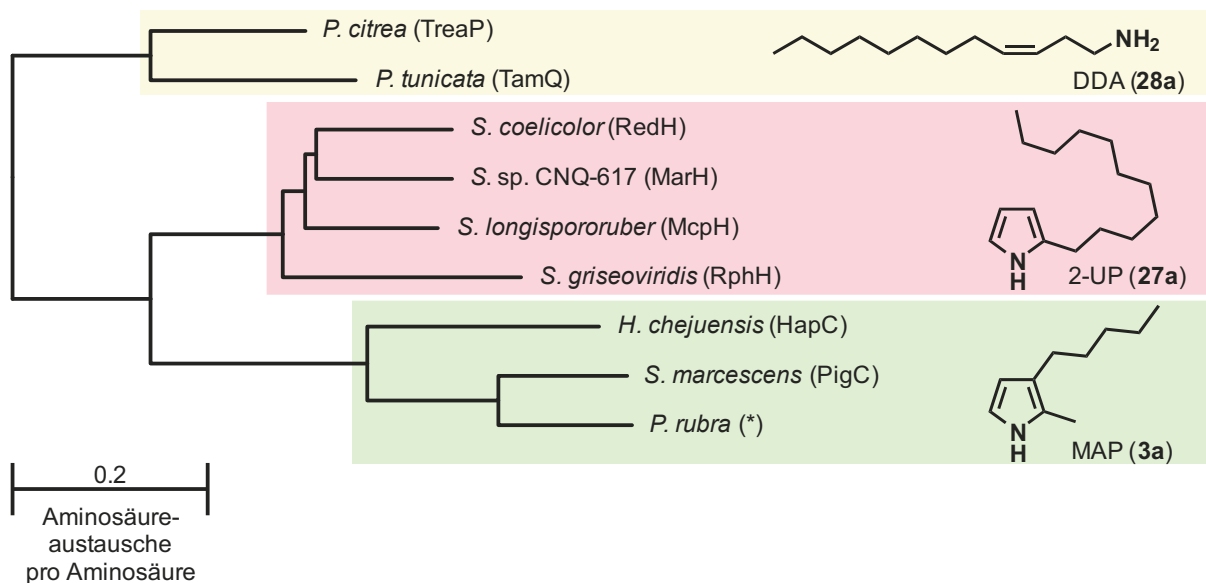
In der Biosynthese von TAMBAMINEN und PRODIGINEN ist der Schritt, in dem die Naturstoffe erstmalig entstehen, die durch die sogenannten Kondensationsenzyme wie PigC (*S. marcescens*) oder RedH [*S. coelicolor* A3(2)] katalysierte Kondensationsreaktion (Kapitel 5.4.7). In dieser Kondensationsreaktion wird MBC (2) mit einem Monopyrrol oder, bei TAMBAMINEN, mit einem primären Amin zum entsprechenden Naturstoff verknüpft. Da eine C-C-Bindungsbildung unter Hydrolyse einer energiereichen Verbindung – in diesem Fall ATP – stattfindet, können die Kondensationsenzyme der Enzymklasse EC 6 (engl. *enzyme class*), den Ligasen, zugeordnet werden.<sup>4[192]</sup>

<sup>4</sup> März 2020: [www.brenda-enzymes.org](http://www.brenda-enzymes.org)

Die Entdeckung der Kondensationsenzyme PigC und RedH und deren katalysierte Reaktion gelang durch Fütterungsexperimente, bei denen Mutanten ohne die Gene für die jeweiligen Enzyme außerstande waren Prodiginine zu produzieren, selbst wenn MBC (**2**) und 2-UP (**27a**) bzw. MAP (**3a**) zugegeben wurden. Umgekehrt konnte Prodigininbildung beobachtet werden bei Zufütterung der nötigen Substrate und heterologer Expression der jeweiligen Kondensationsenzyme.<sup>[16, 18, 19, 168]</sup>

Aufgrund von Sequenzanalysen der Kondensationsenzyme RedH [*S. coelicolor* A3(2)] und PigC (*S. marcescens*) konnte gezeigt werden, dass diese aus drei Domänen bestehen (Kapitel vgl. 5.4.7): Eine N-terminale Domäne mit Sequenzähnlichkeit zur ATP-Bindedomäne einer PEPS und einem C-Terminus, der einer Phosphotransferdomäne von PPDK ähnelt. Der mittlere Sequenzbereich hingegen entspricht keinem Protein mit bekannter Funktion.<sup>[16, 19, 20, 37, 167, 168]</sup> In der Phosphotransferdomäne befindet sich ein stark konserviertes Histidin, welches eine entscheidende Rolle im angenommenen katalytischen Mechanismus spielt (Kapitel vgl. 5.4.7). Dieses Histidin findet sich sowohl in RedH (His 869) als auch in PigC (His 840).<sup>[20, 167]</sup> Kristallstrukturen der Kondensationsenzyme sind zum jetzigen Stand jedoch noch nicht gelöst worden, lediglich Homologiemodelle von PigC wurden bisher veröffentlicht.<sup>[20, 193]</sup>

Trotz der großen strukturellen Diversität vor allem der Prodiginine (vgl. Tabelle 1) lassen sich bei Sequenzvergleichen der Kondensationsenzyme drei Gruppen im phylogenetischen Baum (Abbildung 13) ausmachen, die sich aber auch bei Betrachtung der Edukte der Kondensationsreaktion wiederfinden. Eine dieser Gruppen sind die Kondensationsenzyme, die MBC (**2**) mit primären Aminen [wie DDA (**28a**)] zum Tambjamine **26a** verknüpfen und von Gram-negativen marinen Bakterien der Gattung *Pseudoalteromonas* produziert werden. Betrachtet man die Prodiginine, so lassen sich sowohl aus struktureller Sicht, als auch aus phylogenetischer Sicht zwei Gruppen unterscheiden. So finden sich in der einen Gruppe die Kondensationsenzyme, welche 2-UP (**27a**) mit MBC (**2**) kondensieren, während die andere Gruppe MAP (**3a**) als natürliches Substrat besitzt. Betrachtet man den phylogenetischen Baum, so haben die Kondensationsenzyme wie RedH [*S. coelicolor* A3(2)] und Homologe ihren Ursprung überwiegend in der Gattung *Streptomyces*, bei denen es sich ebenfalls um Gram-negative Bakterien handelt. Dahingegen scheint die Diversität bei den Ursprungsorganismen der Kondensationsenzyme, die Prodigiosin (**1a**) produzieren und MAP (**3a**) als natürliches Substrat besitzen, größer zu sein und erstreckt sich von der Gattung *Pseudoalteromonas* über *Serratia* hin zu *Hahella*. Allerdings ist zu berücksichtigen, dass in Abbildung 13 kein Anspruch auf Vollständigkeit erhoben wird und, wie in Tabelle 1 und Tabelle 2 (Kapitel 5.2.2 und Kapitel 5.3.1) ersichtlich ist, noch etliche andere Organismen Prodiginine und Tambjamine produzieren oder die Naturstoffe aus diesen Organismen isoliert werden.



**Abbildung 13:** Phylogenetischer Baum einer Auswahl an Kondensationsenzymen und den zugehörigen Organismen, die Prodiginine oder Tambjamine produzieren. Die Edukte der Kondensationsreaktion sind ebenfalls dargestellt. Der Phylogenetische Baum wurde mit dem Online Programm COBALT<sup>5</sup> (*Constraint based Multiple Alignment Tool*) erstellt und die Suche nach Kondensationsenzymen zuvor mittels BLAST<sup>6</sup> durchgeführt.<sup>[194-196]</sup> [Abbildung modifiziert nach <sup>[17]</sup>. Das Protein aus *P. rubra* (\* = WP\_125559948.1) wurde noch nicht benannt].

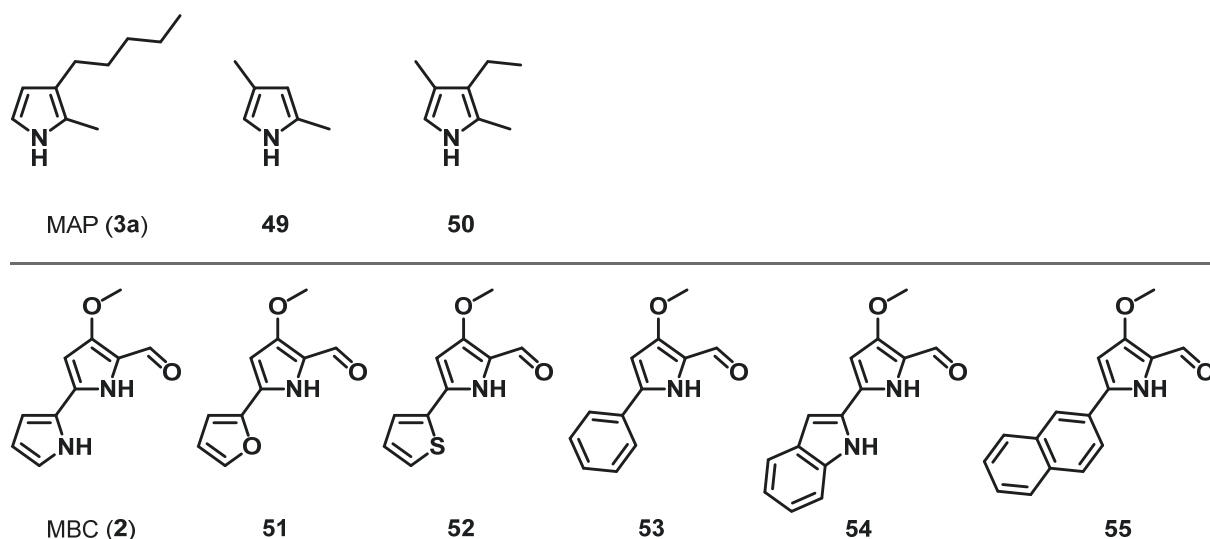
### 5.5.1 Kondensationsenzyme mit MAP (3a) als Edukt – PigC und HapC

Die Kondensation von MAP (3a) und MBC (2) zu Prodigiosin (1a) wird u.a. von den Enzymen HapC (*H. chejuensis*) und PigC (*S. marcescens*) katalysiert. Die bereits erwähnten Mutasynteseexperimente (allg. Erklärung Mutasyntese Kapitel 5.6.2), die zur Identifizierung der Kondensationsenzyme führten, zeigten ebenfalls, dass nicht nur MAP (3a) und MBC (2) zu Prodigiosin (1a) umgesetzt werden kann, sondern auch Derivate dieser Vorläufer (Schema 8).<sup>[18-20]</sup> Hier wird deutlich, dass die Substratspezifität von PigC und HapC nicht sehr stark ausgeprägt ist.

Alternative Alkylierungsmuster im C-Ring werden toleriert, sowohl was die Position der Alkylierung am Pyrrol betrifft, als auch die Länge der Alkylkette. So werden z.B. die Pyrrol-Derivate 49 und 50 akzeptiert (Schema 8B). Kürzere Alkylketten scheinen daher keinen wesentlichen Einfluss auf die Substratazeptanz zu haben. Ebenso können die beiden Kondensationsenzyme eine Reihe an MBC (2) Derivaten mit verschiedenartigen und verschieden großen A-Ringen zu den entsprechenden Prodigininen umsetzen, wobei das Vorhandensein eines Pyrrols an dieser Stelle nicht essentiell zu sein scheint, da sowohl das Furan (51)- als auch das Thiophen-Derivat (52) akzeptiert werden, ebenso wie die MBC (2) Analoga 53, 54 und 55 ohne Heteroaromaten.

<sup>5</sup> September 2019: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/cobalt/cobalt.cgi>

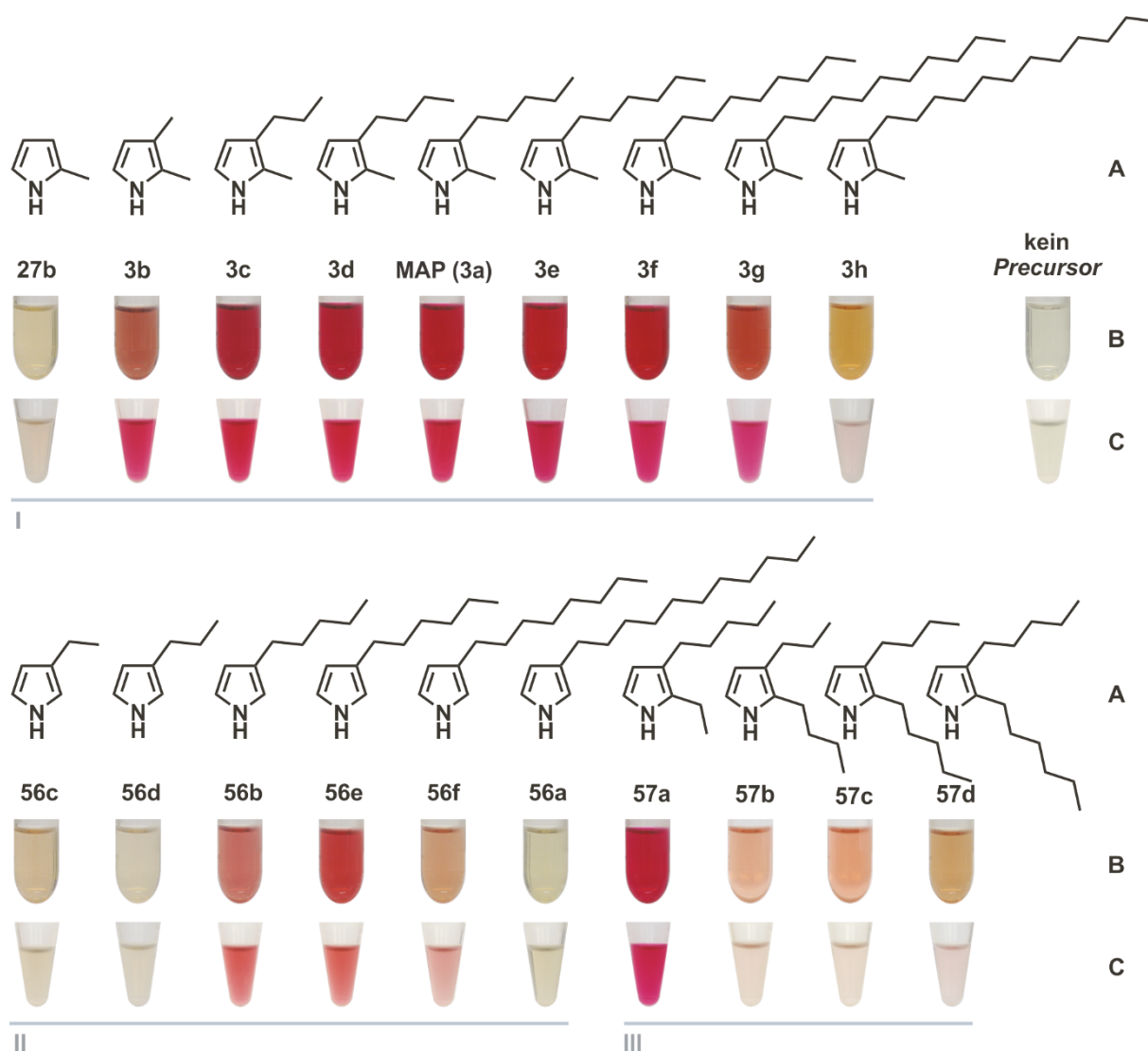
<sup>6</sup> September 2019: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>



**Schema 8.** Übersicht über die MAP (3a) und MBC (2) Derivate, die in Mutasynteseexperimenten zusammen mit MBC (2) respektive MAP (3a) eingesetzt, und durch das Kondensationsenzym PigC (*S. marcescens*) bzw. HapC (*H. chejuensis*) zu den entsprechenden Prodigininen umgesetzt wurden.<sup>[18-20]</sup>

In vorangegangenen Arbeiten wurde das Substratspektrum des Kondensationsenzyms PigC aus *S. marcescens* im Kontext der Mutasyntese (Kapitel 5.6.2) untersucht.<sup>[17, 197]</sup> Verschiedenartige *n*-alkylierte Monopyrrole wurden dafür synthetisiert und sowohl in der Mutasyntese als Mutasynton eingesetzt, als auch in *in vitro* Assays, bei denen der Umsatz der Monopyrrole mit MBC (2) zu den entsprechenden Prodigininen durch heterolog in *E. coli* BL21(DE3) exprimiertes PigC untersucht wurde. Die Ergebnisse dieser Arbeiten sind in Abbildung 14 dargestellt, wobei die Rotfärbung die Generierung der Prodiginine anzeigt.

Die Methylgruppe in 2-Position der Pyrrole **3a–3h** (Abbildung 14I) scheint essentiell für eine gute Umsetzung zu den entsprechenden Prodigininen zu sein, da Pyrrole **56a–56f** ohne diesen Methylsubstituenten nicht gut umgesetzt werden (Abbildung 14II). Pyrrole **57a–57d** mit einer Verlängerung der *n*-Alkylkette in 2-Position über eine Ethylgruppe hinaus werden ebenfalls nicht mehr akzeptiert (Abbildung 14III). Während Prodiginin **58a** noch gebildet wird, werden die Prodiginine **58b–58d** kaum produziert, da für die Pyrrole **57b**, **57c** und **57d** eine schlechtere Umsetzung durch PigC gegeben ist. In 3-Position der Pyrrole werden, bei gleichzeitigem Vorhandensein der Methylgruppe in 2-Position, Propyl- bis hin zu Octylgruppen gut toleriert (Pyrrole **3a**, **3c–3f**), wohingegen die Monopyrrole **3g** und **3h** mit längeren Alkylketten in 3-Position nicht akzeptiert werden (Abbildung 14I). Das 2,3-Dimethylpyrrol **3b** wird ebenfalls nur schwach zum Prodiginin **1b** umgesetzt. Obwohl eine gute Akzeptanz der Pyrrole gegeben ist, wenn ein Methylsubstituent in 2-Position vorhanden ist, wird Pyrrol **27b**, das lediglich eine Methylgruppe in 2-Position aufweist, kaum zum Prodiginin **9b** umgesetzt.



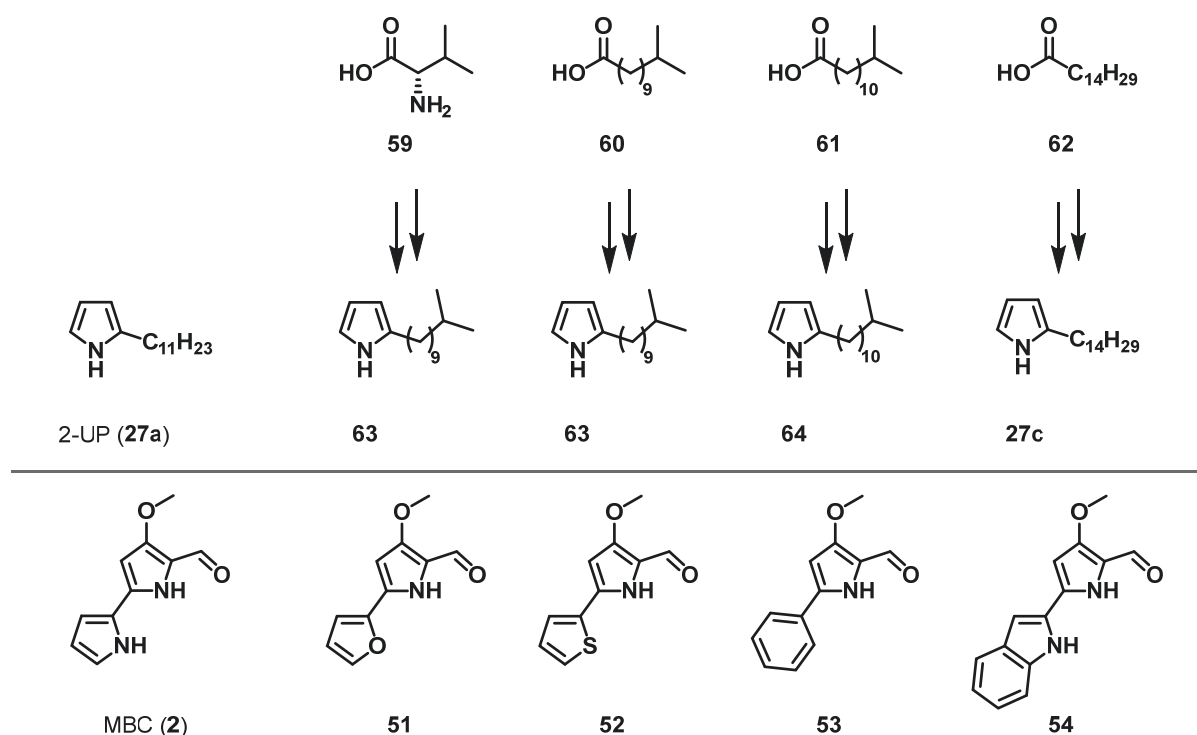
**Abbildung 14.** Substratspektrum von PigC. **A:** Eingesetzte Monopyrrole. **B:** Ethanolische Extrakte der Mutasynthese unter Nutzung des Mutasynthesestammes *P. putida* pig-r2  $\Delta$  pigD. **C:** Extrakte der *in vitro* Assays, bei welchen das Enzym PigC heterolog in *E. coli* BL21(DE3) exprimiert wurde. [Abbildung modifiziert nach <sup>[17]</sup>].

Die Arbeiten von *Chawrai et al.* aus dem Jahr 2012 zeigen vergleichende Untersuchungen zu den Kondensationsenzymen HapC und PigC.<sup>[20]</sup> Für beide Enzyme konnte gezeigt werden, dass diese in einer nicht näher beschriebenen Form membrangebunden vorliegen und nicht löslich exprimiert werden. Die isolierten Membranfraktionen konnten dennoch in kinetischen Untersuchungen eingesetzt werden, die im Falle von PigC eine deutliche Substratüberschussinhibierung durch MAP (**3a**) zeigen und einer nur schwachen Substratüberschussinhibierung durch ATP, während die MBC (**2**) Konzentration keine inhibierende Wirkung auf die Enzyme hatte. Für HapC hingegen wurde nur eine äußerst geringe Inhibierung durch MAP (**3a**) nachgewiesen. Im Rahmen der Doktorarbeit von Dr. *Andreas S. Klein* konnte die Membranständigkeit von PigC und die Substratinhibierung durch MAP (**3a**) in Übereinstimmung mit den Arbeiten von *Chawrai et al.* gezeigt werden.<sup>[17, 20]</sup> Die kinetischen Analysen des Kondensationsenzym PigC wurden auf die Monopyrrole **3c** und **3f** erweitert, die neben einer Methylgruppe in 2-Position eine Propyl- respektive Octylgruppe in 3-Position aufweisen. Durch diese kinetischen Experimente konnte eine Substratüberschussinhibierung in

Abhängigkeit von der Länge des *n*-Alkylsubstituenten nachgewiesen werden, wobei die Stärke der Inhibierung von PigC mit Anstieg der Kettenlänge zunimmt.

### 5.5.2 Kondensationsenzyme aus *Streptomycetaceae* mit 2-UP (27a) als Edukt – RedH und Homologe

Diverse *Streptomyces* Stämme produzieren Undecylprodigiosin (9a) selbst oder dessen zyklische Derivate, die durch nachfolgende oxidative Zyklisierungsreaktionen, katalysiert durch Rieske-Nicht-Häm-Eisen-Oxygenasen, entstehen (Kapitel 5.4.8). Das Kondensationsenzym RedH aus *S. coelicolor* A3(2) katalysiert die Reaktion von 2-UP (27a) und MBC (2) zu Undecylprodigiosin (9a) und wurde wie zuvor beschrieben durch Fütterungsstudien entdeckt und im Hinblick auf die Akzeptanz von 2-UP (27a) und MBC (2) Derivaten untersucht (Schema 9).<sup>[44, 168, 198]</sup>



**Schema 9.** Übersicht über die *Precursor* von 2-UP (27a) und MBC (2) Derivaten, die in Fütterungsexperimenten zusammen mit MBC (2) respektive 2-UP (27a) eingesetzt wurden und durch das Kondensationsenzym RedH [*S. coelicolor* A3(2)] zu den entsprechenden Prodigininen umgesetzt wurden.<sup>[44, 168, 198]</sup>

Die aus den Fütterungsexperimenten abgeleiteten Ergebnisse zu den MBC (2) Derivaten ähneln dabei denen von PigC und HapC.<sup>[18-20]</sup> So wurde nachgewiesen, dass anstelle des Stickstoffs im A-Ring andere Heteroatome toleriert werden, ebenso wie das Fehlen eines Heteroaromaten wie bei MBC (2) Derivat **53** oder das Vorhandensein sterisch anspruchsvollerer Substituenten wie bei Derivat **54**. Die Toleranz des Kondensationsenzyms gegenüber 2-UP (27a) Derivaten konnte indirekt aus den Ergebnissen der Zufütterung der Amino- bzw. Fettsäuren **59**, **60**, **61** und **62** abgeleitet werden, da diese im Verlaufe der Biosynthese zu den korrespondierenden 2-UP (27a) Derivaten **63**, **64** und **27c** umgesetzt werden und letztendlich potentiell Substrat für das Kondensationsenzym RedH

darstellen. Die Pyrrole **65** und **66** mit endständiger Verzweigung können dabei von RedH akzeptiert werden und auch Pyrrol **27c** wird zum entsprechenden Prodiginin **9c** umgesetzt.<sup>[44, 168, 198]</sup>

Neben RedH katalysieren auch Kondensationsenzyme wie McpH aus *S. longispororuber*, RphH aus *S. griseoviridis* und MarH aus *S. sp. CNQ-617* die Kondensation von 2-UP (**27a**) mit MBC (**2**).<sup>[45, 68, 199, 200]</sup> Zu beachten ist jedoch, dass MarH mutmaßlich auch die Hydroxylierung der Alkylkette von 2-UP (**27a**) ermöglicht, entweder durch eine eigene bisher unbekannte enzymatische Funktion oder Rekrutierung einer bis *dato* unbekannten Oxygenase.<sup>[200]</sup> Diese putative Bifunktionalität des Enzyms MarH würde es von den anderen Kondensationsenzymen unterscheiden.

### 5.5.3 Kondensationsenzyme aus *Pseudoalteromonadaceae* mit DDA (**28a**) als Edukt – TamQ und TreaP

Während die Kondensationsenzyme, welche die Bildung von Prodigininen katalysieren noch vergleichsweise gut erforscht sind, so wurde bisher nur wenig zu den Kondensationsenzymen veröffentlicht, die an der Kondensationsreaktion zu Tambjaminen beteiligt sind. TamQ aus *P. tunicata* D2 ist eines der wenigen beschriebenen Enzyme und kondensiert DDA (**28a**) mit MBC (**2**) zu Tambjamine YP1 (**26a**).<sup>[135]</sup> Eine weitere Charakterisierung dieses Enzyms wurde nach aktuellem Wissen bisher noch nicht veröffentlicht.

Zum Ende der experimentellen Phase dieser Doktorarbeit wurde eine kinetische Charakterisierung des rekombinant hergestellten und im Anschluss gereinigten Kondensationsenzym aus *P. citrea* veröffentlicht.<sup>[176, 201]</sup> Ebenso wie TamQ hat dieses Kondensationsenzym, TreaP, DDA (**28a**) als natürliches Substrat und produziert somit Tambjamine YP1 (**26a**), welches jedoch nachfolgend zum zyklischen Tambjamine MYP1 (**26b**) zyklisiert wird.<sup>[176, 201]</sup>

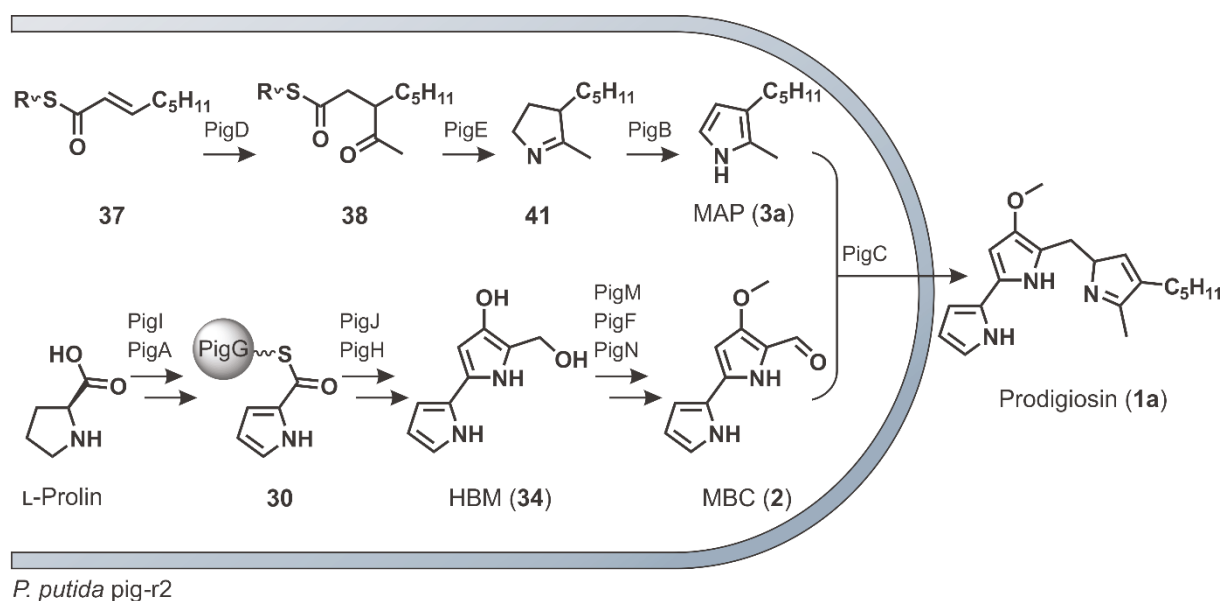
## 5.6 Heterologe Produktion von Prodigiosin (**1a**) und Derivaten in *P. putida* KT2440

### 5.6.1 Produktion von Prodigiosin (**1a**) in *P. putida* KT2440 – Biosynthese

Die hohe strukturelle Komplexität von Naturstoffen macht ihre Synthese herausfordernd und ungleich schwerer, sodass neben der rein chemischen Synthese auch enzymatische und biosynthetische Ansätze oder die Kombination aus allen ein Fundament für eine effiziente Synthese sind.<sup>[202]</sup> Auch im Falle von Prodigiosin sind zahlreiche (biomimetische) Totalsyntheseansätze bekannt, jedoch zeigt sich auch hier wie bei jedem anderen Naturstoff auch das Problem der Naturstofftotalsynthese: Mit jedem weiteren Syntheseschritt sinkt die Gesamtausbeute und macht den synthetischen Ansatz unter dem Gesichtspunkt der Atomeffizienz oder auch im Rahmen einer ökonomischen Betrachtung nicht reizvoll.<sup>[13, 16, 31, 203, 204]</sup> So war eines der ersten Ziele zu Beginn des Prodigiosin (**1a**)-Projekts im Jahr 2013, einer Kooperationsarbeit zwischen dem Institut für Bioorganische Chemie und dem Institut für Enzymtechnologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, eine nachhaltige Produktion von Prodigiosin (**1a**) zu etablieren. Dies gelang durch die Generation eines bakteriellen Prodigiosin (**1a**) Produzenten.<sup>[205]</sup> Die bis *dato* in der Literatur bekannten Beispiele fokussierten sich



vorwiegend auf die Nutzung der natürlichen Prodigiosin (**1a**) Produzenten wie *S. marcescens*, jedoch geht mit der Nutzung eines opportunistischen Humanpathogens wie es *S. marcescens*<sup>7</sup> ist ein Gefahrenpotential einher.<sup>[70, 207-209]</sup> Diese Sicherheitsrisiken können durch Nutzung alternativer Produktionsorganismen vermieden werden. Als ein attraktiver Wirtsorganismus für die biosynthetische Herstellung von Naturstoffen hat sich *P. putida* KT2440 hervorgehoben, der zudem als sicherer<sup>8</sup> Organismus eingestuft ist.<sup>[211]</sup> Durch Anwendung des *Transfer and Expression Systems* (TRES) konnte durch Dr. Andreas Domröse (Institut für Molekulare Enzymtechnologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf; Prof. Dr. Karl-Erich Jaeger, Dr. Thomas Drepper, Dr. Anita Loeschke) das *pig* Gencluster aus *S. marcescens* in das Genom von *P. putida* KT2440 integriert und so ein stabiler und effizienter Prodigiosin (**1a**) Produzent generiert werden.<sup>[17, 205, 212-214]</sup> Bemerkenswerterweise integrierte das *pig* Cluster bei allen Stämmen der Stammbibliothek, die eine hohe Prodigiosin (**1a**) Produktion aufwiesen, in eines der sieben rRNA Operons von *P. putida*.<sup>[212, 215-217]</sup> Der Stamm mit der höchsten Produktionsleistung, *P. putida* pig-r2, erzielt bis zu 94 mg Prodigiosin (**1a**) pro Liter Kulturvolumen. Die Isolierung des Naturstoffs **1a** wurde im Rahmen vorangegangener Arbeiten entwickelt und etabliert, so dass Prodigiosin (**1a**) in reiner Form aus der biosynthetischen Produktion erhalten werden konnte (Kapitel 5.6.3).<sup>[17, 205]</sup>



**Abbildung 15.** Übersicht über den Prodigiosin (**1a**) Produzenten *P. putida* pig-r2. Das *pig* Gencluster aus *S. marcescens* ist ins Genom integriert. [Abbildung modifiziert nach <sup>[17]</sup>; R = ACP oder CoA (= Coenzym A)]

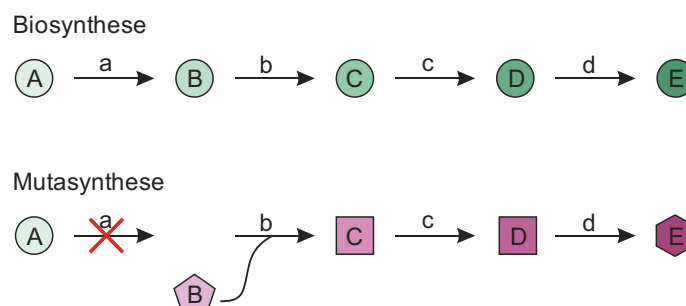
<sup>7</sup> In Deutschland wird *S. marcescens* als Organismus der Risikogruppe 2 eingestuft, so dass es für Arbeiten mit diesem Organismus mindestens Laboratorien der Sicherheitsstufe 2 bedarf.<sup>[206]</sup>

<sup>8</sup> Oftmals wird *P. putida* KT2440 als GRAS (engl. *generally recognized as safe*) Organismus bezeichnet, auch wenn diese Bezeichnung nicht korrekt ist. Jedoch ist *P. putida* KT2440 als sicherer Organismus eingestuft, mit dem in Laboratorien der Sicherheitsstufe 1 gearbeitet werden darf. Der GRAS Status wird von der *Food and Drug Administration* (Lebensmittelüberwachungs- und Arzneimittelbehörde der Vereinigten Staaten von Amerika) nur für Chemikalien und bestimmte Mikroorganismen Stämme verliehen, die unbedenklich eingenommen werden können.<sup>[210]</sup>



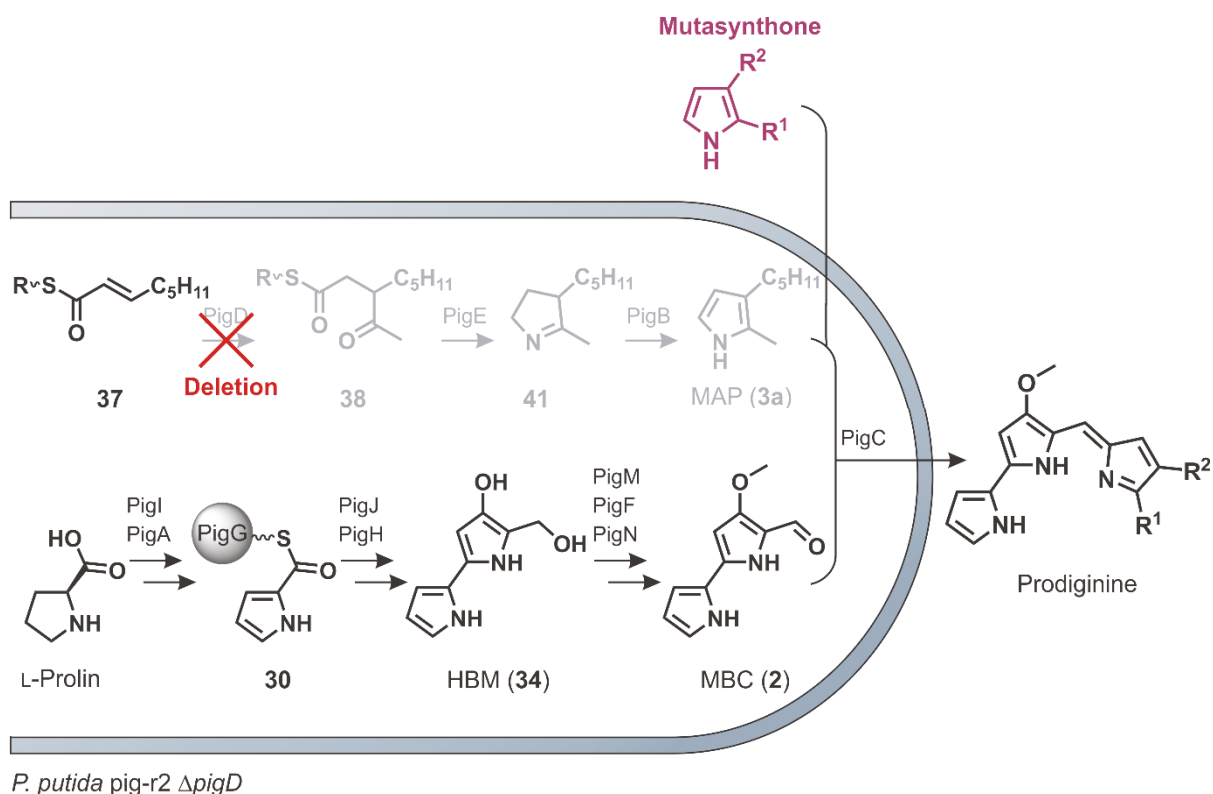
### 5.6.2 Produktion von Prodigiosin (1a) Derivaten in *P. putida* KT2440 – Mutasynthese

Die Vorteile der biosynthetischen Produktion von Naturstoffen, nämlich die Erzeugung wertvoller Produkte durch den Einsatz kostengünstiger Rohstoffe wie Zucker und Wasser, bringt jedoch auch den Nachteil mit sich, dass keine Derivate des Naturstoffs hergestellt werden können. Gerade diese Derivate können in der Anwendung als potentielle Arzneimittel jedoch bedeutsam sein. Eine Variante, Naturstoffderivate mithilfe von Mikroorganismen zu produzieren, ist die sogenannte Mutasynthese (engl. *mutational biosynthesis*, Abk. *mutasynthesis*). Für die Mutasynthese wird ein Stamm benötigt, der durch eine Gendeletion im Biosyntheseweg den ursprünglichen Naturstoff nicht mehr synthetisieren kann. Allerdings können durch Zufütterung des sogenannten Mutasynthons, einem Analogon des fehlenden Bausteins, Derivate des Naturstoffs gebildet werden (Abbildung 16).<sup>[218-223]</sup> Durch Nutzung der Mutasynthese konnten bereits erfolgreich Derivate der Antibiotika Rapamycin, Ansamitocin, Geldanamycin, Vancomycin oder Platensimycin hergestellt werden.<sup>[220, 224-230]</sup>



**Abbildung 16.** Vergleich von Biosynthese und Mutasynthese. [Abbildung modifiziert nach Kirschning et al.<sup>[231]</sup>; A = Startbaustein, B–D = biosynthetische Intermediate; B = Mutasynthon; E = Naturstoff bzw. Naturstoffderivat; a–d = Enzyme; grün = ursprünglicher Biosyntheseweg; violett = Derivate]

Die Übertragung des Mutasynthesekonzepts auf den Prodigiosin (**1a**) Produzenten *P. putida* pig-r2 mit dem Ziel Prodigiosin (**1a**) Derivate zu generieren, erfolgte ebenfalls in Zusammenarbeit zwischen Dr. Andreas Domröse und Dr. Andreas S. Klein. Ausgehend vom Stamm *P. putida* pig-r2 wurde von Dr. Andreas Domröse eine Mutante erzeugt, die eine partielle Gendeletion des Gens *pigD* aufweist. Die Erstellung des *knockout* Stammes erfolgte *via* homologer Rekombination mit Teilsequenzen der Gene *pigC* und *pigD* und Insertion des Streptomycin Resistenzgens in *pigD*. Da das ThDP-abhängige Enzym PigD, welches eine enzymatische *Stetter*-Reaktion im ersten Teilschritt der MAP (**3a**) Biosynthese katalysiert, nicht mehr produziert wird, kann die Deletionsmutante das Monopyrrol **3a** nicht mehr herstellen. Die Biosynthese des Bipyrrols MBC (**2**) kann jedoch weiterhin ungestört erfolgen. Durch Supplementierung mit MAP (**3a**) Derivaten können so Prodigiosin (**1a**) Derivate mit Diversifizierung am C-Ring produziert werden (Abbildung 17).<sup>[17, 197, 212]</sup>

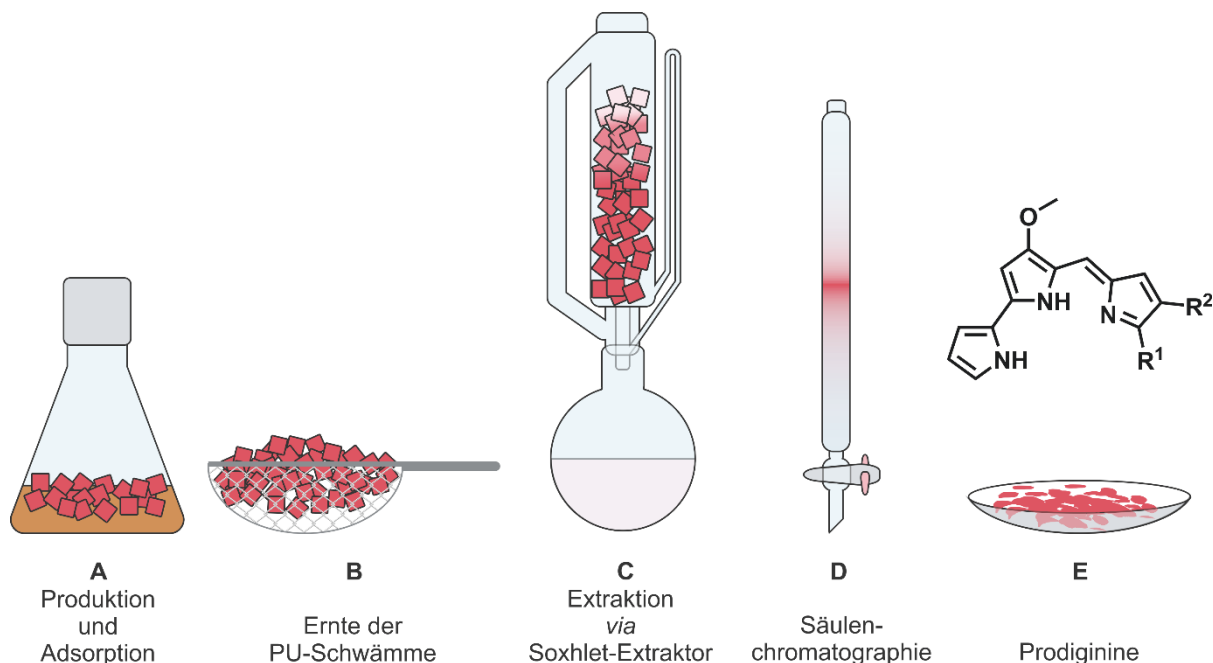


**Abbildung 17.** Übersicht über den Mutasyntesestamm *P. putida* pig-r2  $\Delta$ pigD. Das *pig* Gencluster aus *S. marcescens* ist ins Genom integriert und das Gen *pigD* deletiert, sodass kein MAP (3a) produziert wird. Durch Zufütterung von Mutasyntonen wird die Produktion von Prodigininderivaten ermöglicht. [Abbildung modifiziert nach <sup>[17]</sup>; R = ACP (= Acyl-Carrier Protein) oder CoA (= Coenzym A)]

### 5.6.3 Extraktion und Reinigung von Prodigininen aus *P. putida*

Das Verfahren zur Extraktion und Reinigung von Prodigininen aus *P. putida* wurde in einer Zusammenarbeit des Instituts für Bioorganische Chemie und des Instituts für Molekulare Enzymtechnologie der Heinrich-Heine-Universität entwickelt und kann sowohl für die Produktion von Prodigiosin (1a) mithilfe des Stammes *P. putida* pig-r2 angewendet werden, als auch für den Mutasynteseansatz. Die Extraktionsmethode basiert dabei auf dem Einsatz von etwa 1 cm<sup>3</sup> großen Polyurethan (PU)-Schwämmchen, an welche die Prodiginine aufgrund ihrer hydrophoben Eigenschaften adsorbieren können. Bemerkenswert ist, dass die PU-Schwämmchen nicht nur den Teil des im Überstand vorhandenen Prodiginins adsorbieren, sondern auch die Prodigiosinsekretion durch kontinuierliche Bindung des extrazellulären Pigments erleichtern. Ebenso führt der Einsatz der PU-Schwämmchen zu einer höheren Reinheit des Rohextraktes. Der Ablauf der Extraktion und Reinigung von Prodigininen ist in Abbildung 18 dargestellt. Während der Kultivierung werden die PU-Würfel zum Medium zugegeben, sodass die Prodiginine an diese mittels hydrophober Wechselwirkung adsorbieren können. Nach erfolgter Kultivierung können die PU-Schwämmchen mit einem Sieb aus der Kulturbrühe geerntet und mit Wasser gewaschen werden, sodass wasserlösliche Verunreinigungen bereits entfernt werden können. Im Anschluss erfolgt die eigentliche Extraktion der Prodiginine unter Einsatz eines Soxhlet-Extraktors, der die Fest-Flüssig-Extraktion der Schwämme mit Diethylether als Lösungsmittel ermöglicht, sowie klassische Zweiphasen Extraktion des Rohextrakts im

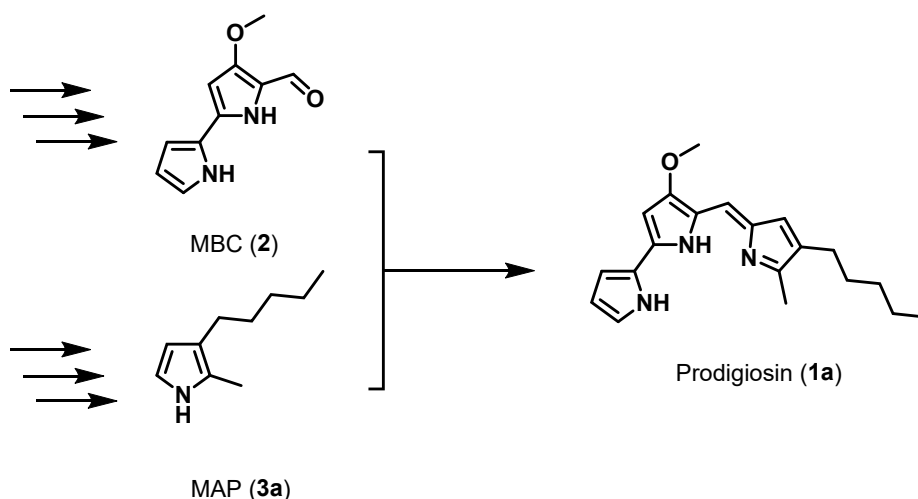
Scheidetrichter mit Wasser und Dichlormethan. Im Folgenden wird der Rohextrakt *via* Säulenchromatographie gereinigt und reines Prodiginin erhalten.<sup>[17, 205]</sup>



**Abbildung 18.** Übersicht über die Extraktion und Isolierung von Prodigininen. **A:** *P. putida* pig-r2 wird zusammen mit PU-Schwämmchen kultiviert, die als Adsorbens für Prodiginine dienen. **B:** Die PU-Schwämme werden nach Kultivierung mithilfe eines Siebs aus der Kulturbrühe geerntet. **C:** Extraktion der PU-Schwämme in einem Soxhlet-Extraktor mit Lösemitteln. **D:** Reinigung *via* Säulenchromatographie. **E:** Prodiginine werden nach Säulenchromatographie in reiner Form erhalten.

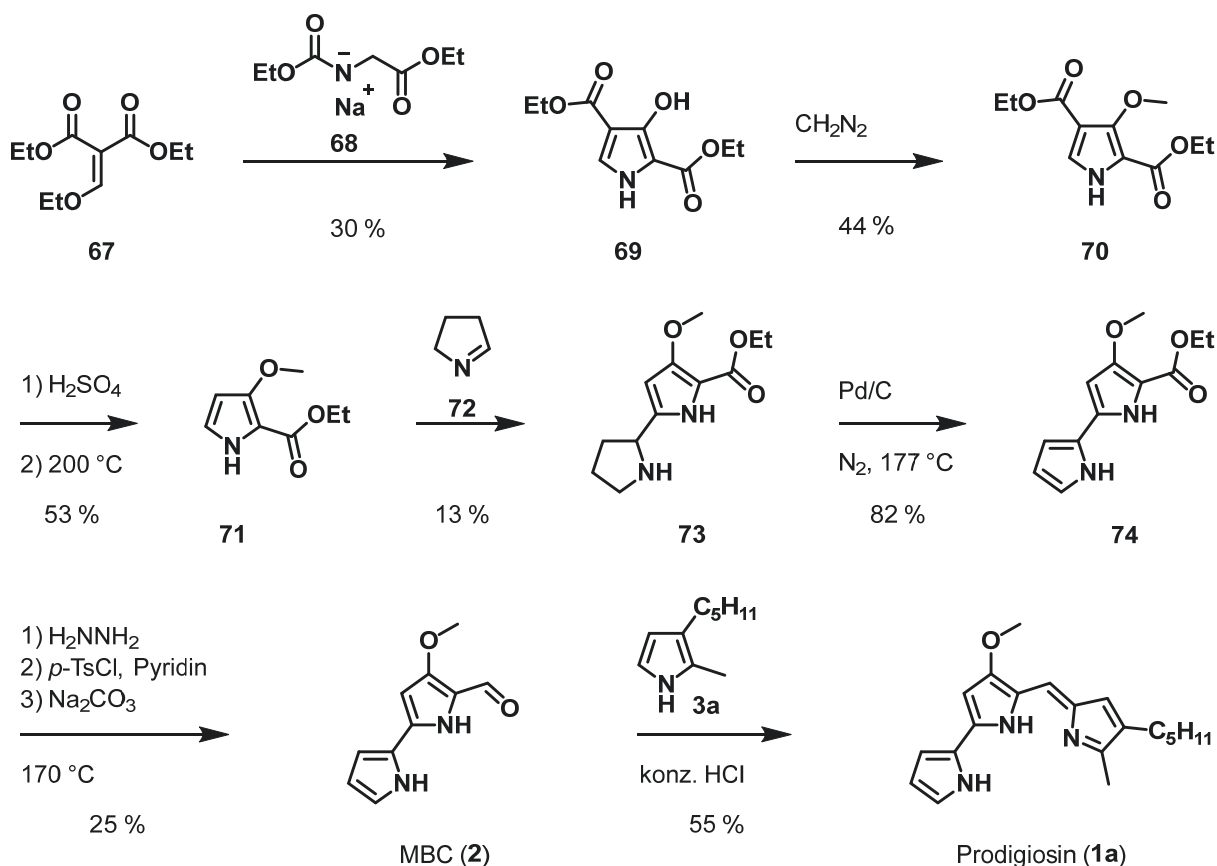
## 5.7 Biomimetische Synthesen von Prodigininen

Da in dieser Arbeit ebenso wie in früheren Arbeiten hauptsächlich Prodiginine mit Variation am C-Ring hergestellt wurden, bietet die biomimetische Totalsynthese (Schema 10) diverse Vorteile.<sup>[17]</sup> Diese ahmt die gegabelte Biosynthese (Kapitel 5.4), und somit den parallelen Aufbau des MBC (**2**) Bausteins einerseits und des Monopyrrols MAP (**3a**) andererseits, nach. Die Kondensation beider Bausteine zum Naturstoff findet dabei erst als letzter Schritt der Synthese statt. Dies erlaubt somit das Einbringen verschiedener MAP (**3a**) Derivate und den einfachen Zugang zu Prodigiosin (**1a**) Derivaten. Zudem können die synthetisierten Monopyrrole nicht nur für die Totalsynthese der Referenzmoleküle genutzt werden, sondern dienen auch als Mutasyntons für mutasynthetische Ansätze (Kapitel 5.6.2) zur Prodiginin Produktion.



**Schema 10.** Schema der biomimetischen Totalsynthese am Beispiel Prodigiosin (**1a**).

Der Ansatz der biomimetischen Totalsynthese diente auch bei den ersten Totalsyntheseversuchen Anfang der 1960er Jahre als Grundlage. Der erste Versuch der Totalsynthese von Prodigiosin (**1a**) mit dem Ziel der Strukturaufklärung führte jedoch zu einer Struktur, deren spektroskopische Eigenschaften nicht mit denen des bakteriellen Isolats übereinstimmte.<sup>[33]</sup> Diese Syntheseroute bildete allerdings die Basis für die kurze Zeit später entworfene und publizierte Syntheseroute von *Rapoport* und *Holden* (Schema 11), die auch zur korrekten Struktur führte und so letztlich den Strukturbeweis ermöglichte (Kapitel 5.2.2).<sup>[31]</sup> Im ersten Schritt dieser in Schema 11 dargestellten Totalsynthese werden Startmaterial **67** und Natriumglycinat (**68**) zu Pyrrol **69** umgesetzt, welches nachfolgend *O*-methyliert wird, sodass Verbindung **70** hervorgeht. Eine folgende zweischrittige Decarboxylierung von Verbindung **70** führt zum Methoxypyrrol **71**. Die aromatische Substitution von Pyrrol **71** mit 1-Pyrrolin (**72**) ergibt Amin **73**, welches anschließend durch Palladium vermittelte Dehydrierung unter hohen Temperaturen zu Verbindung **74** umgesetzt wird. Im nächsten Schritt wird Bipyrrol **74** durch eine *McFayden-Stevens* Reduktion über drei Stufen zum Aldehyden **2** umgesetzt. Im finalen Schritt der Synthese folgt die Kondensation von MBC (**2**) mit MAP (**3a**) unter sauren Bedingungen zu Prodigiosin (**1a**).

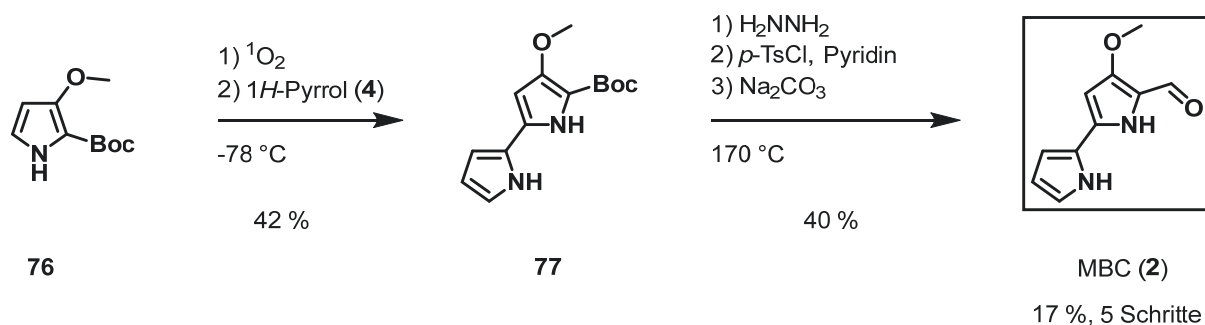


**Schema 11.** Erste Totalsynthese von Prodigiosin (**1a**) entwickelt von Rapoport und Holden.<sup>[31]</sup>

Auch in verschiedenen späteren Totalsynthesen wurde der Ansatz einer biomimetischen Synthese verfolgt.<sup>[31, 92, 204, 232, 233]</sup>

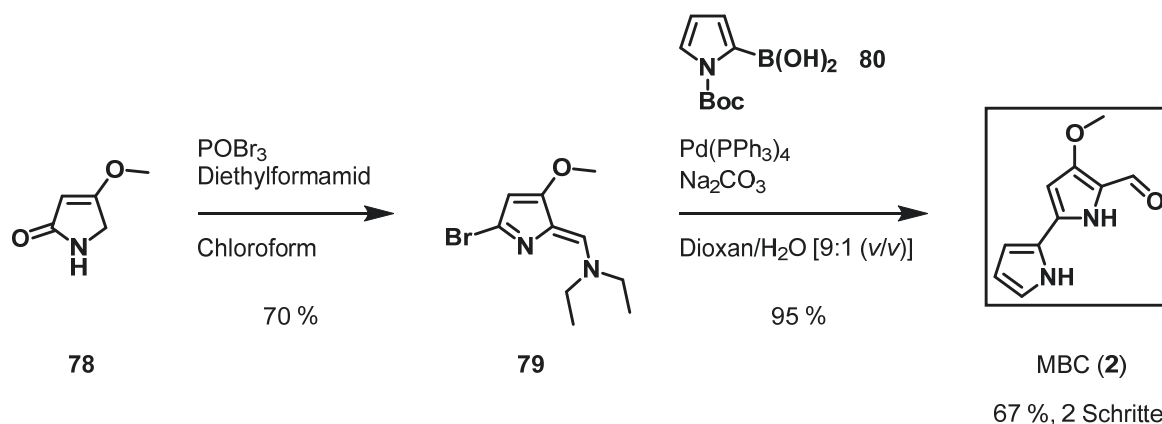
### 5.7.1 Synthese von MBC (**2**) und Boc-MBC (**75**)

Die Zugänglichkeit zum MBC (**2**) in nicht ausreichenden Mengen war eine Schwachstelle der ersten biomimetischen Totalsynthesen. Wasserman *et al.* entwickelten 1999 eine deutlich kürzere Syntheseroute zur Darstellung von MBC (**2**) (Schema 12). So zeigten Wasserman *et al.*, dass Pyrrol **76** bei tiefen Temperaturen und in Anwesenheit von Singulett-Sauerstoff und anschließender Zugabe von 1*H*-Pyrrol (**4**) zum Bipyrrrol **77** umgesetzt werden kann. Verbindung **77** kann wie auch in der Totalsynthese von Rapoport und Holden via *McFayden-Stevens* Reduktion zu MBC (**2**) umgesetzt werden. Die Syntheseroute von Wasserman *et al.* hatte jedoch auch eine niedrige Gesamtausbeute von 17% über fünf Schritte zum Nachteil.<sup>[16, 31, 232]</sup>



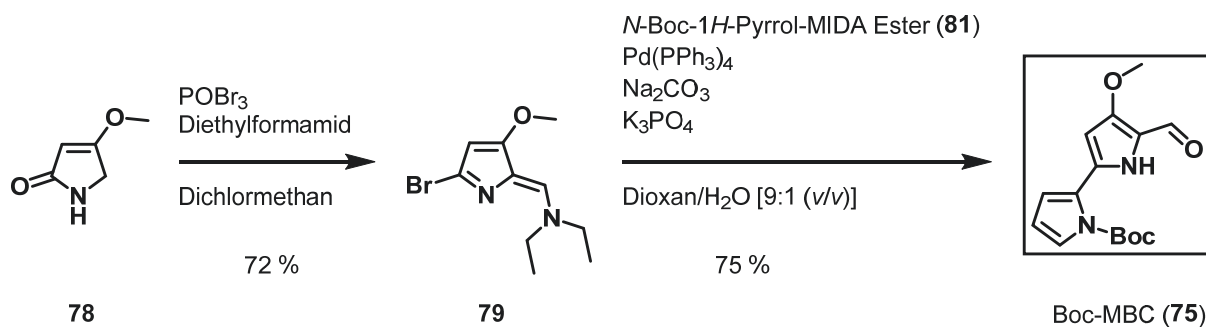
**Schema 12.** Synthese von MBC (2) nach Wasserman *et al.*<sup>[232]</sup>

Die Anwendung der *Suzuki*-Kupplung wurde schließlich 2006 von Lavallée und Mitarbeitern (Firma Gemin X) auf die Synthese des Bausteins MBC (2) übertragen und ermöglichte so dessen Produktion im Kilogramm-Maßstab und damit auch die Synthese des Prodiginins Obatoclax (23) für die Anwendung in klinischen Tests (Kapitel 5.2.3).<sup>[233, 234]</sup> Bei dieser Synthesesequenz wird 4-Methoxy-3-pyrroline-2-on 78 durch ein *Vilsmeier-Haack*-Reagenz zu Bromenamin 79 umgesetzt, aus welchem anschließend unter Einsatz der Boronsäure 80 mithilfe der *Suzuki*-Kupplung MBC (2) synthetisiert wird (Schema 13). *Dairi et al.* konnten mit dieser Synthesesequenz über zwei Schritte eine Gesamtausbeute von 67 % erreichen.<sup>[233]</sup>



**Schema 13.** Synthese von MBC (2) nach *Dairi et al.* Das Schema wurde modifiziert nach *Dairi et al.*<sup>[233]</sup>

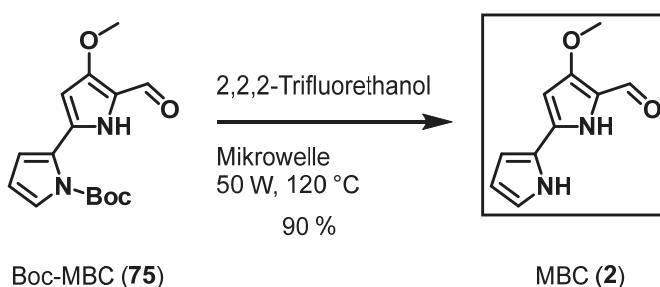
Diese MBC (2)-Synthese von *Dairi et al.* diente neben Veröffentlichungen von *Aldrich* als Grundlage für eine MBC (2)-Synthese, die aus den Arbeiten zur Dissertation von Dr. *Andreas S. Klein* hervorging (Schema 14).<sup>[17, 156, 233, 235]</sup>



**Schema 14.** Boc-MBC (75) Synthese.<sup>[17]</sup>

Bei dieser Strategie wird im Gegensatz zur Synthese nach *Dairi et al.* statt der freien Boronsäure (80) die kommerziell erhältliche geschützte Boronsäure *N*-Boc-1*H*-Pyrrol-MIDA-Ester (81, MIDA = *N*-Methyliminodiacetat) eingesetzt.<sup>[17, 233]</sup> So kann auch der Instabilität der freien Boronsäure (80) entgegen gewirkt werden.<sup>[17]</sup> Da Boc-geschütztes MBC (75) eine höhere Lagerstabilität aufweist als das freie MBC (2), wie bereits von *Aldrich* beobachtet, wurde dieses hergestellt und für die nachfolgende Kondensationsreaktion (Abschnitt 5.7.3) genutzt.<sup>[17, 156]</sup> Im ersten Schritt der Synthese wird unter Anwendung einer *Vilsmeier-Haack* Haloformylierung aus 4-Methoxy-3-pyrrolin-2-on (78) mit Phosphoroxybromid und *N,N*-Diethylformamid das Bromenamin (79) hergestellt. Letzteres wird anschließend zusammen mit *N*-Boc-1*H*-Pyrrol-MIDA Ester (81) in einer *Suzuki*-Kupplung eingesetzt und so Boc-MBC (75) erhalten.

Da für den Einsatz in Experimenten mit Kondensationsenzymen dennoch das ungeschützte MBC (2) benötigt wird, wurde ebenfalls eine Methode entwickelt, um in einer Mikrowellenreaktion Boc-MBC (75) zu entschützen und MBC (2) zu erhalten (Schema 15).<sup>[17]</sup>



**Schema 15.** Entschützung von Boc-MBC (75) zu MBC (2).<sup>[17]</sup>

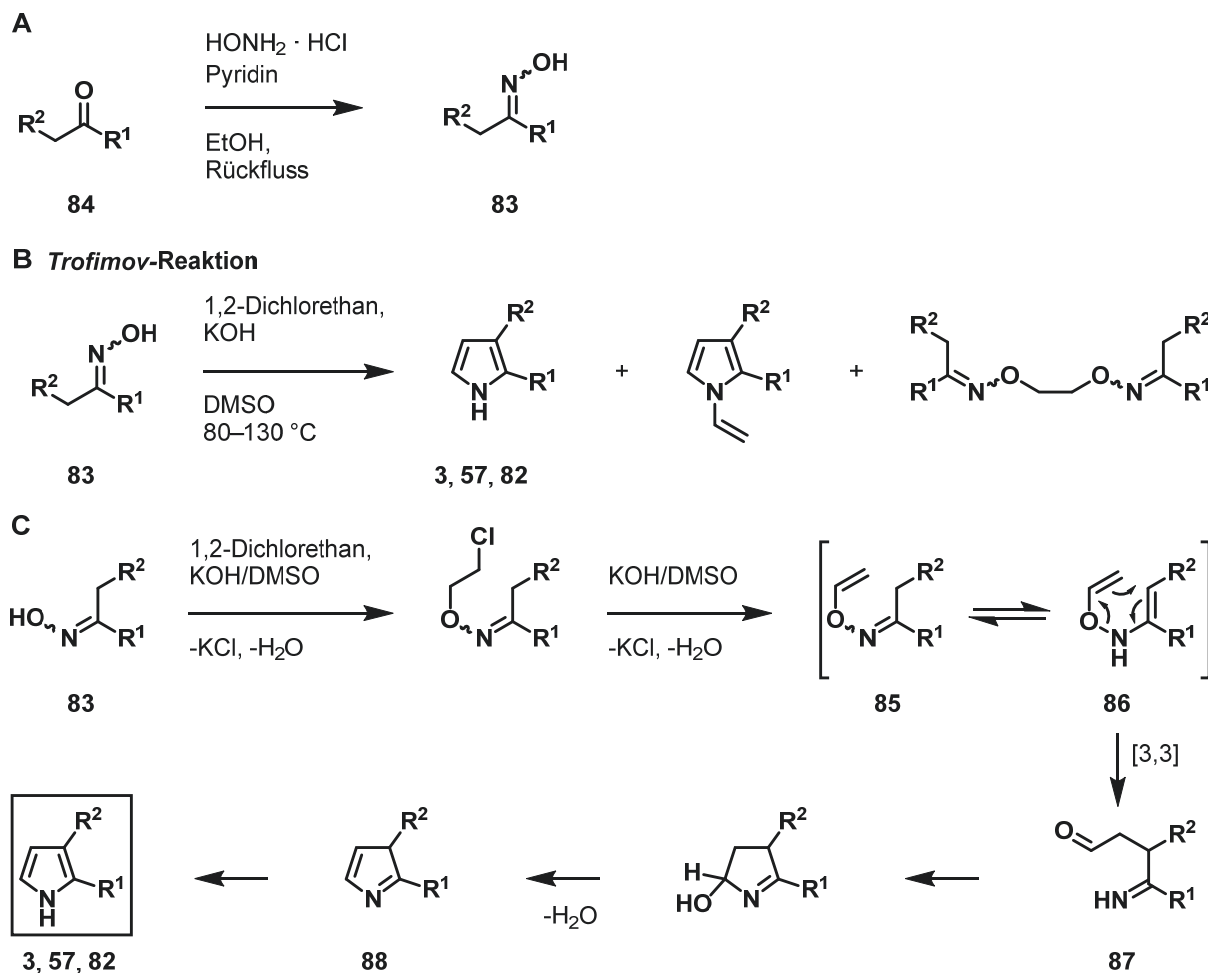
### 5.7.2 Synthesen der Monopyrrole

Neben der Synthese der Bipyrrol-Einheit MBC (2) ist ebenso die Synthese der Monopyrrol Bausteine wie MAP (3a) und dessen Derivate für die biomimetische Totalsynthese von Prodiginen notwendig und auch für die Anwendung in enzymatischen Umsetzungen oder als Mutasynton in Mutasyntesereaktionen erforderlich (Kapitel 5.5.1 und 5.6.2). Als Alternative zu klassischen Pyrrolsynthesen wie die *Hantzsch*-Pyrrolsynthese oder die (*Paal*)-*Knorr*-Pyrrolsynthese, die zu Carbonyl-substituierten Pyrrolen führen oder 2,5-dialkylierten Pyrrolen, kann die *Trofimov*-Synthese zur Darstellung 2,3-disubstituierter Pyrrole genutzt werden.<sup>[236-242]</sup>

## Trofimov-Synthese – Zugang zu 2,3-Dialkylpyrrolen 3, 57 und zyklischen 2,3-Dialkylpyrrolen 82

Die *Trofimov*-Reaktion (Schema 16), die erstmals 1973 beschrieben wurde und Pyrrole ausgehend von Ketoximen **83** unter Einsatz von 1,2-Dichlorethan oder Acetylen aufbaut, findet in einem Superbase-System statt aus MOH (M = Alkalimetall) und Dimethylsulfoxid (DMSO). Die Reaktion kann dabei sowohl als Eintopfsynthese stattfinden ausgehend von Keton **84** oder als konsekutiver Ansatz, bei dem zuerst das Ketoxim **83** ausgehend vom Keton **84** gebildet wird (Schema 16A) und anschließend die *Trofimov*-Reaktion stattfindet.<sup>[237, 238, 243]</sup>

In dieser Arbeit wurde, wie in vorangegangenen Arbeiten etabliert, eine zweistufige Synthesesequenz angewandt und das Ketoxim **83** ausgehend vom Keton **84** zunächst mit Hydroxylaminhydrochlorid und Pyridin in Ethanol hergestellt (Schema 16A).<sup>[17, 244]</sup> Nachfolgend wird das Ketoxim **83** in der *Trofimov*-Synthese eingesetzt, wobei statt Acetylen 1,2-Dichlorethan verwendet wurde (Schema 16B). In dieser Synthese erfolgt nach *Trofimov* zunächst die Reaktion von 1,2-Dichlorethan mit Ketoxim **83**, wobei durch eine anschließende Eliminierung das *O*-Vinylketoxim **85** entsteht (Schema 16C).



**Schema 16.** Oxim (**83**)Synthese und *Trofimov*-Reaktion zur Synthese von (zyklischen) 2,3-dialkylierten Pyrrolen **3**, **57** und **82**. **A:** Oxim(**83**) Synthese. **B:** Übersichtsreaktion der *Trofimov*-Reaktion. **C:** Allgemeiner von *Trofimov* postulierter Reaktionsmechanismus der *Trofimov*-Reaktion mit 1,2-Dichlorethan in einem Superbase-System aus KOH und DMSO. Schema modifiziert nach *Trofimov et al.*<sup>[243]</sup> [Die Reste R<sup>1</sup> oder R<sup>2</sup> sind variabel. Es lassen sich mit der Reaktionssequenz sowohl 2,3-dialkylierte **3**, **57** als auch zyklische 2,3-alkylierte Pyrrole **82** darstellen. Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind zyklische Pyrrole **82** nicht in der Abbildung dargestellt.]



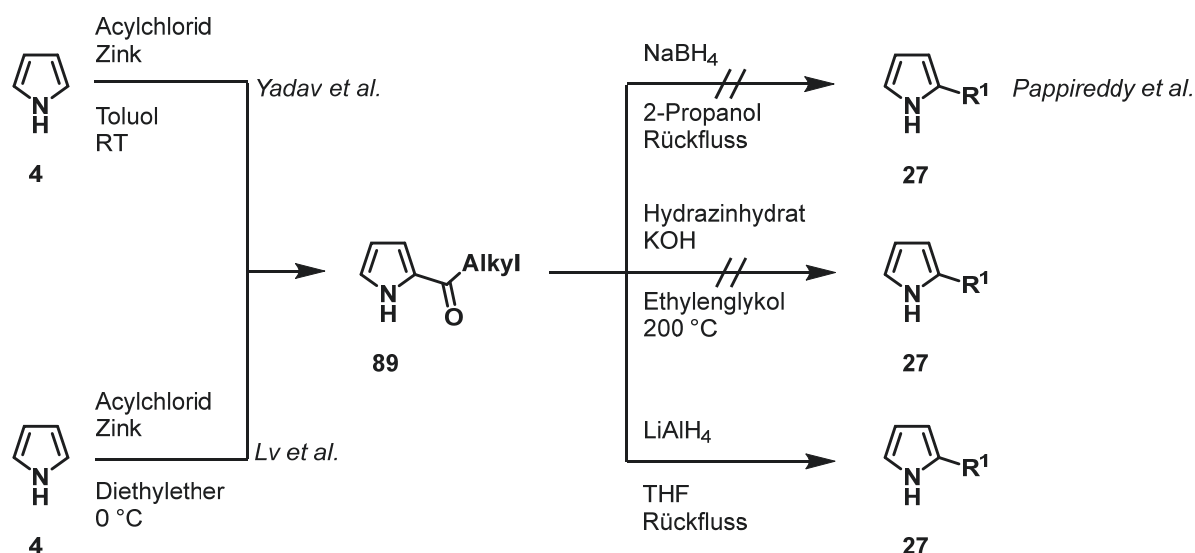
Das Imin **85** steht im Gleichgewicht mit Enamin **86**, aus welchem durch eine [3,3]-sigmatrope Umlagerung Verbindung **87** entsteht. Aus einer intramolekularen Zyklisierung mit anschließender Dehydratisierung geht Pyrrol **88** hervor. Das 3*H*-Pyrrol **88** kann schlussendlich zum entsprechenden 1*H*-Pyrrol **3**, **57** oder **82** umlagern.<sup>[17, 237, 238, 245, 246]</sup>

Neben MAP (**3a**), welches von *Trofimov et al.* erstmalig 1985 mit der *Trofimov*-Reaktion dargestellt wurde und Baustein für Prodigiosin (**1a**) ist, können unter Anwendung der *Trofimov*-Reaktion diverse 2,3-dialkylierte Pyrrole **3** und **57** synthetisiert werden und auch die Synthese von zyklischen 2,3-alkylierten Pyrrolen **82** durch Verwendung von zyklischen Ketoximen **83** ist möglich.<sup>[17, 197, 205, 243, 245-248]</sup>

### Synthese von 2-Alkylpyrrolen **27** und 3-Alkylpyrrolen **56**

Der Zugang zu ausschließlich in 2- oder 3-Position alkylierten Pyrrolen (**27** und **56**), wie 2-UP (**27a**) als Baustein des Undecylprodigiosins (**9a**), ist unter Nutzung der *Trofimov*-Reaktion nicht gut möglich, sodass alternative Syntheserouten in Betracht gezogen werden müssen. Ausgehend vom 1*H*-Pyrrol (**4**) können jedoch sowohl 2-Alkylpyrrole **27** als auch 3-Alkylpyrrole **56** synthetisiert werden.

Für die Herstellung von 2-alkylierten Pyrrolen **27** kann beim 1*H*-Pyrrol (**4**) beginnend zunächst eine Acylierung zu 2-Acylpyrrolen **89** erfolgen. Da Pyrrole zum Polymerisieren neigen, bietet sich als Alternative zu einer klassischen *Friedel-Crafts*-Acylierung unter Verwendung von Lewis-Säuren, die von *Yadav et al.* und auch von *Lv et al.* gezeigte Variante unter Einsatz von elementarem Zink an (Schema 17).<sup>[249, 250]</sup>

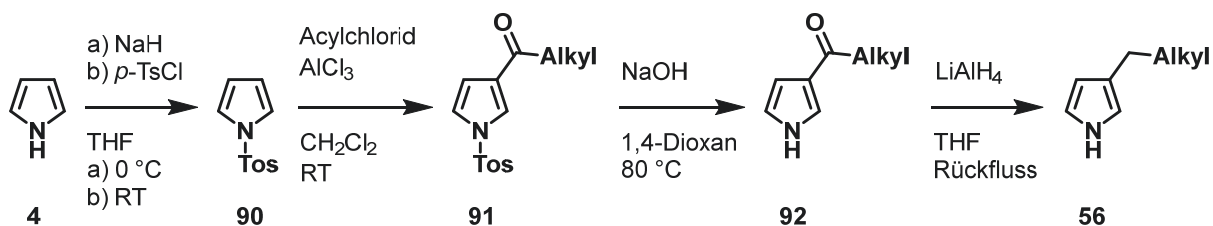


**Schema 17.** Möglichkeiten zur Synthese von 2-Alkylpyrrolen **27**.<sup>[249, 250]</sup>

Die sich anschließende Reduktion zu 2-Alkylpyrrolen **27** kann *via* Natriumborhydrid realisiert werden wie von *Papireddy et al.* für 2-UP (**27a**) gezeigt, als *Wolff-Kishner*-Reduktion erfolgen oder durch den Einsatz von Lithiumaluminiumhydrid.<sup>[130]</sup> Die beiden erstgenannten Varianten konnten im Rahmen der Arbeiten von Dr. *Andreas S. Klein* nicht oder nicht reproduzierbar umgesetzt werden.<sup>[17]</sup> So konnte

durch Einsatz von Natriumborhydrid nur der sekundäre Alkohol erhalten werden. Jedoch gelang die Reduktion *via* Lithiumaluminiumhydrid zum 2-UP (**27a**) mit einer Ausbeute von 63 %.<sup>[17]</sup> Die Reduktion mit Lithiumaluminiumhydrid endete nicht beim sekundären Alkohol, sondern führte zum Alkan, was in der Literatur als sogenannte Überreduktion beschrieben wird.<sup>[251, 252]</sup>

Eine Synthese von ausschließlich in 3-Position alkylierten Pyrrolen **56** ist mittels einer mehrstufigen Synthesesequenz möglich, die ebenfalls von 1*H*-Pyrrol (**4**) ausgeht, welches im ersten Syntheseschritt zum *N*-Tosylpyrrol (**90**) tosyliert wird (Schema 18).

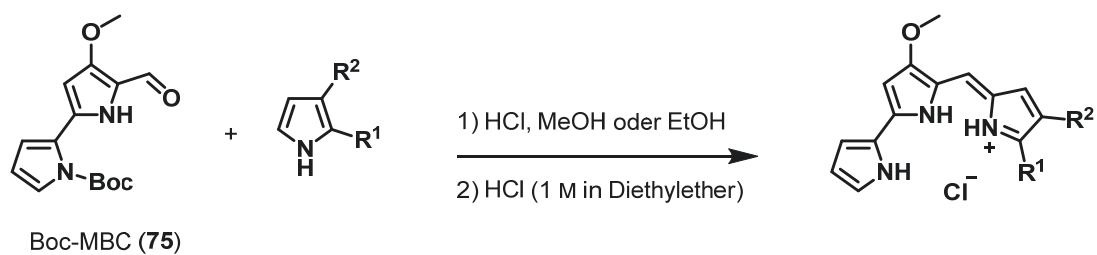


**Schema 18.** Synthesesequenz zur Darstellung von 3-Alkylpyrrolen **56**.

Das Einbringen der Tosylgruppe erfolgt, um bei der nachfolgenden *Friedel-Crafts*-Acylierung von Verbindung **90** eine Acylierung des Pyrrols in 3-Position zu dirigieren. Am unsubstituierten 1*H*-Pyrrol (**4**) findet eine elektrophile Substitution vornehmlich in  $\alpha$ -Position statt, also der 2- und 5-Position des 1*H*-Pyrrols (**4**). Die Tosylierung deaktiviert den Stickstoff und die Regioselektivität kann über die Wahl der Lewis-Säure beeinflusst werden, wobei die Nutzung von Aluminiumchlorid zu Acylierung in 3-Position und somit zu 3-Acyl-*N*-tosylpyrrolen **91** führt.<sup>[253, 254]</sup> Nach Entschützung des Stickstoffs durch basische Hydrolyse und somit Erhalt von 3-Acylpyrrolen **92** erfolgte analog zur Synthese der 2-Alkylpyrrole **27** die Reduktion zum Alkan *via* Lithiumaluminiumhydrid, sodass 3-Alkylpyrrole **56** erhalten werden.<sup>[17]</sup>

### 5.7.3 Kondensationsreaktion zu Prodigininen

Die Kondensation von MBC (**2**) und einem Monopyrrol zu Prodigininen, die den finalen Schritt der Totalynthese darstellt, wird häufig säurekatalysiert unter Einsatz von HCl realisiert, wie bereits von *Rapoport* und *Holden* 1962 beschrieben.<sup>[31]</sup> Auch in später veröffentlichten Synthesen von Prodigininen wurde die Reaktion mit katalytischen Mengen HCl in Methanol oder Ethanol durchgeführt (Schema 19).<sup>[40, 203, 255]</sup> Durch eine nachfolgende Ausfällung des entstandenen Prodiginins als Hydrochlorid kann das Prodiginin als Feststoff und in (*Z*)-Konfiguration erhalten werden. Der Einsatz von Boc-MBC (**75**) statt MBC (**2**) in der Reaktion ist möglich, da unter den Bedingungen der Säurekatalyse auch die Entfernung der Boc-Schutzgruppe erfolgt.<sup>[17]</sup>



**Schema 19.** Kondensationsreaktion von MBC (**2**) mit einem Monopyrrol zum Prodiginin.

Alternativ kann die Kondensation durch den Einsatz von Phosphoroxychlorid katalysiert werden, wie es bereits für Prodiginine oder verwandte Strukturen gezeigt wurde. <sup>[17, 256-258]</sup>

---

## 6 Ergebnisse und Diskussion

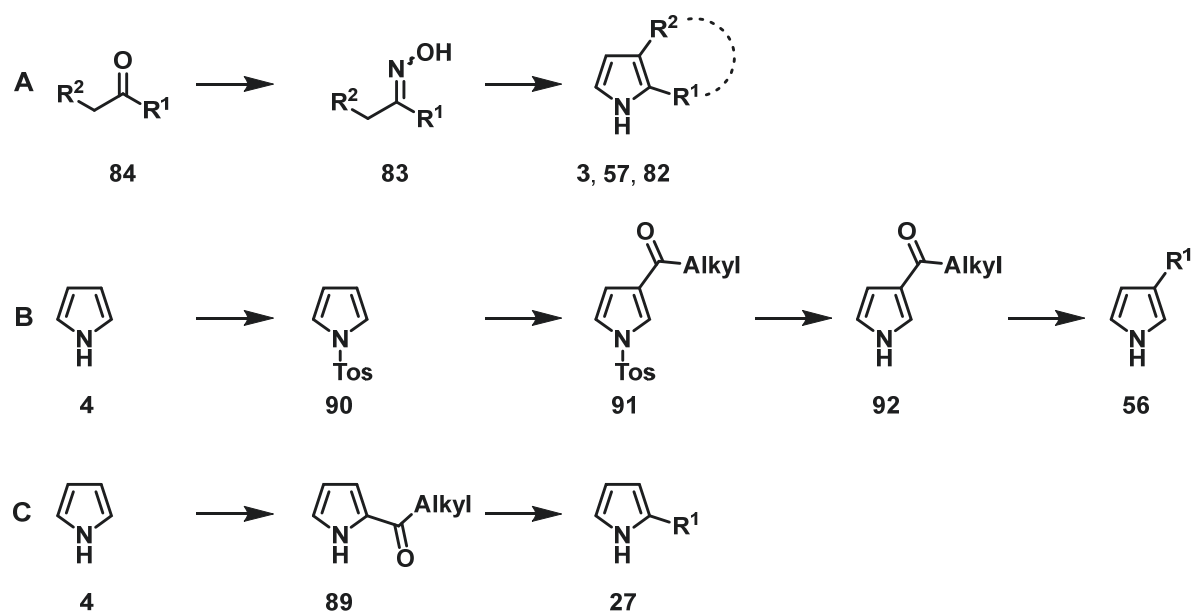
### 6.1 Synthese von Vorläuferverbindungen und Referenzprodukten

Sowohl die *Precursor* Synthese als auch die Herstellung von Referenzverbindungen bilden eine obligatorische Grundlage für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente und sind in diesem Kapitel dargestellt. Eine Optimierung der einzelnen Syntheseschritte wurde dabei nicht vorgenommen.

#### 6.1.1 Synthese von Vorläuferverbindungen

##### 6.1.1.1 Pyrrolsynthesen

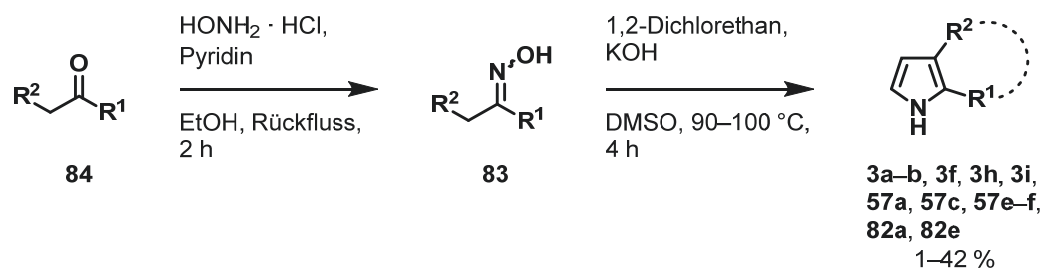
Die für diese Arbeit notwendigen Pyrrole wurden, wie in Schema 20 zusammenfassend dargestellt, über drei verschiedene Syntheserouten hergestellt (Kapitel 8.2.2).



Schema 20. Übersicht der Pyrrolsynthesen dieser Arbeit.

#### Synthese von (zyklischen) 2,3-alkylierten Pyrrolen – Syntheseroute A

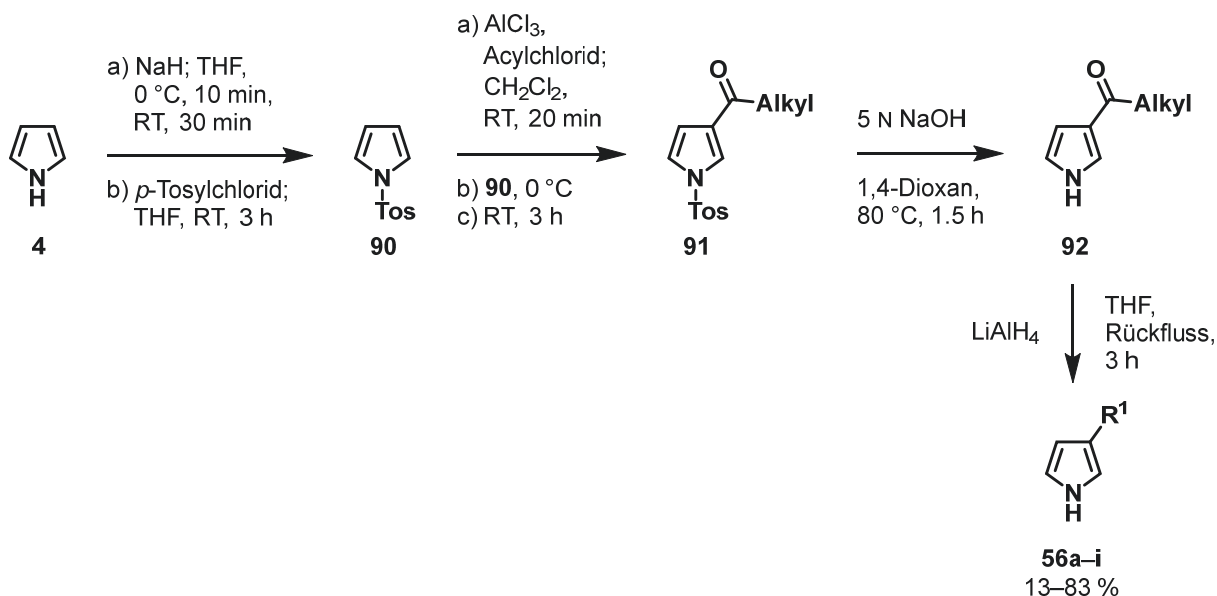
Sowohl die 2,3-Dialkylpyrrole **3a–3b**, **3f**, **3h**, **3i**, **57a**, **57c**, **57e–57g** als auch die zyklischen 2,3-Dialkylpyrrole **82a** und **82e** wurden unter Nutzung einer bereits etablierten Syntheseroute mithilfe der *Trofimov*-Reaktion (Kapitel 5.7.2) hergestellt, wofür zunächst ausgehend von Ketonen **84** die entsprechenden Ketoxime **83** synthetisiert wurden (Schema 21). Die Ketoxime **83** stellen daraufhin die Substrate des hier angewandten konsekutiven Ansatzes der *Trofimov*-Reaktion dar.<sup>[17, 197, 205, 243, 245-248]</sup>



**Schema 21.** Syntheseroute A zur Herstellung von (zyklischen) 2,3-dialkylierten Pyrrolen mithilfe der Trofimov-Reaktion.

### Synthese von 3-alkylierten Pyrrolen – Syntheseroute B

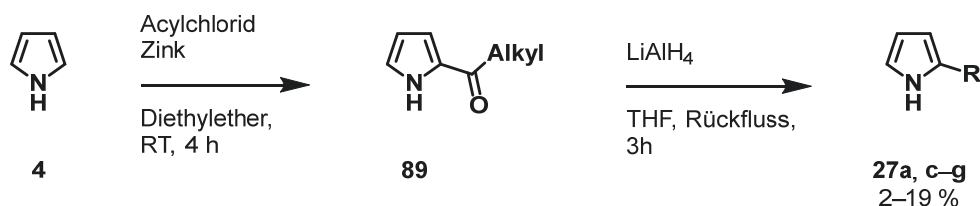
Im Gegensatz zur Synthese der (zyklischen) 2,3-dialkylierten Pyrrole wurden die 3-Alkylpyrrole **56a–56i** nicht unter Nutzung der Trofimov-Reaktion hergestellt, sondern über eine zuvor bereits etablierte vierstufige Synthesesequenz (Kapitel 5.7.2) ausgehend von 1H-Pyrrol (**4**) synthetisiert (Schema 22). Dabei wird 1H-Pyrrol (**4**) zunächst zum *N*-Tosylpyrrol (**90**) umgesetzt, sodass bei der nachfolgenden Friedel-Crafts-Acylierung von Verbindung **90** eine Acylierung in 3-Position erfolgt. Nach Entschützung des Stickstoffs durch basische Hydrolyse werden die 3-Acylpyrrole **92** erhalten, woraufhin die Reduktion zum Alkan *via* Lithiumaluminiumhydrid erfolgen kann, sodass 3-Alkylpyrrole **56** erhalten werden.<sup>[17]</sup>



**Schema 22.** Syntheseroute B zur Herstellung von 3-alkylierten Pyrrolen.

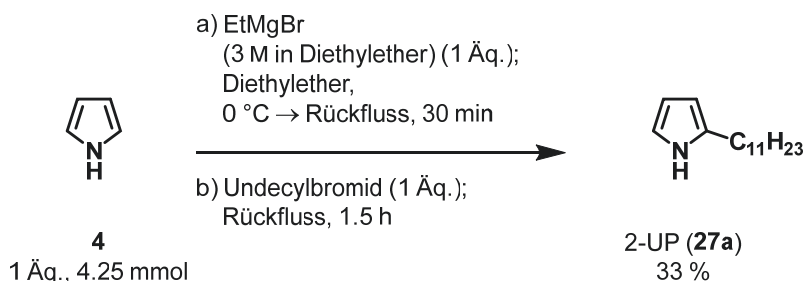
### Synthese von 2-alkylierten Pyrrolen – Syntheseroute C

Die Synthese der 2-Alkylpyrrole **27a–27g** (Schema 20C) wurde u. a. im Rahmen der Bachelorarbeit von B. Sc. *Annabel Arens* durchgeführt.<sup>[259]</sup> Die Syntheseroute basierte dabei auf den Publikationen von *Yadav et al.* und *Lv et al.* sowie der bereits in vorherigen Arbeiten etablierten Syntheseroute für 2-UP (**27a**) (Kapitel 5.7.2, Schema 17).<sup>[17, 249, 250]</sup> Da Pyrrole unter den meist verwendeten Bedingungen einer *Friedel-Crafts*-Acylierung zum Polymerisieren neigen, wurde die Acylierung ausgehend von 1H-Pyrrol (**4**) unter Einsatz von elementarem Zink durchgeführt (Schema 23).<sup>[249, 250]</sup>



**Schema 23.** Synthesesequenz C zur Herstellung von 2-alkylierten Pyrrolen.

Während als Lösungsmittel von *Yadav et al.* Toluol verwendet wurde, fand in der Publikation von *Lv et al.* Diethylether Verwendung.<sup>[249, 250]</sup> Die Extraktion des Reaktionsansatzes und das Entfernen des Lösungsmittels erwies sich bei Verwendung von Diethylether als einfacher in der Handhabung, sodass Diethylether weiterhin als Lösungsmittel bei der Acylierung verwendet wurde. Die Überreduktion zum Alkan nach erfolgter Acylierung wurde unter Verwendung von Lithiumaluminiumhydrid durchgeführt, wie es auch bei der Synthese von 3-Alkylpyrrolen **27** bereits erfolgreich angewendet wurde. Im Rahmen der Bachelorarbeit von B. Sc. *Annabel Arens* fand keine säulenchromatographische Reinigung nach der Acylierung statt und die Reduktion mit Lithiumaluminiumhydrid wurde direkt im Anschluss durchgeführt.<sup>[259]</sup> Die Ausbeuten der Synthesesequenz sind jedoch gering, sodass hier eine weitere Optimierung der Reaktionssequenz nötig wäre oder der Zugang zu 2-Alkylpyrrolen **27** über alternative Syntheserouten in Betracht gezogen werden müsste. Eine alternative einstufige Synthese zu 2-UP (**27a**, Lit.: 22–33%) wurde von *Wasserman et al.* 1976 publiziert, in vorangegangenen Arbeiten erprobt und könnte daher statt der in Schema 23 dargestellten Syntheseroute den Zugang zu 2-UP (**27a**) und auch Derivaten ermöglichen (Schema 24).<sup>[17, 255]</sup>



**Schema 24.** Synthese von 2-UP (**27a**). Synthese nach *Wassermann et al.*, adaptiert von Dr. *Andreas S. Klein*.<sup>[17, 255]</sup>

## Übersicht über alle synthetisierten Pyrrole

Die nachstehende Tabelle 3 gibt eine Übersicht über alle in dieser Arbeit hergestellten Pyrrole. Alle Pyrrole, die zwar verwendet wurden, aber nicht im Rahmen dieser Arbeit hergestellt wurden, sind in Kapitel 8.2.2, Tabelle 22 aufgeführt.

**Tabelle 3.** Übersicht über die in dieser Arbeit synthetisierten Pyrrole.

| Monopyrrol                  | R <sup>1</sup>       | R <sup>2</sup>       | (CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> | Syntheseroute | Gesamtausbeute [%]    |
|-----------------------------|----------------------|----------------------|---------------------------------|---------------|-----------------------|
| <b>3b</b> <sup>[a,b]</sup>  | Methyl               | Methyl               | —                               | A             | 36 <sup>[b]</sup>     |
| <b>3i</b> <sup>[b,c]</sup>  | Methyl               | Ethyl                | —                               | A             | 30 <sup>[b]</sup>     |
| <b>3a</b> <sup>[a,b]</sup>  | Methyl               | <i>n</i> -Pentyl     | —                               | A             | 37 <sup>[b]</sup>     |
| <b>3f</b> <sup>[a,b]</sup>  | Methyl               | <i>n</i> -Octyl      | —                               | A             | 42 <sup>[b]</sup>     |
| <b>3h</b> <sup>[a,b]</sup>  | Methyl               | <i>n</i> -Dodecyl    | —                               | A             | 38 <sup>[b]</sup>     |
| <b>57f</b> <sup>[b,c]</sup> | Ethyl                | Methyl               | —                               | A             | 26 <sup>[b]</sup>     |
| <b>57g</b> <sup>[b,c]</sup> | Ethyl                | <i>n</i> -Propyl     | —                               | A             | 4 <sup>[b]</sup>      |
| <b>57a</b> <sup>[a,b]</sup> | Ethyl                | <i>n</i> -Pentyl     | —                               | A             | 7 <sup>[b]</sup>      |
| <b>57e</b> <sup>[b,c]</sup> | <i>n</i> -Propyl     | Ethyl                | —                               | A             | 13 <sup>[b]</sup>     |
| <b>57c</b> <sup>[a,b]</sup> | <i>n</i> -Pentyl     | <i>n</i> -Butyl      | —                               | A             | 55 <sup>[b]</sup>     |
| <b>82e</b> <sup>[b,d]</sup> | —                    | —                    | 5                               | A             | 1 <sup>[b]</sup>      |
| <b>82a</b> <sup>[b,d]</sup> | —                    | —                    | 8                               | A             | 23 <sup>[b]</sup>     |
| <b>56c</b> <sup>[a,b]</sup> | H                    | Ethyl                | —                               | B             | 21 <sup>[b]</sup>     |
| <b>56d</b> <sup>[a,b]</sup> | H                    | <i>n</i> -Propyl     | —                               | B             | 36 <sup>[b]</sup>     |
| <b>56b</b> <sup>[a,b]</sup> | H                    | <i>n</i> -Pentyl     | —                               | B             | 13 <sup>[b]</sup>     |
| <b>56e</b> <sup>[a,b]</sup> | H                    | <i>n</i> -Hexyl      | —                               | B             | 75 <sup>[b]</sup>     |
| <b>56f</b> <sup>[a,b]</sup> | H                    | <i>n</i> -Octyl      | —                               | B             | 40 <sup>[b]</sup>     |
| <b>56a</b> <sup>[a,b]</sup> | H                    | <i>n</i> -Undecyl    | —                               | B             | 20 <sup>[b]</sup>     |
| <b>56g</b> <sup>[b,c]</sup> | H                    | <i>n</i> -Dodecyl    | —                               | B             | 48 <sup>[b]</sup>     |
| <b>56h</b> <sup>[b,c]</sup> | H                    | <i>n</i> -Tetradecyl | —                               | B             | 52 <sup>[b]</sup>     |
| <b>56i</b> <sup>[b,c]</sup> | H                    | <i>n</i> -Hexadecyl  | —                               | B             | 83 <sup>[b]</sup>     |
| <b>27f</b> <sup>[e]</sup>   | <i>n</i> -Propyl     | H                    | —                               | C             | 2 <sup>[e]</sup>      |
| <b>27e</b> <sup>[e]</sup>   | <i>n</i> -Pentyl     | H                    | —                               | C             | 5 <sup>[e]</sup>      |
| <b>27d</b> <sup>[e]</sup>   | <i>n</i> -Octyl      | H                    | —                               | C             | 19 <sup>[e]</sup>     |
| <b>27a</b> <sup>[b,e]</sup> | <i>n</i> -Undecyl    | H                    | —                               | C             | 2–11 <sup>[b,e]</sup> |
| <b>27c</b> <sup>[e]</sup>   | <i>n</i> -Tetradecyl | H                    | —                               | C             | 19 <sup>[e]</sup>     |
| <b>27g</b> <sup>[e]</sup>   | <i>n</i> -Hexadecyl  | H                    | —                               | C             | 17 <sup>[e]</sup>     |

<sup>[a]</sup> Klein et al.<sup>[197]</sup>

<sup>[b]</sup> Wurde im Rahmen dieser Arbeit synthetisiert.

<sup>[c]</sup> Brass et al.<sup>[177]</sup>

<sup>[d]</sup> Klein et al.<sup>[247]</sup>

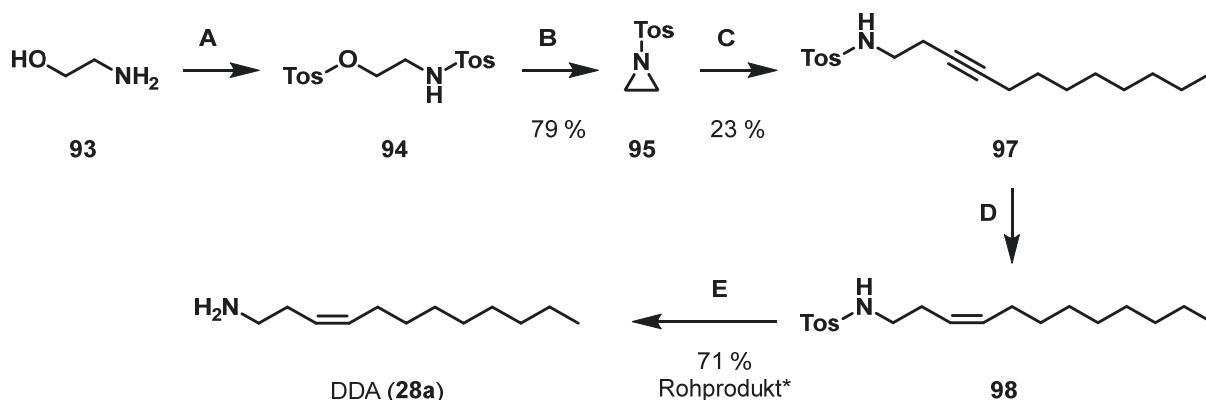
<sup>[e]</sup> Wurde von B. Sc. Annabel Arens im Rahmen ihrer Bachelorarbeit synthetisiert.<sup>[259]</sup>



### 6.1.1.2 Synthese von DDA (28a)

Bei dem natürlichen Substrat der Kondensationsenzyme aus *P. citrea* und *P. tunicata* handelt es sich um DDA (**28a**), sodass auch hier die Synthese dieses Moleküls als Grundlage für folgende Untersuchungen notwendig war (Kapitel 8.2.6). Die gewählte Route zur Herstellung von DDA (**28a**) folgte der von *Pinkerton et al.* 2007 publizierten Synthese, die Teil der Totalsynthese des Tambjamins YP1 (**26a**) aus *P. tunicata* ist.<sup>[260]</sup>

Die Synthese von DDA (**28a**) beginnt mit der Tosylierung von Startmaterial **93** zu *N,O*-Ditosylethanolamin (**94**), welches nachfolgend zu 1-Tosylaziridin (**95**) umgesetzt wird (Schema 25). Dieser Teil der Synthesesequenz basierte auf Vorschriften von *Moss et al.*<sup>[261]</sup>



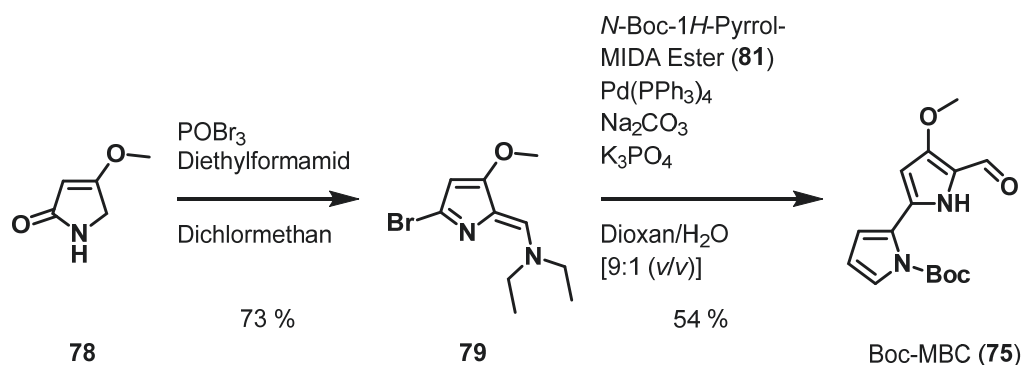
**Schema 25.** Übersicht über die Synthese von DDA (**28a**). Es wurden die folgenden Reaktionsbedingungen verwendet: **A:** a) *p*-Tosylchlorid, Pyridin, -10 °C; b) **93**, Pyridin, -10 °C; c) -10 °C → 0 °C, 6 h; **B:** a) **94**, Toluol; b) KOH, H<sub>2</sub>O; RT, 2 h, stark rühren; **C:** a) **96**, THF, 18 °C; b) *n*-BuLi (2.5 M in Hexan), 18 °C, 20 min; c) **95**, THF, 18 °C, 4 h; **D:** a) **97**, Chinolin, Pentan; b) Lindlar-Katalysator, H<sub>2</sub>-Atmosphäre, RT, 2 h; **E:** a) Naphthalin, 1,2-Dimethoxyethan; b) Natrium, RT, 2.5 h; c) **98**, 1,2-Dimethoxyethan, RT, 1 h; d) Ethanol. [\* = Das NMR nach säulenchromatographischer Isolierung zeigte Verunreinigungen unbekannter Art.]

Ausgehend von 1-Tosylaziridin (**95**) und 1-Decin (**96**) wird Verbindung **97** synthetisiert und die Dreifachbindung im Folgeschritt unter Nutzung des Lindlar-Katalysators unter H<sub>2</sub>-Atmosphäre Z-selektiv reduziert, so dass Verbindung **98** entsteht. Durch Entschützung wird im finalen Schritt das Amin **28a** erhalten. Die säulenchromatographische Isolierung von DDA (**28a**) konnte leichte Verunreinigungen unbekannter Art jedoch nicht entfernen. Dennoch konnte DDA (**28a**) als *Precursor* für verschiedene *in vitro* Assays genutzt werden.

## 6.1.2 Synthese von Referenzprodukten

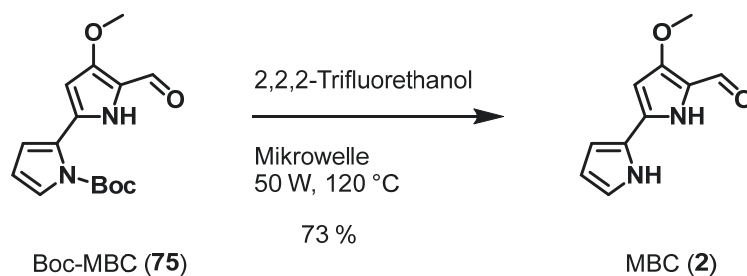
### Synthese von Boc-MBC (75) und MBC (2)

Die chemische Synthese von Prodigininen als Referenzverbindungen bedingt die vorherige Herstellung des Bipyrrrol-Bausteins Boc-MBC (**75**). Ebenso ist die Synthese des Bausteins MBC (**2**) für die Produktion von Prodigininen *via* Biokatalyse erforderlich. Dabei konnte auf eine zuvor bereits etablierte Syntheseroute (Schema 26) zurückgegriffen werden, bei der zunächst Bromenamin **79** *via* eines *Vilsmeier-Haack*-Reagenzes ausgehend von Startmaterial **78** synthetisiert wird. Nach anschließender *Suzuki*-Kupplung mit Boronsäure **80** wird Boc-MBC (**75**) erhalten (Kapitel 8.2.3).<sup>[17, 156, 205]</sup>



**Schema 26.** Synthese von Boc-MBC (75).

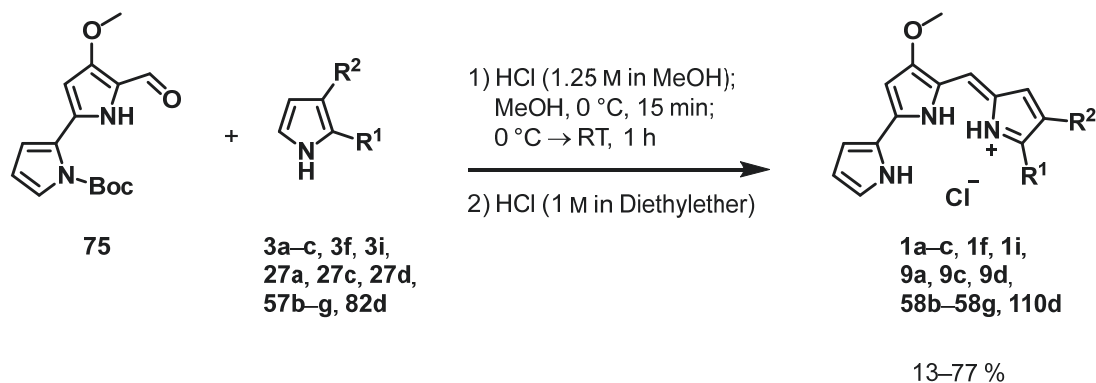
Boc-MBC (75) konnte in einer Mikrowellenreaktion zu MBC (2) mittels 2,2,2-Trifluorethanol entschützt und so für den Einsatz in *in vitro* Assays und Biokatalyseansätzen bereit gestellt werden (Schema 27). Diese Reaktion wurde im Rahmen dieser Arbeit im größeren Maßstab durchgeführt und die Reinigung des Zielprodukts vereinfacht. So wurde an Stelle einer säulenchromatographischen Isolierung von MBC (2) die Reaktionsmischung nach der Mikrowellenreaktion lediglich mit Lösungsmittel gewaschen und dieses anschließend unter reduziertem Druck entfernt.<sup>[17, 177]</sup>



**Schema 27.** Synthese von MBC (2)

### Synthese von Prodigininen

Die Synthese der verschiedenen Prodiginine als Referenzverbindung und zur Untersuchung der Bioaktivität erfolgte entsprechend den zuvor etablierten Reaktionsbedingungen, bei denen Boc-MBC (75) mit dem entsprechenden Monopyrrol unter sauren Bedingungen zum Prodiginin kondensiert wird (Schema 28; Kapitel 8.2.4).<sup>[17]</sup>



**Schema 28.** Kondensationsreaktion zur Synthese von Prodigininen.

Eine Übersicht der in dieser Arbeit synthetisierten Prodiginine kann Tabelle 4 entnommen werden.

**Tabelle 4.** Übersicht der in dieser Arbeit synthetisierten Prodiginine.

|  | Prodiginin  | R <sup>1</sup>       | R <sup>2</sup>   | (CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> | Gesamtausbeute [%] |
|--|-------------|----------------------|------------------|---------------------------------|--------------------|
|  | <b>1b</b>   | Methyl               | Methyl           | —                               | 31                 |
|  | <b>1i</b>   | Methyl               | <i>n</i> -Ethyl  | —                               | 77                 |
|  | <b>1c</b>   | Methyl               | <i>n</i> -Propyl | —                               | 20                 |
|  | <b>1a</b>   | Methyl               | <i>n</i> -Pentyl | —                               | 44                 |
|  | <b>1f</b>   | Methyl               | <i>n</i> -Octyl  | —                               | 13                 |
|  | <b>58f</b>  | Ethyl                | Methyl           | —                               | 84 <sup>[a]</sup>  |
|  | <b>58g</b>  | Ethyl                | <i>n</i> -Propyl | —                               | 52                 |
|  | <b>58e</b>  | <i>n</i> -Propyl     | Ethyl            | —                               | 51                 |
|  | <b>58b</b>  | <i>n</i> -Butyl      | <i>n</i> -Propyl | —                               | 41                 |
|  | <b>58c</b>  | <i>n</i> -Pentyl     | <i>n</i> -Butyl  | —                               | 39                 |
|  | <b>58d</b>  | <i>n</i> -Hexyl      | <i>n</i> -Pentyl | —                               | 65                 |
|  | <b>110d</b> | —                    | —                | 12                              | 13                 |
|  | <b>9d</b>   | <i>n</i> -Octyl      | H                | —                               | 34 <sup>[b]</sup>  |
|  | <b>9a</b>   | <i>n</i> -Undecyl    | H                | —                               | 24 <sup>[b]</sup>  |
|  | <b>9c</b>   | <i>n</i> -Tetradecyl | H                | —                               | 23 <sup>[b]</sup>  |

<sup>[a]</sup> Im NMR ist deutlich erkennbar, dass noch Lösungsmittel im Produkt enthalten war, daher wird die tatsächliche Ausbeute unter dem hier angegebenen Wert liegen.

<sup>[b]</sup> Wurde von B. Sc. *Annabel Arens* im Rahmen ihrer Bachelorarbeit synthetisiert.<sup>[259]</sup>

## 6.2 Neue Kondensationsenzyme – neue Prodiginine?

Das Schlüsselenzym der Biosynthese von Prodigininen ist das sogenannte Kondensationsenzym, welches die C-C-Knüpfung zwischen der MBC (**2**) Einheit und einem Monopyrrol katalysiert, und so den eigentlichen Naturstoff aus dieser Reaktion hervorgehen lässt. Im Falle des Gram-negativen Bakteriums *S. marcescens* katalysiert die Ligase PigC die Kondensation von MBC (**2**) und MAP (**3a**) zu Prodigiosin (**1a**). Die Akzeptanz unnatürlicher Monopyrrole und die Breite des Substratspektrums von PigC ermöglichte die Produktion neuer Prodigiosin (**1a**) Derivate mithilfe des Mutasyntheseansatzes.<sup>[17, 197]</sup> Dennoch ist eine natürliche Limitierung der Chemo-selektivität von PigC zu beobachten (vgl. Kapitel 5.5.1, Abbildung 14):

- Pyrrole mit Methylgruppe in 2-Position und variierender *n*-Alkylkette in 3-Position werden nur eingeschränkt akzeptiert – Pyrrole mit Substituent in 3-Position kleiner als ein *n*-Propylrest oder größer als eine *n*-Octylgruppe werden kaum umgesetzt
- Bei Fehlen der Methylgruppe in 2-Position ist die Akzeptanz der Pyrrole wesentlich stärker eingeschränkt
- Ist der Substituent in 2-Position des Monopyrrols größer als ein Methylsubstituent so führt dies zu nahezu fehlender Produktion des entsprechenden Prodiginins.

Der Zugang zu neuen Prodigiosin (**1a**) Derivaten im biokatalytischen Kontext kann über unterschiedliche Wege realisiert werden. Zum einen ist es möglich das Kondensationsenzym PigC über *directed evolution* oder eine Kombination aus ungerichteten sowie gerichteten Methoden des Proteindesigns zu verändern, wobei das Screening Augenmerk auf Pyrrolsubstrate gerichtet werden sollte, die vom nativen Enzym nicht oder nur wenig umgesetzt werden. Auf diese Weise könnten die Limitationen in der Chemo-selektivität von PigC überwunden werden. Dieser Ansatz wurde im Rahmen des BioSC (*Bioeconomy Science Center*) FocusLabs CombiCom in einer Kooperation mit Prof. Dr. Ulrich Schwaneberg, Dr. A. Joëlle Ruff und M. Sc. Stefanie Brands (Lehrstuhl für Biotechnologie, RWTH Aachen) verfolgt unter Nutzung der sogenannten *KnowVolution* Strategie (*knowledge gaining directed evolution*).<sup>[262]</sup> Zum anderen bietet die Suche nach bisher unbekannten oder nicht charakterisierten PigC Homologen *via* Proteinsequenzabgleiche in Datenbanken des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI; Bethesda, MD, USA) mithilfe des BLAST-Algorithmus<sup>9</sup> die Möglichkeit Enzyme zu finden, die potentiell eine andere Chemo-selektivität als PigC aufweisen. Diese Strategie wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit verfolgt.<sup>[195, 196]</sup>

### 6.2.1.1 Suche nach neuen putativen Kondensationsenzymen

Für die Suche nach neuen putativen Kondensationsenzymen wurden Recherchen mithilfe des BLAST-Algorithmus durchgeführt und die Aminosäuresequenz von PigC (*S. marcescens*) dafür genutzt.<sup>[195]</sup> Die Proteinsequenz von PigC lässt sich in drei Domänen einteilen (vgl. Kapitel 5.4.7), wobei die N-terminale Domäne Sequenzähnlichkeiten zur ATP-Bindedomäne einer PEPS aufweist,

<sup>9</sup> September 2019: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

wohingegen der C-Terminus einer Phosphotransferdomäne von PPKK ähnelt. Der mittlere Sequenzbereich entspricht jedoch keinem Protein bekannter Funktion und ist somit vermutlich für die Substratspezifität verantwortlich.<sup>[16, 19, 20, 37]</sup> Sequenzvergleiche unter Nutzung der vollständigen Aminosäuresequenz von PigC können daher potentiell Suchergebnisse für Proteine erbringen, die eine hohe Homologie zu PPKK oder PPKK aufweisen. Um falsch positive Ergebnisse auszuschließen, wurde der Proteinsequenzabgleich nur mit der Aminosäuresequenz der mittleren Domäne von PigC durchgeführt. Die Suche nach PigC Homologen wurde in einem parallelen Suchprozess zudem weiter modifiziert, indem der Sequenzvergleich *via* BLAST-Algorithmus auf Ergebnisse aus der Gattung *Pseudoalteromonas* beschränkt wurde, da die den Prodigininen strukturell ähnlichen Tambjamine von Arten der Gattung *Pseudoalteromonas* als gelbes Pigment produziert werden, ebenfalls unter Nutzung von Kondensationsenzymen (Kapitel 5.4.7). Ausgewählte Suchergebnisse wurden mithilfe des Online Programms COBALT<sup>10</sup> (*Constraint based Multiple Alignment Tool*) in einem phylogenetischen Baum dargestellt (Kapitel 5.4.7, Abbildung 13), in welchem sich drei Gruppen ausmachen lassen.<sup>[194]</sup>

1. Kondensationsenzyme, die MBC (2) mit primären Aminen wie DDA (28a) zu Tambjaminen verknüpfen und von Gram-negativen marinen Bakterien der Gattung *Pseudoalteromonas* produziert werden
2. Kondensationsenzyme, welche 2-UP (27a) mit MBC (2) kondensieren und aus *Streptomycetaceae* stammen
3. Kondensationsenzyme, welche MAP (3a) als natürliches Substrat besitzen und von u. a. Bakterien der Gattungen *Hahella*, *Serratia* oder *Pseudoalteromonas* produziert werden.

Über die Analyse des phylogenetischen Stammbaums hinaus, wurden auch die Gencluster der entsprechenden Organismen vergleichend analysiert.

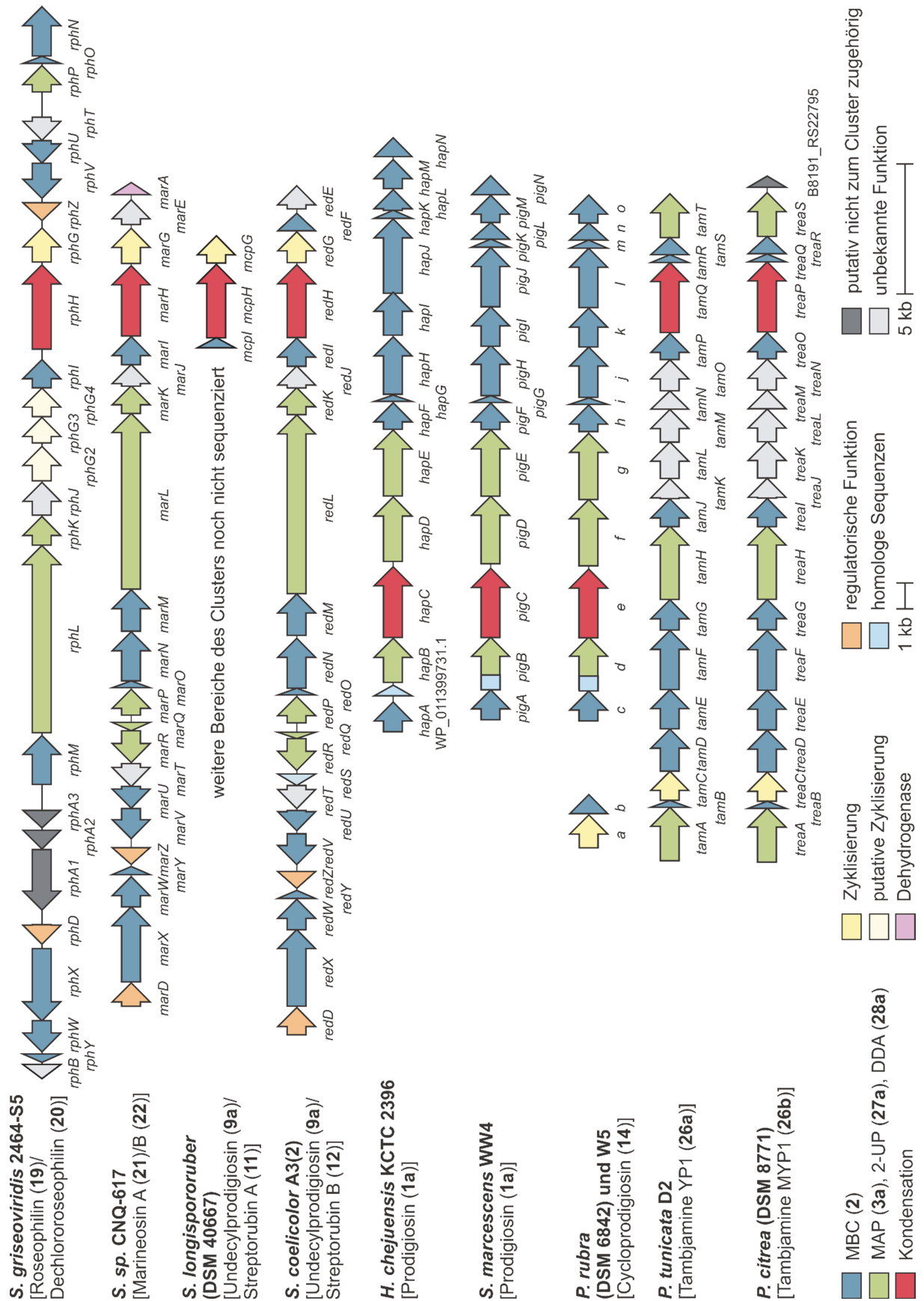
### 6.2.1.2 Genclusteranalyse von Prodiginin und Tambjamine produzierenden Organismen

Auf Basis der BLAST Ergebnisse zu PigC Homologen konnten mithilfe der NCBI Datenbanken die genomische Umgebung der für die Kondensationsenzyme codierenden Gene betrachtet werden sofern Sequenzinformationen vorhanden waren. Auf diesem Wege und durch Sequenzvergleiche auf DNA- und/oder Proteinebene *via* BLAST-Algorithmus sowie Vergleiche mit den bekannten *pig*- und *red*-Clustern konnten verschiedene Gencluster vergleichend betrachtet werden.<sup>[19, 20, 37, 44, 167-169, 172]</sup> Untersucht wurden zum einen die Gencluster von *S. griseoviridis* 2464-S5<sup>11</sup>, *S. sp.* CNQ-617, *S. longispororuber* (DSM 40667) und *S. coelicolor* A3(2).<sup>[37, 44, 45, 68, 164, 166-169, 199, 263]</sup> Die beiden letztgenannten Stämme produzieren beide Undecylprodigiosin (9a) und die zyklischen Derivate Metacycloprodigiosin (11, Streptorubin A) und Butyl-*meta*-cycloprodigiosin (12, Streptorubin B), wohingegen *S. griseoviridis* 2464-S5 und *S. sp.* CNQ-617 Roseophilin (19) und Dechlororoseophilin (20) respektive Marineosin A (21) und B (22) herstellen (vgl. Kapitel 5.2.2 Tabelle 1). Zum anderen wurden

<sup>10</sup> September 2019: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/cobalt/cobalt.cgi>

<sup>11</sup> In der Veröffentlichung von *Kawasaki et al.* wird das hier als *rphB* bezeichnete Gen nicht zum Cluster dazugezählt, in den Zuordnungen der NCBI Datenbanken (GenBank: AB469822.2) wird *rphB* jedoch als solches bezeichnet und zum Cluster zugeordnet.<sup>[68]</sup>

die Gencluster der Prodigiosin (**1a**) Produzenten *S. marcescens* WW4 und *H. chejuensis* KCTC 2396 mit in den Vergleich einbezogen, ebenso wie *P. rubra* (DSM 6842) bzw. W5.<sup>[19, 20, 37, 59, 170-173, 175, 264, 265]</sup> Dieses Bakterium stellt ein zyklisches Derivat von Prodigiosin (**1a**) her, das sogenannte Cycloprodigiosin (**14**). Darüberhinaus wurden auch die Gencluster der Tambjamine YP1 (**26a**) und Tambjamine MYP1 (**26b**) Produzenten *P. tunicata* D2 und *P. citrea* (DSM 8771) betrachtet (vgl. Kapitel 5.3.1 Tabelle 2).<sup>[135, 174-177, 201]</sup> Alle genannten Gencluster wurden vergleichend dargestellt, wobei die Ausrichtung aller Gencluster vereinheitlicht wurde, ungeachtet ihrer Ausrichtung in den jeweiligen Genomen. (Abbildung 19; detaillierte Infos finden sich in Tabelle A 1–Tabelle A 4; Darstellung durch das Programm *Easyfig*.<sup>[266]</sup>

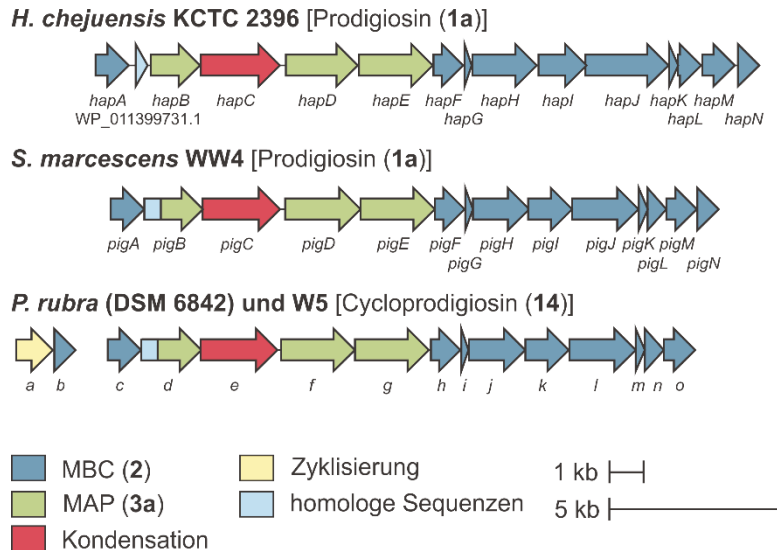


**Abbildung 19.** Gencluster verschiedener Tambjamin- und Prodigiosinproduzenten. [a = PRUB685<sup>[265]</sup>, b = PRUB675<sup>[265]</sup>, c = EBQ21\_RS08995, d = EBQ21\_RS08990, e = EBQ21\_RS08985, f = EBQ21\_RS08980, g = EBQ21\_RS08975, h = EBQ21\_RS08970, i = EBQ21\_RS08965, j = EBQ21\_RS08960, k = EBQ21\_RS08955, l = EBQ21\_RS08950, m = EBQ21\_RS08945, n = EBQ21\_RS08940, o = EBQ21\_RS08935]



## Prodigiosin (1a) und Cycloprodigiosin (14) Produzenten

Bei Betrachtung der kleinsten Gencluster, die der Prodigiosin (1a) und Cycloprodigiosin (14) produzierenden Bakterien, wird die starke Konservierung des Genclusters deutlich (Abbildung 19, Abbildung 20).

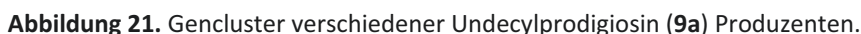


**Abbildung 20.** Gencluster verschiedener Prodigiosin (1a) und Cycloprodigiosin (14) Produzenten. [a-o: siehe Bildunterschrift von Abbildung 19]

Abweichungen sind bei *P. rubra* zu erkennen, dem Stamm der Cycloprodigiosin (14) herstellt. Auffällig ist hier, dass das Cluster auf zwei verschiedene *loci* aufgeteilt ist. An einem *locus* befinden sich die zu *pigA–M* homologen Gene, während ein *PigN* Homolog nicht vorhanden ist. Die Abwesenheit des *pigN* Homologs führte *de Rond et al.* auf die Spur des zweiten *locus*, an dem sich zwar kein direktes *pigN* Homolog befindet, jedoch ein Gen mit Ähnlichkeit zu *redF*, einem Gen aus *S. coelicolor* A3(2), welches die Rolle von *pigN* in diesem Organismus erfüllen soll.<sup>[16, 37, 265]</sup> In direkter Nachbarschaft zu dem *pigN* Homolog befindet sich ein Gen, welches für ein Enzym codiert, dass die Umsetzung von Prodigiosin (1a) zu Cycloprodigiosin (14) katalysiert. Interessanterweise ist dieses Enzym jedoch nicht mit *Rieske*-Nicht-Häm-Eisen-Oxygenasen wie RedG aus *S. coelicolor* A3(2) verwandt, das die Zyklisierung von Undecylprodigiosin (9a) zu Butyl-*meta*-cycloprodigiosin (12, Streptorubin B) katalysiert, sondern der nächste charakterisierte Verwandte ist eine Alkylglycerol Monooxygenase (AGMO).<sup>[265]</sup> Diese AGMOs kommen nur in *Metazoa* und einigen *Protisten* vor und bilden einen isolierten eukaryotischen Zweig der Fettsäure-Hydroxylase Familie.<sup>[265]</sup> Sie benötigen den Cofaktor Tetrahydrobiopterin und sind die einzig bekannten Enzyme, welche die Spaltung der Etherbindung von Alkylglycerolen katalysieren, weshalb diese Enzyme auch unter dem Namen Glyceryl-Ether Monooxygenasen bekannt sind.<sup>[267-269]</sup> Die Verteilung des Cycloprodigiosin (14) Genclusters auf zwei verschiedene *loci* spricht dafür, dass die Gene *pigA–M* in einem horizontalen Gentransfer erhalten wurden, während das *pigN* Äquivalent (Gen *b*, Abbildung 19 und Abbildung 20) sowie das Gen, welches das für die Zyklisierung verantwortliche Enzym (AMGO) codiert (Gen *a*, Abbildung 19 und Abbildung 20), in einem anderen unabhängigen horizontalen Gentransfer Ereignis übertragen wurden,



Während die MBC (**2**) Biosynthese bei Undecylprodigiosin (**9a**) produzierenden Bakterien gleichartig zu Prodigiosin (**1a**) Produzenten verläuft, unterscheidet sich die Biosynthese der entsprechenden Monopyrrole 2-UP (**27a**) und MAP (**3a**) deutlich voneinander (Biosynthesen Kapitel 5.4.3–5.4.5). Die Gencluster Undecylprodigiosin (**9a**) und Prodigiosin (**1a**) produzierender Organismen differieren deutlich voneinander in Größe und Organisation, trotz der Ähnlichkeiten in der Biosynthese von MBC (**2**) (Abbildung 19, Abbildung 21).



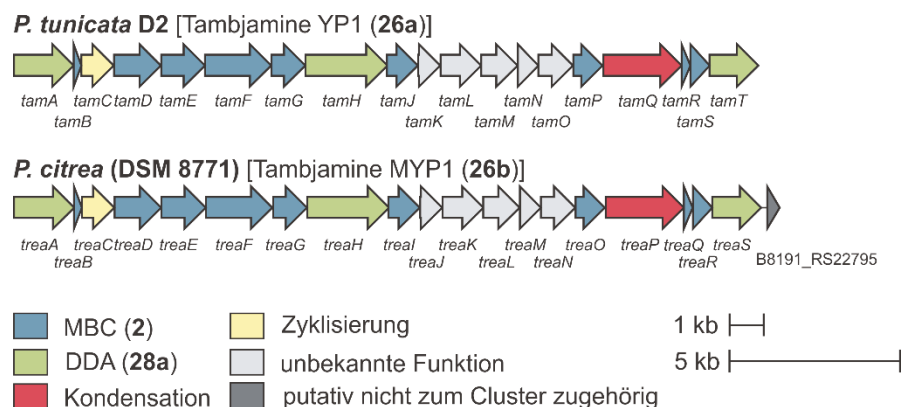
Innerhalb der Organismen, die Undecylprodigiosin (**9a**) und dessen zyklische Derivate **11**, **12**, **19**, **20**, **21** und **22** bilden, sind jedoch die Ähnlichkeiten gut erkennbar. Im Falle des *mcp*-Genclusters von *S. longispororuber* (DSM 40667) kann ein weiterer Vergleich aufgrund der noch nicht vorhandenen Gensequenzen nicht vollzogen werden. Lediglich die Gensequenzen, die für das Kondensationsenzym McpH und die Zyklase McpG codieren, sind vollständig vorhanden sowie Teilsequenzen des *mcpI* Gens.<sup>[45]</sup> Es kann jedoch spekuliert werden, dass das *mcp*-Cluster eine starke Ähnlichkeit zum *red*-Cluster aufweist, da die Naturstoffprodukte der Gencluster Streptorubin A (**11**, *mcp*-Cluster) und Streptorubin B (**12**, *red*-Cluster) sich lediglich in der Art der Zyklisierung des *Precursors* Undecylprodigiosin (**9a**) unterscheiden.

Das *red*- sowie das *mar*-Gencluster des Marineosin A (**21**) und Marineosin B (**22**) produzierenden Stammes *S. sp.* CNQ-617, sind nahezu identisch aufgebaut und organisiert.<sup>[199]</sup> Der offensichtliche Unterschied liegt in dem Gen *marA*, welches für eine Dehydrogenase codiert, die den finalen Schritt der Marineosin A/B (**21**, **22**) Biosynthese katalysiert, indem sie eine Doppelbindung im B-Ring des

Marineosin A/B (**21**, **22**) *Precursors* reduziert.<sup>[199]</sup> Sowohl in der Größe des Genclusters als auch in der Organisation unterscheidet sich das *rph*-Gencluster des Roseophilin (**19**) und Dechlororoseophilin (**20**) produzierenden Bakteriums *S. griseoviridis* 2464-S5 von den *red*- und *mar*-Genclustern.<sup>[68]</sup> Beim Vergleich dieser drei Gencluster ist auffällig, dass sich die Bereiche *downstream* von *rphL* sowie *upstream* von *rphG* deutlich vom *red*- und *mar*-Cluster unterscheiden und stark ein Rekombinationsereignis vermuten lassen. Die Gene *rphA1*, *rphA2* und *rphA3* sind höchstwahrscheinlich im Zuge dieses Rekombinationsevents Teil des Genclusters geworden. Homologe Gene zu diesen drei Genen sind in *S. coelicolor* A3(2) sehr weit vom *red*-Cluster entfernt, was den Schluss zulässt, dass die Gene *rphA1*, *rphA2* und *rphA3* keine Funktion bei der Biosynthese von Roseophilin (**19**) bzw. Dechlororoseophilin (**20**) haben. Putativ handelt es sich bei diesen um ABC-Transporter Gene sowie regulatorische Gene. Neben dem *redG* Homolog *rphG* (*Rieske*-Nicht-Häm-Eisen-Oxygenase) finden sich mit *rphG2*, *rphG3* und *rphG4* noch drei weitere putative Oxygenasen im *rph*-Gencluster. *Kimata et al.* zeigten jedoch, dass keines dieser drei letztgenannten potentiellen Oxygenasen Undecylprodigiosin (**9a**) zyklisieren konnte, so dass eine spätere Beteiligung dieser Oxygenasen beim Aufbau des Roseophilin (**19**) Kohlenstoffgerüsts vermutet wird. Im Gencluster konnten zudem keine Gene gefunden werden, die eine Furanringbildung oder Chlorierung erklären würden, die jedoch zwei strukturelle Merkmale des Roseophilins (**19**) darstellen.<sup>[270]</sup>

## Gencluster der Tambjamine Produzenten

Die Gencluster der Tambjamine Produzenten *P. citrea* (DSM 8771) und *P. tunicata* D2 wurden ebenfalls in den Genclustervergleich aufgenommen und zeigen eine sehr starke Ähnlichkeit untereinander (Abbildung 19, Abbildung 22). Deutlich erkennbar ist, dass alle für die MBC (**2**) Biosynthese notwendigen Gene vorhanden sind, auch wenn sich die Anordnung der Gene von den der Prodigosin (**1a**) und Undecylprodigosin (**9a**) bzw. deren zyklische Derivate **11**, **12**, **19–22** produzierenden Bakterien unterscheidet. Die MBC (**2**) Biosynthese scheint somit stark konserviert zu sein.



**Abbildung 22.** Gencluster verschiedener Tambjamine Produzenten.

Jeweils fünf nebeneinander im Cluster liegende Gene haben bisher unbekannte Funktion in der Biosynthese der Tambjamine. Putativ handelt es sich u.a. um ABC-Transporterproteine. Das

*tam*-Gencluster wurde bereits annotiert und benannt, wobei zu beachten ist, dass die ursprünglich durch *Burke et al.* vergebene Benennung von *tamL*/TamL in der Literatur fälschlicherweise als *taml*/Taml übernommen wurde.<sup>12[135]</sup> Im Rahmen dieser Arbeit wird die von *Burke et al.* veröffentlichte Bezeichnung verwendet. Im Gegensatz zum *tam*-Cluster war das Gencluster von *P. citrea* (DSM 8771) bisher noch nicht benannt worden, sodass im Zuge der Veröffentlichung von Teilen der vorliegenden Arbeit eine Vergabe von Namen stattfand und das Cluster als *trea*-Cluster bezeichnet wurde, um auch namentlich eine Unterscheidung vom *tam*-Cluster zu gewährleisten.<sup>13[177]</sup> Im Falle von *P. citrea* (DSM 8771) findet sich nach dem Gen *treaS* noch ein weiteres Gen (B8191\_RS22795), allerdings kann diesem keine Funktion in der Tambjamine Biosynthese zugeordnet werden. In *P. tunicata* D2 findet sich ein homologes Gen, dessen Genprodukt jedoch als putatives *orphan protein* annotiert ist und nicht in der Nähe des *tam*-Clusters lokalisiert ist, sodass das auf *treaS* folgende Gen (B8191\_RS22795) höchstwahrscheinlich nicht zum *trea*-Cluster zugehörig ist.

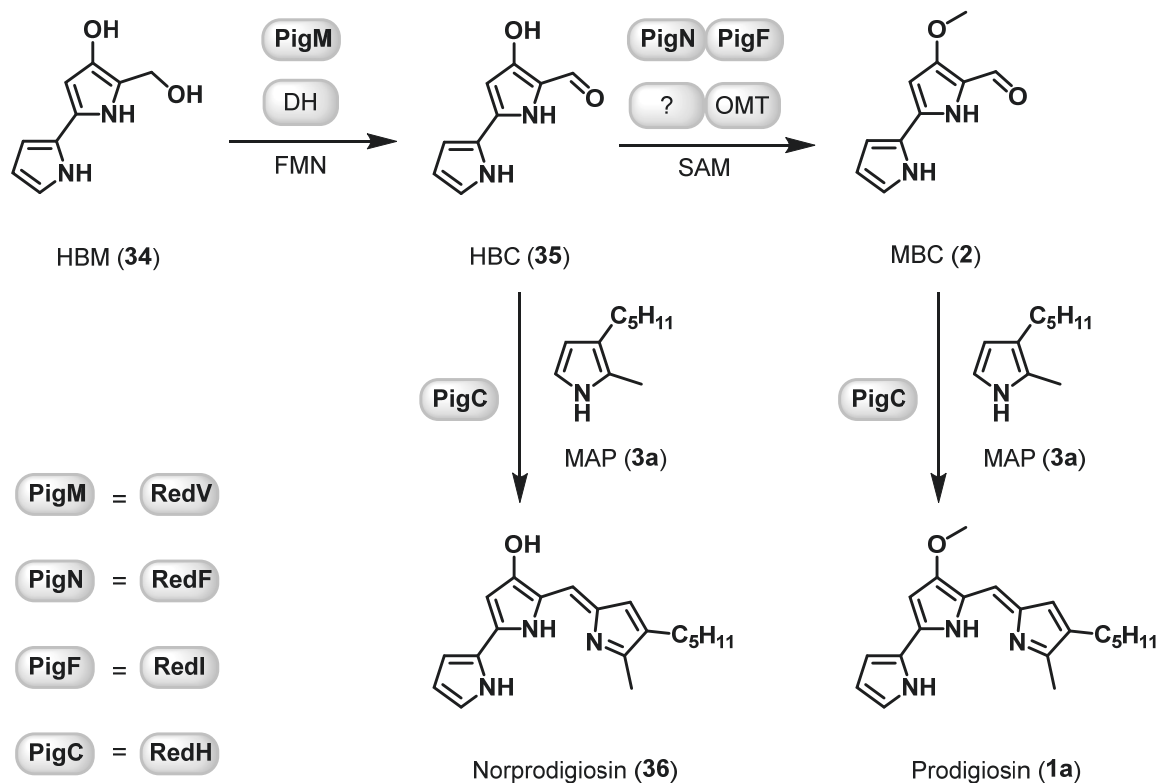
Interessanterweise finden sich sowohl in *P. tunicata* D2 als auch in *P. citrea* (DSM 8771) Gene, die für (putative) Oxidasen codieren. Erst kürzlich konnte von *Picott et al.* gezeigt und mittels NMR-Analyse nachgewiesen werden, dass *P. citrea* (DSM 8771) das zyklische Tambjamine MYP1 (**26b**) produziert.<sup>[137]</sup> Die Produktion eines zyklischen Tambjamins in *P. tunicata* D2 wird von *Burke et al.* flüchtig erwähnt, jedoch wurden hierzu keine weiteren Untersuchungen veröffentlicht.<sup>[135]</sup> Die Präsenz von TamC in *P. tunicata* D2 legt allerdings nahe, dass eine oxidative Zyklisierung von Tambjamine YP1 (**26a**) möglich und zu erwarten wäre.

## O-Methylierung von MBC (2)

Die Rolle von PigN/RedF in der Biosynthese von MBC (**2**) ist bisher nicht endgültig geklärt, jedoch ist eine Diskussion auf Basis des Gencluster Vergleichs in Abbildung 19 und vor dem Hintergrund der Literatur möglich. In der MBC (**2**) Biosynthese katalysieren PigF/RedI, bei denen es sich um S-Adenosylmethionin (SAM)-abhängige O-Methyltransferasen (OMT) handelt, die Methylierung der Hydroxygruppe des HBCs (**35**), sodass MBC (**2**) entsteht (Schema 29). Die genaue Funktion von PigN/RedF ist bisher ungeklärt, vermutet wird jedoch, dass dieses Enzym ebenfalls an dieser Methylierungsreaktion beteiligt ist, da in PigN-defizienten Mutanten Norprodigiosin (**36**) akkumuliert, dem Kondensationsprodukt aus HBC (**35**) und MAP (**3a**).<sup>[16, 19, 37]</sup>

<sup>12</sup> Ursächlich für die unterschiedliche Benennung in der Literatur könnte sein, dass ein klein geschriebenes „l“ (L) leicht mit dem Großbuchstaben „I“ (i) verwechselt werden kann.

<sup>13</sup> In einer späteren Publikation von *Picott et al.* findet sich für das Kondensationsenzym aus *P. citrea* dennoch die Benennung TamQ, was zu möglichen Verwechslungen führen könnte.<sup>[176, 201]</sup>



**Schema 29.** Ausschnitt aus der MBC (2) Biosynthese. Dargestellt sind die beteiligten Enzyme des *pig* Clusters und deren Homologe im *red* Cluster. Alternativ zur Kondensation von MBC (2) und MAP (3a) zu Prodigiosin (1a) kann auch HBC (35) mit MAP (3a) zu Norprodigiosin (36) kondensiert werden. [*pig* Cluster = *S. marcescens*; *red* Cluster = *S. coelicolor* A3(2); DH = Dehydrogenase, FMN = Flavinmononukleotid, OMT = O-Methyltransferase, SAM = S-Adenosylmethionin].

In *S. coelicolor* A3(2) scheint jedoch nur RedI an der Transformation von HBC (35) zu MBC (2) beteiligt zu sein.<sup>[16, 19]</sup> Betrachtet man nun die Gencluster und die zugehörigen Informationen<sup>14</sup> (Abbildung 19 und Tabelle 5), so ist zu erkennen, dass *S. marcescens* WW4, *H. chejuensis* KCTC 2396, *S. coelicolor* A3(2) und *P. rubra* (DSM 6842) bzw. W5 sowohl eine O-Methyltransferase besitzen als auch eine Phospholipid-Methyltransferase.

**Tabelle 5.** Übersicht über Prodiginin produzierende Organismen und deren (putative) Methyltransferasen.

| Organismus                            | O-Methyltransferase                             | Phospholipid-Methyltransferase Homolog                  |
|---------------------------------------|-------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|
| <i>S. marcescens</i> WW4              | PigF                                            | PigN                                                    |
| <i>H. chejuensis</i> KCTC 2396        | HapF                                            | HapN                                                    |
| <i>S. coelicolor</i> A3(2)            | RedI                                            | RedF                                                    |
| <i>P. rubra</i> (DSM 6842) bzw. W5    | EBQ21_RS08970<br>(Gen <i>h</i> in Abbildung 19) | PRUB675 <sup>[265]</sup> (Gen <i>b</i> in Abbildung 19) |
| <i>P. citrea</i> (DSM 8771)           | TreaO                                           | —                                                       |
| <i>P. tunicata</i> D2                 | TamP                                            | —                                                       |
| <i>S. sp.</i> CNQ-617                 | MarI                                            | —                                                       |
| <i>S. longispororuber</i> (DSM 40667) | Mcpl                                            | —                                                       |
| <i>S. griseoviridis</i> 2464-S5       | RphI                                            | —                                                       |

<sup>14</sup> Detaillierte Informationen zu den Genclustern können Tabelle A 1–Tabelle A 4 entnommen werden.

Homologe zu PigN, dem Enzym mit bisher unbekannter Funktion, sind jedoch nicht in *P. citrea* (DSM 8771), *P. tunicata* D2, *S. sp.* CNQ-617, *S. longispororuber* (DSM 40667) oder *S. griseoviridis* 2464-S5 zu finden. Die *O*-Methylierung von HBC (**35**) und somit Produktion von MBC (**2**) scheint in diesen Organismen ohne Vorhandensein eines zu PigN bzw. RedF homologen Proteins, das die bisher unbekannte Funktion von PigN/RedF erfüllt, zu funktionieren. Hier verdeutlicht sich erneut, dass die eigentlichen *O*-Methyltransferasen PigF bzw. RedI und deren Homologe sein müssten und PigN/RedF nur unterstützende Funktion haben können.

Für PigN konnten bereits Transmembranbereiche des Proteins vorhergesagt werden, ebenso wie für das homologe Protein RedF.<sup>[19, 37, 265]</sup> Eine mögliche Funktion von PigN könnte daher die Rekrutierung von PigF zur Membran sein. Das Kondensationsenzym PigC soll, ebenso wie PigB, das den finalen Schritt in der MAP (**3a**) Biosynthese katalysiert, in der Membran lokalisiert sein. Dies wurde bereits von *de Rond et al.* im Kontext des Cycloprodigosin (**14**) Produzenten *P. rubra* diskutiert.<sup>[265]</sup> Auch von *Williamson et al.* wurde eine assistierende Funktion von RedF angedacht.<sup>[19]</sup> Die Notwendigkeit zweier Proteine für die Methylierung von HBC (**35**) wäre ebenso im Einklang mit den Untersuchungen von *Feitelson et al.*, die nahe legten, dass zwei Genprodukte für diese Reaktion nötig sind, die zudem wahrscheinlich an die Membran gebunden sind.<sup>[37, 271, 272]</sup> Möglicherweise findet sich an der Zellmembran ein Komplex verschiedener Proteine (PigB, PigC, PigN) zusammen, die an den finalen Schritten der Naturstoffsynthese beteiligt sind, sodass das Prodiginin im Anschluss aus der Zelle transportiert werden kann. Strukturbiologische Untersuchungen könnten Aufschluss über diesen Sachverhalt geben.

Die Genclustervergleiche legen somit nahe, dass PigF/RedI die *O*-Methylierung von HBC (**35**) katalysieren und dennoch bleibt die Frage offen, weshalb sich in anderen Prodiginin produzierenden Organismen keine Proteinhomologe zu PigN/RedF finden lassen.

## 6.2.2 Klonierung und Expression ausgewählter Kondensationsenzyme

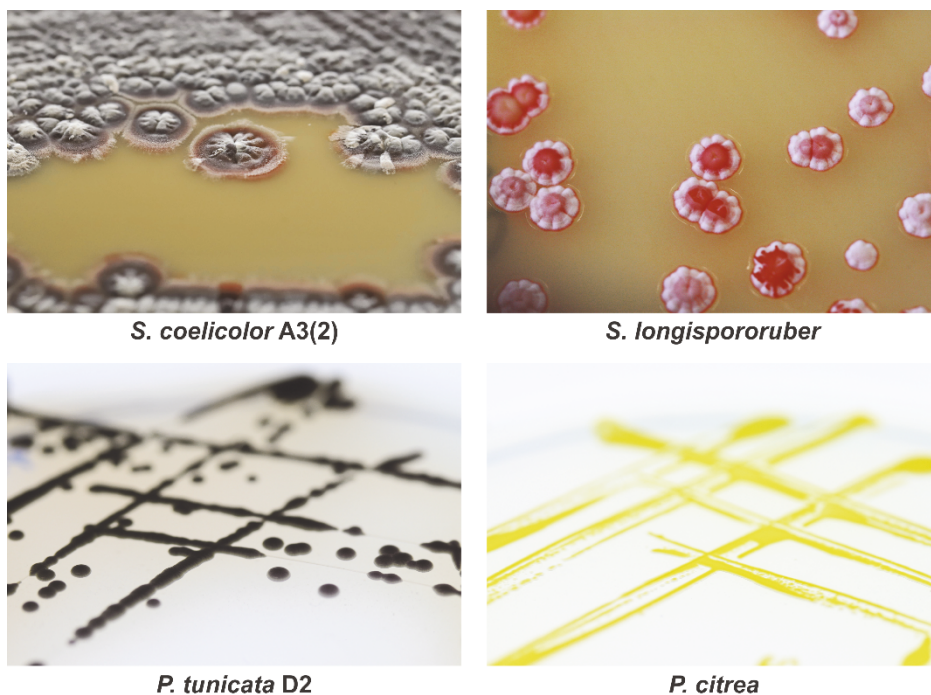
Der biosynthetische Zugang zu strukturell neuen Prodigininen mit putativ anderen Bioaktivitäten ist durch die Chemoselektivität und das limitierte Substratspektrum des Kondensationsenzyms PigC eingeschränkt. Die Suche nach bisher unbekannten oder nicht charakterisierten homologen Proteinen eröffnet die Möglichkeit Kondensationsenzyme zu finden, die eine andere Chemoselektivität als PigC aufweisen. Basierend auf den Genclusteranalysen (Abbildung 19) und aufgrund der Betrachtung des phylogenetischen Baumes (Kaptitel 5.5, Abbildung 13) wurden verschiedene, zu PigC homologe, Kondensationsenzyme für nähere Untersuchungen ausgewählt. Zum einen wurden mit RedH und McpH Kondensationsenzyme aus verschiedenen *Streptomycetaceae* ausgesucht, die Undecylpyrrol (**27a**) und MBC (**2**) kondensieren. In späteren Betrachtungen wurde auch das Protein MarH mit in die Auswahl einbezogen. Diese Proteine können den Zugang zu Undecylprodigosin (**9a**) ermöglichen sowie eine mögliche Akzeptanz von Pyrrolen mit langen *n*-Alkylketten in der 2-Position. Zum anderen waren TreaP und TamQ von großem Interesse, die als Kondensationsenzyme in der Tambjamine Biosynthese beteiligt sind. Diese Ligasen katalysieren die Reaktion zwischen MBC (**2**) und



dem primären Amin DDA (**28a**), jedoch war unbekannt, ob auch Pyrrole von diesen Enzymen als Substrate angenommen werden können. Somit wurden drei Kondensationsenzyme aus *Streptomycetaceae* und zwei aus *Pseudoalteromonadaceae* für nähere Analysen ausgewählt.

#### 6.2.2.1 Anzucht und Genomisolierung von *Streptomycetaceae* und *Pseudoalteromonadaceae*

Für eine Klonierung und Expression der zwei ausgewählten Gene *redH* und *mcpH* aus *Streptomycetaceae*<sup>15</sup> sowie *tamQ* und *treaP* aus *Pseudoalteromonadaceae* war ein Zugang zu den entsprechenden Genen obligatorisch. Daher wurden zum einen die Stämme *S. coelicolor* A3(2) und *S. longispororuber* sowohl auf Agarplatten als auch in Flüssigkultur in Glycerin-Medium sowie M65-Medium angezogen, um Zellmaterial erhalten zu können (Abbildung 23, oben).



**Abbildung 23.** Anzucht von *Streptomycetaceae* und *Pseudoalteromonadaceae* auf Agarplatten. [Foto von *S. coelicolor* A3(2): CC BY-NC-SA: Dr. Andreas S. Klein]

Die Anzucht erfolgte analog zu den Anzuchtbedingungen, die im Rahmen vorangegangener Arbeiten für die Kultivierung von *S. coelicolor* A3(2) etabliert wurden und konnte auch auf die Anzucht von *S. longispororuber* übertragen werden.<sup>[17]</sup> Zum anderen wurden die marinen Mikroorganismen *P. tunicata* D2 und *P. citrea* ebenfalls auf Agarplatten (Abbildung 23, unten) und in Flüssigkultur angezogen, wobei hier als Medium Marine-Boullion verwendet wurde. Nach Anzucht und Ernte der *S. coelicolor* A3(2), *S. longispororuber*, *P. tunicata* D2 und *P. citrea* Flüssigkulturen, erfolgte die Isolierung der genomischen DNA aus den *Streptomycetaceae* nach einem Protokoll von Kumar *et al.*, wohingegen bei *Pseudoalteromonadaceae* ein kommerzielles Kit für die Genomisolierung verwendet

<sup>15</sup> Das für MarH codierende Gen wurde als synthetisches Gen bestellt.

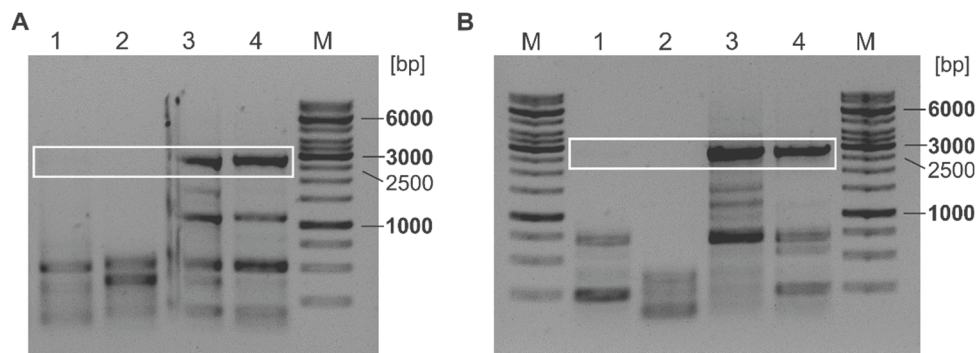
wurde (Kapitel 8.3.3.2).<sup>[273]</sup> Die so erhaltene genomische DNA der Mikroorganismen diene als Ausgangsmaterial für die folgenden Klonierungsschritte.

### 6.2.2.2 Klonierung der für Kondensationsenzyme codierenden Gene aus *Streptomycetaceae*

Alle für Kondensationsenzyme codierenden Gene sollten von den entsprechenden Genomen amplifiziert und anschließend *via Gibson Assembly*<sup>®</sup> (Kapitel 8.3.8) in den mit *NdeI* und *XhoI* linearisierten Vektor pET28a(+) eingefügt werden. Dabei wurden die Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *XhoI* im finalen Konstrukt nicht erhalten und auch auf die Fusion eines His<sub>6</sub>-tags wurde verzichtet. Die Klonierungsstrategien erfolgten somit in Anlehnung an die erfolgreiche Klonierungsstrategie von *pigC*, das in vorangegangenen Arbeiten *via Gibson Assembly*<sup>®</sup> in den Vektor pET28a(+) eingefügt wurde (Vektorkarten und Sequenzen: Kapitel 9.6).<sup>[17, 197]</sup>

#### Klonierung von *redH* und *mcpH*

Die Gene *redH* und *mcpH* sollten zunächst aus der entsprechenden genomischen DNA amplifiziert werden. Die Amplifikation des Gens *redH* vom zuvor isolierten Genom von *S. coelicolor* A3(2) mit den *Gibson Assembly*<sup>®</sup> Primerpaaren HB03/04 und auch HB09/10<sup>16</sup> (Tabelle 18) war erfolgreich und ergab Amplifikate der erwarteten Größe von ca. 2.8 kb (Abbildung 24), jedoch war eine Zugabe von 10% DMSO zum PCR-Ansatz (Kapitel 8.3.2) nötig.



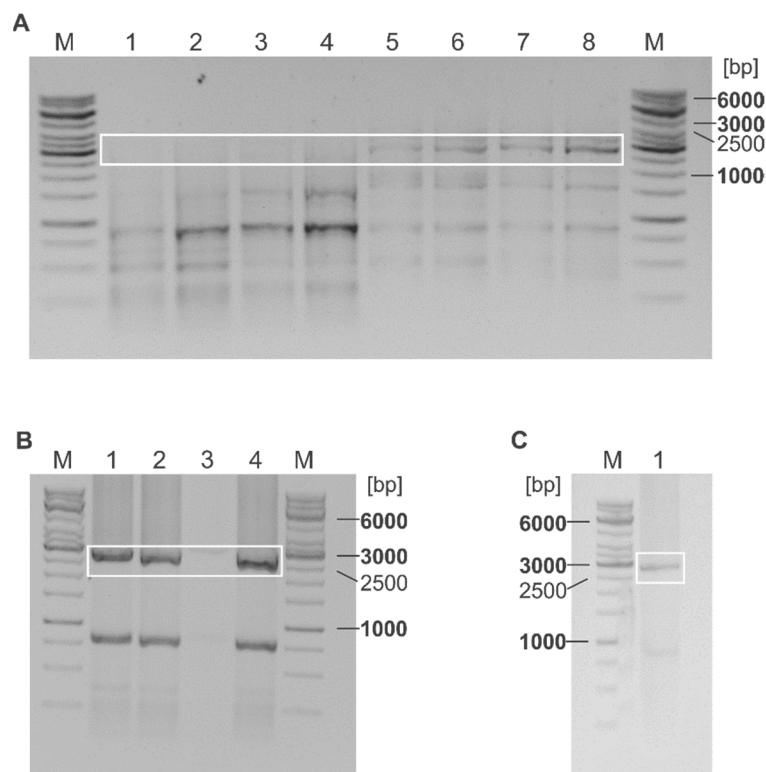
**Abbildung 24.** Amplifikation des Gens *redH* (2.8 kb) aus dem Genom von *S. coelicolor* A3(2). **A:** Amplifikation von *redH* mit dem Primerpaar HB03/04 mittels Gradienten-PCR und Zusatz von 10% DMSO. [1 = 51.7 °C, 2 = 54.7 °C, 3 = 59.4 °C, 4 = 62.7 °C, M = 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)]. **B:** Amplifikation von *redH* mit dem Primerpaar HB09/10 mittels Gradienten-PCR und Zusatz von 10% DMSO. [1 = 59.9 °C, 2 = 61.9 °C, 3 = 64.9 °C, 4 = 69.5 °C, M = 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)]

Nach Isolierung der Banden auf Höhe von ca. 2.8 kb aus dem Agarosegel (Kapitel 8.3.6), konnte das Plasmid pET28a(+):*redH* *via Gibson Assembly*<sup>®</sup> erstellt werden (Kapitel 9.6.2, Abbildung A 19).

Im Gegensatz zu *redH* erwies sich die Amplifikation des Gens *mcpH* von der genomischen DNA aus *S. longispororuber* als problematisch, auch unter Verwendung höherer DMSO Konzentrationen bis zu 10% in den PCR-Ansätzen, die bei der Amplifikation GC-reicher Template von Vorteil sein können.<sup>[274-276]</sup> Da eine Amplifikation des Gens *mcpH* mit *Gibson Assembly*<sup>®</sup> Primern (Primerpaar HB05/06; Tabelle 18) initial nicht erfolgreich war, wurde ein *Nested PCR* Ansatz (Details zur Methode in

<sup>16</sup> Die Primer HB09/10 sind um 8 Basen (HB09) bzw. 5 Basen (HB10) länger als das Primerpaar HB03/04. Die Sequenz, die an das Zielgen bindet wurde so verlängert.

Kapitel 8.3.2.4) verfolgt, um Nebenprodukte durch unspezifisches Binden der Primer zu reduzieren. So wurde zunächst eine PCR mit beiden Primerpaaren, dem inneren (HB24/25) und dem äußeren Primerpaar (HB28/29), durchgeführt. Es konnten jedoch nicht die gewünschten Amplifikate erhalten werden (Abbildung 25A). Ein PCR-Ansatz nur mit dem äußeren Primerpaar HB28/29 (Tabelle 18) war allerdings erfolgreich und erbrachte Amplifikate der erwarteten Größe von ca. 3.0 kb, sodass dieser Ansatz als Template für einen zweiten PCR-Ansatz mit dem inneren Primerpaar HB24/25 (Tabelle 18) genutzt und das entsprechende DNA-Fragment mit einer Größe von ca. 2.8 kb aus dem Agarosegel isoliert werden konnte. Im Anschluss wurde das Isolat als Template-DNA für eine PCR mit *Gibson Assembly*® Primern (Primerpaar HB05/06; Tabelle 18) verwendet und auch in diesem Fall das DNA-Fragment der entsprechenden Größe von ca. 2.8 kb aus dem Agarosegel isoliert und im *Gibson Assembly*® eingesetzt.

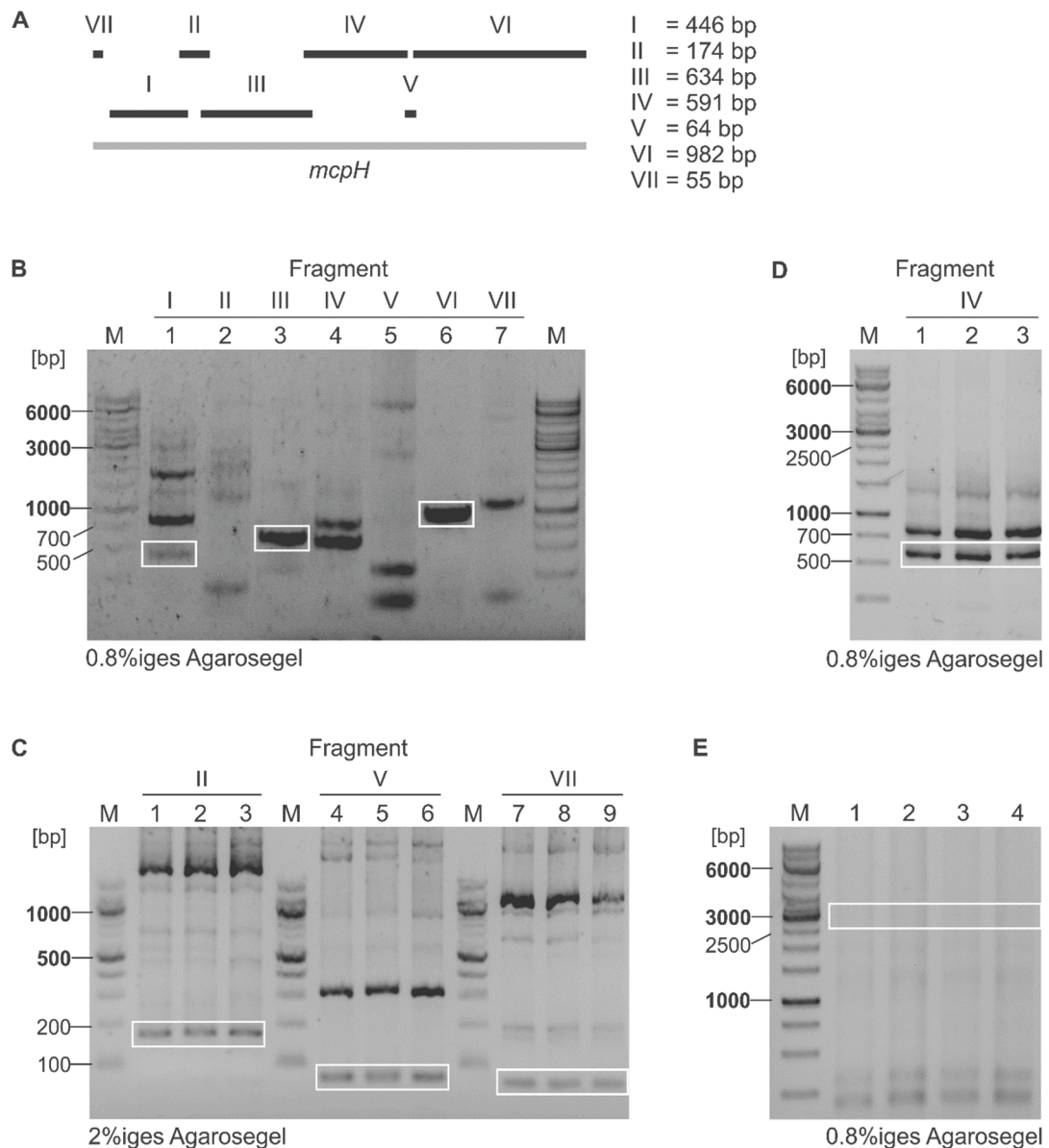


**Abbildung 25.** Amplifikation des Gens *mcpH* (2.8 kb, *S. longispororuber*). **A:** Nested PCR zur Amplifikation von *mcpH* aus dem Genom von *S. longispororuber* mit den beiden Primerpaaren HB24/25 und HB28/29 (Spalte 1–4) sowie nur mit dem äußeren Primerpaar HB28/29 (Spalte 5–8). [1, 5 = 61.4 °C; 2, 6 = 63.5 °C; 3, 7 = 66.3 °C; 4, 8 = 68.4 °C; M = 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA); erwartetes Fragment Spalte 1–4 = 2.8 kb; erwartetes Fragment Spalte 5–8 = 3.0 kb]. **B:** Nested PCR zur Amplifikation von *mcpH* aus dem Genom von *S. longispororuber* mit dem inneren Primerpaar HB24/25. [1 = 60.2 °C, 2 = 61.4 °C, 3 = 63.5 °C, 4 = 66.4 °C, M = 1 kb DNA Ladder; erwartetes Fragment = 2.8 kb]. **C:** Amplifikation von *mcpH* nach Nested PCR mit *Gibson Assembly*® Primern (HB05/06). [1 = 68.4 °C, M = 1 kb DNA Ladder; erwartetes Fragment = 2.8 kb].

Letztlich wurde ein pET28a(+):*mcpH* Konstrukt erhalten, welches allerdings sieben nicht stumme Punktmutationen aufwies (Kapitel: 9.6.2, Abbildung A 24). Aufbauend auf diesem Konstrukt, sollten daher die Punktmutationen mithilfe einer *Overlap Extension* PCR Strategie (Details zur Methode in Kapitel 8.3.2.5) und unter Nutzung von mutagenen Primern (Primer HB33–HB44; Tabelle 18) wieder entfernt werden. Zwar konnten die entsprechenden Teilstücke des Gens (Abbildung 26A) mit den



gewünschten Mutationen in einzelnen PCR-Ansätzen erstellt werden, (Abbildung 26 B–D) jedoch scheiterte auch diese Strategie, da die finale Assemblierung nicht erfolgreich war (Abbildung 26 E) und keine Bande mit der gewünschten Größe von 2.8 kb beobachtet werden konnte.



**Abbildung 26.** *Overlap Extension PCR* des Gens *mcpH* (2.8 kb, *S. longispororuber*). **A:** Erwartete Größen der Fragmente I–VII. **B:** Initiale Amplifikation der Fragmente I–VII mit den Primern HB33–HB44. [1–7 = 56.0°C, M = 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)]. **C:** Erneute Amplifikation der kleinen Fragmente II, V, VII mit den Primern HB34/37, 40/43, 24/44. [1, 5, 8 = 55.0°C; 2, 6, 9 = 60.0°C; 3 = 65.0°C; 4, 7 = 50.0°C; M = Quick-Load® 100 bp DNA Ladder (New England BioLabs GmbH (Frankfurt am Main, Deutschland); 2%iges Agarosegel]. **D:** Erneute Amplifikation des Fragments IV mit den Primern HB38/41. [1 = 50.0°C, 2 = 55.0°C, 3 = 60.0°C; M = 1 kb DNA Ladder]. **E:** *Overlap Extension PCR* mit allen Fragmenten und den Primern HB24/25. [1 = 49.8°C, 2 = 54.7°C, 3 = 59.4°C, 4 = 64.4°C, M = 1 kb DNA Ladder].

Auch der Einsatz der *Herculase II Fusion* DNA Polymerase, die auch entsprechend den Herstellerangaben lange und GC-reiche Gene amplifizieren können soll, anstelle der *Phire Hot Start II* DNA-Polymerase und die alternative Verwendung der *Gibson Assembly®* Primer anstelle des Primerpaars HB24/25 führte nicht zum Erfolg des letzten Assemblierungsschritts.<sup>[277]</sup>

Die beobachteten Probleme während aller Klonierungsstrategien könnte sich auf den hohen Anteil an Guanin und Cytosin im Genom der *Streptomyceten* zurückführen lassen. Das Genom von *S. longispororuber* wurde bislang noch nicht vollständig sequenziert, sodass keine Aussage über den gesamten GC-Gehalt des Genoms getroffen werden kann, jedoch beträgt der GC-Gehalt des Genoms von *S. coelicolor* A3(2) 72.1%<sup>17</sup>, was sich deutlich von *E. coli* Stämmen unterscheidet, die mit 50.8% GC-Gehalt<sup>18</sup> ein ausgewogenes Verhältnis aller Basen aufweisen. [165, 278] Bei Betrachtung des GC-Gehalts der Gene *redH* und *mcpH* lassen sich jedoch keine Unterschiede im GC-Gehalt feststellen, da sowohl *mcpH* aus *S. longispororuber* als auch *redH* aus *S. coelicolor* A3(2) einen Anteil von 71.5% an Guanin und Cytosin besitzen, sodass die Gründe für die problematische Klonierung des Gens *mcpH* nicht vollständig geklärt werden können. Schlussendlich wurde das Gen *mcpH* als synthetisches Gen bestellt, da sich hier der Vorteil ergibt eine Codonharmonisierung oder Codonoptimierung durchzuführen.

### Klonierung von *marH\_synth*, *redH\_synth* und *mcpH\_synth*

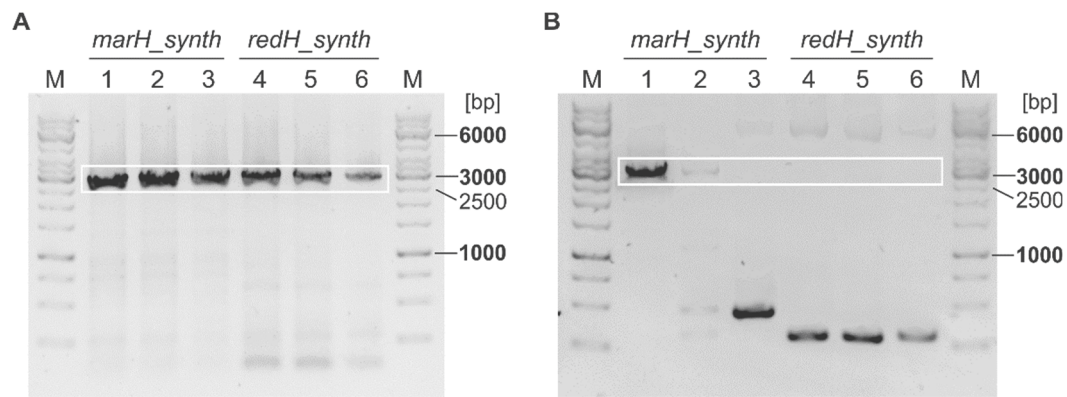
Aufgrund der zuvor beschriebenen Schwierigkeiten bei der Klonierung von Genen aus *Streptomycetaceae*, wurden die Gene *marH* und auch *redH* als synthetische Gene (hier daher als *marH\_synth* bzw. *redH\_synth* bezeichnet) im Vektor pUC57 bestellt, wobei für *marH* eine Codonoptimierung und im Falle von *redH* eine Codonharmonisierung für *P. putida* vorgenommen wurde, um auch eine potentielle Expression in *P. putida* zu ermöglichen (Kapitel 9.6.2, Abbildung A 20–Abbildung A 23, Abbildung A 25–Abbildung A 27). Die im folgenden Abschnitt beschriebenen Klonierungsarbeiten wurden mit Ausnahme der Konstruktion des Plasmids pET28a(+):*mcpH\_synth* sowie der Erstellung des Stammes *E. coli* DH5 $\alpha$ \_pET28a(+):*mcpH\_synth* von B. Sc. Annabel Arens im Rahmen ihrer Bachelorarbeit durchgeführt.<sup>[259]</sup>

Da die Gene *marH\_synth* und *redH\_synth* flankiert von den Schnittstellen *NdeI* und *XhoI* vorlagen, sollten die Gene zunächst mittels klassischer Restriktion und Ligation in den Vektor pET28a(+) kloniert werden. Diese Versuche waren jedoch erfolglos, sodass *marH\_synth* und *redH\_synth* schließlich vom Vektor pUC57::*marH\_synth* bzw. pUC57::*redH\_synth* amplifiziert und *via Gibson Assembly*<sup>®</sup> in den mit *NdeI* und *XhoI* linearisierten Vektor pET28a(+) eingefügt wurden. Die Amplifikation der Gene *redH\_synth* bzw. *redH\_synth* mit den *Gibson Assembly*<sup>®</sup> Primern (HB\_AAR\_ga\_*marH\_fw*, HB\_AAR\_ga\_*marH\_rv*, HB\_AAR\_ga\_*redH\_fw*, HB\_AAR\_ga\_*redH\_rv*; Tabelle 18) konnte erfolgreich durchgeführt werden (Abbildung 27 A).

---

<sup>17</sup> *S. coelicolor* A3(2) (NCBI Referenzsequenz: NC\_003888.3)

<sup>18</sup> *E. coli str. K-12 substr. MG1655* (NCBI Referenzsequenz: NC\_000913.3)



**Abbildung 27.** Amplifikation der Gene *marH\_synth* (2.7 kb) und *redH\_synth* (2.8 kb) und Ergebnisse der Test-PCR. **A:** Amplifikation der Gene *marH\_synth* (2.7 kb) und *redH\_synth* (2.8 kb) von den Vektoren pUC57::*redH\_synth* bzw. pUC57::*marH\_synth* mit den *Gibson Assembly*<sup>®</sup> Primern HB\_AAR\_ga\_*marH\_fw*, HB\_AAR\_ga\_*marH\_rv*, HB\_AAR\_ga\_*redH\_fw*, HB\_AAR\_ga\_*redH\_rv*. [1, 4 = 55.0°C; 2, 5 = 56.9°C; 3, 6 = 59.1°C; M = 1 kb DNA Ladder (*Thermo Scientific*, Waltham, MA, USA)]. **B:** Test-PCR zum Nachweis des Plasmids pET28a(+):*redH\_synth* bzw. pET28a(+):*marH\_synth* mit den Primern T7 und pRSET-RP [1–6 = 46.0°C, M = 1 kb DNA Ladder].

Die Erstellung des Konstrukts pET28a(+):*marH\_synth* *via Gibson Assembly*<sup>®</sup> war erfolgreich und konnte mittels Test-PCR (Abbildung 27 B, Spalte 4–6; Test-PCR: 8.3.2.2) nach Plasmidisolierung und mittels Sequenzierung verifiziert werden. Im Gegensatz dazu blieben die Versuche zur Erstellung des Plasmids pET28a(+):*redH\_synth* erfolglos, da nach *Gibson Assembly*<sup>®</sup> und Transformation von *E. coli* DH5α und Plasmidisolierung wiederholt nur der Leervektor (LV) *via* PCR mit den Primern T7 und pRSET-RP (Tabelle 18) nachgewiesen werden konnte (Abbildung 27 B).

Da der Leervektor pET28a(+) nach Restriktion *via* Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und aus dem Gel isoliert wurde, ebenso wie das mit *Gibson Assembly*<sup>®</sup> Primern amplifizierte Gen *redH\_synth*, ist der beobachtete hohe Leervektorhintergrund nach *Gibson Assembly*<sup>®</sup> und Transformation nur schwerlich zu erklären. Als Alternative zum *Gibson Assembly*<sup>®</sup> könnten u. a. noch andere Klonierungsstrategien wie TOPO-Klonierung oder das *Gateway*<sup>®</sup> Klonierungssystem in Betracht gezogen werden.<sup>[279-281]</sup>

Die Ursachen der fehlgeschlagenen Klonierungen könnten jedoch im Falle des Gens *redH\_synth* auch darauf zurückzuführen sein, dass das Gen *redH\_synth* für *E. coli* toxisch ist und daher keine positiven Transformanten isoliert werden konnten.

### Erfolgreich erstellte Konstrukte

Durch die zuvor beschriebene Klonierungsarbeiten konnten letztlich drei Plasmide erfolgreich erstellt werden. Tabelle 6 gibt eine Übersicht über die drei Plasmide, die erstellt wurden und so nachfolgend für Expressionsversuche und Aktivitätstests zur Verfügung standen.

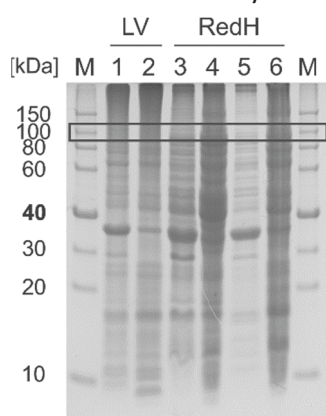
**Tabelle 6.** Übersicht der erfolgreich erstellten Plasmide mit Genen, die für Kondensationsenzyme aus *Streptomycetaceae* kodieren.

| Plasmid                      | Gen         | Ursprungsorganismus des Gens |
|------------------------------|-------------|------------------------------|
| pET28a(+): <i>redH</i>       | <i>redH</i> | <i>S. coelicolor</i> A3(2)   |
| pET28a(+): <i>marH_synth</i> | <i>marH</i> | <i>S. sp.</i> CNQ-617        |
| pET28a(+): <i>mcpH_synth</i> | <i>mcpH</i> | <i>S. longispororuber</i>    |

### 6.2.2.3 Genexpression und Aktivitätsassays der Kondensationsenzyme aus *Streptomycetaceae*

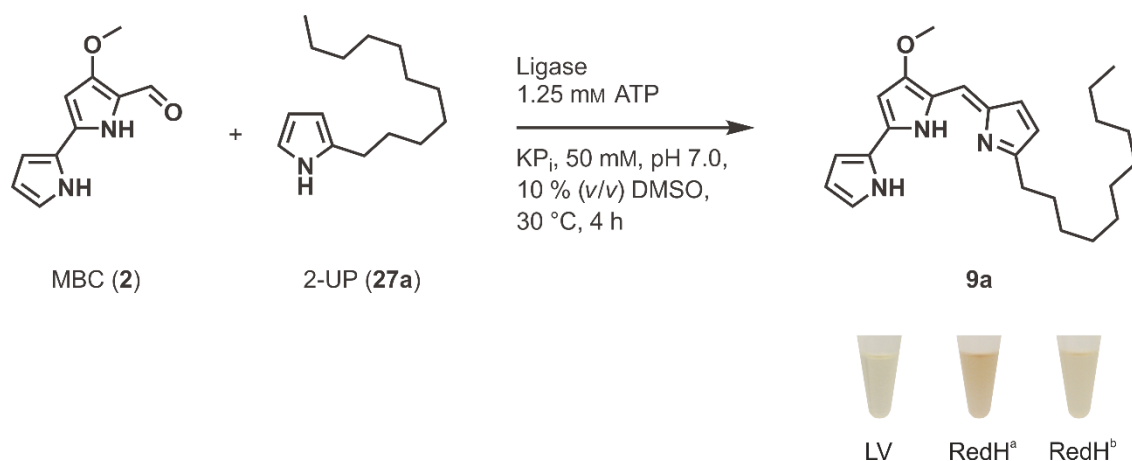
#### Expression von *redH* und Aktivitätsassays mit RedH

Die Klonierung des nativen Gens *redH* aus *S. coelicolor* A3(2) in den Expressionsvektor pET28a(+) verlief erfolgreich (Kapitel 6.2.2.2), sodass sowohl der Stamm *E. coli* BL21(DE3) als auch der Stamm *E. coli* Rosetta™2(DE3) mit dem Plasmid pET28a(+):*redH* transformiert wurde. Das BL21-Derivat Rosetta™2 soll durch die Bereitstellung von tRNAs, die in *E. coli* selten verwendete Codons enthalten, die Expression verbessern. Das Gen *redH* wurde daher in beiden Stämmen exprimiert (Kapitel 8.4.1.2.3) und eine vergleichende SDS-PAGE Analyse durchgeführt (Abbildung 28).



**Abbildung 28.** SDS-PAGE Analyse der Expression von *redH* in *E. coli* BL21(DE3) und *E. coli* Rosetta™2(DE3). [RedH = 102 kDa, M = Marker (Roti®-Mark 10–150), 1 = Pellet pET28a(+) LV; 2 = CFE pET28a(+) LV; 3 = Pellet *E. coli* BL21(DE3)\_pET28a(+):*redH*; 4 = Zellfreier Extrakt (CFE, engl. *cell free extract*) *E. coli* BL21(DE3)\_pET28a(+):*redH*; 5 = Pellet *E. coli* Rosetta™2(DE3)\_pET28a(+):*redH*; 6 = CFE, *E. coli* Rosetta™2(DE3)\_pET28a(+):*redH*]

Eine starke Überexpression von *redH* konnte in beiden Fällen nicht beobachtet werden. So konnte lediglich eine schwache Bande auf Höhe von ca. 100 kDa jeweils im zellfreien Extrakt (CFE, engl. *cell free extract*) festgestellt werden (Spalte 4, 6). Trotz nur schwach ausgeprägten Proteinproduktion von RedH wurden *in vitro* Assays (Kapitel 8.5.6) mit den entsprechenden Lysaten durchgeführt, um eine mögliche Aktivität des Kondensationsenzym nachweisen zu können (Abbildung 29). Als Substrat wurde neben MBC (**2**) das Monopyrrol 2-UP (**27a**) eingesetzt, bei welchem es sich um das natürliche Substrat des Enzyms RedH handelt.



**Abbildung 29.** *In vitro* Assay mit dem Substrat 2-UP (27a) und dem Kondensationsenzym RedH. Als Kontrolle wurde eine Leervektorprobe genutzt. In den Reaktionsgefäßen sind die ethanolischen Extrakte zu sehen. [RedH<sup>a</sup> = exprimiert in *E. coli* BL21(DE3); RedH<sup>b</sup> = exprimiert in *E. coli* Rosetta™2(DE3); es wurde Zellysat genutzt; Assaybedingungen: 1 mM MBC (2), 1 mM 2-UP (27a), 1.25 mM ATP, KPi-Puffer (50 mM, pH 7.0), 10 % (v/v) DMSO, 30 °C, 4 h, 300 rpm, 500 µL Assayvolumen].

Anhand der fehlenden Rotfärbung der ethanolischen Extrakte der *in vitro* Assays war bereits erkennbar, dass das Kondensationsenzym RedH keine signifikante Aktivität aufwies. Die entsprechenden Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie Messungen (LC-MS) (Kapitel 9.8.1.1, Abbildung A 40–Abbildung A 52) verifizierten dies, da das erwartete Reaktionsprodukt Undecylprodigiosin (9a) nur in Spuren nachweisbar war. Somit konnte das Kondensationsenzym RedH unter den gewählten Bedingungen nicht oder nur sehr schwach aktiv produziert werden. Um eine Produktion des Kondensationsenzym in aktiver Form dennoch zu ermöglichen, wurde als alternative Strategie die Coexpression von Chaperonen gewählt.

### Expression von *redH* und *mcpH* bei Coexpression von Chaperonen und Aktivitätsassays mit RedH und McpH

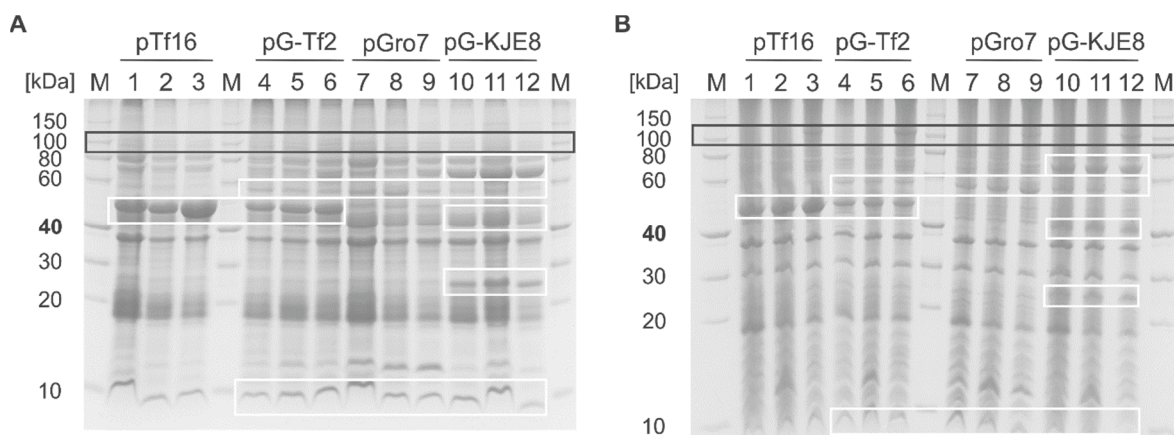
Eine starke Expression rekombinanter Gene in *E. coli* kann oft zu fehlerhafter Faltung der Proteine und somit zu Aggregation in unlöslichen *inclusion bodies* führen. Eine Möglichkeit dieses Phänomen zu verhindern ist eine Coexpression von Chaperonen, die eine korrekte Proteinfaltung und eine Verbesserung der Produktion aktiver Proteine ermöglichen können.<sup>[282-284]</sup> Da im Fall von RedH unter den bisher untersuchten Expressionsbedingungen kein aktives Enzym produziert werden konnte, wurde das *Chaperone Plasmid Set* von TaKaRa Bio Inc. (Kusatsu, Präfektur Shiga, Japan) genutzt, um verschiedene Chaperone mit den für Kondensationsenzyme codierenden Genen zu coexprimieren (Kapitel 8.4.1.2.3). Neben *redH* wurde auch *mcpH*<sup>19</sup> untersucht. Bei den coexprimierten Chaperonen handelt es sich um das DnaK-DnaJ-GrpE System und das GroEL-GroES System, welche zum  $\sigma^{32}$ -Hitzeschock-Regulon gehören.<sup>[282-284]</sup> Neben diesen Chaperonen gehören zu dem *Chaperone Plasmid Set* von TaKaRa Bio Inc. (Kusatsu, Präfektur Shiga, Japan) auch Plasmide, auf denen

<sup>19</sup> Das für McpH codierende Gen lag als synthetisches Gen (*mcpH\_synth*) vor.



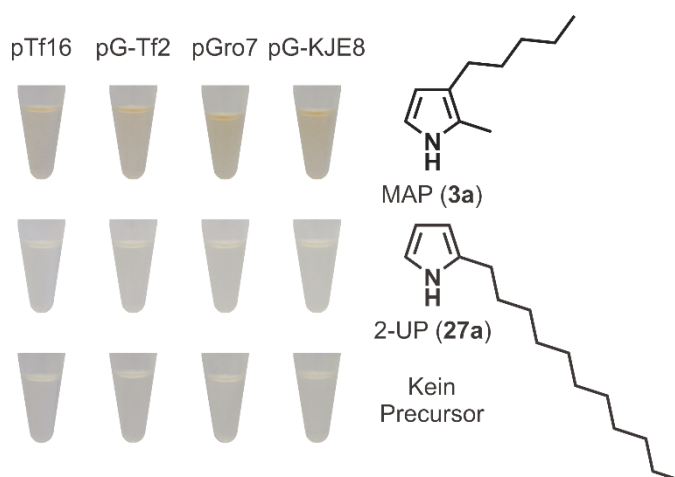
das Gen für den *Trigger Factor* (TF) aus *E. coli* codiert ist, welcher ebenfalls in die Proteinfaltung involviert ist.<sup>[284, 285]</sup>

Kompetente Zellen von *E. coli* BL21(DE3) mit den Plasmiden pTf16, pG-Tf2, pGro7, pG-KJE8 wurden mit den Plasmiden pET28a(+):*mcpH\_synth* bzw. pET28a(+):*redH* transformiert und anschließend Experimente zur Expression von *redH* und *mcpH* durchgeführt. Im Falle von *redH* konnte keine Expression festgestellt werden, sondern lediglich eine Expression der entsprechenden Chaperone (Abbildung 30). Das Protein McpH hingegen wurde in geringen Mengen produziert, jedoch weiterhin in unlöslicher Form (Abbildung 30B, Spalte 3, 6, 9, 12).



**Abbildung 30.** Vergleichende SDS-PAGE Analyse zur Expression von *redH* (102 kDa, schwarze Markierung) und *mcpH* (104 kDa, schwarze Markierung) mit gleichzeitiger Coexpression von Chaperonen. **A:** Proben des CFE. **B:** Proben des Pellets. [RedH (102 kDa, schwarze Markierung), McpH (104 kDa, schwarze Markierung), M = Marker (Roti®-Mark 10–150), 1, 4, 7, 10 = pET28a(+) LV; 2, 5, 8, 11 = pET28a(+):*redH*; 3, 6, 9, 12 = pET28a(+):*mcpH\_synth*]. [Coexprimierte Chaperone (weiße Markierungen) bei Nutzung der entsprechenden Plasmide: pTf16 = TF (56 kDa); pG-Tf2 = GroES (10 kDa), GroEL (60 kDa), Tf (56 kDa); pGro7 = GroES (10 kDa), GroEL (60 kDa); pG-KJE8 = DnaK (70 kDa), DnaJ (40 kDa), GrpE (22 kDa), GroES (10 kDa), GroEL (60 kDa)]

Trotz der nur schwachen Expression von *mcpH* bei Coexpression der Chaperonen, sollte ein Aktivitätsassay Aufschluss darüber geben, ob das Protein McpH in einer aktiven Form vorlag. Als Substrat wurde neben 2-UP (**27a**), dem natürlichen Substrat von McpH, auch das Monopyrrol MAP (**3a**) eingesetzt. Lediglich für das unnatürliche Substrat MAP (**3a**) konnte für alle Konstrukte eine sehr schwache Verfärbung des Ansatzes beobachtet werden (Abbildung 31), die jedoch nicht auf das Vorliegen eines aktiven Enzyms schließen lässt, sondern auch auf eine Polymerisation des Monopyrrols zurückzuführen sein kann. So handelt es sich bei 1*H*-Pyrrol (**4**) und einfachen alkylierten Pyrrolen um farblose Substanzen, wohingegen Pyrrolpolymere farbig sind.<sup>[286, 287]</sup>



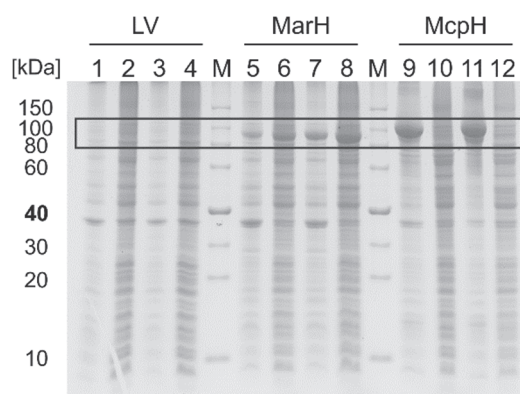
**Abbildung 31.** *In vitro* Assay des Kondensationsenzym McpH und dem natürlichen Substrat 2-UP (**27a**) sowie MAP (**3a**). Es wurde Zelllysate von *E. coli* BL21(DE3)\_pET28a(+):mcpH\_synth bei Coexpression von Chaperonen genutzt. Als Kontrolle wurden Ansätze ohne Zugabe von Monopyrrol *Precursor* genutzt. In den Reaktionsgefäßen sind die ethanolischen Extrakte zu sehen. [Auflistung der coexprimierten Chaperone bei Nutzung der entsprechenden Plasmide: pTf16 = Tf; pG-Tf2 = GroES, GroEL, Tf; pGro7 = GroES, GroEL; pG-KJE8 = DnaK, DnaJ, GrpE, GroES, GroEL; Assaybedingungen: 1 mM MBC (**2**), 1 mM Pyrrol **3a** bzw. **27a**, 1.25 mM ATP,  $KP_i$ -Puffer (50 mM, pH 7.0), 10% (v/v) DMSO, 30 °C, 4 h, 300 rpm, 500  $\mu$ L Assayvolumen]

Somit konnte durch Coexpression von Chaperonen das Gen *redH* nicht exprimiert werden, jedoch das Gen *mcpH\_synth*. Das Kondensationsenzym McpH zeigte allerdings keine Aktivität und wurde somit nicht funktional exprimiert.

Da in *E. coli* weder eine funktionale Expression von *mcpH* noch von *redH* möglich war, kann als alternativer Expressionswirt *P. putida* KT2440 in Betracht gezogen werden. Das Genom dieses Gram-negativen Bakteriums weist mit 61.5% einen deutlich höheren GC-Gehalt auf als *E. coli* mit ca. 51% und liegt damit näher am GC-Gehalt der *Streptomycetaceae* wie *S. coelicolor* A3(2) (71.5% GC-Gehalt) aus denen die Zielgene stammen.<sup>[165, 216, 217, 278]</sup> Dies könnte zu einer besseren Expression in *P. putida* KT2440 verhelfen, da sich dieser Stamm bereits in vielen Fällen als gut einsetzbarer Wirt für die Produktion verschiedener Naturstoffe zeigte.<sup>[211]</sup>

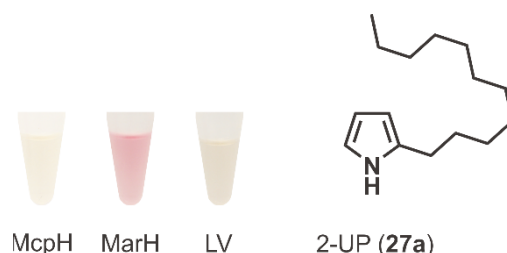
### Expression von *marH* und *mcpH* und Aktivitätsassays mit MarH und McpH

Nach erfolgter Klonierung des Vektors pET28a(+):marH\_synth und Transformation des Expressionsstammes *E. coli* BL21(DE3) mit diesem Plasmid, wurden auch für dieses Konstrukt Expressionsversuche durchgeführt. Neben *marH* wurde vergleichend erneut die Expression von *mcpH* (pET28a(+):mcpH\_synth) getestet (Abbildung 32). Die im folgenden Abschnitt beschriebenen Expressionsexperimente und Assays wurden von B. Sc. *Annabel Arens* im Rahmen ihrer Bachelorarbeit durchgeführt.<sup>[259]</sup>



**Abbildung 32:** SDS-PAGE Analyse der Expression von *marH* (100 kDa) und *mcpH* (104 kDa) in *E. coli* BL21(DE3). Nach Induktion wurde die Temperatur von 37 °C auf 18 °C gesenkt. Die Expressionsversuche und SDS-PAGE Analyse wurden von B. Sc. *Annabel Arens* im Rahmen ihrer Bachelorarbeit durchgeführt.<sup>[259]</sup> [MarH (100 kDa), McpH (104 kDa), M = Marker (Roti®-Mark 10–150), 1, 5, 9 = Pellet, 0.1 mM Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG); 2, 6 10 = CFE, 0.1 mM IPTG; 3, 7, 11 = Pellet, 0.5 mM IPTG; 4, 8, 12 = CFE, 0.5 mM IPTG]

Während Banden für MarH sowohl in den Pellet Proben als auch im CFE nachweisbar waren, erfolgte unter den getesteten Bedingungen keine Produktion von McpH in löslicher Form. Sowohl mit Zellpellet von *E. coli* BL21(DE3)\_pET28a(+):*marH\_synth* als auch *E. coli* BL21(DE3)\_pET28a(+):*mcpH\_synth* wurden *in vitro* Assays (8.5.6) durchgeführt, um zu testen ob die Kondensationsenzyme aktiv produziert wurden. Als Substrat wurde ausschließlich das natürliche Substrat beider Enzyme verwendet, das Monopyrrol 2-UP (**27a**) (Abbildung 33).



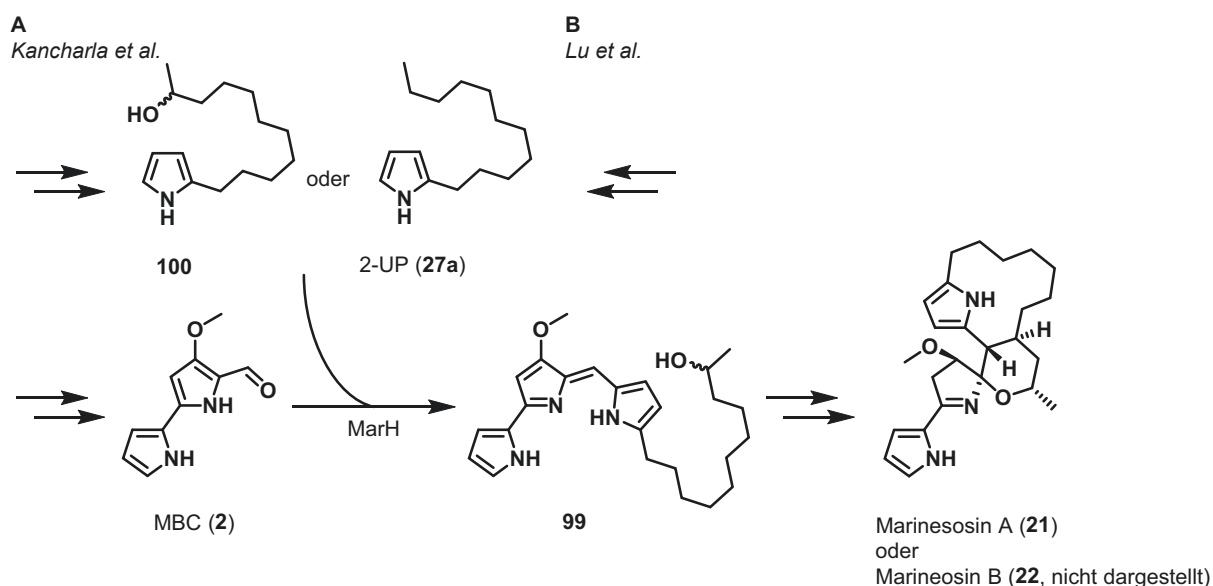
**Abbildung 33.** *In vitro* Assay mit den Kondensationsenzymen McpH und MarH und dem Substrat 2-UP (**27a**). Als Kontrolle wurde eine Leervektorprobe genutzt. In den Reaktionsgefäßen sind die ethanolischen Extrakte zu sehen. Die Expression der Kondensationsenzyme und der *in vitro* Assay wurden von B. Sc. *Annabel Arens* im Rahmen ihrer Bachelorarbeit durchgeführt.<sup>[259]</sup> [Es wurde Zelllysat genutzt; Assaybedingungen: 1 mM MBC (**2**), 1 mM 2-UP (**27a**), 1.25 mM ATP, K<sub>P</sub>-Puffer (50 mM, pH 7.0), 10 % (v/v) DMSO, 30 °C, 4 h, 300 rpm, 500 µL Assayvolumen]

Anhand der fehlenden Rotfärbung war gut erkennbar, dass McpH das Substrat 2-UP (**27a**) nicht zum Undecylprodigiosin (**9a**) umsetzt und somit nicht in aktiver Form exprimiert wird, wie es auch in den vorherigen Versuchen gezeigt werden konnte. Die LC-MS Analysen der methanolischen Extrakte verifizierten, dass McpH das Monopyrrol 2-UP (**27a**) nicht umsetzte (Kapitel 9.8.1.1, Abbildung A 43). Bei MarH hingegen, konnte eine leichte Rotfärbung der Reaktionsansätze beobachtet werden, was auf die Produktion eines Prodiginins hindeutet (Kapitel 9.8.1.1, Abbildung A 44).

Das Kondensationenzym MarH ist Teil des *mar*-Clusters und an der Biosynthese von Marineosin A/B (**21/22**) beteiligt (vgl. Kapitel 6.2.1.2, Abbildung 19). Im Hinblick auf das Substrat von MarH in der Kondensationsreaktion wurde im Jahr 2014 von *Kancharla et al.* zunächst skizziert, dass



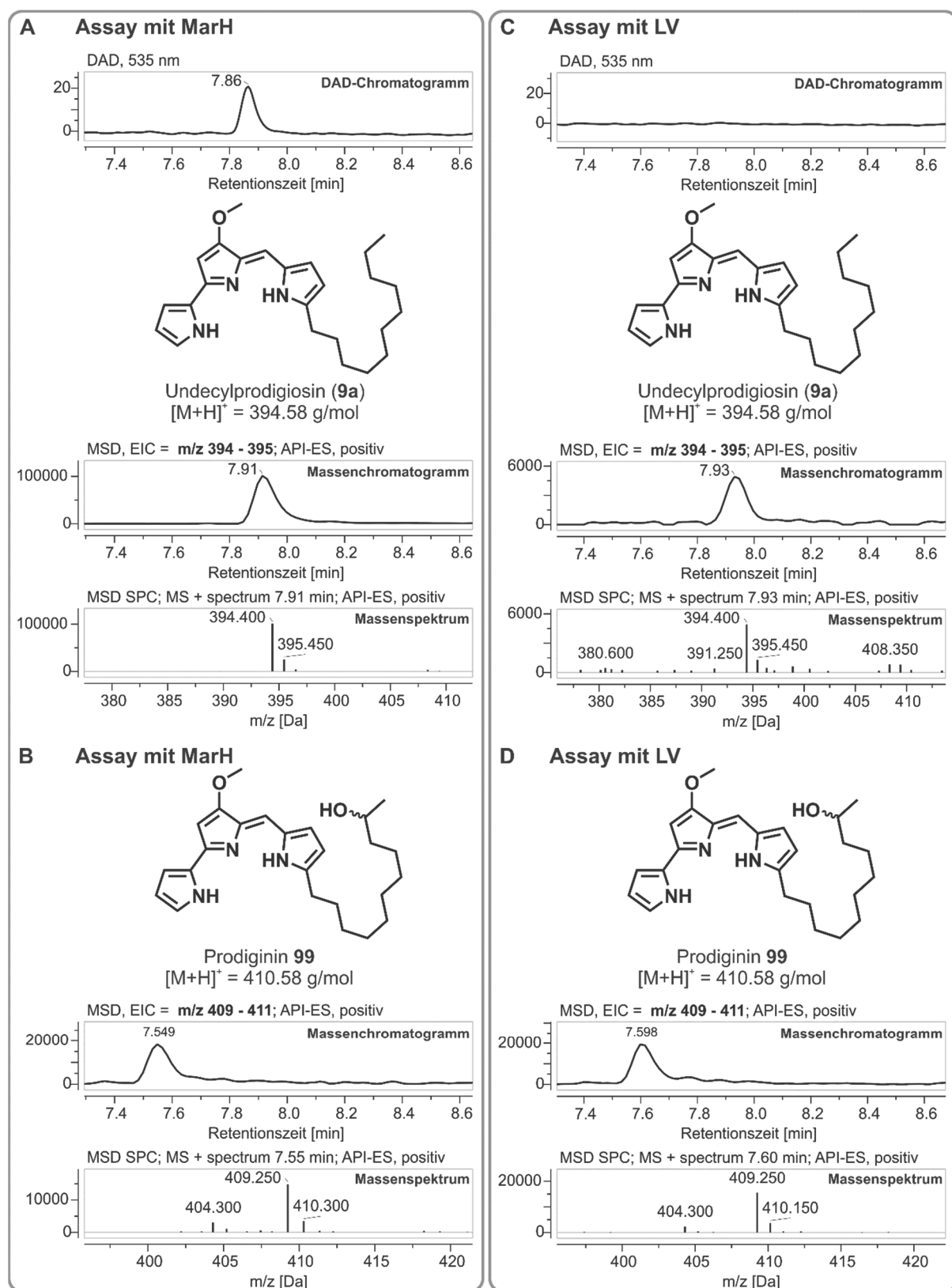
das Prodiginin **99** aus einer Kondensation des hydroxylierten Pyrrols **100** mit MBC (**2**) hervorgeht und Prodiginin **99** schließlich das Substrat für die nachfolgende Zyklisierung und Reduktion zu Marineosin A/B (**21/22**) darstellt.<sup>[288]</sup> In einer späteren Publikation der gleichen Arbeitsgruppe aus dem Jahr 2017 wurde von *Lu et al.* vorgeschlagen, dass es sich bei MarH um ein bifunktionales Enzym handelt, welches nicht nur die Kondensation von 2-UP (**27a**) und MBC (**2**) katalysiert, sondern auch eine Hydroxylierungsreaktion<sup>20</sup>, aus der das Prodiginin **99** hervorgeht (Schema 30).<sup>[200]</sup>



**Schema 30.** Ausschnitt aus der Marineosin A/B (**21/22**) Biosynthese. Dargestellt sind zwei mögliche Varianten der durch MarH katalysierten Kondensationsreaktion. **A:** Das hydroxylierte Pyrrol **100** wird durch MarH mit MBC (**2**) zu Prodiginin **99** kondensiert und nachfolgend zu Marineosin A/B (**21/22**) umgesetzt (nach *Kancharla et al.*).<sup>[288]</sup> **B:** Das bifunktionale Enzym MarH katalysiert Kondensation von 2-UP (**27a**) und MBC (**2**) sowie die Hydroxylierung, sodass Prodiginin **99** entsteht, welches nachfolgend zu Marineosin A/B (**21/22**) umgesetzt wird (nach *Lu et al.*).<sup>[200]</sup>

Im Falle eines bifunktionalen Enzyms – wie von *Lu et al.* vorgeschlagen – ist zu vermuten, dass in den LC-MS Messungen der methanolischen Extrakte des *in vitro* Assays die dem Prodiginin **99** entsprechende Masse zu detektieren ist, da Zyklasen, die die weiteren Schritte zu Marineosin A/B (**21/22**) katalysieren könnten in den Assays nicht präsent sind. Allerdings wurde *via* LC-MS Messung keine Masse, die dem hydroxylierten Prodiginin **99** (Prodiginin **99** [M+H]<sup>+</sup> berechnet: 410.58 g/mol) entsprechen könnte nachgewiesen (Abbildung 34 A). Die Probe des *in vitro* Assays und die Leervektorkontrolle unterschieden sich hier nicht voneinander (Abbildung 34 B). Es konnte lediglich die Masse nachgewiesen werden, die Undecylprodigiosin (**9a**) entspricht (Prodiginin **9a** [M+H]<sup>+</sup> berechnet: 394.58 g/mol), gefunden: 394.40 g/mol.

<sup>20</sup> Substrat der Hydroxylierungsreaktion ist *Lu et al.* zufolge sehr wahrscheinlich das Kondensationsprodukt Undecylprodigiosin (**9a**), sodass MarH erst die Kondensation und im Anschluss die Hydroxylierung katalysiert.<sup>[200]</sup>



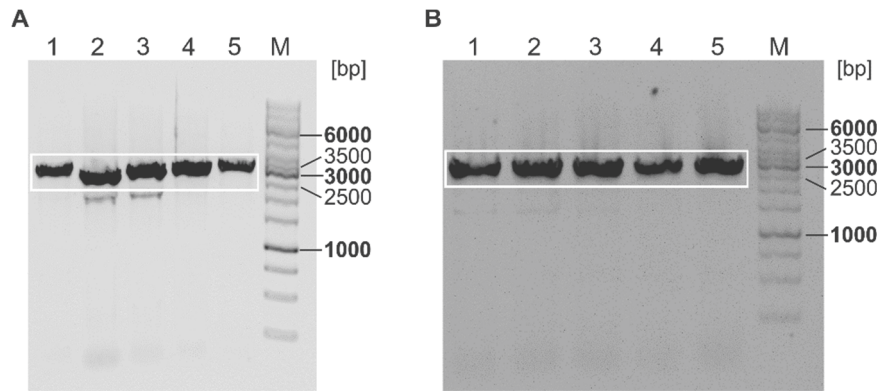
**Abbildung 34.** Dioden-Array-Detektor (DAD)-Chromatogramme, Massenchromatogramme und Massenspektren der *in vitro* Assays mit MarH bzw. LV und 2-UP (**27a**) als Substrat. **A:** *In vitro* Assay mit MarH: Detektion des Reaktionsprodukts Undecylprodigiosin (**9a**). **B:** *In vitro* Assay mit MarH: Keine Detektion des putativen Reaktionsprodukts Prodiginin **99**. **C:** *In vitro* Assay mit LV: Detektion von Undecylprodigiosin (**9a**) nur in Spuren. **D:** *In vitro* Assay mit LV: Keine Detektion von Prodiginin **99**. [Analysiert wurde der methanolische Extrakt der *in vitro* Assays; Es wurde Zelllysat genutzt; Assaybedingungen: 1 mM MBC (**2**), 1 mM 2-UP (**27a**), 1.25 mM ATP, KP<sub>i</sub>-Puffer (50 mM, pH 7.0), 10% (v/v) DMSO, 30 °C, 4 h, 300 rpm, 500 µL Assayvolumen].

Die Ergebnisse in Abbildung 34 zeigen, dass unter den untersuchten Bedingungen keine Hydroxylierungsreaktion stattgefunden hat. Dahingegen konnten in den von *Lu et al.* publizierten Fütterungsversuchen u.a. bei Fütterung von 2-UP (**27a**) zu einem MarH produzierenden *Streptomyes venezuelae* Stamm sowohl Prodiginin **99** als auch Undecylprodigiosin (**9a**) detektiert werden. Ebenso wurde gezeigt, dass Pyrrol **100** von MarH zu Prodiginin **99** umgesetzt wurde. Allerdings kann auf Basis der im Rahmen der vorliegenden Arbeit in Abbildung 33 und Abbildung 34 dargestellten Experimente keine weitere und fundierte Aussage über das Vorliegen eines bifunktionalen Enzyms getroffen werden.

Zwar wurde bei der von MarH katalysierten Kondensationsreaktion von MBC (**2**) und 2-UP (**27a**) zu Undecylprodigiosin (**9a**), dargestellt in Abbildung 33, wie zuvor erwähnt nur eine schwache Rotfärbung beobachtet, dennoch konnte aktives Enzym nachgewiesen werden. Hier würde sich trotz schwacher Aktivität gegenüber 2-UP (**27a**) zukünftig die Testung weiterer Monopyrrole anbieten. Insbesondere vor dem Hintergrund der von *Lu et al.* publizierten Ergebnisse sollte das Substratspektrum von MarH weitergehend untersucht werden und auf Pyrrol **100** und Derivate dieses Pyrrols ausgeweitet werden.<sup>[200]</sup>

#### **6.2.2.4 Genexpression und Aktivitätsassays der Kondensationsenzyme aus *Pseudoalteromonadaceae***

Im Gegensatz zu den Problemen, die bei den zuvor beschriebenen Klonierungsexperimenten mit Genen aus *Streptomycetaceae* auftraten, kam es bei den Klonierungen der Gene aus *P. tunicata* D2 sowie *P. citrea* zu keinen Schwierigkeiten. Analog zu den bisherigen Experimenten wurden die Gene *tamQ* und *treaP* aus den zuvor präparierten Genomen mithilfe von *Gibson Assembly*® Primern amplifiziert, sodass eine nachfolgende Assemblierung unter Nutzung des *Gibson Assembly*® in den mit *NdeI* und *XhoI* geschnittenen Vektor pET28a(+) erfolgen konnte (Vektorkarten und Sequenzen: Kapitel 9.6). Die erfolgreiche Amplifikation der Gene *tamQ* und *treaP* konnte mit den *Gibson Assembly*® Primerpaaren (Tabelle 18) HB07/HB08 (*tamQ*) bzw. HB17/HB18 (*treaP*) erzielt werden und ergab DNA-Fragmente der erwarteten Größe von ca. 2.7 kb (Abbildung 35). Eine nicht stumme Punktmutation im Gen *treaP*, die während der Sequenzierung aufgefallen war, konnte unter Nutzung der Primer HB79/80 mittels *QuikChange*®-PCR (Kapitel 8.3.2.3) erfolgreich entfernt werden.



**Abbildung 35.** Amplifikation von der für Kondensationsenzyme codierende Gene aus *Pseudoalteromonadaceae*. **A:** Amplifikation von *tamQ* (2.7 kb) ausgehend vom Genom von *P. tunicata* D2 mittels Gradienten-PCR [1 = 44.8°C, 2 = 46.1°C, 3 = 48.3°C, 4 = 51.3°C, 5 = 53.3°C, M = 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)]. **B:** Amplifikation von *treaP* (2.7 kb) ausgehend vom Genom von *P. citrea* mittels Gradienten-PCR. [1 = 40.8°C, 2 = 50.2, 3 = 51.4, 4 = 53.5, 5 = 56.4, M = 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)]

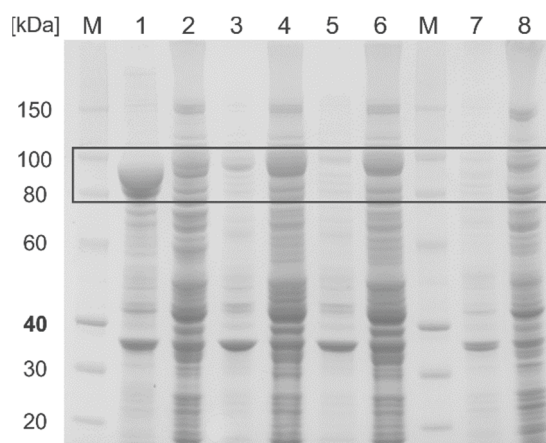
Die im Vergleich unproblematische Gen-Amplifikation (Abbildung 35) könnten mit dem eher niedrigen GC-Gehalt der Genome von *P. tunicata* und *P. citrea* im Vergleich zu denen von *Streptomycetaceae* zusammenhängen. So beträgt der GC-Gehalt von *P. tunicata*<sup>21</sup> 39.9%, während das Genom von *P. citrea*<sup>22</sup> einen GC-Gehalt von 41.1% aufweist.<sup>[175, 289]</sup> Damit liegen sie im Gegensatz zu *Streptomycetaceae* Genen näher am GC-Gehalt von *E. coli* Stämmen, die mit ca.51% ein ausgewogenes Verhältnis aller Basen aufweisen (50.8% *E. coli str. K-12 substr. MG1655*<sup>23</sup>).<sup>[278]</sup>

Der Expressionsstamm *E. coli* BL21(DE3) wurde jeweils mit den Plasmiden pET28a(+)\_*tamQ* und pET28a(+)\_*treaP* (Kapitel 9.6.2, Abbildung A 17, Abbildung A 18) transformiert und die entsprechenden Proteine produziert. Neben der Expression von *tamQ* und *treaP* wurde zu Vergleichszwecken ebenfalls *pigC* exprimiert. Zudem wurde im Rahmen einer SDS-PAGE Analyse eine Kontrollprobe mit Leervektor [*E. coli* BL21(DE3)\_pET28a(+)] vergleichend analysiert (Abbildung 36).

<sup>21</sup> NCBI Referenzsequenz: NZ\_CP031961.1

<sup>22</sup> NCBI Referenzsequenz: NZ\_AHBZ00000000.2

<sup>23</sup> NCBI Referenzsequenz: NC\_000913.3



**Abbildung 36.** SDS-PAGE Analyse der Expression von *pigC*<sup>24</sup>, *tamQ* und *treaP* in *E. coli* BL21(DE3). [TamQ (101 kDa); TreaP (100 kDa); PigC (99 kDa); M = Marker (Roti®-Mark 10–150); 1 = Pellet, PigC; 2 = CFE, PigC; 3 = Pellet, TamQ; 4 = CFE, TamQ; 5 = Pellet, TreaP; 6 = CFE, TreaP; 7 = Pellet, Leervektor; 8 = CFE, Leervektor]

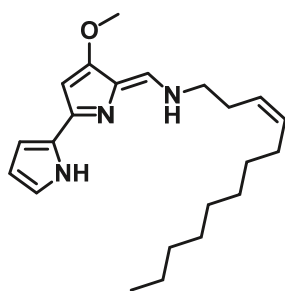
Die Proteinbande von PigC war hauptsächlich im Pellet nachzuweisen (Abbildung 36, Spalte 1), während die entsprechenden Banden für TamQ und TreaP schwächer in den Pelletfraktionen und stärker ausgeprägt auch im Überstand zu sehen waren (Abbildung 36, Spalte 3–6). Das Vorliegen von PigC in der Pelletfraktion ist sicherlich in der Tatsache begründet, dass es sich um ein membranständiges Protein handelt.<sup>[17, 20, 193, 290]</sup> Ob TamQ und TreaP an die Zellmembran gebunden vorliegen ist bisher nicht bekannt. Diese Fragestellung wird jedoch in Kapitel 6.2.5 behandelt.

#### 6.2.2.5 Initiale Aktivitätsassays mit Kondensationsenzymen aus *Pseudoalteromonadaceae*

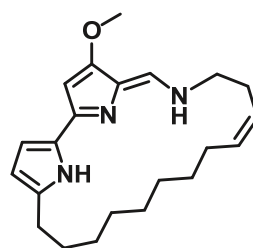
Die entsprechenden Gene der beiden Kondensationsenzyme TamQ und TreaP aus *P. tunicata* D2 bzw. *P. citrea* konnten erfolgreich in den Expressionsvektor pET28a(+) kloniert und exprimiert werden. Die sich anschließende Fragestellung nach der Aktivität der Enzyme sollte in initialen Aktivitätsassays geklärt werden, welche analog zu den bereits für PigC etablierten Assays durchgeführt wurden.<sup>[17, 197, 247]</sup>

Für das Kondensationsenzym TamQ aus *P. tunicata* D2 wurde das native Substrat bereits von *Burke et al.* als das primäre Amin DDA (**28a**) postuliert, nachdem von *Franks et al.* die Struktur des Naturstoffs Tambjamin YP1 (**26a**) aufgeklärt worden war.<sup>[135, 136]</sup> Im Falle von *P. citrea* konnte der von diesem Organismus produzierte Naturstoff, das makrozyklische Tambjamin MYP1 (**26b**), erst im Jahr 2019 von *Picott et al.* isoliert und identifiziert werden (Abbildung 37 B). Die strukturelle Ähnlichkeit von Tambjamin YP1 (**26a**) aus *P. tunicata* D2 und Tambjamin MYP1 (**26b**) aus *P. citrea* (Abbildung 37) legen jedoch nahe, dass TreaP und TamQ beide das primäre Amin DDA (**28a**) als natürliches Substrat in der Kondensationsreaktion umsetzen.

<sup>24</sup> Die Klonierung von pET28a(+)\_pigC (dort als pPigC\_3 bezeichnet) wurde von Dr. *Andreas S. Klein* im Rahmen seiner Dissertation durchgeführt.<sup>[17]</sup>



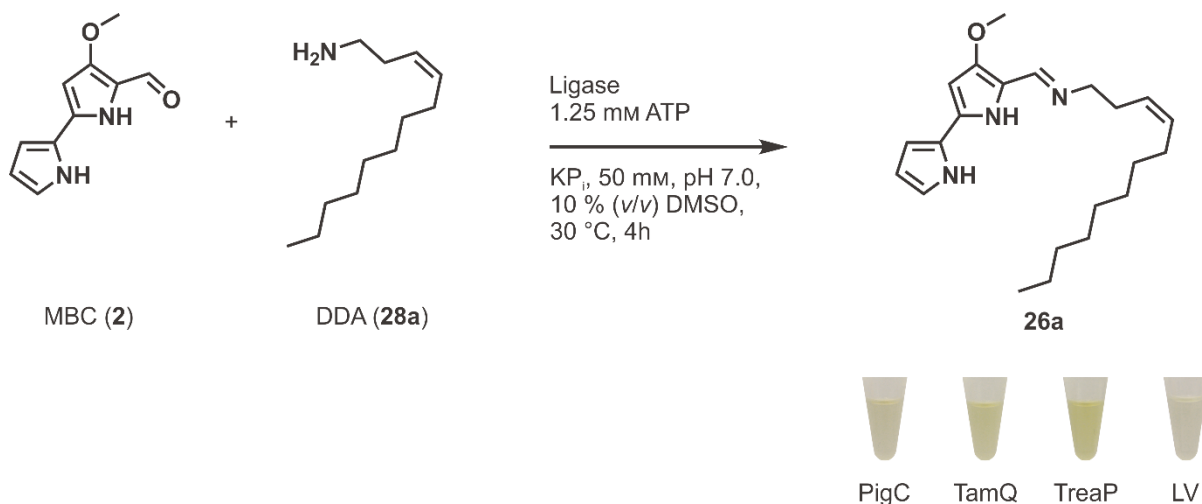
Tambjamin YP1 (**26a**)



Tambjamin MYP1 (**26b**)

**Abbildung 37.** Strukturformeln von Tambjaminen, die von *P. tunicata* D2 und *P. citrea* produziert werden. **A:** Tambjamin YP1 (**26a**) aus *P. tunicata* D2. **B:** Tambjamin MYP1 (**26b**) aus *P. citrea*.<sup>[135-137]</sup>

Um zu testen, ob die Kondensationsenzyme TamQ und TreaP auch funktional und in aktiver Form in *E. coli* BL21(DE3) produziert werden, wurden *in vitro* Assays mit beiden Enzymen und MBC (**2**) und DDA (**28a**) als Substrat durchgeführt. Auch das bereits bekannte Kondensationsenzym PigC wurde zusammen mit diesem für PigC unnatürlichen Substrat getestet.



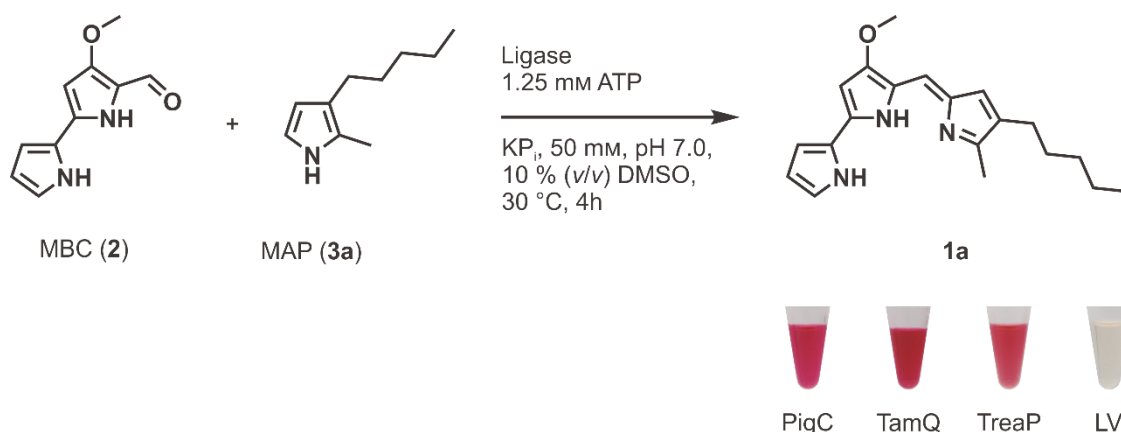
**Abbildung 38.** *In vitro* Assay mit dem Substrat DDA (**28a**) und den Kondensationsenzymen PigC, TamQ und TreaP. Als Kontrolle wurde eine Leervektorprobe genutzt. In den Reaktionsgefäßen sind die ethanolischen Extrakte zu sehen. [Es wurde Zelllysat genutzt; Assaybedingungen: 1 mM MBC (**2**), 1 mM DDA (**28a**), 1.25 mM ATP, KP<sub>i</sub>-Puffer (50 mM, pH 7.0), 10% (v/v) DMSO, 30 °C, 4 h, 300 rpm, 500 µL Assayvolumen].

Wie anhand der Gelbfärbung bereits erkennbar war (Abbildung 38), konnte gezeigt werden, dass TamQ und TreaP das Substrat DDA (**28a**) mit MBC (**2**) unter ATP-Verbrauch zum Tambjamin YP1 (**26a**) umsetzen und somit in aktiver Form vorlagen. Für den Leervektoransatz und die Probe mit PigC konnte keine deutliche Gelbfärbung beobachtet werden. Die methanolischen Extrakte aller Ansätze wurden für LC-MS Messungen genutzt und die optischen Ergebnisse der Aktivitätsassays so entsprechend verifiziert (Kapitel 9.8.1.1, Abbildung A 45–Abbildung A 48). Die dem Tambjamin YP1 (**26a**) entsprechende Masse konnte zwar im Extrakt des Ansatzes mit PigC detektiert werden, jedoch konnte auch in der Leervektorkontrolle Produkt in geringen Mengen nachgewiesen werden. Die Leervektorprobe verdeutlichte zudem, dass die Kondensationsreaktion enzymkatalysiert durch TamQ



oder TreaP unter Nutzung von ATP verläuft und die Iminbildung nur in sehr geringem Maße spontan oder säurekatalysiert stattfindet.

Die initial angestrebte Erweiterung der Zahl der biologisch herstellbaren Prodigininderivate durch den Einsatz von Ligasen mit putativ anderer Chemoselektivität als PigC bedingt jedoch, dass die Kondensationsenzyme aus den zwei *Pseudoalteromonadaceae* auch Pyrrolderivate anstelle von primären Aminen umsetzen können. Aus diesem Grunde sollte in einem weiteren *in vitro* Assay analysiert werden, ob TamQ und TreaP gleichermaßen wie PigC in der Lage sind das Monopyrrol MAP (**3a**) mit MBC (**2**) zu Prodigiosin (**1a**) zu kondensieren (Abbildung 39).



**Abbildung 39.** *In vitro* Assay mit dem Monopyrrol MAP (**3a**) als Substrat und den Kondensationsenzymen PigC, TamQ und TreaP. Als Kontrolle wurde eine Leervektorprobe genutzt. In den Reaktionsgefäßen sind die ethanolischen Extrakte zu sehen. [Es wurde Zelllysate genutzt; Assaybedingungen 1 mM MBC (**2**), 1 mM MAP (**3a**), 1.25 mM ATP,  $\text{KPi}$ -Puffer (50 mM, pH 7.0), 10 % (v/v) DMSO, 30 °C, 4 h, 300 rpm, 500  $\mu\text{L}$  Assayvolumen].

Tatsächlich konnte sowohl für TamQ als auch TreaP eine zu PigC vergleichbare Rotfärbung in den ethanolischen Extrakten beobachtet werden, die auf die Bildung von Prodigiosin (**1a**) hindeutet. Die ebenfalls durchgeführten LC-MS Messungen, in denen die entsprechende Masse von Prodigiosin (**1a**) nachgewiesen werden konnte (Kapitel 9.8.1.1, Abbildung A 96–Abbildung A 99), verifizierten die initialen optischen Ergebnisse. Somit konnte erstmalig nachgewiesen werden, dass die Kondensationsenzyme aus den Organismen *P. tunicata* D2 und *P. citrea* unnatürliche Substrate in Form des Monopyrrols MAP (**3a**) umsetzen und so in der Lage sind statt Tambjaminen auch Prodiginine zu produzieren. Diese Akzeptanz unnatürlicher Substrate schließt somit die Lücke zwischen den beiden strukturell ähnlichen Naturstoffen Tambjaminen und Prodigininen.

Das aktive Zentrum bzw. die Substratbindestellen sowohl von TamQ als auch TreaP müssen daher so beschaffen zu sein, dass auch Pyrrole mit einem von primären Aminen stark unterschiedlichen sterischen Anspruch und einer anderen räumlichen Struktur binden können. Da für PigC lediglich ein Homologiemodell bekannt ist, jedoch weder für PigC noch ein anderes Kondensationsenzym eine Kristallstruktur vorhanden ist, können weitergehende Aussagen nicht getroffen werden.<sup>[193]</sup> Eine Kristallstruktur der drei Kondensationsenzyme könnte allerdings Aufschluss über die tatsächlichen Unterschiede im aktiven Zentrum bzw. der Substratbindestelle geben.

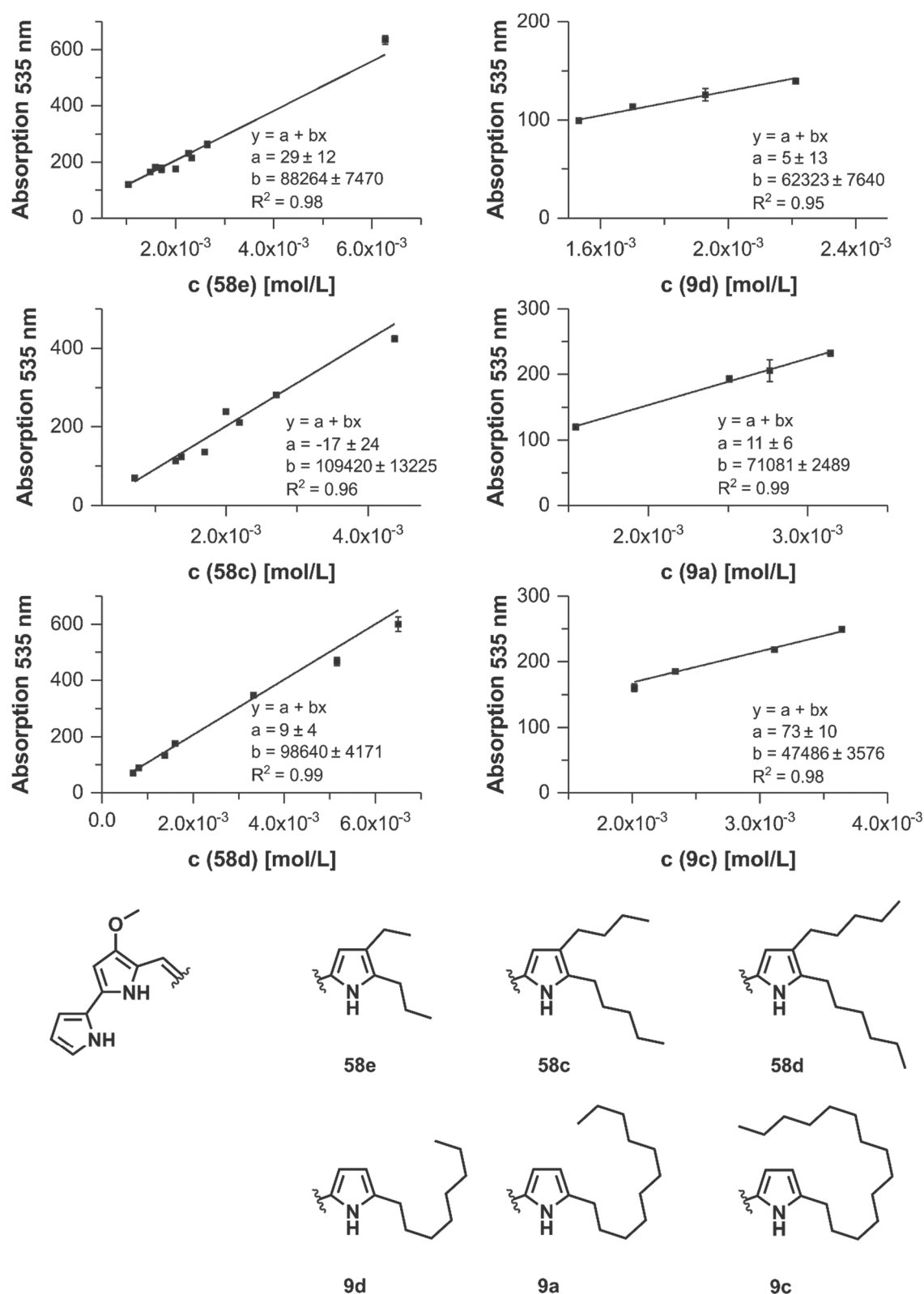
### 6.2.3 Substratspektren neuer Kondensationsenzyme

Der biosynthetische Zugang zu strukturell neuen Prodigininen mit möglicherweise anderen Bioaktivitäten ist durch die Chemo Selektivität des bisher genutzten Kondensationsenzym PigC eingeschränkt, sodass neue Kondensationsenzyme gesucht wurden, welche die Produktion neuer Prodigiosin (**1a**) Derivate ermöglichen können. Die initialen Aktivitätsassays unter Nutzung von TamQ und TreaP zeigten, dass diese Enzyme nicht nur das natürliche Substrat DDA (**28a**) umsetzen, sondern auch das Monopyrrol MAP (**3a**) und somit den Naturstoff Prodigiosin (**1a**) produzieren konnten. Auf die ersten Experimente folgend, sollte unter Nutzung der neuen Kondensationsenzyme eine Analyse der Substratspektren der Ligasen erfolgen, einhergehend mit einer Quantifizierung der gebildeten Prodiginine.

#### 6.2.3.1 Bestimmung von Extinktionskoeffizienten zur Quantifizierung von Prodigininen

Die Rotfärbung und das unter sauren Bedingungen bei 535 nm gelegene Absorptionsmaximum der Prodiginine ermöglicht eine Quantifizierung dieser Moleküle durch Anwendung des *Lambert-Beer* Gesetzes. Die Bestimmung der molaren Extinktionskoeffizienten ist dafür jedoch unabdingbar. So wurden bereits die molaren Extinktionskoeffizienten verschiedener Prodiginine bestimmt, darunter Prodigiosin (**1a**) sowie weitere 2,3-dialkylierte Prodiginine mit Methylgruppe in 2-Position und zyklische 2,3-alkylierte Prodiginine.<sup>[17, 197, 205, 247, 248]</sup> Eine Quantifizierung von 2,3-dialkylierten Prodigininen, welche an 2-Position des C-Rings andere Substituenten als einen Methylrest tragen war bisher aufgrund fehlender Extinktionskoeffizienten nicht möglich. Im Rahmen dieser Arbeit wurden daher nach Synthese der entsprechenden Prodiginine (Kapitel 6.1.2) zusätzlich die molaren Extinktionskoeffizienten der Prodiginine **58c**, **58d** und **58e** (Abbildung 40 A, C, E) bestimmt und im Zuge der Bachelorarbeit von B. Sc. *Annabel Arens* zudem die molaren Extinktionskoeffizienten der Prodiginine **9a**, **9c** und **9d** mit unterschiedlich langen Alkylsubstituenten in 2-Position ermittelt (Abbildung 40 B, D, F).

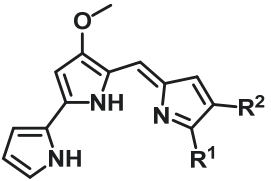




**Abbildung 40.** Bestimmung molarer Extinktionskoeffizienten ( $\lambda = 535 \text{ nm}$ , Ethanol) der Prodiginine **9a**, **9c**, **9d**, **58c**, **58d** und **58e** sowie die entsprechenden Strukturformeln der Prodiginine. Die Extinktionskoeffizienten der Prodiginine **9a**, **9c** und **9d** wurden von B. Sc. Annabel Arens im Rahmen ihrer Bachelorarbeit bestimmt.<sup>[259]</sup>

In Tabelle 7 sind die molaren Extinktionskoeffizienten dargestellt, die experimentell ermittelt wurden und in dieser Arbeit zur Quantifizierung der entsprechenden Prodiginine in *in vitro* Assays genutzt wurden.

**Tabelle 7.** Experimentell bestimmte molare Extinktionskoeffizienten ( $\lambda = 535$  nm, acides Ethanol) verschiedener Prodiginine.

|                                                                                   | Prodiginin | R1         | R2     | Molarer Extinktionskoeffizient $\epsilon$ [1/M·cm] |
|-----------------------------------------------------------------------------------|------------|------------|--------|----------------------------------------------------|
|  | <b>58e</b> | Propyl     | Ethyl  | 88 264 $\pm$ 7 470                                 |
|                                                                                   | <b>58c</b> | Pentyl     | Butyl  | 109 420 $\pm$ 13 225                               |
|                                                                                   | <b>58d</b> | Hexyl      | Pentyl | 98 640 $\pm$ 4 171                                 |
|                                                                                   | <b>9d</b>  | Octyl      | —      | 62 323 $\pm$ 7 640 <sup>[a]</sup>                  |
|                                                                                   | <b>9a</b>  | Undecyl    | —      | 71 081 $\pm$ 2 489 <sup>[a]</sup>                  |
|                                                                                   | <b>9c</b>  | Tetradecyl | —      | 47 486 $\pm$ 3 576 <sup>[a]</sup>                  |

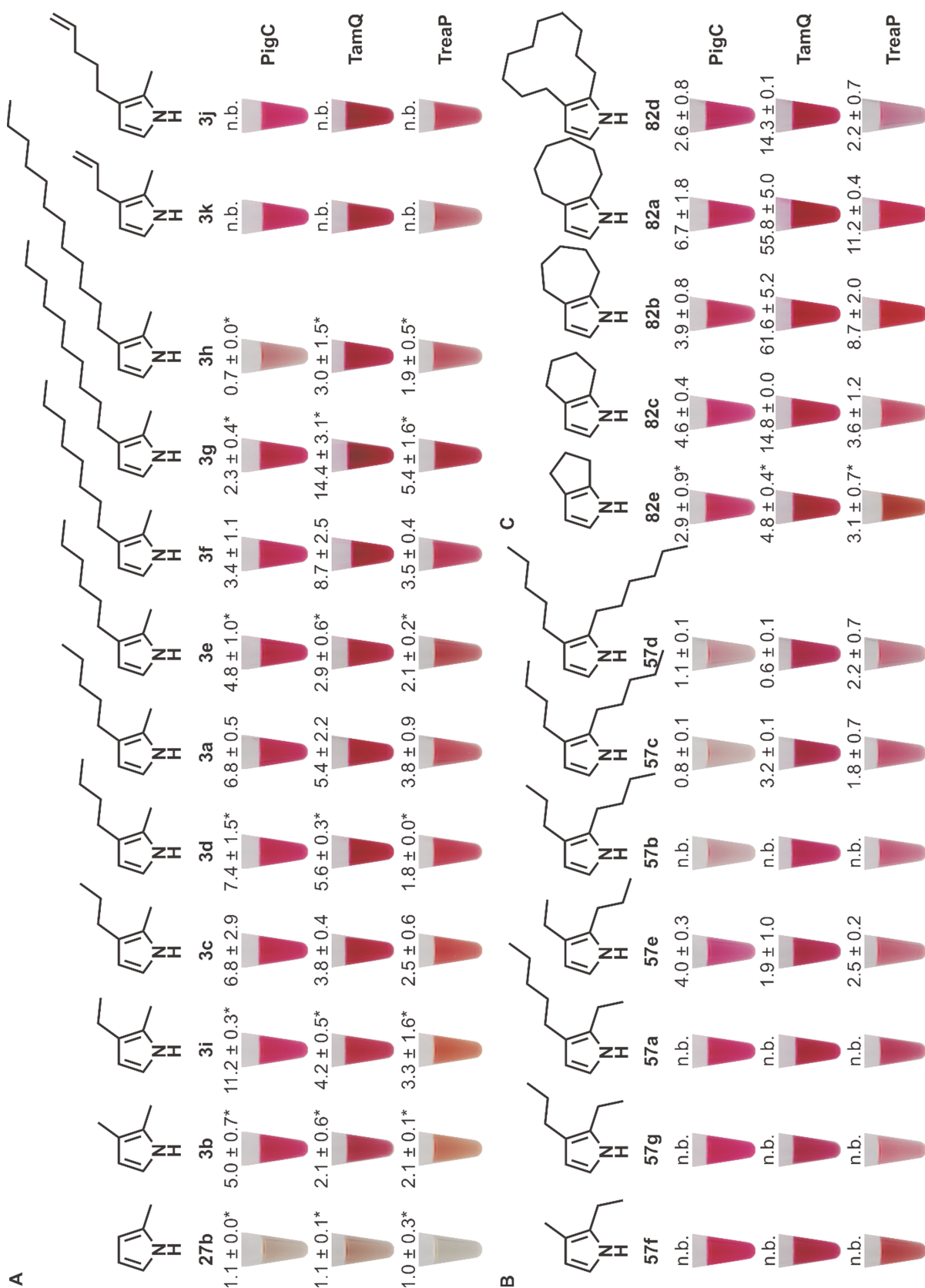
<sup>[a]</sup> Die Primärdaten zur Bestimmung der Extinktionskoeffizienten der Prodiginine **9a**, **9c** und **9d** wurden von B. Sc. *Annabel Arens* im Rahmen ihrer Bachelorarbeit generiert.<sup>[259]</sup>

### 6.2.3.2 Bestimmung der Substratspektren der Kondensationsenzyme

Die Substratspektren von TamQ und TreaP wurden im Vergleich zu PigC untersucht, um Unterschiede in der Chemo-selektivität der Enzyme identifizieren zu können. Dazu wurden zunächst 2,3-dialkylierte Pyrrole sowie zyklische 2,3-alkylierte Pyrrole zusammen mit MBC (**2**) als Substrat in *in vitro* Assays eingesetzt und die Produktion der Prodiginine auf Basis von Triplikaten und experimentell bestimmten Extinktionskoeffizienten (Tabelle 7) sowie berechneter Extinktionskoeffizienten auch quantifiziert.<sup>[17, 197, 205, 247]</sup> Im Rahmen dieser Arbeit wurden auch die Pyrrole **3i**, **57e**, **57f**, **57g** und **56g–56i** synthetisiert (Kapitel 6.1.1.1) und zum ersten Mal auch auf Umsetzung durch PigC hin untersucht. Für die *in vitro* Assays wurden Leervektorkontrollen (Abbildung A 1–Abbildung A 3) durchgeführt und die Produktion der Prodiginine *via* LC-MS Messungen verifiziert.

### Substratspektren mit 2,3-dialkylierten Pyrrolen und zyklischen 2,3-alkylierten Pyrrolen

Das bereits bekannte Substratspektrum von PigC zeigte auf, dass dieses Enzym neben MAP (**3a**) nicht nur Pyrrolderivate **3c**, **3d** oder **3e** mit ähnlicher Kettenlänge in 2-Position zu den Prodigininen **1c**, **1d** und **1e** umsetzt, sondern eine Vielzahl von Monopyrrolen umsetzen und die entsprechenden Prodiginine produzieren kann. Jedoch ist die Akzeptanz von Monopyrrolen begrenzt.<sup>[17, 197, 247, 248]</sup> So konnte PigC Pyrrole mit längeren Alkylketten wie die Pyrrole **3f**, **3g** oder **3h** nur eingeschränkt oder gar nicht zu den entsprechenden Prodigininen **1f**, **1g** und **1h** umwandeln, während TamQ diese Pyrrole gut umsetzte (Abbildung 41 A). 2,3-Dialkylierte Pyrrole wurden von dem Kondensationsenzym TreaP durchweg akzeptiert, obwohl das Substratspektrum schmäler erschien und z. B. Pyrrol **3i** schlechter als im Falle der anderen Kondensationsenzyme zum entsprechenden Prodiginin **1i** umgesetzt wurde. Ebenso konnten weniger intensive Rotfärbungen beobachtet werden verglichen mit den beiden anderen getesteten Enzymen. Dennoch ist die gleiche Tendenz zu längeren Alkylketten wie bei TamQ zu erkennen.



**Abbildung 41.** Ergebnisse der *in vitro* Assays mit PigC, TamQ und TreaP. **A:** Pyrrol **27b** und 2,3-dialkylierte Pyrrole. **B:** 2,3-dialkylierte Pyrrole. **C:** cyclische 2,3-alkylierte Pyrrole. [Angaben zur Quantifizierung in mg/L; n. b. = nicht bestimmt; \* = Quantifizierung mit berechneten Extinktionskoeffizienten; es wurde Zelllysate genutzt; Assaybedingungen: 1 mM MBC (**2**), 1 mM Pyrrole **3a–3j**, **27b**, **57a–57g**, **82a–82e**, 1.25 mM ATP, KPi-Puffer (50 mM, pH 7.0), 10% (v/v) DMSO, 30 °C, 4 h, 300 rpm, 500 µL Assayvolumen].

Die Substratakzeptanz von PigC für die 2,3-Dialkylpyrrole **57b–57e** nahm bei Vorliegen eines Substituentens in 2-Position größer als ein Ethylrest schnell ab. *Couturier et al.* konnten in einer 2019 veröffentlichten Publikation ebendieses Verhalten auch im Fall der Substrate der FAD-abhängigen Oxidase PigB beobachten, welches den letzten Schritt in der MAP (**3a**)-Biosynthese (Kapitel 5.4.4) katalysiert.<sup>[291]</sup> Bei Fütterung unnatürlicher Varianten des PigB Substrats zu einem PigD defizienten *Serratia sp.* Stamm wurden Derivate mit längeren Alkylketten in 3-Position vom Enzym toleriert, wohingegen Verlängerungen des Restes in 2-Positionen über einen Ethylrest hinaus zu kaum noch vorhandenem Umsatz führten.<sup>[291]</sup> Die Kondensationsenzyme TamQ und TreaP setzten jedoch im Gegensatz zu PigC auch Pyrrole mit längeren Alkylketten in 2-Position noch um (Abbildung 41B). Bei den beiden letztgenannten Enzymen scheint die Größe des Substituenten einen untergeordneten Einfluss auf die Akzeptanz der Pyrrole zu haben.

Die zyklischen 2,3-Alkylpyrrole **82a–82d** wurden von TamQ am besten umgesetzt, insbesondere die Pyrrole mit acht- bzw. siebengliedrigem Ring **82a** und **82b** (Abbildung 41C). Dies zeigte sich auch für das Kondensationsenzym TreaP, welches die zyklischen Pyrrole **82a** und **82b** im Vergleich zu allen anderen getesteten Pyrrolen am besten akzeptierte. Die zuvor beschriebenen visuellen Ergebnisse spiegelten sich auch in der Quantifizierung der *in vitro* Assays wider (Abbildung 41).

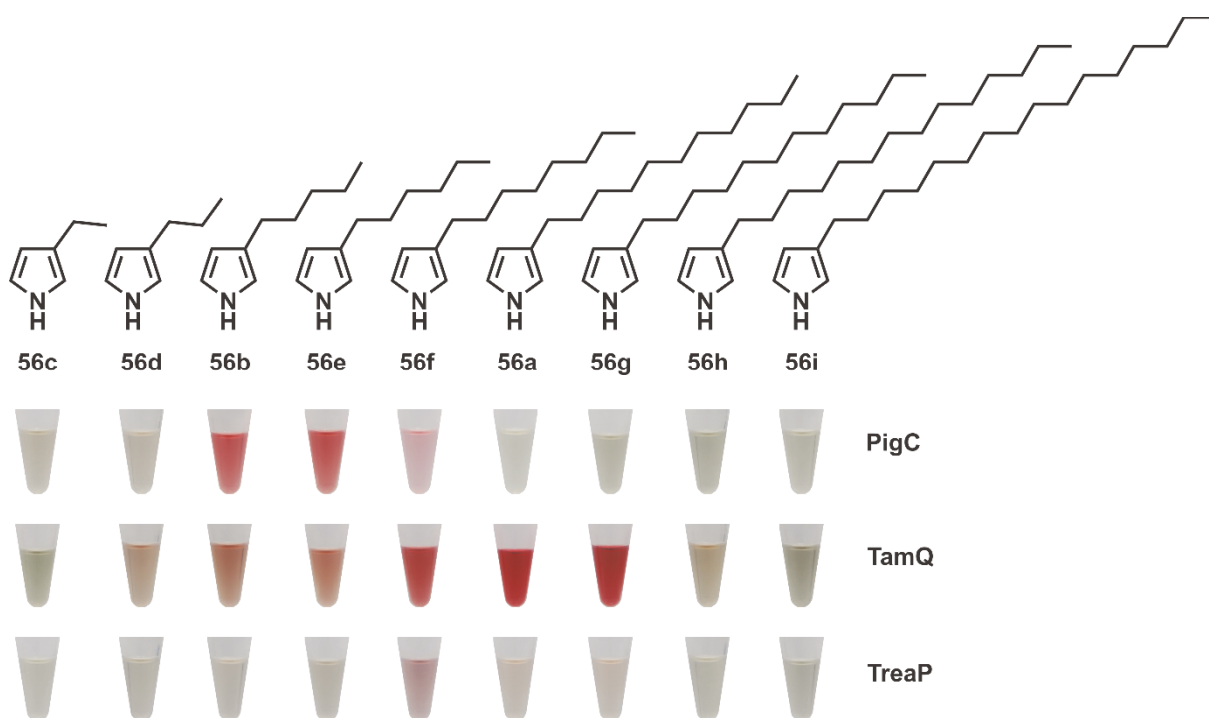
Die Unterschiede im Umsatz von Pyrrolen mit langen Alkylketten in 3-Position sowie in 2- und 3-Position zwischen TamQ, TreaP und PigC ließe sich durch die unterschiedlichen natürlichen Substrate der drei Kondensationsenzyme erklären. Bei TamQ und TreaP handelt es sich bei dem natürlichen Substrat um das primäre Amin DDA (**28a**), welches einen Decylrest mit einer (Z)-konfigurierten Doppelbindung aufweist. Das aktive Zentrum bzw. die Substratbindestelle dieser Enzyme wird daher wahrscheinlich auf dieses Substrat ausgelegt sein und den Raum für sterisch anspruchsvollere Substrate mit langen Alkylketten bieten. Denkbar ist ebenso, dass die Alkylketten aus dem Protein herausragen und daher bei TamQ und Pyrrol **3h** das Limit der Akzeptanz von langen Alkylketten in 3-Position noch nicht erreicht wurde. Die Ligase PigC hingegen kondensiert als natürliche Reaktion MBC (**2**) mit MAP (**3a**) zum Prodigiosin (**1a**). Die Alkylreste des Monopyrrols MAP (**3a**) weisen sicher einen geringeren sterischen Anspruch auf als DDA (**28a**). Aufgrund dieser Annahmen, wäre ein nahezu identisches Substratspektrum von TamQ und TreaP zu erwarten. Dies ist zwar in den grundlegenden Tendenzen gegeben, dennoch kann anhand der schwachen Rotfärbung sowie den Werten der Quantifizierung entnommen werden, dass TreaP für die untersuchten Pyrrole **3a–3k**, **27b**, **57a–57g**, **82c–82e** insgesamt einen geringeren Umsatz zeigte. Möglicherweise unterscheiden sich hier die kinetischen Parameter beider Enzyme oder die Raumstruktur der Proteine ist trotz des gleichen natürlichen Substrats verschieden.

Die beobachtete starke Umsetzung zyklischer 2,3-alkylierter Pyrrole, insbesondere Pyrrole **82b** und **82a** durch TamQ und TreaP (Abbildung 41C) kann jedoch nicht anhand der Natur der natürlichen Substrate erklärt werden. Für eine rationale Erklärung dieses Phänomens wäre eine Kristallstruktur

und Kenntnisse über Aufbau und räumliche Struktur von aktivem Zentrum und Substratbindestelle nötig.

### Substratspektren mit 3-alkylierten Pyrrolen

Neben den Pyrrolen **3a–3k**, **27b**, **57a–57g**, **82a–82d** wurden auch nur in 3-Position alkylierte Pyrrole zusammen mit MBC (**2**) als Substrat in *in vitro* Assays mit allen drei Kondensationsenzymen untersucht (Abbildung 42).



**Abbildung 42.** Ergebnisse der *in vitro* Assays mit PigC, TamQ und TreaP. Als Substrate wurden die 3-alkylierten Pyrrole **56a–56i** genutzt. [Es wurde Zellysat genutzt; Assaybedingungen: 1 mM MBC (**2**), 1 mM Pyrrol **56a–56i**, 1,25 mM ATP,  $\text{KPi}$ -Puffer (50 mM, pH 7.0), 10% (v/v) DMSO, 30 °C, 4 h, 300 rpm, 500  $\mu\text{L}$  Assayvolumen].

Bei Vergleich der Ergebnisse aus Abbildung 41 mit den in Abbildung 42 zeigt sich, dass das Fehlen der Methylgruppe in 2-Position mit einer drastischen Reduktion der Akzeptanz dieser Pyrrole durch die Kondensationsenzyme einhergeht. Dieses Phänomen war für PigC bereits durch die Arbeiten von Dr. *Andreas S. Klein* bekannt und zeigte sich in gleicher Weise für die Kondensationsenzyme TamQ und besonders stark für TreaP.<sup>[17, 197]</sup> Auch die Regioselektivität bei der elektrophilen aromatischen Substitution ist hier als Einflussfaktor mit zu betrachten (siehe Kapitel 6.2.3.4).

Möglicherweise spielt das Vorhandensein eines Alkylrests in 2-Position eine Rolle bei der richtigen Orientierung des Substrats im Protein. Im Falle von PigC scheint dabei explizit ein Methylrest ausschlaggebend für die Akzeptanz der Pyrrole zu sein, da sowohl eine Vergrößerung des Rests über einen Ethylrest hinaus (Abbildung 41 B) als auch die Abwesenheit eines Alkylrests in 2-Position zu einer starken Limitierung führt (Abbildung 42), während bei TamQ und TreaP die Größe des Alkylrests eine untergeordnete Rolle zu spielen scheint.

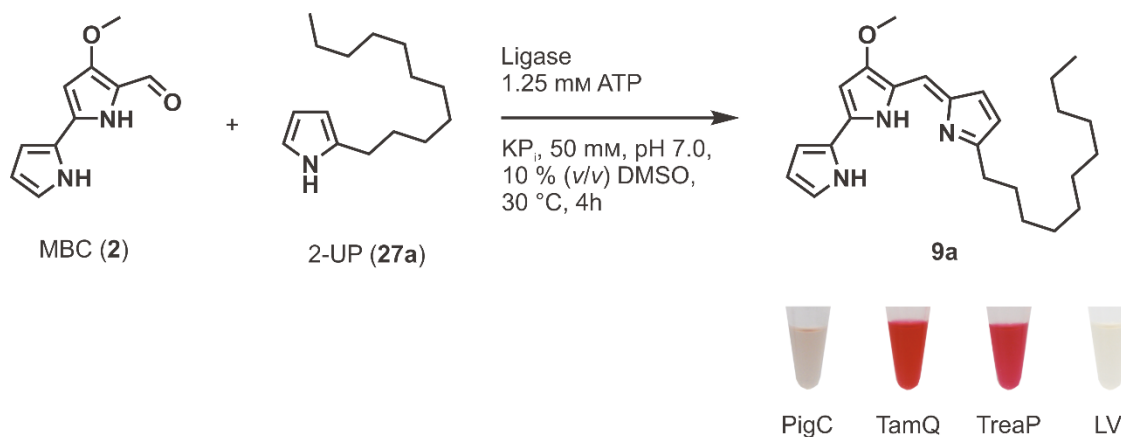
Im Gegensatz zu TamQ und PigC war das Enzym TreaP kaum in der Lage die 3-alkylierten Pyrrole **56c–56i** überhaupt umzusetzen. Lediglich für Pyrrol **56f** konnte eine leichte Rosafärbung beobachtet werden und das Reaktionsprodukt *via* LC-MS Messung nachgewiesen werden. In allen anderen Fälle waren nur Spuren nachweisbar. Wie bereits in Abbildung 41 gut erkennbar, setzte das Enzym TamQ im Gegensatz zu PigC bevorzugt Pyrrole mit längeren Alkylketten um, was bei den 3-alkylierten Pyrrole **56a**, **56f** und **56g** erneut deutlich zu beobachten war (Abbildung 42).

### 6.2.3.3 Erweiterung der Substratspektren – Zugang zu Undecylprodigiosin (**9a**) und Derivaten

Die an der Biosynthese von Undecylprodigiosin (**9a**) beteiligten Kondensationsenzyme RedH oder McpH konnten im Rahmen dieser Arbeit nur unter Schwierigkeiten kloniert und nicht funktional in *E. coli* hergestellt werden (Kapitel 6.2.2.2 und 6.2.2.3). Der Zugang zum natürlich vorkommenden Undecylprodigiosin (**9a**), welches aus der Kondensation von MBC (**2**) mit 2-UP (**27a**) hervorgeht, gelang daher bisher nicht. Eine Umsetzung von 2-UP (**27a**) durch das Kondensationsenzym PigC war ebenso nicht möglich, wie es bereits in vorangegangenen Arbeiten aufgezeigt wurde.<sup>[17]</sup> Da die Kondensationsenzyme TamQ und TreaP noch nicht im Hinblick auf die Akzeptanz von 2-Alkylpyrrolen **27** untersucht wurden, sollte das Substratspektrum weitergehend analysiert werden.

#### Initiale *in vitro* Assays mit 2-UP (**27a**) als Substrat

Bei den vorangegangenen Untersuchungen der Substratspektren der Kondensationsenzyme TamQ und TreaP (Kapitel 6.2.3.2) zeigte sich, dass diese Ligasen bevorzugt Pyrrole mit langen Alkylketten umsetzen, sodass eine Umsetzung von 2-UP (**27a**) durch diese Enzyme denkbar war. Daher wurden *in vitro* Assays mit 2-UP (**27a**) als Substrat und den Kondensationsenzymen TamQ und TreaP sowie vergleichsweise PigC durchgeführt (Abbildung 43).



**Abbildung 43.** *In vitro* Assay mit dem Monopyrrol 2-UP (**27a**) als Substrat und den Kondensationsenzymen PigC, TamQ und TreaP. Als Kontrolle wurde eine Leervektorprobe genutzt. In den Reaktionsgefäßen sind die ethanolischen Extrakte zu sehen. [Es wurde Zelllysate genutzt; Assaybedingungen: 1 mM MBC (**2**), 1 mM 2-UP (**27a**), 1.25 mM ATP, KP<sub>i</sub>-Puffer (50 mM, pH 7.0), 10 % (v/v) DMSO, 30 °C, 4 h, 300 rpm, 500 µL Assayvolumen].



Aus der Dissertation von Dr. *Andreas S. Klein* war bereits bekannt, dass das Kondensationsenzym PigC 2-UP (**27a**) nicht zu Undecylprodigiosin (**9a**) umsetzen konnte, was die Ergebnisse des durchgeführten *in vitro* Assays bestätigten (Abbildung 43).<sup>[17]</sup> Bei TamQ und TreaP hingegen konnte eine deutliche Rotfärbung beobachtet werden und in LC-MS Messungen Undecylprodigiosin (**9a**) nachgewiesen werden. Durch den Einsatz der Kondensationsenzyme TamQ und TreaP konnte somit der zuvor nicht mögliche enzymatische Zugang zu Undecylprodigiosin (**9a**) ermöglicht werden.

### Substratspektren mit 2-alkylierten Pyrrolen

Da sowohl TamQ als auch TreaP das unnatürliche Substrat 2-UP (**27a**) akzeptierten und Undecylprodigiosin (**9a**) produzieren konnten, veranlassten diese Ergebnisse eine systematische Untersuchung des Substratspektrums aller drei Kondensationsenzyme im Hinblick auf 2-alkylierte Pyrrole. So wurden im Rahmen der Bachelorarbeit von B. Sc. *Annabel Arens* die zuvor synthetisierten Derivate des Undecylpyrrols (**27a**, Kapitel 6.1.1.1) zusammen mit MBC (**2**) als Substrat in Aktivitätsassays eingesetzt (Abbildung 44).<sup>[259]</sup>



**Abbildung 44.** Ergebnisse der *in vitro* Assays mit PigC, TamQ und TreaP. Als Substrate wurden die 2-alkylierten Pyrrole **27a–27g** genutzt. Die hier dargestellten Ergebnisse wurden von B. Sc. *Annabel Arens* im Rahmen ihrer Bachelorarbeit erhalten und die Abbildung entstand in Anlehnung an ihre Arbeit.<sup>[259]</sup> [Es wurde Zelllysate genutzt; Assaybedingungen: 1 mM MBC (**2**), 1 mM Pyrrol **27a–27g**, 1.25 mM ATP, K<sub>Pi</sub>-Puffer (50 mM, pH 7.0), 10% (v/v) DMSO, 30 °C, 4 h, 300 rpm. 500 µL Assayvolumen].

Die Ligase TamQ setzte, mit Ausnahme von Pyrrol **27b** und **27g**, bei denen nur eine sehr schwache Rotfärbung sichtbar war, alle getesteten Pyrrole um. Das Kondensationsenzym TreaP hingegen akzeptierte hauptsächlich das Pyrrol **27a**, **27d** und **27e** als Substrat, während für Pyrrol **27b** und **27g** nur etwas schwächere Rotfärbungen beobachtet werden konnten. Wie aus den initialen *in vitro* Assays bereits erwartet, wurde 2-UP (**27a**) von PigC nicht umgesetzt und auch 2-UP (**27a**) Derivate mit längerer Alkylkette – Pyrrol **27c** und **27g** – wurden nicht als Substrate angenommen. Allerdings setzte

das Kondensationsenzym PigC die Pyrrole mit Octyl (**27d**)- und auch Pentylrest (**27e**) um, wohingegen Pyrrole **27b** und **27f** mit kürzerer Alkylkette kaum als Substrate akzeptiert wurden.

Während bei Testung der 3-alkylierten Pyrrole das 3-Tetradecylpyrrol (**56h**) von TamQ nicht mehr umgesetzt wurde (Kapitel 6.2.3.2, Abbildung 42), konnte das 2-Tetradecylpyrrol (**27c**) akzeptiert werden und erst bei Einsatz des 2-Hexadecylpyrrols (**27g**) konnte eine Limitierung beobachtet werden (Abbildung 44). Auch für PigC und 2-Octylpyrrol (**27d**) sowie 3-Octylpyrrol (**56f**) konnten diese Beobachtungen gemacht werden: 3-Octylpyrrol (**56f**) wurde von PigC nicht mehr akzeptiert, wohingegen 2-Octylpyrrol (**27d**) umgesetzt wurde. Für das Enzym TreaP zeigten sich die Unterschiede in der Umsetzung noch deutlicher. So wurden 3-alkylierte Pyrrole kaum bzw. nur in Spuren umgesetzt, wohingegen 2-alkylierte Pyrrole vom Kondensationsenzym TreaP durchaus als Substrat angenommen wurden. Offenbar beeinflusst die Position der Alkylreste am Pyrrolring (2-Position oder 3-Position) die Akzeptanz der Substrate durch die Enzyme.

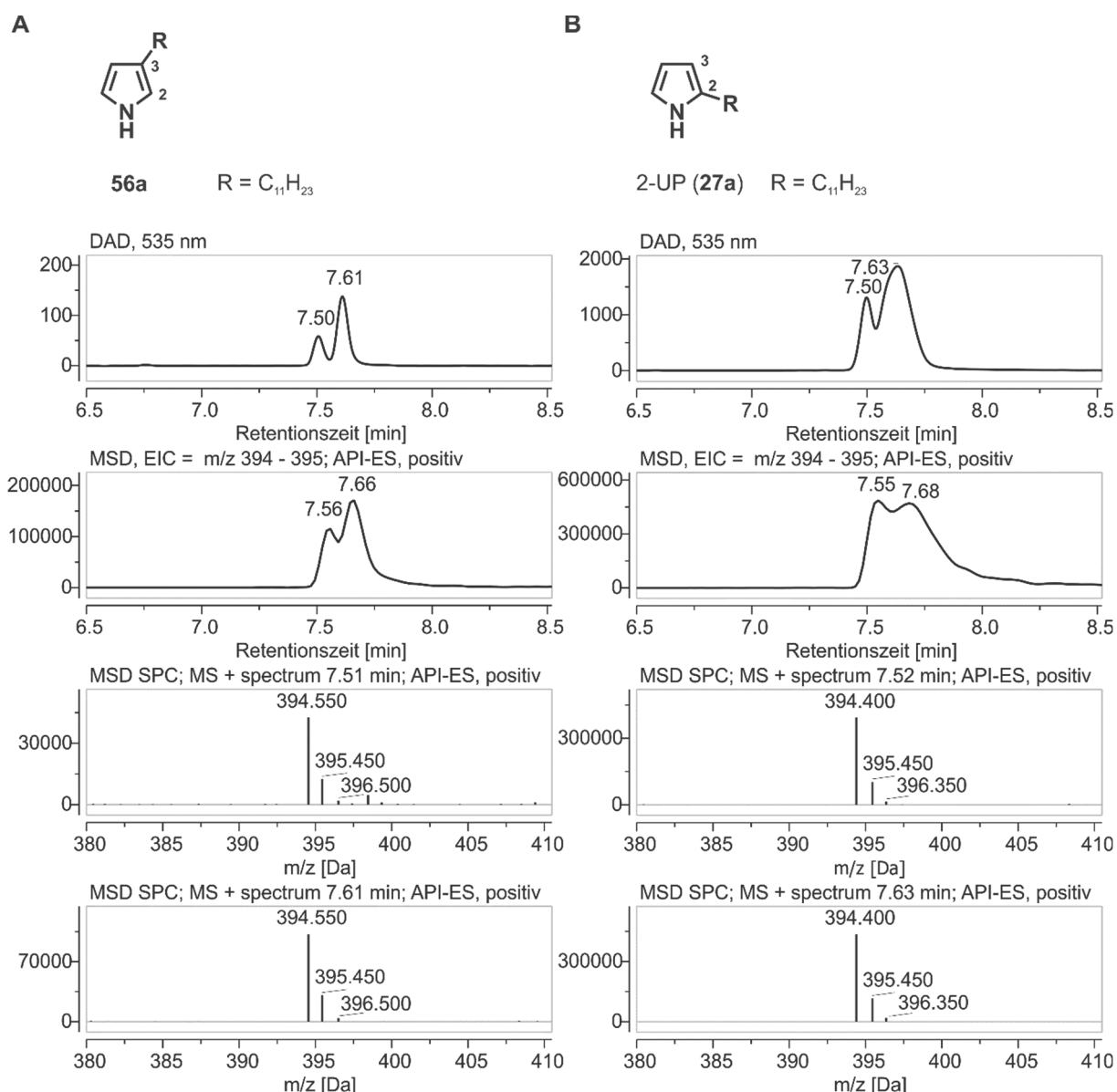
Die in Abbildung 44 dargestellten Ergebnisse zeigen jedoch erneut, dass vor allem durch TamQ und TreaP der enzymatische Zugang zu Undecylprodigiosin (**9a**) selbst sowie Derivate dieses Prodiginins ermöglicht wird. Dies stellt zudem einen Ansatzpunkt für potentiell nachfolgende enzymatische Zyklisierungen dar, wie sie auch im Falle von Undecylprodigiosin (**9a**) zu Streptorubin A (**11**) oder Streptorubin B (**12**) folgen.

Aus allen bis hierhin gezeigten Ergebnissen der *in vitro* Assays (Kapitel 6.2.3.2, Abbildung 41–Abbildung 44) ging hervor, dass TamQ und auch TreaP im Vergleich zum Kondensationsenzym PigC Pyrrole mit längeren Alkylketten umsetzen konnten, was durch die unterschiedliche Struktur der natürlichen Substrate erklärbar sein kann und bereits diskutiert wurde. Ebenso konnte eine starke Akzeptanz der zyklischen 2,3-alkylierten Pyrrole bei TamQ und TreaP beobachtet werden. Eine detaillierte Begründung für die Substratspektren von PigC, TamQ und TreaP ließe sich allerdings erst finden, sobald eine Kristallstruktur für die Enzyme verfügbar ist auf deren Basis *in silico* Modellierungen und Vorhersagen vorgenommen werden können. Für keines der Enzyme wurde bisher eine Kristallstruktur erhalten, allerdings wurde für PigC ein Homologiemodell erstellt.<sup>[193]</sup> Eine Kristallstruktur aller Kondensationsenzyme würde schließlich auch die Möglichkeit des rationalen Proteindesigns eröffnen und somit eine gezielte Einflussnahme auf das Substratspektrum der Enzyme zulassen.

#### 6.2.3.4 Regioselektivität der elektrophilen aromatischen Substitution an Pyrrolderivaten

Bei Betrachtung der LC-MS Daten der *in vitro* Assays mit 3-alkylierten Pyrrolen und auch 2-alkylierten Pyrrolen konnte für alle drei untersuchten Kondensationsenzyme beobachtet werden, dass jeweils zwei Signale unterschiedlicher Intensität bei einer Wellenlänge von 535 nm detektiert werden und auch in den Massenchromatogrammen zu sehen sind (Kapitel 9.8.1.2, Abbildung A 53; Kapitel 9.8.1.3, Abbildung A 54). In Abbildung 45 sind exemplarisch die LC-MS Analysen der Extrakte der *in vitro* Assays mit TamQ und 3-Undecylpyrrol (**56a**) und 2-UP (**27a**) als Substrat abgebildet.

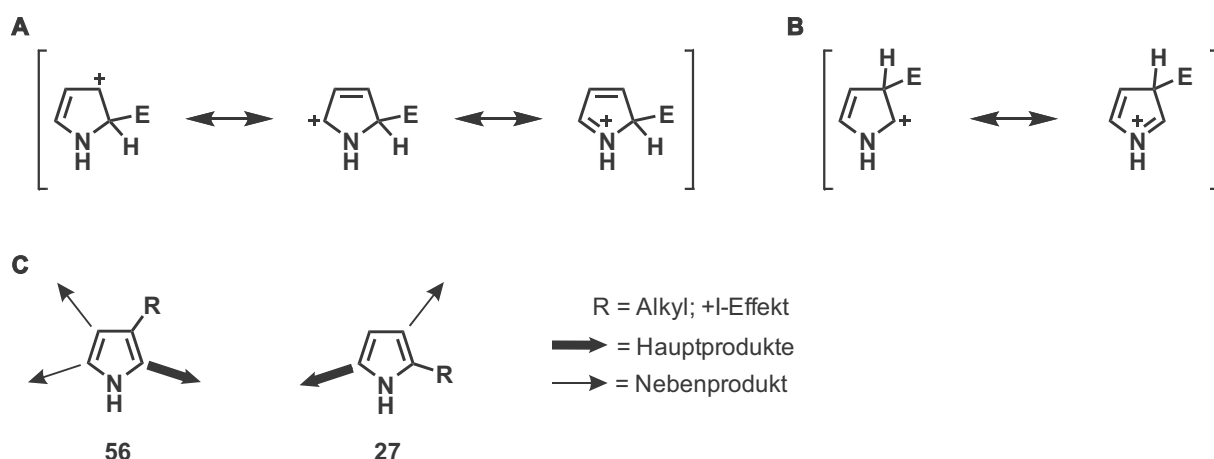




**Abbildung 45.** Strukturformel des Pyrrolsubstrats, DAD-Chromatogramm, Massenchromatogramm und Massenspektrum von *in vitro* Assays mit heterolog exprimiertem TamQ mit 3-Undecylpyrrol (**56a**, **A**) und 2-UP (**27a**, **B**) als Substrat. [Es wurde Zelllysate genutzt; Assaybedingungen: 1 mM MBC (**2**), 1 mM Pyrrol **27a** bzw. **56a**, 1.25 mM ATP, K<sub>P</sub>-Puffer (50 mM, pH 7.0), 10% (v/v) DMSO, 30 °C, 4 h, 300 rpm, 500 µL Assayvolumen].

Neben den zwei Signalen in den DAD-Chromatogrammen und den Massenchromatogrammen ist in den dazugehörigen Massenspektren in beiden Fällen die Masse des erwarteten Prodiginins zu erkennen (Prodiginin **101a** [M+H]<sup>+</sup> berechnet: 394.58 g/mol; gefunden: 394.55 g/mol; Prodiginin **9a** [M+H]<sup>+</sup> berechnet: 394.58 g/mol; gefunden: 394.40 g/mol). Offensichtlich sind zwei Isomere der Prodiginine **9a** bzw. **101a** aus der enzymatischen Reaktion hervorgegangen.

Betrachtet man das unsubstituierte 1H-Pyrrol (**4**), so kann die elektrophile aromatische Substitution sowohl an der α- als auch an der β-Position stattfinden. Die entstehenden Kationen bei Anlagerung eines Elektrophils (E<sup>+</sup>) sind in beiden Fällen stabilisiert (Abbildung 46A, B), jedoch ist nach Anlagerung eines Elektrophils in einer der α-Positionen (2- und 5-Position des Pyrrols) die Delokalisierung größer und somit die elektrophile aromatische Substitution in α-Position wahrscheinlicher (Abbildung 46A).



**Abbildung 46.** Wheland-Komplexe bei der elektrophilen aromatischen Substitution von Pyrrolen. **A:** Wheland-Komplex bei Anlagerung des Elektrophils ( $E^+$ ) an  $\alpha$ -Position. **B:** Wheland-Komplex bei Anlagerung des Elektrophils ( $E^+$ ) an  $\beta$ -Position. **C:** Einfluss von Alkylsubstituenten in 2- oder 3-Position auf die Regioselektivität der elektrophilen aromatischen Substitution von Pyrrolen.

Da jedoch im Falle der Pyrrole **27a** bzw. **56a** ein Alkylsubstituent vorhanden ist, welcher einen +I-Effekt (positiver induktiver Effekt) besitzt, beeinflusst dieser die Regioselektivität der elektrophilen aromatischen Substitution (Abbildung 46 C). Somit wären für 3-alkylierte Pyrrole wie 3-Undecylpyrrol (**56a**) drei Reaktionsprodukte zu erwarten, wobei die Substitution in 2-Position das Hauptprodukt darstellen sollte. Bei 2-alkylierten Pyrrolen wie 2-UP (**27a**) wären hingegen nur zwei Regioisomere zu erwarten und eine Substitution in 3-Position würde das Nebenprodukt darstellen. Auf Basis dieser Betrachtungen lassen sich die in Abbildung 45 B dargestellten Ergebnisse erklären.

Bei *in vitro* Assays mit 3-Undecylpyrrol (**56a**) als Substrat konnte allerdings nur die Bildung zweier Regioisomere beobachtet werden (Abbildung 45 A) statt der erwarteten drei Regioisomere. Da jedoch eine Substitution in 4-Position die sowohl elektronisch als auch sterisch am wenigsten begünstigte Position darstellt, ist zu vermuten, dass die Bildung dieses Regioisomers nicht oder nur in Mengen unter der Nachweisgrenze stattfand. Ein echter Nachweis und somit Aufklärung der Regioselektivität wäre jedoch nur über Isolierung der Prodiginin-Regioisomere **9a** und **101a** und anschließende NMR-Analyse möglich. Diese könnte letztlich eine verlässliche Aussage über die tatsächliche Struktur des entsprechenden Prodiginins geben.

Die in Abbildung 45 dargestellten Beobachtungen decken sich mit denen zu PigC, die Dr. Andreas S. Klein im Rahmen seiner Dissertation machte. Hier konnten bei Prodiginin **101b** ebenfalls zwei Peaks mit unterschiedlicher Intensität im Chromatogramm und extrahierten Massenchromatogramm analysiert werden, welche die gleiche Masse und das für Prodiginine typische Isotopenmuster zeigen.<sup>[17]</sup>

Da bei allen 2,3-dialkylierten Pyrrolen nur ein Regioisomer des entsprechenden Prodiginins beobachtet wurde, legt dies nahe, dass die natürliche Funktion der Methylgruppe in 2-Position des MAP (**3a**) darin bestehen könnte die Bildung von Regioisomeren zu unterbinden. Offenkundig ist von enzymatischer Seite bei keinem der drei Kondensationsenzyme eine Regioselektivität bei der Kondensationsreaktion

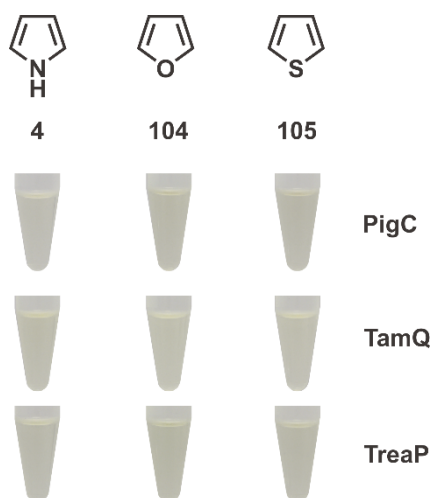
vorhanden, sodass Regioselektivität über Blockieren einer der  $\alpha$ -Positionen und dirigierende Effekte der Alkylsubstituenten in 2- und 3-Position des Pyrrols erreicht wird.

### 6.2.3.5 Fünfgliedrige Heteroaromaten und Indole 102

Neben den bisher untersuchten Pyrrolderivaten sowie dem primären Amin DDA (**28a**) wurden zudem verschiedene fünfgliedrige Heteroaromaten und Indole auf Akzeptanz durch die Kondensationsenzyme hin untersucht. Ein Einsatz anderer fünfgliedriger Heteroaromaten oder Indole würde die Diversität des Substratspektrums und damit der produzierbaren Prodigininderivate erhöhen. Die Nutzung von Indol (**102a**) und Derivaten ergäbe zudem einen enzymatischen Zugang zum bisher nur chemisch von *Baldino et al.* synthetisierten Prodigininderivat Indolprodigosin (**103a**), welches ein Indol anstelle eines Pyrrols am C-Ring aufweist.<sup>[292]</sup>

#### *In vitro* Assays mit verschiedenen fünfgliedrige Heteroaromaten

Zunächst wurden das unsubstituierte 1*H*-Pyrrol (**4**) sowie Furan (**104**) und Thiophen (**105**) zusammen mit MBC (**2**) als Substrate in *in vitro* Assays eingesetzt und so überprüft, ob eines der Kondensationsenzyme PigC, TamQ oder TreaP einen der fünfgliedrigen Heteroaromaten umsetzt. Allerdings wurde in keinem Fall eine Produktbildung beobachtet, weder visuell (Abbildung 47) noch *via* LC-MS Analytik.

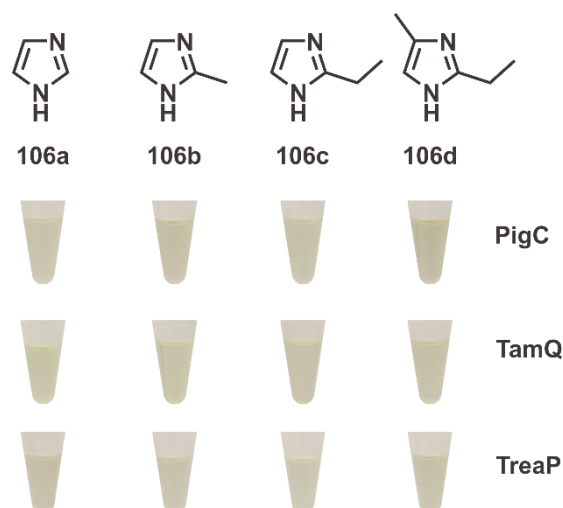


**Abbildung 47.** Ergebnisse der *in vitro* Assays mit PigC, TamQ und TreaP. Als Substrate wurden 1*H*-Pyrrol (**4**), Furan (**104**) und Thiophen (**105**) genutzt. [Es wurde Zellysat genutzt; Assaybedingungen: 1 mM MBC (**2**), 1 mM 1*H*-Pyrrol (**4**), Furan (**104**) oder Thiophen (**105**), 1.25 mM ATP,  $KP_i$ -Puffer (50 mM, pH 7.0), 10 % (v/v) DMSO, 30 °C, 4 h, 300 rpm, 500  $\mu$ L Assayvolumen].

Sowohl im Falle von 1*H*-Pyrrol (**4**) als auch für Furan (**104**) und Thiophen (**105**) besteht eine Präferenz für eine elektrophile aromatische Substitution in  $\alpha$ -Position. 1*H*-Pyrrol (**4**) ist dabei reaktiver als Furan (**104**) und Thiophen (**105**), dennoch wird selbst dieses Substrat nicht zum entsprechenden Prodiginin umgesetzt. Dieses Ergebnis entspricht den Beobachtungen der vorhergehenden Experimente, dass Pyrrole mit sehr kurzen Alkylsubstituenten kaum oder gar nicht umgesetzt werden (Kapitel 6.2.3.2, Abbildung 41, Abbildung 42, Abbildung 44). Eine Untersuchung alkylierter Furan (**104**)- oder Thiophen (**105**) Derivate wurde nicht durchgeführt, könnte aber einen interessanten

Ansatz für zukünftige Experimente darstellen und einen Zugang zu neuen, diversen Prodigininstrukturen ermöglichen.

Auch die Testung von Imidazol (**106a**) und verschiedenen Imidazol Derivaten (**106a–106d**) ergab lediglich ein negatives Ergebnis bezüglich der Umsetzung dieser Substrate durch die drei getesteten Kondensationsenzyme (Abbildung 48).

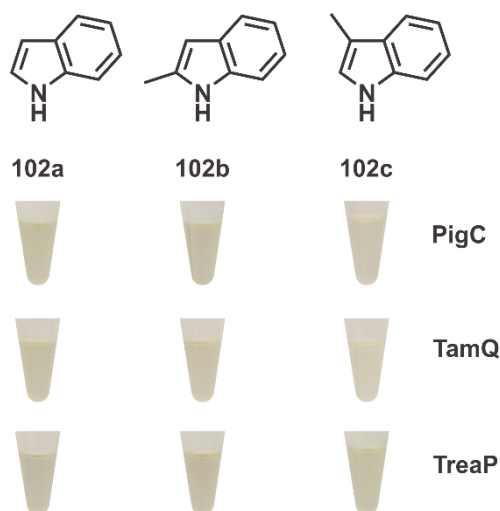


**Abbildung 48.** Ergebnisse der *in vitro* Assays mit PigC, TamQ und TreaP. Als Substrate wurden Imidazol (**106a**) und die Derivate **106b**, **106c** und **106d** genutzt. [Es wurde Zelllysate genutzt; Assaybedingungen: 1 mM MBC (**2**), 1 mM Imidazol **106a–106d**, 1.25 mM ATP,  $KP_i$ -Puffer (50 mM, pH 7.0), 10% (v/v) DMSO, 30 °C, 4 h, 300 rpm, 500  $\mu$ L Assayvolumen].

### ***In vitro* Assays mit Indolen **102****

Der mutasynthetische oder enzymatische Zugang zu Indolprodigiosin (**103a**) und Derivaten wurde bereits in vorangegangenen Arbeiten im analytischen Maßstab untersucht, wobei weder *via* Mutasynthese noch in *in vitro* Assays mit heterolog exprimiertem PigC eine Kondensation von Indol (**102a**) mit MBC (**2**) nachgewiesen werden konnte.<sup>[17]</sup> Getestet wurden neben Indol (**102a**) auch Indol (**102**) Derivate mit elektronenziehenden (Chlor, Nitrogruppe) Gruppen sowie einem Elektronendonator (Methoxygruppe) in 5-Position, die jedoch ebenfalls nicht umgesetzt wurden.<sup>[17]</sup>

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde zum einen erneut Indol (**102a**) als Substrat eingesetzt, um einen möglichen Umsatz durch die Kondensationsenzyme TamQ und TreaP zu analysieren, zum anderen wurden die Substrate 2-Methylindol (**102b**) und 3-Methylindol (**102c**) untersucht (Abbildung 49).

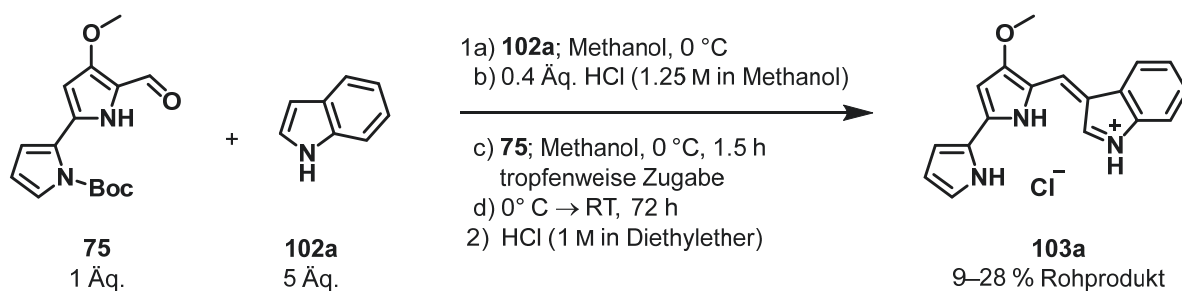


**Abbildung 49.** Ergebnisse der *in vitro* Assays mit PigC, TamQ und TreaP. Als Substrate wurden Indol (**102a**), 2-Methylindol (**102b**) und 3-Methylindol (**102c**) genutzt. [Es wurde Zelllysate genutzt; Assaybedingungen: 1 mM MBC (**2**), 1 mM Indol **102a–102c**, 1.25 mM ATP,  $K_P$ -Puffer (50 mM, pH 7.0), 10% (v/v) DMSO, 30 °C, 4 h, 300 rpm, 500  $\mu$ L Assayvolumen].

Wie in Abbildung 49 bereits anhand der fehlenden Rotfärbung erkennbar, wurde keines der getesteten Indole (**102a–102c**) umgesetzt, was durch die LC-MS Analysen bestätigt werden konnte. Während bei 1*H*-Pyrrol (**4**) die elektrophile Substitution bevorzugt in  $\alpha$ -Position erfolgt, findet diese bei Indol (**102a**) nahezu ausschließlich in  $\beta$ -Position statt. Im Gegensatz zu der Beobachtung im Falle der getesteten Pyrrole, dass die Methylgruppe einen entscheidenden Einfluss auf die Akzeptanz der Pyrrole hat, konnte durch Einsatz des 2-Methylindols (**102b**) kein positiver Effekt auf die Kondensationsreaktion erwirkt werden. Zudem konnte ein Blockieren der  $\beta$ -Position keine Kondensation an 2-Position des 3-Methylindols (**102c**) erzwingen. Die Gründe für die mangelnde Umsetzung der Indole liegt wahrscheinlich eher in der unterschiedlichen Reaktivität im Vergleich zu Pyrrolen begründet als in einer Fehlpassung des Substrats in der Substratbindetasche bzw. im aktiven Zentrum, da die gesättigte Variante des Indols, das 4,5,6,7-Tetrahydro-1*H*-indol (**82c**) gut von allen Kondensationsenzymen umgesetzt wird (Kapitel 6.2.3.2, Abbildung 41 C). Zu beachten ist bei diesem Vergleich allerdings, dass es sich bei Indol (**102a**) um ein planares System handelt, was im Fall von 4,5,6,7-Tetrahydro-1*H*-indol (**82c**) nicht gegeben ist. Die unterschiedlichen Reaktivitäten von Indol (**102a**) und Pyrrolen wurden zudem in der chemischen Synthese des Indolprodigiosins (**103a**) deutlich, die nachfolgend beschrieben und diskutiert wird.

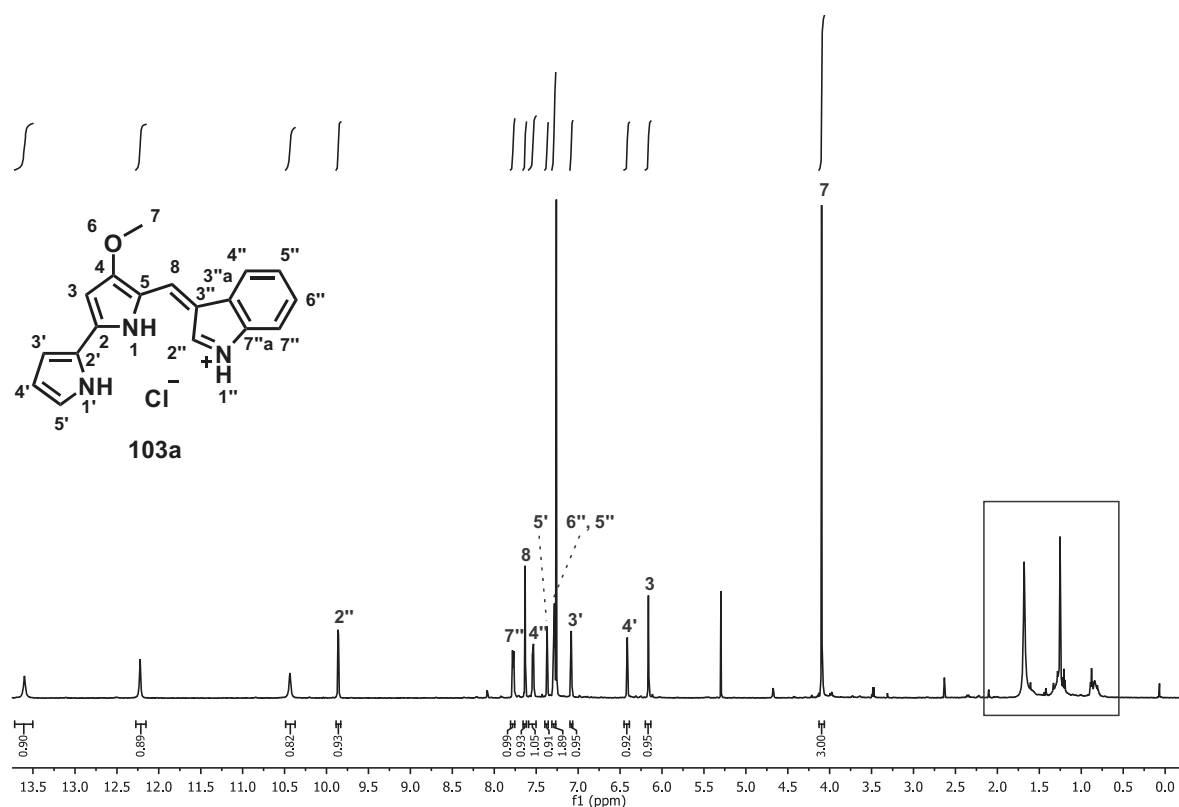
### Chemische Synthese von Indolprodigiosin (**103a**)

Da eine enzymatisch katalysierte Synthese von Indolprodigiosin (**103a**) und Derivaten mit den drei untersuchten Kondensationsenzymen nicht realisiert werden konnte, sollte der Zugang zu Indolprodigiosin (**103a**) mittels chemischer Synthese ermöglicht werden. Dazu wurde die Syntheseroute, die von Dr. *Andreas S. Klein* etabliert wurde, im Rahmen der Bachelorarbeit von B. Sc. *Anne Vogt* weiter untersucht und im Rahmen der vorliegenden Arbeit modifiziert und im semi-präparativen Maßstab durchgeführt (Schema 31; Methoden in Kapitel 8.2.5).<sup>[17, 293]</sup>



**Schema 31.** Synthese von Indolprodigiosin (**103a**) aus Boc-MBC (**75**) und Indol (**102a**).

Wie in vorherigen Arbeiten geschildert verlief die Kondensationsreaktion sehr langsam und durch sofortige Zugabe des Katalysators (HCl in Methanol) trat eine Dimerisierung zweier Boc-MBC (**75**) Moleküle zu einem Tetrapyrrol auf.<sup>[17]</sup> Um diese Nebenreaktion zu unterdrücken wurde zum einen die Reaktionstemperatur auf 0 °C gesenkt und zum anderen in Methanol gelöstes Boc-MBC (**75**) sehr langsam zur Lösung des Indols (**102a**) in Methanol und dem Katalysator zugetropft. Erst nach erfolgter Zugabe des Boc-MBCs (**75**) wurde die Reaktionsmischung langsam auf Raumtemperatur erwärmt. Desweiteren wurde die Reaktionszeit auf 72 h erhöht, um die im Vergleich zu den Prodigininsynthesen mit Pyrrolderivaten langsamere Kondensationsreaktion zu ermöglichen. Letztlich konnten Synthesebedingungen gefunden werden, bei denen Indolprodigiosin (**103a**) in Rohausbeuten bis zu 28% (9–28% Rohprodukt, 20–120 µmol, 4.5–34 mg) erhalten werden konnte (Schema 31). Die verbesserten Synthesebedingungen führten zwar zur erfolgreichen Synthese des gewünschten Produkts, jedoch konnte nicht genügend reine Substanz für <sup>13</sup>C-NMR Messungen isoliert werden, sodass lediglich <sup>1</sup>H-NMR Messungen stattfanden. Im <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum (Abbildung 50) sind die Signale der A- und B-Ringe und insbesondere der Methoxygruppe in dem Bereich chemischer Verschiebung, wie es bereits von anderen Prodigininen bekannt ist. Indikativ für das Vorliegen von Indolprodigiosin (**103a**) sind u. a. das Signal des Protons am Brückenkopfatom (Proton 8) bei 7.63 ppm sowie das Signal bei 9.86 ppm (Proton 2'').



**Abbildung 50.**  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von Indolprodigiosin (**103a**) in  $\text{CDCl}_3$  (600 MHz) und Struktur von Prodiginin **103a**. Ausgewählte Signale wurden zugeordnet. [Kasten: Verunreinigungen unbekannter Art; Lösungsmittel: 0.00 ppm = Tetramethylsilan (TMS), 5.30 ppm = Dichlormethan; 7.26 ppm =  $\text{CDCl}_3$ ].

Im  $^1\text{H}$ -NMR Spektrum sind, neben Dichlormethan (5.30 ppm), noch Verunreinigungen unbekannter Art vorhanden, gut erkennbar an den Signalen bei 1.25 ppm und 1.68 ppm (Abbildung 50, Kasten) sowie weiteren kleineren Signalen. Diese Verunreinigungen – möglicherweise Öle oder Fette – ließen sich auch nicht durch Waschen mit kaltem *n*-Pentan entfernen.

Auffallend war jedoch, dass das säulenchromatographisch gereinigte Indolprodigiosin (**103a**) eine geringe Stabilität aufwies, trotz Lagerung unter Argonatmosphäre und bei  $-20^\circ\text{C}$ . So konnte bereits nach Aufbewahrung über Nacht stellenweise eine schwarze Verfärbung beobachtet werden. Diese ließ sich zwar säulenchromatographisch entfernen, allerdings unter Einbuße der Produktmengen. Die Lagerstabilität war auch nach erneuter Reinigung nicht gegeben, sodass von der weiteren Synthese von Indolprodigiosin (**103a**) abgesehen wurde. Somit ist die Synthese von Indolprodigiosin (**103a**) zwar möglich, jedoch spricht die schlechte Lagerstabilität des Produkts gegen die weitere Herstellung und Nutzung des Produkts.

## 6.2.4 Kinetische Untersuchungen der Kondensationsenzyme

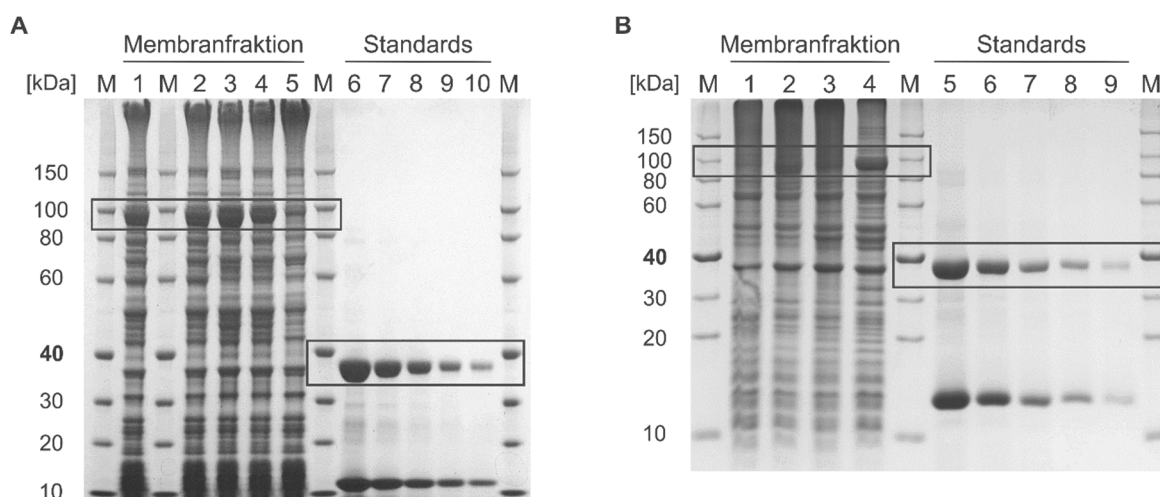
Zusätzlich zu den *in vitro* Assays können vor allem enzymkinetische Betrachtungen zu einem größeren Verständnis der Kondensationsreaktion führen und Anhaltspunkte für die Substratakzeptanz sowie mögliche Parameter für eine Optimierung des Prozesses geben. Kinetische Analysen der Kondensationsenzyme PigC aus *S. marcescens* und HapC aus *H. chejuensis* wurden von *Chawrai et al.* bereits durchgeführt, wobei die Substrate MAP (**3a**), MBC (**2**) und ATP jeweils in variierenden Konzentrationen eingesetzt wurden.<sup>[20]</sup> Da keines der Proteine über einen N-terminalen His<sub>6</sub>-Tag in ausreichend aktiver Form isoliert werden konnte, wurden die kinetischen Untersuchungen mit isolierter Membranfraktion durchgeführt.<sup>[20]</sup> Basierend auf den Informationen und der Methodik aus der Publikation von *Chawrai et al.* wurde das Kondensationsenzym PigC in vorherigen Arbeiten untersucht und kinetische Analysen mit MAP (**3a**) sowie zwei weiteren 2,3-dialkylierten Pyrrolen durchgeführt.<sup>[17]</sup> Diese Analysen sollten im Rahmen dieser Arbeit auch mit den Kondensationsenzymen TamQ und TreaP erfolgen, um weitere Informationen über diese Enzyme zu erhalten.

### 6.2.4.1 Kinetische Untersuchung mit 2,3-dialkylierten Pyrrolen

Die bisher nicht untersuchten Kondensationsenzyme TamQ und TreaP wurden entsprechend vorheriger Arbeiten im Hinblick auf deren Enzymkinetiken analysiert und im Falle von PigC weitergehend untersucht.<sup>[17]</sup> Als Monopyrrolsubstrate wurde neben dem natürlichen Substrat von PigC, MAP (**3a**), auch die MAP (**3a**) Derivate Pyrrol **3c** mit kürzerer, bzw. Pyrrol **3f** mit längerer Alkylkette in 3-Position untersucht. Die Reinheit dieser Substrate war vor dem experimentellen Einsatz in *Michaelis-Menten*-Kinetik Messungen (Kapitel 8.5.7) *via* quantitativem NMR (Kapitel 8.2.1.4) überprüft und auf  $96 \pm 0.7\%$  (**3a**),  $97 \pm 0.8\%$  (**3c**) und  $97 \pm 0.3\%$  (**3f**) bestimmt worden.

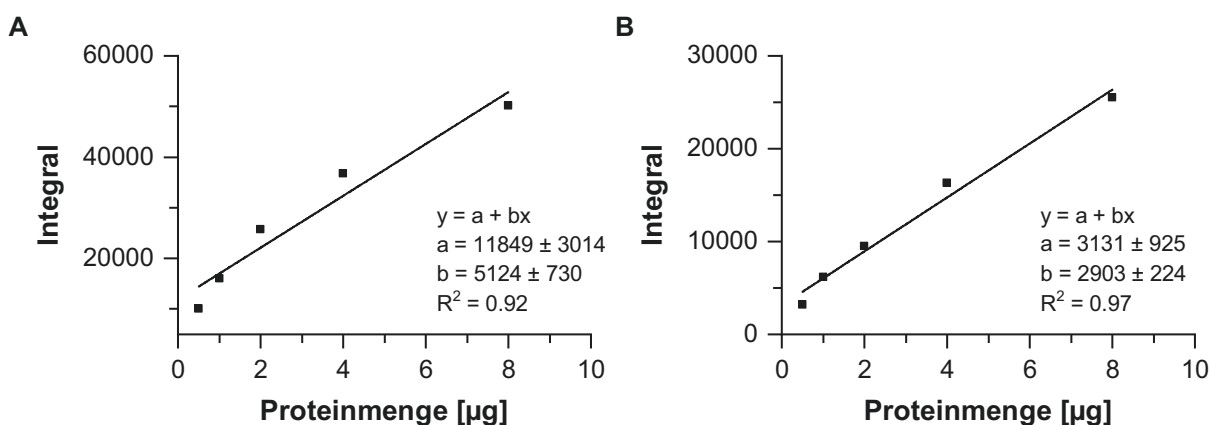
Zur Bestimmung der spezifischen Aktivität im Kontext von Enzymkinetiken muss die Proteinmenge des Enzyms bekannt sein. Eine Isolierung der heterolog exprimierten Kondensationsenzyme war jedoch zu dem Zeitpunkt noch nicht erfolgreich durchgeführt worden, sodass die Quantifizierung der Enzymmenge über quantitative Densitometrie (Kapitel 8.5.5) erfolgen sollte.<sup>[20, 294-296]</sup> Erst kürzlich wurde von *Picott et al.* eine Methode zur löslichen Expression und Isolierung zweier Kondensationsenzyme publiziert.<sup>[176, 201]</sup> Die Quantifizierung der Enzymmenge *via* quantitativer Densitometrie geschah mittels SDS-PAGE Analyse der Membranfraktion sowie Proteinstandards mit bekannter Konzentration (Abbildung 51).





**Abbildung 51.** Bilder der SDS-PAGE Analyse der isolierten Membranfraktionen und der Proteinstandards, die für die densitometrische Quantifizierung genutzt wurden. **A:** SDS-PAGE, die für die Auswertung der Kinetiken mit 2,3-dialkylierten Pyrrolen genutzt wurde. [M = Marker (Roti®-Mark 10–150), 1, 2 = PigC; 3 = TamQ; 4 = TreaP; 5 = Leervektor; 6–10 = Proteinstandardmischung zu gleichen Teilen aus ADH (Tetramer ca. 150 kDa; Monomer ca. 37.5 kDa) und Lysozym (ca. 14 kDa); 6 = 8 µg, 7 = 4 µg, 8 = 2 µg, 9 = 1 µg, 10 = 0.5 µg] **B:** SDS-PAGE, die für die Auswertung der Kinetiken mit 3-alkylierten Pyrrolen genutzt wurde. Die Ergebnisse wurden von B. Sc. Annabel Arens im Rahmen ihrer Bachelorarbeit erhalten.<sup>[259]</sup> [M = Marker (Roti®-Mark 10–150), 1 = Leervektor; 2 = PigC; 3 = TamQ; 4 = TreaP; 5–9 = Proteinstandardmischung zu gleichen Teilen aus ADH und Lysozym; 5 = 8 µg, 6 = 4 µg, 7 = 2 µg, 8 = 1 µg, 9 = 0.5 µg]

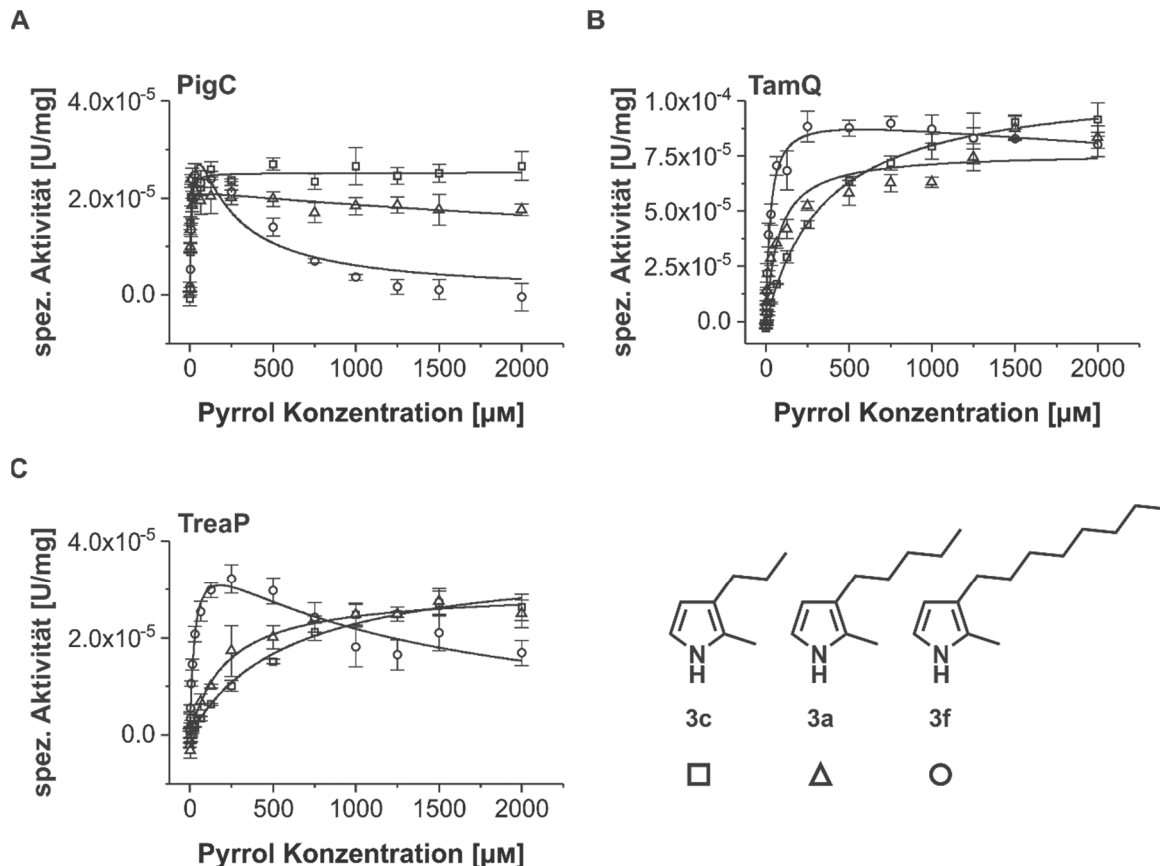
Zur densitometrischen Datenauswertung wurde unter Verwendung der Software *ImageJ* das Bild der SDS-PAGEs analysiert und die Banden des ADH-Proteinstandards und der zu untersuchenden Proteine im Hinblick auf das Integral ihres Graustufenwertes ausgewertet.<sup>[295]</sup> Durch lineare Regression konnte so die Proteinmenge der Enzyme in der Membranfraktion bestimmt werden (Abbildung 52).



**Abbildung 52.** Integrale des Proteinstandards ADH, die mit der Software *ImageJ* bestimmt wurden, aufgetragen gegen die Proteinmenge des Proteinstandards. **A:** Standardgerade, die für die Auswertung der Kinetiken mit 2,3-dialkylierten Pyrrolen genutzt wurde. **B:** Standardgerade, die für die Auswertung der Kinetiken mit 3-alkylierten Pyrrolen genutzt wurde. Die Ergebnisse wurden von B. Sc. Annabel Arens im Rahmen ihrer Bachelorarbeit erhalten.<sup>[259]</sup>

Somit konnte für PigC, TamQ und TreaP nicht nur die spezifische Aktivität angegeben, sondern daraus folgend auch kinetische Parameter abgeleitet werden. Die Ergebnisse der kinetischen Untersuchungen (Abbildung 53) zeigten eine Substratüberschussinhibierung des Kondensationsenzyms PigC, die mit

der Länge der Alkylkette der getesteten Monopyrrole zunahm (Abbildung 53 A). Dieses Phänomen war bereits in den vorangegangenen Arbeiten beobachtet worden.<sup>[17]</sup>



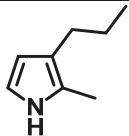
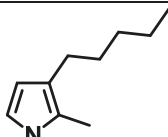
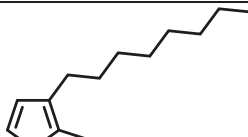
**Abbildung 53.** Spezifische Aktivität (spez. Aktivität) von PigC (A), TamQ (B) und TreaP (C). [Es wurde resuspendierte Membranfraktion verwendet; Bedingungen: 0.1 mM MBC (2), 1.25 mM ATP, 0–2 mM Pyrrole 3a, 3c oder 3f, K<sub>P</sub>-Puffer (50 mM, pH 7.0, 0.1 mM MgCl<sub>2</sub>), 10 % (v/v) DMSO, 30 °C, 200 μL Assayvolumen].

Für das natürliche Substrat MAP (3a) war bereits bei niedrigen Substratkonzentrationen von etwa 100 μM eine Inhibierung erkennbar, was sich mit den Beobachtungen von *Chawrai et al.* deckt, bei denen eine Substratüberschussinhibierung ab einer MAP (3a) Konzentration  $\geq 20 \mu\text{M}$  erkennbar wurde.<sup>[20]</sup> Auch *Picott et al.*, wiesen bei Untersuchungen des PigC Homologs aus *P. rubra* eine Substratüberschussinhibierung bei ähnlichen Konzentrationen von MAP (3a) nach.<sup>[176, 201]</sup> Im Gegensatz zu PigC zeigte sich für TamQ keine Substratüberschussinhibierung durch Pyrrole 3a und 3c im untersuchten Konzentrationsbereich, sondern lediglich eine sehr geringe Inhibierung durch Pyrrol 3f (Abbildung 53 B). Für das Enzym TreaP war keine Substratüberschussinhibierung durch Pyrrole mit *n*-Propyl- und *n*-Pentylresten (Pyrrol 3c und 3a) zu beobachten jedoch für Pyrrol 3f, welches eine *n*-Octylkette in 3-Position aufweist. Diese Inhibierung war bei TreaP stärker ausgeprägt als für das Kondensationsenzym TamQ, jedoch schwächer verglichen mit PigC.

Anhand der kinetischen Untersuchungen wurde ebenfalls deutlich, dass sich die Kondensationsenzyme TreaP und TamQ, trotz identischem natürlichen Substrat beider Kondensationsenzyme, in ihren Enzymkinetiken unterscheiden (Abbildung 53 B, C), sodass sich somit die zuvor beobachtete unterschiedliche Akzeptanz der Monopyrrole (vgl. Kapitel 6.2.3.2) erklären lässt. An dieser Stelle sei

auch zu erwähnen, dass TamQ eine deutlich höhere spezifische Aktivität aufwies als die beiden anderen untersuchten Kondensationsenzyme, deren spezifische Aktivität im Bereich gleicher Größenordnung lag. So weisen PigC und TreaP bei einer Konzentration von 250  $\mu\text{M}$  des Pyrrols **3f** eine spezifische Aktivität von  $2.1 \cdot 10^{-5}$  U/mg bzw.  $3.2 \cdot 10^{-5}$  U/mg auf, während es für TamQ  $8.9 \cdot 10^{-5}$  U/mg sind.

**Tabelle 8.** Übersicht über die kinetischen Daten der untersuchten Enzyme. Die Daten entstammen den Untersuchungen mit den 2,3-dialkylierten Pyrrolen **3a**, **3c** und **3f**. [Es wurde resuspendierte Membranfraktion verwendet; Bedingungen: 0.1 mM MBC (**2**), 1.25 mM ATP, 0–2 mM Pyrrole **3a**, **3c** oder **3f**,  $\text{KPI-Puffer}$  (50 mM, pH 7.0, 0.1 mM  $\text{MgCl}_2$ ), 10% (v/v) DMSO, 30 °C, 200  $\mu\text{L}$  Assayvolumen].

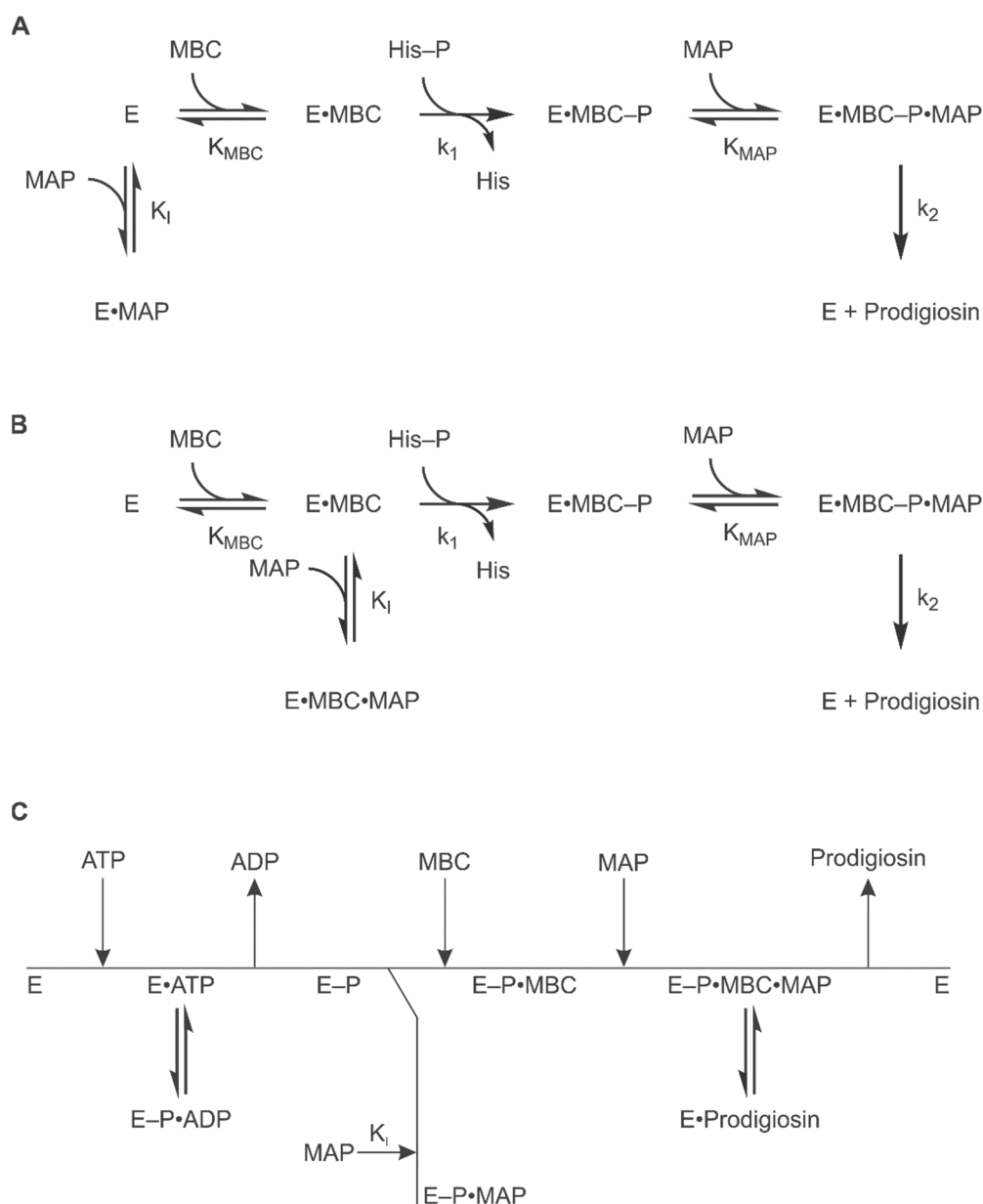
|                                                                                                  |                                                          | PigC                                                   | TamQ                                                   | TreaP                                                  |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|
| <br><b>3c</b>   | $v_{\max}$ [U/mg]                                        | $2.5 \cdot 10^{-5} \pm 4.3 \cdot 10^{-7}$              | $1.1 \cdot 10^{-4} \pm 2.1 \cdot 10^{-6}$              | $3.6 \cdot 10^{-5} \pm 1.6 \cdot 10^{-6}$              |
|                                                                                                  | $K_M$ [ $\mu\text{M}$ ]                                  | $3.1 \pm 0.41$                                         | $3.6 \cdot 10^2 \pm 0.23 \cdot 10^2$                   | $5.9 \cdot 10^2 \pm 0.71 \cdot 10^2$                   |
|                                                                                                  | $K_I$ [ $\mu\text{M}$ ]                                  | –                                                      | –                                                      | –                                                      |
|                                                                                                  | $k_{\text{cat}}$ [ $\text{s}^{-1}$ ]                     | $4.1 \cdot 10^{-5}$                                    | $1.8 \cdot 10^{-4}$                                    | $6.0 \cdot 10^{-5}$                                    |
|                                                                                                  | $k_{\text{cat}}/K_M$ [ $\text{Lmol}^{-1}\text{s}^{-1}$ ] | 13                                                     | 0.51                                                   | 0.10                                                   |
|                                                                                                  | $R^2$                                                    | 0.92                                                   | 0.99                                                   | 0.98                                                   |
|                                                                                                  | Fit-Methode                                              | Michaelis-Menten                                       | Michaelis-Menten                                       | Michaelis-Menten                                       |
| <br><b>3a</b> | $v_{\max}$ [U/mg]                                        | $2.1 \cdot 10^{-5} \pm 7.9 \cdot 10^{-7}$              | $7.7 \cdot 10^{-5} \pm 2.4 \cdot 10^{-6}$              | $3.0 \cdot 10^{-5} \pm 1.1 \cdot 10^{-6}$              |
|                                                                                                  | $K_M$ [ $\mu\text{M}$ ]                                  | $1.6 \pm 0.39$                                         | $75 \pm 12$                                            | $2.2 \cdot 10^2 \pm 0.31 \cdot 10^2$                   |
|                                                                                                  | $K_I$ [ $\mu\text{M}$ ]                                  | $6.7 \cdot 10^3 \pm 2.2 \cdot 10^3$                    | –                                                      | –                                                      |
|                                                                                                  | $k_{\text{cat}}$ [ $\text{s}^{-1}$ ]                     | $3.5 \cdot 10^{-5}$                                    | $1.3 \cdot 10^{-4}$                                    | $5.0 \cdot 10^{-5}$                                    |
|                                                                                                  | $k_{\text{cat}}/K_M$ [ $\text{Lmol}^{-1}\text{s}^{-1}$ ] | 22                                                     | 1.7                                                    | 0.23                                                   |
|                                                                                                  | $R^2$                                                    | 0.81                                                   | 0.93                                                   | 0.96                                                   |
|                                                                                                  | Fit-Methode                                              | Michaelis-Menten<br>Substratüber-<br>schussinhibierung | Michaelis-Menten                                       | Michaelis-Menten                                       |
| <br><b>3f</b> | $v_{\max}$ [U/mg]                                        | $4.6 \cdot 10^{-5} \pm 6.9 \cdot 10^{-6}$              | $9.5 \cdot 10^{-5} \pm 3.2 \cdot 10^{-6}$              | $4.0 \cdot 10^{-5} \pm 2.4 \cdot 10^{-6}$              |
|                                                                                                  | $K_M$ [ $\mu\text{M}$ ]                                  | $19 \pm 5.7$                                           | $26 \pm 3.0$                                           | $27 \pm 4.4$                                           |
|                                                                                                  | $K_I$ [ $\mu\text{M}$ ]                                  | $1.5 \cdot 10^2 \pm 0.42 \cdot 10^2$                   | $1.2 \cdot 10^4 \pm 0.49 \cdot 10^4$                   | $1.3 \cdot 10^3 \pm 0.20 \cdot 10^3$                   |
|                                                                                                  | $k_{\text{cat}}$ [ $\text{s}^{-1}$ ]                     | $7.6 \cdot 10^{-5}$                                    | $1.6 \cdot 10^{-4}$                                    | $6.7 \cdot 10^{-5}$                                    |
|                                                                                                  | $k_{\text{cat}}/K_M$ [ $\text{Lmol}^{-1}\text{s}^{-1}$ ] | 3.9                                                    | 6.2                                                    | 2.5                                                    |
|                                                                                                  | $R^2$                                                    | 0.88                                                   | 0.97                                                   | 0.92                                                   |
|                                                                                                  | Fit-Methode                                              | Michaelis-Menten<br>Substratüber-<br>schussinhibierung | Michaelis-Menten<br>Substratüber-<br>schussinhibierung | Michaelis-Menten<br>Substratüber-<br>schussinhibierung |

Da die Proteinmenge *via* densitometrischer Quantifizierung ermittelt wurde, konnten neben der spezifischen Aktivität auch kinetische Parameter, wie die Wechselzahl  $k_{\text{cat}}$  und der Quotient aus  $k_{\text{cat}}$

und der Michaelis-Konstante  $K_M$  und somit die katalytische Effizienz ermittelt werden (Tabelle 8). Hierbei sollte jedoch beachtet werden, dass die Quantifizierung der Proteinmenge *via* Densitometrie durchaus fehlerbehaftet ist und eine Bestimmung der kinetischen Daten und Proteingehalt nach Isolierung des Zielenzyms akuratre Daten liefern würde. Die Publikation von *Picott et al.* aus dem Jahr 2019 wäre ein Anhaltspunkt für die zukünftige Etablierung einer Expressions- und Isolierungsstrategie der Kondensationsenzyme.<sup>[176, 201]</sup>

Die  $K_M$ -Werte von TamQ und TreaP waren für das Pyrrol **3c** mit  $3.6 \cdot 10^2 \mu\text{M} \pm 0.23 \cdot 10^2 \mu\text{M}$  bzw.  $5.9 \cdot 10^2 \mu\text{M} \pm 0.71 \cdot 10^2 \mu\text{M}$  deutlich höher im Vergleich zu PigC mit  $3.1 \mu\text{M} \pm 0.41 \mu\text{M}$  und wiesen auf eine niedrigere Affinität zwischen Substrat und Enzym hin, als es für Pyrrol **3c** und PigC gegeben ist. Auch bei MAP (**3a**) sind die  $K_M$ -Werte deutlich unterschiedlich. Während der  $K_M$ -Wert von PigC und MAP (**3a**) bei  $1.6 \mu\text{M} \pm 0.39 \mu\text{M}$  liegt, sind es  $75 \mu\text{M} \pm 12 \mu\text{M}$  für TamQ und  $2.2 \cdot 10^2 \mu\text{M} \pm 0.31 \cdot 10^2 \mu\text{M}$  für TreaP. Dies kann dadurch bedingt sein, dass TamQ und TreaP kein Monopyrrol als natürliches Substrat haben, sondern das primäre Amin DDA (**28a**). Die niedrigen  $K_M$ -Werte tragen auch zu einer geringeren katalytischen Effizienz bei (Tabelle 8). So liegt die katalytische Effizienz für MAP (**3a**) und PigC bei 22 L/mol·s, jedoch bei nur 1.7 L/mol·s bzw. 0.23 L/mol·s im Falle von TamQ und TreaP. Bei Betrachtung der Ergebnisse aller drei Enzyme für das langkettige Pyrrol **3f** konnte beobachtet werden, dass sich die  $K_I$ -Werte klar unterscheiden. Dabei hat die Inhibierungskonstante mit  $1.5 \cdot 10^2 \mu\text{M} \pm 0.42 \cdot 10^2 \mu\text{M}$  den kleinsten Wert für PigC und entspricht somit der stärksten Substratüberschussinhibierung. Bei Nutzung von PigC als Kondensationsenzym für die Prodigininproduktion *via* Mutasyntese oder Biokatalyse müsste bei Einsatz von Pyrrolen mit längeren *n*-Alkylketten in 3-Position ein verfahrenstechnischer Ansatz gefunden werden, um die Substratüberschussinhibierung zu vermeiden. Denkbar wäre hier das Zufüttern des Substrats und somit ein Fed-Batch Verfahren, was eine konstante Substratkonzentration unterhalb der inhibierenden Konzentration ermöglichen würde. Da jedoch TamQ die schwächste Inhibierung durch Pyrrol **3f** aufwies bietet diese Ligase neben dem Vorteil der Akzeptanz von einem breiteren Spektrum an Monopyrrolen (vgl. Kapitel 6.2.3.2) auch den Vorteil der kaum vorhandenen Substratüberschussinhibierung und ist daher als alternatives kondensierendes Enzym für die Prodigininproduktion von hohem Interesse.

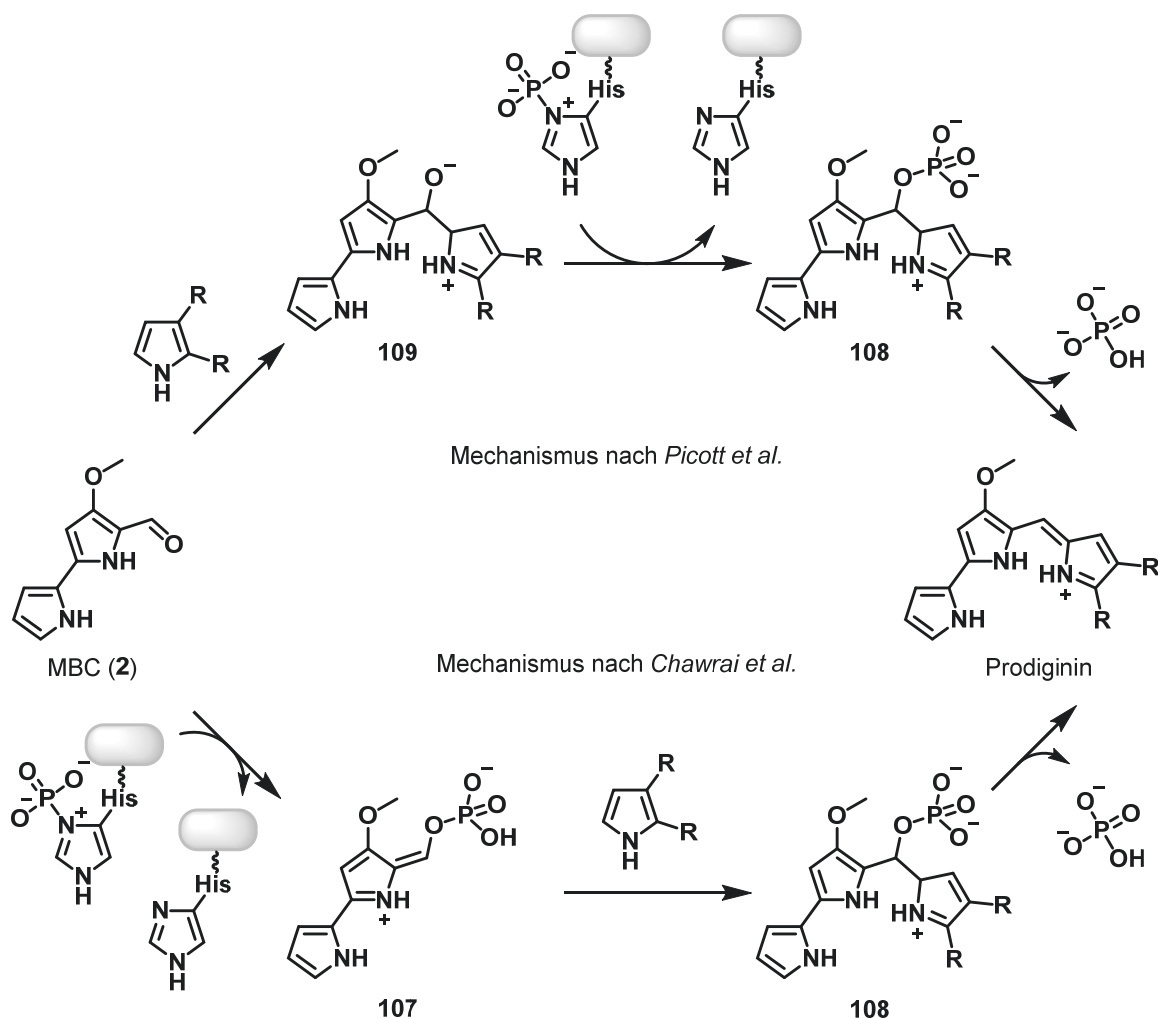
Die insbesondere für PigC beobachtete Substratüberschussinhibierung lässt sich durch verschiedene Modelle erklären, die bereits in der Literatur diskutiert wurden. Abbildung 54 zeigt zwei von *Chawrai et al.* postulierte kinetische Modelle für PigC aus *S. marcescens* sowie eine von *Picott et al.* vorgeschlagene Reaktionssequenz für das zu PigC homologe Kondensationsenzym aus *P. rubra*, für welches ebenfalls eine Substratüberschussinhibierung durch dessen natürliches Substrat MAP (**3a**) beobachtet wurde.<sup>[20, 176, 201]</sup>



**Abbildung 54.** Verschiedene Modelle zur Erklärung der Substratüberschussinhibition und Reaktionssequenz für ein PigC Homolog. **A, B:** Kinetische Modelle erstellt von *Chawrai et al.* zur Erklärung der Substratüberschussinhibition von PigC (*S. marcescens*). Abbildung modifiziert nach *Chawrai et al.*<sup>[20]</sup> **C:** Uni Uni Bi Uni Ping-Pong Reaktionssequenz des Kondensationsenzyms aus *P. rubra*, postuliert von *Picott et al.* Abbildung modifiziert nach *Picott et al.*<sup>[176, 201]</sup> [E = Enzym; E-P = phosphoryliertes Enzym; His = Histidin]

Dem von *Chawrai et al.* veröffentlichten Modell in Abbildung 54 A liegt die Annahme zugrunde, dass es sich um einen geordneten Mechanismus handelt, bei dem MBC (**2**) vor MAP (**3a**) binden muss, damit die Reaktion zu Prodigiosin (**1a**) erfolgen kann. Bindet MAP (**3a**) jedoch zuerst, findet keine Kondensation statt. Ein alternativer, ebenfalls denkbarer Mechanismus (Abbildung 54 B), basiert auf einer Inhibition durch MAP (**3a**), bei der MAP (**3a**) zwar erst nach MBC (**2**) bindet, jedoch bevor der Phosphoryltransfer auf MBC (**2**) erfolgen kann. Dieser Erklärung folgend würde MAP (**3a**) die Phosphorylierung verhindern und so die Reaktion unterbinden. Bei den von *Chawrai et al.* erzielten experimentellen Daten führte letztlich die Kombination aus beiden Modellen zu den am besten passenden nicht-linearen Regressionen.<sup>[20]</sup>

Im Gegensatz zu den von *Chawrai et al.* postulierten Modellen (Abbildung 54 A, B) basiert die von *Picott et al.* veröffentlichte Uni Uni Bi Uni Ping-Pong Reaktionssequenz des Kondensationsenzyms aus *P. rubra* (Abbildung 54 C) auf der Annahme eines anderen Reaktionsmechanismus. Während von *Chawrai et al.* postuliert wird, dass zuerst MBC (**2**) zu Verbindung **107** phosphoryliert wird und daraufhin der nukleophile Angriff des Pyrrols am aktivierten Carbonyl erfolgen kann, sodass Intermediat **108** entsteht (5.4.7 und Abbildung 55, oben), wird von *Picott et al.* diskutiert, dass keine Aktivierung des Aldehyds für eine Reaktion zwischen MBC (**2**) und MAP (**3a**) notwendig ist.<sup>[20, 176, 201]</sup>

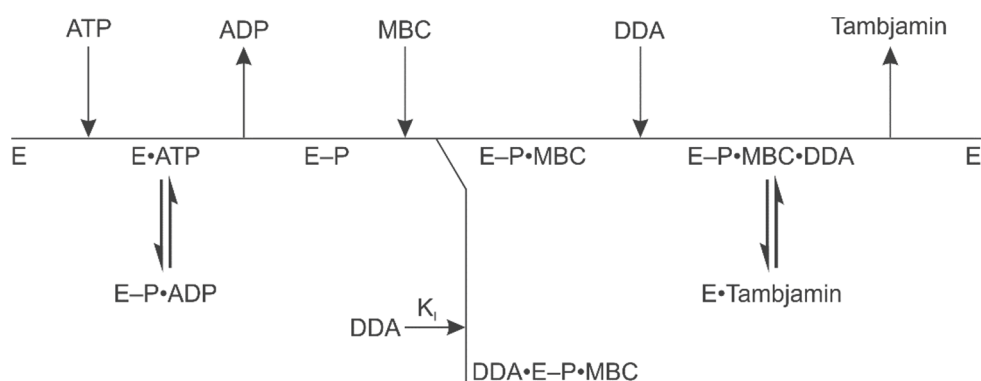


**Abbildung 55.** Verschiedene Reaktionsmechanismen der Kondensationsreaktion. Abbildung modifiziert nach *Chawrai et al.* und *Picott et al.* <sup>[20, 176, 201]</sup>

Stattdessen wird eine Phosphorylierung des Oxyanion-Intermediats **109** angedacht (Abbildung 55, unten), was eine gute Abgangsgruppe erzeugen würde. Ein Nachweis von Intermediat **109** wurde jedoch nicht erbracht.<sup>[176, 201]</sup> Dieser putative Mechanismus steht im Kontrast zu den kürzlich veröffentlichten Daten von *Long et al.*, welche nach Inkubation u.a. des Kondensationsenzyms PigC mit MBC (**2**) und ATP phosphoryliertes MBC (**107**) nachweisen konnten.<sup>[186]</sup> Es sollte dabei jedoch beachtet werden, dass es sich in diesen beiden Publikationen nicht um identische Enzyme handelt, sondern um homologe Proteine, sodass verschiedene

Reaktionsmechanismen zwar unwahrscheinlich aber nicht auszuschließen sind. Ein endgültiger Nachweis eines Reaktionsmechanismus wurde bisher noch nicht erbracht.

Auf struktureller Ebene ist die Substratüberschussinhibierung durch MAP (**3a**) möglicherweise durch die Tatsache bedingt, dass das Bipyrrrol MBC (**2**) und das Monopyrrol MAP (**3a**) ähnlich aufgebaut sind, da in beiden Fällen planare aromatische Pyrrolstrukturen vorliegen. Somit könnte MAP (**3a**) gut in die Substratbindetasche für MBC (**2**) passen und auf diese Weise die beobachtete Inhibierung verursachen. Diese Substratüberschussinhibierung durch Monopyrrole **3a**, **3c** und **3f** wurde jedoch wie oben bereits beschrieben (Abbildung 53) nicht im gleichen Maße für TamQ und TreaP beobachtet. Interessanterweise konnten *Picott et al.* allerdings für das Kondensationsenzym aus *P. citrea* eine unkompetitive Substratinhibierung für das natürliche Substrat DDA (**28a**) feststellen, möglicherweise induziert durch unspezifische hydrophobe Wechselwirkungen zwischen Substrat und Enzym vor Bindung von MBC (**2**) und somit Inhibierung der Reaktion. Die von *Picott et al.* publizierten Beobachtungen führten zu der in Abbildung 56 dargestellten Reaktionssequenz, die sich bezüglich der Inhibierung von der des Kondensationsenzym aus *P. rubra* unterscheidet.<sup>[176, 201]</sup>



**Abbildung 56.** Uni Uni Bi Uni Ping-Pong Reaktionssequenz des Kondensationsenzym aus *P. citrea*, postuliert von *Picott et al.* Abbildung modifiziert nach *Picott et al.*<sup>[176, 201]</sup> [E = Enzym; E-P = phosphoryliertes Enzym].

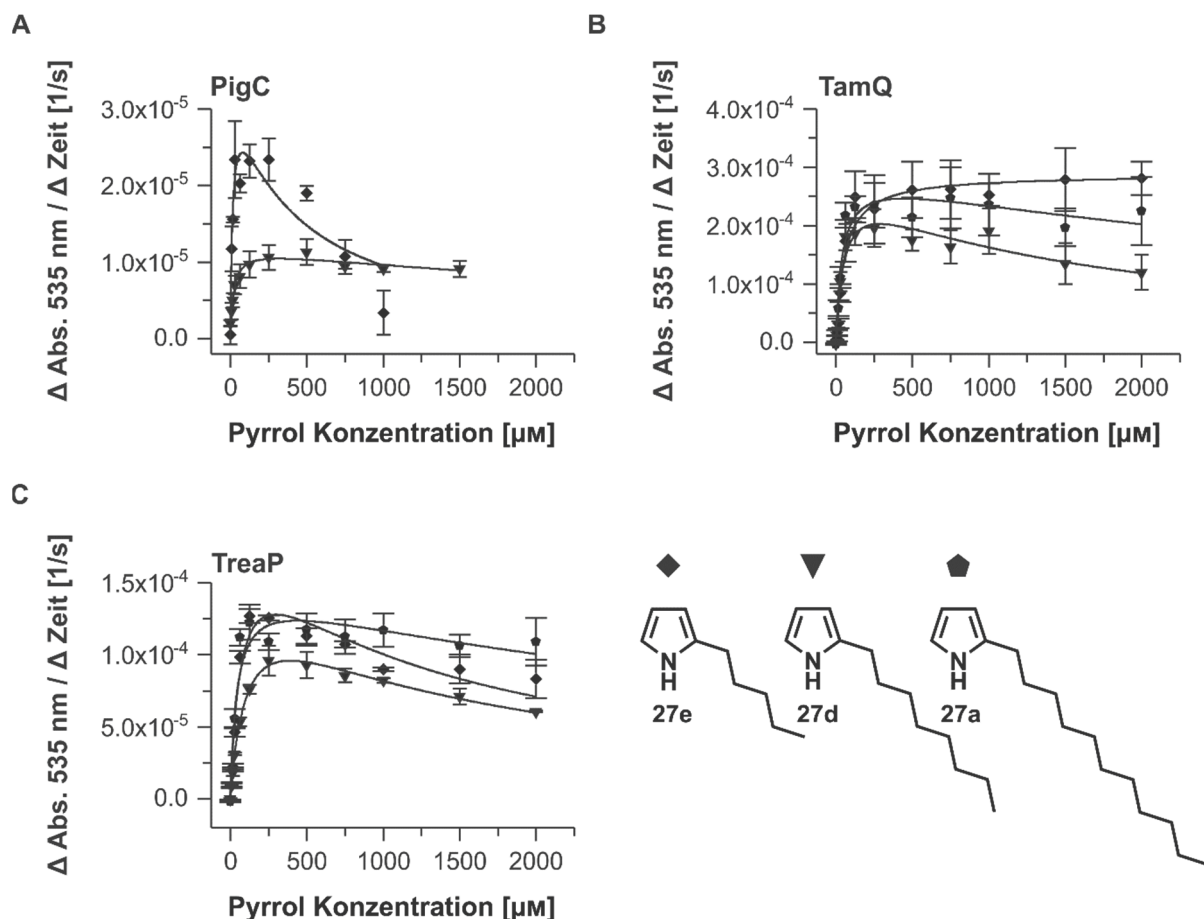
Als Erklärung für die unterschiedlichen beobachteten Inhibierungsmuster für das Kondensationsenzym aus *P. citrea* (TreaP) sowie des Enzyms aus *P. rubra* wurde von *Picott et al.* angeführt, dass im Falle der Monopyrrole eine strukturell stärker differenzierte Substratbindetasche vorliegt, angepasst an planare Heteroaromaten wie Pyrrole, wohingegen dies bei TreaP nicht der Fall ist.<sup>[176, 201]</sup> Diese Annahmen lassen sich durch die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Daten untermauern und würden das recht klar begrenzte Substratspektrum von PigC im Vergleich zum breiten Substratspektrum von TamQ erklären (Kapitel 6.2.3.2).

#### 6.2.4.2 Kinetische Untersuchung mit 2-alkylierten Pyrrolen

Der enzymatische Zugang zu Undecylprodigiosin (**9a**) und Derivaten wurde vor allem durch den Einsatz der Kondensationsenzyme aus *Pseudaltermonadaceae* TamQ und TreaP ermöglicht (Kapitel 6.2.3.3), sodass auch hier Untersuchungen der Enzymkinetiken erfolgten. Die Primärdaten wurden von B. Sc. *Annabel Arens* im Rahmen ihrer Bachelorarbeit generiert.<sup>[259]</sup>



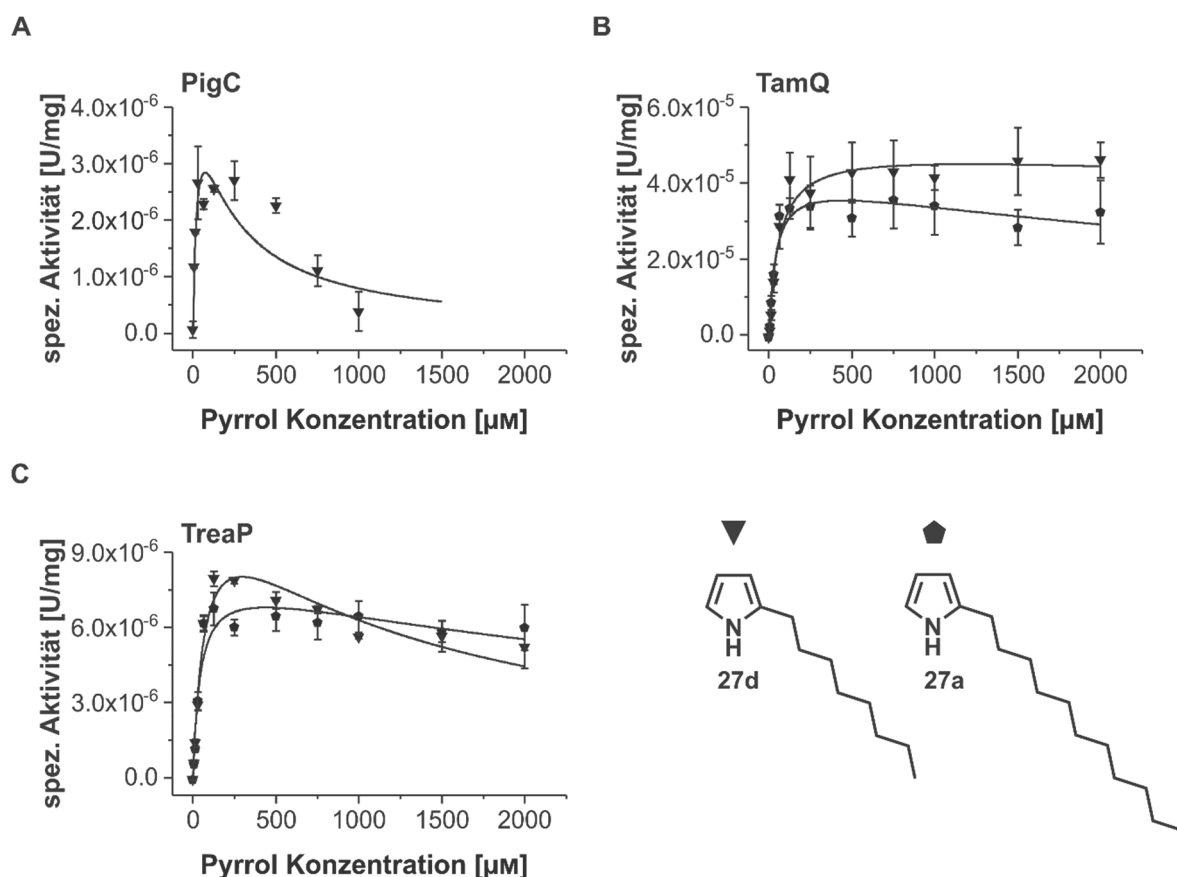
Als Monopyrrole wurden die Pyrrole **27e**, **27d** und **27a** eingesetzt, welche in 2-Position eine *n*-Pentyl-, *n*-Octyl- bzw. *n*-Undecylkette aufweisen. Mit TamQ und TreaP konnten alle drei Monopyrrole (**27e**, **27d** und **27a**) getestet werden, jedoch zeigte PigC in den vorherigen *in vitro* Assays keinen Umsatz des Undecylpyrrols (**27a**) (Kapitel 6.2.3.2, Abbildung 44), sodass dieses Kondensationsenzym nur mit den Pyrrolen **27d** und **27e** getestet wurde. Die initialen Ergebnisse der *Michaelis-Menten*-Kinetiken sind in Abbildung 57 dargestellt.



**Abbildung 57.** Änderung der Absorption (Abs.) bei 535 nm mit der Zeit bei kinetischen Untersuchungen von PigC (**A**), TamQ (**B**) und TreaP (**C**). [Es wurde resuspendierte Membranfraktion verwendet; Bedingungen: 0.1 mM MBC (**2**), 1.25 mM ATP, 0–2 mM Pyrrole **27a**, **27d** oder **27e**,  $\text{K}_\text{P}$ -Puffer (50 mM, pH 7.0, 0.1 mM  $\text{MgCl}_2$ ), 10% (v/v) DMSO, 30°C, 200  $\mu\text{L}$  Assayvolumen]. Die Primärdaten wurden von B. Sc. *Annabel Arens* im Rahmen ihrer Bachelorarbeit generiert.<sup>[259]</sup>

Gut erkennbar ist, dass bei PigC die Inhibition des Enzyms durch die Pyrrolsubstrate deutlich stärker ausgeprägt ist, als dies für TamQ und TreaP zu erkennen war. Ein klarer Einfluss der Kettenlänge auf die Stärke der Inhibition wie im Fall der 2,3-dialkylierten Pyrrole kann anhand dieser Daten zunächst nicht aufgezeigt werden. Unter Einbeziehung der Extinktionskoeffizienten der Prodiginine **9a** und **9d** sowie der Proteinmenge, welche wie zuvor beschrieben durch quantitative Densitometrie bestimmt worden war (Abbildung 51, Abbildung 52), konnte die spezifische Aktivität bestimmt werden (Abbildung 58).

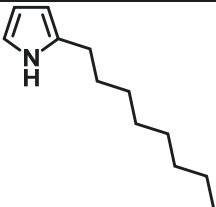
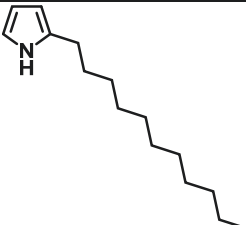




**Abbildung 58.** Spezifische Aktivität von PigC (A), TamQ (B) und TreaP (C). [Es wurde resuspendierte Membranfraktion verwendet; Bedingungen: 0.1 mM MBC (2), 1.25 mM ATP, 0–2 mM Pyrrole 27a oder 27d, KP-Puffer (50 mM, pH 7.0, 0.1 mM MgCl<sub>2</sub>), 10% (v/v) DMSO, 30 °C, 200 µL Assayvolumen]. Die Primärdaten wurden von B. Sc. Annabel Arens im Rahmen ihrer Bachelorarbeit generiert.<sup>[259]</sup>

Die Daten (Abbildung 58) zeigen zunächst auf, dass übereinstimmend mit den Ergebnissen zur Kinetik mit 2,3-dialkylierten Pyrrolen (Abbildung 53) die spezifische Aktivität von TamQ deutlich höher lag als bei TreaP und PigC und auch die Substratüberschussinhibierung bei PigC am stärksten ausgeprägt war, was auch aus den Inhibitionskonstanten  $K_i$  abgelesen werden konnte (Tabelle 9). So betrug  $K_i$  für PigC und Pyrrol 27d  $1.9 \cdot 10^2 \mu\text{M} \pm 1.4 \cdot 10^2 \mu\text{M}$ , wohingegen es für TamQ und TreaP  $2.4 \cdot 10^4 \mu\text{M} \pm 4.4 \cdot 10^4 \mu\text{M}$  bzw.  $1.2 \cdot 10^3 \mu\text{M} \pm 0.25 \cdot 10^3 \mu\text{M}$  waren. Die aus den vorhergehenden Ergebnissen erwartete Korrelation zwischen *n*-Alkylkettenlänge und der Stärke der Inhibierung ließ sich jedoch nicht klar ablesen. Im Fall von TamQ war die Substratüberschussinhibierung für das Pyrrol 27a deutlich stärker ausgeprägt mit  $K_i = 4.7 \cdot 10^3 \mu\text{M} \pm 2.4 \cdot 10^3 \mu\text{M}$  als für Pyrrol 27d ( $K_i = 2.4 \cdot 10^4 \mu\text{M} \pm 4.4 \cdot 10^4 \mu\text{M}$ ), während bei TreaP die Inhibierung durch Pyrrol 27d stärker war mit  $K_i = 1.2 \cdot 10^3 \mu\text{M} \pm 0.25 \cdot 10^3 \mu\text{M}$  als durch Pyrrol 27a mit einer Inhibierungskonstante von  $4.4 \cdot 10^3 \mu\text{M} \pm 1.7 \cdot 10^3 \mu\text{M}$ . Offenkundig scheint Pyrrol 27d mit einer *n*-Octylkette in 2-Position des Pyrrols die stärkste Inhibierung zu verursachen, was sich vor allem auch unter Einbeziehung der Ergebnisse aus Abbildung 57 ableiten lässt. Eine genauere Aussage ließe sich bei Bestimmung des Extinktionskoeffizienten von Prodiginin 9e und anschließender Berechnung der spezifischen Aktivitäten analog zu den Daten in Abbildung 58 treffen. Die bereits für die Kinetiken mit 2,3-dialkylierten Pyrrolen diskutierten strukturellen und mechanistischen Grundlagen lassen sich auf die hier beschriebenen Ergebnisse gut übertragen.

**Tabelle 9.** Übersicht über die kinetischen Daten der untersuchten Enzyme. Die Daten entstammen den Untersuchungen mit den 2-alkylierten Pyrrolen **27a** und **27d**. [n. b. = nicht bestimmt; es wurde resuspendierte Membranfraktion verwendet; Bedingungen: 0.1 mM MBC (**2**), 1.25 mM ATP, 0–2 mM Pyrrole **27a** oder **27d**, KP<sub>i</sub>-Puffer (50 mM, pH 7.0, 0.1 mM MgCl<sub>2</sub>), 10% (v/v) DMSO, 30 °C].

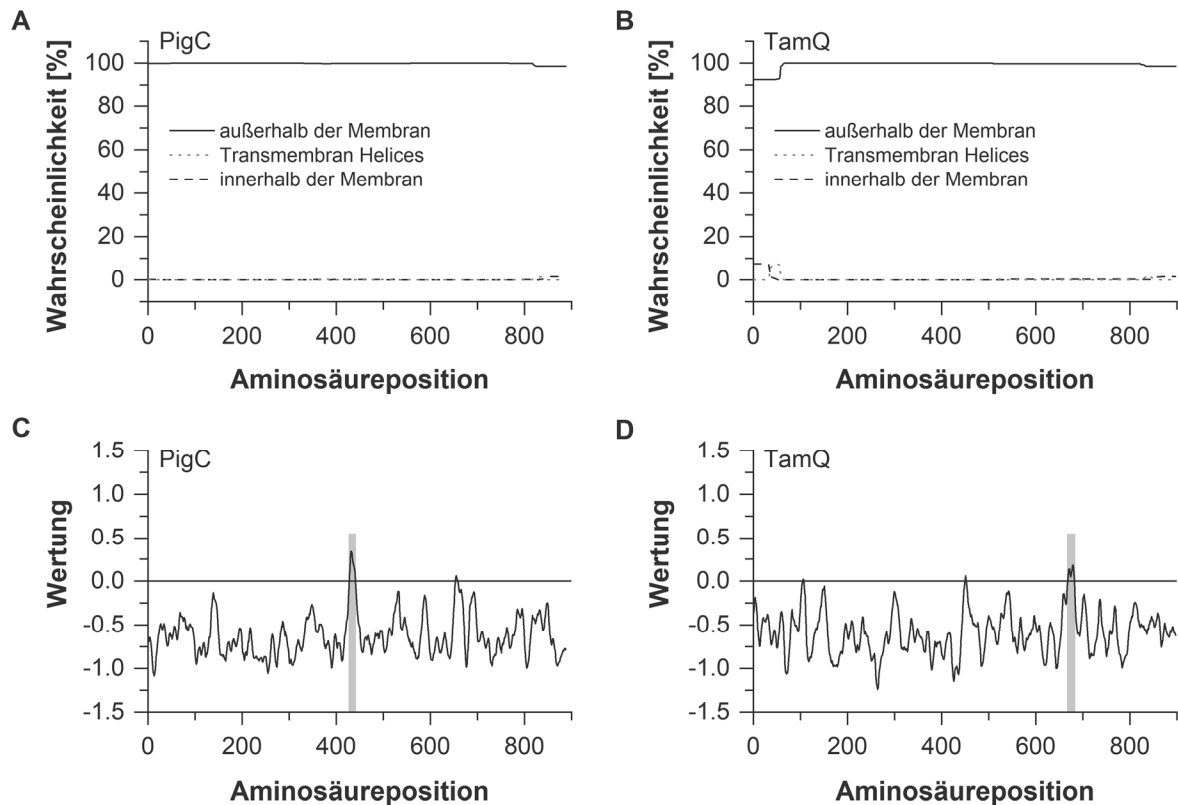
|                                                                                                  |                                                            | PigC                                                   | TamQ                                                   | TreaP                                                  |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|
| <br><b>27d</b>  | $v_{\max}$ [U/mg]                                          | $5.0 \cdot 10^{-6} \pm 2.1 \cdot 10^{-6}$              | $4.9 \cdot 10^{-5} \pm 4.7 \cdot 10^{-6}$              | $1.2 \cdot 10^{-5} \pm 1.0 \cdot 10^{-6}$              |
|                                                                                                  | $K_M$ [ $\mu$ M]                                           | $28 \pm 23$                                            | $60 \pm 17$                                            | $72 \pm 14$                                            |
|                                                                                                  | $K_I$ [ $\mu$ M]                                           | $1.9 \cdot 10^2 \pm 1.4 \cdot 10^2$                    | $2.4 \cdot 10^4 \pm 4.4 \cdot 10^4$                    | $1.2 \cdot 10^3 \pm 0.25 \cdot 10^3$                   |
|                                                                                                  | $k_{\text{cat}}$ [s <sup>-1</sup> ]                        | $8.3 \cdot 10^{-6}$                                    | $8.3 \cdot 10^{-5}$                                    | $2.0 \cdot 10^{-5}$                                    |
|                                                                                                  | $k_{\text{cat}}/K_M$ [Lmol <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ] | 0.30                                                   | 1.4                                                    | 0.28                                                   |
|                                                                                                  | R <sup>2</sup>                                             | 0.59                                                   | 0.89                                                   | 0.94                                                   |
|                                                                                                  | Fit-Methode                                                | Michaelis-Menten<br>Substratüber-<br>schussinhibierung | Michaelis-Menten<br>Substratüber-<br>schussinhibierung | Michaelis-Menten<br>Substratüber-<br>schussinhibierung |
| <br><b>27a</b> | $v_{\max}$ [U/mg]                                          | n. b.                                                  | $4.2 \cdot 10^{-5} \pm 4.1 \cdot 10^{-6}$              | $8.1 \cdot 10^{-6} \pm 6.4 \cdot 10^{-7}$              |
|                                                                                                  | $K_M$ [ $\mu$ M]                                           | n. b.                                                  | $42 \pm 12$                                            | $43 \pm 10$                                            |
|                                                                                                  | $K_I$ [ $\mu$ M]                                           | n. b.                                                  | $4.7 \cdot 10^3 \pm 2.4 \cdot 10^3$                    | $4.4 \cdot 10^3 \pm 1.7 \cdot 10^3$                    |
|                                                                                                  | $k_{\text{cat}}$ [s <sup>-1</sup> ]                        | n. b.                                                  | $7.1 \cdot 10^{-5}$                                    | $1.4 \cdot 10^{-5}$                                    |
|                                                                                                  | $k_{\text{cat}}/K_M$ [Lmol <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ] | n. b.                                                  | 1.7                                                    | 0.31                                                   |
|                                                                                                  | R <sup>2</sup>                                             | n. b.                                                  | 0.85                                                   | 0.90                                                   |
|                                                                                                  | Fit-Methode                                                | n. b.                                                  | Michaelis-Menten<br>Substratüber-<br>schussinhibierung | Michaelis-Menten<br>Substratüber-<br>schussinhibierung |

Im Falle von PigC war zudem auffällig, dass die nicht-lineare Regression mit der zuvor verwendeten Formel für Substratüberschussinhibierung (Kapitel 8.5.7, Formel 3) ein recht schlechtes Bestimmtheitsmaß aufwies, sodass mutmaßlich, wie bereits zuvor diskutiert (Kapitel 6.2.4.1), noch andere Inhibierungsmodelle zum Tragen kommen. Hier würde die Anwendung anderer Kinetikmodelle möglicherweise eine den experimentell erhobenen Daten eher entsprechende nicht-lineare Regression ermöglichen.

### 6.2.5 Interaktionen der Kondensationsenzyme PigC und TamQ mit der Zellmembran

Für das Kondensationsenzym PigC (99 kDa) ist bereits bekannt, dass es sich um ein membranständiges Enzym handelt. Kobayashi und Ichikawa veröffentlichten 1989, dass in die Prodigiosin (**1a**) Produktion in *S. marcescens* ein etwa 100 kDa großes Protein involviert sei, welches in der inneren Membran lokalisiert ist.<sup>[290]</sup> In späteren Arbeiten wurde von Chawrai et al. ebenfalls die Membranfraktion von heterolog in *E. coli* exprimiertem PigC für kinetische Untersuchungen verwendet und You et al. postulierten auf Basis von *in silico* Vorhersagen, dass PigC eine Transmembranstruktur habe.<sup>[20, 193]</sup>

In vorangegangenen Arbeiten wurden *in silico* Vorhersagen mit dem *Online*-Programm *Transmembrane Hidden Markov Model (TMHMM-2.0)*<sup>25</sup>, welches von *Krogh et al.* beschrieben wurde, für das Kondensationsenzym PigC durchgeführt, das im Gegensatz zu den Daten von *You et al.* keine Transmembran Domäne prognostizieren konnte, allerdings konnte mit dem *Online*-Programm *Amphipaseek*<sup>26</sup> von *Sapay et al.* eine amphipathische  $\alpha$ -Helix in der mittleren Domäne des Enzyms vorhergesagt werden (Abbildung 59 A, C).<sup>[17, 193, 297, 298]</sup> Diese  $\alpha$ -Helix ist typisch für Membrananker, die parallel zur Membranebene verlaufen (*IPM anchor*, engl. *in-plane membrane anchor*).<sup>[297]</sup>



**Abbildung 59.** *In silico* Vorhersage für Transmembrandomänen und IPM-Anker unter Nutzung des *Online*-Programms *TMHMM-2.0* von *Krogh et al.* bzw. des *Online* Programms *Amphipaseek* von *Sapay et al.*<sup>[297, 298]</sup> **A:** Vorhersage von Transmembrandomänen mittels *TMHMM-2.0* für PigC. **B:** Vorhersage von Transmembrandomänen mittels *TMHMM-2.0* für TamQ. **C:** Vorhersage von IPM-Ankern mittels *Amphipaseek* für PigC. **D:** Vorhersage von IPM-Ankern mittels *Amphipaseek* für TamQ. [C, D: Positive Werte sagen eine amphipathische  $\alpha$ -Helix vorher; grau hinterlegte Bereiche]

Im Gegensatz zu PigC lassen sich in der Literatur keine Hinweise darauf finden, ob es sich bei TamQ ebenfalls um ein membranständiges Protein handelt. Die in vorangegangenen Arbeiten für PigC bereits ausgeführten *in silico* Analysen wurden daher im Rahmen dieser Arbeit für PigC erneut, und für das Kondensationsenzym TamQ erstmalig ausgeführt, um Vorhersagen über eine potentielle Membranständigkeit treffen zu können (Abbildung 59 B, D).<sup>[17]</sup> Ebenso wie bereits für PigC konnte mittels *TMHMM-2.0* keine Transmembrandomäne vorhergesagt werden. Allerdings prognostizierte

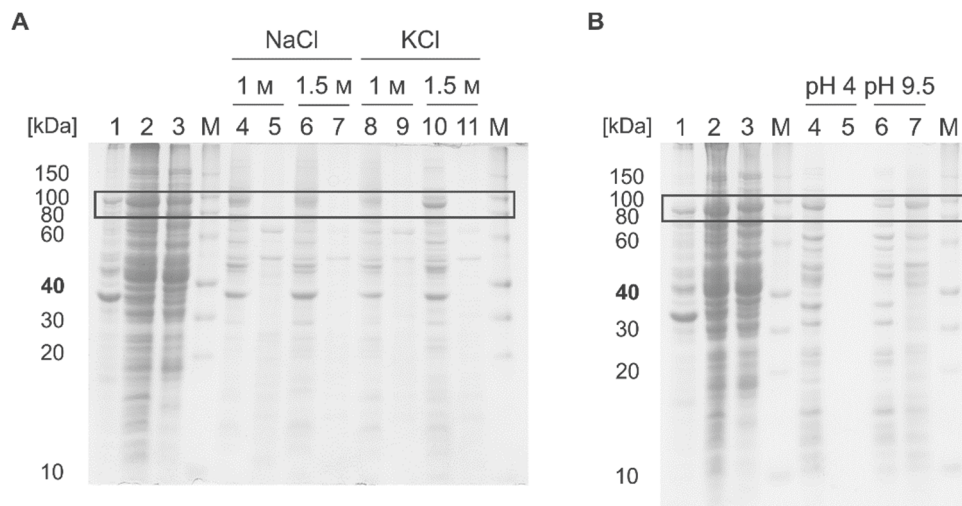
<sup>25</sup> November 2019: <https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?TMHMM-2.0>

<sup>26</sup> November 2019: [https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=/NPSA/npsa\\_amphipaseek.html](https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_amphipaseek.html)

das *Online-Programm AmphipaSeek* für TamQ so wie für PigC eine amphipathische  $\alpha$ -Helix, welche auf einen *IPM* Anker hinweist.<sup>[297]</sup>

Das Vorliegen eines integralen Membranproteins mit Transmembrandomänen im Falle von PigC und TamQ scheint somit durch die *in silico* Vorhersagen nahezu ausgeschlossen. Wie von *Chawrai et al.* und Dr. *Andreas S. Klein* bereits gezeigt, lässt sich das Protein PigC jedoch in der Membranfraktion nach Zellaufschluss und Ultrazentrifugation nachweisen, was somit vermuten lässt, dass es sich bei PigC um ein peripheres, membranständiges Protein handelt.<sup>[17, 20]</sup> Periphere Membranproteine sind im Gegensatz zu integralen Membranproteinen nicht fest in der Membran verankert oder durchspannen diese, sondern sind über nicht kovalente Bindungen wie ionische Wechselwirkungen an die Membranoberfläche oder an andere integrale Membranproteine assoziiert und lassen sich durch relativ milde Methoden ablösen. Diese Methoden basieren darauf, dass die Wechselwirkungen zwischen Membran und Protein unterbrochen werden.<sup>[299-301]</sup>

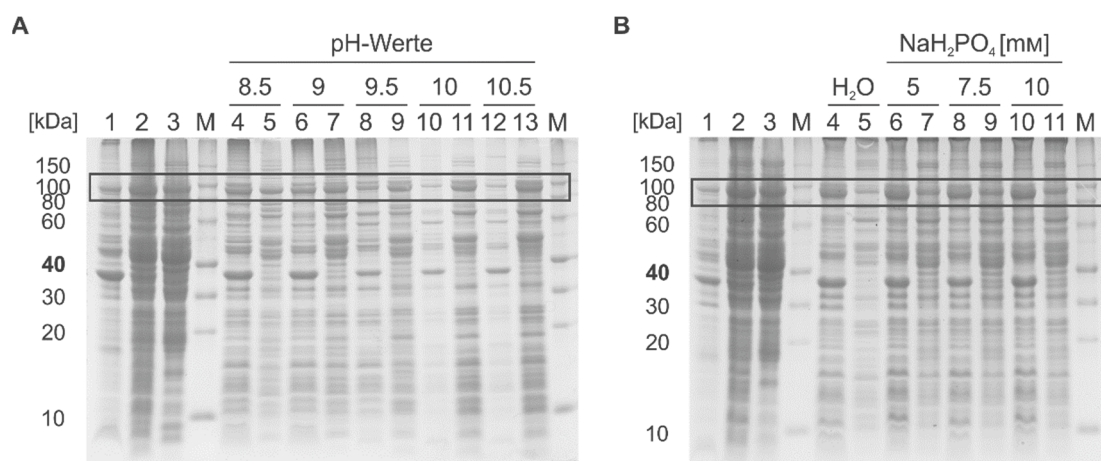
Zur Überprüfung, ob es sich bei PigC und TamQ tatsächlich um periphere Membranproteine handelt und diese zudem potentiell zu isolieren, wurde die Membranfraktion der PigC bzw. TamQ produzierenden *E. coli* BL21(DE3) Zellen isoliert (Kapitel 8.5.3) und diese nach der Ultrazentrifugation (UZ) in verschiedenen Puffern bzw. Salzlösungen resuspendiert (Kapitel 8.5.4.1). Nach erneuter Ultrazentrifugation wurden Proben von Überstand und Zellmembran enthaltendem Pellet genommen und diese *via* SDS-PAGE analysiert. Periphere, membranständige Proteine können u. a. durch saure oder basische Puffer oder auch Lösungen hoher Ionenstärke von der Membran extrahiert werden ohne die Membran selbst zu solubilisieren.<sup>[300-304]</sup> Für initiale Experimente zur Extraktion der Proteine PigC und TamQ aus der Zellmembran wurden daher ein Natriumcarbonatpuffer (100 mM, pH 9.5) und ein Citratpuffer (100 mM, pH 4) ausgewählt sowie Lösungen hoher Ionenstärke (NaCl- und KCl-Lösungen jeweils 1 M und 1.5 M). Die Ergebnisse der Extraktion von TamQ sind in Abbildung 60 dargestellt (PigC: Kapitel 9.3, Abbildung A 4).



**Abbildung 60.** SDS-PAGE Analyse zur Extraktion von TamQ (101 kDa) aus der Membranfraktion. **A:** Extraktion mit Lösungen hoher Ionenstärke. [M = Marker (Roti®-Mark 10–150), 1 = Pellet; 2 = CFE; 3 = Überstand, UZ; 4, 6, 8, 10 = Pellet nach Extraktion mit NaCl-/KCl-Lösung und UZ; 5, 7, 9, 11 = Überstand nach Extraktion mit NaCl-/KCl-Lösung und UZ]. **B:** Extraktion mit alkalischem und saurem Puffer. [M = Marker (Roti®-Mark 10–150), 1 = Pellet; 2 = CFE; 3 = Überstand nach UZ, 4, 6 = Pellet nach Extraktion mit Puffer und UZ; 5, 7 = Überstand nach Extraktion mit Puffer und UZ].

Gut erkennbar ist, dass keine der Lösungen mit hoher Ionenstärke TamQ aus der Membranfraktion extrahieren konnte (Abbildung 60A). So kann keine Bande für TamQ nach Extraktion der Membranfraktion und anschließender Ultrazentrifugation im Überstand nachgewiesen werden, während im zugehörigen Pellet weiter eine deutliche Bande sichtbar ist. Auch der Citratpuffer führte nicht zur gewünschten Extraktion des Proteins TamQ, wohingegen durch Einsatz des Natriumcarbonatpuffers TamQ deutlich erkennbar von der Membranfraktion gelöst werden konnte (Abbildung 60A, Spalte 7). Die Ergebnisse für das Protein PigC sind in allen Fällen analog zu denen für TamQ (PigC: Kapitel 9.3, Abbildung A 4). Als Kontrollexperiment wurde das Membran enthaltende Pellet auch mit 50 mM  $\text{KPi}$ -Puffer pH 7 extrahiert, um sicherzustellen, dass tatsächlich der veränderte pH-Wert bzw. die Ionenstärke für das Ablösen der entsprechenden Kondensationsenzyme verantwortlich ist, was letztlich auch nachgewiesen werden konnte (Kapitel 9.3, Abbildung A 5).

Da das Protein TamQ mit einem Puffer mit pH 9.5 erfolgreich von der Membran gelöst werden konnte, wurden in einer weiteren Versuchsreihe Puffer mit den pH-Werten 8.5–10.5 getestet, um die initialen Ergebnisse zu verifizieren und potentiell bessere Bedingungen für die Membranextraktion zu identifizieren. Zudem wurden verschiedene  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -Lösungen und dest.  $\text{H}_2\text{O}$  getestet. Das Waschen der Zellmembran mit diesen Lösungen wird häufig angewendet, um periphere Membranproteine vor der Isolierung von integralen Membranproteinen von der Membran abzustreifen.<sup>[305]</sup> Sowohl TamQ (Abbildung 61A) als auch PigC (Kapitel 9.3, Abbildung A 6A) konnten mit allen getesteten Puffern von der Membran abgelöst werden, wobei ab einem pH-Wert von 9.5 kaum noch Zielprotein im Membranfraktion enthaltenden Pellet nachgewiesen werden konnte. Im Gegensatz dazu konnte durch dest.  $\text{H}_2\text{O}$  und die  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -Lösungen nur eine sehr schwache Ablösung des Proteins TamQ (Abbildung 61B) von der Membran erzielt werden. Auch hier waren die Ergebnisse für PigC und TamQ einander entsprechend (PigC: Kapitel 9.3, Abbildung A 6B).

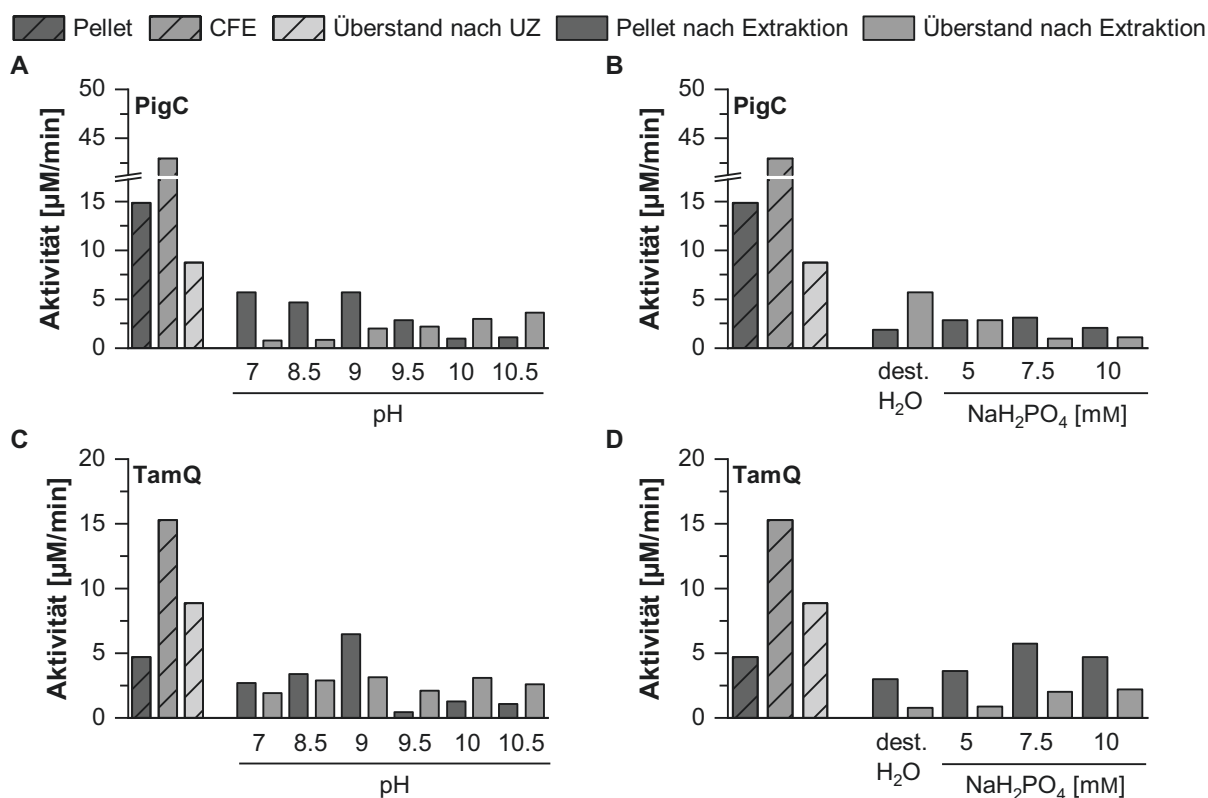


**Abbildung 61.** SDS-PAGE Analyse zur Extraktion von TamQ (101 kDa) aus der Membranfraktion. **A:** Extraktion mit Puffern verschiedener pH-Werte (pH 8.5 und pH 9: 100 mM TRIS-HCl; pH 9.5, 10 und 10.5: 100 mM NaHCO<sub>3</sub>/Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>). [M = Marker (Roti®-Mark 10–150), 1 = Pellet; 2 = CFE; 3 = Überstand, UZ; 4, 6, 8, 10, 12 = Pellet nach Extraktion mit Puffer und UZ; 5, 7, 9, 11, 13 = Überstand nach Extraktion mit Puffer und UZ]. **B:** Extraktion mit dest. H<sub>2</sub>O, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Lösung. [M = Marker (Roti®-Mark 10–150), 1 = Pellet; 2 = CFE; 3 = Überstand, UZ; 4, 6, 8, 10 = Pellet nach Extraktion und UZ; 5, 7, 9, 11 = Überstand nach Extraktion und UZ].

Da eine erfolgreiche Ablösung der Kondensationsenzyme von der Membran ein möglicher erster Schritt für die Isolierung der Zielproteine sein kann, wurden Aktivitätsassays in Anlehnung an die Assaybedingungen der *Michaelis-Menten*-Kinetik (Kapitel 8.5.7) mit allen Fraktionen durchgeführt (Abbildung 62). So sollte festgestellt werden, ob das von der Membran gelöste Protein tatsächlich das Zielprotein ist und es in aktiver Form vorliegt.

In allen Fällen ist gut erkennbar, dass die Ergebnisse der SDS-PAGE Analysen (Abbildung 61) mit den der Aktivitätsassays übereinstimmen. So zeigen die Enzymaktivitäten gut, dass nach Extraktion der Enzyme mit Puffern von pH  $\geq 9.5$  die höhere Aktivität im Überstand nachgewiesen (Abbildung 62 A, C) werden kann. Die Ablösung von PigC und TamQ von der Membran durch Nutzung von dest. H<sub>2</sub>O und NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> war auf Grundlage der SDS-PAGE Ergebnisse als nicht erfolgreich bewertet worden, was sich mit den Ergebnissen der Aktivitätsassays deckt, da die höhere Enzymaktivität weiterhin in der Membranfraktion zu detektieren ist (Abbildung 62 B, D). Eine Ausnahme ist für PigC gegeben, da hier die Ablösung mit dest. H<sub>2</sub>O doch zu höherer Aktivität im Überstand führte, was nach Analyse *via* SDS-PAGE nicht erwartet worden war (Abbildung 62 B und Kapitel 9.3, Abbildung A 6). Insgesamt wird jedoch deutlich, dass die Enzymaktivität in den Proben nach Extraktion aus der Zellmembran vergleichsweise gering ist und eine potentielle Reinigung der Proteine *via* Ablösen von der Zellmembran nicht zu favorisieren ist. Zu berücksichtigen ist jedoch, dass keine spezifische Aktivität in diesen Assays bestimmt wurde und auch der Einfluss des pH-Wertes nicht evaluiert worden ist.



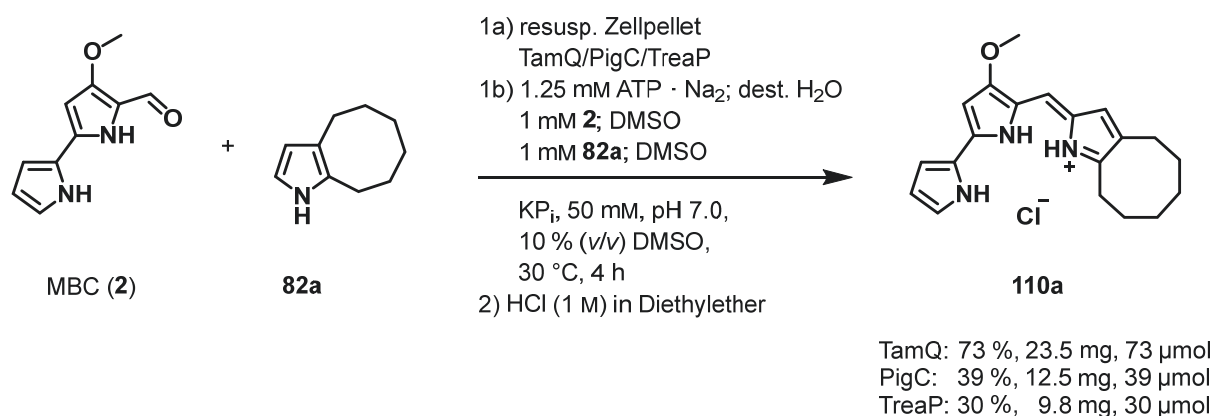


**Abbildung 62.** Enzymaktivität verschiedener Fraktionen nach Extraktion von PigC und TamQ von der Zellmembran. **A, C:** Extraktion von PigC und TamQ mittels Puffer verschiedener pH-Werte (pH 7: 50 mM KP<sub>i</sub>-Puffer; pH 8.5 und pH 9: 100 mM TRIS-HCl-Puffer; pH 9.5, 10 und 10.5: 100 mM NaHCO<sub>3</sub>/Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Puffer). **B, D:** Extraktion von PigC und TamQ von der Zellmembran mit NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Lösungen und dest. H<sub>2</sub>O. [Assaybedingungen: 1 mM MBC (**2**), 1 mM MAP (**3a**), 1.25 mM ATP, 10% (v/v) DMSO, 30 °C, 200 µL Assayvolumen]

Die Gesamtheit der in diesem Unterkapitel vorgestellten Ergebnisse und Literaturreferenzen legen nahe, dass es sich sowohl bei TamQ als auch bei PigC nicht um integrale sondern periphere Membranproteine handelt, wie es bereits die *in silico* Vorhersagen (Abbildung 59) andeuten. Da sich beide Zielproteine durch Puffer mit pH  $\geq 9.5$  gut von der Membran lösen lassen, ist anzunehmen, dass die an der Oberfläche des Proteins gelegenen Aminosäuren in deprotonierter Form vorliegen und sich daher von der negativ geladenen Membran abstoßen. Lösungen mit niedriger Ionenstärke wie 5–10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> können Ionen wie Na<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>, K<sup>+</sup>-Ionen entfernen, welche die Ladungen von Proteinen und Membran abschirmen.<sup>[305]</sup> Bei Entfernung dieser Ionen kann es ebenfalls zur Abstoßungen zwischen Zellmembran und Proteinen kommen. Integrale Membranproteine hingegen sollten weder durch Lösungen niedriger Ionenstärke noch Puffer mit pH  $\geq 9.5$  von der Zellmembran zu lösen sein, sodass auf Grundlage dieser Ergebnisse festgehalten werden kann, dass weder TamQ noch PigC integrale Membranproteine zu sein scheinen. Dies würde die von *You et al.* prognostizierte Transmembranstruktur von PigC negieren.<sup>[193]</sup> Die *in silico* Vorhersagen im Rahmen dieser Arbeit, basierend auf den Ergebnissen von Dr. *Andreas S. Klein* zu PigC (Abbildung 59), prognostizieren allerdings für beide Proteine eine amphipathische  $\alpha$ -Helix, dennoch kann auf Basis der *in silico* und der experimentellen Ergebnisse nicht entschieden werden, ob die Prognosen mit der Realität übereinstimmen und tatsächlich IPM-Anker vorhanden sind.

### 6.2.6 Biokatalyse zur Synthese von Prodigininen

Die Erweiterung des Substratspektrums durch Nutzung neuer Kondensationsenzyme und auch die Quantifizierung dieser Ansätze wurde bisher in kleinen Volumina von 500  $\mu\text{L}$  durchgeführt (Kapitel 6.2.3). Die Herstellung von Prodigininen mit biologischen Methoden wurde, abgesehen von heterologer Produktion unter Nutzung des Stammes *P. putida* pig-r2, im Arbeitskreis bisher nur im Kontext der Mutasynthese im semi-präparativen Maßstab gezeigt.<sup>[17, 197, 247]</sup> Eine Nutzung der Kondensationsenzyme in einem Biokatalyseansatz könnte daher neue Perspektiven für die Synthese von Prodigininen bieten, sodass die enzymatische Produktion von Prodigininen exemplarisch in einen größeren Maßstab übertragen wurde (Kapitel 8.6.1). Hierzu wurde gefrorenes Zellpellet von *E. coli* BL21(DE3), in denen PigC, TamQ bzw. TreaP heterolog produziert wurden, in Puffer gelöst und ATP sowie die entsprechenden Substrate zugegeben. Da die drei untersuchten Kondensationsenzyme PigC, TamQ und TreaP eine gute Umsetzung der zyklischen Pyrrole **82a**, **82b** und **82b** zeigten (Kapitel 6.2.3.2, Abbildung 41), wurde das Pyrrol **82a** schließlich als Modells substrat für die semi-präparativen Biokatalyseansätze ausgewählt (Schema 32).



**Schema 32.** Reaktionsschema der Biokatalyse zur Synthese von Prodiginin **110a** mit Angaben zur Produktausbeute.

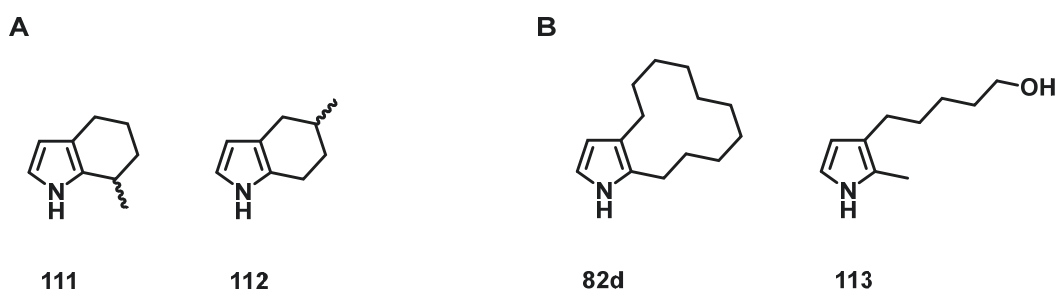
Da die *in situ* Produktentfernungsstrategie mit PU-Würfeln bereits erfolgreich angewendet wurde und diverse Erleichterungen bei der Produktisolierung und späteren Reinigung erbrachte, wurde diese Methode mit dem Biokatalyseansatz kombiniert und die Produktisolierung und Reinigung analog durchgeführt.<sup>[17, 205]</sup> Unter Einsatz von TamQ konnten auf diese Weise 73 % Prodiginin **110a** (23.5 mg, 73  $\mu\text{mol}$ ; Abbildung A 38) erhalten werden. Wie von den vorangegangenen Quantifizierungsexperimenten der *in vitro* Ansätze erwartet (Kapitel 6.2.3.2, Abbildung 41), lagen die Ausbeuten für PigC und TreaP bei niedrigeren Werten als für TamQ (PigC: 12.5 mg, 39  $\mu\text{mol}$ , 39%; TreaP: 9.8 mg, 30  $\mu\text{mol}$ , 30%). Die insgesamt jedoch höheren Ausbeuten im Vergleich zu den Versuchen im kleinen Maßstab können durch die längere Reaktionszeit erklärt werden, ebenso wie durch die bessere Vermischung des Reaktionsansatzes in Erlenmeyerkolben verglichen mit 1.5 mL Reaktionsgefäßen. Darüberhinaus wird die *in situ* Produktentfernung, wie bereits für die Prodigiosin (**1a**) Produktion mithilfe des Stammes *P. putida* r-2 gezeigt, einen positiven Einfluss auf die



Ausbeute haben, da das Reaktionsgleichgewicht in Richtung der Produktbildung verschoben wird und auch weniger Verunreinigungen im Rohprodukt vorhanden sind.<sup>[17, 205]</sup>

Kritisch zu betrachten ist jedoch der Einsatz von MBC (**2**) und auch ATP in den Biokatalyseansätzen, welche einen deutlichen Kostenfaktor durch arbeits- und kostenintensive Synthesen darstellen bzw. im Falle von ATP zwar kommerziell zu erwerben sind, bei größeren Ansätzen jedoch auch einen Kostenaufwand bedeuten. Der ATP-Verbrauch durch die Kondensationsenzyme könnte allerdings zum einen reduziert werden, da sich in den durch Einfrieren permeabilisierten Zellpellets bereits ATP befindet, welches als Cofaktor für die Reaktion benötigt wird, zum anderen kann durch den Einsatz eines Cofaktorregenerationssystems ATP wiedergewonnen werden. Denkbar wären hier u.a. ein Acetylphosphat/Acetat-Kinase-System oder ein Phosphoenolpyruvat/Pyruvat-Kinase basiertes System, welche beide Adenosindiphosphat (ADP) zu ATP regenerieren.<sup>[306-309]</sup>

Die Kosten für MBC (**2**) und ATP wären allerdings dann zu rechtfertigen, wenn das durch Biokatalyse hergestellte Prodiginin diesen Kostenaufwand begründen würde. So konnte in der Masterarbeit von M. Sc. *David P. Klebl* bereits nachgewiesen werden, dass im Rahmen semi-präparativer Mutasyntheseansätze mit den Pyrrolen *rac*-**111** und *rac*-**112** (Abbildung 63 A) jeweils ein Enantiomer des entsprechenden Prodiginins im Überschuss vorlag, was auf eine stereoselektive Umsetzung durch das Kondensationsenzym PigC hindeutet.<sup>[248]</sup> Auch die weiterführenden Untersuchungen durch M. Sc. *T. Moritz Weber* konnten dies belegen.<sup>[310]</sup> Ein Einsatz des Biokatalyseansatzes bei Pyrrolen wie *rac*-**111** und *rac*-**112** wäre daher denkbar. Insbesondere dann, wenn für TamQ oder TreaP eine zu PigC komplementäre Enantioselectivität gegeben wäre, würde sich eine Biokatalyse anbieten, da für die Enzyme TamQ und TreaP noch kein entsprechender Mutasynthesestamm vorliegt. So könnte insgesamt unter Nutzung der Biokatalyse eine Produktion von synthetisch nur aufwändig zu erhaltenden Prodigininen gegeben sein.



**Abbildung 63.** Verschiedene Pyrrolderivate, die als Substrate für die Biokatalyse dienen könnten. **A:** *rac*-Pyrrole **111** und **112**, Substrate für eine potentielle Kondensationsenzym katalysierte kinetische Racematspaltung. **B:** Zyklisches Pyrrol **82d** und terminal hydroxyliertes Pyrrol **113**, welche in Mutasyntheseansätzen nur schlecht/nicht umgesetzt werden.

Eine denkbare Anwendung der Biokatalyse wäre zudem bei Pyrrolsubstraten gegeben, die zwar vom Kondensationsenzym als Substrat akzeptiert und umgesetzt werden können, jedoch nicht in Mutasyntheseansätzen einsetzbar sind, da kein Transport über die Zellmembran stattfindet. M. Sc. *David P. Klebl* konnte im Rahmen seiner Masterarbeit im Falle von zwei Pyrrolen (**82d**, **113**)

zeigen, dass eine Umsetzung der Pyrrolsubstrate durch PigC gegeben ist, der Einsatz in der Mutasyntese jedoch ungeeignet, da offensichtlich kein oder ein nicht ausreichender Import des Mutasynthons in die Zelle stattfand (Abbildung 63 B). Dennoch bleibt für die Pyrrole **82d** und **113** abzuwägen, ob eine chemische Synthese der Prodiginine nicht ebenso zielführend und kostengünstiger ist als der Biokatalyseansatz.

### 6.2.7 Synopsis des Kapitels

- Analysen der Gencluster verschiedener Prodiginin- und Tambjamine-Produzenten wurden durchgeführt, auf deren Grundlage fünf zu PigC homologe Kondensationsenzyme für die heterologe Expression ausgewählt wurden.
- Die Kondensationsenzyme aus *Streptomyetaceae* RedH und McpH konnten nicht aktiv heterolog in *E. coli* produziert werden. MarH zeigte geringe Aktivität.
- Die Kondensationsenzyme aus *Pseudalteromonadaceae*, TamQ und TreaP, konnten erfolgreich heterolog produziert werden und *via in vitro* Assays die Aktivität nachgewiesen werden.
- Es konnte erstmalig nachgewiesen werden, dass die Kondensationsenzyme TamQ und TreaP unnatürliche Substrate in Form des Monopyrrols MAP (**3a**) umsetzen und so in der Lage sind statt Tambjamine auch Prodigiosin (**1a**) und andere Prodiginine zu produzieren.
- Die Substratspektren der Kondensationsenzyme TamQ und TreaP konnten erstmalig untersucht werden und zeigten zu PigC verschiedene Substratspektren. Dies ermöglichte den Umsatz von Monopyrrolen, die von der Ligase PigC nicht umgesetzt werden können.
- 1H-Pyrrol (**4**) und andere fünfgliedrige Heteroaromaten und Indole **102** wurden von den Kondensationsenzymen nicht als Substrat angenommen. Indolprodigiosin (**103a**) konnte chemisch hergestellt werden, wies jedoch sehr schlechte Lagerstabilität auf.
- Der Zugang zu Undecylprodigiosin (**9a**) und Derivaten konnte durch die Enzyme TamQ und TreaP ermöglicht werden.
- Es konnten erfolgreich kinetische Untersuchungen der Kondensationsenzyme PigC, TamQ und TreaP durchgeführt werden. Die Kondensationsenzyme TreaP und insbesondere TamQ zeigten weniger stark ausgeprägte Substratüberschussinhibierung als PigC.
- Die Proteine TamQ und PigC konnten von der Zellembraun gelöst werden, was den Rückschluss auf das Vorliegen peripherer Membranproteine zulässt.
- Es wurde erfolgreich ein Biokatalyseansatz zur Synthese von Prodigininen entwickelt, der die biologische Produktion von u. a. mutasyntetisch nicht zugänglichen Prodigininen ermöglichen könnte.

### 6.3 Biosynthetische Produktion von Prodigiosin (1a)

Die Konstruktion des heterologen Prodigiosin (1a) Produzenten *P. putida* pig-r2 in vorangegangenen Arbeiten in Kombination mit einer effizienten *in situ* Produktentfernung mittels PU-Würfeln ermöglichte die Produktion und Isolierung von Prodigiosin (1a).<sup>[17, 205, 212]</sup> Eine Optimierung der Kultivierungsbedingungen erlaubte schließlich die Produktion von Prodigiosin (1a) mit einem Titer von  $94 \pm 1$  mg/L<sub>Kultur</sub>. Zur Bereitstellung des Naturstoffs für biologische Untersuchungen (Kapitel 6.4) ist eine Produktion von 94 mg/L Prodigiosin (1a) genügend, jedoch benötigen weitergehende biologische Testungen in Mehrfachmessungen oder in größeren Versuchsansätzen auch höhere Mengen des reinen Prodigiosins (1a). Daher ist eine biosynthetische Herstellung von Prodigiosin (1a) mit dem Stamm *P. putida* pig-r2 mit gesteigerter Produktionsleistung erstrebenswert und sollte durch Anpassung der Kultivierungsparameter erzielt werden.

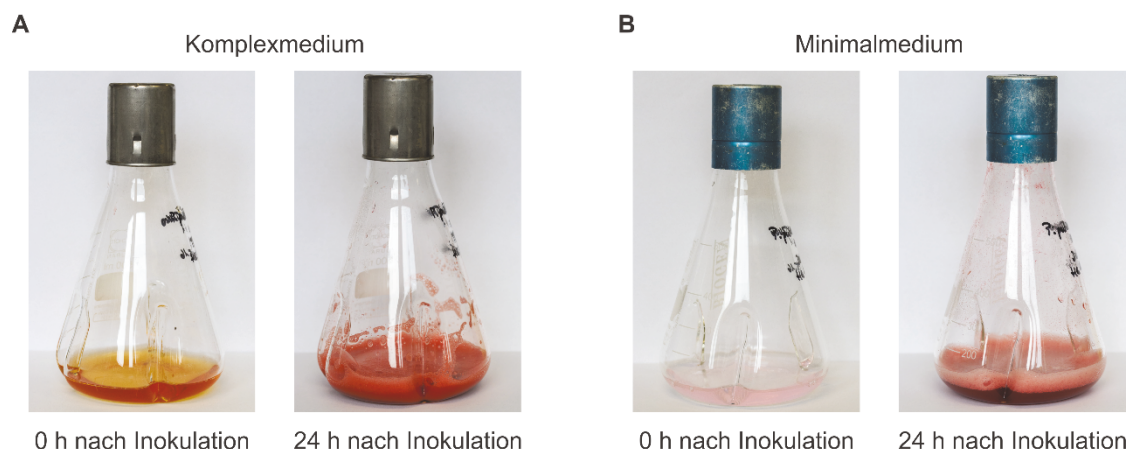
#### 6.3.1 Optimierung der Kultivierungsparameter zur Erhöhung der Prodigiosin (1a) Produktion

Im Zuge der Modifikation der Kultivierungsparameter zur höheren Prodigiosin (1a) Produktion in vorangegangenen Arbeiten wurde die Kultivierungstemperatur variiert und die Füllhöhe in den Erlenmeyerkolben verändert. Ebenso wurden als Kulturgefäße Erlenmeyerkolben mit und ohne Schikanen untersucht. Als positiv erwies sich dabei eine niedrige Temperatur von 20°C während der Kultivierung sowie Erlenmeyerkolben mit Schikanen und einem Füllvolumen von 10%.<sup>[205, 212]</sup> Die Kultivierung von *P. putida* pig-r2 erfolgte bisher jedoch nur mit LB (engl. *lysogeny broth*)- und TB (engl. *terrific broth*)-Medium, wobei TB-Medium zu höheren Prodigiosin (1a) Titern führte.<sup>[17, 205, 212]</sup> Die Komplexmedien LB- und auch TB-Medium weisen allerdings keine definierte Zusammensetzung der Medienbestandteile auf. Die definierte Medienzusammensetzung von Minimalmedien erlaubt zum einen die Variation der Kohlenstoffquelle (C-Quelle) und zum anderen eine höhere Kontrolle der Kultivierung. Daher sollte ein Ansatzpunkt zur Verbesserung der Prodigiosin (1a) Produktion die Variation des Anzuchtmediums und der Einsatz von Minimalmedien sein. Zum anderen sollte die Kultivierungstemperatur weiter untersucht werden, da sich bereits gezeigt hatte, dass dieser Parameter einen signifikanten Einfluss hat.<sup>[205, 212]</sup>

Für den Stamm *P. putida* KT2440, welcher die Basis für den Prodigiosin (1a) Produzenten *P. putida* pig-r2 ist, sind diverse Minimalmedien bekannt, die zur Anzucht verwendet werden können. Im Rahmen dieser Arbeit wurden vier verschiedene Minimalmedien<sup>27</sup> (8.4.1.1.2) untersucht: M9-Medium, Delft-Medium, Wilms-MOPS [3-(*N*-Morpholino)propansulfonsäure]-Medium sowie das Medium M63.<sup>[311-314]</sup> Initial stellte sich die Frage, ob *P. putida* pig-r2 auf den vier ausgewählten Minimalmedien wächst und unter diesen Bedingungen weiterhin Prodigiosin (1a) produziert wird. Dazu wurde der Stamm *P. putida* pig-r2 in Delft Minimalmedium sowie den drei anderen ausgewählten

<sup>27</sup> Die Medienrezepte wurden im Vergleich zu den publizierten Rezepten teilweise leicht abgewandelt. Die Benennung der Minimalmedien wurde trotz Abwandlung der Medienrezepte beibehalten. Die Details zu den Modifikationen können dem Abschnitt 8.4.1.1.2 entnommen werden.

Minimalmedien angezogen (Abbildung 64). Als Kontrolle wurde *P. putida* pig-r2 auch in TB-Medium kultiviert.



**Abbildung 64.** Anzucht von *P. putida* pig-r2 in Komplexmedium und Minimalmedium. **A:** Anzucht in TB-Medium. **B:** Anzucht in Delft-Medium, einem Minimalmedium.

Der Stamm *P. putida* pig-r2 wuchs auf allen vier getesteten Minimalmedien und auch die Produktion von Prodigiosin (**1a**) konnte beobachtet werden, was bereits an der roten Farbe der Kultur nach 24 h gut erkennbar war und durch spätere Isolierung des Naturstoffs aus der Kultur, Reinigung und NMR-Analytik verifiziert wurde.

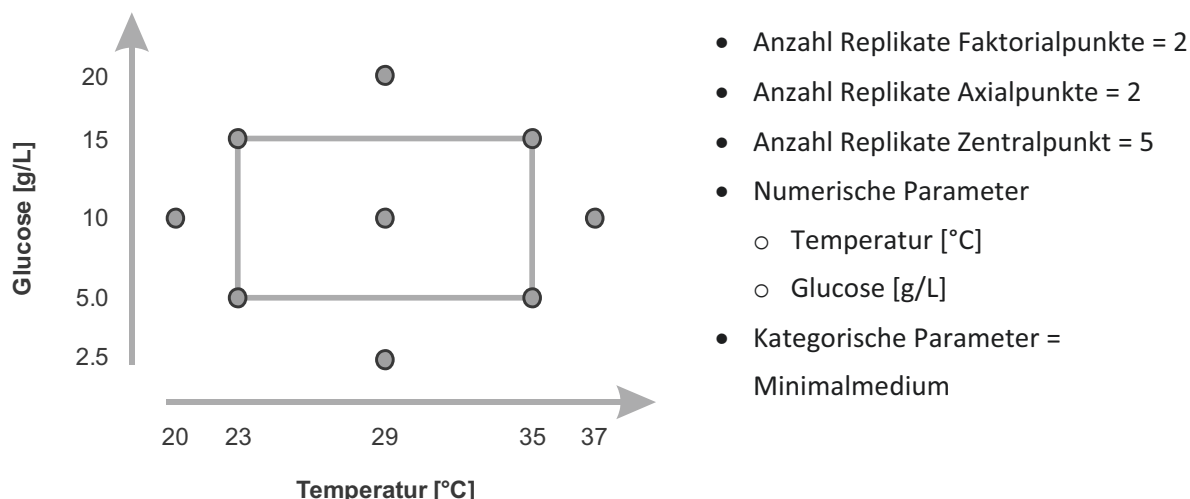
### Versuchsplanung und Aufbau der Experimentreihen

Da die Produktion von Prodigiosin (**1a**) mithilfe des Stammes *P. putida* pig-r2 auch bei Anzucht auf Minimalmedien möglich war, sollte eine weitere Untersuchung und Optimierung der Kultivierungsparameter erfolgen. Um die Versuche systematisch planen und durchführen zu können, wurde das Programm *Design Expert* (StatEase, Inc.) für statistische Versuchsplanung (engl. *Design of Experiments*) verwendet (Kapitel 8.6.4). Dies ermöglicht die Planung der Experimente mit einer möglichst geringen Anzahl an Versuchen. Zudem benötigt die dennoch hohe Anzahl an Versuchen eine Miniaturisierung und Parallelisierung. Daher wurde der *BioLector*® Mikrobioreaktor (*m2p labs* GmbH, Baesweiler, Deutschland) genutzt, der eine parallele Kultivierung unter definierten Bedingungen in einem kleinen Volumen erlaubt. So können bei Nutzung der *FlowerPlates* (MTP-48-B, 48 Well; *m2p labs* GmbH, Baesweiler, Deutschland) 48 Versuche bei definierter Temperatur und Umgebungsbedingung parallel durchgeführt werden. Zusätzlich kann der Verlauf des mikrobiellen Wachstums während der Kultivierung verfolgt werden.

Aufbauend auf den von Dr. *Andreas Domröse* durchgeführten Optimierungen<sup>28</sup> wurde neben dem Medium auch die Kultivierungstemperatur untersucht, da die Senkung der Temperatur von 30 °C auf 20 °C in den vorherigen Untersuchungen eine signifikante Steigerung der Prodigiosin (**1a**) Produktion zur Folge hatte.<sup>[205, 212]</sup> So wurde zunächst der zu testende Temperaturbereich auf 20–37 °C festgelegt.

<sup>28</sup> Die detaillierten Angaben zu den Optimierungsversuchen können der Dissertationsschrift von Dr. *Andreas Domröse* sowie der Publikation von *Domröse et al.* entnommen werden.<sup>[205, 212]</sup>

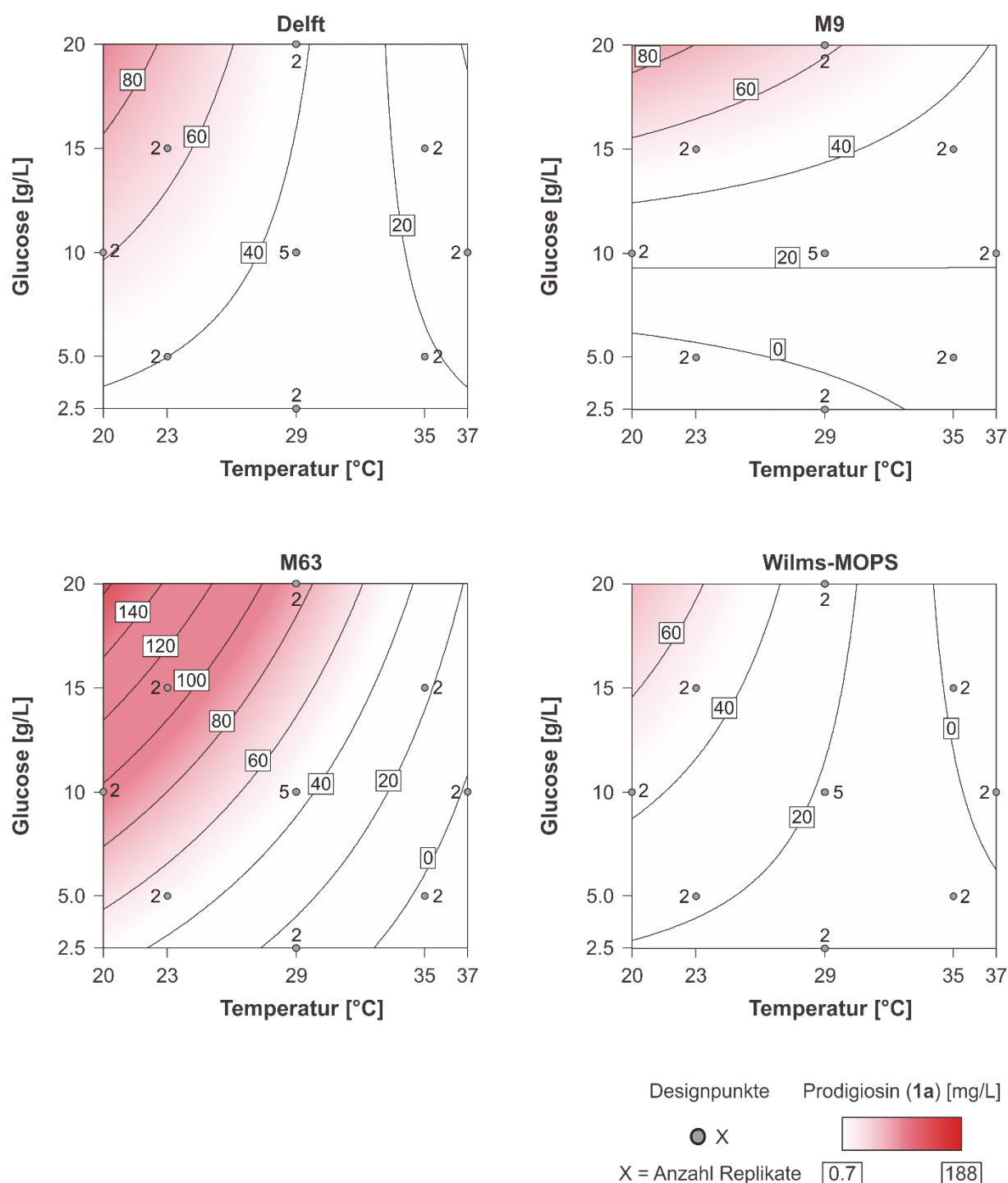
Zudem sollte die Konzentration der C-Quelle im Minimalmedium variiert werden. Als Kohlenstoffquelle wurde Glucose gewählt und Konzentrationen im Bereich von 2.5–20 g/L untersucht. Als Versuchsgrundlage diente ein *Central Composite Design*, welches mit dem Programm *Design Expert* (StatEase, Inc.) erstellt wurde (Abbildung 65).



**Abbildung 65.** Übersicht über den Aufbau des *Central Composite Design*s für die Optimierung des Mediums für erhöhte Prodigiosin (**1a**) Produktion.

### Ergebnisse der Design of Experiment Versuche zur Optimierung der Kultivierungsparameter

Anhand der Vorgaben (Abbildung 65) wurden die jeweiligen Kultivierungsexperimente mit der entsprechenden Anzahl an Replikaten von der Software *Design Expert* (StatEase, Inc.) festgelegt und im *BioLector*® (m2p labs GmbH, Baesweiler, Deutschland) durchgeführt. Bei diesen Versuchen wurde der Verlauf des mikrobiellen Wachstums verfolgt und die Kultivierung am Ende der stationären Phase bzw. am Übergang zur Absterbephase abgebrochen. Von jedem Ansatz wurden 500 µL Probe genommen, die Menge an Prodigiosin (**1a**) nach Extraktion photometrisch quantifiziert (Kapitel 8.6.7) und die theoretische Menge an Prodigiosin (**1a**) in einem Kulturvolumen von 1 L errechnet. Diese Ergebnisse wurden in die Software *Design Expert* (StatEase, Inc.) übertragen, durch diese statistisch ausgewertet und als Ergebnis *Response Surface* Graphen erhalten. Auf Grundlage der experimentellen Daten (Rohdaten: Tabelle A 6) wurde durch die Software eine Oberfläche errechnet, die zwischen den Achsen Temperatur (x-Achse), Glucosemenge (y-Achse) und Prodigiosin (**1a**) Menge (z-Achse) aufgespannt wird. Das dreidimensionale System wurde in zweidimensionaler Darstellung wiedergegeben, wobei die dritte Dimension [Prodigiosin (**1a**) in mg/L<sub>Kultur</sub>] mittels Farbgradient und Konturlinien abgebildet wurde (Abbildung 66). Die in den Graphen dargestellte Menge an Prodigiosin (**1a**) entspricht daher den berechneten Werten und ist nicht zwingend identisch mit den tatsächlich gemessenen Werten an den Design Punkten.



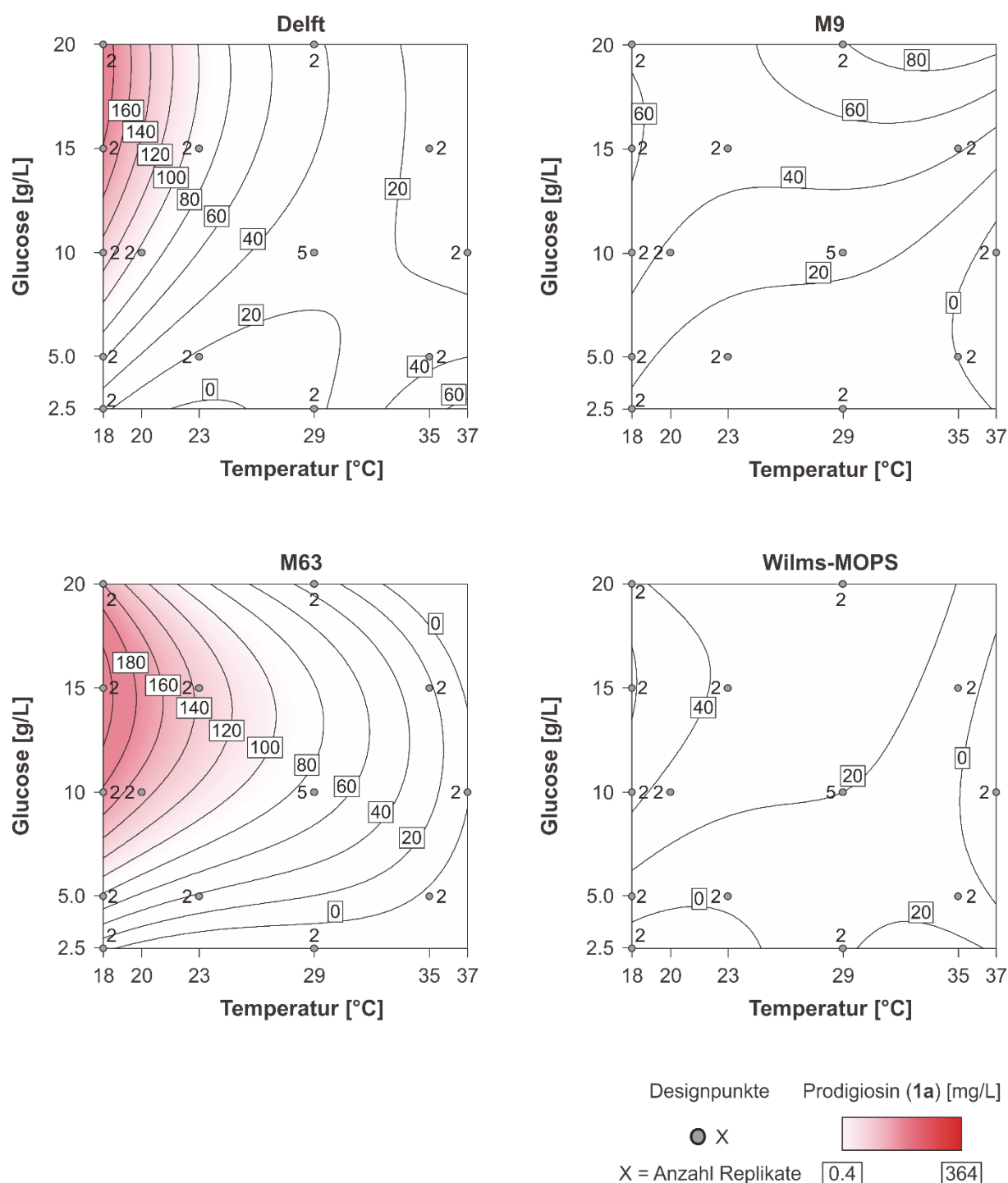
**Abbildung 66.** 2D-Darstellung der *Response Surface* Graphen als Ergebnis der Optimierung der Kultivierungsparameter. Die Optimierung wurde mittels *Design of Experiments* unter Verwendung des *Central Composite Designs* mithilfe der Software *Design Expert* (StatEase, Inc.) durchgeführt. [Die Rotfärbung repräsentiert die Menge an Prodigiosin (1a). Die Werte wurden auf mg pro Liter Kulturvolumen hochgerechnet. Als numerische Parameter wurde die Glucosemenge zwischen 2.5–20 g/L und die Temperatur zwischen 20–37 °C variiert.]

Diese Ergebnisse bestätigen die Resultate der Untersuchungen von Dr. *Andreas Domröse*, da auch bei Kultivierung mit Komplexmedien niedrigere Temperaturen zu höheren Prodigiosin (1a) Mengen führten.<sup>[205, 212]</sup> Im Falle der Glucosemengen zeigten sich mittlere bis hohe Mengen als förderlich für die Prodigiosin (1a) Produktion. Die größten Unterschiede ließen sich jedoch beim Vergleich der vier

Minimalmedien untereinander beobachten. So konnten für die Medien Delft, M9 und Wilms-MOPS insgesamt nur geringe Mengen Prodigiosin (**1a**) erzielt und berechnet werden, im Gegensatz zum Medium M63. Die höchsten experimentell bestimmten Werte an Prodigiosin (**1a**) konnten bei Nutzung des M63 Minimalmediums mit 15 g/L Glucose und bei 23 °C verzeichnet werden und betrugen  $157 \pm 44 \text{ mg/L}_{\text{Kultur}}$  (Tabelle A 8).

Da die Kultivierungsbedingungen, die zu hoher Prodigiosin (**1a**) Produktion führen, am Rande des untersuchten Parameterraums liegen, wurden analog zu den vorherigen Experimenten zusätzlich noch Kultivierungen bei 18 °C in Duplikaten bei allen fünf verschiedenen Glucosemengen (2.5–20 g/L) durchgeführt. Auf Grundlage der ersten Ergebnisse (Abbildung 66) war zu vermuten, dass bei Temperaturen unter 20 °C noch höhere Mengen an Prodigiosin (**1a**) erzielt werden könnten. Nach Quantifizierung der Prodigiosin (**1a**) Konzentration wurden die in diesen Untersuchungen erzielten Daten (Rohdaten: Tabelle A 7) ebenfalls in die Software *Design Expert* (StatEase, Inc.) überführt. Die Daten der zusätzlichen Messpunkte bei 18 °C wurden zusammen mit den vorherigen Ergebnissen verarbeitet, statistisch ausgewertet und als Ergebnis neue *Response Surface* Graphen erhalten (Abbildung 67).





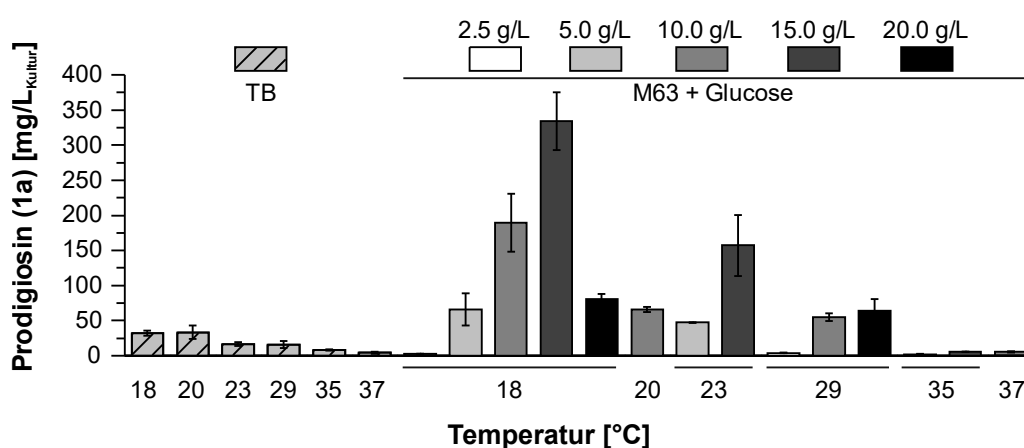
**Abbildung 67.** 2D-Darstellung der *Response Surface* Graphen als Ergebnis der Optimierung der Kultivierungsparameter und Erweiterung des Temperaturbereichs auf 18–37 °C. Die Optimierung wurde mittels *Design of Experiments* unter Verwendung des *Central Composite Designs* mithilfe der Software *Design Expert* (StatEase, Inc.) durchgeführt. [Die Rotfärbung repräsentiert die Menge an Prodigiosin (1a). Die Werte wurden auf mg pro Liter Kulturvolumen hochgerechnet. Als numerische Parameter wurde die Glucosemenge zwischen 2.5–20 g/L und die Temperatur zwischen 18–37 °C variiert].

Bei Betrachtung der Graphen und beim Vergleich mit denen in Abbildung 66 sollte beachtet werden, dass sich der maximale Prodigiosin (1a) Titer und damit die Skala unterscheidet. Anhand der Titer konnte abgeleitet werden, dass die Verwendung der Minimalmedien M9 und Wilms-MOPS bei keiner der untersuchten Kultivierungsbedingungen zu hohen Prodigiosin (1a) Mengen führte. Die höchsten



Mengen an Prodigiosin (**1a**) wurden weiterhin für das Minimalmedium M63 sowie für das Delft Medium beobachtet und berechnet. Der zuvor schon festgestellte Trend der höheren Prodigiosin (**1a**) Produktion bei niedrigeren Temperaturen setzt sich auch bei einer Kultivierungstemperatur von 18 °C fort und äußert sich in einer Steigerung der Prodigiosin (**1a**) Menge. So wurde bei Nutzung des M63 Mediums mit 15 g/L Glucose und Kultivierung bei 18 °C die höchste Prodigiosin (**1a**) Menge experimentell ermittelt, die bei  $334 \pm 41$  mg/L<sub>Kultur</sub> lag (Tabelle A 8).

Um eine bessere Vergleichbarkeit zu gewährleisten, wurde bei allen untersuchten Temperaturen die Kultivierung und anschließende Prodigiosin (**1a**) Quantifizierung auch in TB-Medium durchgeführt. Diese Ergebnisse wurden zusammen mit den experimentell gewonnenen Daten der *Design of Experiment* Untersuchungen unter Verwendung des M63 Mediums abgebildet, da dieses Minimalmedium die bisher besten Bedingungen für die Prodigiosin (**1a**) Produktion lieferte (Abbildung 68).



**Abbildung 68.** Prodigiosin (**1a**) Titer bei verschiedenen Kultivierungsbedingungen. Die Versuche wurden alle in einem Kulturvolumen von 800 µL im *BioLector*® (*m2p labs* GmbH, Baesweiler, Deutschland) durchgeführt.

Die im TB-Medium erreichten Prodigiosin (**1a**) Mengen wurden von denen in M63 Medium deutlich übertroffen. Die Werte bei Nutzung des TB-Mediums und 20 °C lagen bei  $33 \pm 10$  mg/L<sub>Kultur</sub> und wichen damit von denenjenigen ab, die im Zuge der initialen Optimierung von Dr. *Andreas Domröse* erhalten wurden und  $94 \pm 1$  mg/L<sub>Kultur</sub> betrugen. Dies könnte aber auf Unterschiede im Kulturvolumen (0.8 bzw. 50 mL) und unterschiedliche Kultivierungsgefäße (*FlowerPlate* bzw. 500 mL Erlenmeyerkolben) zurückgeführt werden.

Doch auch bei direktem Vergleich mit den von Dr. *Andreas Domröse* ermittelten Kultivierungsbedingungen, ungeachtet des Kulturvolumens, konnte die Prodigiosin (**1a**) Produktion durch eine erste Optimierung *via Design of Experiments* bereits um einen Faktor von etwa 1.67 gesteigert werden (Tabelle 10).

**Tabelle 10.** Vergleich der Prodigiosin (**1a**) Titer bei verschiedenen Kultivierungsbedingungen. [Die Daten für TB-Medium wurden von Dr. *Andreas Domröse* ermittelt.<sup>[205, 212]</sup>]

| Optimierung                                 | Medium              | Kultivierungs-<br>temperatur [°C] | Kultur-<br>volumen [mL] | Prodigiosin ( <b>1a</b> )<br>[mg/L <sub>Kultur</sub> ] |
|---------------------------------------------|---------------------|-----------------------------------|-------------------------|--------------------------------------------------------|
| <i>Domröse et al.</i> <sup>[205, 212]</sup> | TB-Medium           | 20                                | 50                      | 94 ± 1                                                 |
| 1. Optimierung                              | M63, 15 g/L Glucose | 23                                | 0.8                     | 157 ± 44                                               |
| 2. Optimierung                              | M63, 15 g/L Glucose | 18                                | 0.8                     | 334 ± 41                                               |

Im Zuge der zweiten Optimierung der Kultivierungsbedingungen und Erweiterung des getesteten Temperaturbereiches auf 18–37 °C konnte der Prodigiosin (**1a**) Titer bei Verwendung von M63 mit 15 g/L Glucose und Kultivierung bei 18 °C um den Faktor 3.56 erhöht werden.

Die Nutzung der Software *Design Expert* (*StatEase, Inc.*) ermöglicht es ebenfalls aus den experimentell gewonnen und statistisch ausgewerteten Daten Kultivierungsbedingungen zu berechnen, die bestimmten Vorgaben folgen. So wurde als Maßgabe eine maximale Prodigiosin (**1a**) Menge festgelegt und durch die Software die Kultivierungsparameter berechnet, bei denen dies möglich ist. Die Bedingungen, unter denen dies laut Programm *Design Expert* (*StatEase, Inc.*) am ehesten zu erfüllen ist, waren die folgenden: M63 Medium, 18 °C, 14.6 g/L Glucose. Auch die experimentellen Daten zeigen, dass bei Nutzung des M63 Mediums mit 15.0 g/L Glucose und Kultivierung bei 18 °C die höchste Prodigiosin (**1a**) Menge mit 334 ± 41 mg/L<sub>Kultur</sub> erzielt (Tabelle A 8) wurde und sind damit im Einklang mit der Vorhersage. Hier sollte zusätzlich im Fernbachkolben getestet werden, ob tatsächlich 14.6 g/L im Medium förderlich für hohe Prodigiosin (**1a**) Titer sind oder 15.0 g/L, wie bereits experimentell im kleinen Maßstab ermittelt. Diese Ergebnisse sollten dann künftig Maßgabe für die Standardparameter zur biosynthetischen Prodigiosin (**1a**) Produktion sein.

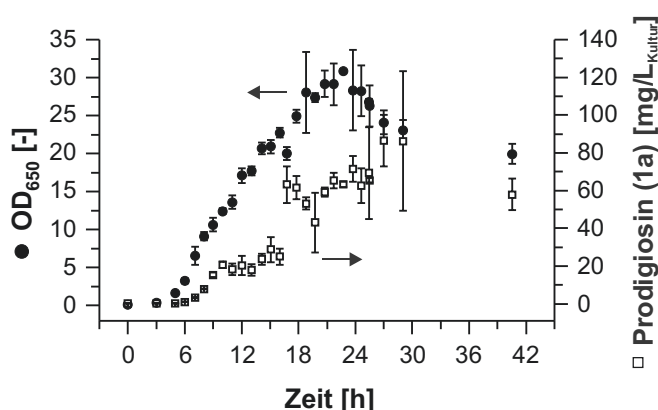
Auf Basis der dargestellten Ergebnisse, wurde die Optimierung der Kultivierungsparameter durch eine Kooperation mit Prof. Dr. *Jochen Büchs*, Dr. *Nina Ihling* und Dipl.-Ing. *Carl Brehl* (AVT.BioVT, RWTH Aachen) im Rahmen des BioSC *FocusLabs CombiCom* wiederholt und weitergeführt. Dazu wurden die Fluoreszenzeigenschaften von Prodigiosin (**1a**) genutzt, um *online* die Produktion von Prodigiosin (**1a**) verfolgen zu können. Diese Versuche wurden von Dipl.-Ing. *Carl Brehl* ebenfalls im *BioLector*® (*m2p labs GmbH*, Baesweiler, Deutschland) durchgeführt, bestätigten den Trend der im Rahmen der vorliegenden Arbeit gewonnenen Daten, und wiesen M63 Medium mit 16 g/L Glucose und 18 °C als bisher beste Bedingungen für erhöhte Prodigiosin (**1a**) Produktion aus (unveröffentlichte Ergebnisse). Weiterführende Untersuchungen und Fermentationen u. a. unter Nutzung des RAMOS Systems werden von Dipl.-Ing. *Carl Brehl* durchgeführt und bieten hier Ansatzpunkte für tiefergehende Optimierungen der Kultivierung, weiterhin mit dem Ziel der gesteigerten Prodigiosin (**1a**) Produktion.

Sowohl die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse als auch die weiteren Untersuchungen durch Dipl.-Ing. *Carl Brehl* (unveröffentlichte Ergebnisse) zeigen auf, dass eine stetige Senkung der Kultivierungstemperatur zu immer höheren Prodigiosin (**1a**) Titern führt. Eine Limitierung der

Prodigiosin (**1a**) Titer durch zu niedrige Temperaturen wurde bisher noch nicht beobachtet und sollte künftig experimentell bestimmt werden.

### Betrachtung der Ursachen für gesteigerte Prodigiosin (**1a**) Produktion durch Änderung der Kultivierungsparameter

Die Prodigiosin (**1a**) Produktion wurde durch Variation der Kultivierungsparameter beeinflusst. Um die Gründe der erhöhten Produktion zu evaluieren, wurde zunächst in einem Wachstumsexperiment untersucht in welcher Phase des Wachstums Prodigiosin (**1a**) gebildet wird. Dazu wurde der Stamm *P. putida* pig-r2 in TB-Medium kultiviert und in regelmäßigen Abständen Proben zur Bestimmung der OD sowie der produzierten Menge Prodigiosin (**1a**) genommen (Abbildung 69).

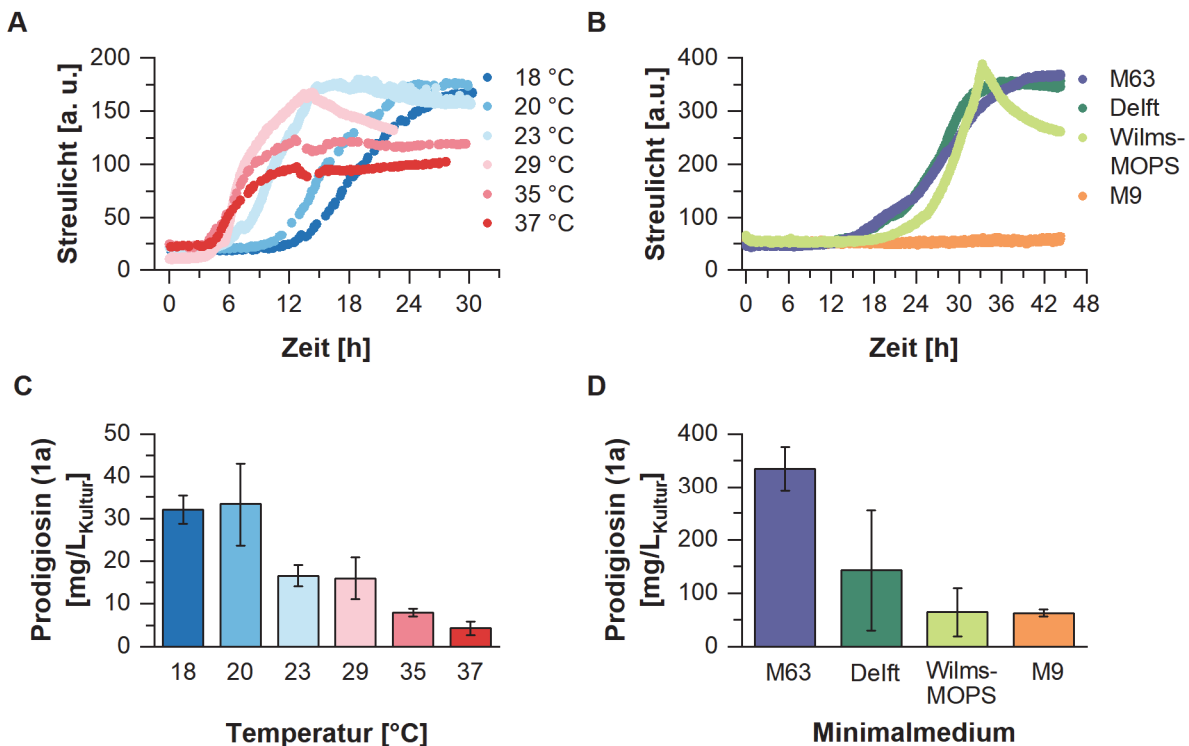


**Abbildung 69.** Wachstumskurve des Stammes *P. putida* pig-r2 und Prodigiosin (**1a**) Produktion. [Kultivierung in 50 mL TB-Medium in 500 mL Erlenmeyerkolben bei 25 °C und 130 rpm].

Die Prodigiosin (**1a**) Bildung setzte mit einem Versatz von ca. 3 h nach Beginn des exponentiellen Wachstums ein und wurde vornehmlich in dieser Phase gebildet bis hinein in die stationäre Phase, die ca. 18 h nach Inokulation begann. Ab diesem Zeitpunkt stieg die Menge an Prodigiosin (**1a**) nicht mehr stark an und verringerte sich in der späten stationären Phase/Absterbephase. Die Bildung von Prodigiosin (**1a**) ist somit offenkundig an das Wachstum des Stammes gekoppelt und wird nicht, wie es für viele Sekundärmetabolite der Fall ist, im Anschluss an die Wachstumsphase gebildet.<sup>[22]</sup>

Aus dieser Beobachtung lässt sich schließen, dass eine Verlängerung der Wachstumsphase und somit der Zeit, in der Prodigiosin (**1a**) gebildet wird, höhere Prodigiosin (**1a**) Titer zur Folge hat. Bei näherer Betrachtung der Wachstumskurven, die mittels *BioLector*® (*m2p labs* GmbH, Baesweiler, Deutschland) aufgenommen wurden und anhand der ermittelten Prodigiosin (**1a**) Mengen konnte diese Korrelation nachgewiesen werden. Dabei wurde zunächst nur das TB-Medium analysiert, da hier der isolierte Einfluss der Kultivierungstemperatur auf die Prodigiosin (**1a**) Produktion betrachtet werden kann (Abbildung 70A, C). Bei Temperaturen über 30 °C und somit schlechten Wachstumsbedingungen für *P. putida* ist gut erkennbar, dass nur niedrigere Biomassen erreicht werden.<sup>[315]</sup> Bei Temperaturen unter den für *P. putida* optimalen 30 °C werden höhere Biomassen erreicht, allerdings ist das Wachstum mit Abnahme der Kultivierungstemperatur langsamer. Dahingegen ist die Menge an Prodigiosin (**1a**)

bei tieferen Temperaturen höher (Abbildung 70C), sodass offenbar der C-Quellen Fluss bevorzugt in Richtung der Produktbildung gelenkt wurde.



**Abbildung 70.** Wachstumskurven des Stammes *P. putida* pig-r2 und Prodigiosin (1a) Produktion. **A:** Wachstumskurven bei Kultivierung mit TB-Medium bei unterschiedlichen Temperaturen. **B:** Wachstumskurven bei Kultivierung mit verschiedenen Minimalmedien mit 15 g/L Glucose bei 18 °C **C:** Prodigiosin (1a) Produktion bei Wachstum auf TB-Medium und unterschiedlichen Temperaturen. **D:** Prodigiosin (1a) Produktion bei Wachstum auf verschiedenen Minimalmedien mit 15 g/L Glucose bei 18 °C. [a. u. = *arbitrary units* (engl. willkürliche Einheiten); Die Versuche wurden alle in einem Kulturvolumen von 800  $\mu$ L im *BioLector*<sup>®</sup> (*m2p labs* GmbH, Baesweiler, Deutschland) durchgeführt. Bei allen Wachstumskurven wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit nur eins von zwei bzw. drei Replikaten dargestellt.].

Im Falle der untersuchten Minimalmedien wurden die Ergebnisse bei 18 °C und 15 g/L Glucose betrachtet. Die Wachstumskurven (Abbildung 70B) zeigen, dass der Stamm *P. putida* pig-r2 auf M9 Medium kaum anwächst, während bei allen anderen Medien starkes Wachstum beobachtet werden kann. Insbesondere im Vergleich zu den Wachstumskurven auf TB-Medium fällt auf, dass bei Nutzung von Delft, M63 oder Wilms-MOPS Minimalmedium mit Glucose als C-Quelle eine mehr als doppelt so hohe Biomasse detektiert werden kann. Auch die Phase exponentiellen Wachstums ist deutlich verlängert und beträgt nahezu 30 h bei Kultivierung in M63, wohingegen mit TB-Medium nur knapp 20 h maximal erreicht wurden. Diese Faktoren zusammengenommen erklären somit die deutliche Steigerung der Prodigiosin (1a) Produktion bei Nutzung von Minimalmedien unter den hier untersuchten Kultivierungsbedingungen (Abbildung 70D). Der drastische Abfall der Wachstumskurve bei Verwendung des Minimalmediums Wilms-MOPS (Abbildung 70B) wurde auch bei anderen Temperaturen und Glucosekonzentrationen beobachtet und deutet auf einen bestimmten Mangel eines Nährstoffs hin, welcher ein weiteres Wachstum verhindert. Hier wären weitere Untersuchungen zum Beispiel mithilfe des RAMOS-Systems (engl. *Respiratory Activity Monitoring System*) nötig, um

diesen Sachverhalt zu untersuchen und den potentiellen Nährstoffmangel auszuräumen. Das RAMOS-System ermöglicht einen genauen Einblick in die respiratorischen Aktivitäten der Zellen und kann auf diese Weise Aufschluss über mögliche Limitationen in bakteriellen Kultivierungen geben.<sup>[316]</sup> Auch Änderungen in der Morphologie der Zellen durch einen spezifischen Nährstoffmangel im Wilms-MOPS Medium könnten zu einer Veränderung der Streulichtverhältnisse im *BioLector*® (*m2p labs* GmbH, Baesweiler, Deutschland) führen und eine Erklärung für das drastische Absinken der Biomasse bei den *online* Messungen sein (Abbildung 70 B).

Die Korrelation zwischen Prodigiosin (**1a**) Produktion und Wachstum des Stammes *P. putida* pig-r2 lässt sich auch durch die Merkmale des Stammes selbst erklären. So wurde dieser Stamm von Dr. *Andreas Domröse* mithilfe des TREX Systems erzeugt und das für die Prodigiosin (**1a**) Bildung nötige *pig* Cluster integrierte dabei in die 16S rRNA von *rrnC*, einem der sieben rRNA Operons, die *P. putida* KT2440 aufweist.<sup>[205, 212-217]</sup> Es wird allgemein angenommen, dass die Expression bakterieller *rrn* Operons mit dem Wachstum korreliert, um die für die Zelle nötigen Mengen an Ribosomen bereit stellen zu können und so den höheren Bedarf an Proteinen zu decken.<sup>[215, 317]</sup> Dabei können auch äußere Faktoren wie Nährstoffmangel oder Stress die Expression beeinflussen.<sup>[215, 317-319]</sup> Da das *pig* Cluster wie zuvor beschrieben in einem rRNA Operon lokalisiert ist, kann die höhere Prodigiosin (**1a**) Produktion durch Verlängerung der Wachstumsphase und das verstärkte Ablesen des rRNA Operons während des Wachstums erklärt werden.

### 6.3.2 Fermentation des Stammes *P. putida* pig-r2

Die in diesem Kapitel vorgestellten Ergebnisse entstammen einer Kooperation mit Dipl.-Ing. *Carl Brehl* (AVT.BioVT, RWTH Aachen), bei welcher gemeinsam eine Fermentation des Prodigiosin (**1a**) Produzenten *P. putida* pig-r2 in den Laboratorien der AVT.BioVT der RWTH Aachen durchgeführt wurde. Dazu wurde ein Kulturvolumen von 1.5 L M63 Medium mit 16.0 g/L Glucose verwendet und die Kultivierungstemperatur auf 18°C eingestellt (Kapitel 8.6.9). Nach Ende der Fermentation wurden 1.2 L der Fermentationsbrühe pelletiert und Prodigiosin (**1a**) extrahiert und *via* Säulenchromatographie gereinigt (Kapitel 8.6.6.2). Letztlich konnten so 174 mg Prodigiosin (**1a**) aus den 1.2 L Kulturbrühe isoliert werden, was einer Ausbeute von 145 mg/L<sub>Kultur</sub> entspricht.

Neben der Kultivierung des Prodigiosin (**1a**) Produzenten *P. putida* pig-r2 im Fermenter wurde dieser Stamm unter identischen Bedingungen (M63 Medium, 16.0 g/L Glucose, 18°C) in Fernbachkolben kultiviert. Dabei wurde zum einen eine 1000 mL Kultur mit PU-Würfeln als *in situ* Produktentfernung kultiviert, zum anderen eine Kultur mit gleichem Volumen, jedoch ohne PU-Würfel. Im Falle der Kultur mit PU-Schwämmen wurde nach Kultivierung über Nacht die erste Charge PU-Würfel geerntet, da bereits kein Prodigiosin (**1a**) mehr aus dem Medium in die Schwämmchen aufgenommen wurde und erneut 5 g zugegeben. Im Anschluss wurde die Kultur über eine weitere Nacht kultiviert. Aus dem Ansatz ohne PU-Würfel konnten so 18 mg/L reines Prodigiosin (**1a**) isoliert werden, während es unter Nutzung der *in situ* Produktentfernung 29 mg/L waren (Tabelle 11). Dieser letzte Wert liegt unter dem, der unter vergleichbaren Bedingungen in vorherigen Arbeiten unter Nutzung von TB-Medium erzielt

wurde und entspricht nicht den Mengen an Prodigiosin (**1a**), die in den Optimierungsversuchen im kleinen Maßstab erreicht wurden.<sup>[17]</sup> Im Verlauf der vorliegenden Arbeit wurde jedoch beobachtet, dass die leicht variierende Größe der PU-Würfel, die bedingt ist durch das manuelle Zuschneiden des Schaumstoffs, und auch die unterschiedlichen Chargen des Schaumstoffs einen Einfluss auf die Kultivierung im Fernbachkolben und die Produkttiter haben, so dass eine Reproduzierbarkeit nicht immer gegeben war. Die Änderung des Mediums hin zu Minimalmedien konnte jedoch die Produkttiter wie zuvor gezeigt im kleinen Maßstab eindeutig verbessern. Um diese Verbesserung auch im Fernbachkolben reproduzierbar zu erzielen ist eine systematische Untersuchung der *in situ* Produktentfernung nötig. Sowohl die Art des Schaumstoffmaterials als auch die Geometrie und die Abmessungen des Schaumstoffs sind Parameter, die im Kontext einer strukturierten Analyse evaluiert werden sollten.

Ein direkter Vergleich der Fermentationen im Fernbachkolben mit der Kultivierung im Fermenter kann und sollte aufgrund der unterschiedlichen Systeme nicht stattfinden, dennoch geben die Kultivierungen im Fernbachkolben Aufschluss darüber, wie viel Prodigiosin (**1a**) mit dem im Arbeitskreis vorhandenen Equipment produziert werden kann. Erwähnt werden sollte dennoch, dass die höheren Prodigiosin (**1a**) Mengen, die im Fermenter erzielt wurden, sicherlich durch einen höheren Leistungs- und Sauerstoffeintrag im Fermenter bedingt sind.

**Tabelle 11.** Übersicht über die Kultivierungsarten und die Mengen an Rohprodukt und isoliertem Prodigiosin (**1a**).

| Kultivierungsart<br>(Kulturvolumen)                            | Fernbachkolben<br>(Maßstab 1 L) | Fernbachkolben mit<br><i>in situ</i><br>Produktentfernung<br>(Maßstab 1 L) | Fermenter<br>(Maßstab 1.5 L) |
|----------------------------------------------------------------|---------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|------------------------------|
| Rohextrakt [mg/L <sub>Kultur</sub> ]                           | 88                              | 91                                                                         | 811                          |
| isoliertes Prodigiosin ( <b>1a</b> ) [mg/L <sub>Kultur</sub> ] | 18                              | 29                                                                         | 145                          |
| Reinheit Rohextrakt [%]                                        | 20                              | 32                                                                         | 15                           |

Anhand von Tabelle 11 wird auch der in vorangegangenen Arbeiten beobachtete Effekt der *in situ* Produktentfernung sichtbar, der zu einer erhöhten Reinheit des Rohprodukts führt.<sup>[17, 205]</sup> Die Reinheit des Rohextrakts bei Anwendung der PU-Würfel war vergleichbar zu den Daten von Dr. Andreas S. Klein, der die *in situ* Produktentfernung in TB-Medium evaluierte und eine Reinheit des Rohextraktes von  $37 \pm 1\%$  nachweisen konnte. Dahingegen lag die Reinheit des Rohextraktes bei Kultivierung in TB-Medium ohne PU-Würfel bei lediglich  $9 \pm 2\%$  statt 20% in Minimalmedium. Hier könnte die Verwendung des Minimalmediums mit definierten Bestandteilen einen positiven Einfluss auf die Reinheit des Rohextraktes haben im Vergleich zum TB-Medium mit undefinierten Medienkomponenten.

### 6.3.3 Synopsis des Kapitels

- Der Prodigiosin (**1a**) Produzent *P. putida* pig-r2 konnte unter Beibehaltung der Prodigiosin (**1a**) Produktion auf verschiedenen Minimalmedien angezogen werden.
- Mittels *Design of Experiment* wurden die Kultivierungsparameter Temperatur, Art des Minimalmediums und Glucosekonzentration systematisch im Hinblick auf eine möglichst hohe Prodigiosin (**1a**) Produktion untersucht.
- Es konnten Kultivierungsbedingungen für eine Erhöhung der Prodigiosin (**1a**) Titer im Vergleich zur Kultivierung in TB-Medium identifiziert werden. Dabei zeigten möglichst niedrige Kultivierungstemperaturen und das Minimalmedium M63 einen starken, positiven Einfluss.
- Ein Zusammenhang zwischen Verlängerung der Wachstumsphase des Stamms *P. putida* pig-r2 und hohen Prodigiosin (**1a**) Titern konnte identifiziert werden.
- Die Fermentation von *P. putida* pig-r2 im 1.5 L Maßstab unter Nutzung optimierter Kultivierungsbedingungen erbrachte 145 mg/L<sub>Kultur</sub> reines Prodigiosin (**1a**).

## 6.4 Bioaktivität von Prodigininen

Prodiginine weisen eine große Vielzahl biologischer Aktivitäten auf, die von antibakteriellen und antimikrobiellen Effekten hin zu zytotoxischer Wirkung reichen. Als Grundlage für die hohe Bioaktivität sind sicher die Fähigkeiten der Prodiginine zu nennen Einzel- und Doppelstrangbrüche in der DNA zu verursachen sowie die Beeinflussung des Protonengradienten und der Autophagieprozesse in Zellen (Kapitel 5.2.3).

Da unterschiedliche biologische Wirkungen auf verschiedene Molekülstrukturen zurückgeführt werden können, ist die Testung der produzierten Prodigiosin (**1a**) Derivate von hohem Interesse. In diesem Kapitel wird die antibiotische Aktivität verschiedener Prodiginine beleuchtet, ebenso wie der Einfluss auf die Autophagie in einer humanen Brustkrebszelllinie und zudem die Wirkung von Prodigininen auf Pflanzen und Pflanzenpathogene.

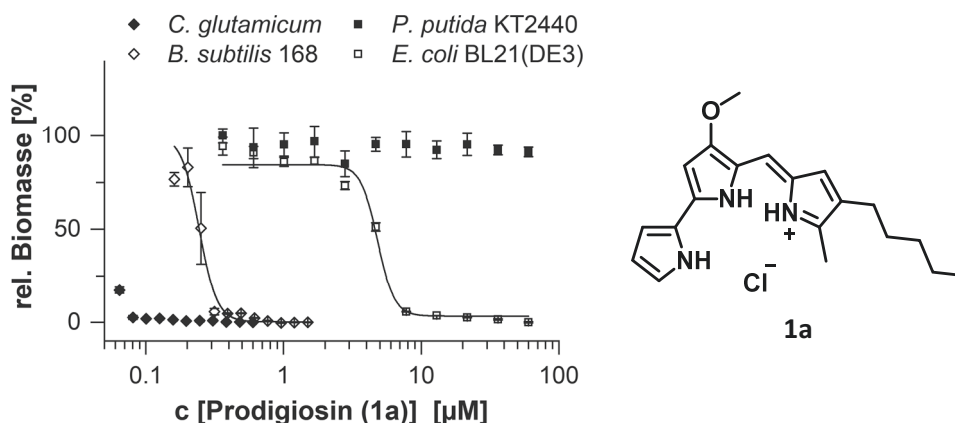
### 6.4.1 Antibiotische Aktivität von Prodigininen

In der Literatur finden sich zahlreiche Beispiele für die antibiotische Wirkung von Prodigininen auf Gram-positive und Gram-negative Bakterien, aber auch Hefen und andere Pilze.<sup>[13, 36, 69-80]</sup> Die antimikrobielle Wirkung von Prodigininen ist zum einen im Kontext der Wahl eines Produktionsorganismus wichtig, um einen Stamm für die Prodigininproduktion zu finden, der nicht durch den Naturstoff Prodigiosin (**1a**) oder dessen Derivate im Wachstum behindert wird, zum anderen könnten Prodiginine als potentiell Antibiotikum dienen, sofern sie einen Effekt auf (fakultativ) humanpathogene Organismen haben.

#### 6.4.1.1 Antibiotische Wirkung gegenüber biotechnologisch relevante Organismen

Für die Anwendung des Mutasynteseprinzips und die erfolgreiche Etablierung der mutasyntetischen Produktion von Prodigininen (Kapitel 5.6) war es unerlässlich einen Mutasyntese Wirt zu finden, dessen Wachstum von Prodigininen nicht negativ beeinflusst wird. Daher wurde im Rahmen der Doktorarbeit von Dr. *Andreas S. Klein* bereits die antibakterielle Wirkung von Prodigiosin (**1a**) und einigen ausgewählten Derivaten auf biotechnologisch wichtige Organismen getestet, die potentiell als Mutasyntese Wirte dienen können.<sup>[17]</sup> So wurden die Gram-negativen Stämme *E. coli* BL21(DE3) und *P. putida* KT2440, als auch die beiden Gram-positiven Bakterien *B. subtilis* 168 und *C. glutamicum* untersucht. In den initialen antibakteriellen Testungen wurden *n*-alkylierte Prodiginine **1a**, **1c**, **1f**, **1j** und **58b** analysiert, wohingegen in späteren Analysen im Rahmen der Masterarbeit von M. Sc. *David P. Klebl* zusätzlich zyklische Prodiginine **110a–110d** betrachtet wurden.<sup>[247, 248]</sup> Alle getesteten Verbindungen zeigten einen starken Einfluss auf das Wachstum der Gram-positiven Bakterien, wobei das Wachstum von *C. glutamicum* nahezu vollständig inhibiert wurde. Im Gegensatz dazu tolerierten *E. coli* BL21(DE3) und *P. putida* KT2440, zwei Gram-negative Organismen, 10-fach höhere Konzentrationen der Prodiginine (Abbildung 71, Tabelle A 9). Hervorzuheben ist, dass für *P. putida* KT2440 keine signifikante Wachstumsinhibierung in einem Konzentrationsbereich von  $\leq 60 \mu\text{M}$  beobachtet werden konnte, was die Eignung von *P. putida* KT2440 als Mutasyntese Wirt aufzeigt.



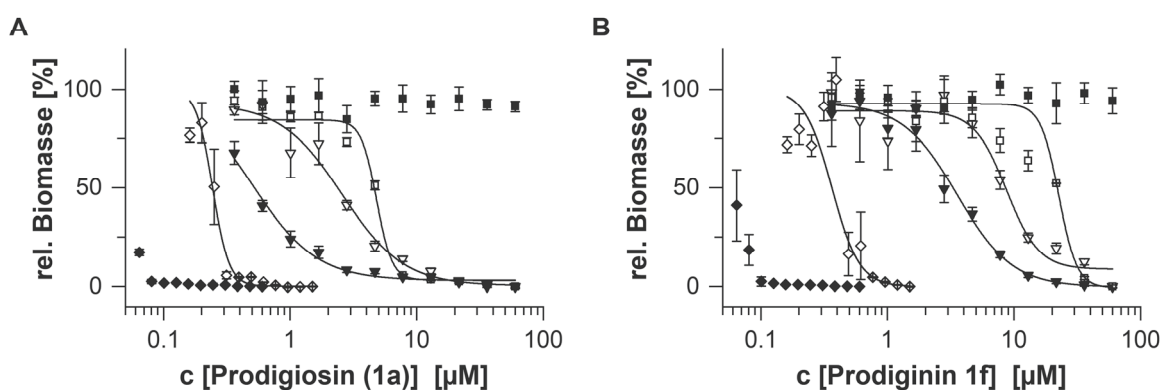


**Abbildung 71.** Untersuchungen zur antimikrobiellen Aktivität von Prodigiosin (1a). Untersucht wurden *C. glutamicum*, *B. subtilis*, *P. putida* KT2440 und *E. coli* BL21(DE3). Die Daten für diese Abbildung wurden von Dr. Andreas S. Klein im Rahmen seiner Dissertation erhoben und die Abbildung in Anlehnung an diese Arbeit erstellt.<sup>[17]</sup>

Aufbauend auf den Ergebnissen zur Toxizität verschiedener Prodiginine gegenüber Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien – also Prokaryonten – ergab sich die Fragestellung in welcher Weise Prodiginine auf eukaryotische Organismen wirken würden. Daher wurden Toxizitätsassays sowohl mit den *n*-alkylierten Prodigininen 1a, 1f und 58b als auch mit den zyklischen Prodigininen 110a–110d durchgeführt und deren Wirkung auf das Wachstum der Hefen *Saccharomyces cerevisiae* und *Pichia pastoris* (*Komagataella phaffii*)<sup>29</sup> untersucht.

Dabei zeigte sich, dass beide Hefen durch die getesteten Prodiginine zwar in ihrem Wachstum inhibiert werden jedoch nicht so ausgeprägt wie die Gram-positiven Bakterien *C. glutamicum* und *B. subtilis* 168 (Abbildung 72, Abbildung A 7–Abbildung A 13). Dennoch war die Wachstumsinhibierung stärker als bei den Gram-negativen Organismen *E. coli* BL21(DE3) und *P. putida* KT2440.

◆ *C. glutamicum* ◇ *B. subtilis* 168 ▼ *S. cerevisiae* ▽ *P. pastoris* □ *E. coli* BL21(DE3) ■ *P. putida* KT2440



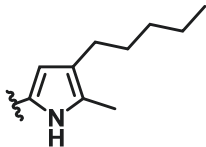
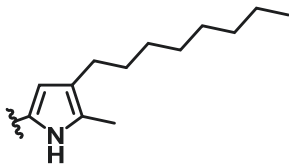
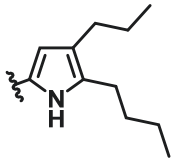
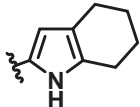
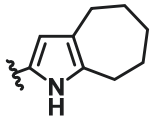
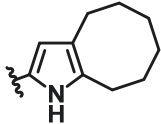
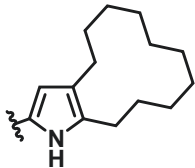
**Abbildung 72.** Untersuchungen zur antimikrobiellen Aktivität von Prodigininen. Untersucht wurden jeweils *C. glutamicum*, *B. subtilis*, *S. cerevisiae*, *P. pastoris*, *P. putida* KT2440 und *E. coli* BL21(DE3). **A:** Toxizitätstest mit Prodigiosin (1a), **B:** Toxizitätstest mit Prodiginin 1f. Ergebnisse zu *C. glutamicum*, *B. subtilis*, *P. putida* KT2440 und *E. coli* BL21(DE3) sind der Dissertation von Dr. Andreas S. Klein entnommen.<sup>[17]</sup>

<sup>29</sup> Der korrekte Name der biotechnologisch relevanten Hefe lautet *K. phaffii*, jedoch ist der Name *P. pastoris* weiterhin gebräuchlich. In dieser Arbeit wird der Name *P. pastoris* verwendet.

In den vorangegangenen Untersuchungen durch Dr. *Andreas S. Klein* und M. Sc. *David P. Klebl* wurde bereits deutlich, dass Prodiginine mit kürzeren Alkylketten eine stärkere antibakterielle Wirksamkeit aufweisen. Hervorzuheben ist hier Prodiginin **1c**, welches einen Methyl- und einen Propylsubstituenten am C-Ring trägt, und den stärksten antibakteriellen Effekt zeigte. Die schwächere Wirkung von Prodigininen mit längeren Alkylketten war bereits von *Marchal et al.* beschrieben und ein Zusammenhang zwischen erhöhter Lipophilie von Prodigininderivaten und geringeren antibakteriellen Eigenschaften erkannt worden.<sup>[71]</sup> Auch die beobachtete allgemein stärkere Wirkung von Prodigininen auf Gram-positive Bakterien ist übereinstimmend mit zuvor publizierten Ergebnissen.<sup>[36, 71, 72]</sup>

Auch für die getesteten Hefen kann der Trend der schwächeren antimikrobiellen Wirkung bei Prodigininen mit längeren *n*-Alkylketten anhand der IC<sub>50</sub>-Werte nachvollzogen werden (Tabelle 12, Abbildung 72). Die Toxizität der zyklischen Prodiginine war mit Ausnahme des Prodiginins **110b** von vergleichbarer Stärke. Prodiginin **110b** wies eine höhere Wirksamkeit auf und führte zu einer Wachstumsinhibierung der Hefen in vergleichbarer Art zu Prodigiosin und ähnlichen IC<sub>50</sub>-Werten (Tabelle 12).

**Tabelle 12.** Ergebnisse der Wirkung verschiedener Prodiginine (**1a**, **1f**, **58b**, **110a–110d**) in Toxizitätsassays mit den Organismen *S. cerevisiae* und *P. pastoris*. Aufgelistet sind die Werte für MIC und IC<sub>50</sub>.

| Prodiginin                                                                          |             | <i>S. cerevisiae</i><br>MIC/IC <sub>50</sub><br>[μM] | <i>P. pastoris</i><br>MIC/IC <sub>50</sub><br>[μM] |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------|------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|
|    | <b>1a</b>   | 1.62 ± 0.17 /<br>0.50 ± 0.02                         | 7.84 ± 2.03 /<br>2.57 ± 0.37                       |
|    | <b>1f</b>   | 9.62 ± 0.49 /<br>3.55 ± 0.28                         | 15.67 ± 4.45 /<br>8.70 ± 1.16                      |
|    | <b>58b</b>  | 4.24 ± 1.00 /<br>1.05 ± 0.10                         | 11.92 ± 3.13 /<br>3.46 ± 0.45                      |
|   | <b>110c</b> | 4.82 ± 0.41 /<br>1.69 ± 0.21                         | 8.04 ± 0.70 /<br>4.88 ± 0.20                       |
|  | <b>110b</b> | 1.86 ± 0.29 /<br>0.44 ± 0.03                         | 7.27 ± 1.78 /<br>1.73 ± 0.70                       |
|  | <b>110a</b> | 5.14 ± 0.67 /<br>1.65 ± 0.10                         | 11.70 ± 2.40 /<br>2.50 ± 0.30                      |
|  | <b>110d</b> | 4.23 ± 0.62 /<br>1.38 ± 0.09                         | 6.07 ± 1.51 /<br>1.65 ± 0.18                       |

Für die Hefe *P. pastoris* konnte im Vergleich zu *S. cerevisiae* eine höhere Toleranz gegenüber allen getesteten Prodigininen beobachtet werden, was sich auch in den höheren IC<sub>50</sub>-Werten für *P. pastoris* widerspiegelt. Beim Vergleich von Gram-positiven, Gram-negativen Bakterien sowie Hefen zeigten die untersuchten Hefen eine durch die Prodigininderivate verursachte Wachstumsinhibierung von mittlerer Stärke (Abbildung 72). Diese Ergebnisse unterstreichen erneut die vorteilhafte Wahl von *P. putida* KT2440 als Produktionsorganismus und Mutasynthese Wirt.

Bei Betrachtung der Dosis-Wirkungs-Kurven der Hefen im Vergleich zu den bakteriellen Stämmen (Abbildung 72) war der langsamere Abfall der Kurven auffällig, der sich von dem steileren Abfall bei bakteriellen Organismen unterscheidet. Für Hefen wie *S. cerevisiae* ist bekannt, dass diese zahlreiche

ABC-Transporter (engl. *ATP-binding cassette*) besitzen von denen viele Xenobiotika aus dem Organismus ausschleusen können, so für eine zelluläre Entgiftung sorgen und eine pleiotrope Resistenz verleihen. Diese Transporter werden auch als *ABC-drug efflux pumps* bezeichnet.<sup>[320-322]</sup> Dies könnte, neben der unterschiedlichen Beschaffenheit der Zellwände von Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien sowie *Saccharomycetaceae*, die ebenso Einfluss auf die aktive oder auch passive Aufnahme der Prodiginine hat, auch eine Erklärung für die beobachteten Unterschiede der Dosis-Wirkungs-Kurven sein.

Die beobachtete und hier beschriebene Wachstumsinhibierung von Hefen durch Prodiginine kontrastiert die in der Literatur berichteten Daten zum Teil. So wird von *Gerber et al.* beschrieben, dass Prodigiosin (**1a**) nur partielle Inhibition des Wachstums von *S. cerevisiae* zeigt, während andere Prodigininderivate keinerlei Inhibition verursachen.<sup>[36]</sup> Dennoch ist die antimykotische Aktivität von Prodigininen bekannt wie z. B. gegen *C. albicans*.<sup>[36, 70, 79, 80, 323]</sup> Eine Quelle, welche die antimykotische Wirkung von Prodigininen gegenüber *P. pastoris* beschreibt, ist bis *dato* nicht bekannt, sodass kein Vergleich mit Literaturdaten erfolgen kann.

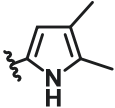
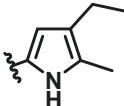
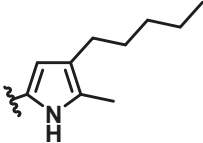
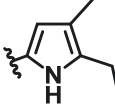
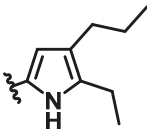
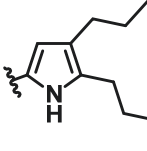
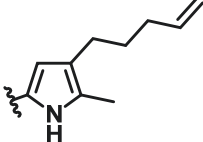
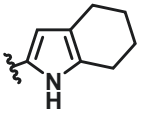
#### **6.4.1.2 Antibiotische Aktivität gegenüber fakultativ humanpathogenen Erregern**

Die Testungen von verschiedenen Prodigininen an fakultativ humanpathogenen Erregern, die in diesem Unterkapitel vorgestellt werden, wurden im Rahmen der Zusammenarbeit mit Prof. Dr. *Karl-Erich Jaeger*, Dr. *Thomas Drepper*, Dr. *Anita Loeschcke* und M. Sc. *Jennifer Hage-Hülsmann* (Institut für Molekulare Enzymtechnologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) von M. Sc. *Jennifer Hage-Hülsmann* durchgeführt. Die Prodiginine wurden im Rahmen dieser Arbeit (**1a**, **1b**, **1i**, **58f**, **58g**), in Zusammenarbeit mit Dr. *Andreas S. Klein* (**58b**), von Dr. *Andreas S. Klein* (**1j**) oder im Rahmen der Masterarbeit von M. Sc. *David P. Klebl* (**110c**) hergestellt.<sup>[17, 248]</sup>

Wie im vorangegangenen Unterkapitel bereits beschrieben, zeigen Prodiginine antibakterielle Wirkung gegen Gram-negative und Gram-positive Bakterien sowie antimykotische Aktivität gegenüber Hefen. Bei allen getesteten Organismen [*C. glutamicum*, *B. subtilis*, *S. cerevisiae*, *P. pastoris*, *P. putida* KT2440 und *E. coli* BL21(DE3)] handelte es sich jedoch um biotechnologisch relevante und gut untersuchte Mikroorganismen, die alle der Risikogruppe 1 zugeordnet werden können und teilweise sogar GRAS-Status haben. Von größerer klinischer Bedeutung ist jedoch die Wirkung von Naturstoffen wie Prodigininen auf fakultativ humanpathogene oder obligat humanpathogene Bakterien. Daher wurden durch M. Sc. *Jennifer Hage-Hülsmann* diverse Prodigininderivate im Hinblick auf ihre antibakterielle Wirkung gegenüber fakultativ humanpathogene Bakterien getestet. Bei den untersuchten Mikroorganismen handelt es sich zum einen um die Gram-positiven Bakterien *S. aureus*, *Staphylococcus epidermis* und *Enterococcus faecium* und zum anderen um die Gram-negativen Bakterien *Pseudomonas aeruginosa* und *S. marcescens*. Außerdem wurde das Gram-positive Bakterium *C. glutamicum* erneut getestet, da es sich bei diesem Organismus um einen Modellorganismus für humanpathogene Vertreter der Corynebakterien wie

*Mycobacterium tuberculosis*, *Corynebacterium diphtheriae* und *Mycobacterium leprae* handelt – den Erregern der Tuberkulose, der Diphtherie bzw. der Lepra.<sup>[324-326]</sup> Die Ergebnisse der Testungen sind in Tabelle 13 zusammenfassend aufgeführt.

**Tabelle 13.** Ergebnisse der Wirkung der Prodiginine **1a**, **1b**, **1i**, **1j**, **58b**, **58f**, **58g** und **110c** in Toxizitätsassays mit den Organismen *C. glutamicum*, *S. aureus*, *S. epidermis*, *E. faecium*, *P. aeruginosa* und *S. marcescens*. Die hier gezeigten Daten wurden von M. Sc. Jennifer Hage-Hülsmann im Rahmen ihrer Dissertation erhoben. Im untersuchten Konzentrationsbereich konnte für keines der getesteten Prodiginine eine Inhibierung des Wachstums von *P. aeruginosa* und *S. marcescens* festgestellt werden.

| Prodiginin                                                                          |             | <i>C. glutamicum</i><br>MIC<br>[μM]                 | <i>S. aureus</i><br>MIC<br>[μM]                     | <i>S. epidermis</i><br>MIC<br>[μM]                  | <i>E. faecium</i><br>MIC<br>[μM]                    |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------|-----------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|
|    | <b>1b</b>   | 12.8                                                | 25.6                                                | 25.6                                                | 25.6                                                |
|    | <b>1i</b>   | 12.8                                                | 25.6                                                | 25.6                                                | 25.6                                                |
|  | <b>1a</b>   | 12.8                                                | 12.8                                                | 12.8                                                | 12.8                                                |
|  | <b>58f</b>  | keine Inhibition<br>des<br>Wachstums <sup>[a]</sup> | keine Inhibition<br>des<br>Wachstums <sup>[a]</sup> | keine Inhibition<br>des<br>Wachstums <sup>[a]</sup> | keine Inhibition<br>des<br>Wachstums <sup>[a]</sup> |
|  | <b>58g</b>  | 12.8                                                | 12.8                                                | 12.8                                                | 12.8                                                |
|  | <b>58b</b>  | 12.8                                                | 12.8                                                | 12.8                                                | 12.8                                                |
|  | <b>1j</b>   | 12.8                                                | 12.8                                                | 25.6                                                | 25.6                                                |
|  | <b>110c</b> | 12.8                                                | 12.8                                                | 25.6                                                | 25.6                                                |

<sup>[a]</sup>Die Wachstumsinhibierung war im getesteten Konzentrationsbereich nicht ausreichend, um eine MIC-Bestimmung zu ermöglichen.

Übereinstimmend mit den Toxizitätsassays aus Kapitel 6.4.1.1 und der Literatur zeigten die Prodiginine eine insgesamt deutlich stärkere Wirkung gegenüber Gram-positiven Organismen.<sup>[36, 71, 72]</sup> Sowohl für *C. glutamicum* als auch *S. aureus*, *S. epidermis* und *E. faecium* konnte eine Inhibierung des Wachstums beobachtet werden. Die MIC-Werte variierten je nach Prodigininderivat zwischen 12.8 und 25.6 µM. Lediglich für das Prodiginin **58f** konnte im untersuchten Konzentrationsbereich keine vollständige Wachstumsinhibierung beobachtet werden. Zu beachten ist jedoch bei allen Angaben, dass die Bestimmung der MIC-Werte im Vergleich zu den Daten in Kapitel 6.4.1.1 nicht als mathematische Auswertung durch Bestimmung des Schnittpunktes der Tangenten am Wendepunkt der Dosis-Wirkungskurve mit der horizontalen Asymptote erfolgte. Die hier dargestellten MIC-Werte wurden wie häufig üblich als diejenige Konzentration angegeben, bei der kein sichtbares Wachstum mehr vorhanden war.<sup>[327-329]</sup> Daher wird kein direkter quantitativer Vergleich der Daten vorgenommen.

Die untersuchten fakultativ humanpathogenen, Gram-negativen Bakterien *P. aeruginosa* und *S. marcescens* wurden durch keines der Prodiginine in ihrem Wachstum inhibiert. Da es sich bei *S. marcescens* um ein Prodigiosin (**1a**) produzierendes Bakterium handelt, ist die fehlende Wachstumsinhibierung durch Prodigiosin (**1a**) oder Prodigininderivate sicher in dieser Tatsache begründet. Übereinstimmend mit der Literatur ist neben der ausgeprägten Wirkung von Prodigiosin (**1a**) auf *S. aureus* sowie *E. faecium* auch die mangelnde Aktivität gegenüber *P. aeruginosa*.<sup>[36, 71, 72, 75]</sup>

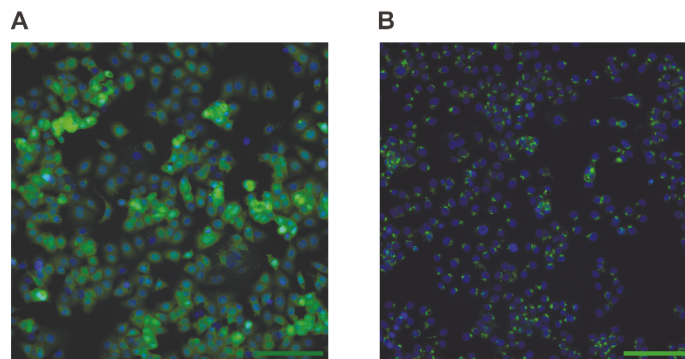
#### 6.4.2 Beeinflussung der Autophagie in MCF7 Brustkrebszellen

Die in diesem Unterkapitel präsentierten physiologischen Testungen verschiedener Prodiginine gegenüber humanen Zelllinien wurden von Dr. Sonja Sievers und Dr. Luca Laraia am Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie in Dortmund in der Abteilung für Chemische Biologie und am Compound Management and Screening Center (COMAS) durchgeführt. Detaillierte Angaben zu den Methoden können der Veröffentlichung von Klein et al. entnommen werden.<sup>[197]</sup> Die Herstellung der Prodiginine für diese Untersuchungen erfolgten zum einen in Zusammenarbeit mit Dr. Andreas S. Klein (Prodiginine **1a**, **1c**, **1f**, **58b**) und zum anderen im Rahmen dieser Arbeit (Prodiginine **1b**, **1i**, **58g**). Die Prodiginine **1j** und **114** wurden von Dr. Andreas S. Klein synthetisiert, während die Prodiginine **110a–110d** von M. Sc. David P. Klebl im Rahmen seiner Masterarbeit hergestellt wurden.<sup>[17, 248]</sup>

Über die antimikrobiellen Eigenschaften der Prodiginine hinaus besitzen Prodigiosin (**1a**) und das synthetische Derivat Obatoclax (**23**) Autophagie modulierende Eigenschaften, wobei Obatoclax-Mesylat (**23**, GX15-070) bereits in verschiedenen klinischen Studien (Phase II) untersucht wurde.<sup>[114-119]</sup> Um den Einfluss von Prodigininen auf die Autophagie mit besonderem Augenmerk auf den Einfluss der Alkylketten genauer zu untersuchen, wurden Prodigiosin (**1a**) und die Derivate **1c**, **1f**, **1j** und **58b** physiologischen Tests unterzogen. Als Modell diente die humane Brustkrebszelllinie MCF7, die von der Michigan Cancer Foundation (MCF) in den 1970er Jahren als stabile Zelllinie etabliert wurde und seitdem als Modellsystem für Brustkrebs verwendet wird.<sup>[330]</sup> Im Detail wurde die Fähigkeit

der Prodiginine untersucht eGFP (engl. *enhanced green fluorescent protein*)-LC3 *puncta* zu modulieren, welche als autophagosomale Marker dienen. Autophagosomen, zweilagige Membranvesikel, sind wichtige zelluläre Strukturen der Autophagie, die im letzten Schritt mit Lysosomen verschmelzen und so den Abbau des Inhalts der Autophagosomen und das Recycling von Nährstoffen ermöglichen. LC3-I ist ein Mikrotubuli-assoziiertes Protein (1A/1B-*light chain 3*) und ist im Cytoplasma vorhanden (Kapitel 5.2.3, Abbildung 4). Wird an dieses Protein Phosphatidylethanolamin konjugiert, bildet sich die lipidierte Form LC3-II aus und wird in die wachsende Membran eingebaut, die bei der Ausbildung der Autophagosomen entsteht. Nach Fusion der Autophagosomen mit den sauren Lysosomen werden sie, ebenso wie die anderen vom Autophagosom umschlossenen Moleküle, abgebaut. Die Abbauprodukte aller autophagosomalen Bestandteile werden schließlich wieder freigesetzt. [17, 108-110, 331-333]

In den physiologischen Test wurde die stabil transfizierte Zelllinie eGFP-LC3-MCF7 genutzt, bei welcher die LC3-Proteine mit eGFP fusioniert sind. So kann der Prozess der Autophagie mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops verfolgt und sichtbar gemacht werden. Nach dreistündiger Inkubation der Zellen mit den Prodigininen **1a**, **1c**, **1f**, **1j** und **58b** konnte eine Akkumulation der eGFP-LC3 *puncta* beobachtet werden [Abbildung 73 B, am Beispiel Prodigiosin (**1a**)], was auf eine Akkumulation der Autophagosomen schließen lässt. Im Gegensatz dazu wurde im Kontrolllexperiment, bei dem lediglich mit DMSO inkubiert wurde, wie erwartet nur eine diffuse eGFP-LC3 Färbung sichtbar (Abbildung 73 A), die von gleichmäßig im Cytosol verteilten eGFP-LC3-Proteinen resultierte.

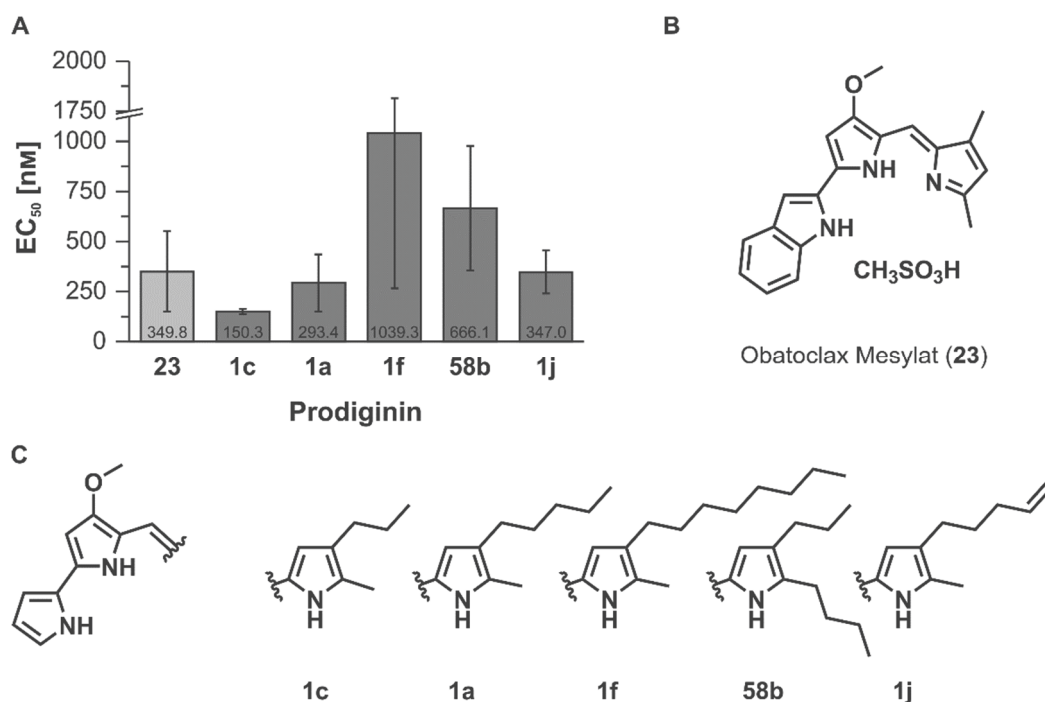


**Abbildung 73.** Einfluss von Prodigininen auf die Autophagie in eGFP-LC3-MCF7 Zellen am Beispiel von Prodigiosin (**1a**). **A:** Diffuse eGFP-LC3 Färbung nach Inkubation mit DMSO als Kontrolle. **B:** Akkumulation von Autophagosomen in eGFP-LC3-MCF7 Zellen nach 3 h Inkubation mit Prodigiosin (**1a**). [Abbildung nach [17, 197]; grün = Fluoreszenz von eGFP-LC3 *puncta*, blau = Nuklei mit Hoechst Farbstoff angefärbt, Maßstabsbalken = 150  $\mu$ m]

In einer von Zhao *et al.* im Jahr 2020 veröffentlichten Publikation wurde übereinstimmend mit den hier präsentierten Ergebnissen gezeigt, dass Prodigiosin die Fusion von Autophagosomen und Lysosomen in humanen Darmkrebszelllinien (kolorektales Karzinom) unterbindet. Ebenso wurde die Aktivität verschiedener Hydrolasen im Lysosom abgeschwächt. Allerdings konnte kein Einfluss auf den lysosomalen pH-Wert beobachtet werden. [334]



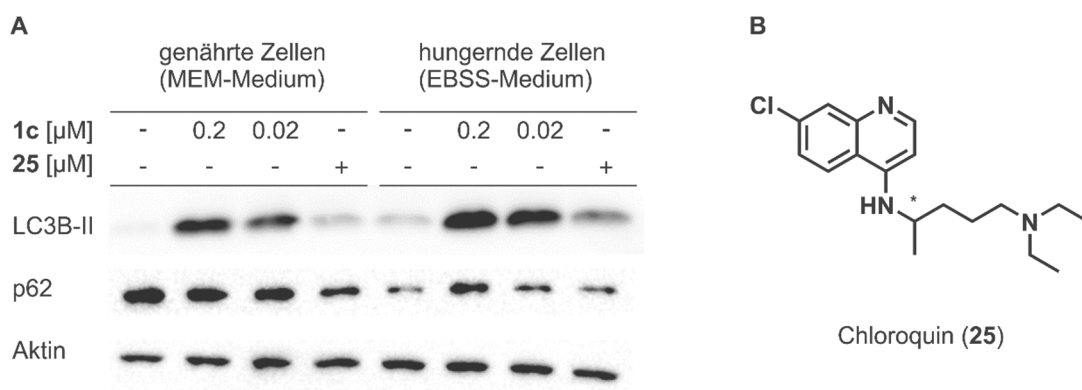
Das Prodiginin **1c** verursachte unter den getesteten Prodigininen die stärkste Akkumulation von Autophagosomen und wies einen  $EC_{50}$ -Wert von 150 nM auf. Damit war es zweifach potenter als Prodigiosin (**1a**) oder das synthetische Prodiginin Obatoclax (**23**) (Abbildung 74). Eine Verlängerung der Alkylketten im Falle der Prodiginine **1f** und **58b** erbrachte eine Reduktion der Aktivität mit sich und auch das Prodigininderivat **1j** mit einer terminalen Doppelbindung konnte keine gesteigerte Wirksamkeit aufweisen.



**Abbildung 74.** Einfluss von Prodigininen auf die Akkumulation von Autophagosomen in MCF7 Brustkrebszellen. **A:**  $EC_{50}$ -Werte für die Akkumulation von Autophagosomen in MCF7 Brustkrebszellen nach 3 h Inkubation mit dem Prodiginin Obatoclax (**23**)-Mesylat sowie mit den Prodigininen **1a**, **1c**, **1f**, **1j** und **58b**. **B:** Strukturformel des Prodiginins Obatoclax (**23**)-Mesylat. **C:** Strukturformeln der getesteten Prodiginine **1a**, **1c**, **1f**, **1j** und **58b**.

Das potenteste der getesteten Prodiginine, Prodiginin **1c**, wurde näher untersucht und eine Analyse der Proteinexpression *via* Western Blot durchgeführt (Abbildung 75). Die Untersuchung fand sowohl mit normalgenährten Zellen statt, als auch mit hungrigen Zellen. Die eGFP-LC3-MCF7 Zellen wurden vor der Western Blot Analyse für 3 h mit Prodiginin **1c** oder Chloroquin (**25**, Abbildung 75 B) inkubiert. Bei Chloroquin handelt es sich um einen bekannten Inhibitor der Fusion von Autophagosomen und Lysosomen.<sup>[335]</sup> Im Western Blot wurden LC3B-II und p62 detektiert sowie Aktin als Expressionskontrolle. LC3-II ist die lipidierte Form der LC3 Proteine, während p62 ein Autophagie Rezeptor ist, der für den Abbau markierte, ubiquitinierte Proteine binden und genauso mit LC3 Proteinen interagieren kann, um so die abzubauenen Proteine zu den Autophagosomen zu dirigieren.<sup>[333, 336, 337]</sup>

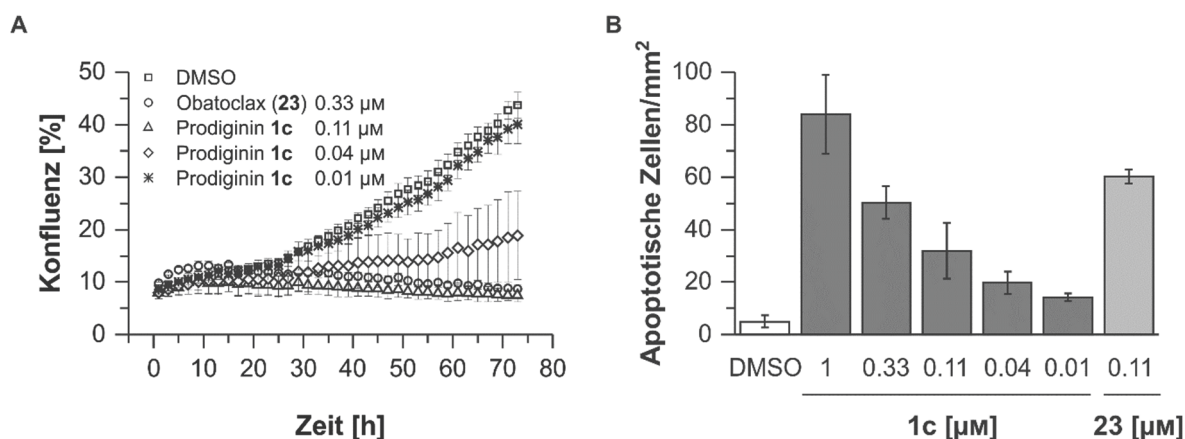




**Abbildung 75.** Analyse der Proteinexpression *via* Western Blot von genährten und hungernden eGFP-LC3-MCF7 Zellen nach Beeinflussung der Autophagieprozesse. Die eGFP-LC3-MCF7 Zellen wurden vor der Western Blot Analyse (**A**) für 3 h mit Prodiginin **1c** oder Chloroquin (**25**, **B**), einem bekannten Fusionsinhibitor von Autophagosomen und Lysosomen, inkubiert. Detektiert wurden LC3B-II und p62 sowie Aktin (Expressionskontrolle). [Abbildung nach <sup>[17, 197]</sup>; MEM = *minimum essential medium* (Vollmedium), EBSS = *Earle's balanced salt solution* (Hungermedium)]

Wie für einen Inhibitor der Fusion von Autophagosomen und Lysosomen erwartet, führte Prodiginin **1c** sowohl in normalgenährten Zellen als auch in hungernden Zellen zu einer Akkumulation der lipidierten LC3 Proteine (LC3-II) im Vergleich zur Expressionskontrolle Aktin. Dies erfolgte in viel stärkerem Maße als nach Inkubation mit Chloroquin (**25**). Auch die Hemmung des autophagischen Flusses wurde bestätigt, da Prodiginin **1c** den autophagischen Abbau von p62 nach Induktion der Autophagie durch Nährstoffmangel inhibiert.

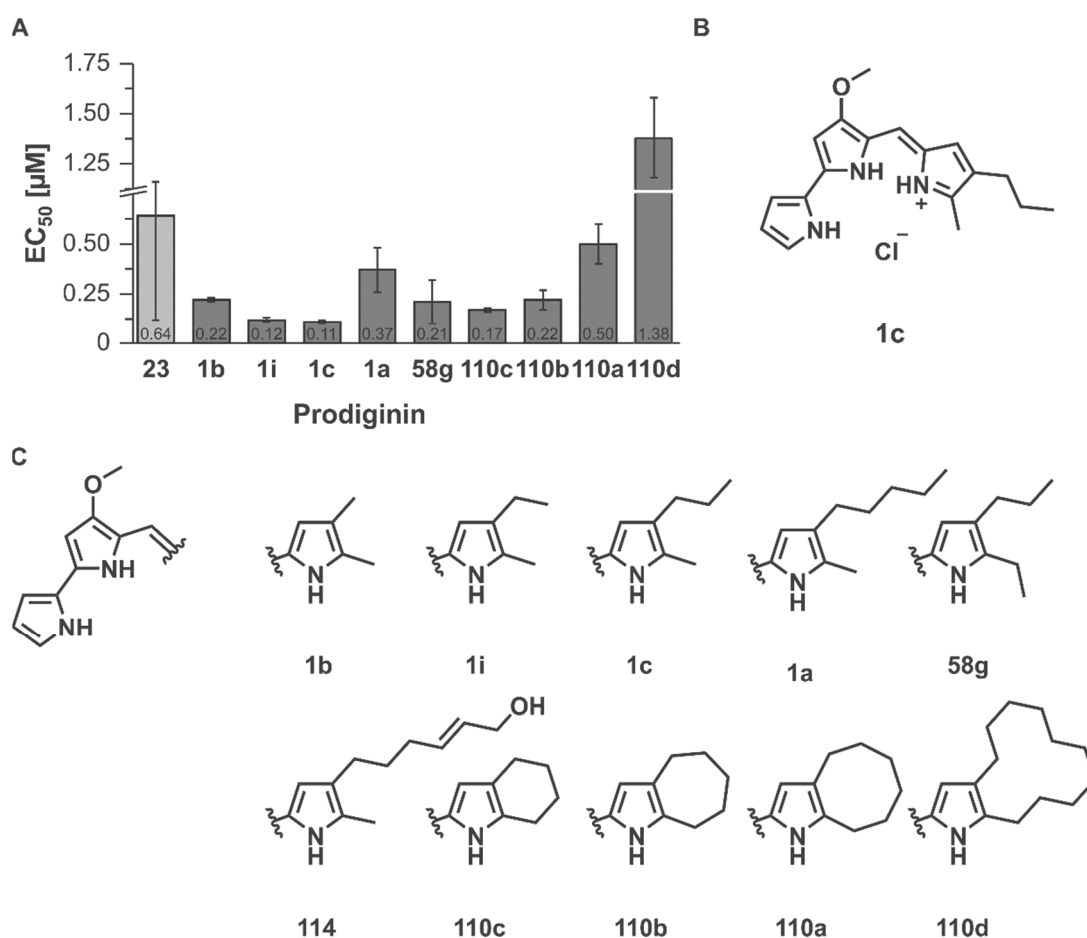
Darüber hinaus konnte eine durch Prodiginin **1c** verursachte dosisabhängige Wachstumshemmung beobachtet werden, die letztlich zur Induktion von Apoptose führte (Abbildung 76). Sowohl die Wachstumshemmung als auch die Apoptose wurden durch *Live-Cell-Imaging* von MCF7 Zellen untersucht. Die Wachstumshemmung konnte durch Bestimmung der Konfluenz ermittelt werden, welche die prozentuale Bedeckung der Kulturgefäßoberfläche durch adhärente Zellen beschreibt. Die Apoptose wurde durch Inkubation der MCF7 Zellen mit einer Caspase 3/7 selektiven Reagenz untersucht. Da es sich bei Caspasen um Proteasen handelt, die während der Apoptose aktiv sind, konnten bei den *Live-Cell-Imaging* Untersuchungen von MCF7 die Caspase 3/7 positiven, also apoptotischen, Zellen pro mm<sup>2</sup> erfasst werden.



**Abbildung 76.** Auswirkung von Prodiginin **1c** und Obatoclax (**23**) auf die Konfluenz von MCF7 Zellen (**A**) sowie deren Einfluss auf die Apoptose (**B**). [Abbildung nach <sup>[17, 197]</sup>]

Zwar hemmte Prodiginin **1c** die Autophagie stärker als Obatoclax (**23**), allerdings war die Apoptose-Induktion bei identischer Konzentration von 0.11 µM weniger stark ausgeprägt (Abbildung 76 B). Ursache hierfür könnte sein, dass das synthetische Prodiginin Obatoclax (**23**) für die Inhibition von Bcl-2 (engl. *B-cell lymphoma 2*), einem anti-apoptotischen Protein, optimiert wurde. Durch die Obatoclax (**23**)-induzierte Inhibition der anti-apoptotischen Bcl-2 Proteine wird die pro-apoptotische Wirkung gefördert.<sup>[115, 338, 339]</sup> So kann die beobachtete apoptotische Aktivität verschiedene Ursachen haben und daher auch stärker sein als bei Prodiginin **1c**.

Aufbauend auf den bis hierhin dargestellten initialen Ergebnissen sollte in erneuten physiologischen Tests zum einen die Wirkung der zyklischen Prodiginine **110a–110d** getestet werden, zum anderen galt es den Einfluss der Alkylkettenlänge am C-Ring der Prodiginine weiter zu untersuchen. Daher wurden für die physiologischen Tests die Prodiginine **1b**, **1i**, **58g** und **114** synthetisiert, bei denen die Alkylketten an 2- und 3-Position des C-Rings im Vergleich zum bisher potentesten Autophagieinhibitor Prodiginin **1c** verlängert oder verkürzt wurden. Neben den vorgenannten Prodigininen **1b**, **1i**, **58g** und **114** und den zyklischen Prodigininen **110a–110d** wurde auch erneut Prodigiosin (**1a**) im Vergleich zum synthetischen Derivat Obatoclax (**23**) in physiologischen Tests im Hinblick auf die Inhibition der Autophagie untersucht (Abbildung 77).



**Abbildung 77.** EC<sub>50</sub>-Werte für die Akkumulation von Autophagosomen in MCF7 Brustkrebszellen (**A**) nach 3 h Inkubation mit verschiedenen Prodigininen. Das Prodiginin **1c** (**B**) zeigt die niedrigsten EC<sub>50</sub>-Werte im Vergleich zu den anderen getesteten Prodigininen **1a**, **1b**, **1i**, **58g**, **110a–110d** und **114** (**C**).

Bei den Ergebnissen der physiologischen Tests zeigte sich zunächst, dass die EC<sub>50</sub>-Werte der zyklischen Prodiginine **110a–110d** verglichen mit Prodiginin **1c** größer waren, jedoch mit Ausnahme des Prodiginins **110d** alle getesteten zyklischen Prodiginine unter dem Wert für das synthetische Prodiginin Obatoclax (**23**) lagen. Darüber hinaus wurde bei Betrachtung der EC<sub>50</sub>-Werte ersichtlich, dass mit steigender Ringgröße der zyklischen Prodiginine **110a–110d** eine Erhöhung der EC<sub>50</sub>-Werte einhergeht. Bei Betrachtung der verschiedenen Alkylkettenlängen der Prodiginine wies weiterhin das Prodiginin **1c** den geringsten EC<sub>50</sub>-Wert auf, wobei das Prodiginin **1i** mit einem Ethyl- anstelle eines Propylsubstituenten allerdings ähnliche Wirksamkeit zeigt, wenn auch nicht bessere. Eine weitere Verkürzung der Alkylsubstituenten zu zwei Methylgruppen (Prodiginin **1b**) führte nicht zu höherer Wirksamkeit, und auch Prodiginin **58g** mit Ethyl- und Propylsubstituenten zeigte keine niedrigeren EC<sub>50</sub>-Werte als Prodiginin **1c**. Das hydroxylierte Prodiginin **114** wurde ebenfalls den physiologischen Testungen unterzogen, jedoch stellte sich heraus, dass dieses Derivat keinerlei Aktivität als Autophagieinhibitor besitzt.

Sowohl für die getesteten zyklischen Prodiginine **110a–110d** als auch die alkylierten Prodiginine **1a–1c**, **1i** und **58g** zeigte sich, dass eine Vergrößerung der Substituenten zu einem negativen Einfluss auf die Wirksamkeit als Autophagieinhibitor führt, was mit den Ergebnissen aus dem initialen *Screening*

konform ist. Auch wenn die molekulare Zielstruktur der Prodiginine unbekannt ist, so lässt sich doch mutmaßen, dass die räumliche Struktur der Prodiginine mit größeren (zyklischen) Alkylsubstituenten einen zu hohen sterischen Anspruch hat und die Bindung an die Zielstruktur nicht ausreichend ausgebildet werden kann. Diese Begründung kann für das Prodiginin **1b** mit zwei Methylsubstituenten nicht herangezogen werden. Im Umkehrschluss ließe sich allerdings vermuten, dass auch eine zu schwache Interaktion aufgrund zu kleiner Substituenten zu geringerer Wirksamkeit führen kann. Ebenso kann in Betracht gezogen werden, dass längere *n*-Alkylgruppen zu stark mit den Lipiden der Zellmembran interagieren und aufgrund dessen nur schwerlich an die unbekannte molekulare Zielstruktur gelangen. Eine Inhibition der Autophagie konnte für Prodiginin **114** nicht beobachtet werden, so dass die terminale Hydroxygruppe als ursächlich hierfür vermutet werden kann und Grund für eine mangelnde Membrangängigkeit dieses Prodiginins sein könnte, die letztlich die fehlende Wirksamkeit bedingt

### 6.4.3 Synopsis des Kapitels

- Sieben Prodiginine wurden gegenüber den biotechnologisch relevanten Hefen *P. pastoris* und *S. cerevisiae* getestet. Die Hefen tolerierten Prodiginine besser als Gram-positive und schlechter als Gram-negative Bakterien. *P. pastoris* zeigte eine höhere Toleranz der Prodiginine als *S. cerevisiae*.
- Acht Prodiginine wurden auf deren Wirksamkeit gegenüber fünf fakultativ humanpathogenen Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien und einen Modellorganismus getestet. *S. marcescens* und *P. aeruginosa* zeigten keine Wachstumsinhibition durch Prodiginine. Gram-positive Bakterien wurden im Wachstum stark beeinflusst.
- Fünf verschiedene Prodiginine wurden auf deren Bioaktivität gegenüber humanen MCF7 Brustkrebszellen getestet. Prodiginin **1c** war der wirksamste Inhibitor der Autophagie ( $EC_{50} = 150 \text{ nM}$ ) und des Zellwachstums und induzierte zudem die Apoptose. Prodiginin **1c** ist wirksamer als das synthetische Prodiginin Obatoclax (**23**) und der Autophagieinhibitor Chloroquin (**25**).
- Prodiginin **1i** ( $EC_{50} = 0.12 \text{ }\mu\text{M}$ ) zeigte in einer zweiten Testreihe mit acht noch nicht untersuchten Prodigininen ähnliche Wirksamkeit wie Prodiginin **1c** ( $EC_{50} = 0.11 \text{ }\mu\text{M}$ ) bei Inhibition der Autophagie.

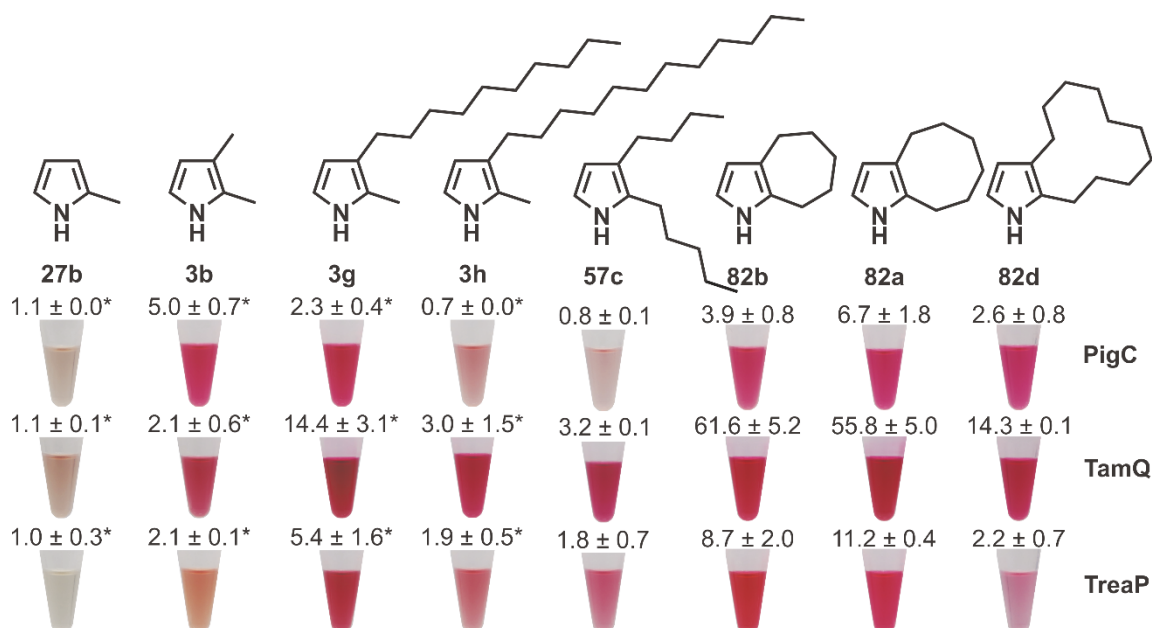
## 7 Zusammenfassung und Ausblick

### 7.1 Neue Enzyme für die Prodigininsynthese

#### 7.1.1 Ligasen für die Prodigininsynthese

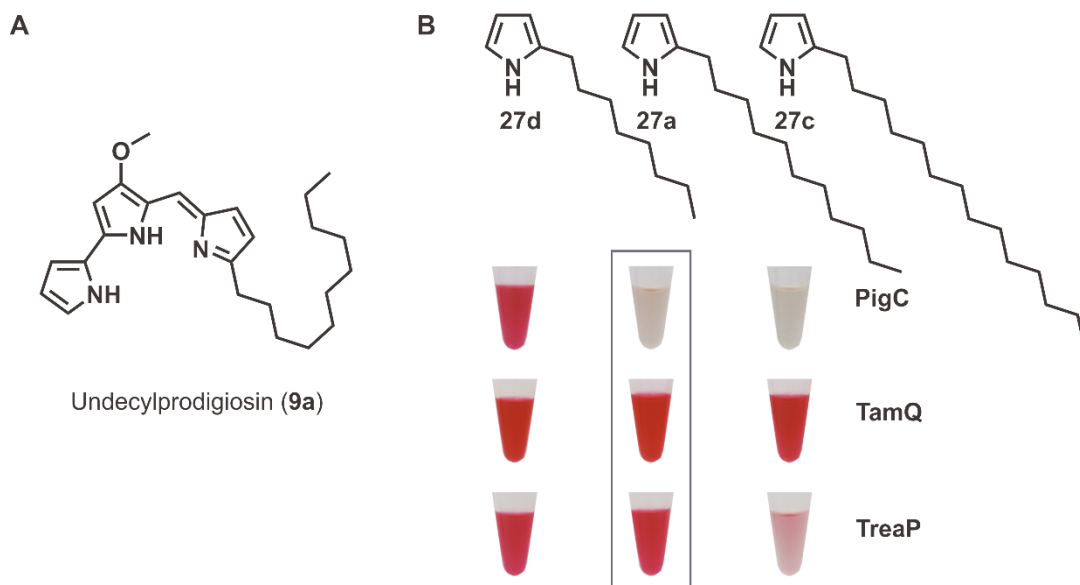
Der Startpunkt des ersten Projekts dieser Doktorarbeit war die Suche nach Kondensationsenzymen mit anderer Chemoselektivität als das im Arbeitskreis bereits untersuchte Enzym PigC aus *S. marcescens*. Der Einsatz neuer Kondensationsenzyme sollte enzymatischen Zugang zu auf diesem Weg bisher nicht adressierbaren Prodigininen ermöglichen. Durch Proteinsequenzabgleiche und Suchen in Datenbanken des NCBI (Bethesda, MD, USA) mithilfe des BLAST-Algorithmus und darauf aufbauenden Genclusteranalysen konnten verschiedene Ligasen identifiziert werden, die das Substratspektrum von PigC ergänzen könnten. Von den fünf zur näheren Untersuchung ausgewählten Kondensationsenzymen konnten zwei, RedH aus *S. coelicolor* A3(2) und McpH aus *S. longispororuber*, nicht funktional in *E. coli* produziert werden. Als alternativer Expressionswirt zu *E. coli* sollte zukünftig *P. putida* KT2440 getestet werden, da mutmaßlich der hohe GC-Gehalt der *Streptomycetaceae* Gene zur problematischen Klonierung und Expression führte, *P. putida* aber verglichen mit *E. coli* einen höheren GC-Anteil im Genom aufweist. Das dritte Kondensationsenzym aus *Streptomycetaceae*, MarH aus *S. sp.* CNQ-617, konnte schwach aktiv in *E. coli* produziert werden. Für die letzten beiden Ligasen TamQ und TreaP aus *Pseudalteromonadaceae*, welche ursprünglich die Kondensationsreaktion in der Tambjamin Biosynthese katalysieren, gelang die erfolgreiche Klonierung und Produktion aktiven Enzyms.<sup>[135, 176, 201]</sup>

Bei der näheren Untersuchung der Ligasen TamQ und TreaP mittels *in vitro* Assays zeigte sich, dass diese nicht nur ihr natürliches Substrat, das primäre Amin DDA (**28a**) umsetzen. Auch das Monopyrrol MAP (**3a**) wurde als Substrat angenommen und so Prodigiosin (**1a**) aus der Kondensationsreaktion hervorgebracht. Die Akzeptanz des unnatürlichen Monopyrrols durch diese Kondensationsenzyme schließt somit die Lücke zwischen zwei strukturell sehr nahe verwandten Naturstoffen, den Tambjaminen und Prodigininen. Die Akzeptanz des Monopyrrols MAP (**3a**) durch die Enzyme TamQ und TreaP aus *P. tunicata* D2 bzw. *P. citrea* ermöglichte eine weitere Analyse des Substratspektrums beider Ligasen im Vergleich zum Kondensationsenzym PigC, dessen Substratspektrum ebenfalls mit bisher nicht getesteten Monopyrrolen weitergehend analysiert wurde. Diese Untersuchungen zeigten wesentliche Unterschiede in der Chemoselektivität auf (Abbildung 78).



**Abbildung 78.** Ausschnitt aus dem Substratspektrum der Kondensationsenzyme PigC, TamQ und TreaP. [Angaben zur Quantifizierung der Prodigiosine sind in mg/L.; \* = Für Berechnung der Quantifizierung wurden berechnete und nicht experimentell bestimmte Extinktionskoeffizienten genutzt]

Die Unterschiede zwischen den Ligasen zeigten sich vor allem in der Akzeptanz langkettiger Pyrrole durch TamQ. Ebenso war eine starke Umsetzung zyklischer Pyrrole sowohl durch TamQ als auch TreaP zu beobachten (Abbildung 78). Neben der Umsetzung langkettiger Pyrrole durch TamQ und TreaP und der vergleichenden Analyse der Substratspektren, konnte der enzymatische Zugang zu Undecylprodigiosin (**9a**) und Derivaten durch den Einsatz der Ligasen aus *Pseudoalteromonadaceae* erzielt werden (Abbildung 79). Der enzymatische Zugang zu Undecylprodigiosin (**9a**) war zuvor durch das eingeschränkte Substratspektrum von PigC nicht realisierbar.



**Abbildung 79.** Enzymatischer Zugang zu Undecylprodigiosin (**9a**) und Derivaten durch die Nutzung der Kondensationsenzyme TamQ und TreaP. **A:** Struktur von Undecylprodigiosin (**9a**). **B:** Ausschnitt aus dem Substratspektrum der Kondensationsenzyme PigC, TamQ und TreaP. Durch den Kasten hervorgehoben sind die Ergebnisse für den Undecylprodigiosin (**9a**) Precursor 2-UP (**27a**).

Eine enzymatische Umsetzung von 1*H*-Pyrrol (**4**) und anderen fünfgliedrigen Heteroaromaten und Indolen **102** konnte hingegen nicht erzielt werden, sodass eine Enzym basierte Produktion von Indolprodigiosin (**103a**) oder Derivaten nicht möglich war. Die chemische Synthese von Indolprodigiosin (**103a**) gelang zwar, jedoch wies dieses Molekül sehr schlechte Lagerstabilität auf.

Zusätzlich zur Analyse des Substratspektrums erfolgten kinetische Untersuchung der Ligasen. In vorangegangenen Arbeiten konnte für das Kondensationsenzym PigC eine Substratüberschussinhibierung in Abhängigkeit von der Kettenlänge der eingesetzten Monopyrrole festgestellt werden. Hierbei führten längere *n*-Alkylketten zu stärkerer Inhibierung.<sup>[17]</sup> Die Enzyme TamQ, TreaP und PigC zeigten in den weiterführenden kinetischen Untersuchungen im Rahmen der vorliegenden Arbeit ebenfalls ein divergierendes Verhalten in Bezug auf die Enzyminhibierung. Herauszustellen ist hier die Tatsache, dass die Substratüberschussinhibierung durch langkettige Monopyrrole für TamQ nur in sehr geringem Ausmaße gegeben war. Somit stellt dieses Enzym eine Ergänzung zu PigC dar und bietet die Möglichkeit der enzymatischen Synthese von Prodigininen, die unter Nutzung der Ligase PigC nicht oder nur schwer adressierbar waren.

Die drei Ligasen PigC, TamQ und TreaP wurden ebenfalls erstmalig in einem Biokatalyseansatz im semi-präparativen Maßstab eingesetzt. Dieser Ansatz ermöglichte die Synthese des Prodiginins **110a** in Mengen  $\leq 23.5$  mg. Da der Biokatalyseansatz mit der *in-situ* Produktentfernung kombiniert wurde, konnte auch eine einfache Isolierung des Prodiginins **110a** erfolgen.

### 7.1.2 Perspektiven und Anknüpfungspunkte

Basierend auf den zuvor zusammengefassten und in dieser Arbeit erzielten Ergebnissen zu neuen Kondensationsenzymen für die Prodigininsynthese ergeben sich diverse Anknüpfungspunkte für künftige Arbeiten.

#### Mutasyntese und Biokatalyse unter Nutzung von TamQ

Die Nutzung der Vorteile des Mutasyntese-Konzeptes wie die Breitstellung des Bipyrrrol-Bausteins MBC (**2**) durch den Mutasyntesewirt sollte künftig mit den Vorteilen des Kondensationsenzyms TamQ kombiniert werden. Basierend auf dem bisher genutzten Mutasyntesestamm *P. putida* pig-r2 ΔpigD sollte ein Austausch des Gens *pigC* mit dem für die Ligase TamQ codierenden Gen *tamQ* erfolgen. Die chromosomale Integration des Gens *tamQ* sollte einem plasmidbasierten Konzept eher vorgezogen werden, da Vorversuche mit dem Mutasyntesestamm *P. putida* pig-r2 ΔpigD und plasmidbasierter Expression von TamQ keine vielversprechenden Ergebnisse erbrachten (Daten nicht gezeigt). Ein neuer Mutasyntesestamm, bei dem *pigC* gegen *tamQ* ausgetauscht wurde, kann die Produktion vor allem langkettiger Prodiginine ermöglichen und ebenso den mutasyntetischen Zugang zu Undecylprodigiosin (**9a**) und Derivaten eröffnen. Die Mutasyntese-Strategie zeigt allerdings u. a. dann Limitationen, wenn die *Precursor* die bakterielle Zellwand nicht überwinden können. Hier bietet der Biokatalyseansatz im semi-präparativen Maßstab mit den drei Kondensationsenzymen PigC, TamQ und TreaP und unter Nutzung der *in-situ* Produktentfernung künftig eine alternative Methode. So kann ein Zugang zu Prodigininen, die *via* Mutasyntese nicht herstellbar sind, ermöglicht werden. Auch im Falle kinetischer Racematspaltung könnte der Biokatalyseansatz neue Möglichkeiten eröffnen.

#### Erweiterung des Enzymportfolios

Das Portfolio an nutzbaren Kondensationsenzymen, das bisher PigC, TamQ und TreaP umfasst, kann künftig ebenfalls erweitert werden. So könnte zum einen das Substratspektrum des Kondensationsenzyms MarH aus *S. sp.* CNQ-617 weiter untersucht werden. Dieses konnte in *E. coli* produziert werden, wies aber nur schwache Aktivität gegenüber dem Substrat 2-UP (**27a**) auf. Dennoch könnte diese Ligase künftig einen Zugang zu Undecylprodigiosin (**9a**) und Derivaten ermöglichen. Hier sollte vor allem das Potential des Enzyms in Bezug auf die Umsetzung verschiedener hydroxylierter Monopyrrole ermittelt werden.

Die Sequenzvergleiche und Genclusteranalysen, die letztlich zur Nutzung der Enzyme TamQ und TreaP führten, gaben bei erneuter Untersuchung auch Hinweise auf ein weiteres Kondensationsenzym, TabH, welches im Arbeitskreis bisher noch nicht in den Fokus rückte. Das entsprechende Gencluster (Abbildung 80) wurde erst kürzlich im Stamm *Streptomyces albus* NRRL B-2362<sup>30</sup> entdeckt und beschrieben, obwohl eine Struktur für das biologisch aktive Tambjamine BE-18591 (**26h**), dem

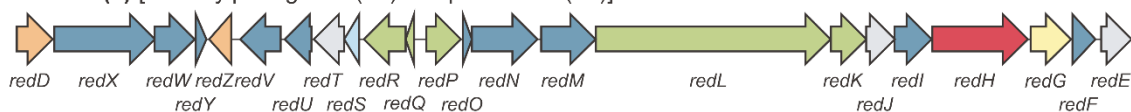
---

<sup>30</sup> Der Produzent von Tambjamine BE-18591 (**26h**) wird in den Publikationen von Kojiri et al., Nakajima et al. und Tanigaki et al. mit *S. sp.* BA18591 benannt. [146, 147, 161]

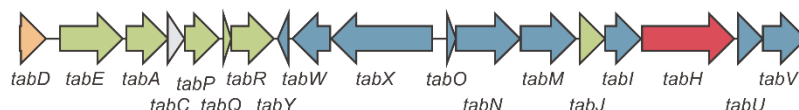


Reaktionsprodukt der TabH katalysierten Reaktion, bereits zuvor in verschiedenen Literaturstellen angegeben wurde.<sup>[146, 147, 161, 340]</sup>

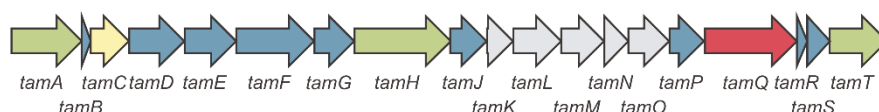
***S. coelicolor* A3(2)** [Undecylprodigiosin (**9a**)/Streptorubin B (**12**)]



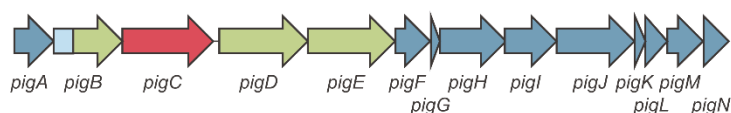
***S. albus* NRRL B-2362** [Tambjamine BE-18591 (**26h**)]



***P. tunicata* D2** [Tambjamine YP1 (**26a**)]

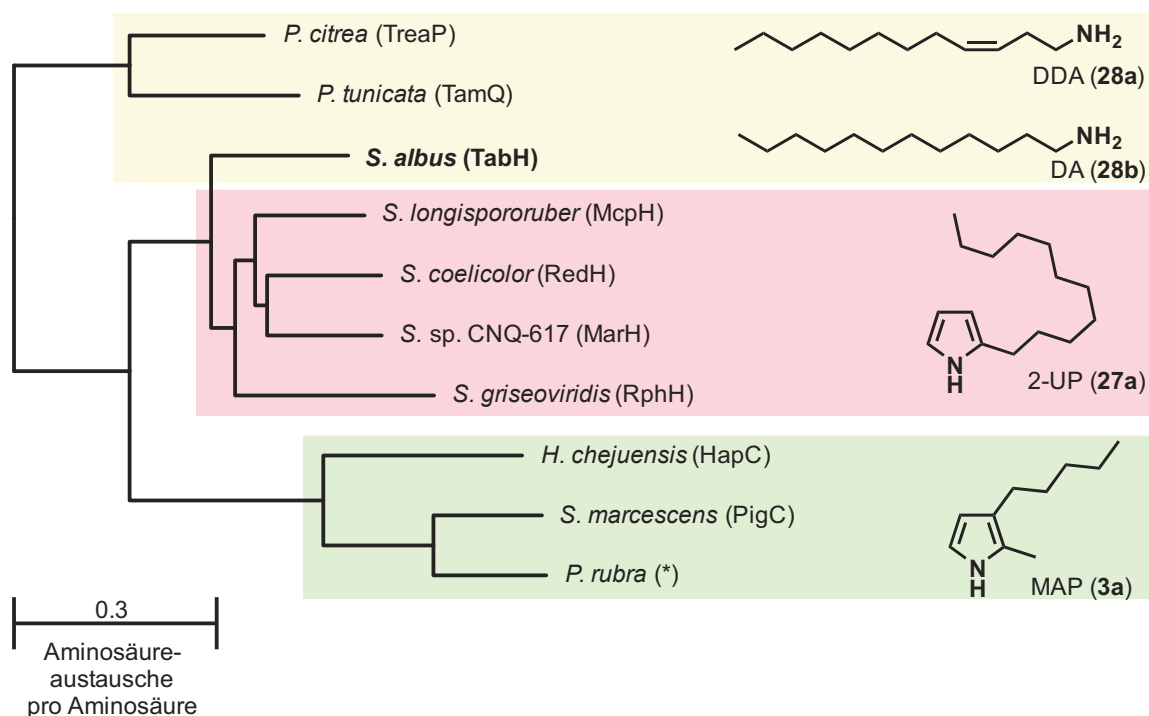


***S. marcescens* WW4** [Prodiginin (**1a**)]



**Abbildung 80.** Gencluster ausgewählter Tambjamine- und Prodigininproduzenten. [DA = Dodecan-1-amin (**28b**)].

Auffallend an Tambjamine BE-18591 (**26h**) ist, dass es sich um das einzige bisher bekannte Tambjamine handelt, welches von einem *Streptomyces* produziert wird. TabH aus *S. albus* NRRL B-2362 ist zwar wie die Kondensationsenzyme aus *P. citrea* und *P. tunicata* D2 an der Tambjamine Biosynthese beteiligt, jedoch offenkundig näher mit den Ligasen Prodiginin produzierender *Streptomyces* Arten verwandt. Die Verwandtschaft zu *Streptomyces* wird sowohl an der Organisation des Genclusters (Abbildung 80) deutlich, als auch bei Betrachtung des um TabH erweiterten phylogenetischen Stammbaums der Kondensationsenzyme (Abbildung 81).



**Abbildung 81.** Phylogenetischer Baum einer Auswahl an Kondensationsenzymen und den zugehörigen Organismen, die Prodiginine oder Tambjamine produzieren. Die Edukte der Kondensationsreaktion sind ebenfalls dargestellt. Der phylogenetische Baum wurde mit dem Online Programm COBALT erstellt und die Suche nach Kondensationsenzymen zuvor mittels BLAST durchgeführt.<sup>[194, 195]</sup> [Abbildung basierend auf Dissertationsschrift Dr. Andreas S. Klein.<sup>[17]</sup> Das Protein aus *P. rubra* (\* = WP\_125559948.1) wurde noch nicht benannt].

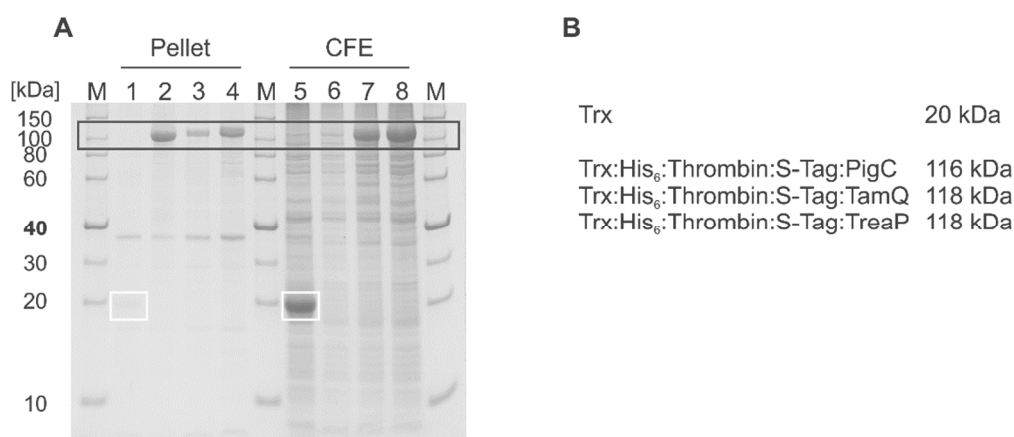
Daher kann die Ligase TabH eine interessante Erweiterung des aktuellen Enzymportfolios darstellen und die heterologe Expression und Untersuchung des Substratspektrums dieses Kondensationsenzym sollte in Betracht gezogen werden. Zu vermuten ist, dass TabH eine ähnliche aber nicht zu TamQ und TreaP identische Chemo-selektivität aufweist und somit den Zugang zu weiteren Prodigininen ermöglichen kann.

### Reinigung der Kondensationsenzyme

Neben der Erweiterung des Enzymportfolios um bisher nicht untersuchte Ligasen, sollte eine Reinigung und Isolierung der Enzyme TamQ, TreaP und PigC angestrebt werden. Diese Enzyme wurden im Arbeitskreis bisher nur in Form von Zelllysat oder isolierter Membranfraktion nach heterologer Expression in *E. coli* eingesetzt. Eine erfolgreiche Isolierung mit einer hohen Reinheit des Proteins TamQ oder auch PigC und TreaP sollte schließlich das Erhalten einer Kristallstruktur als Ziel haben. Die Kristallstruktur(en) würden zum einen die beobachteten Substratspektren erklären können und Rückschlüsse auf die Selektivität zulassen. Andererseits eröffnet sich auf Basis einer Strukturaufklärung auch die Möglichkeit der gezielten Modifikation der Kondensationsenzyme mittels rationalem Proteindesign. Eine Optimierung kann auch unter Nutzung ungerichteter Methoden wie *directed evolution*, beispielsweise hinsichtlich der Akzeptanz unnatürlicher Derivate die zu jetzigem Zeitpunkt nicht umgesetzt werden können, erfolgen.<sup>[341-345]</sup> Neben der Verbesserung der Akzeptanz vor allem kurzkettiger 2,3-dialkylierter Pyrrole, was von M. Sc. Stefanie Brands (Lehrstuhl für

Biotechnologie der RWTH Aachen) bereits untersucht wird, ist darüber hinaus auch eine Optimierung im Hinblick auf andere Heteroaromaten wie Indole **102** denkbar. Da in den Masterarbeiten von M. Sc. David P. Klebl und M. Sc. T. Moritz Weber bereits die Enantioselektivität des Enzyms PigC gegenüber chiralen, zyklischen Pyrrolen **111** und **112** gezeigt (Enantiomerenüberschuss von 68–73 %) und weitergehend untersucht wurde, kann es auf Basis einer Kristallstruktur und *in silico* Modellierungen möglich sein zunächst Gründe für die beobachtete Selektivität zu finden und diese unter Umständen zu verbessern.<sup>[248, 310, 341, 342, 346]</sup>

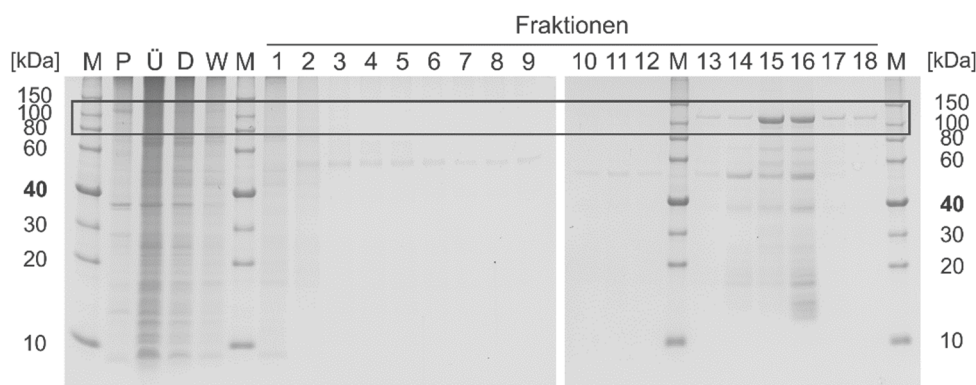
Eine Strategie zur löslichen Produktion und Isolierung des Kondensationsenzym aus *P. citrea* unter Nutzung des Vektorsystems pET32a(+) wurde 2019 von Picott *et al.* veröffentlicht und sollte künftig als Basis für weitere Versuche dienen.<sup>[176]</sup> So wurden in initialen Versuchen zur Isolierung der Kondensationsenzyme im Rahmen dieser Arbeit die Gene *tamQ*, *treaP* und *pigC* in Anlehnung an die Klonierungsstrategie<sup>31</sup> von Picott *et al.* in den Vektor pET32a(+) kloniert (Primer HB101–106). Ebenso konnten Bedingungen für eine gute Expression von *tamQ* und *treaP* gefunden werden (Expression: Kapitel 8.4.1.2.3; Vektorkarten: Kapitel 9.6.3, Abbildung A 29–Abbildung A 31). Lediglich für das Enzym PigC konnte bisher keine Produktion in löslicher Form erzielt werden (Abbildung 82), sodass sich hier der Bedarf künftiger weiterer Optimierungen zeigt.



**Abbildung 82.** SDS-PAGE Analyse der Expression von *pigC*, *tamQ* und *treaP* in *E. coli* BL21(DE3) unter Nutzung des pET32a(+) Vektors. **A:** SDS-PAGE nach Expression der Kondensationsenzyme PigC, TamQ und TreaP (schwarze Markierung). [1, 5 = Leervektor; 2, 6 = PigC; 3, 7 = TamQ; 4, 8 = TreaP; M = Marker (Roti®-Mark 10–150)]. **B:** Erwartete Größen der entsprechenden Proteinkonstrukte. [Trx = Thioredoxin (Löslichkeitstag, weiße Markierung); S-Tag = Tag für Reinigung und Detektion].

Da jedoch TamQ und TreaP erfolgreich in löslicher Form produziert werden konnten, wurde ein erster Versuch zur Isolierung des Kondensationsenzym TamQ *via* IMAC (engl. *immobilized metal ion affinity chromatography*) durchgeführt (Kapitel 8.5.4.2).

<sup>31</sup> N-terminal ist das Gen mit Thioredoxin als Löslichkeitstag fusioniert. Zwischen den beiden Elementen befindet sich zusätzlich ein His<sub>6</sub>-Tag, eine Thrombinschnittstelle und die Sequenz für einen S-Tag. Das S-Tag-System kann zur Reinigung des Zielproteins oder zum Nachweis genutzt werden und basiert auf Interaktion des S-Tag-Peptids mit dem Ribonuklease S-Protein.<sup>[347]</sup>

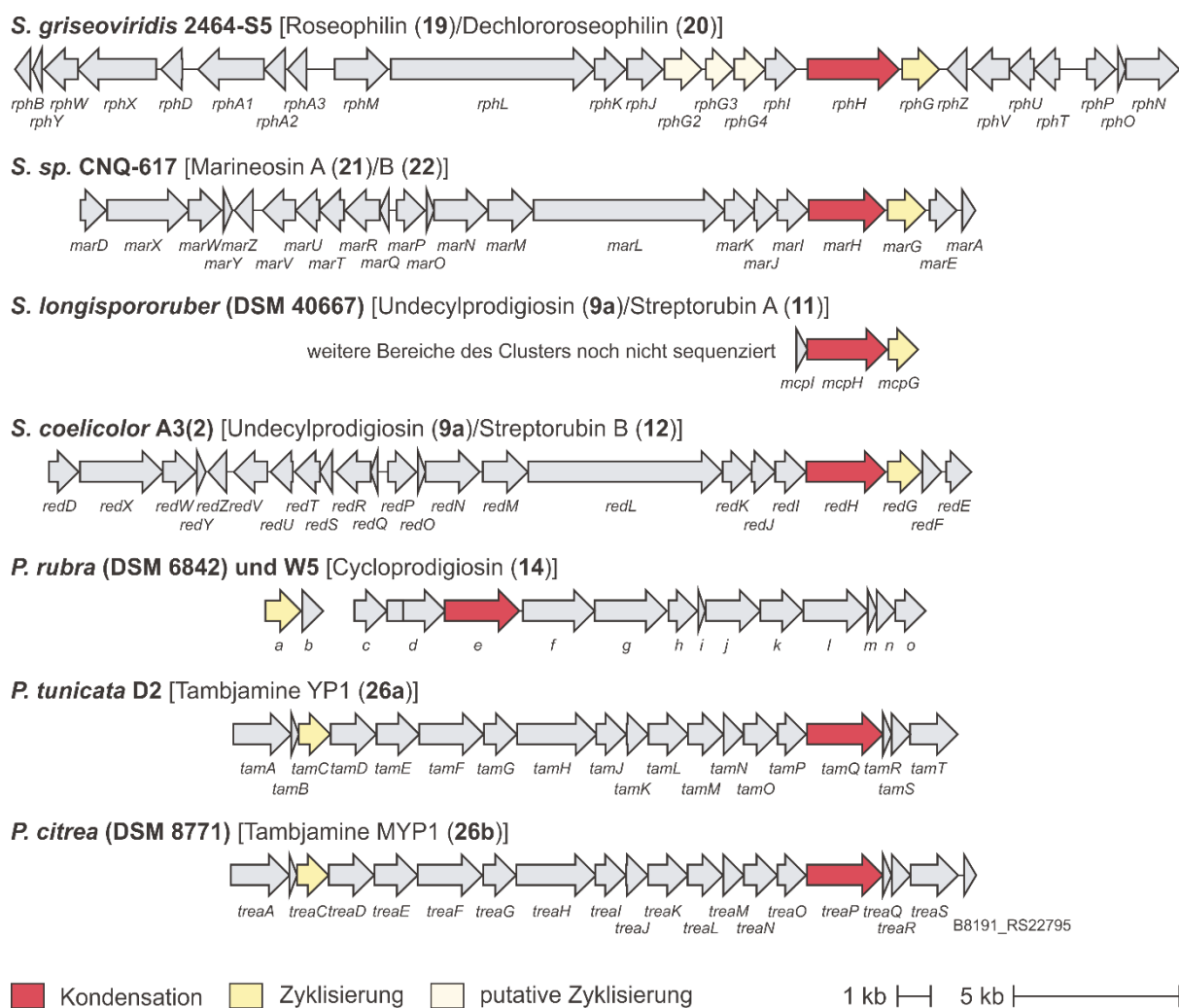


**Abbildung 83.** SDS-PAGE Analyse der Isolierung des TamQ-Konstrukts (118 kDa) *via* IMAC. [P = Pellet, Ü = Überstand (1:3 verdünnt), D = Durchfluss bei Beladen der Säule (1:3 verdünnt), W = Eluat bei Waschen der Säule (1:3 verdünnt), 1–18 = aufgefangene Fraktionen (unverdünnte Proben), M = Marker (Roti®-Mark 10–150)].

Die Bande des Zielproteins konnte in den Fraktionen 13–18 der SDS-PAGE (Abbildung 83) identifiziert werden und in den entsprechenden Proben *via in vitro* Assays Enzymaktivität nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Die Reduktion der Nebenbanden zeigt eine Verbesserung des Reinheitsgrads, dennoch sollte in Zukunft die Reinigungsstrategie überarbeitet und optimiert werden. Denkbar ist eine vorausgehende Ultrazentrifugation des Lysats, um die Membranfraktion bereits abzutrennen. Darauf folgend kann z. B. eine Kombination aus Affinitätschromatographie, Ionenaustauschchromatographie und abschließender Größenausschlusschromatographie angewandt werden, wobei möglicherweise bereits eine Kombination aus zwei Chromatographiemethoden für eine erfolgreiche Isolierung ausreichend ist.

### Zyklasen als mögliche Erweiterung des Enzymportfolios

Vor allem die Nutzung des Kondensationsenzym TamQ ermöglichte, wie anfangs beschrieben, den enzymatischen Zugang zu Undecylprodigiosin (**9a**) und Derivaten. Bei vielen Stämmen, die Undecylprodigiosin (**9a**) produzieren, folgt auf die Kondensationsreaktion eine Zyklisierung, die zu verschiedenartigen Ringstrukturen führt. So setzt z. B. die Zyklase RedG aus *S. coelicolor* A3(2) Undecylprodigiosin (**9a**) zum zyklischen Prodiginin Streptorubin B (**12**) um.<sup>[45, 65, 189-191, 348]</sup> Um Zugang zu zyklischen Prodigininderivaten zu erlangen, wurde die *Rieske*-Nicht-Häm-Eisen-Oxygenase RedG bereits in vorangegangenen Arbeiten durch Fusion mit dem *Maltose-Binding-Protein* erfolgreich löslich exprimiert, ebenso wie alle für den Elektronentransport nötigen Proteine. Dennoch konnte abschließend keine zuverlässige Aussage über eine Aktivität der Zyklase getroffen werden, so dass zyklische Prodigininstrukturen im Arbeitskreis bisher nicht *via* Oxygenasen adressierbar waren.<sup>[17]</sup> Da Undecylprodigiosin (**9a**) nun u. a. durch TamQ enzymatisch herstellbar ist, stellte sich erneut die Frage nach einer Enzym katalysierten Zyklisierung, sodass im Zuge der Genclusteranalysen der Fokus daher auch auf verschiedene zu RedG homologe Enzyme gelenkt wurde (Abbildung 84).



**Abbildung 84.** Gencluster ausgewählter Tambjamin- und Prodigininproduzenten. Farblich hervorgehoben sind nur die entsprechenden Gene der Kondensationsenzyme sowie (putativer) Zyklasen.

Dabei fielen vor allem die putativen Zyklasen im Tambjamin Gencluster der *Pseudoaltermonadaceae* *P. citrea* und *P. tunicata* D2 auf. Der Hinweis auf das Vorhandensein einer Zyklase in *P. citrea* wurde ebenfalls durch die Publikation von *Picott et al.* gegeben, welche den von *P. citrea* produzierten Naturstoff als das zyklische Tambjamin MYP1 (26b) identifizierten.<sup>[137]</sup> Eine weitere Untersuchung oder Charakterisierung der Zyklasen fand bisher noch nicht statt.

Ebenfalls erst kürzlich entdeckt wurde die Zyklase aus *P. rubra*, welche die Bildung von Cycloprodigiosin (14) aus Prodigiosin (1a) katalysiert. Dieses Enzym besitzt jedoch keinerlei Ähnlichkeit zu *Rieske*-Nicht-Häm-Eisen-Oxygenasen wie RedG, sondern ähnelt AGMOs (Kapitel 5.4.8 und 6.2.1.2).<sup>[265]</sup> Bei Sequenzvergleichen auf Aminosäureebene mithilfe des BLAST-Algorithmus zeigte sich, dass die Zyklasen aus *P. citrea* und *P. tunicata* D2 eine ca. 33%ige Ähnlichkeit zur *Rieske*-Nicht-Häm-Eisen-Oxygenase RedG zeigen, jedoch keinerlei Sequenzidentität mit dem Enzym aus *P. rubra* aufweisen (Tabelle 14).<sup>[195]</sup>

**Tabelle 14.** Übersicht über verschiedene Zyklasen aus Prodiginin- und Tambjamin produzierenden Organismen.

| Zyklase | Organismus                 | NCBI accession number | Ähnlichkeit zu RedG             | Ähnlichkeit zu WP_010386914.1   |
|---------|----------------------------|-----------------------|---------------------------------|---------------------------------|
|         |                            |                       | Abdeckung [%]/<br>Identität [%] | Abdeckung [%]/<br>Identität [%] |
| RedG    | <i>S. coelicolor</i> A3(2) | NP_630017.1           | 100/100                         | 0/0                             |
| MarG    | <i>S. sp.</i> CNQ-617      | AHF22859.1            | 90/35                           | 0/0                             |
| McpG    | <i>S. longispororuber</i>  | AEL16995.1            | 90/33                           | 0/0                             |
| RphG    | <i>S. griseoviridis</i>    | BAG84256.2            | 75/65                           | 0/0                             |
| TreaC   | <i>P. citrea</i>           | WP_010362069.1        | 96/59                           | 0/0                             |
| TamC    | <i>P. tunicata</i> D2      | WP_009837241.1        | 77/60                           | 0/0                             |
|         | <i>P. rubra</i>            | WP_010386914.1        | 0/0                             | 100/100                         |

Auch ein Sequenzvergleich *via* Clustal Omega, bei dem die Sequenz der gut untersuchten *Rieske*-Nicht-Häm-Eisen-Oxygenase NDO aus *P. putida* mit einbezogen wurde, verdeutlicht, dass es sich sehr wahrscheinlich auch bei TamC und Treac um *Rieske*-Nicht-Häm-Eisen-Oxygenasen handelt (Abbildung 85).<sup>[349, 350]</sup> Sowohl das CXH-Motiv, die Bindestelle für das [2Fe-2S] *Rieske*-Cluster, als auch das Sequenzmotiv E/DXXHXXXXH sind hoch konserviert und bei allen Zyklasen aufzufinden. Das letztgenannte Motiv ist für die Bindung des Nicht-Häm-Eisens verantwortlich, wobei der Aspartatrest, bzw. Glutamatrest im Falle von RedG und Homologen, als Elektronenüberträger fungiert.<sup>[45, 187, 188, 190, 351-353]</sup>

```

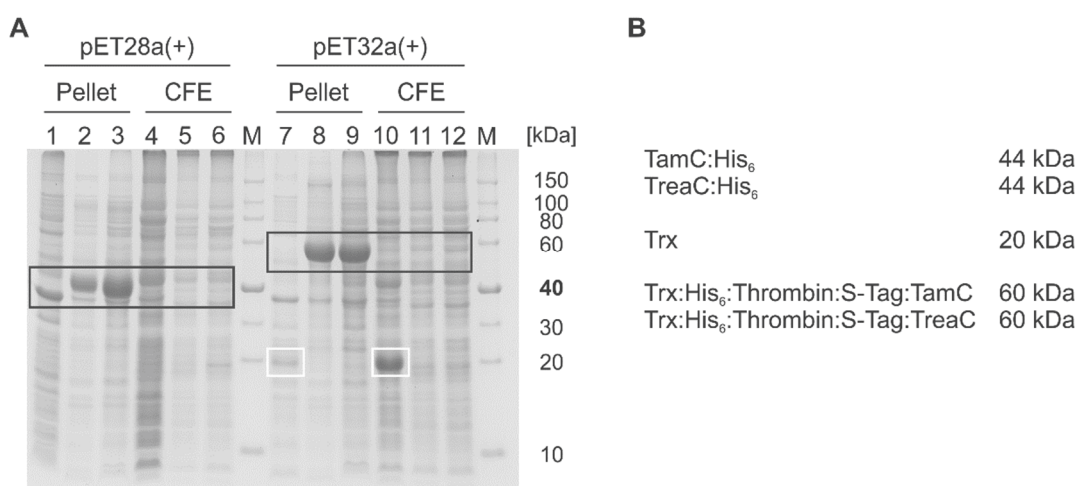
NDO      (P. putida)      ...RAFLNVCRHRGKTLVSVEAGNAKGFVCSYHGWGF...NFGVDAYHVGWTHASSL...
TreaC    (P. citrea)    ...VCLDDRCPHKGVKLSLGQ-QHGDIIACPYHGFQY...ESVCEIYHIPFVHKGSA...
TamC     (P. tunicata)  ...VCMDDKCPHKGVMLSRGK-QHGDIIACPYHGFQF...ESVCEIYHIPFVHKGSA...
RphG     (S. griseoviridis) ...VCQQARCPHKGANLADGR-VMGNSVECPYHGFRF...ESTLEFYHITFVHRGHW...
McpG     (S. longispororuber) ...VCQSARCPHKGANLADGR-LVGNSVACPYHGFRF...ESLLEFYHVTYVHRDHW...
RedG     (S. coelicolor A3(2)) ...VCQGARCPHKGANLGDGR-MKGNTIECPYHGFRY...ESLLEFYHVTYVHRDHW...
MarG     (S. sp. CNQ-617) ...VCQGARCPHKGAWLGDGR-MKGNAIECPYHGFLF...ESVQEFYHVTYVHRDHW...
          .      *  *  *  *      .      .  .  *  *  *  :  :  :  *  *  :  :  *

```

**Abbildung 85.** Sequenzvergleich von Zyklasen aus verschiedenen Prodiginin- und Tambjamin-Biosyntheseclustern mit der *Rieske*-Nicht-Häm-Eisen-Oxygenase NDO aus *P. putida*. [grün = *Rieske*-Cluster; blau = Nicht-Häm-Eisen Zentrum; rot = Aminosäure, die als Elektronenüberträger dient. Abbildung in Anlehnung an <sup>[17]</sup>].

Da die beiden Zyklasen aus *P. citrea* und *P. tunicata* D2 bisher noch nicht erforscht wurden und auch im Kontext der Prodigininproduktion von Interesse sein könnten, wurden für erste Untersuchungen die codierenden Sequenzen mithilfe von *Gibson Assembly*® Primern aus den entsprechenden Genomen amplifiziert (Primerpaare HB93/HB94 und HB95/96) und, analog zur Klonierung der Kondensationsenzyme, zunächst in den Vektor pET28a(+) eingefügt, wobei jedoch ein C-terminaler His<sub>6</sub>-tag angefügt wurde (Vektorkarten: Kapitel 9.6.4, Abbildung A 32, Abbildung A 33). Expressionsstudien (Kapitel 8.4.1.2.3) zeigten eine Überexpression, allerdings keine Produktion der Proteine in löslicher Form (Abbildung 86), sodass wie für die Kondensationsenzyme das Vektorsystem pET32a(+) genutzt wurde (Primerpaare HB113/HB114 und HB115/HB116; Vektorkarten: Kapitel 9.6.5, Abbildung A 34, Abbildung A 35). Dies erbrachte weiterhin eine starke Überexpression, allerdings ebenfalls keine Produktion der Proteine in löslicher Form (Abbildung 86).

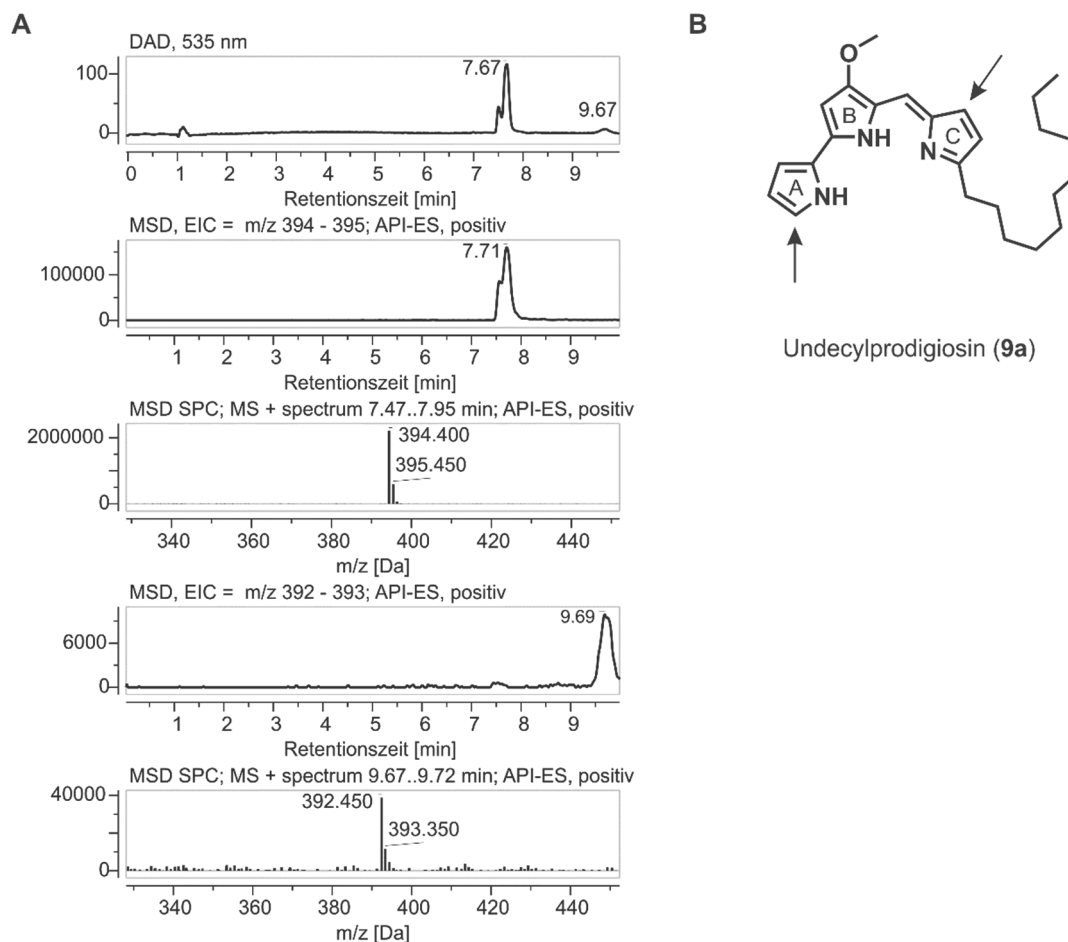




**Abbildung 86.** SDS-PAGE Analyse der Expression von *tamC* und *treaC* (schwarze Markierung) in *E. coli* BL21(DE3) unter Nutzung zwei verschiedener Vektorsysteme. [1, 4, 7, 10 = Leervektor; 2, 5, 8, 11 = TamC; 3, 6, 9, 12 = TreaC; M = Marker (Roti®-Mark 10–150); Trx = Thioredoxin (Löslichkeitstag, weiße Markierung); S-Tag = Tag für Reinigung und Detektion; 7–12: Zugabe von Ammoniumeisen-III-citrat (1 mM), L-Cystein (2 mM), Eisen-II-sulfat-7-hydrat (1 mM) zum Medium].

Ungeachtet der Tatsache, dass keine lösliche Expression erreicht werden konnte, wurden erste Untersuchungen zur Aktivität der Zyklasten durchgeführt (Kapitel 8.6.2). So wurde den Kulturen zum Zeitpunkt der Induktion in DMSO gelöstes Substrat zugegeben, das Zellpellet nach Zellernte extrahiert und die roten Extrakte *via* LC-MS analysiert. Als Substrat wurde Undecylprodigiosin (**9a**) ausgewählt, da das vermutlich natürliche Substrat Tambjamine YP1 (**26a**) nicht zur Verfügung stand. Ohnehin ist der Einsatz der Zyklasten im Kontext des Prodiginin-Projekts von Interesse, sodass eine Umsetzung von Prodigininen zu zyklischen Derivaten im Fokus des Interesses stand. Zukünftig sollten die Experimente jedoch auch unter Einsatz des natürlichen Substrats wiederholt werden.

Mithilfe der LC-MS Messungen (Kapitel 9.8.2, Abbildung A 55, Abbildung A 56) der Versuchsansätze konnte in allen Fällen zunächst das Substrat Undecylprodigiosin (**9a**) nachgewiesen werden [Undecylprodigiosin **9a** [M+H]<sup>+</sup> berechnet: 394.58 g/mol; gefunden: 394.40 g/mol] (Abbildung 87 A). Ein potentiell cyclisierendes Produkt von Undecylprodigiosin (**9a**) würde eine Masse von 391.58 g/mol betragen. Tatsächlich konnte bei einem Ansatz [*E. coli* BL21(DE3)\_pET28a(+):*treaC*] ein Peak bei 535 nm detektiert werden, dessen Retentionszeit sich von dem zu Undecylprodigiosin (**9a**) gehörenden Peak unterschied und auch die Masse des erwarteten cyclisierenden Produkts konnte nachgewiesen werden [cyclisierendes Produkt [M+H]<sup>+</sup> berechnet: 392.56 g/mol; gefunden: 392.45 g/mol]. Demzufolge scheint das Enzym TreaC in aktiver Form exprimiert worden zu sein und es konnten starke Indize für die Umsetzung des unnatürlichen Substrats Undecylprodigiosin (**9a**) zu einem cyclischen Derivat aufgezeigt werden.



**Abbildung 87.** Zyklisierung von Undecylprodigiosin (**9a**) katalysiert durch TreaC. **A:** DAD-Chromatogramm, Massenchromatogramme und Massenspektren des Assays mit Undecylprodigiosin (**9a**) als Substrat und dem Protein TreaC. **B:** Mögliche Stellen an denen eine durch TreaC katalysierte Zyklisierung von Undecylprodigiosin (**9a**) stattfinden kann.

Diese initialen Ergebnisse werfen jedoch neue Fragen auf und weisen auf Experimente hin, die zukünftig folgen sollten. So stellt sich zunächst die Frage nach der Struktur des Reaktionsprodukts. Auf Basis der natürlichen, zyklischen Prodiginin- und Tambjaminsstrukturen erscheinen zwei Positionen für eine Zyklisierung wahrscheinlich (Abbildung 87B). Die durch RedG, McpG oder RphG katalysierten Reaktionen führen alle zu Prodigininen, bei denen eine Ringbildung zum C-Ring stattfindet, wobei Unterschiede in der Größe des gebildeten Rings bestehen.<sup>[16]</sup> TreaC hingegen katalysiert die Reaktion von Tambjamine YP1 (**26a**) zur zyklischen Form Tambjamine MYP1 (**26b**) mit einer Ringknüpfung zum A-Ring.<sup>[137]</sup> Aufgrund dieser Tatsache ist auch bei Undecylprodigiosin (**9a**) eine Zyklisierung zum A-Ring durch TreaC denkbar. Die dadurch entstehende Struktur könnte dann sowohl Ethylcyclononylprodigiosin (**18**) als auch Methylcyclodecylprodigiosin (**16**) entsprechen oder dem Prodiginin Cyclononylprodigiosin (**15**) ähneln (Kapitel 5.2.2, Tabelle 1).<sup>[50-52]</sup>

Auch die Frage des Elektronentransports wird durch den Vorversuch aufgeworfen. Das *Rieske*-Nicht-Häm-Eisen-Oxygenase-System benötigt üblicherweise, neben der Oxygenase selbst, eine Ferredoxinreduktase, die NAD(P)H zu NADP<sup>+</sup> oxidiert. Die übertragenen Elektronen werden durch ein Ferredoxin zum *Rieske*-Cluster transportiert.<sup>[188, 351]</sup> Da die entsprechenden Ferredoxine bzw.



Ferredoxinreduktasen aus *P. citrea* bzw. *P. tunicata* D2 nicht zusammen mit der Zyklase heterolog in *E. coli* exprimiert wurden, muss das Elektronentransportsystem von *E. coli* selbst genutzt worden sein. Bei Sequenzvergleichen (Tabelle 15) zeigt sich, dass die in *P. citrea* und *P. tunicata* D2 vorhandenen Ferredoxine und Ferredoxinreduktasen tatsächlich eine hohe Ähnlichkeit zu denen in *E. coli* aufweisen, wohingegen keine Sequenzähnlichkeiten zu Proteinen in *S. coelicolor* A3(2) gefunden wurden. In *P. putida* KT2440 finden sich ebenfalls homologe Ferredoxine und Ferredoxinreduktasen, letztere sogar mehrfach. Eine Anwendung der Zyklasten in *P. putida* basierten Systemen könnten daher ebenfalls möglich sein, sollte aber zunächst getestet werden, und könnte so einen Einbau der Zyklasten in den bestehenden Mutasynthesestamm *P. putida* pig-r2 ermöglichen.

**Tabelle 15.** Übersicht über Homologe der Ferredoxine und der Ferredoxinreduktasen aus *P. citrea* und *P. tunicata* D2 in *E. coli* und *P. putida* KT2440.

|                                  | <i>P. tunicata</i> D2            | <i>E. coli</i> str. K-12<br>substr. MG1655         | <i>P. putida</i> KT2440                                                                            |
|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b><i>P. citrea</i> DSM 8771</b> |                                  |                                                    |                                                                                                    |
| <b>Ferredoxin</b>                | <b>EAR29921</b>                  | <b>NP_417020</b>                                   | <b>NP_743008</b>                                                                                   |
| Abdeckung [%]/Identität [%]      | 100/89                           | 99/73                                              | 98/58                                                                                              |
| <b>Ferredoxinreduktase</b>       | <b>EAR30621</b>                  | <b>NP_418359</b>                                   | <b>NP_746755.1</b>                                                                                 |
| Abdeckung [%]/Identität [%]      | 98/52                            | 100/50                                             | 93/38<br><b>NP_743795.1</b><br>93/34                                                               |
|                                  | <b><i>P. citrea</i> DSM 8771</b> | <b><i>E. coli</i> str. K-12<br/>substr. MG1655</b> | <b><i>P. putida</i> KT2440</b>                                                                     |
| <b><i>P. tunicata</i> D2</b>     |                                  |                                                    |                                                                                                    |
| <b>Ferredoxin</b>                | <b>ERG20391</b>                  | <b>NP_417020</b>                                   | <b>NP_743008</b>                                                                                   |
| Abdeckung [%]/Identität [%]      | 100/89                           | 99/74                                              | 98/57                                                                                              |
| <b>Ferredoxinreduktase</b>       | <b>ERG20640</b>                  | <b>NP_418359</b>                                   | <b>NP_746755.1</b>                                                                                 |
| Abdeckung [%]/Identität [%]      | 98/52                            | 100/47                                             | 91/39<br><b>NP_743795.1</b><br>98/31<br><b>NP_742969.1</b><br>53/34<br><b>NP_743060.1</b><br>55/27 |

Die Sequenzvergleiche und die anfänglichen Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Zyklase TreaC in Kombination mit dem in *E. coli* vorhandene Elektronentransportsystem funktioniert. Es sollte dennoch überdacht werden, ob eine Coexpression der Ferredoxine und Ferredoxinreduktase aus den Ursprungsorganismen mit den entsprechenden Zyklasten zu einer Verbesserung der Aktivität führen kann. Die Möglichkeit das ohnehin in *E. coli* vorhandene Elektronentransportsystem zu nutzen bietet jedoch den Vorteil der verringerten Klonierungsarbeit und der einfacheren Handhabung.

In Anbetracht der erfolgreich scheinenden Vorversuche im Fall von TreaC, sollte in Betracht gezogen werden, unter Nutzung des gleichen Versuchsaufbaus erneut die Zyklase RedG aus *S. coelicolor* A3(2) zu untersuchen. Ebenso sollten die hier gezeigten Experimente zukünftig zunächst repliziert und auf diese Weise die erhaltenen Ergebnisse verifiziert werden. Aufbauend darauf kann ein

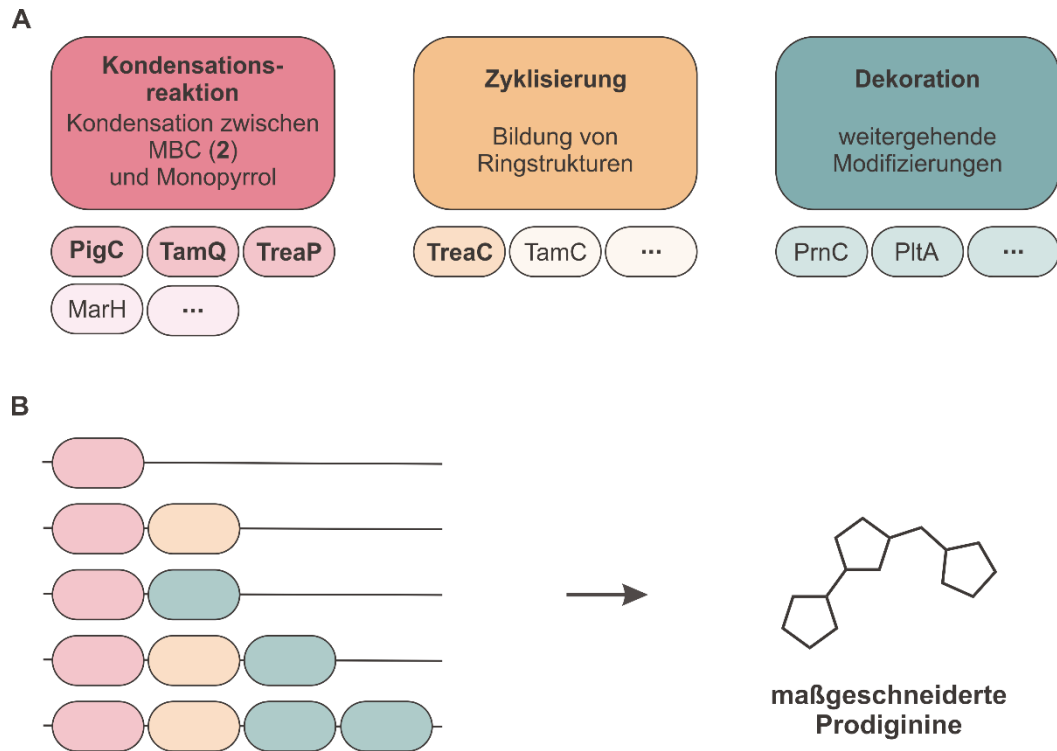
semi-präparativer Ansatz erfolgen, der eine Isolierung des Zyklisierungsprodukts im Milligramm-Maßstab erlaubt. Nach Isolierung wäre es mittels NMR-Analytik möglich nähere Informationen über die Struktur des Reaktionsprodukts zu erlangen und die Frage zu beantworten, ob die Ringknüpfung am A- oder C-Ring stattgefunden hat oder an ganz anderer Stelle. Ebenso sollte analysiert werden, ob bei der enzymatischen Zyklisierung ein Stereozentrum entstanden ist und nachfolgend die absolute Konfiguration bestimmt werden. Eine Synthese von möglichen Referenzverbindungen kann ebenfalls zur Beantwortung der Frage nach der Struktur beitragen. Die Totalsynthese von Cyclononylprodigiosin (**15**) unter Nutzung von Ringschlussmetathese wurde bereits 1999 von *Fürstner et al.* veröffentlicht und könnte entsprechend auf die Synthese eines Cyclononylprodigiosin (**15**) Derivats mit einer C11 statt einer C9 *n*-Alkylkette übertragen werden.<sup>[354]</sup> Ebenso sind diverse (enantioselektive) Totalsynthesen von *Metacycloprodigiosin* (**11**, Streptorubin A) und *Butyl-meta-cycloprodigiosin* (**12**, Streptorubin B) sowie *Prodigiosin R1* (**13**) bekannt, die ebenfalls mögliche Reaktionsprodukte darstellen.<sup>[16, 41, 355-358]</sup>

Desweiteren bietet es sich an, nicht nur Undecylprodigiosin (**9a**) als Substrat für die Zyklastase Treac einzusetzen, sondern auch dessen Derivate mit längeren und kürzeren *n*-Alkylketten am C-Ring. Diese Substrate sind durch die Arbeiten im Rahmen der vorliegenden Dissertation durch Nutzung von TamQ enzymatisch zugänglich geworden, können jedoch auch chemisch synthetisiert werden. Ebenso können *Prodigiosin* (**1a**) und Derivate als mögliche Substrate untersucht werden. Auch die Testung weiterer unnatürlicher Substrate, bei denen es sich nicht um *Prodiginine* oder *Tambjamine* handelt sollte in Erwägung gezogen werden.

Aufgrund der Tatsache, dass die Zyklastase aus dem *Cycloprodigiosin* (**14**) produzierenden Stamm *P. rubra* keine Ähnlichkeiten zu *Rieske*-Nicht-Häm-Eisen-Oxygenasen besitzt, sondern mit *Alkylglycerol Monooxygenasen* verwandt ist, sollte auch dieses Enzym zukünftig untersucht werden.<sup>[265]</sup> Sowohl von Seiten des Proteins an sich, als auch seitens des natürlichen Substrats *Prodigiosin* (**1a**) und somit der katalysierten Reaktion bietet sich eine vielversprechende Ergänzung zu den Zyklastasen aus *P. citrea* und *P. tunicata* D2 an.

### Ein Enzym-Baukasten für die Produktion maßgeschneiderter Prodiginine

Durch die Erweiterung des Repertoires an Kondensationsenzymen und die Möglichkeit künftig auch Zyklasen in der enzymatischen Prodigininsynthese einzusetzen, ist ein Baukasten ähnliches System zur Produktion maßgeschneiderter Prodiginine denkbar (Abbildung 88).



**Abbildung 88.** Baukastensystem zur Herstellung maßgeschneiderter Prodiginine. **A:** Aktuell und zukünftig zur Verfügung stehende Enzyme für die Prodigininsynthese. **B:** Beispiele für Kombinationsmöglichkeiten der Enzyme. [rot = Kondensationsreaktion (Ligasen) = PigC: *S. marcescens*, TamQ: *P. tunicata* D2, TreaP: *P. citrea*, MarH: *S. sp.* CNQ-617; orange = Zyklisierung (Rieske-Nicht-Häm-Eisen-Oxygenase) = TreaC: *P. citrea*, TamC: *P. tunicata* D2; grün = Dekoration (z. B. Halogenasen) = PrnC, PltA: *Pseudomonas protegens* Pf-5]

Durch die vorliegende Arbeit stehen PigC, TamQ und TreaP als Katalysatoren der Kondensationsreaktion mit verschiedenen Substratspektren zur Verfügung. TreaC und potentiell auch TamC, ebenso wie die Zykklase aus *P. rubra* könnten den Aufbau zyklischer Strukturen ermöglichen (Abbildung 88A). Weitere Modifizierungen und Funktionalisierungen stellen den dritten Kasten dar, der Proteine wie PrnC und PltA aus *P. protegens* Pf-5 repräsentiert. Beide Enzyme werden im Rahmen der Dissertation von M. Sc. Jan Gebauer untersucht (unveröffentlichte Ergebnisse). Die natürlichen Substrate dieser beiden Halogenasen, Pyrrolnitrin bzw. Pyoluteorin, besitzen Pyrrolmotive und könnten daher zukünftig den A-Ring oder den C-Ring der Prodiginine halogenieren.<sup>[359, 360]</sup>

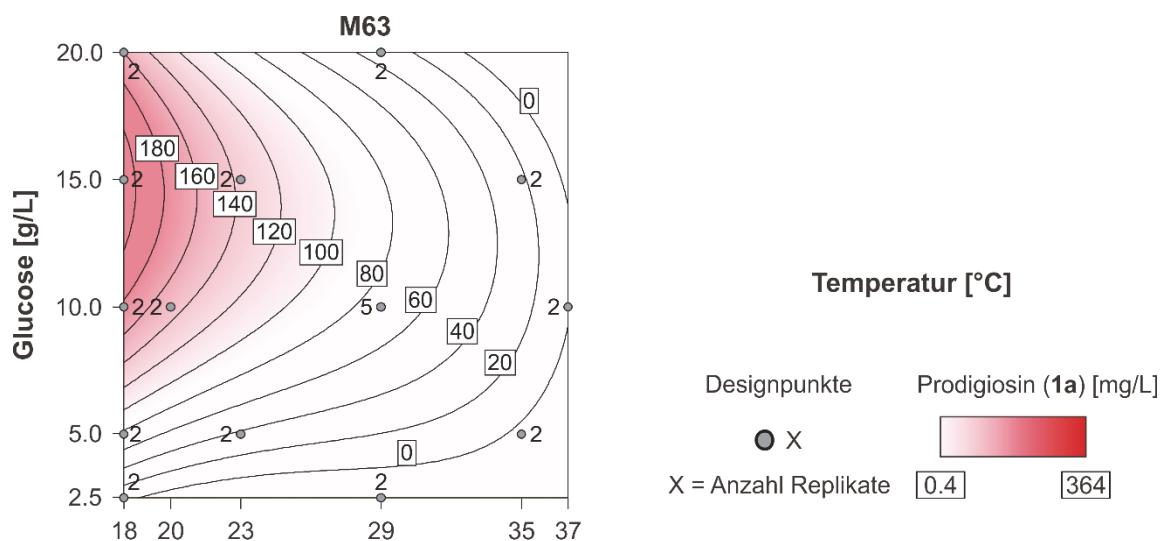
Die unterschiedlichen Bausteine ließen sich beliebig kombinieren (Abbildung 88B), um so das gewünschte Prodiginin zu erhalten. Abzuwägen bleibt, ob solch ein System plasmidbasiert realisiert wird oder ob eine genomische Integration der Gene in einen (bestehenden und/oder weiter modifizierten) Stamm wie *P. putida* pig-r2 mehr Vorteile bietet. Der schnellere Zugang und die größere Flexibilität wäre durch einen plasmidbasierten Ansatz gegeben, wohingegen eine genomische

Integration die höhere Stabilität und Robustheit verspricht sowie die Bereitstellung von Cofaktoren oder Elektronentransportproteinen.

## 7.2 Biosynthetische Produktion von Prodigiosin (1a) – Optimierung der Kultivierungsparameter

Mit dem Ziel höhere Prodigiosin (**1a**) Titer bei Kultivierung des Stammes *P. putida* pig-r2 zu erhalten und so größere Mengen des Naturstoffs bereitstellen zu können, wurde eine Optimierung der Kultivierungsbedingungen vorgenommen. In Abänderung zu den in Vorarbeiten etablierten Bedingungen wurde ein Wechsel von Komplexmedium zu Minimalmedium vorgenommen und sowohl Kultivierungstemperatur als auch die Glucosekonzentration im Medium variiert. Die Versuche zur Optimierung wurden mithilfe von *Design of Experiments* durchgeführt und evaluiert.

Da beobachtet wurde, dass die Prodigiosin (**1a**) Produktion hauptsächlich während des exponentiellen Wachstums des Stammes *P. putida* pig-r2 erfolgt, konnte durch den Einsatz von Minimalmedien und niedrige Kultivierungstemperaturen eine Ausdehnung der Wachstumsphase erzielt werden. Diese Verlängerung des exponentiellen Wachstums führte zu einer Erhöhung der Prodigiosin (**1a**) Titer. Bei Nutzung des M63 Mediums mit 15.0 g/L Glucose und Kultivierung bei 18 °C konnte experimentell im kleinen Maßstab die höchste Prodigiosin (**1a**) Menge mit  $334 \pm 41$  mg/L<sub>Kultur</sub> erzielt werden (Abbildung 89).



**Abbildung 89.** 2D-Darstellung der *Response Surface* Graphen als Ergebnis der Optimierung der Kultivierungsparameter für das Medium M63. Die Optimierung wurde mittels *Design of Experiments* unter Verwendung des *Central Composite Designs* mithilfe der Software *Design Expert* (StatEase, Inc.) durchgeführt. [Die Rotfärbung repräsentiert die Menge an Prodigiosin (**1a**). Die Werte wurden auf mg pro Liter Kulturvolumen hochgerechnet. Als numerische Parameter wurde die Glucosemenge zwischen 2.5–20 g/L und die Temperatur zwischen 18–37 °C variiert].

Der Stamm *P. putida* pig-r2 wurde aufbauend auf den Ergebnissen der Kultivierungsoptimierung im größeren Maßstab kultiviert. Die Fermentation im 1.5 L Maßstab unter Nutzung der optimierten Kultivierungsbedingungen ergab eine Menge von 145 mg/L<sub>Kultur</sub> an Prodigiosin (**1a**).

Basierend auf diesen Ergebnissen sollten künftig unter Nutzung der von Dipl.-Ing. Carl Brehl (AVT.BioVT, RWTH Aachen) etablierten *online* Messung von Prodigiosin (**1a**) Kultivierungstemperaturen < 18°C evaluiert werden, ebenso wie verschiedene Kohlenstoffquellen. Glycerin, Fructose oder Succinat könnten beispielsweise als alternative C-Quellen eingesetzt werden. Hier ist zu analysieren, ob sich ein Wechsel der Kohlenstoffquelle positiv auf die Prodigiosin (**1a**) Titer auswirkt. Zusätzlich sollte geprüft werden, ob Limitationen der Stickstoffquelle oder anderer Spurenelemente bestehen oder, ob während der Kultivierung eine Sauerstofflimitierung vorliegt. Mögliche Limitierungen können so künftig vermieden werden und mutmaßlich zu höheren Prodigiosin (**1a**) Titern führen. Da jedoch das *pig*-Cluster in einem der rRNA Operons von *P. putida* lokalisiert ist und äußere Faktoren wie Nährstoffmangel oder Stress die Expression beeinflussen können, ist möglicherweise auch das gezielte Herbeiführen eines Mangels für eine Erhöhung der Prodigiosin (**1a**) Titer vorteilhaft. <sup>[215, 317-319]</sup>

Die Optimierung der Kultivierungsparameter wurde bisher nur für den Stamm *P. putida* pig-r2 durchgeführt. Äquivalente Untersuchungen sollten auch für den Mutasyntesestamm *P. putida* pig-r2  $\Delta$ pigD erfolgen, unter der Annahme, dass auch im Falle dieses Stamms eine Variation der Kultivierungsbedingungen zu höheren intrazellulären MBC (**2**) Titern führen kann und somit zu einer Verbesserung der Ausbeuten in der Mutasynthese.

Über die Optimierung der Kultivierungsparameter hinaus sollte eine systematische Untersuchung der *in situ* Produktentfernung durchgeführt werden. Die Art des Schaumstoffmaterials sowie die Geometrie und die Abmessungen des Schaumstoffs sind Parameter, die im Hinblick auf eine strukturierte Analyse evaluiert werden sollten.

### 7.3 Bioaktivität von Prodigininen

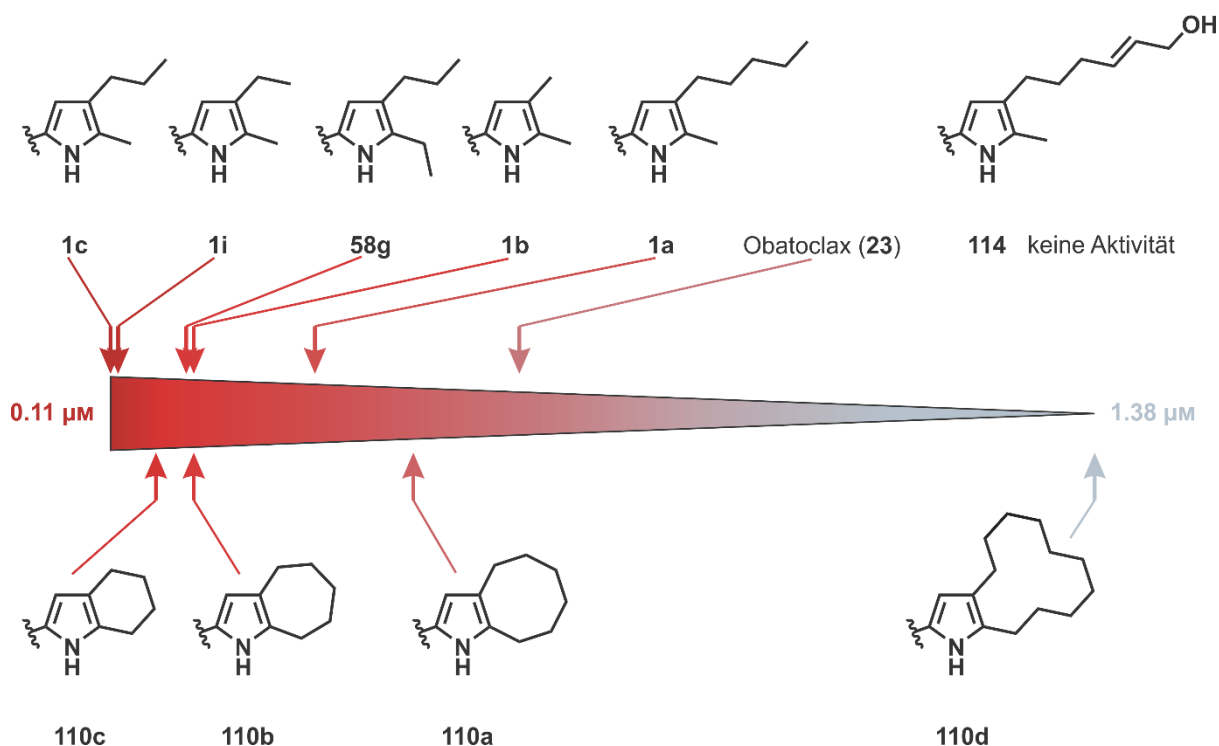
Die Bioaktivität verschiedener Prodigininderivate wurde zunächst im Hinblick auf die antibiotische Wirkung untersucht, wobei über Gram-positive und Gram-negative Bakterien hinaus Testungen mit eukaryotischen Systemen durchgeführt wurden. Während die Gram-positiven Bakterienstämme *B. subtilis* 168 und *C. glutamicum* die Prodiginine **1a**, **1f**, **58b** und **110a–110d** am wenigsten tolerieren konnten, zeigten die Gram-negativen Bakterien *E. coli* BL21(DE3) und *P. putida* KT2440 die höchste Toleranz. Das Wachstum der untersuchten eukaryotischen Organismen, den Hefen, *P. pastoris* und *S. cerevisiae* wurde durch die Prodiginine **1a**, **1f**, **58b** und **110a–110d** ebenfalls eingeschränkt. Somit lassen sich die beiden Hefen in Bezug auf ihre Sensitivität gegenüber Prodigininen zwischen Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien einordnen. *P. putida* KT2440 wies weiterhin die beste Toleranz von Prodigininen auf und bestätigt damit erneut die vorteilhafte Wahl von *P. putida* KT2440 als Produktionsorganismus und Mutasynthese Wirt.

Neben biotechnologisch relevanten Organismen erfolgten Testungen der Prodiginine **1a**, **1b**, **1i**, **1j**, **58b**, **58g**, **58f** und **110c** gegenüber fünf fakultativ humanpathogenen Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien und dem Modellorganismus *C. glutamicum*. Diese Untersuchungen wurden von M. Sc. Jennifer Hage-Hülsmann am Institut für Enzymtechnologie (Heinrich-Heine-Universität

Düsseldorf) durchgeführt. Eine Wachstumsinhibierung der Gram-negativen Organismen *S. marcescens* und *P. aeruginosa* konnte nicht beobachtet werden, hingegen wurden *C. glutamicum*, *S. aureus*, *S. epidermis* und *E. faecium* im mikromolaren Bereich im Wachstum gehindert. Basierend auf diesen Ergebnissen könnte eine weiterführende Untersuchung von anderen fakultativ humanpathogenen Organismen, insbesondere von Hefen und Gram-positiven Bakterien durchgeführt werden, ebenso wie Testungen der Prodiginine gegenüber obligat humanpathogenen Mikroorganismen oder klinischen Isolaten.

Über antibiotische Testungen hinausgehend, erfolgte auch die Analyse der Bioaktivität gegenüber humanen MCF7 Brustkrebszellen. Die physiologischen Tests zur Modulation der Autophagie wurden von Dr. Sonja Sievers und Dr. Luca Laraia am COMAS in der Abteilung für Chemische Biologie des Max-Planck-Instituts für Molekulare Physiologie in Dortmund durchgeführt. Als bisher wirksamster Inhibitor der Autophagie stellte sich das Prodiginin **1c** heraus ( $EC_{50} = 150 \text{ nM}$ ). Prodiginin **1c** war zudem wirksamer als das synthetische Prodiginin Obatoclax (**23**) und der gebräuchliche Autophagieinhibitor Chloroquin (**25**). Die Akkumulation der Autophagosomen durch Inhibierung der Fusion von Autophagosomen und Lysosmen durch die getesteten Prodiginine **1a**, **1c**, **1f**, **1j** und **58b** konnte *via* Fluoreszenzmikroskopie verfolgt werden und die Ergebnisse durch Western-Blot Experimente weiter bestätigt werden. Auch eine Inhibition des Zellwachstums und letztlich Apoptose der MCF7 Brustkrebszellen konnte nachgewiesen werden.

Basierend auf den ersten Ergebnissen und der Tatsache, dass Prodiginin **1c** die beste Wirksamkeit zeigte, wurden zusätzlich zu den zuvor untersuchten Prodigininen die Prodigosin (**1a**) Derivate **1b**, **1i**, **58g** und **114** in einer zweiten Testreihe untersucht, um den Einfluss der Kettenlänge am C-Ring der Prodiginine weitergehend zu analysieren. Ebenso wurden auch die zyklischen Prodiginine **110a–110d** getestet. Eine Verlängerung oder Verkürzung der *n*-Alkylkette brachte jedoch keine Verbesserung der Aktivität, sodass Prodiginin **1c** weiterhin die stärkste Autophagieinhibierung bewirkt (Abbildung 90). Jedoch zeigte Prodiginin **1i** ( $EC_{50} = 0.12 \text{ }\mu\text{M}$ ) ähnliche Wirksamkeit wie Prodiginin **1c** ( $EC_{50} = 0.11 \text{ }\mu\text{M}$ ) bei Inhibition der Autophagie.

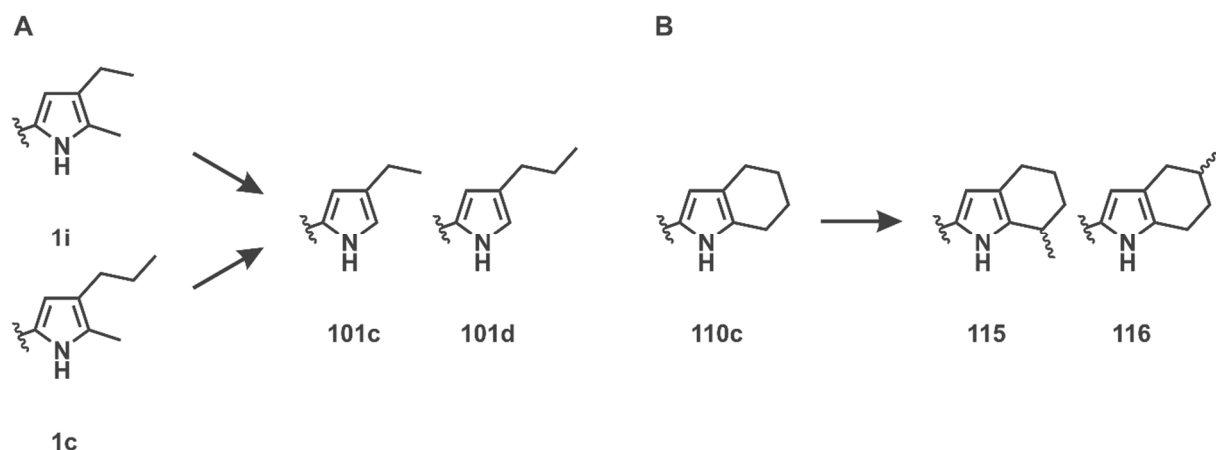


**Abbildung 90.** Übersicht der Aktivität verschiedener Prodigininderivate in Bezug auf die Autophagieinhibierung. Dargestellt sind die Ergebnisse der zweiten Testreihe, welche die Prodiginine **1a–1c**, **1i**, **58g**, **110a–110d**, **114** und das synthetische Prodigininderivat Obatoclax (**23**) umfasst. Die höchste Aktivität wies das Prodiginin **1c** auf, wohingegen Prodiginin **114** keinerlei Aktivität zeigte. [Der MBC (**2**)-Teil der Prodiginine wird aufgrund der besseren Übersichtlichkeit nicht dargestellt.]

Die stärkste Wirkung innerhalb der untersuchten zyclischen Prodiginine wies Prodiginin **110c** auf, wohingegen das Prodiginin **110d** die schwächste Autophagieinhibierung aufzeigte. Das hydroxylierte Prodiginin **114** konnte die Autophagieprozesse nicht modulieren.

Aus den bisherigen Ergebnissen lässt sich eine Struktur-Wirkungs-Beziehung sowohl in Bezug auf die *n*-Alkylkettenlänge als auch auf die Ringgröße der zyclischen Prodiginine **110a–110d** erkennen. Ebenso zeigt sich deutlich, dass eine Funktionalisierung der Alkylkette in Form einer Hydroxygruppe die biologische Wirkung der Autophagieinhibition unterbindet. Zukünftige Untersuchungen könnten einerseits, abgeleitet von den beiden bisher aktivsten Prodigininen **1c** und **1i**, die Relevanz der Methylgruppe in 2-Position aufklären (Abbildung 91).





**Abbildung 91.** Mögliche neue Prodigininstrukturen für erweiterte Untersuchungen der Struktur-Wirkungs-Beziehungen im Kontext der Autophagieinhibition. **A:** Prodigininstrukturen **101c** und **101d**, die sich aus den bisher aktivsten Prodigininen **1c** und **1i** ableiten. **B:** Prodigininstrukturen **115** und **116** die vom aktivsten zyklischen Prodiginin **110c** abgeleitet werden können. [Der MBC (**2**)-Teil der Prodiginine wird aufgrund der besseren Übersichtlichkeit nicht dargestellt.]

Andererseits bietet sich die Möglichkeit an, zyklische Prodiginine wie Prodiginin **115** und **116** zunächst in racemischer, später in enantiomerenreiner Form auf deren Wirkung hin zu untersuchen. Der synthetische Zugang zu den racemischen Verbindungen **115** und **116** ist durch die Masterarbeiten von M. Sc. *David P. Klebl* und M. Sc. *T. Moritz Weber* bereits gegeben und könnte künftig durch kinetische Racematspaltung durch Einsatz von PigC in enantiomerenangereicherter oder enantiomerenreicher Form möglich sein.<sup>[248, 310]</sup>

Ein weiterer und neuer Aspekt der Bioaktivität von Prodigininen konnte durch eine Kooperation mit Prof. Dr. *Florian M. W. Grundler*, Dr. A. *Sylvia S. Schleker* und Dr. *Samer S. Habash* (Institut für Nutzpflanzenwissenschaften und Ressourcenschutz, Abteilung Molekulare Phytomedizin der Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn) im Kontext des BioSC *FocusLabs CombiCom* beleuchtet werden, bei der verschiedene Prodiginine von Dr. *Samer S. Habash* auf deren fungizide und nematizide Wirkung hin untersucht wurden. Die getesteten Prodiginine wurden von Dr. *Andreas S. Klein*, M. Sc. *David P. Klebl*, M. Sc. *Tim Moritz Weber* und im Rahmen der vorliegenden Arbeit [(Prodigosin (**1a**)) hergestellt.

Nematoden sind ubiquitär vorkommende vielzellige Fadenwürmer, unter denen es einige parasitäre Arten gibt, die u.a. viele (Nutz)pflanzen schädigen, und so starke Ernteeinbußen verursachen können.<sup>[361]</sup> Um Ernteverluste zu minimieren, sind neben dem Einsatz resistenter Pflanzen auch chemische, biologische und anbautechnische Maßnahmen im Einsatz.<sup>[362-366]</sup> Als Alternative zu althergebrachten chemisch synthetisierten Pestiziden, deren Einsatz diverse Risiken und Gefahren mit sich bringen kann und welche in vielen Ländern einschließlich in Deutschland keine Zulassung haben, könnten mikrobiell hergestellte Sekundärmetabolite dienen und eine Quelle für neue Verbindungen darstellen, die als Agrochemikalien weiterentwickelt werden könnten.



Die Wirkung von Prodigiosin (**1a**) gegen verschiedene Pflanzenpathogene wurde zuvor in der Literatur beschrieben und gezeigt, dass dieser Naturstoff die Sporenkeimung des Pilzes *Botrytis cinerea*, dem Verursacher der Grauschimmelfäule, inhibiert.<sup>[367]</sup> Ebenso wurde bereits eine Wirkung von Prodigiosin (**1a**)-enthaltendem Überstand von *S. marcescens* gegenüber den juvenilen Stadien der pflanzenpathogenen Nematoden *Radopholus similis* und *Meloidogyne javanica* sowie die Inhibition des Schlüpfens der Eier beschrieben.<sup>[368]</sup> Daher wurden Prodigiosin (**1a**) sowie verschiedene Derivate von Dr. Samer S. Habash in diversen Experimenten auf deren Wirkung gegenüber Nematoden, Pflanzen und Pilze untersucht. Zu den untersuchten Nematoden zählte zum einen der Modellorganismus *C. elegans* und zum anderen *Heterodera schachtii*, ein Pflanzenparasit, der u.a. Zuckerrüben befällt.<sup>[369]</sup> Neben Nematoden wurden auch die Pilze *Phoma lingam* und *Sclerotinia sclerotiorum* getestet, welche die Pflanzenkrankheiten Wurzelhals- und Stängelfäule respektive Weißstängeligkeit bei verschiedenen Nutzpflanzen verursachen und daher ebenfalls zu den Pflanzenpathogenen zählen und teilweise die gleichen Pflanzenwirte infizieren wie auch *H. schachtii*.<sup>[370]</sup> Bei den Untersuchungen der pflanzenschädigenden Nematoden und Pilze wurde eine wachstumsinhibierende Wirkung von Prodigiosin (**1a**) und den verschiedenen Derivaten auf diese Organismen festgestellt, wobei die Stärke des Effekts zum einen konzentrationsabhängig war und zum anderen mit der Struktur der Prodiginine variierte. So wurden MIC<sub>50</sub>-Werte im Bereich von 0.1–125421 µM bestimmt bzw. extrapoliert. Neben der Wirkung auf Nematoden und pflanzenpathogene Pilze wurde auch der Einfluss von Prodigininen auf das Wachstum der Pflanze *A. thaliana* analysiert sowie der Einfluss von Prodigininen auf den Parasitismus von *H. schachtii* an *A. thaliana*. Hier konnten sehr aussichtsreiche Ergebnisse erzielt werden.

Ausgehend von den vielversprechenden Ergebnissen dieser Kooperationsarbeit bieten sich weitere Untersuchungen im Kontext von SAR-Studien an. Dabei sollte der Fokus zunächst auf die Synthese von Derivaten der Prodiginine gelegt werden, bei denen in den bisherigen Testungen die stärkste Wirkung erreicht werden konnte.

## 8 Experimentalteil

### 8.1 Allgemeines

#### 8.1.1 Geräte und Software

Die in Tabelle 16 aufgeführten Geräte, sind regelmäßig verwendete Geräte für molekular- und mikrobiologische sowie proteinbiochemische Methoden. Spezielle Geräte werden in den entsprechenden Methoden gesondert benannt. Geräte zur Analyse chemischer Verbindungen werden in Kapitel 8.2.1 beschrieben, wohingegen die verwendete Software in Tabelle 17 aufgeführt ist.

**Tabelle 16.** Übersicht über in dieser Arbeit verwendete Geräte.

| Gerät                            | Beschreibung                                                                                                    | Hersteller                                                        |
|----------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|
| Agarosegelelektrophorese         | 300 V Netzgerät                                                                                                 | VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland                    |
|                                  | Agarosegelkammern                                                                                               | peqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland                 |
| Chromatographiesystem (Proteine) | ÄKTA™ Purifier                                                                                                  | GE Healthcare, München, Deutschland                               |
| Elektroporator                   | MicroPulser Electroporator                                                                                      | Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland                   |
| Fotoapparat                      | Canon EOS 1000D, digitale Spiegelreflexkamera mit EF-S 60 mm f/2.8 USM Makroobjektiv                            | Canon Deutschland GmbH, Krefeld, Deutschland                      |
|                                  | Canon EOS 6D Mark II, digitale Spiegelreflexkamera mit Canon EF 24–105 mm f/4L IS USM Objektiv                  | Canon Deutschland GmbH, Krefeld, Deutschland                      |
| Geldokumentationssystem          | INTAS GeliX Imager                                                                                              | INTAS Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland    |
| Gelelektrophorese für SDS-PAGE   | Gelelektrophoresesystem für Invitrogen precast SDS-PAGE-gels (XCell SureLock™ Mini-Cell Electrophoresis System) | Invitrogen GmbH, Darmstadt, Deutschland                           |
|                                  | Bio-Rad Mini-Protean® Tetra System                                                                              | Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland                   |
| Heißluftgebläse                  | Steinel HG3002LCD Typ 3458                                                                                      | Steinel Vertrieb GmbH, Herzebrock-Clarholz, Deutschland           |
| Heizschrank                      | Jouan Innovens 234 EU1                                                                                          | Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA                       |
| Magnetrührer mit Heizplatte      | Heidolph MR 3001 K, kombiniert mit EKT HeiCon Kontaktthermometer                                                | Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland        |
| Mikrobioreaktor                  | m2p-labs BioLector®                                                                                             | m2p-labs GmbH, Baesweiler, Deutschland                            |
| PCR-Cycler                       | VWR Doppio                                                                                                      | VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland                    |
|                                  | Biometra TProfessional Basic Gradient                                                                           | Analytik Jena AG, Jena, Deutschland                               |
| pH-Meter                         | Mikroprozessor-pH-Meter 764                                                                                     | Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland |

## Experimentalteil

|                           |                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                                    |
|---------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| pH-Elektrode              | <i>NORDANTEC</i> pH-Elektrode IJ44C                                                                                                                                 | <i>NORDANTEC</i> GmbH,<br>Bremerhaven, Deutschland                                                                                                 |
| Photometer                | <i>NanoDrop 2000c</i> ,<br>Kleinvolumenphotometer<br><i>Tecan Infinite® M1000 PRO</i> ,<br>Mikrotiterplatten<br><i>Shimadzu UV-1800</i> ; temperierbar,<br>Küvetten | <i>Thermo Fischer Scientific</i> ,<br>Waltham, MA, USA<br><i>Tecan Group AG</i> , Männedorf,<br>Schweiz<br><i>Shimadzu</i> , Duisburg, Deutschland |
| Pipetten                  | <i>Eppendorf Research</i> , 0.1–2.5 µL                                                                                                                              | <i>Eppendorf AG</i> , Hamburg,<br>Deutschland                                                                                                      |
|                           | <i>Eppendorf Research</i> , 1–10 µL                                                                                                                                 | <i>Eppendorf AG</i> , Hamburg,<br>Deutschland                                                                                                      |
|                           | <i>Eppendorf Research</i> , 10–100 µL                                                                                                                               | <i>Eppendorf AG</i> , Hamburg,<br>Deutschland                                                                                                      |
|                           | <i>Eppendorf Research</i> , 100–1 000 µL                                                                                                                            | <i>Eppendorf AG</i> , Hamburg,<br>Deutschland                                                                                                      |
|                           | <i>Gilson Pipetman</i> , 0.5–5 mL                                                                                                                                   | <i>Gilson</i> , Middleton, WI, USA                                                                                                                 |
| Pumpen                    | <i>Vaccubrand RZ 6</i> Drehschieberpumpe                                                                                                                            | <i>Vaccubrand GmbH &amp; Co. KG</i> ,<br>Wertheim, Deutschland                                                                                     |
|                           | <i>DIVAC 1.2L</i> Membranpumpe                                                                                                                                      | <i>Leybold GmbH</i> , Köln, Deutschland                                                                                                            |
| Rotationsverdampfer       | <i>Büchi Rotavapor® R-210</i><br>Rotationsverdampfer mit <i>Büchi B-491</i><br>Heizbad und <i>Büchi V-700</i><br>Membranpumpe                                       | <i>Büchi Labortechnik GmbH</i> , Essen,<br>Deutschland                                                                                             |
|                           | <i>Büchi Rotavapor® R-114</i><br>Rotationsverdampfer mit <i>Büchi B-480</i><br>Heizbad und <i>Büchi V-700</i><br>Membranpumpe                                       | <i>Büchi Labortechnik GmbH</i> , Essen,<br>Deutschland                                                                                             |
| Schüttler und Inkubatoren | <i>BioCote Stuart rotator SB2</i> ,<br>Rotorschüttler in 37°C Konstantraum<br>für Kulturröhrchen                                                                    | <i>BioCote Ltd</i> , Wolverhampton, UK                                                                                                             |
|                           | <i>Edmund Bühler TiMix</i> , Schüttler mit<br>Inkubationshaube für Reaktionsplatten                                                                                 | <i>Edmund Bühler GmbH</i> ,<br>Hechingen, Deutschland                                                                                              |
|                           | <i>Eppendorf MixMate PCB-11</i> ,<br>Schüttelblock für Reaktionsplatten                                                                                             | <i>Eppendorf AG</i> , Hamburg,<br>Deutschland                                                                                                      |
|                           | <i>Eppendorf Thermomixer compact</i> ,<br>beheizter Schüttelblock für 1.5–2 mL<br>Reaktionsgefäße                                                                   | <i>Eppendorf AG</i> , Hamburg,<br>Deutschland                                                                                                      |
|                           | <i>Heidolph Unimax 1010</i> ,<br>Plattformschüttler für Flüssigkulturen;<br>mit <i>Heidolph Inkubator 1000</i> ,<br>Inkubationshaube                                | <i>Heidolph Instruments</i> ,<br>GmbH & Co. KG, Schwabach,<br>Deutschland                                                                          |
|                           | <i>Hettich Benelux MKR23</i> ,<br>beheizter/gekühlter Schüttelblock für<br>1.5–50 mL Reaktionsgefäße                                                                | <i>Hettich Benelux B.V.</i> ,<br>Geldermalsen, Niederlande                                                                                         |
|                           | <i>New Brunswick™ Innova® 42R</i>                                                                                                                                   | <i>Eppendorf AG</i> , Hamburg,<br>Deutschland                                                                                                      |
| Spritzenpumpe             | <i>KDS Legato® 100</i>                                                                                                                                              | <i>KD Scientific Inc.</i> , Holliston, MA,<br>USA                                                                                                  |
| Synthesemikrowelle        | <i>CEM Discover Labmate</i>                                                                                                                                         | <i>CEM GmbH</i> , Kamp-Lintfort,<br>Deutschland                                                                                                    |
| Ultraschallbad            | <i>Sonorex RK 100H</i>                                                                                                                                              | <i>Bandelin electronic</i><br>GmbH & Co. KG, Berlin,<br>Deutschland                                                                                |
| UV-Lampe                  | <i>Prinz UV-Testlampe</i> für Netzbetrieb                                                                                                                           | <i>PRINZ Verlag GmbH</i> , Passau,<br>Deutschland                                                                                                  |

## Experimentalteil

|                |                                                                                                              |                                                                    |
|----------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|
| Waagen         | <i>Sartorius MC1</i> , Laborwaage                                                                            | <i>Sartorius AG</i> , Göttingen, Deutschland                       |
|                | <i>Sartorius LA1200S</i> , Feinwaage                                                                         | <i>Sartorius AG</i> , Göttingen, Deutschland                       |
|                | <i>Sartorius 2004MP</i> , Ultrafeinwaage                                                                     | <i>Sartorius AG</i> , Göttingen, Deutschland                       |
| Zellaufschluss | <i>Sonopuls HD2070</i> , verschiedene Horngrößen (1.5–50 mL)                                                 | <i>Bandelin electronic GmbH &amp; Co. KG</i> , Berlin, Deutschland |
| Zentrifugen    | <i>Beckman Coulter Optima L-80 XP</i> , Ultrazentrifuge                                                      | <i>Beckman Coulter</i> , Brea, CA, USA                             |
|                | <i>Beckman Coulter Type 50.2 Ti Rotor</i> , Festwinkelzentrifugationsrotor                                   | <i>Beckman Coulter</i> , Brea, CA, USA                             |
|                | <i>Eppendorf Centrifuge 5242R</i> , gekühlte Zentrifuge mit Festwinkelrotor für Reaktionsgefäße (1.5 + 2 mL) | <i>Eppendorf AG</i> , Hamburg, Deutschland                         |
|                | <i>Eppendorf Centrifuge 5810R</i> , gekühlte Zentrifuge mit Festwinkelrotor für Reaktionsgefäße (15 + 50 mL) | <i>Eppendorf AG</i> , Hamburg, Deutschland                         |
|                | <i>Eppendorf Concentrator 5301</i> , Vakuumzentrifuge                                                        | <i>Eppendorf AG</i> , Hamburg, Deutschland                         |
|                | <i>Sorvall F10S-4x1000</i> , Festwinkelzentrifugationsrotor                                                  | <i>Thermo Fischer Scientific</i> , Waltham, MA, USA                |
|                | <i>Sorvall F9S</i> , Festwinkelzentrifugationsrotor                                                          | <i>Thermo Fischer Scientific</i> , Waltham, MA, USA                |
|                | <i>Sorvall RC6+</i> , gekühlte Standzentrifuge                                                               | <i>Thermo Fischer Scientific</i> , Waltham, MA, USA                |

**Tabelle 17.** Übersicht über in dieser Arbeit verwendete Software.

| Software                         | Verwendung                                | Hersteller                                   |
|----------------------------------|-------------------------------------------|----------------------------------------------|
| Adobe Illustrator CS 5.1         | Erstellung von Vektorgrafiken             | <i>Adobe Systems</i>                         |
| Adobe Photoshop CS 5.1           | Bearbeitung von Fotografien               | <i>Adobe Systems</i>                         |
| ChemBioDraw 16.0 & 18.0          | Zeichnen von Strukturformeln              | <i>PerkinElmer Informatics</i>               |
| CloneManager 9.4 Professional    | Planung von Klonierungsstrategien         | <i>Scientific &amp; Educational Software</i> |
| CorelDRAW 2018                   | Erstellung von Vektorgrafiken             | <i>Corel Corporation</i>                     |
| CorelPHOTO-PAINT 2018            | Bearbeitung von Fotografien               | <i>Corel Corporation</i>                     |
| Design Expert 11 & 12            | Experimentaldesign und Auswertung         | <i>StatEase, Inc.</i>                        |
| Easyfig <sup>32</sup>            | Vergleichende Darstellung von Genclustern | <i>Freeware</i> <sup>[266]</sup>             |
| ensochemLab 7.0.5                | Elektronisches Laborjournal               | <i>enso Software GmbH</i>                    |
| ImageJ <sup>33</sup>             | Densitometrie                             | <i>Freeware</i> <sup>[295]</sup>             |
| MestReNova 10.0                  | Analyse von NMR Daten                     | <i>Mestrelab Research S.L.</i>               |
| Microsoft Excel 2010 & 2016      | Auswertung von Datensätzen                | <i>Microsoft Corp.</i>                       |
| Microsoft PowerPoint 2010 & 2016 | Erstellung von Präsentationen             | <i>Microsoft Corp.</i>                       |
| Microsoft Word 2010 & 2016       | Erstellung von Textdokumenten             | <i>Microsoft Corp.</i>                       |
| OriginPro 9.0G & 2018            | Lineare und nicht-lineare Regression      | <i>OriginLab Corp.</i>                       |

<sup>32</sup> November 2019: <https://mjsull.github.io/Easyfig/>

<sup>33</sup> November 2019: <https://imagej.net/index.php?title=Welcome&oldid=38266>

### 8.1.2 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien wie Pipettenspitzen für Luftpolsterpipetten (0.1–1000 µL), Reaktionsgefäße (1.5 mL, 2 mL, 15 mL, 50 mL), Petrischalen (92 × 16 mm) sowie Semimikroküvetten (Polystyrol) wurden von *neoLab Migge GmbH* (Heidelberg, Deutschland) bezogen. Sterile Einwegspritzen der *Injekt®* Serie (Polypropylen/Polyethylen) wurden von *B. Braun Melsungen AG* (Melsungen, Deutschland) erworben, während sterile Spritzenfilter (0.20 µm, Celluloseacetatmembran) und Spritzenfilter mit regenerierter Cellulose (*Sartorius Minisart RC4*, 0.45 µm) von *VWR International GmbH* (Darmstadt, Deutschland) verwendet wurden. Sterile Flaschenaufsatzfilter (0.2 µm, 250 mL, Polyethersulfon) wurden von *SARSTEDT AG & Co. KG* (Nümbrecht, Deutschland) erworben. Dünnschichtchromatographie (DC)-Platten mit Kieselgel 60 [Polygram®SIL G/UV<sub>254</sub>; spezifische Oberfläche (BET) ≈ 500 m<sup>2</sup>/g, mittlere Porenweite 60 Å, spezifisches Porenvolumen 0.75 mL/g, Partikelgröße 5–17 µm] und DC-Platten mit Aluminiumoxid [Polygram®Alox N/UV<sub>254</sub>; spezifische Oberfläche (BET) ≈ 200 m<sup>2</sup>/g, mittlere Porenweite 60 Å] wurden von *Macherey-Nagel* (Düren, Deutschland) bezogen. Für die präparative Säulenchromatographie wurde Kieselgel 60 (Partikelgröße 40–63 µm) und neutrales Aluminiumoxid (Aktivitätsstufe I, Partikelgröße 50–200 µm, spezifische Oberfläche (BET) ≈ 130 m<sup>2</sup>/g) von *Macherey-Nagel* (Düren, Deutschland) verwendet. Mikrotiterplatten (Nunc®; Polystyrol, flacher Boden) wurden von *Nunc™ Thermo Fisher Scientific* (Waltham, MA, USA) und *Deep-Well* Platten (Polypropylen, Lösungsmittelresistent, konischer Boden) von *Eppendorf AG* (Hamburg, Deutschland) erworben. *FlowerPlates* (MTP-48-B, 48 Well) wurden von *m2p labs GmbH* (Baesweiler, Deutschland) bezogen und EP-102 Elektroporationsküvette von *cell projects Ltd* (Harrietsham, UK).

### 8.1.3 Chemikalien

Die in dieser 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. Organische Lösungsmittel wurden kommerziell erworben und vor Benutzung destilliert, um Stabilisatoren zu entfernen.

### 8.1.4 Enzyme

Die *Phusion Hot Start II* DNA-Polymerase (2 U/µL), *Phire Hot Start II* DNA-Polymerase, T4 DNA-Ligase, Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs, jeweils 10 mM) und alle Restriktionsendonukleasen wurden bei *Thermo Fisher Scientific* (Waltham, MA, USA) erworben. *Taq* DNA-Ligase (40000 U/mL) und T5-Exonuklease (10000 U/mL) wurden von *New England BioLabs GmbH* (Frankfurt am Main, Deutschland) bezogen. Die *Herculase II Fusion* DNA Polymerase wurde von *Agilent* (Santa Clara, CA, USA) bezogen. Proteinase K (> 600 mAU/mL) wurde von *Qiagen GmbH* (Hilden, Deutschland) erworben.

### 8.1.5 Oligonukleotide und Plasmide

Alle Oligonukleotide wurden als Lyophilisat von *Sigma-Aldrich* (Steinheim, Deutschland) erhalten und in dest. H<sub>2</sub>O gelöst, um eine 100 mM Lösung zu erhalten. Eine Übersicht über die genutzten Oligonukleotide und deren Sequenzen ist in Tabelle 18 zu finden. Synthetische Gene wurden bei *GenScript USA Inc.* (Piscataway, NJ, USA) im Vektor pUC57 oder pET28a(+) bestellt und wurden zuvor für *P. putida* Codon harmonisiert (redH\_synth) bzw. Codon optimiert (marH\_synth). Im Falle von mcpH\_synth wurden manuell in *P. putida* und *E. coli* seltene Codons sowie *SacI* und *XhoI* Schnittstellen innerhalb des Gens durch Einfügen stummer Mutationen entfernt (Vektorkarten, Sequenzen: Kapitel 9.6). Alle synthetischen Gene sind mit dem Suffix „\_synth“ gekennzeichnet. Alle Plasmide, die in dieser Arbeit verwendet und/oder erstellt wurden sowie deren Genotyp und Herkunft sind in Tabelle 19 gelistet.

**Tabelle 18.** Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide. Alle Sequenzen sind in 5'→3'-Richtung angegeben und die Suffixe „\_fw“ (engl. *forward*) und „\_rv“ (engl. *reverse*) zeigen die Orientierung der Primer bei Anlagerung an den *sense*- bzw. *antisense*-Strang an. Nicht bindende Nukleotide für die Mutagenese sind fett gedruckt. Die mit dem Zielgen überlappenden Sequenzen bei *Gibson Assembly*® Primern sind unterstrichen. Es ist weiterhin vermerkt für welche Methode die Primer eingesetzt wurden. [A/S = Analyse/Sequenzierprimer; GA = *Gibson Assembly*®; N = *Nested PCR*; OE = *Overlap Extension PCR* QC = *QuikChange*®]

| Name Oligonukleotid <sup>34</sup> | #    | 5'→3'-Sequenz                     | Methode |
|-----------------------------------|------|-----------------------------------|---------|
| HB03_ga_redH_CM_fw                | HB03 | GTGCCGCGCGGCAGCCAATGGACACGCACGTC  | GA      |
|                                   |      | AGC                               |         |
| HB04_ga_redH_CM_rv                | HB04 | AGTGGTGGTGGTGGTGGTGCTCAGTCGGTGGT  | GA      |
|                                   |      | GGCTCC                            |         |
| HB05_ga_mcpH_CM_fw                | HB05 | GTGCCGCGCGGCAGCCAATGACGACGAAGGCG  | GA      |
|                                   |      | ACC                               |         |
| HB06_ga_mcpH_CM_rv                | HB06 | AGTGGTGGTGGTGGTGGTGCTCAGCCCTCCACG | GA      |
|                                   |      | ACCTC                             |         |
| HB07_ga_tamQ_CM_fw                | HB07 | GTGCCGCGCGGCAGCCAATGATTAACGCTGCGA | GA      |
|                                   |      | TG                                |         |
| HB08_ga_tamQ_CM_rv                | HB08 | AGTGGTGGTGGTGGTGGTGCTTAACCTTCCTTA | GA      |
|                                   |      | TCTAAACTACG                       |         |
| HB09_ga_redH                      | HB09 | GTGCCGCGCGGCAGCCAATGGACACGCACGTC  | GA      |
|                                   |      | AGCGACACGAC                       |         |
| HB10_ga_redH                      | HB10 | AGTGGTGGTGGTGGTGGTGCTCAGTCGGTGGT  | GA      |
|                                   |      | GGCTCCGGCCG                       |         |
| HB15_redH_seq_fw                  | HB15 | TCACCAGCCGCTTCGTC                 | A/S     |
| HB16_redH_seq_rv                  | HB16 | TCATCCGGGTCAGGTCGAG               | A/S     |
| HB17_ga_treaP_CM_fw               | HB17 | GTGCCGCGCGGCAGCCAATGACAGTTAACTCTC | GA      |
|                                   |      | TGGCTAT                           |         |
| HB18_ga_treaP_CM_rv               | HB18 | AGTGGTGGTGGTGGTGGTGCTTAATCTTCCTTA | GA      |
|                                   |      | TTTACAATTATTAGAC                  |         |
| HB19_tamQ_seq_fw                  | HB19 | ACCGCAATCCTTATGGCG                | A/S     |
| HB20_tamQ_seq_rv                  | HB20 | TCTGCGGCCAACTGCTC                 | A/S     |
| HB21_tamQ_seq_rv                  | HB21 | ACAAGATGTGGAGTGGAC                | A/S     |
| HB22_mcpH_seq_fw                  | HB22 | ACGTCGGCCTGCACATG                 | A/S     |
| HB23_mcpH_seq_rv                  | HB23 | TGCGTCGTGGACAGCAG                 | A/S     |
| HB24_mcpH_nested_fw               | HB24 | ATGACGACGAAGGCGACCAC              | N       |
| HB25_mcpH_nested_rv               | HB25 | TCAGCCCTCCACGACCTCGA              | N       |
| HB28_mcpH_nested_fw               | HB28 | TCGGCATCAACTCGGCGAC               | N       |
| HB29_mcpH_nested_rv               | HB29 | TCGGTCCGAGAATCGGATAC              | N       |
| HB32_tamQ_seq_fw                  | HB32 | ACAGCAGGCGTTATACACC               | A/S     |
| HB33_mcpH_T255C_fw                | HB33 | GACGACACCGCCACGGGTC               | OE      |
| HB34_mcpH_A686G_fw                | HB34 | CTCCTCCGCGCCGCG                   | OE      |
| HB35_mcpH_A686G_rv                | HB35 | CGCGGCGCGGAGGAG                   | OE      |
| HB36_mcpH_A842G_fw                | HB36 | TGGCCCCGCGGGCTCCAT                | OE      |
| HB37_mcpH_A842G_rv                | HB37 | ATGGAGCCCGCGGGGCCA                | OE      |
| HB38_mcpH_A1463G_fw               | HB38 | GGCGACTGCGCGGCG                   | OE      |
| HB39_mcpH_A1463G_rv               | HB39 | CGCCGCGCAGTCGCC                   | OE      |
| HB40_mcpH_T2037AG2039A_fw         | HB40 | GGAGATCTGGAGCGAGACGCAG            | OE      |
| HB41_mcpH_T2037AG2039A_rv         | HB41 | CTGCGTCTCGCTCCAGATCTCC            | OE      |
| HB42_mcpH_T2070C_fw               | HB42 | GGTCAAGGAGATCATCGAGGCG            | OE      |
| HB43_mcpH_T2070C_rv               | HB43 | CGCTCGATGATCTCCTTGACC             | OE      |
| HB44_mcpH_T255C_rv                | HB44 | GACCGTGCGGTGTGTCGTC               | OE      |
| HB69_treaP_seq_fw                 | HB69 | TTAGCGAAGCAGCCTTTC                | A/S     |

<sup>34</sup> Im Verlaufe der experimentellen Phase der Doktorarbeit fand eine Umbenennung des Kondensationsenzym TreA in TreAP statt [vgl. (Tabelle 20)]. Die Namen aller Primer in dieser Arbeit wurden an die neue Benennung angepasst, auch wenn sie im Laborbuch unter alter Benennung aufgeführt sind.





**Tabelle 19.** Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten und erstellten Plasmide.

| Plasmid                        | Genotyp                                                                                                                                                                                          | Herkunft/Referenz                                 |
|--------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------|
| pET28a(+)                      | <i>lacI</i> , T7 Prom, T7 Term, f1 ori, Kan <sup>R</sup> , pBR322 Ori                                                                                                                            | Novagen                                           |
| pET32a(+)                      | <i>lacI</i> , T7 Prom, T7 Term, f1 ori, <i>bla</i> (Amp <sup>R</sup> ), pBR322 Ori                                                                                                               | Novagen                                           |
| pET28a(+):pigC                 | <i>lacI</i> , T7 Prom, T7 Term, f1 ori, Kan <sup>R</sup> , pBR322 ori, <i>pigC</i>                                                                                                               | [17, 197], dort als pPigC_3 bezeichnet            |
| pET28a(+):tamQ                 | <i>lacI</i> , T7 Prom, T7 Term, f1 ori, Kan <sup>R</sup> , pBR322 ori, <i>tamQ</i>                                                                                                               | diese Arbeit                                      |
| pET28a(+):treaP <sup>[a]</sup> | <i>lacI</i> , T7 Prom, T7 Term, f1 ori, Kan <sup>R</sup> , pBR322 ori, <i>treaP</i>                                                                                                              | diese Arbeit                                      |
| pET28a(+):tamC                 | <i>lacI</i> , T7 Prom, T7 Term, f1 ori, Kan <sup>R</sup> , pBR322 ori, <i>tamC</i>                                                                                                               | diese Arbeit                                      |
| pET28a(+):treaC <sup>[a]</sup> | <i>lacI</i> , T7 Prom, T7 Term, f1 ori, Kan <sup>R</sup> , pBR322 ori, <i>treaC</i>                                                                                                              | diese Arbeit                                      |
| pET28a(+):redH                 | <i>lacI</i> , T7 Prom, T7 Term, f1 ori, Kan <sup>R</sup> , pBR322 ori, <i>redH</i>                                                                                                               | diese Arbeit                                      |
| pET28a(+):mcpH <sup>[b]</sup>  | <i>lacI</i> , T7 Prom, T7 Term, f1 ori, Kan <sup>R</sup> , pBR322 ori, <i>mcpH</i>                                                                                                               | diese Arbeit                                      |
| pET28a(+):mcpH_synth           | <i>lacI</i> , T7 Prom, T7 Term, f1 ori, Kan <sup>R</sup> , pBR322 ori, <i>mcpH_synth</i>                                                                                                         | GenScript USA Inc.                                |
| pET28a(+):marH_synth           | <i>lacI</i> , T7 Prom, T7 Term, f1 ori, Kan <sup>R</sup> , pBR322 ori, <i>marH_synth</i>                                                                                                         | [259]                                             |
| pET32a(+):pigC                 | <i>lacI</i> , T7 Prom, T7 Term, f1 ori, <i>bla</i> (Amp <sup>R</sup> ), pBR322 ori, <i>pigC</i>                                                                                                  | diese Arbeit                                      |
| pET32a(+):tamQ                 | <i>lacI</i> , T7 Prom, T7 Term, f1 ori, <i>bla</i> (Amp <sup>R</sup> ), pBR322 ori, <i>tamQ</i>                                                                                                  | diese Arbeit                                      |
| pET32a(+):treaP <sup>[a]</sup> | <i>lacI</i> , T7 Prom, T7 Term, f1 ori, <i>bla</i> (Amp <sup>R</sup> ), pBR322 ori, <i>treaP</i>                                                                                                 | diese Arbeit                                      |
| pET32a(+):tamC                 | <i>lacI</i> , T7 Prom, T7 Term, f1 ori, <i>bla</i> (Amp <sup>R</sup> ), pBR322 ori, <i>tamC</i>                                                                                                  | diese Arbeit                                      |
| pET32a(+):treaC <sup>[a]</sup> | <i>lacI</i> , T7 Prom, T7 Term, f1 ori, <i>bla</i> (Amp <sup>R</sup> ), pBR322 ori, <i>treaC</i>                                                                                                 | diese Arbeit                                      |
| pUC57::redH_synth              | <i>bla</i> (Amp <sup>R</sup> ), <i>lacZ</i> , <i>rep</i> (pMB1), <i>redH_synth</i>                                                                                                               | GenScript USA Inc.                                |
| pUC57::marH_synth              | <i>bla</i> (Amp <sup>R</sup> ), <i>lacZ</i> , <i>rep</i> (pMB1), <i>marH_synth</i>                                                                                                               | GenScript USA Inc.                                |
| pG-KJE8                        | <i>araB</i> Prom, <i>dnaK</i> , <i>dnaJ</i> , <i>grpE</i> , <i>rrnBT1T2</i> Term, p15A ori, tet <sup>R</sup> , Pzt-1 Prom, <i>groES</i> , <i>groEL</i> , Cm <sup>R</sup> , <i>araC</i> Repressor | TaKaRa Bio Inc. (Kusatsu, Präfektur Shiga, Japan) |
| pGro7                          | <i>araB</i> Prom, <i>groES</i> , <i>groEL</i> , pACYC ori, Cm <sup>R</sup> , <i>araC</i> Repressor                                                                                               | TaKaRa Bio Inc. (Kusatsu, Präfektur Shiga, Japan) |
| pG-Tf2                         | Pzt-1 Prom, <i>groES</i> , <i>groEL</i> , <i>tig</i> , tet <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup> , p15A ori                                                                                             | TaKaRa Bio Inc. (Kusatsu, Präfektur Shiga, Japan) |
| pTf16                          | <i>araB</i> Prom, <i>tig</i> , p15A ori, Cm <sup>R</sup> , <i>araC</i> Repressor                                                                                                                 | TaKaRa Bio Inc. (Kusatsu, Präfektur Shiga, Japan) |

<sup>[a]</sup> Vgl. Tabelle 20.

<sup>[b]</sup> Wurde nur mit Punktmutationen erhalten (vgl. Kapitel 9.6, Abbildung A 24).

**Tabelle 20.** Benennungen des Kondensationsenzym und der Zyklase aus *P. citrea*.

|                                                       | Kondensationsenzym<br>aus <i>P. citrea</i> | Zyklase aus <i>P. citrea</i> |
|-------------------------------------------------------|--------------------------------------------|------------------------------|
| Benennung des Gens/Enzyms in dieser Arbeit            | <i>treaP</i> /TreaP                        | <i>treaC</i> /TreaC          |
| Benennung des Gens/Enzyms in Laborbuch bis 01.02.2019 | <i>treaC</i> /TreaC                        | —                            |
| Benennung des Gens/Enzyms in Laborbuch ab 01.02.2019  | <i>treaP</i> /TreaP                        | <i>treaC</i> /TreaC          |

### 8.1.6 Mikroorganismen

**Tabelle 21.** Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Mikroorganismen.

| Mikroorganismus                                                                     | Genotyp                                                                                                                                                             | Herkunft/Referenz | Verwendung           |
|-------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|----------------------|
| <i>E. coli</i> BL21(DE3)                                                            | F <sup>-</sup> <i>ompT gal dcm lon hsdSB</i> (rB <sup>-</sup> mB <sup>-</sup> ) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7p07 ind1 sam7 nin5]) [malB <sup>+</sup> ]K <sup>-</sup> 12(λS) | [371]             | Proteinexpression    |
| <i>E. coli</i> DH5α                                                                 | F <sup>-</sup> Φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (rK <sup>-</sup> , mK <sup>+</sup> ) phoA supE44 λ <sup>-</sup> thi-1 gyrA96 relA1                | [372]             | Klonierung           |
| <i>E. coli</i> Mach1                                                                | ΔrecA1398 endA1 tonA Φ80ΔlacM15 ΔlacX74 hsdR(rK <sup>-</sup> mK <sup>+</sup> )                                                                                      | [373]             | Klonierung           |
| <i>E. coli</i> Rosetta <sup>TM</sup> 2(DE3)                                         | F <sup>-</sup> <i>ompT lon gal dcm hsdSB</i> (rB <sup>-</sup> mB <sup>-</sup> )(DE3) pRARE2 (Cam <sup>R</sup> )                                                     | Novagen           | Proteinexpression    |
| <i>P. pastoris</i> , DSM 70382 ( <i>K. phaffii</i> )                                | Wildtyp                                                                                                                                                             | [374]             | Toxizitäts-Assays    |
| <i>P. citrea</i> (DSM 8771)                                                         | Wildtyp                                                                                                                                                             | [144]             | Genomisolierung      |
| <i>P. putida</i> pig-r2 <sup>[a]</sup>                                              | r <sup>-</sup> , m <sup>+</sup> , TREX-LpigR Gm <sup>R</sup>                                                                                                        | [205, 212]        | Naturstoffproduktion |
| <i>P. putida</i> pig-r2 Δ <i>pigD</i> <sup>[a]</sup>                                | r <sup>-</sup> , m <sup>+</sup> , <i>pig Cluster</i> , TREX-LpigR Δ <i>pigD</i> Gm <sup>R</sup> Sm <sup>R</sup>                                                     | [205, 212]        | Mutagenese           |
| <i>P. tunicata</i> D2 (DSM 14096)                                                   | Wildtyp                                                                                                                                                             | [375]             | Genomisolierung      |
| <i>S. cerevisiae</i> Y00000 (BY4741)                                                | Wildtyp ( <i>MATα</i> , <i>his3D1</i> , <i>leu2D0</i> , <i>lys2D0</i> , <i>ura3D0</i> )                                                                             | [376]             | Toxizitäts-Assays    |
| <i>S. coelicolor</i> A3(2) (DSM 40783) (neue Bezeichnung: <i>S. violaceoruber</i> ) | Wildtyp                                                                                                                                                             | [377]             | Genomisolierung      |
| <i>S. longispororuber</i> (DSM 40667)                                               | Wildtyp                                                                                                                                                             | [378]             | Genomisolierung      |

<sup>[a]</sup> Die Benennung der Stämme erfolgte analog zu den publizierten Veröffentlichungen. [17, 197, 205, 247]

## 8.2 Synthesevorschriften

### 8.2.1 Allgemeine chemische Methoden

#### 8.2.1.1 Lösungsmittel

Petrolether (PE), EtOAc, Diethylether und Dichlormethan wurden vor Gebrauch mithilfe von Rotationsverdampfern destilliert. Alle anderen Lösungsmittel wurden ohne weitere Reinigung verwendet. Die absoluten Lösungsmittel Tetrahydrofuran, Dichlormethan, Diethylether und Toluol wurden durch eine Lösungsmitteltrocknungsanlage (MB-SPS-800; *M. Braun Inertgas-Systeme GmbH*, Garching, Deutschland) bereitgestellt. Bei Analysen mittels GC-MS, NMR, IR, LC-MS und HRMS (engl. *high-resolution mass spectrometry*) wurden nur Lösungsmittel mit der geforderten Reinheit verwendet.

Zur Extraktion von Prodigininen wurde acides Ethanol verwendet, welches aus Ethanol (p.a.) versetzt mit 4 % (v/v) 1 N HCl besteht.

#### 8.2.1.2 Reaktionsdurchführung, Reaktionskontrolle und präparative Chromatographie

Sofern nicht anders vermerkt, wurden alle Reaktionen unter inerten Bedingungen in zuvor ausgeheizten Glasgeräten unter Schutzgasatmosphäre (Argon oder Stickstoff) durchgeführt. Die Glaswaren wurden über Nacht im Trockenschrank (120 °C) ausgeheizt und bei Arbeiten unter *Schlenk*-Bedingungen zusätzlich mit einem Heißluftgebläse erhitzt. Inerte Reaktionen wurden in *Schlenk*-Kolben und unter Nutzung der *Schlenk*-Technik durchgeführt. Zur Reaktionskontrolle wurde die DC unter Verwendung von DC-Folien mit Kieselgel 60 oder mit Aluminiumoxid (8.1.2) genutzt. Verbindungen wurden durch UV-Licht sichtbar gemacht und/oder durch Anfärben mit KMnO<sub>4</sub> Lösung [1.5 g KMnO<sub>4</sub>, 10 g K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 1.25 mL 10 % (v/v) NaOH, 200 mL H<sub>2</sub>O] oder *p*-Anisaldehyd Lösung (3 mL *p*-Anisaldehyd, 6 mL konz. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 300 mL konz. Essigsäure). Nach Anfärben der DC-Folien wurden diese anschließend unter Nutzung eines Heißluftgebläses entwickelt. Die Entfernung von Lösungsmitteln erfolgte mittels Rotationsverdampfern bei einer Badtemperatur von 40 °C. Für die präparative Säulenchromatographie wurden Glassäulen gefüllt mit Kieselgel 60 oder neutralem Aluminiumoxid (8.1.2) genutzt. Die Elution der Verbindungen erfolgte mit verschiedenen Lösungsmittelgemischen.

#### 8.2.1.3 Massenspektrometrie

GC (Gaschromatographie)-MS Messungen wurden mit einem Trace 1310 Gaschromatographen (*Thermo Scientific*, Waltham, MA, USA) gekoppelt mit einem *ISQ™ QD Single Quadrupole* Massenspektrometer (*Thermo Scientific*, Waltham, MA, USA) durchgeführt. Die Temperaturen des Injektors und des Detektors lagen konstant bei 250 °C bzw. 230 °C. Als Trägergas wurde Helium verwendet. Zur chromatographischen Trennung war der Gaschromatograph mit einer Optima 5MS Säule (30 m × 0.25 mm, 0.25 μm; *Macherey-Nagel*, Düren, Deutschland) ausgestattet. Das folgende Temperaturprogramm wurde verwendet: 1 min, 60 °C; 60–185 °C (15 °C/min); 185–280 °C (120 °C/min); 5 min, 280 °C. Die Ionisation der Analyte im Massenspektrometer erfolgte durch

Elektronenstoßionisation bei 70 eV. Die Proben für GC-MS Messungen wurden in Methyl-*tert*-butylether (MTBE) gelöst.

Hochauflösende Massenspektren wurden vom *Zentralinstitut für Engineering, Elektronik und Analytik* (ZEA-3) des *Forschungszentrum Jülich GmbH* durchgeführt oder am *HHU Center of Molecular and Structural Analytics* (HHUCeMSA), dem gemeinsamen Analytikzentrum der Wissenschaftlichen Einrichtung Chemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Für die Aufnahme der Spektren wurde im Falle des ZEA-3 ein Fouriertransformation-Ionenzyklotronresonanz-Massenspektrometer (FT-ICR-MS) eingesetzt und die in Methanol gelösten Proben mittels Elektronensprayionisation (ESI) ionisiert. Die Messungen am HHUCeMSA erfolgten mit einem UHR QTOF *maXis 4G* (*Bruker Corporation*, Billerica, MA, USA), wobei die in Methanol gelösten Proben ebenfalls per ESI ionisiert wurden.

#### 8.2.1.4 NMR-Spektroskopie und Quantitative NMR-Spektroskopie

Die Aufnahme aller NMR-Datensätze erfolgte an einem *Advance/DRX 600* NMR Spektrometer (*Bruker Corporation*, Billerica, MA, USA). Die Messungen erfolgten bei 297 K in  $\text{CDCl}_3$  oder  $\text{DMSO-}d_6$  bei 600 MHz bzw. 151 MHz. Die chemischen Verschiebungen sind in ppm angegeben und relativ zu den charakteristischen Signalen von  $\text{CDCl}_3$  [ $^1\text{H}$ :  $\delta(\text{CDCl}_3) = 7.26$  ppm und  $^{13}\text{C}$ :  $\delta(\text{CDCl}_3) = 77.2$  ppm],  $\text{DMSO-}d_6$  [ $^1\text{H}$ :  $\delta(\text{DMSO-}d_6) = 2.50$  ppm und  $^{13}\text{C}$ :  $\delta(\text{DMSO-}d_6) = 39.5$  ppm] oder TMS [ $^1\text{H}$ :  $\delta(\text{TMS}) = 0.00$  ppm und  $^{13}\text{C}$ :  $\delta(\text{TMS}) = 0.0$  ppm]. Neben  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -Spektren wurden zusätzlich DEPT (engl. *distortionless enhancement by polarization transfer*)- $135^\circ$  Puls-,  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY (engl. *correlation spectroscopy*),  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -HSQC (engl. *heteronuclear single quantum coherence*) und  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -HMBC (engl. *heteronuclear multiple bond correlation*) Spektren aufgenommen und zur Zuordnung der Signale 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.

Zur Bestimmung der Reinheit von Substanzen wurden quantitative NMR-Messungen durchgeführt unter Verwendung von 4-Methoxyphenol als internem Standard. Die Peakfläche der Methoxygruppe bei 3.76 ppm ( $^1\text{H}$ -NMR) wurde als Referenz genutzt und die Masse des Analyten über die nachfolgende Gleichung berechnet.

$$m_{\text{Produkt}} = m_{\text{Standard}} \cdot \frac{N_{\text{Standard}}}{N_{\text{Produkt}}} \cdot \frac{M_{\text{Produkt}}}{M_{\text{Standard}}} \cdot \frac{I_{\text{Produkt}}}{I_{\text{Standard}}}$$

**Formel 1.** Formel zur Berechnung der Masse eines Analyten bei quantitativer NMR-Analyse ( $m$  = Masse,  $N$  = Anzahl der signalerzeugenden Protonen,  $M$  = molare Masse,  $I$  = Integral des Signals).

#### 8.2.1.5 Infrarot(IR)-Spektroskopie

IR-Spektren wurden auf einem *SpectrumTwo* IR Spektrometer (*Perkin Elmer Inc.*, Waltham, MA, USA) aufgenommen. Die Messungen erfolgten mittels ATR-IR (engl. *attenuated total reflection*) und die Absorptionsbanden jedes Spektrums wurden als Wellenzahlen  $\tilde{\nu}$  ( $1/\text{cm}$ ) aufgeführt. Flüssigkeiten

wurden direkt vermessen, während Feststoffe in Chloroform gelöst und aufgetragen wurden. Die Messung wurde nach Verdampfen des Lösungsmittels begonnen.

#### 8.2.1.6 LC-MS Analyse

Die Analyten wurden mit einer *Agilent 1100* LC-MS (*Agilent Technologies*, Santa Clara, CA, USA), ausgestattet mit einem Diodenarraydetektor (DAD) und API (engl. *atmospheric pressure ionisation*) Elektronenspray Massendetektor analysiert. Die Substanzen wurden auf einer *reversed phase* Atlantis T3 Säule (1 m × 3 mm, 3 µm) getrennt. Wasser und Methanol mit jeweils 0.1 % (v/v) Ameisensäure wurden als mobile Phase verwendet, wobei folgender Gradient verwendet wurde: 0.00 min: Wasser/Methanol (90:10); 4.00 min: Wasser/Methanol (40:60); 6.00 min: Methanol. Nach 10 min wurde das Programm gestoppt. Flussrate und Säulentemperatur wurden konstant bei 0.6 mL/min bzw. 30 °C gehalten. Die Detektionswellenlängen des DAD betrugen  $\lambda = 510$  nm, 520 nm, 530 nm, 540 nm, 3D-Feld ( $\lambda = 190\text{--}800$  nm). Die Analyten wurden in Methanol gelöst und 10 µL jeder Probe injiziert. Die MS Detektion erfolgte im positiven Modus in einem Bereich von  $m/z = 100\text{--}1000$ . Die Substanzen wurden über ihr UV-Absorptionsspektrum und das Masse-zu-Ladungs-Verhältnis identifiziert.

#### 8.2.1.7 Schmelzpunktbestimmung

Die Schmelzpunktbestimmung erfolgte an einem *Büchi Melting Point* B-540 Gerät (*Büchi Labortechnik* GmbH, Essen, Deutschland).

### 8.2.2 Synthese von Pyrrolen

Die Pyrrolsynthesen erfolgten alle unter Schutzgasatmosphäre und möglichst unter Lichtausschluss, um Polymerbildung zu verhindern. Alle in dieser Arbeit hergestellten und genutzten Pyrrole sind in Tabelle 3 aufgeführt. Wie Tabelle 3 zu entnehmen ist, wurden die Pyrrole **3c–3e**, **3g**, **3j**, **3k**, **27b**, **57b**, **57d** und **82b–82d** nicht im Rahmen dieser Arbeit hergestellt, sondern von Dr. *Andreas Klein* erhalten.<sup>[17, 197, 247, 248]</sup>

**Tabelle 22.** Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Pyrrole. Alle in grau markierten Pyrrole wurden von Dr. *Andreas S. Klein* synthetisiert und zur Verfügung gestellt. Alle anderen Pyrrole sind im Rahmen dieser Arbeit hergestellt worden, im Rahmen gemeinsamer Arbeiten mit Dr. *Andreas S. Klein* entstanden oder im Rahmen studentischer Arbeiten. Details hierzu sind in der Tabellenunterschrift zu finden.

| Monopyrrol                  | R <sup>1</sup>       | R <sup>2</sup>       | (CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> | Syntheseroute    | Gesamtausbeute [%]    |
|-----------------------------|----------------------|----------------------|---------------------------------|------------------|-----------------------|
| <b>3b</b> <sup>[a,b]</sup>  | Methyl               | Methyl               | —                               | A                | 36 <sup>[b]</sup>     |
| <b>3i</b> <sup>[b,c]</sup>  | Methyl               | Ethyl                | —                               | A                | 30 <sup>[b]</sup>     |
| <b>3c</b> <sup>[a]</sup>    | Methyl               | <i>n</i> -Propyl     | —                               | A                | 59 <sup>[a]</sup>     |
| <b>3d</b> <sup>[a]</sup>    | Methyl               | <i>n</i> -Butyl      | —                               | A                | 48 <sup>[a]</sup>     |
| <b>3a</b> <sup>[a,b]</sup>  | Methyl               | <i>n</i> -Pentyl     | —                               | A                | 37 <sup>[b]</sup>     |
| <b>3e</b> <sup>[a]</sup>    | Methyl               | <i>n</i> -Hexyl      | —                               | A                | 49 <sup>[a]</sup>     |
| <b>3f</b> <sup>[a,b]</sup>  | Methyl               | <i>n</i> -Octyl      | —                               | A                | 42 <sup>[b]</sup>     |
| <b>3g</b> <sup>[a]</sup>    | Methyl               | <i>n</i> -Decyl      | —                               | A                | 36 <sup>[a]</sup>     |
| <b>3h</b> <sup>[a,b]</sup>  | Methyl               | <i>n</i> -Dodecyl    | —                               | A                | 38 <sup>[b]</sup>     |
| <b>3k</b> <sup>[a]</sup>    | Methyl               | 2-Propenyl           | —                               | A                | 21 <sup>[a]</sup>     |
| <b>3j</b> <sup>[a]</sup>    | Methyl               | 4-Pentenyl           | —                               | A <sup>[d]</sup> | 45 <sup>[a,e]</sup>   |
| <b>57f</b> <sup>[b,c]</sup> | Ethyl                | Methyl               | —                               | A                | 26 <sup>[b]</sup>     |
| <b>57g</b> <sup>[b,c]</sup> | Ethyl                | <i>n</i> -Propyl     | —                               | A                | 4 <sup>[b]</sup>      |
| <b>57a</b> <sup>[a,b]</sup> | Ethyl                | <i>n</i> -Pentyl     | —                               | A                | 7 <sup>[b]</sup>      |
| <b>57e</b> <sup>[b,c]</sup> | <i>n</i> -Propyl     | Ethyl                | —                               | A                | 13 <sup>[b]</sup>     |
| <b>57b</b> <sup>[a]</sup>   | <i>n</i> -Butyl      | <i>n</i> -Propyl     | —                               | A                | 14 <sup>[a]</sup>     |
| <b>57c</b> <sup>[a,b]</sup> | <i>n</i> -Pentyl     | <i>n</i> -Butyl      | —                               | A                | 55 <sup>[b]</sup>     |
| <b>57d</b> <sup>[a]</sup>   | <i>n</i> -Hexyl      | <i>n</i> -Pentyl     | —                               | A                | 35 <sup>[a]</sup>     |
| <b>82e</b> <sup>[f,b]</sup> | —                    | —                    | 5                               | A                | 1 <sup>[b]</sup>      |
| <b>82c</b> <sup>[f]</sup>   | —                    | —                    | 6                               | A                | 44 <sup>[f]</sup>     |
| <b>82b</b> <sup>[f]</sup>   | —                    | —                    | 7                               | A                | 36 <sup>[f]</sup>     |
| <b>82a</b> <sup>[f,b]</sup> | —                    | —                    | 8                               | A                | 23 <sup>[b]</sup>     |
| <b>82d</b> <sup>[f,g]</sup> | —                    | —                    | 12                              | A                | 29 <sup>[f]</sup>     |
| <b>56c</b> <sup>[a,b]</sup> | H                    | Ethyl                | —                               | B                | 21 <sup>[b]</sup>     |
| <b>56d</b> <sup>[a,b]</sup> | H                    | <i>n</i> -Propyl     | —                               | B                | 36 <sup>[b]</sup>     |
| <b>56b</b> <sup>[a,b]</sup> | H                    | <i>n</i> -Pentyl     | —                               | B                | 13 <sup>[b]</sup>     |
| <b>56e</b> <sup>[a,b]</sup> | H                    | <i>n</i> -Hexyl      | —                               | B                | 75 <sup>[b]</sup>     |
| <b>56f</b> <sup>[a,b]</sup> | H                    | <i>n</i> -Octyl      | —                               | B                | 40 <sup>[b]</sup>     |
| <b>56a</b> <sup>[a,b]</sup> | H                    | <i>n</i> -Undecyl    | —                               | B                | 20 <sup>[b]</sup>     |
| <b>56g</b> <sup>[b,c]</sup> | H                    | <i>n</i> -Dodecyl    | —                               | B                | 48 <sup>[b]</sup>     |
| <b>56h</b> <sup>[b,c]</sup> | H                    | <i>n</i> -Tetradecyl | —                               | B                | 52 <sup>[b]</sup>     |
| <b>56i</b> <sup>[b,c]</sup> | H                    | <i>n</i> -Hexadecyl  | —                               | B                | 83 <sup>[b]</sup>     |
| <b>27b</b> <sup>[a]</sup>   | Methyl               | H                    | —                               | C                | 49 <sup>[a]</sup>     |
| <b>27f</b> <sup>[h]</sup>   | <i>n</i> -Propyl     | H                    | —                               | C                | 2 <sup>[h]</sup>      |
| <b>27e</b> <sup>[h]</sup>   | <i>n</i> -Pentyl     | H                    | —                               | C                | 5 <sup>[h]</sup>      |
| <b>27d</b> <sup>[h]</sup>   | <i>n</i> -Octyl      | H                    | —                               | C                | 19 <sup>[h]</sup>     |
| <b>27a</b> <sup>[b,i]</sup> | <i>n</i> -Undecyl    | H                    | —                               | C                | 2–11 <sup>[b,h]</sup> |
| <b>27c</b> <sup>[h]</sup>   | <i>n</i> -Tetradecyl | H                    | —                               | C                | 19 <sup>[h]</sup>     |
| <b>27g</b> <sup>[h]</sup>   | <i>n</i> -Hexadecyl  | H                    | —                               | C                | 17 <sup>[h]</sup>     |

<sup>[a]</sup> *Klein et al.*<sup>[197]</sup>

<sup>[b]</sup> Im Rahmen dieser Arbeit synthetisiert.

<sup>[c]</sup> *Brass et al.*<sup>[177]</sup>

<sup>[d]</sup> 7-Octen-2-on, das Edukt der *Trofimov*-Reaktion, wurde zuvor aus 6-Heptensäure synthetisiert.

<sup>[e]</sup> Gesamtausbeute wurde ausgehend von 6-Heptensäure berechnet.

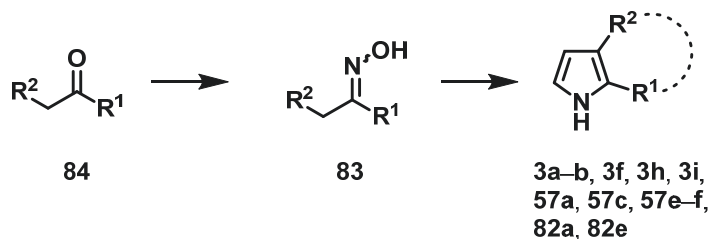
<sup>[f]</sup> *Klein et al.*<sup>[247]</sup>

<sup>[g]</sup> Wurde von M. Sc. *David P. Klebl*, im Rahmen seiner Masterarbeit synthetisiert.<sup>[248]</sup>

<sup>[h]</sup> Wurde von B. Sc. *Annabel Arens* im Rahmen ihrer Bachelorarbeit synthetisiert.<sup>[259]</sup>

<sup>[i]</sup> Synthese wurde von Dr. *Andreas S. Klein* im Rahmen seiner Dissertation etabliert.<sup>[17]</sup>

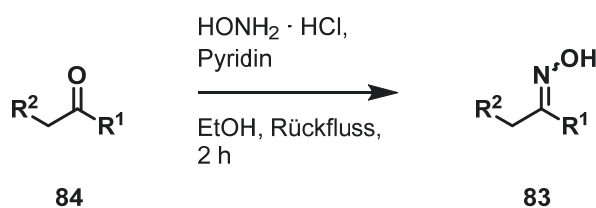
### 8.2.2.1 Vorschrift A: Synthese der 2,3-Dialkylpyrrole **3a**, **3b**, **3f**, **3h**, **3i**, **57a**, **57c**, **57e**, **57f** und der zyklischen 2,3-alkylierten Pyrrole **82a**, **82e**



**Schema 33.** Allgemeines Reaktionsschema der Synthese von 2,3-Dialkylpyrrolen und zyklischen 2,3-alkylierten Pyrrolen nach Vorschrift A.

Die 2,3-dialkylierten Pyrrole **3a**, **3b**, **3f**, **3h**, **3i**, **57a**, **57c**, **57e**, **57f** und die zyklischen 2,3-alkylierten Pyrrole **82a**, **82e** wurden nach Vorschrift A entsprechend den Synthesevorschriften von *Klein et al.* und der Dissertationsschrift von Dr. *Andreas S. Klein* synthetisiert.<sup>[17, 197]</sup>

#### Allgemeine Vorschrift für die Synthese von Ketoximen **83**

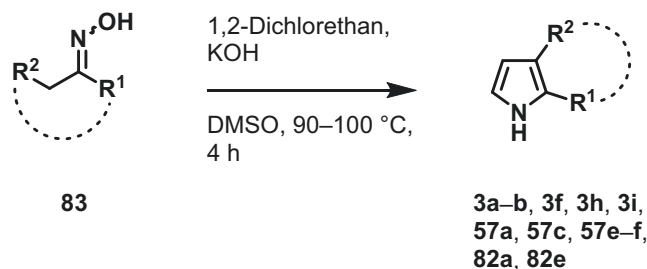


Gemörsertes Hydroxylaminhydrochlorid (1.5 Äq.), Keton<sup>35</sup> (**84**, 1.0 Äq.) und Pyridin (0.8 Äq.) wurden in unvergälltem Ethanol (0.5 mL/mmol Keton) unter normaler Atmosphäre für 2 h unter Rückfluss erhitzt. Die Reaktionsmischung wurde nach Abbruch der Reaktion und Abkühlen mit EtOAc extrahiert (3× 25 mL). Die vereinten organischen Phasen wurden mehrmals mit 1 N HCl und Wasser gewaschen, über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Die Ketoxime<sup>36</sup> **83** wurden ohne weitere Reinigung in der folgenden Synthese eingesetzt. Die Reaktionskontrolle erfolgte über DC und Anfärben mit einer KMnO<sub>4</sub> Lösung.<sup>[17, 197, 247]</sup>

<sup>35</sup> Allen Ketonen wurde die allgemeine Molekülnummer **84** zugeordnet. Die Art der eingesetzten Ketone können den einzelnen folgenden Abschnitten zur Analytik der Pyrrole entnommen werden.

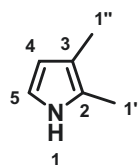
<sup>36</sup> Da es sich um ein Intermediat der Pyrrolsynthese handelt, wurde allen Ketoximen die allgemeine Molekülnummer **83** zugeordnet.

**Allgemeine Vorschrift für die Synthese der 2,3-dialkylierten Pyrrole 3a, 3b, 3f, 3h, 3i, 57a, 57c, 57e, 57f und der zyklischen 2,3-alkylierten Pyrrole 82a, 82e nach Trofimov.**<sup>[245]</sup>



Ketoxim (**83**, 1.0 Äq.), KOH (5.0 Äq.), DMSO (2.13 mL/mmol Ketoxim) und Wasser (13.7  $\mu$ L/mmol Ketoxim) wurden unter Schutzgasatmosphäre in einem Dreihalskolben auf 90–100 °C erhitzt. Der Reaktionskolben wurde mit Aluminiumfolie umhüllt, um den Reaktionsansatz vor Licht zu schützen. Mithilfe einer Spritzenpumpe wurde 1,2-Dichlorethan (3.5 Äq.) in DMSO (0.21 mL/mmol Ketoxim) über einen Zeitraum von 2 h zugegeben. Nach der Hälfte der Zugabe wurde eine zweite Portion KOH (5.0 Äq.) zur Reaktionsmischung gegeben. Der Reaktionsansatz wurde nach Ende der 1,2-Dichlorethan Zugabe noch für weitere 2 h gerührt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von Eiswasser abgebrochen und der Ansatz mit Diethylether (3× 25 mL) extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Die säulenchromatographische Reinigung [Kieselgel; PE/Dichlormethan bzw. PE/EtOAc (verschiedene Verhältnisse) + 1 % (v/v) Triethylamin (TEA)] ergab die Monopyrrole **3a**, **3b**, **3f**, **3h**, **3i**, **57a**, **57c**, **57e**, **57f**, **82a** und **82e** als leicht gelbes Öl oder Feststoff. Die Reaktionskontrolle erfolgte über DC und Anfärben mit *p*-Anisaldehyd Lösung.<sup>[17, 197, 247]</sup>

### 2,3-Dimethyl-1H-pyrrol (**3b**)



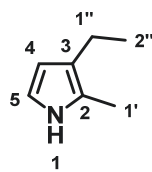
**3b**

Entsprechend Vorschrift A für die Synthese von 2,3-Dialkylpyrrolen (8.2.2.1), wurde das Pyrrol **3b** aus 2-Butanon (2.60 mL, 29.0 mmol) hergestellt und nach säulenchromatographischer Reinigung [PE/Dichlormethan, 75:25 + 1 % (v/v) TEA] als leicht gelbes Öl (983 mg, 10.3 mmol, 36 %) erhalten. <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 2.04 (s, 3H, 1''-H), 2.19 (s, 3H, 1'-H), 6.00 (m<sub>c</sub>, 1H, 4-H), 6.59 (m<sub>c</sub>, 1H, 5-H), 7.71 (brs, 1H, 1-NH); <sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 11.0 (C-1''), 11.1 (C-1'), 110.1 (C-4), 114.2 (C-3), 114.9 (C-5), 123.7 (C-2); IR (ATR-Film):  $\tilde{\nu}$  [1/cm] = 3377, 2921, 1683, 1464, 1246, 1101, 1058, 943, 898, 831, 707, 638, 547; MS (EI, 70 eV):  $m/z$  = 95 [(M)<sup>+</sup>], 94, 80, 67, 51;  $t_R$  = 4.4 min.

Die Analytik Daten stimmen mit der Literatur überein.<sup>[17, 379]</sup>



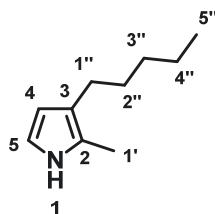
### 3-Ethyl-2-methyl-1H-pyrrol (3i)



**3i** Entsprechend Vorschrift A für die Synthese von 2,3-Dialkylpyrrolen (8.2.2.1), wurde das Pyrrol **3i** aus 2-Pentanon (2.00 g, 23.2 mmol) hergestellt und nach säulenchromatographischer Reinigung [PE/Dichlormethan, 85:15 + 1% (v/v) TEA] als leicht gelbes Öl (752 mg, 6.89 mmol, 30%) erhalten. **<sup>1</sup>H-NMR** (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 1.20 (t,  $^3J_{2'',1''} = 7.6$  Hz, 3H, 2''-H), 2.22 (s, 3H, 1'-H), 2.46 (q,  $^3J_{1'',2''} = 7.6$  Hz, 2H, 1''-H), 6.08 (m<sub>c</sub>, 1H, 4-H), 6.62 (m<sub>c</sub>, 1H, 5-H), 7.71 (brs, 1H, 1-NH); **<sup>13</sup>C-NMR** (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 11.1 (C-1'), 15.7 (C-2''), 19.1 (C-1''), 108.4 (C-4), 115.0 (C-5), 121.3 (C-3), 123.0 (C-2); **IR** (ATR-Film):  $\tilde{\nu}$  [1/cm] = 3376, 2962, 1453, 1103, 951, 899, 832, 697, 547; **MS** (EI, 70 eV):  $m/z$  = 109 [M<sup>+</sup>], 94, 80, 67, 53;  $t_R$  = 5.2 min.

Die NMR-, IR- und MS-Daten stimmen mit der Literatur überein.<sup>[380]</sup>

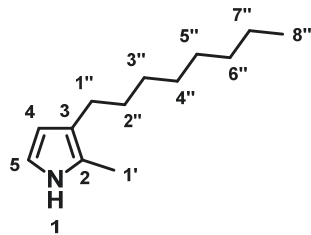
### 2-Methyl-3-pentyl-1H-pyrrole (3a, 2-Methyl-3-amyl-1H-pyrrol, MAP)



**3a** Entsprechend Vorschrift A für die Synthese von 2,3-Dialkylpyrrolen (8.2.2.1), wurde das Pyrrol **3a** aus 2-Octanon (3.00 mL, 19.2 mmol) hergestellt und nach säulenchromatographischer Reinigung [PE/Dichlormethan, 75:25 + 1% (v/v) TEA] als leicht gelbes Öl (1.1 g, 7.2 mmol, 37%) erhalten. **<sup>1</sup>H-NMR** (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 0.91 (t,  $^3J_{5'',4''} = 6.8$  Hz, 3H, 5''-H), 1.28–1.40 (m, 4H, 3'', 4''-H), 1.55 (m<sub>c</sub>, 2H, 2''-H), 2.19 (s, 3H, 1'-H), 2.39 (t,  $^3J_{1'',2''} = 7.7$  Hz, 2H, 1''-H), 6.03 (t,  $^3J_{4,5} = 2.8$  Hz,  $^3J_{4,1} = 2.8$  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); **<sup>13</sup>C-NMR** (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 11.2 (C-1'), 14.3 (C-5''), 22.8 (C-4''), 26.0 (C-1''), 31.2 (C-2''), 31.9 (C-3''), 109.0 (C-4), 114.9 (C-5), 119.9 (C-3), 123.3 (C-2); **IR** (ATR-Film):  $\tilde{\nu}$  [1/cm] = 3382, 2925, 2857, 1695, 1465, 1377, 1266, 1060, 1021, 830, 707; **MS** (EI, 70 eV):  $m/z$  = 151 [(M)<sup>+</sup>], 108, 94, 80, 67, 50 ;  $t_R$  = 8.5 min.

Die Analytik Daten stimmen mit der Literatur überein.<sup>[17, 19]</sup>

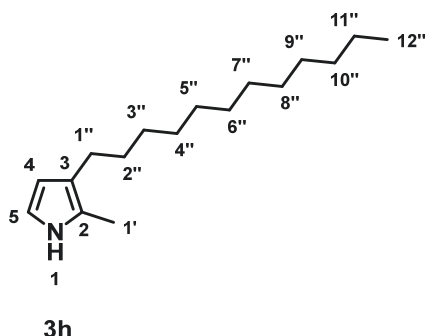
### 2-Methyl-3-octyl-1H-pyrrol (3f)



**3f** Entsprechend Vorschrift A für die Synthese von 2,3-Dialkylpyrrolen (8.2.2.1), wurde das Pyrrol **3f** aus 2-Undecanon (1.78 mL, 8.60 mmol) hergestellt und nach säulenchromatographischer Reinigung [PE/Dichlormethan, 75:25 + 1% (v/v) TEA, dann PE/EtoAc, 90:10 + 1% (v/v) TEA] als leicht gelbes Öl (702 mg, 3.63 mmol, 42%) erhalten. **<sup>1</sup>H-NMR** (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 0.89 (t,  $^3J_{8'',7''} = 7.0$  Hz, 3H, 8''-H), 1.22–1.38 (m, 10H, 3'', 4'', 5'', 6'', 7''-H), 1.53 (m<sub>c</sub>, 2H, 2''-H), 2.19 (s, 3H, 1'-H), 2.39 (t,  $^3J_{1'',2''} = 7.7$  Hz, 2H, 1''-H), 6.02 (t,  $^3J_{4,5} = 2.8$  Hz,  $^3J_{4,1} = 2.8$ , 1H, 4-H), 6.60 (t,  $^3J_{5,4} = 2.7$  Hz,  $^3J_{5,1} = 2.7$  Hz, 1H, 5-H), 7.70 (brs, 1H, 1-NH); **<sup>13</sup>C-NMR** (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 11.2 (C-1'), 14.3 (C-8''), 22.8, 26.1 (C-1''), 29.5, 29.7, 29.8, 31.5 (C-2''), 32.1, 109.0 (C-4), 114.9 (C-5), 119.9 (C-3), 123.3 (C-2); **IR** (ATR-Film):  $\tilde{\nu}$  [1/cm] = 3379, 2922, 2853, 1464, 1378, 1109, 900, 831, 710, 669, 544; **MS** (EI, 70 eV):  $m/z$  = 193 [(M)<sup>+</sup>], 178, 136, 108, 94, 80, 53;  $t_R$  = 10.8 min.

Die Analytikangaben stimmen mit der Literatur überein.<sup>[17, 197]</sup>

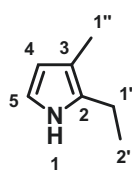
### 3-Dodecyl-2-methyl-1H-pyrrol (3h)



Entsprechend Vorschrift A für die Synthese von 2,3-Dialkylpyrrolen (8.2.2.1), wurde das Pyrrol **3h** aus 2-Pentadecanon (2.50 g, 11.0 mmol) hergestellt und nach säulenchromatographischer Reinigung [PE/Dichlormethan, 75:25 + 1% (v/v) TEA] als leicht gelbes Öl (1.1 g, 4.2 mmol, 38%) erhalten. **<sup>1</sup>H-NMR** (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 0.89 (t, <sup>3</sup>J<sub>12'',11''</sub> = 6.9 Hz, 3H, 12''-H), 1.24–1.36 (m, 18H, 3''-, 4''-, 5''-, 6''-, 7''-, 8''-, 9''-, 10''-, 11''-H), 1.52 (m<sub>c</sub>, 2H, 2''-H), 2.18 (s, 2H, 1'-H), 2.38 (t, <sup>3</sup>J<sub>1'',2''</sub> = 7.7 Hz, 2H, 1''-H), 6.02 (m<sub>c</sub>, 1H, 4-H), 6.59 (t, <sup>3</sup>J<sub>5,4</sub> = 2.7 Hz, <sup>3</sup>J<sub>5,1</sub> = 2.7 Hz, 1H, 5-H), 7.71 (brs, 1H, 1-NH); **<sup>13</sup>C-NMR** (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 11.2 (C-1'), 14.3 (C-12''), 22.8, 26.1 (C-1''), 29.5, 29.8, 29.8, 29.9, 31.5 (C-2''), 32.1, 109.0 (C-4), 114.9 (C-5), 119.9 (C-3), 123.3 (C-2); **IR** (ATR-Film):  $\tilde{\nu}$  [1/cm] = 3381, 2922, 2852, 1724, 1465, 1378, 1277, 1111, 901, 831, 709, 544; **MS** (EI, 70 eV): *m/z* = 249 [(M)<sup>+</sup>], 234, 220, 206, 192, 178, 164, 150, 136, 122, 108, 94, 67, 52; *t<sub>R</sub>* = 12.5 min.

Die Analytikangaben stimmen mit der Literatur überein.<sup>[17, 197]</sup>

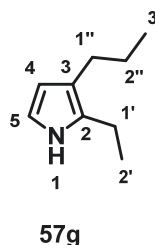
### 2-Ethyl-3-methyl-1H-pyrrol (57f)



Entsprechend Vorschrift A für die Synthese von 2,3-Dialkylpyrrolen (8.2.2.1), wurde das Pyrrol **57f** aus 3-Pentanon (2.44 mL, 23.2 mmol) hergestellt und nach säulenchromatographischer Reinigung [PE/Dichlormethan, 85:15 + 1% (v/v) TEA] als leicht gelbes Öl (634 mg, 5.81 mmol, 26%) erhalten. **<sup>1</sup>H-NMR** (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 1.22 (t, <sup>3</sup>J<sub>2',1'</sub> = 7.7 Hz, 3H, 2'-H), 2.07 (s, 3H, 1''-H), 2.61 (q, <sup>3</sup>J<sub>1',2'</sub> = 7.6 Hz, 2H, 1'-H), 6.03 (m<sub>c</sub>, 1H, 4-H), 6.61 (m<sub>c</sub>, 1H, 5-H), 7.76 (brs, 1H, 1-NH); **<sup>13</sup>C-NMR** (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 10.9 (C-1''), 14.2 (C-2'), 19.1 (C-1'), 110.2 (C-4), 113.4 (C-3), 114.9 (C-5), 129.7 (C-2); **IR** (ATR-Film):  $\tilde{\nu}$  [1/cm] = 3380, 2966, 1466, 1107, 1061, 1018, 898, 831, 716, 695, 638, 547; **MS** (EI, 70 eV): *m/z* = 109 [M<sup>+</sup>], 94, 80, 67, 53; *t<sub>R</sub>* = 5.0 min.

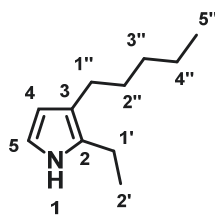
Die <sup>13</sup>C-NMR-Daten stimmen mit der Literatur überein.<sup>[381]</sup>

### 2-Ethyl-3-propyl-1H-pyrrol (57g)



Entsprechend Vorschrift A für die Synthese von 2,3-Dialkylpyrrolen (8.2.2.1), wurde das Pyrrol **57g** aus 3-Heptanon (2.58 mL, 18.5 mmol) hergestellt und nach säulenchromatographischer Reinigung [PE/Dichlormethan, 85:15 + 1% (v/v) TEA] als leicht gelbes Öl (109 mg, 790 μmol, 4%) erhalten. **<sup>1</sup>H-NMR** (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 0.96 (t, <sup>3</sup>J<sub>3'',2''</sub> = 7.2 Hz, 3H, 3''-H), 1.20 (t, <sup>3</sup>J<sub>2',1'</sub> = 7.6 Hz, 3H, 2'-H), 1.57 (m<sub>c</sub>, 2H, 2''-H), 2.39 (t, <sup>3</sup>J<sub>1'',2''</sub> = 7.7 Hz, 2H, 1''-H), 2.60 (q, <sup>3</sup>J<sub>1',2'</sub> = 7.6 Hz, 2H, 1'-H), 6.03 (m<sub>c</sub>, 1H, 4-H), 6.62 (t, <sup>3</sup>J<sub>5,4</sub> = 2.7 Hz, <sup>3</sup>J<sub>5,1</sub> = 2.7 Hz, 1H, 5-H), 7.75 (brs, 1H, 1-NH); **<sup>13</sup>C-NMR** (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 14.3 (C-3''), 14.6 (C-2'), 19.0 (C-1'), 24.8 (C-2''), 28.1 (C-1''), 109.0 (C-4), 115.0 (C-5), 118.9 (C-3), 129.5 (C-2); **IR** (ATR-Film):  $\tilde{\nu}$  [1/cm] = 3383, 2961, 2928, 1464, 1109, 1066, 1007, 902, 832, 714, 544; **MS** (EI, 70 eV): *m/z* = 137 [M<sup>+</sup>], 122, 108, 93, 80, 67; *t<sub>R</sub>* = 6.7 min; **HRMS** (ESI-FTMS, positiv-Ion): Berechnet für C<sub>9</sub>H<sub>16</sub>N (M + H)<sup>+</sup> = 138.12773, gefunden = 138.12772.

### 2-Ethyl-3-pentyl-1H-pyrrol (57a)



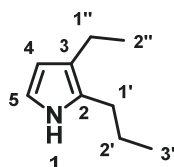
**57a**

Entsprechend Vorschrift A für die Synthese von 2,3-Dialkylpyrrolen (8.2.2.1), wurde das Pyrrol **57a** aus 3-Nonanon (2.50 mL, 14.5 mmol) hergestellt und nach säulenchromatographischer Reinigung [PE/EtOAc, 98:2 + 1 % (v/v) TEA] als leicht gelbes Öl (163 mg, 986  $\mu$ mol, 7%) erhalten. **<sup>1</sup>H-NMR** (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 0.90 (m<sub>c</sub>, 3H, 5''-H), 1.20 (m<sub>c</sub>, 3H, 2'-H), 1.28–1.39 (m<sub>c</sub>, 4H, 3'', 4''-H), 1.54 (m<sub>c</sub>, 2H, 2''-H), 2.39 (t, <sup>3</sup>J<sub>1'',2''</sub> = 7.2 Hz, 2H, 1''-H), 2.59 (q, <sup>3</sup>J<sub>1',2'</sub> = 7.6 Hz, 2H, 1'-H), 6.03 (m<sub>c</sub>, 1H, 4-H),

6.61 (m<sub>c</sub>, 1H, 5-H), 7.76 (brs, 1H, 1-NH); **<sup>13</sup>C-NMR** (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 14.3 (C-5''), 14.6 (C-2'), 19.0 (C-1'), 22.8 (C-3''), 25.9 (C-1''), 31.4 (C-2''), 32.0 (C-4''), 108.9 (C-4), 115.0 (C-5), 119.1 (C-3), 129.4 (C-2); **IR** (ATR-Film):  $\tilde{\nu}$  [1/cm] = 3384, 2959, 2925, 2854, 1465, 1377, 1110, 1064, 1010, 900, 831, 713, 477; **MS** (EI, 70 eV):  $m/z$  = 165 [M<sup>+</sup>], 150, 136, 122, 108, 93, 80, 67, 51;  $t_R$  = 9.1 min.

Die Analytikangaben stimmen mit der Literatur überein.<sup>[17, 197]</sup>

### 3-Ethyl-2-propyl-1H-pyrrol (57e)

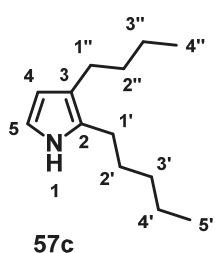


**57e**

Entsprechend Vorschrift A für die Synthese von 2,3-Dialkylpyrrolen (8.2.2.1), wurde das Pyrrol **57e** aus 4-Heptanon (1.62 g, 14.2 mmol) hergestellt und nach säulenchromatographischer Reinigung [PE/EtOAc, 90:10 + 1 % (v/v) TEA] als leicht gelbes Öl (260 mg, 1.89 mmol, 13%) erhalten. **<sup>1</sup>H-NMR** (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>):

$\delta$  [ppm] = 0.96 (t, <sup>3</sup>J<sub>3',2'</sub> = 7.4 Hz, 3H, 3'-H), 1.18 (t, <sup>3</sup>J<sub>2'',1''</sub> = 7.6 Hz, 3H, 2''-H), 1.58 (m<sub>c</sub>, 2H, 2'-H), 2.44 (q, <sup>3</sup>J<sub>1'',2''</sub> = 7.6 Hz, 2H, 1''-H), 2.54 (t, <sup>3</sup>J<sub>1',2'</sub> = 7.6 Hz, 2H, 1'-H), 6.04 (m<sub>c</sub>, 1H, 4-H), 6.62 (t, <sup>3</sup>J<sub>5,4</sub> = 2.7 Hz, <sup>3</sup>J<sub>5,1</sub> = 2.7 Hz, 1H, 5-H), 7.73 (brs, 1H, 1-NH); **<sup>13</sup>C-NMR** (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 14.1 (C-3'), 16.0 (C-2''), 19.1 (C-1''), 23.6 (C-2'), 28.0 (C-1'), 108.2 (C-4), 115.1 (C-5), 121.1 (C-3), 127.8 (C-2); **IR** (ATR-Film):  $\tilde{\nu}$  [1/cm] = 3382, 2960, 1457, 1109, 1071, 899, 832, 713, 548; **MS** (EI, 70 eV):  $m/z$  = 137 [M<sup>+</sup>], 122, 108, 93, 80, 67;  $t_R$  = 6.6 min; **HRMS** (ESI-FTMS, positiv-Ion): Berechnet für C<sub>9</sub>H<sub>16</sub>N (M + H)<sup>+</sup> = 138.12773, gefunden = 138.12772.

### 3-Butyl-2-pentyl-1H-pyrrol (57c)



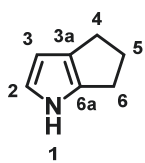
**57c**

Entsprechend Vorschrift A für die Synthese von 2,3-Dialkylpyrrolen (8.2.2.1), wurde das Pyrrol **57c** aus 6-Undecanon (2.50 mL, 12.2 mmol) hergestellt und nach säulenchromatographischer Reinigung [PE/Dichlormethan, 90:10 + 1 % (v/v) TEA] als leicht gelbes Öl (1.3 g, 6.7 mmol, 55%) erhalten. **<sup>1</sup>H-NMR** (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 0.90 (t, <sup>3</sup>J<sub>4'',3''</sub> = 6.8 Hz, 3H, 4''-H), 0.93 (t, <sup>3</sup>J<sub>5',4'</sub> = 7.4 Hz, 3H, 5'-H), 1.27–1.43 (m, 6H, 3', 4', 3''-H), 1.45–1.61 (m, 4H, 2', 2''-H), 2.39 (t, <sup>3</sup>J<sub>1'',2''</sub> = 7.8 Hz, 2H, 1''-H), 2.54

(t, <sup>3</sup>J<sub>1',2'</sub> = 7.8 Hz, 2H, 1'-H), 6.02 (t, <sup>3</sup>J<sub>4,5</sub> = 2.8 Hz, <sup>4</sup>J<sub>4,1</sub> = 2.8 Hz, 1H, 4-H), 6.60 (t, <sup>3</sup>J<sub>5,4</sub> = 2.7 Hz, <sup>3</sup>J<sub>5,1</sub> = 2.7 Hz, 1H, 5-H), 7.73 (brs, 1H, 1-NH); **<sup>13</sup>C-NMR** (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 14.2 (C-4''), 14.2 (C-5'), 22.7 (C-3''), 22.8 (C-4'), 25.7 (C-1''), 25.9 (C-1'), 30.1 (C-2'), 31.8 (C-3'), 33.9 (C-2''), 108.8 (C-4), 115.0 (C-5), 119.5 (C-3), 128.3 (C-2); **IR** (ATR-Film):  $\tilde{\nu}$  [1/cm] = 3384, 2956, 2926, 2856, 1688, 1459, 1378, 1112, 1078, 902, 831, 708, 473; **MS** (EI, 70 eV):  $m/z$  = 193 [M<sup>+</sup>], 150, 136, 108, 94, 80, 53;  $t_R$  = 10.3 min.

Die Analytikangaben stimmen mit der Literatur überein.<sup>[17, 197]</sup>

### 1,4,5,6-Tetrahydrocyclopenta[*b*]pyrrol (**82e**)



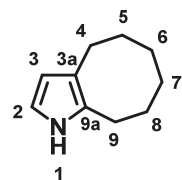
**82e**

Entsprechend Vorschrift A für die Synthese von 2,3-Dialkylpyrrolen (8.2.2.1), wurde das Pyrrol **82e** aus Cyclopentanon (4.50 mL, 50.8 mmol) hergestellt und nach säulenchromatographischer Reinigung [PE/Dichlormethan, 1:1 + 1% (v/v) TEA] als orangebrauner Feststoff (44 mg, 0.41 mmol, 1%) erhalten. <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>):

δ [ppm] = 2.42 (tt, <sup>3</sup>J<sub>5,4</sub> = 7.1 Hz, <sup>3</sup>J<sub>5,6</sub> = 7.1 Hz, 2H, 5-H), 2.62 (t, <sup>3</sup>J<sub>4,5</sub> = 7.0 Hz, 2H, 4-H), 2.68 (t, <sup>3</sup>J<sub>6,5</sub> = 7.1 Hz, 2H, 6-H), 5.99 (dd, <sup>3</sup>J<sub>3,2</sub> = 3.0 Hz, <sup>4</sup>J<sub>3,1</sub> = 2.0 Hz, 1H, 3-H), 6.68 (dd, <sup>3</sup>J<sub>2,3</sub> = 3.0 Hz, <sup>4</sup>J<sub>2,1</sub> = 2.7 Hz, 1H, 2-H), 7.82 (brs, 1H, 1-NH); <sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 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<sup>+</sup>], 106, 80; *t<sub>R</sub>* = 7.5 min.

Die Analytikangaben stimmen mit der Literatur überein.<sup>[17, 247]</sup>

### 4,5,6,7,8,9-Hexahydro-1*H*-cycloocta[*b*]pyrrol (**82a**)



**82a**

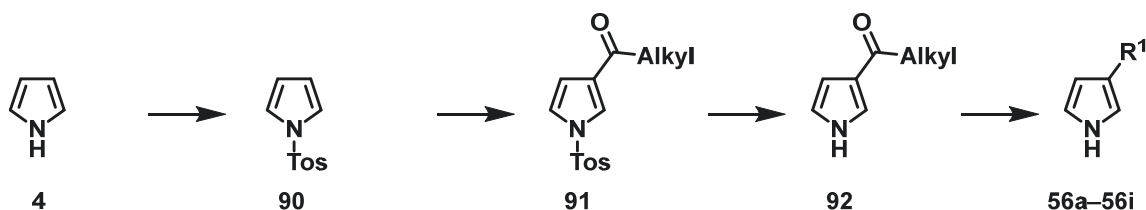
Entsprechend Vorschrift A für die Synthese von 2,3-Dialkylpyrrolen (8.2.2.1), wurde das Pyrrol **82a** aus Cyclooctanon (2.00 g, 15.9 mmol) hergestellt und nach säulenchromatographischer Reinigung [PE/Dichlormethan, 90:10 + 0.5% (v/v) TEA] als leicht braunes Öl (539 mg, 3.61 mmol, 23%) erhalten. <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>):

δ [ppm] = 1.44 (m<sub>c</sub>, 4H, 7-, 6-H), 1.64 (m<sub>c</sub>, 4H, 8-, 5-H), 2.60 (m<sub>c</sub>, 2H, 4-H), 2.70 (m<sub>c</sub>, 2H, 9-H), 5.96 (m<sub>c</sub>, 1H, 3-H), 6.57 (t, <sup>3</sup>J<sub>2,3</sub> = 2.7 Hz, <sup>3</sup>J<sub>2,1</sub> = 2.7 Hz, 1H, 2-H), 7.70 (brs, 1H, 1-NH); <sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 25.1 (C-4), 25.7\*, 25.7\*, 26.1 (C-7), 29.8 (C-8), 30.9 (C-5), 109.4 (C-3), 114.4 (C-2), 119.2 (C-3a), 128.6 (C-9a); IR (ATR-Film):  $\tilde{\nu}$  [1/cm] = 3331, 2914, 2846, 1724, 1452, 1438, 1362, 1233, 1201, 1103, 1066, 974, 951, 901, 883, 860, 842, 778, 746, 722, 695, 669, 607, 576, 504; MS (EI, 70 eV): *m/z* = 149 [M<sup>+</sup>], 120, 106, 93, 80, 64, 53; *t<sub>R</sub>* = 9.4 min.

\* Die Signale weisen eine geringe Differenz auf.

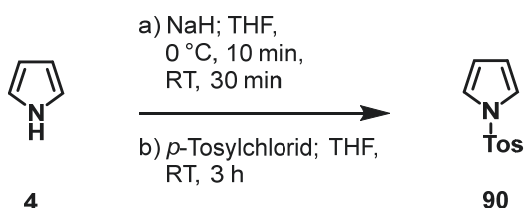
Die Analytik Daten stimmen mit der Literatur überein.<sup>[17, 382]</sup>

### 8.2.2.2 Vorschrift B: Synthese der 3-Alkylpyrrole 56a–56i



**Schema 34.** Allgemeines Reaktionsschema der Synthese der 3-Alkylpyrrole **56a–56i** nach Vorschrift B.

#### *N*-Tosylpyrrol (**90**)

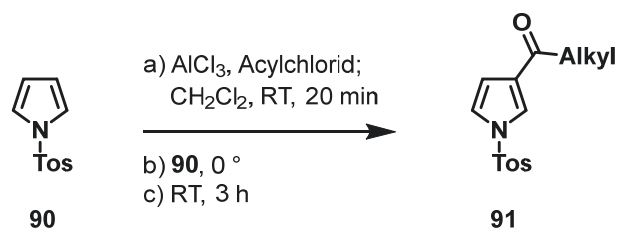


Unter Schutzgasatmosphäre und bei 0 °C wurde langsam 1*H*-Pyrrol (**4**, 3.50 mL, 50.5 mmol, 1.00 Äq.) in einem Zeitraum von 10 min zu einer Lösung aus Natriumhydrid (2.42 g, 101 mmol, 2.00 Äq.) in trockenem Tetrahydrofuran (THF, 16 mL) gegeben. Die Reaktionsmischung wurde für 30 min bei Raumtemperatur gerührt und im Anschluss in trockenem THF (8 mL) gelöstes *p*-Tosylchlorid (9.62 g, 50.5 mmol, 1.00 Äq.) zugegeben. Der Reaktionsansatz wurde für weitere 3 h bei Raumtemperatur gerührt, danach durch Zugabe von Wasser bei 0 °C vorsichtig gequencht und mit Dichlormethan extrahiert (3× 30 mL). Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Die säulenchromatographische Reinigung [Kieselgel; PE/Dichlormethan (75:25) + 1 % (v/v) TEA] ergab *N*-Tosylpyrrol (**90**) als hellen Feststoff (3.70 g, 16.7 mmol, 30%). Der Reaktionsfortschritt wurde über DC und Anfärben mit *p*-Anisaldehyd Lösung verfolgt.

**4** **90** <sup>1</sup>**H-NMR** (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 2.40 (s, 3H, 7'-H), 6.28 (t, <sup>3</sup>J<sub>3,2</sub> = 2.3 Hz, <sup>3</sup>J<sub>3,4</sub> = 2.3 Hz, <sup>3</sup>J<sub>4,3</sub> = 2.3 Hz, <sup>3</sup>J<sub>4,5</sub> = 2.3 Hz, 2H, 3-, 4-H), 7.15 (t, <sup>3</sup>J<sub>2,3</sub> = 2.3 Hz, <sup>3</sup>J<sub>5,4</sub> = 2.3 Hz, <sup>4</sup>J<sub>2,4</sub> = 2.3 Hz, <sup>4</sup>J<sub>5,3</sub> = 2.3 Hz, 2H, 2-, 5-H), 7.28 (d, <sup>3</sup>J<sub>3',2'</sub> = 8.1 Hz, <sup>3</sup>J<sub>5',6'</sub> = 8.1 Hz, 2H, 3'-, 5'-H), 7.74 (d, <sup>3</sup>J<sub>2',3'</sub> = 8.4 Hz, <sup>3</sup>J<sub>6',5'</sub> = 8.4 Hz, 2H, 2'-, 6'-H); <sup>13</sup>**C-NMR** (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 21.7 (C-7'), 113.6 (C-3, C-4), 120.9 (C-5, C-2), 127.0 (C-6', C-2'), 130.1 (C-5', C-3'), 136.3 (C-1'), 145.1 (C-4'); **IR** (ATR-Film):  $\tilde{\nu}$  [1/cm] = 1595, 1459, 1359, 1309, 1168, 1057, 1033, 934, 812, 754, 102, 671, 597, 587, 539; **MS** (EI, 70 eV): *m/z* = 221 [M], 188, 155, 128, 111, 91, 7865, 50; *t<sub>R</sub>* = 11.5 min.

Die Analytikdaten stimmen mit der Literatur überein.<sup>[17]</sup>

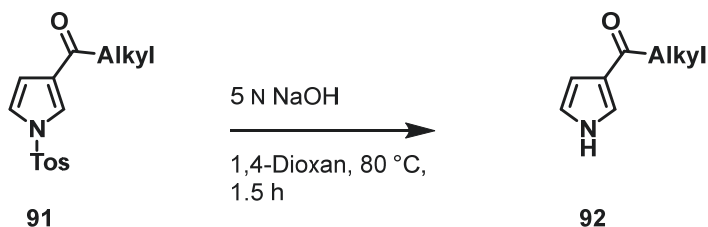
### Allgemeine Vorschrift für die Synthese von 3-Acyl-*N*-tosylpyrrolen **91**



Die 3-Acyl-*N*-tosylpyrrole **91** wurden wie von *Klein et al.* beschrieben nach einer modifizierten Vorschrift von *Katritzky et al.* und *Huffmann et al.* hergestellt.<sup>[197, 383, 384]</sup>

Zu einer Lösung aus trockenem  $\text{AlCl}_3$  (3.0 Äq.) in trockenem Dichlormethan (3.3 mL/mmol *N*-Tosylpyrrol) wurde bei Raumtemperatur und unter Schutzgasatmosphäre langsam das entsprechende Acylchlorid (2.0 Äq.) zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde für 20 min bei Raumtemperatur gerührt, dann eine Lösung aus *N*-Tosylpyrrol (**90**, 1.0 Äq.) in trockenem Dichlormethan (2.2 mL/mmol *N*-Tosylpyrrol) bei  $0^\circ\text{C}$  zugetropft. Der Ansatz wurde für weitere 3 h bei Raumtemperatur gerührt und durch Zugabe von Eiswasser vorsichtig gequencht. Das Produkt wurde mit Dichlormethan ( $3 \times 15\text{ mL}$ ) extrahiert, die vereinten organischen Phasen über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und im Anschluss das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das Produkt wurde ohne weitere Reinigungsschritte in der nächsten Synthese eingesetzt. Der Reaktionsfortschritt wurde über DC und Anfärben mit *p*-Anisaldehyd Lösung verfolgt.

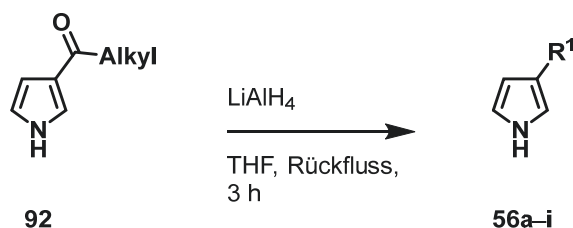
### Allgemeine Vorschrift für die Synthese von 3-Acylpyrrolen **92**



Die 3-Acylpyrrole **92** wurden wie in *Klein et al.* beschrieben nach einer modifizierten Vorschrift von *Kakushima et al.* hergestellt.<sup>[197, 385]</sup>

Eine Lösung aus 3-Acyl-*N*-tosylpyrrol (1.0 Äq.) in 1,4-Dioxan (3.3 mL/mmol 3-Acyl-*N*-tosylpyrrol) und 5 N NaOH (3.3 mL/mmol 3-Acyl-*N*-tosylpyrrol) wurde für 1.5 h bei  $80^\circ\text{C}$  unter Schutzgasatmosphäre gerührt. Anschließend wurde die Reaktionsmischung mit Dichlormethan ( $3 \times 10\text{ mL}$ ) und EtOAc ( $1 \times 10\text{ mL}$ ) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das Produkt wurde ohne weitere Reinigungsschritte in der nächsten Synthese eingesetzt. Der Reaktionsfortschritt wurde über DC und Anfärben mit *p*-Anisaldehyd Lösung verfolgt.

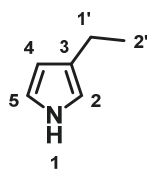
## Allgemeine Vorschrift für die Synthese von 3-Alkylpyrrolen 56a–56i



Die 3-Alkylpyrrole **56a–56i** wurden wie in *Klein et al.* beschrieben nach einer modifizierten Vorschrift von *He et al.* hergestellt.<sup>[197, 386]</sup>

Unter Schutzgasatmosphäre und bei 0 °C wurde vorsichtig LiAlH<sub>4</sub> (2.0 Äq.) zu einer Lösung aus 3-Acylpyrrol (1.0 Äq.) in trockenem THF (4.0 mL/mmol 3-Acylpyrrol) gegeben. Die Reaktionsmischung wurde für 1.5 h unter Rückfluss erhitzt, dann bei 0 °C eine zweite Portion LiAlH<sub>4</sub> (2.0 Äq.) zugegeben. Der Reaktionsansatz wurde für weitere 1.5 h unter Rückfluss erhitzt und im Anschluss durch vorsichtige Zugabe von gesättigter Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Lösung bei 0 °C gequencht. Das Produkt wurde mit EtOAc (3× 25 mL) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösemittel am Rotationsverdampfer entfernt. Die säulenchromatographische Reinigung [Kieselgel; PE/Dichlormethan (verschiedene Verhältnisse) + 1 % (v/v) TEA] ergab die 3-Alkylpyrrole **56a–56i** als leicht gelbes Öl oder Feststoff. Die Reaktionskontrolle erfolgte über DC und Anfärben mit *p*-Anisaldehyd Lösung.

### 3-Ethyl-1H-pyrrol (56c)



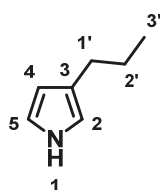
Entsprechend Vorschrift B für die Synthese von 3-Alkylpyrrolen (8.2.2.2), wurde das Pyrrol **56c** aus *N*-Tosylpyrrol (**90**, 1.0 g, 4.5 mmol) und Acetylchlorid (0.64 mL, 9.0 mmol) hergestellt und nach säulenchromatographischer Reinigung [PE/Dichlormethan, 80:20 + 1 % (v/v) TEA] als leicht gelbes Öl (91 mg, 0.96 mmol, 21 %) erhalten.

**56c** <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 1.21 (t, <sup>3</sup>J<sub>2',1'</sub> = 7.6 Hz, 3H, 2'-H), 2.54 (q, <sup>3</sup>J<sub>1',2'</sub> = 7.5 Hz, 2H, 1'-H), 6.12 (m<sub>c</sub>, 1H, 4-H), 6.59 (m<sub>c</sub>, 1H, 2-H), 6.73 (m<sub>c</sub>, 1H, 5-H), 7.99 (brs, 1H, 1-NH); <sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 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] = 3400, 2961, 2928, 2857, 1717, 1462, 1378, 1279, 1127, 1067, 930, 887, 763, 704, 665, 548; MS (EI, 70 eV): *m/z* = 95 [M<sup>+</sup>], 80, 67, 53; t<sub>R</sub> = 4.5 min.

Die Analytik Daten stimmen mit der Literatur überein.<sup>[17, 197, 387]</sup>



### 3-Propyl-1H-pyrrol (56d)

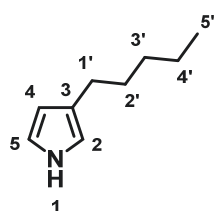


56d

Entsprechend Vorschrift B für die Synthese von 3-Alkylpyrrolen (8.2.2.2), wurde das Pyrrol **56d** aus *N*-Tosylpyrrol (**90**, 1.00 g, 4.52 mmol) und Propionsäurechlorid (847  $\mu$ L, 9.04 mmol) hergestellt und nach säulenchromatographischer Reinigung [PE/Dichlormethan, 80:20 + 1 % (v/v) TEA] als leicht gelbes Öl (179 mg, 1.64 mmol, 36 %) erhalten.  $^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 0.98 (t,  $^3J_{3',2'} = 7.4$  Hz, 3H, 3'-H), 1.58–1.67 (m, 2H, 2'-H), 2.49 (t,  $^3J_{1',2'} = 7.8$  Hz, 2H, 1'-H), 6.11 (m<sub>c</sub>, 1H, 4-H), 6.59 (m<sub>c</sub>, 1H, 2-H), 6.73 (m<sub>c</sub>, 1H, 5-H), 7.99 (brs, 1H, 1-NH);  $^{13}\text{C-NMR}$  (151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 14.2 (C-3'), 24.5 (C-2'), 29.3 (C-1'), 108.7 (C-4), 115.0 (C-2), 117.7 (C-5), 124.6 (C-3); **IR** (ATR-Film):  $\tilde{\nu}$  [1/cm] = 3394, 2957, 2928, 2871, 1738, 1456, 1377, 1217, 1061, 960, 888, 767, 710, 633, 539; **MS** (EI, 70 eV):  $m/z$  = 109 [ $\text{M}^+$ ], 92, 80, 65, 53;  $t_R$  = 5.6 min.

Die Analytik Daten stimmen mit der Literatur überein.<sup>[17, 388]</sup>

### 3-Pentyl-1H-pyrrol (56b)

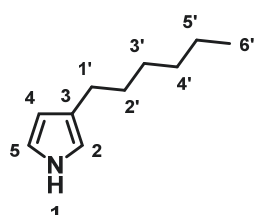


56b

Entsprechend Vorschrift B für die Synthese von 3-Alkylpyrrolen (8.2.2.2), wurde das Pyrrol **56b** aus *N*-Tosylpyrrol (**90**, 1.0 g, 4.5 mmol) und Pentansäurechlorid (1.1 mL, 9.0 mmol) hergestellt und nach säulenchromatographischer Reinigung [PE/Dichlormethan, 75:25 + 1 % (v/v) TEA] als gelbes Öl (83 mg, 0.60 mmol, 13 %) erhalten.  $^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 0.91 (m<sub>c</sub>, 3H, 5'-H), 1.31–1.40 (m, 4H, 3'-, 4'-H), 1.59 (m<sub>c</sub>, 2H, 2'-H), 2.49 (t,  $^3J_{1',2'} = 7.8$  Hz, 2H, 1'-H), 6.10 (m<sub>c</sub>, 1H, 4-H), 6.58 (m<sub>c</sub>, 1H, 2-H), 6.73 (m<sub>c</sub>, 1H, 5-H), 7.99 (brs, 1H, 1-NH);  $^{13}\text{C-NMR}$  (151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 14.3 (C-5'), 22.7 (C-4'), 27.1 (C-1'), 31.1 (C-2'), 31.9 (C-3'), 108.7 (C-4), 114.9 (C-2), 117.7 (C-5), 124.8 (C-3); **IR** (ATR-Film):  $\tilde{\nu}$  [1/cm] = 3395, 2956, 2925, 2855, 1739, 1466, 1378, 1217, 1060, 959, 887, 766, 707, 637, 539; **MS** (EI, 70 eV):  $m/z$  = 137 [ $\text{M}^+$ ], 94, 80, 67, 53;  $t_R$  = 7.8 min.

Die Analytikangaben stimmen mit der Literatur überein.<sup>[17, 197, 388]</sup>

### 3-Hexyl-1H-pyrrol (56e)



56e

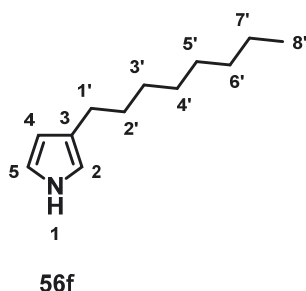
Entsprechend Vorschrift B für die Synthese von 3-Alkylpyrrolen (8.2.2.2), wurde das Pyrrol **56e** aus *N*-Tosylpyrrol (**90**, 1.30 g, 5.88 mmol) und Hexansäurechlorid (1.60 mL, 11.8 mmol) hergestellt und nach säulenchromatographischer Reinigung [PE/Dichlormethan, 75:25 + 1 % (v/v) TEA] als leicht gelbes Öl (395 mg, 2.61 mmol, 88 %) erhalten.

$^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 0.90 (t,  $^3J_{6',5'} = 6.4$  Hz, 3H, 6'-H), 1.27–1.41 (m, 6H, 3'-, 4'-, 5'-H), 1.59 (m<sub>c</sub>, 2H, 2'-H), 2.49 (t,  $^3J_{1',2'} = 7.8$  Hz, 2H, 1'-H), 6.11 (m<sub>c</sub>, 1H, 4-H), 6.58 (m<sub>c</sub>, 1H, 2-H), 6.73 (m<sub>c</sub>, 1H, 5-H), 7.98 (brs, 1H, 1-NH);  $^{13}\text{C-NMR}$  (151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 14.3 (C-6'), 22.8 (C-5'), 27.1 (C-1'), 29.4 (C-3'), 31.3 (C-2'), 32.0 (C-4'), 108.7 (C-4), 114.9 (C-2), 117.7 (C-5), 124.8 (C-3); **IR** (ATR-Film):  $\tilde{\nu}$  [1/cm] = 3404, 2957, 2925, 2856, 1721, 1464, 1378, 1278, 1127, 1069, 960, 769, 741, 705, 556; **MS** (EI, 70 eV):  $m/z$  = 151 [ $\text{M}^+$ ], 122, 94, 80, 67, 53;  $t_R$  = 8.8 min.

Die  $^{13}\text{C-NMR}$  Daten stimmen mit der Literatur überein.<sup>[17, 388]</sup>



### 3-Octyl-1H-pyrrol (56f)

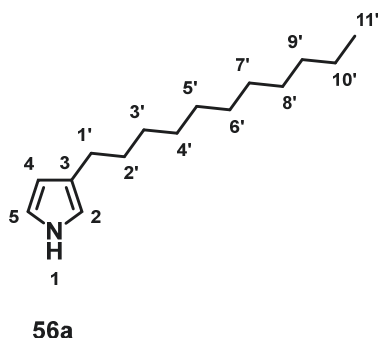


Entsprechend Vorschrift B für die Synthese von 3-Alkylpyrrolen (8.2.2.2), wurde das Pyrrol **56f** aus *N*-Tosylpyrrol (**90**, 1.00 g, 4.52 mmol) und Octansäurechlorid (1.54 mL, 9.04 mmol) hergestellt und nach säulenchromatographischer Reinigung [PE/Dichlormethan, 80:20 + 1 % (v/v) TEA] als leicht gelber Feststoff (321 mg, 1.79 mmol, 40%) erhalten. **<sup>1</sup>H-NMR** (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 0.89 (t, <sup>3</sup>J<sub>8',7'</sub> = 6.8 Hz, 3H, 8'-H), 1.21–1.41 (m, 10H, 3'-, 4'-, 5'-, 6'-, 7'-H), 1.59 (m<sub>c</sub>, 2H, 2'-H), 2.49 (t, <sup>3</sup>J<sub>1',2'</sub> = 7.8 Hz, 2H, 1'-H), 6.10 (m<sub>c</sub>, 1H, 4-H), 6.58 (m<sub>c</sub>, 1H, 2-H), 6.72 (m<sub>c</sub>, 1H, 5-H), 7.98 (brs, 1H, 1-NH); **<sup>13</sup>C-NMR** (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 14.3 (C-8'), 22.8 (C-7'), 27.1 (C-1'), 29.5, 29.7\*, 29.7\*, 31.4 (C-2'), 32.1 (C-6'), 108.7 (C-4), 114.9 (C-2), 117.7 (C-5), 124.8 (C-3); **IR** (ATR-Film):  $\tilde{\nu}$  [1/cm] = 3395, 2923, 2853, 1738, 1465, 1377, 1217, 1062, 958, 887, 767, 708, 638, 539; **MS** (EI, 70 eV): *m/z* = 179 [M<sup>+</sup>], 150, 122, 94, 80, 67, 53; *t<sub>R</sub>* = 10.5 min.

\*Die Signale weisen eine geringe Differenz auf.

Die Analytikangaben stimmen mit der Literatur überein.<sup>[17, 197]</sup>

### 3-Undecyl-1H-pyrrol (56a)

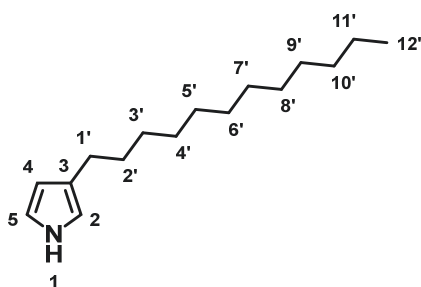


Entsprechend Vorschrift B für die Synthese von 3-Alkylpyrrolen (8.2.2.2), wurde das Pyrrol **56a** aus *N*-Tosylpyrrol (**90**, 1.00 g, 4.52 mmol) und Undecansäurechlorid (1.88 mL, 9.04 mmol) hergestellt und nach säulenchromatographischer Reinigung [PE/Dichlormethan, 85:15 + 1 % (v/v) TEA] als leicht gelber Feststoff (196 mg, 0.885 mmol, 20%) erhalten. **<sup>1</sup>H-NMR** (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 0.89 (t, <sup>3</sup>J<sub>11',10'</sub> = 7.0 Hz, 3H, 11'-H), 1.24–1.39 (m, 16H, 3'-, 4'-, 5'-, 6'-, 7'-, 8'-, 9'-, 10'-H), 1.59 (m<sub>c</sub>, 2H, 2'-H), 2.49 (t, <sup>3</sup>J<sub>1',2'</sub> = 7.8 Hz, 2H, 1'-H), 6.10 (m<sub>c</sub>, 1H, 4-H), 6.58 (m<sub>c</sub>, 1H, 2-H), 6.73 (m<sub>c</sub>, 1H, 5-H), 7.98 (brs, 1H, 1-NH); **<sup>13</sup>C-NMR** (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 14.3 (C-11'), 22.8, 27.1 (C-1'), 29.5, 29.7\*, 29.7\*, 29.8\*, 29.8\*, 29.9, 31.4 (C-2'), 32.1, 108.7 (C-4), 114.9 (C-2), 117.7 (C-5), 124.8 (C-3); **IR** (ATR-Film):  $\tilde{\nu}$  [1/cm] = 3396, 2922, 2852, 1738, 1465, 1377, 1217, 1062, 887, 768, 708, 638, 544; **MS** (EI, 70 eV): *m/z* = 221 [M<sup>+</sup>], 178, 150, 122, 108, 94, 80, 67, 53; *t<sub>R</sub>* = 11.9 min; **HRMS** (ESI-FTMS, positiv-Ion): Berechnet für C<sub>15</sub>H<sub>28</sub>N (M + H)<sup>+</sup> = 222.22163, gefunden = 222.22171.

\*Die Signale weisen eine geringe Differenz auf.

Die Analytikangaben stimmen mit der Literatur überein.<sup>[17, 197]</sup>

### 3-Dodecyl-1H-pyrrol (56g)



56g

Entsprechend Vorschrift B für die Synthese von 3-Alkylpyrrolen (8.2.2.2), wurde das Pyrrol **56g** aus *N*-Tosylpyrrol (**90**, 600 mg, 2.71 mmol) und Dodecansäurechlorid (1.19 g, 5.42 mmol) hergestellt und nach säulenchromatographischer Reinigung [PE/Dichlormethan, 75:25 + 1 % (v/v) TEA] als leicht gelber Feststoff (295 mg, 1.25 mmol, 48 %) erhalten.

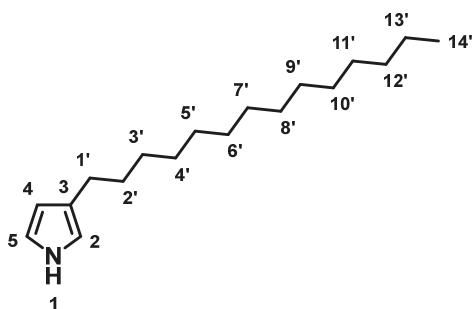
**<sup>1</sup>H-NMR** (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 0.90 (t, <sup>3</sup>J<sub>12',11'</sub> = 7.0 Hz, 3H, 12'-H), 1.21–1.42 (m, 18H, 3'-, 4'-, 5'-, 6'-, 7'-, 8'-, 9'-, 10'-, 11'-H),

1.59 (m<sub>c</sub>, 2H, 2'-H), 2.50 (t, <sup>3</sup>J<sub>1',2'</sub> = 7.8 Hz, 2H, 1'-H), 6.11 (m<sub>c</sub>, 1H, 4-H), 6.58 (m<sub>c</sub>, 1H, 2-H), 6.73 (m<sub>c</sub>, 1H, 5-H), 7.97 (brs, 1H, 1-NH); **<sup>13</sup>C-NMR** (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 14.3 (C-12'), 22.9, 27.1 (C-1'), 29.5, 29.7\*, 29.7\*, 29.8\*, 29.8\*, 29.9, 31.4 (C-2'), 32.1, 108.7 (C-4), 114.9 (C-2), 117.7 (C-5), 124.8 (C-3); **IR** (ATR-Film):  $\tilde{\nu}$  [1/cm] = 3398, 2922, 2852, 1465, 1062, 768, 708, 543; **MS** (EI, 70 eV): *m/z* = 235 [M<sup>+</sup>], 192, 122, 94, 80, 67, 53; *t<sub>R</sub>* = 11.4 min; **HRMS** (ESI-FTMS, positiv-Ion): Berechnet für C<sub>16</sub>H<sub>30</sub>N (M + H)<sup>+</sup> = 236.23728, gefunden = 236.23731.

\*Die Signale weisen eine geringe Differenz auf.

Die <sup>1</sup>H- und <sup>13</sup>C-NMR-Daten stimmen mit der Literatur überein.<sup>[389]</sup>

### 3-Tetradecyl-1H-pyrrol (56h)



56h

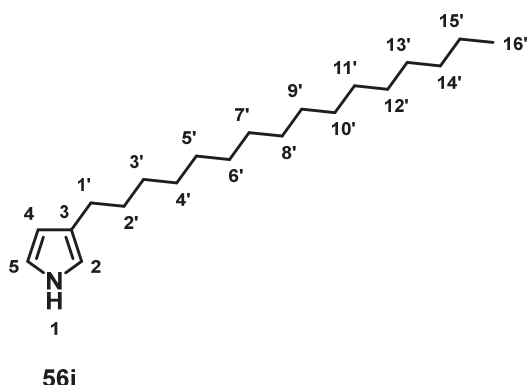
Entsprechend Vorschrift B für die Synthese von 3-Alkylpyrrolen (8.2.2.2), wurde das Pyrrol **56h** aus *N*-Tosylpyrrol (**90**, 1.20 g, 5.42 mmol) und Tetradecansäurechlorid (2.95 mL, 10.9 mmol) hergestellt und nach säulenchromatographischer Reinigung [PE/Dichlormethan, 75:25 + 1 % (v/v) TEA] als leicht gelber Feststoff (733 mg, 2.78 mmol, 52 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 0.90 (t, <sup>3</sup>J<sub>14',13'</sub> = 6.9 Hz,

3H, 14'-H), 1.21–1.39 (m, 22H, 3'-, 4'-, 5'-, 6'-, 7'-, 8'-, 9'-, 10'-, 11'-, 12'-, 13'-H), 1.59 (m<sub>c</sub>, 2H, 2'-H), 2.49 (t, <sup>3</sup>J<sub>1',2'</sub> = 7.8 Hz, 2H, 1'-H), 6.11 (m<sub>c</sub>, 1H, 4-H), 6.58 (m<sub>c</sub>, 1H, 2-H), 6.73 (m<sub>c</sub>, 1H, 5-H), 7.97 (brs, 1H, 1-NH); **<sup>13</sup>C-NMR** (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 14.3 (C-14'), 22.9, 27.1 (C-1'), 29.5, 29.7\*, 29.7\*, 29.8\*, 29.8\*, 29.9, 31.4 (C-2'), 32.1, 108.7 (C-4), 114.9 (C-2), 117.7 (C-5), 124.8 (C-3); **IR** (ATR-Film):  $\tilde{\nu}$  [1/cm] = 3396, 2914, 2847, 1464, 1067, 959, 774, 759, 705, 652, 561, 530; **MS** (EI, 70 eV): *m/z* = 263 [M<sup>+</sup>], 220, 122, 94, 81, 67, 53; ; *t<sub>R</sub>* = 12.0 min; **HRMS** (ESI-FTMS, positiv-Ion): Berechnet für C<sub>18</sub>H<sub>34</sub>N (M + H)<sup>+</sup> = 264.26858, gefunden = 264.26856.

\*Die Signale weisen eine geringe Differenz auf.

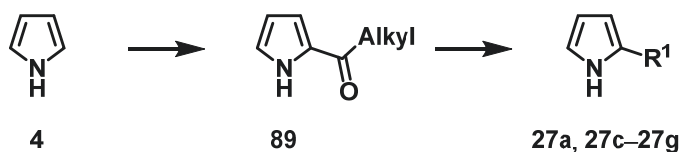
### 3-Hexadecyl-1H-pyrrol (56i)



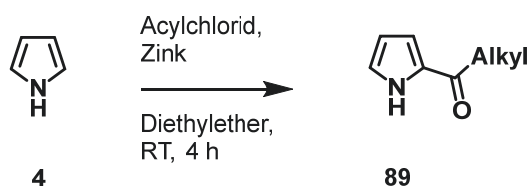
Entsprechend Vorschrift B für die Synthese von 3-Alkylpyrrolen (8.2.2.2), wurde das Pyrrol **56i** aus *N*-Tosylpyrrol (**90**, 1.20 g, 5.42 mmol) und Hexadecansäurechlorid (3.29 mL, 10.9 mmol) hergestellt und nach säulenchromatographischer Reinigung [PE/Dichlormethan, 75:25 + 1 % (v/v) TEA] als leicht gelber Feststoff (1.32 g, 4.53 mmol, 83 %) erhalten. <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 0.90 (t, <sup>3</sup>J<sub>16',15'</sub> = 6.9 Hz, 3H, 16'-H), 1.23–1.38 (m, 26H, 3'-, 4'-, 5'-, 6'-, 7'-, 8'-, 9'-, 10'-, 11'-, 12'-, 13'-, 14'-, 15'-H), 1.59 (m<sub>c</sub>, 2H, 2'-H), 2.49 (t, <sup>3</sup>J<sub>1',2'</sub> = 7.8 Hz, 2H, 1'-H), 6.11 (m<sub>c</sub>, 1H, 4-H), 6.58 (m<sub>c</sub>, 1H, 2-H), 6.73 (m<sub>c</sub>, 1H, 5-H), 7.97 (brs, 1H, 1-NH); <sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 14.3 (C-16'), 22.9, 27.1 (C-1'), 29.5, 29.7\*, 29.7\*, 29.8\*, 29.8\*, 29.9, 31.4 (C-2'), 32.1, 108.7 (C-4), 114.9 (C-2), 117.7 (C-5), 124.8 (C-3); IR (ATR-Film):  $\tilde{\nu}$  [1/cm] = 3395, 2914, 2847, 1463, 1428, 1147, 1067, 960, 776, 762, 729, 706, 652, 562, 530; MS (EI, 70 eV): *m/z* = 291 [M<sup>+</sup>], 248, 122, 94, 81, 53; *t<sub>R</sub>* = 12.7 min; HRMS (ESI-FTMS, positiv-Ion): Berechnet für C<sub>20</sub>H<sub>38</sub>N (M + H)<sup>+</sup> = 292.29988, gefunden = 292.29983.

\*Die Signale weisen eine geringe Differenz auf.

#### 8.2.2.3 Vorschrift C: Synthese der 2-Alkylpyrrole 27a, 27c–27g



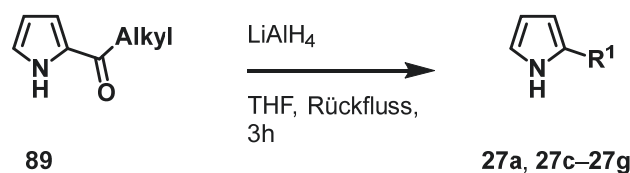
#### Allgemeine Vorschrift für die Synthese von 2-Acylpyrrolen 89



Die 2-Alkylpyrrole **27a**, **27c–27g** wurden wie in der Dissertationsschrift von Dr. *Andreas S. Klein* und der Bachelorarbeit von B. Sc. *Annabel Arens* beschrieben nach einer modifizierten Vorschrift von *Yadav et al.* und *Lv et al.* hergestellt.<sup>[17, 249, 250, 259]</sup> Die 2-Acylpyrrole **27a**, **27c–27g** wurden von B. Sc. *Annabel Arens* im Rahmen ihrer Bachelorarbeit synthetisiert.<sup>[259]</sup>

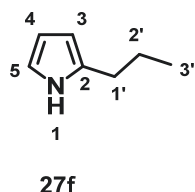
1*H*-Pyrrol (**4**, 1.00 Äq.), das entsprechende Acylchlorid (0.75 Äq bzw. 1.00 Äq.<sup>37</sup>) und Zinkpulver (2.00 Äq.) wurden unter Schutzgasatmosphäre und bei 0 °C zu Diethylether (1.5 mL/mmol 1*H*-Pyrrol) gegeben und anschließend für 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Zinkpulver wurde über Watte und Celite abfiltriert und die Reaktion im Anschluss durch Zugabe einer gesättigten NaHCO<sub>3</sub>-Lösung gequenchet. Anschließend wurde mit EtOAc (3× 25 mL) extrahiert und mit Wasser gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das Produkt wurde ohne weitere Reinigung in der nächsten Synthese eingesetzt. Die Reaktionskontrolle erfolgte über DC und Anfärben mit *p*-Anisaldehyd Lösung.

### Allgemeine Vorschrift für die Synthese von 2-Alkylpyrrolen **27a**, **27c–27g**



Die 2-Alkylpyrrole **27a**, **27c–27g** wurden durch Reduktion mit LiAlH<sub>4</sub> analog zur allgemeinen Vorschrift zur Synthese von 3-Alkylpyrrolen **56** (8.2.2.2) hergestellt. Abweichend wurden insgesamt mehr Äquivalente LiAlH<sub>4</sub> eingesetzt (6 Äq. statt 4 Äq.). Die säulenchromatographische Reinigung [Kieselgel; PE/Dichlormethan (verschiedene Verhältnisse) + 1 % (v/v) TEA] ergab die 2-Alkylpyrrole **27a**, **27c–27g** als leicht gelbes Öl oder Feststoff. Die Reaktionskontrolle erfolgte über DC und Anfärben mit *p*-Anisaldehyd Lösung.

### 2-Propyl-1*H*-pyrrol (**27f**)



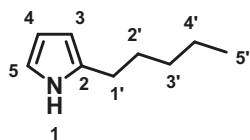
Entsprechend Vorschrift C für die Synthese von 2-Alkylpyrrolen (8.2.2.3), wurde das Pyrrol **27f** aus 1*H*-Pyrrol (**4**, 1.50 mL, 21.5 mmol) und Propionsäurechlorid (1.41 mL, 16.2 mmol) hergestellt und nach säulenchromatographischer Reinigung [PE/Dichlormethan, 75:25 + 1 % (v/v) TEA] als farbloses Öl (39.6 mg, 0.362 mmol, 2 %) erhalten. <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 0.97 (t, <sup>3</sup>J<sub>3',2'</sub> = 7.4 Hz, 3H, 3'-H), 1.65 (m<sub>c</sub>, 2H, 2'-H), 2.58 (t, <sup>3</sup>J<sub>1',2'</sub> = 7.6 Hz, 2H, 1'-H), 5.92 (m<sub>c</sub>, 1H, 3-H), 6.13 (m<sub>c</sub>, 1H, 4-H), 6.67 (m<sub>c</sub>, 1H, 5-H), 7.90 (brs, 1H, 1-NH); <sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 14.1 (C-3'), 23.1 (C-2'), 30.0 (C-1'), 105.1 (C-3), 108.4 (C-4), 116.1 (C-5), 132.8 (C-2); IR (ATR-Film):  $\tilde{\nu}$  [1/cm] = 3380, 2959, 2932, 2872, 1567, 1465, 1118, 1097, 1023, 884, 782, 709, 561; MS (EI, 70 eV): *m/z* = 109 [M<sup>+</sup>], 80; t<sub>R</sub> = 5.0 min.

Die <sup>13</sup>C-NMR Daten stimmen teilweise mit der Literatur überein.<sup>[390]</sup>

Die <sup>13</sup>C-NMR Daten stimmen teilweise mit der Literatur überein.<sup>[390]</sup>

<sup>37</sup> Im Rahmen der Bachelorarbeit von B. Sc. *Annabel Arens* wurde die Synthese angepasst und nur 0.75 Äq. statt 1 Äq. des entsprechenden Säurechlorids eingesetzt.<sup>[259]</sup> Lediglich bei 2-UP (**27a**) wurde 1 Äq. des Säurechlorids verwendet.

### 2-Pentyl-1H-pyrrol (27e)

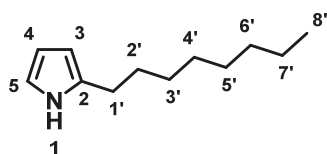


27e

Entsprechend Vorschrift C für die Synthese von 2-Alkylpyrrolen (8.2.2.3), wurde das Pyrrol **27e** aus 1H-Pyrrol (**4**, 1.50 mL, 21.6 mmol) und Pentansäurechlorid (1.97 mL, 16.2 mmol) hergestellt und nach säulenchromatographischer Reinigung [PE/EtOAc, 99:1 + 1% (v/v) TEA] als leicht gelbes Öl (103 mg, 0.75 mmol, 5%) erhalten. <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 0.90 (t, <sup>3</sup>J<sub>5',4'</sub> = 7.0 Hz, 3H, 5'-H), 1.32–1.38 (m, 4H, 3'-H, 4'-H), 1.60–1.67 (m, 2H, 2'-H), 2.60 (t, <sup>3</sup>J<sub>1',2'</sub> = 7.8 Hz, 2H, 1'-H), 5.92 (m<sub>c</sub>, 1H, 3-H), 6.13 (m<sub>c</sub>, 1H, 4-H), 6.67 (m<sub>c</sub>, 1H, 5-H), 7.90 (brs, 1H, 1-NH); <sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 14.2 (C-5'), 22.6 (C-4'), 27.9 (C-1'), 29.5 (C-2'), 31.7 (C-3'), 105.0 (C-3), 108.4 (C-4), 116.1 (C-5), 133.0 (C-2); IR (ATR-Film):  $\tilde{\nu}$  [1/cm] = 3381, 2956, 2927, 2857, 1567, 1467, 1119, 1096, 1024, 884, 784, 711, 563; MS (EI, 70 eV): *m/z* = 139 [M<sup>+</sup>], 80; *t<sub>R</sub>* = 7.1 min.

Die <sup>1</sup>H- und <sup>13</sup>C-NMR-Daten stimmen mit der Literatur überein.<sup>[391]</sup>

### 2-Octyl-1H-pyrrol (27d)



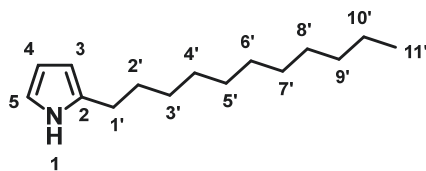
27d

Entsprechend Vorschrift C für die Synthese von 2-Alkylpyrrolen (8.2.2.3), wurde das Pyrrol **27d** aus 1H-Pyrrol (**4**, 1.50 mL, 21.6 mmol) und Octansäurechlorid (2.77 mL, 16.2 mmol) hergestellt und nach säulenchromatographischer Reinigung [PE/Dichlormethan, 75:25 + 1% (v/v) TEA] als leicht gelber Feststoff (545 mg, 3.04 mmol, 19%) erhalten. <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 0.89 (t, <sup>3</sup>J<sub>8',7'</sub> = 6.9 Hz, 3H, 8'-H), 1.22–1.40 (m, 10H, 7'-H, 6'-H, 5'-H, 4'-H, 3'-H), 1.62 (m<sub>c</sub>, 2H, 2'-H), 2.60 (t, <sup>3</sup>J<sub>1',2'</sub> = 7.8 Hz, 2H, 1'-H), 5.92 (m<sub>c</sub>, 1H, 3-H), 6.14 (m<sub>c</sub>, 1H, 4-H), 6.67 (m<sub>c</sub>, 1H, 5-H), 7.89 (brs, 1H, 1-NH); <sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 14.3 (C-8'), 22.8, 27.9 (C-1'), 29.4, 29.6\*, 29.6\*, 29.8, 32.0, 105.0 (C-3), 108.4 (C-4), 116.1 (C-5), 133.0 (C-2); IR (ATR-Film):  $\tilde{\nu}$  [1/cm] = 3381, 2955, 2924, 2853, 1466, 1119, 1093, 1024, 884, 784, 711; MS (EI, 70 eV): *m/z* = 207, 179 [M<sup>+</sup>], 133, 115, 80, 78, 73, 56, 53; *t<sub>R</sub>* = 9.7 min.

\*Die Signale weisen eine geringe Differenz auf.

Die <sup>1</sup>H- und die <sup>13</sup>C-NMR Daten stimmen mit der Literatur überein.<sup>[130]</sup>

### 2-Undecyl-1H-pyrrol (27a)



27a

Entsprechend Vorschrift C für die Synthese von 2-Alkylpyrrolen (8.2.2.3), wurde das Pyrrol **27a** aus 1H-Pyrrol (**4**, 2.00 mL, 28.8 mmol) und Undecansäurechlorid (6.37 mL, 28.8 mmol) hergestellt und nach säulenchromatographischer Reinigung [PE/EtOAc, 99:1 + 1% (v/v) TEA] als leicht gelber Feststoff

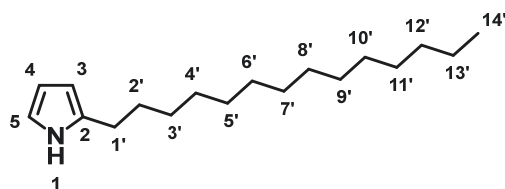
(355 mg, 1.60 mmol, 11%) erhalten. <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 0.89 (t, <sup>3</sup>J<sub>11',10'</sub> = 7.6 Hz, 3H, 11'-H), 1.20–1.40 (m, 16H, 10'-H, 9'-H, 8'-H, 7'-H, 6'-H, 5'-H, 4'-H, 3'-H), 1.62 (m<sub>c</sub>, 2H, 2'-H), 2.60 (t, <sup>3</sup>J<sub>1',2'</sub> = 7.7 Hz, 2H, 1'-H), 5.92 (m<sub>c</sub>, 1H, 3-H), 6.14 (m<sub>c</sub>, 1H, 4-H), 6.67 (m<sub>c</sub>, 1H, 5-H), 7.90 (brs, 1H, 1-NH); <sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 14.3 (C-11'), 22.8, 27.9 (C-1'), 29.5, 29.6\*, 29.6\*, 29.7, 29.8\*, 29.8\*, 29.8\*, 32.1, 105.0 (C-3), 108.4 (C-4), 116.1 (C-5), 133.0 (C-2); IR (ATR-Film):  $\tilde{\nu}$  [1/cm] = 3364, 3355,

2918, 2848, 1463, 1095, 1022, 781, 728, 718, 577; **MS** (EI, 70 eV):  $m/z$  = 208, 207, 191, 147, 133, 96, 73, 75;  $t_R$  = 11.0 min.

\*Die Signale weisen eine geringe Differenz auf.

Die  $^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ -NMR, IR- und MS-Daten stimmen mit der Literatur überein.<sup>[17, 392]</sup>

### 2-Tetradecyl-1H-pyrrol (27c)



**27c**

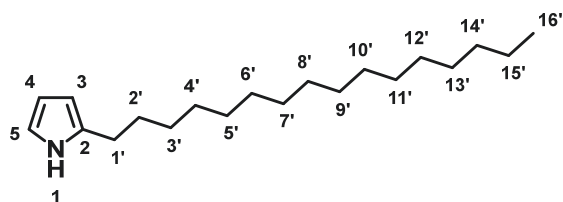
Entsprechend Vorschrift C für die Synthese von 2-Alkylpyrrolen (8.2.2.3), wurde das Pyrrol **27c** aus 1H-Pyrrol (**4**, 1.50 mL, 21.6 mmol) und Tetradecansäurechlorid (4.41 mL, 16.2 mmol) hergestellt und nach säulenchromatographischer Reinigung [PE/Dichlormethan, 75:25 + 1% (v/v) TEA] als

cremefarbener Feststoff (822 mg, 3.12 mmol, 19%) erhalten.  **$^1\text{H}$ -NMR** (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 0.89 (t,  $^3J_{14',13'} = 7.0$  Hz, 3H, 14'-H), 1.20–1.40 (m, 22H, 13'-H, 12'-H, 11'-H, 10'-H, 9'-H, 8'-H, 7'-H, 6'-H, 5'-H, 4'-H, 3'-H), 1.62 (m<sub>c</sub>, 2H, 2'-H), 2.60 (t,  $^3J_{1',2'} = 7.7$  Hz, 2H, 1'-H), 5.92 (m<sub>c</sub>, 1H, 3-H), 6.13 (m<sub>c</sub>, 1H, 4-H), 6.67 (m<sub>c</sub>, 1H, 5-H), 7.89 (brs, 1H, 1-NH);  **$^{13}\text{C}$ -NMR** (151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 14.3 (C-14'), 22.9, 27.9 (C-1'), 29.5, 29.6\*, 29.6\*, 29.7, 29.8\*, 29.8\*, 29.9, 32.1, 105.0 (C-3), 108.4 (C-4), 116.1 (C-5), 133.0 (C-2); **IR** (ATR-Film):  $\tilde{\nu}$  [1/cm] = 3364, 3352, 2916, 2847, 1472, 1463, 1025, 776, 728, 718, 578; **MS** (EI, 70 eV):  $m/z$  = 263 [ $\text{M}^+$ ], 94, 81, 80;  $t_R$  = 11.8 min.

\*Die Signale weisen eine geringe Differenz auf.

Die  $^1\text{H}$ -NMR Daten stimmen mit der Literatur überein.<sup>[393]</sup>

### 2-Hexadecyl-1H-pyrrol (27g)



**27g**

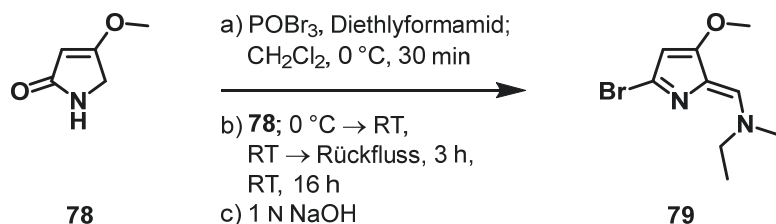
Entsprechend Vorschrift C für die Synthese von 2-Alkylpyrrolen (8.2.2.3), wurde das Pyrrol **27g** aus 1H-Pyrrol (**4**, 1.50 mL, 21.6 mmol) und Hexadecansäurechlorid (4.92 mL, 16.2 mmol) hergestellt und nach säulenchromatographischer Reinigung [PE/Dichlormethan, 75:25 + 1% (v/v) TEA]

als weißer Feststoff (804 mg, 2.76 mmol, 17%) erhalten.  **$^1\text{H}$ -NMR** (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 0.89 (t,  $^3J_{16',15'} = 7.0$  Hz, 3H, 16'-H), 1.20–1.39 (m, 26H, 15'-H, 14'-H, 13'-H, 12'-H, 11'-H, 10'-H, 9'-H, 8'-H, 7'-H, 6'-H, 5'-H, 4'-H, 3'-H), 1.62 (m<sub>c</sub>, 2H, 2'-H), 2.59 (t,  $^3J_{1',2'} = 7.8$  Hz, 2H, 1'-H), 5.91 (m<sub>c</sub>, 1H, 3-H), 6.13 (m<sub>c</sub>, 1H, 4-H), 6.66 (m<sub>c</sub>, 1H, 5-H), 7.89 (brs, 1H, 1-NH);  **$^{13}\text{C}$ -NMR** (151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 14.3 (C-16'), 22.9, 27.9 (C-1'), 29.5, 29.6\*, 29.6\*, 29.7, 29.8\*, 29.8\*, 29.9, 32.1, 105.0 (C-3), 108.4 (C-4), 116.1 (C-5), 133.0 (C-2); **IR** (ATR-Film):  $\tilde{\nu}$  [1/cm] = 3364, 3351, 2915, 2847, 1472, 1463, 1093, 1024, 777, 729, 718, 578; **MS** (EI, 70 eV):  $m/z$  = 207, 94, 81, 80;  $t_R$  = 12.5 min, **HRMS** (ESI-FTMS, positiv-Ion): Berechnet für  $\text{C}_{20}\text{H}_{37}\text{N}$  ( $\text{M} + \text{H}$ )<sup>+</sup> = 292.2996, gefunden = 292.2999.

\* Die Signale weisen eine geringe Differenz auf.

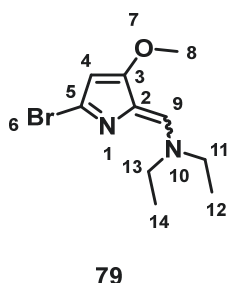
### 8.2.3 Synthese von Boc-MBC (75) und MBC (2)

#### *N*-[(5-Brom-3-methoxy-2*H*-pyrrol-2-yliden)methyl]-*N*-diethylamin (79)



*N*-[(5-Brom-3-methoxy-2*H*-pyrrol-2-yliden)methyl]-*N*-diethylamin(79) wurde wie in *Domröse et al.* beschrieben nach einer Vorschrift von *Dairi et al.* und *Haynes et al.* hergestellt.<sup>[17, 168, 205, 233]</sup>

Die Reaktion wurde in einem *Schlenk*-Kolben unter Schutzgasatmosphäre durchgeführt. Zu einer Lösung aus Diethylformamid (5.91 mL, 53.0 mmol, 3.00 Äq.) in trockenem Dichlormethan (20 mL) wurde bei 0 °C langsam in trockenem Dichlormethan (3.4 mL/mmol 4-Methoxy-3-pyrrolin-2-on) gelöstes POBr<sub>3</sub> (12.7 g, 44.2 mmol, 2.50 Äq.) getropft und für 30 min gerührt. Der Reaktionsansatz wurde stark gelb und ein weißer Feststoff fiel aus (*Vilsmeier* Komplex). Im Anschluss wurde eine Lösung aus 4-Methoxy-3-pyrrolin-2-on (78, 2.00 g, 17.7 mmol, 1.00 Äq.) in trockenem Dichlormethan (15 mL) bei 0 °C zugetropft, danach wurde die Reaktionsmischung langsam auf Raumtemperatur erwärmt und anschließend für 3 h unter Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde der dunkelbraune Reaktionsansatz noch für 16 h gerührt. Durch Zufügen von Eiswasser (200 mL) wurde die Reaktion gestoppt und der pH-Wert des Reaktionsgemischs mit 1 N NaOH auf pH 7–8 eingestellt. Nach Zugabe von ca. 80 mL EtOAc wurde der Reaktionsansatz filtriert, um Feststoffe zu entfernen. Im Anschluss wurde der Reaktionsansatz mit EtOAc extrahiert, die vereinigten organischen Phasen mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel anschließend am Rotationsverdampfer entfernt. Die säulenchromatographische Reinigung [Kieselgel; PE/EtOAc (80:20) + 1 % (v/v) TEA] ergab *N*-[(5-Brom-3-methoxy-2*H*-pyrrol-2-yliden)methyl]-*N*-diethylamin (79, 3.34 g, 12.9 mmol, 73 %) als hellbraunes Öl, das bei Raumtemperatur als Feststoff auskristallisierte. Die Reaktionskontrolle erfolgte über DC und Anfärben mit *p*-Anisaldehyd Lösung.



**<sup>1</sup>H-NMR** (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 1.29 (m<sub>c</sub>, 6H, 14-H, 12-H), 3.39 (q, <sup>3</sup>J<sub>11,12/13,14</sub> = 7.2 Hz, 2H, 11-H/13-H), 3.76 (s, 3H, 8-H), 4.12 (q, <sup>3</sup>J<sub>11,12/13,14</sub> = 7.1 Hz, 2H, 11-H/13-H), 5.59 (s, 1H, 4-H), 6.99 (s, 1H, 9-H); **<sup>13</sup>C-NMR** (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 12.6 (C-12/C-14), 14.7 (C-12/C-14), 44.7 (C-11/C-13), 51.2 (C-11/C-13), 58.1 (C-8), 96.6 (C-4), 120.9 (C-2), 133.8 (C-5), 138.7 (C-9), 165.5 (C-3);

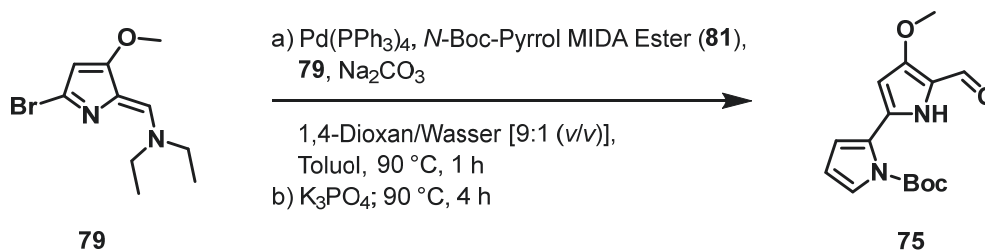
**IR** (ATR-Film):  $\tilde{\nu}$  [1/cm] = 2974, 2938, 1737, 1627, 1525, 1486, 1447, 1406, 1381,

1351, 1325, 1275, 1185, 1107, 1075, 1058, 991, 944, 907, 858, 801, 774, 718, 676, 642, 565, 525, 478; **MS** (EI, 70 eV): *m/z* = 258 [M<sup>+</sup>], 244, 229, 215, 202, 179, 163, 149, 134, 123, 107, 91, 80, 72, 56; *t<sub>R</sub>* = 12.3 min.

Die <sup>1</sup>H-NMR- und <sup>13</sup>C-NMR Daten stimmen mit der Literatur überein.<sup>[17, 168, 233, 234]</sup>

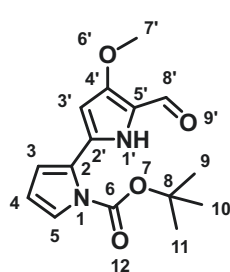


***tert*-Butyloxycarbonyl-5'-formyl-4'-methoxy-1*H*,1'*H*-(2,2'-bipyrrol) (75, Boc-MBC)**



Boc-MBC (**75**) wurde nach einer modifizierten Vorschrift von *Domröse et al.* durch eine *Suzuki*-Kupplung hergestellt.<sup>[205]</sup>

Vor Beginn der Reaktion wurden ausreichende Mengen Toluol und eine Mischung aus 1,4-Dioxan/Wasser [9:1 (v/v)] 1 h mit Stickstoff begast, um Sauerstoff zu entfernen. Die Reaktion wurde in einem *Schlenk*-Kolben unter Schutzgasatmosphäre durchgeführt. Zu einer Lösung aus Tetrakis(triphenylphosphine)-palladium(0) (0.558 g, 0.480 mmol, 0.05 Äq., 5.00 mol-%) in Toluol (4 mL) wurden *N*-Boc-1*H*-Pyrrol-2-boronsäure MIDA Ester (**81**, 4.91 g, 14.5 mmol, 1.50 Äq.) und *N*-[(5-Bromo-3-methoxy-4*H*-pyrrol-2-yliden)methyl]-*N*-diethylamin (**79**, 2.50 g, 9.65 mmol, 1.00 Äq.) gelöst in 1,4-Dioxan/Wasser [9:1 (v/v), 73 mL] gegeben. Nach Zugabe von Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (3.07 g, 28.9 mmol, 3.00 Äq.) wurde die Reaktionsmischung auf 90 °C erhitzt. Nach 1 h wurde K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (4.10 g, 19.3 mmol, 2.00 Äq.) zugegeben und nach einer weiteren Stunde eine zweite Portion Tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (0.558 g, 0.480 mmol, 0.050 Äq., 5.00 mol-%). Die Reaktionsmischung wurde für weitere 1.5 h bei 90 °C gerührt, danach wurde durch Zugabe von Wasser (100 mL) und 2 N HCl (ca. 15 mL) die Reaktion abgebrochen. Das Palladiumsalz wurde durch Filtration über Watte und Celite entfernt und der Reaktionsansatz im Anschluss mit Dichlormethan extrahiert (3× 100 mL). Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das Rohprodukt wurde auf Celite aufgezogen. Säulenchromatographische Reinigung [Kieselgel; PE/EtOAc (80:20) + 1% (v/v) TEA] ergab Boc-MBC (**75**, 1.50 g, 5.18 mmol, 54%) als leicht orange-braunen Feststoff. Die Reaktionskontrolle erfolgte über DC und Anfärben mit *p*-Anisaldehyd Lösung.



**<sup>1</sup>H-NMR** (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 1.61 (s, 9H, 9-, 10-, 11-H), 3.89 (s, 3H, 7'-H), 6.08 (d, <sup>4</sup>J<sub>3',1'</sub> = 2.6 Hz, 1H, 3'-H), 6.25 (m<sub>c</sub>, 1H, 4-H), 6.67 (dd, <sup>3</sup>J<sub>3,4</sub> = 3.7 Hz, <sup>4</sup>J<sub>3,5</sub> = 1.7 Hz, 1H, 3-H), 7.33 (dd, <sup>3</sup>J<sub>5,4</sub> = 3.4 Hz, <sup>4</sup>J<sub>5,3</sub> = 1.8 Hz, 1H, 5-H), 9.53 (s, 1H, 8'-H), 10.70 (brs, 1H, 1'-NH); **<sup>13</sup>C-NMR** (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 28.1 (C-9, C-10, C-11), 58.1 (C-7'), 85.9 (C-8), 94.9 (C-3'), 111.6 (C-4), 117.0 (C-3), 118.4 (C-5'), 124.7 (C-5), 126.1 (C-2), 130.4 (C-2'), 149.8 (C-6), 174.5 (C-8');

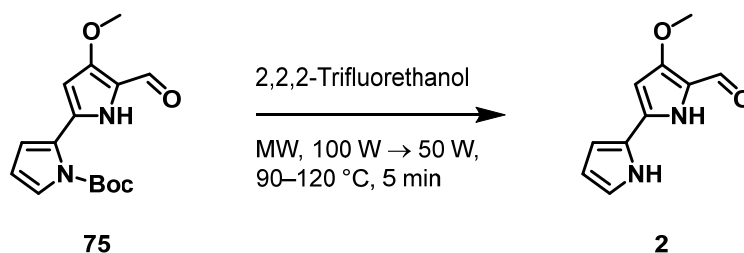
**IR** (ATR-Film):  $\tilde{\nu}$  [1/cm] = 3207, 2977, 1744, 1598, 1546, 1504, 1429, 1389, 1365,

1304, 1284, 1230, 1189, 1170, 1159, 1138, 1082, 1067, 1015, 918, 878, 843, 821, 768, 732, 692, 640, 586, 536, 497; **MS** (EI, 70 eV): *m/z* = 190 [(M-C<sub>5</sub>H<sub>9</sub>O<sub>2</sub>)<sup>+</sup>], 173, 161, 143, 131, 119, 108, 91, 76, 65, 52; *t*<sub>R</sub> = 13.2 min.

Die Analytik Daten stimmen mit der Literatur überein.<sup>[17, 134, 235]</sup>

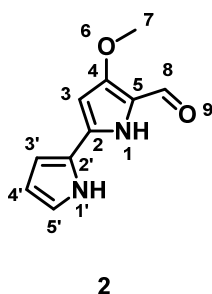


#### 4-Methoxy-1*H*,1'*H*-(2,2'-bipyrrol)-5-carbaldehyd (**2**, MBC)



MBC (**2**) wurde wie in *Brass et al.* beschrieben hergestellt.<sup>[177]</sup>

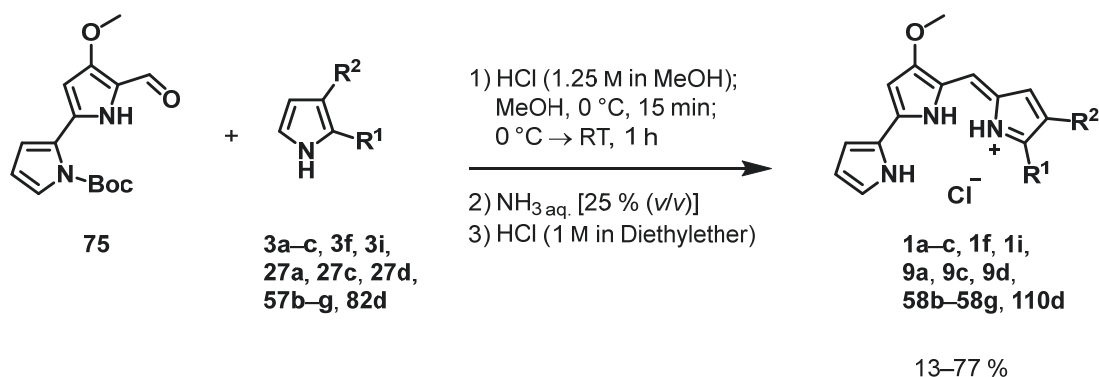
In einem geschlossenen Mikrowellen Reaktionsgefäß wurde Boc-MBC (**75**, 1.00 g, 3.44 mmol, 1.0 Äq.) in 2,2,2-Trifluorethanol (10 mL) für 5 min bei 90–120 °C (anfangs 100 W, dann auf 50 W gesenkt) in einer *CEM Discover Labmate* Synthesemikrowelle (CEM GmbH, Kamp-Lintfort, Deutschland) erhitzt. Nach Abkühlen des Reaktionsgemischs auf Raumtemperatur, wurde das fein kristalline Produkt mithilfe einer Saugflasche mit *Büchner*-Trichter und einem *Whatman*™ Filterpapier (Grad 3, 6 µm Porendurchmesser) mit EtOAc gewaschen. Die Lösungsmittelreste wurden am Rotationsverdampfer entfernt und MBC (**2**, 476 mg, 2.50 mmol, 73%) wurde in Form von feinen dunkelgrünen Kristallen erhalten.



**<sup>1</sup>H-NMR** (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ [ppm] = 3.83 (s, 3H, 7-H), 6.12 (m<sub>c</sub>, 1H, 4'-H), 6.26 (d, <sup>4</sup>*J*<sub>3,1</sub> = 2.6 Hz, 1H, 3-H), 6.74 (s, 1H, 3'-H), 6.90 (m<sub>c</sub>, 1H, 5'-H), 9.30 (s, 1H, 8-H), 11.23 (brs, 1H, 1'-NH), 11.41 (brs, 1H, 1-NH);  
**<sup>13</sup>C-NMR** (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ [ppm] = 58.3 (C-7), 91.4 (C-3), 108.8 (C-3'), 109.8 (C-4'), 117.8 (C-5), 120.9 (C-5'), 123.8 (C-2'), 133.7 (C-2), 159.2 (C-4), 172.1 (C-8);  
**IR** (ATR-Film):  $\tilde{\nu}$  [1/cm] = 3191, 1594, 1545, 1504, 1421, 1344, 1301, 1234, 1155, 1116, 1040, 1012, 973, 829, 809, 769, 739, 694, 625, 603, 586, 462.

Die <sup>1</sup>H- und <sup>13</sup>C-NMR Daten stimmen mit der Literatur überein.<sup>[17, 189]</sup>

## 8.2.4 Synthese von Prodigininen

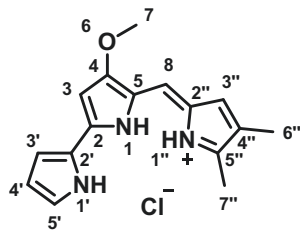


Die Prodiginine **1a–1c**, **1f**, **1i**, **9a**, **9c**, **9d**, **58b–58g** und **110d** wurden wie in *Brass et al.* beschrieben nach einer modifizierten Vorschrift von *Dairi et al.* hergestellt.<sup>[177, 234]</sup> Die Prodiginine **9a**, **9c**, **9d** wurden von B. Sc. *Annabel Arens* im Rahmen ihrer Bachelorarbeit hergestellt.<sup>[259]</sup>

Die Reaktion wurde in einem *Schlenk*-Kolben unter Schutzgasatmosphäre durchgeführt. Zu einer Lösung aus Boc-MBC (**75**, 1 Äq.) und dem entsprechenden Pyrrol **3a–3c**, **3f**, **3i**, **82d**, **27a**, **27c**, **27d** oder **57b–57g** (1.5 Äq.) in trockenem Methanol (20 mL/mmol Boc-MBC) wurde bei 0 °C HCl in Methanol (1.25 M, 1.3 Äq. oder 1.25 %, 1.3 Äq.)<sup>38</sup> zugetropft, woraufhin die Lösung sofort dunkelrot wurde. Der Reaktionsansatz wurde für 15 min bei 0 °C gerührt, danach 1 h bei Raumtemperatur. Die Reaktion wurde durch Zugabe von wenigen Tropfen wässriger Ammoniak-Lösung (25 % (w/w)) gequencht, bis der Reaktionsansatz eine orangene Farbe zeigte, und im Anschluss erfolgte eine Extraktion mit Dichlormethan (3 × 10 mL). Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Die säulenchromatographische Reinigung [Kieselgel; Dichlormethan/Ammoniak in Methanol (7 N) (Gradient) anschließend neutrales Aluminiumoxid, *n*-Pentan/EtOAc (Gradient)] ergab die Prodiginine **1a–1c**, **1f**, **1i**, **9a**, **9c**, **9d**, **58b–58g**, **110d**, **9a**, **9c** und **9d** als dunkelroten Feststoff oder Öl. Das Produkt wurde in einer geringen Menge Diethylether aufgenommen, wenige Tropfen HCl (1 M in Diethylether) zugegeben und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt, so dass von den entsprechenden Prodigininen das Hydrochlorid gebildet wurde.

<sup>38</sup> Es wurde sowohl 1.25 M als auch 1.25 % HCl in Methanol verwendet bei gleichbleibenden Äquivalenten. Es konnte bisher kein Einfluss auf die Ausbeute festgestellt werden.

### 5-[(4,5-Dimethyl-2*H*-pyrrol-2-yliden)methyl]-4-methoxy-1*H*,1'*H*-2,2'-bipyrrol·HCl (**1b**)

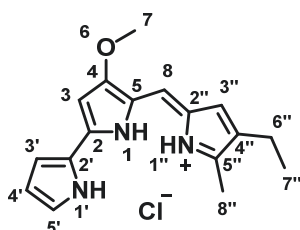


**1b**

Entsprechend der Vorschrift für die Synthese von Prodigininen (8.2.4), wurde das Prodiginin **1b** aus Boc-MBC (**75**) und 2,3-Dimethyl-1*H*-pyrrol (**3b**) hergestellt und nach säulenchromatographischer Reinigung [Kieselgel; Dichlormethan/Ammoniak in Methanol (7 N) (Gradient von 99.5:0.5 bis 97.5:2.5) anschließend neutrales Aluminiumoxid, *n*-Pentan/EtOAc (Gradient von 90:10 bis 50:50)] und

Ausfällung als Hydrochlorid als tiefroter Feststoff (28.9 mg, 108  $\mu$ mol, 31%) erhalten. **<sup>1</sup>H-NMR** (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 2.01 (s, 3H, 6''-H), 2.50 (s, 3H, 7''-H), 3.95 (s, 3H, 7-H), 6.03 (d, <sup>4</sup>*J*<sub>3,1</sub> = 2.0 Hz, 1H, 3-H), 6.31 (m<sub>c</sub>, 1H, 4'-H), 6.62 (m<sub>c</sub>, 1H, 3''-H), 6.86 (s, 1H, 8-H), 6.87 (m<sub>c</sub>, 1H, 3'-H), 7.19 (m<sub>c</sub>, 1H, 5'-H), 12.52 (brs, 1H, 1'-NH), 12.61 (brs, 1H, 1-NH), 12.65 (brs, 1H, 1''-NH); **<sup>13</sup>C-NMR** (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 10.7 (C-6''), 12.4 (C-7''), 58.8 (C-7), 93.0 (C-3), 111.8 (C-4'), 116.0 (C-8), 117.2 (C-3'), 120.8 (C-5), 122.3 (C-2'), 123.0 (C-4''), 125.1 (C-2''), 126.9 (C-5'), 129.3 (C-3''), 147.1 (C-5''), 147.8 (C-2), 165.9 (C-4); **IR** (ATR-Film):  $\tilde{\nu}$  [1/cm] = 2922, 1725, 1634, 1602, 1575, 1545, 1511, 1449, 1412, 1366, 1249, 1135, 1066, 1042, 954, 887, 837, 803, 744, 708, 651, 611, 594, 542, 465; **HRMS** (ESI-FTMS, positiv-Ion): Berechnet für C<sub>16</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>O (M + H)<sup>+</sup> = 268.1444, gefunden = 268.1446.

### 5-[(4-Ethyl-5-methyl-2*H*-pyrrol-2-yliden)methyl]-4-methoxy-1*H*,1'*H*-2,2'-bipyrrol·HCl (**1i**)

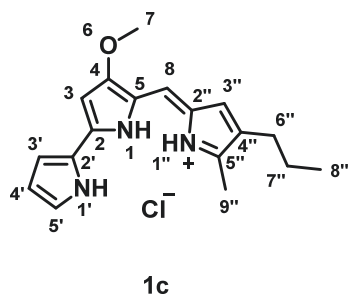


**1i**

Entsprechend der Vorschrift für die Synthese von Prodigininen (8.2.4), wurde das Prodiginin **1i** aus Boc-MBC (**75**) und 3-Ethyl-2-methyl-1*H*-pyrrol (**3i**) hergestellt und nach säulenchromatographischer Reinigung [Kieselgel; Dichlormethan/Ammoniak in Methanol (7 N) (Gradient von 99.5:0.5 bis 98.5:1.5) anschließend neutrales Aluminiumoxid, *n*-Pentan/EtOAc (Gradient von 95:5 bis 0:100)] und Ausfällung als Hydrochlorid als tiefroter

Feststoff (25.0 mg, 185  $\mu$ mol, 77%) erhalten. **<sup>1</sup>H-NMR** (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 1.14 (t, <sup>3</sup>*J*<sub>7'',6''</sub> = 7.6 Hz, 3H, 7''-H), 2.38 (m<sub>c</sub>, 2H, 6''-H), 2.50 (s, 3H, 8''-H), 3.92 (s, 3H, 7-H), 6.02 (m<sub>c</sub>, 1H, 3-H), 6.28 (m<sub>c</sub>, 1H, 4'-H), 6.64 (m<sub>c</sub>, 1H, 3''-H), 6.84–6.89 (m, 2H, 3'-, 8-H), 7.16 (m<sub>c</sub>, 1H, 5'-H), 12.49 (brs, 1H, 1'-NH), 12.57 (brs, 1H, 1-NH), 12.64 (brs, 1H, 1''-NH); **<sup>13</sup>C-NMR** (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 12.4 (C-8''), 14.4 (C-7''), 18.7 (C-6''), 58.8 (C-7), 92.9 (C-3), 111.8 (C-4'), 115.9, 117.1, 120.7 (C-5), 122.3 (C-2'), 125.1 (C-2''), 126.8 (3''), 127.7 (C-5'), 129.8 (C-4''), 146.4 (C-5''), 147.7 (C-2), 165.8 (C-4); **IR** (ATR-Film):  $\tilde{\nu}$  [1/cm] = 2969, 1725, 1634, 1602, 1575, 1542, 1511, 1450, 1354, 1315, 1248, 1122, 1068, 1041, 988, 956, 879, 838, 804, 743, 710, 650, 593; **HRMS** (ESI-FTMS, positiv-Ion): Berechnet für C<sub>11</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O (M + H)<sup>+</sup> = 282.1601, gefunden = 282.1604.

### 5-[(5-Methyl-4-propyl-2H-pyrrol-2-yliden)methyl]-4-methoxy-1H,1'H-2,2'-bipyrrol-HCl (**1c**)



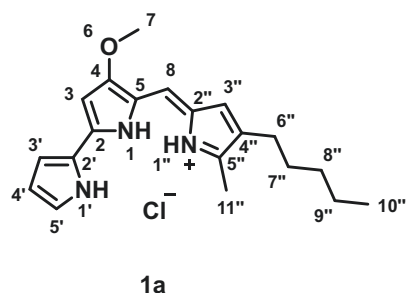
**Mutasyntese:** Entsprechend der Vorschrift für Mutasyntese im präparativen Maßstab (8.6.8) wurde das Prodiginin **1c** aus 2-Methyl-3-propyl-1H-pyrrol (**3c**) hergestellt und nach säulenchromatographischer Reinigung [Kieselgel; Dichlormethan/Ammoniak in Methanol (7 N) (Gradient von 99.5:0.5 bis 99:1)] und Ausfällung als Hydrochlorid als tiefroter Feststoff (10.5 mg, 35.5  $\mu$ mol, 7 %) erhalten.<sup>[197]</sup>

**Chemische Synthese:** Entsprechend der Vorschrift für die Synthese von Prodigininen (8.2.4), wurde das Prodiginin **1c** aus Boc-MBC (**75**) und 2-Methyl-3-propyl-1H-pyrrol (**3c**) hergestellt und nach säulenchromatographischer Reinigung [Kieselgel; Dichlormethan/Ammoniak in Methanol (7 N) (Gradient von 99.5:0.5 bis 98:2)] und Ausfällung als Hydrochlorid als tiefroter Feststoff (14.0 mg, 47.4  $\mu$ mol, 20 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 0.94 (t,  $^3J_{8'',7''} = 7.3$  Hz, 3H, 8''-H), 1.57 (m<sub>c</sub>, 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 (m<sub>c</sub>, 1H, 4'-H), 6.68 (d,  $^4J_{3'',1''} = 2.6$ , 1H, 3''-H), 6.92 (ddd,  $^3J_{3',4'} = 3.7$  Hz,  $^4J_{3',5'} = 2.4$  Hz,  $^4J_{3',1'} = 1.2$  Hz, 1H, 3'-H), 6.95 (s, 1H, 8'-H), 7.23 (m<sub>c</sub>, 1H, 5'-H), 12.57 (brs, 1H, 1'-NH), 12.73 (brs, 2H, 1-, 1''-NH); **<sup>13</sup>C-NMR** (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [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 C<sub>18</sub>H<sub>22</sub>N<sub>3</sub>O (M + H)<sup>+</sup> = 296.17574, gefunden = 296.17565.

Die Analytikangaben stimmen mit der Literatur überein.<sup>[17]</sup>

### 5-[(5-Methyl-4-pentyl-2H-pyrrol-2-yliden)methyl]-4-methoxy-1H,1'H-2,2'-bipyrrol-HCl (**1a**, Prodigiosin)



**Biosynthese:** Entsprechend der Vorschrift für die biosynthetische Produktion von Prodigiosin (**1a**) (8.6.5) und der Extraktion und Reinigung (8.6.6) wurde Prodigiosin (**1a**) unter Nutzung des Stammes *P. putida* pig-r2 hergestellt und nach säulenchromatographischer Reinigung [Kieselgel; Dichlormethan/Ammoniak in Methanol (7 N) (Gradient von 99.5:0.5 bis 98.5:1.5)] und Ausfällung als Hydrochlorid als tiefroter

Feststoff [18 mg/L (M63 Medium, 18 °C, 16 g/L Glucose, Fernbachkolben), 29 mg/L (M63 Medium, 18 °C, 16 g/L Glucose, Fernbachkolben, *in situ* Produktentfernung), 145 mg/L (Fermentation, 8.6.9)] erhalten.

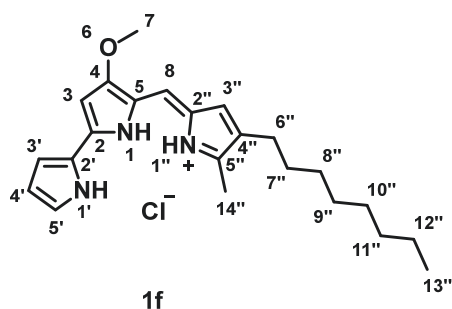
**Chemische Synthese:** Entsprechend der Vorschrift für die Synthese von Prodigininen (8.2.4), wurde Prodigiosin (**1a**) aus Boc-MBC (**75**) und 2-Methyl-3-pentyl-1H-pyrrol (**3a**) hergestellt und nach

säulenchromatographischer Reinigung [Kieselgel; Dichlormethan/Ammoniak in Methanol (7 N) (Gradient von 99.5:0.5 bis 99:1)] und Ausfällung als Hydrochlorid als tiefroter Feststoff (49.1 mg, 150  $\mu$ mol, 44%) erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 0.90 (t,  $^3J_{10'',9''} = 7.0$  Hz, 3H, 10''-H), 1.32 (m<sub>c</sub>, 4H, 8''-, 9''-H), 1.54 (m<sub>c</sub>, 2H, 7''-H), 2.39 (t,  $^3J_{6'',7''} = 7.6$  Hz, 2H, 6''-H), 2.54 (s, 3H, 11''-H), 4.00 (s, 3H, 7-H), 6.07 (d,  $^4J_{3,1} = 1.9$  Hz, 1H, 3-H), 6.35 (m<sub>c</sub>, 1H, 4'-H), 6.68 (d,  $^4J_{3'',1''} = 2.6$  Hz, 1H, 3''-H), 6.91 (ddd,  $^3J_{3',4'} = 3.8$  Hz,  $^4J_{3',5'} = 2.4$  Hz,  $^5J_{3',1'} = 1.4$  Hz, 1H, 3'-H), 6.95 (s, 1H, 8-H), 7.22 (m<sub>c</sub>, 1H, 5'-H), 12.56 (brs, 1H, 1'-NH), 12.71 (brs, 2H, 1-, 1''-NH); **<sup>13</sup>C-NMR** (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 12.6 (C-11''), 14.2 (C-10''), 22.6 (C-9''), 25.5 (C-6''), 29.9 (C-7''), 31.6 (C-8''), 58.9 (C-7), 93.0 (C-3), 111.9 (C-4'), 116.1 (C-8), 117.2 (C-3'), 120.8 (C-5), 122.4 (C-2'), 125.3 (C-2''), 127.1 (C-5'), 128.5 (C-3''), 128.6 (C-4''), 147.1 (C-5''), 147.8 (C-2), 165.9 (C-4); **IR** (ATR-Film):  $\tilde{\nu}$  [1/cm] = 3157, 3100, 2953, 2924, 2854, 1738, 1635, 1605, 1576, 1545, 1509, 1468, 1455, 1413, 1385, 1352, 1279, 1264, 1250, 1199, 1136, 1083, 1066, 1042, 989, 956, 890, 879, 835, 808, 785, 745, 716, 698, 681, 648, 607, 595, 484, 462.

Die Analytikangaben stimmen mit der Literatur überein.<sup>[17, 205]</sup>

#### 5-[(5-Methyl-4-octyl-2H-pyrrol-2-yliden)methyl]-4-methoxy-1H,1'H-2,2'-bipyrrol·HCl (**1f**)



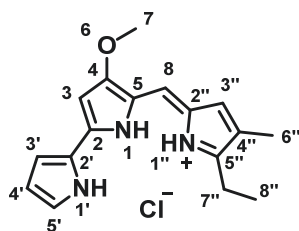
**Mutasynthese:** Entsprechend der Vorschrift für Mutasynthese im präparativen Maßstab (8.6.8) wurde das Prodiginin **1f** aus 2-Methyl-3-octyl-1H-pyrrol (**3f**) hergestellt und nach säulenchromatographischer Reinigung [Kieselgel; Dichlormethan/Ammoniak in Methanol (7 N) (Gradient von 99.5:0.5 bis 99:1)] und Ausfällung als Hydrochlorid als tiefroter Feststoff (3.80 mg, 10.4  $\mu$ mol, 2%) erhalten.<sup>[197]</sup>

**Chemische Synthese:** Entsprechend der Vorschrift für die Synthese von Prodigininen (8.2.4), wurde das Prodiginin **1f** aus Boc-MBC (**75**) und 2-Methyl-3-octyl-1H-pyrrol (**3f**) hergestellt und nach säulenchromatographischer Reinigung [Kieselgel; Dichlormethan/Ammoniak in Methanol (7 N) (Gradient von 99.5:0.5 bis 98:2)] und Ausfällung als Hydrochlorid als tiefroter Feststoff (11.0 mg, 30.1  $\mu$ mol, 13%) erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 0.88 (t,  $^3J_{13'',12''} = 6.9$  Hz, 3H, 13''-H), 1.24–1.33 (m<sub>c</sub>, 11H, 8''-, 9''-, 10''-, 11''-, 12''-H), 1.53 (m<sub>c</sub>, 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 (m<sub>c</sub>, 1H, 3-H), 6.35 (m<sub>c</sub>, 1H, 4'-H), 6.68 (m<sub>c</sub>, 1H, 3''-H), 6.92 (m<sub>c</sub>, 1H, 3'-H), 6.95 (s, 1H, 8-H), 7.23 (m<sub>c</sub>, 1H, 5'-H), 12.56 (brs, 1H, 1'-NH), 12.72 (brs, 2H, 1-, 1''-NH); **<sup>13</sup>C-NMR** (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [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'), 125.1 (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 C<sub>23</sub>H<sub>32</sub>N<sub>3</sub>O (M + H)<sup>+</sup> = 366.25399, gefunden = 366.25400.

Die Analytikangaben stimmen mit der Literatur überein.<sup>[17]</sup>

**5-[(5-Ethyl-4-methyl-2*H*-pyrrol-2-yliden)methyl]-4-methoxy-1*H*,1'-*H*-2,2'-bipyrrol-HCl (58f)**



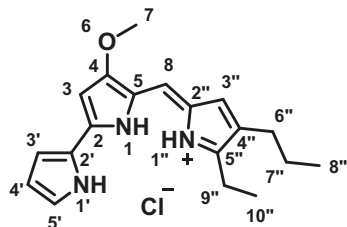
**58f**

Entsprechend der Vorschrift für die Synthese von Prodigininen (8.2.4), wurde das Prodiginin **58f** aus Boc-MBC (**75**) und 2-Ethyl-3-methyl-1*H*-pyrrol (**57f**) hergestellt und nach säulenchromatographischer Reinigung [Kieselgel; Dichlormethan/Ammoniak in Methanol (7 N) (Gradient von 99.5:0.5 bis 98:2) anschließend neutrales Aluminiumoxid, *n*-Pentan/EtOAc (Gradient von 100:0, 90:10 bis 80:20)] und Ausfällung als Hydrochlorid als tiefroter

Feststoff (81.0 mg, 290  $\mu$ mol, 84%\*) erhalten. **<sup>1</sup>H-NMR** (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 1.32 (t,  $^3J_{8'',7''} = 7.6$  Hz, 3H, 8''-H), 2.02 (s, 3H, 6''-H), 2.87 (m<sub>c</sub>, 2H, 7''-H), 3.93 (s, 3H, 7-H), 6.02 (d,  $^4J_{3,1} = 2.0$  Hz, 1H, 3-H), 6.29 (m<sub>c</sub>, 1H, 4'-H), 6.61 (d,  $^4J_{3'',1''} = 2.7$  Hz, 1H, 3''-H), 6.86 (m<sub>c</sub>, 2H, 3'-, 8-H), 7.17 (m<sub>c</sub>, 1H, 5'-H), 12.55 (brs, 2H, 1'-, 1''-NH), 12.69 (brs, 1H, 1-NH); **<sup>13</sup>C-NMR** (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 10.7 (C-6''), 13.9 (C-8''), 20.3 (C-7''), 58.8 (C-7), 92.9 (C-3), 111.8 (C-4'), 116.0 (C-8), 117.2 (C-3'), 120.9 (C-5), 122.2, 122.3, 125.0 (C-2''), 126.9 (C-5'), 129.7 (C-3''), 147.9 (C-2), 152.6, 165.9 (C-4); **IR** (ATR-Film):  $\tilde{\nu}$  [1/cm] = 2957, 2926, 1725, 1629, 1602, 1574, 1543, 1511, 1462, 1376, 1269, 1230, 1155, 1133, 1069, 1040, 981, 956, 880, 835, 816, 742, 649, 600; **HRMS** (ESI-FTMS, positiv-Ion): Berechnet für C<sub>17</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O (M + H)<sup>+</sup> = 282.1601, gefunden = 282.1599.

\*Im NMR ist deutlich erkennbar, dass noch Lösungsmittel im Produkt enthalten war, daher wird die tatsächliche Ausbeute unter dem hier angegebenen Wert liegen.

**5-[(5-Ethyl-4-propyl-2*H*-pyrrol-2-yliden)methyl]-4-methoxy-1*H*,1'-*H*-2,2'-bipyrrol-HCl (58g)**

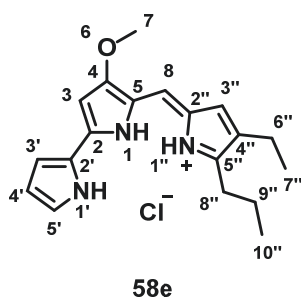


**58g**

Entsprechend der Vorschrift für die Synthese von Prodigininen (8.2.4), wurde das Prodiginin **58g** aus Boc-MBC (**75**) und 2-Ethyl-3-propyl-1*H*-pyrrol (**57g**) hergestellt und nach säulenchromatographischer Reinigung [Kieselgel; Dichlormethan/Ammoniak in Methanol (7 N) (Gradient von 99.5:0.5 bis 99:1) anschließend neutrales Aluminiumoxid, *n*-Pentan/EtOAc (Gradient von 100:0, 90:10 bis 98:5)] und Ausfällung als Hydrochlorid

als tiefroter Feststoff (39.0 mg, 130  $\mu$ mol, 52%) erhalten. **<sup>1</sup>H-NMR** (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 0.94 (t,  $^3J_{8'',7''} = 7.3$  Hz, 3H, 8''-H), 1.35 (t,  $^3J_{10'',9''} = 7.6$  Hz, 3H, 10''-H), 1.56 (m<sub>c</sub>, 2H, 7''-H), 2.37 (t,  $^3J_{6'',7''} = 7.7$  Hz, 2H, 6''-H), 2.89 (q,  $^3J_{9'',10''} = 7.6$  Hz, 2H, 9''-H), 3.96 (s, 3H, 7-H), 6.04 (m<sub>c</sub>, 1H, 3-H), 6.31 (m<sub>c</sub>, 1H, 4'-H), 6.65 (d,  $^4J_{3'',1''} = 2.6$  Hz, 1H, 3''-H), 6.88 (m<sub>c</sub>, 1H, 3'-H), 6.91 (s, 1H, 8-H), 7.19 (m<sub>c</sub>, 1H, 5'-H), 12.58 (brs, 2H, 1'-, 1''-NH), 12.76 (brs, 1H, 1-NH); **<sup>13</sup>C-NMR** (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 14.0 (C-8''), 14.4 (C-10''), 20.2 (C-9''), 23.7 (C-7''), 27.5 (C-6''), 58.8 (C-7), 93.0 (C-3), 111.8 (C-4'), 116.1 (C-8), 117.3 (C-3'), 120.9 (C-5), 122.3 (C-2'), 125.3 (C-2''), 127.0 (C-5'), 127.5 (C-4''), 128.7 (C-3''), 148.0 (C-2), 152.5 (C-5''), 165.9 (C-4); **IR** (ATR-Film):  $\tilde{\nu}$  [1/cm] = 2926, 1737, 1626, 1596, 1541, 1507, 1354, 1266, 1228, 1130, 1039, 987, 955, 880, 815, 733, 597; **HRMS** (ESI-FTMS, positiv-Ion): Berechnet für C<sub>19</sub>H<sub>23</sub>N<sub>3</sub>O (M + H)<sup>+</sup> = 310.1914, gefunden = 310.1916.

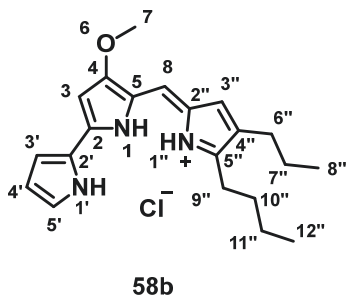
### 5-[(4-Ethyl-5-propyl-2*H*-pyrrol-2-yliden)methyl]-4-methoxy-1*H*,1'-*H*-2,2'-bipyrrol·HCl (**58e**)



Entsprechend der Vorschrift für die Synthese von Prodigininen (8.2.4), wurde das Prodiginin **58e** aus Boc-MBC (**75**) und 3-Ethyl-2-propyl-1*H*-pyrrol (**57e**) hergestellt und nach säulenchromatographischer Reinigung [Kieselgel; Dichlormethan/Ammoniak in Methanol (7 N) (Gradient von 99.5:0.5 bis 98.5:1.5) anschließend neutrales Aluminiumoxid, *n*-Pentan/EtOAc (Gradient von 95:5, 50:50 bis 0:100)] und Ausfällung als Hydrochlorid als

tiefroter Feststoff (54.0 mg, 150  $\mu$ mol, 51%) erhalten. **<sup>1</sup>H-NMR** (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 1.00 (t,  $^3J_{10'',9''} = 7.4$  Hz, 3H, 10''-H), 1.18 (t,  $^3J_{7'',6''} = 7.5$  Hz, 3H, 7''-H), 1.80 (m<sub>c</sub>, 2H, 9''-H), 2.43 (m<sub>c</sub>, 2H, 6''-H), 2.85 (t,  $^3J_{8'',9''} = 7.6$  Hz, 2H, 8''-H), 3.97 (s, 3H, 7-H), 6.05 (d,  $^4J_{3,1} = 2.0$  Hz, 1H, 3-H), 6.31 (m<sub>c</sub>, 1H, 4'-H), 6.68 (d,  $^4J_{3'',1''} = 2.6$  Hz, 1H, 3''-H), 6.88 (ddd,  $^3J_{3',4'} = 3.9$  Hz,  $^4J_{3',5'} = 2.5$  Hz,  $^5J_{3',1'} = 1.4$  Hz, 1H, 3'-H), 6.91 (s, 1H, 8-H), 7.18 (m<sub>c</sub>, 1H, 5'-H), 12.60 (brs, 2H, 1'-, 1''-NH), 12.77 (brs, 1H, 1-NH); **<sup>13</sup>C-NMR** (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 14.0 (C-10''), 14.7 (C-7''), 18.6 (C-6''), 23.2 (C-9''), 28.6 (C-8''), 58.7 (C-7), 92.9 (C-3), 111.8 (C-4'), 116.0 (C-8), 117.1 (C-3'), 120.8 (C-5), 122.3 (C-2'), 125.3 (C-2''), 126.8 (C-5'), 127.9 (C-3''), 129.6 (C-4''), 147.8 (C-2), 150.9 (C-5''), 165.8 (C-4); **IR** (ATR-Film):  $\tilde{\nu}$  [1/cm] = 2962, 2930, 2870, 1629, 1602, 1544, 1509, 1358, 1265, 1137, 1042, 991, 959, 838, 779; **HRMS** (ESI-FTMS, positiv-Ion): Berechnet für C<sub>19</sub>H<sub>24</sub>N<sub>3</sub>O (M + H)<sup>+</sup> = 310.19139, gefunden = 310.19127.

### 5-[(5-Butyl-4-propyl-2*H*-pyrrol-2-yliden)methyl]-4-methoxy-1*H*,1'-*H*-2,2'-bipyrrol·HCl (**58b**)

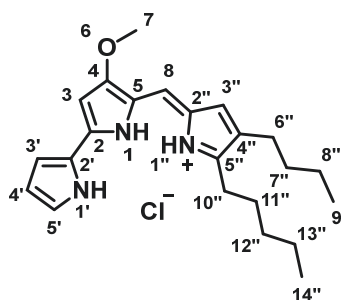


Entsprechend der Vorschrift für die Synthese von Prodigininen (8.2.4), wurde das Prodiginin **58b** aus Boc-MBC (**75**) und 2-Butyl-3-propyl-1*H*-pyrrol (**57b**) hergestellt und nach säulenchromatographischer Reinigung [Kieselgel; PE/Dichlormethan (Gradient von 75:25, 50:50 bis 25:75)] und Ausfällung als Hydrochlorid als tiefroter Feststoff (24 mg, 64  $\mu$ mol, 41%) erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 0.96 (t,  $^3J_{12'',11''} = 7.3$  Hz,  $^3J_{8'',7''} = 7.3$  Hz, 6H, 8''-, 12''-H), 1.44 (m<sub>c</sub>, 2H, 11''-H), 1.59 (m<sub>c</sub>, 4H, 7''-H), 1.75 (m<sub>c</sub>, 2H, 10''-H), 2.39 (t,  $^3J_{6'',7''} = 7.6$  Hz, 2H, 6''-H), 2.89 (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<sub>c</sub>, 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<sub>c</sub>, 1H, 5'-H), 12.63 (brs, 2H, 1'-, 1''-NH), 12.83 (brs, 1H, 1-NH); **<sup>13</sup>C-NMR** (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [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 C<sub>21</sub>H<sub>28</sub>N<sub>3</sub>O (M + H)<sup>+</sup> = 338.22269, gefunden = 338.22262.

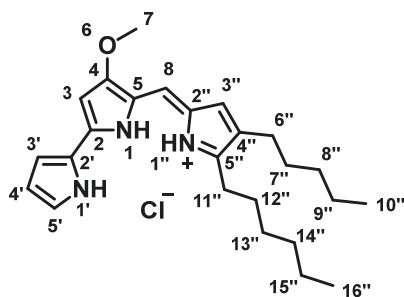
Die Analytikangaben stimmen mit der Literatur überein.<sup>[17]</sup>



**5-[(4-Butyl-5-pentyl-2*H*-pyrrol-2-yliden)methyl]-4-methoxy-1*H*,1'*H*-2,2'-bipyrrol-HCl (58c)**

**58c**

Entsprechend der Vorschrift für die Synthese von Prodigininen (8.2.4), wurde das Prodiginin **58c** aus Boc-MBC (**75**) und 3-Butyl-2-pentyl-1*H*-pyrrol (**57c**) hergestellt und nach säulenchromatographischer Reinigung [Kieselgel; Dichlormethan/Ammoniak in Methanol (7 N) (Gradient von 99.5:0.5 bis 98.5:1.5) anschließend neutrales Aluminiumoxid, *n*-Pentan/EtOAc (Gradient von 95:5, 50:50 bis 0:100)] und Ausfällung als Hydrochlorid

als tiefrotes Öl (49.0 mg, 130 µmol, 39%) erhalten. <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 0.86–0.97 (m, 6H, 14''-, 9''-H), 1.31–1.42 (m, 6H, 12''-, 13''-, 8''-H), 1.52 (m<sub>c</sub>, 2H, 7''-H), 1.75 (m<sub>c</sub>, 2H, 11''-H), 2.38 (t, <sup>3</sup>J<sub>6'',7''</sub> = 7.7 Hz, 2H, 6''-H), 2.85 (t, <sup>3</sup>J<sub>10'',11''</sub> = 7.9 Hz, 2H, 10''-H), 3.95 (s, 3H, 7-H), 6.03 (d, <sup>4</sup>J<sub>3,1</sub> = 1.9 Hz, 1H, 3-H), 6.29 (m<sub>c</sub>, 1H, 4'-H), 6.64 (d, <sup>4</sup>J<sub>3'',1''</sub> = 2.6 Hz, 1H, 3''-H), 6.86 (m<sub>c</sub>, 1H, 3'-H), 6.88 (s, 1H, 8-H), 7.16 (m<sub>c</sub>, 1H, 5'-H), 12.58 (brs, 2H, 1'-, 1''-NH), 12.75 (brs, 1H, 1-NH); <sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 14.0, 14.1, 22.5, 22.5, 25.1 (C-6''), 26.8 (C-10''), 29.6 (C-11''), 31.8, 32.6 (C-7''), 58.8 (C-7), 92.9 (C-3), 111.8 (C-4'), 116.0 (C-8), 117.2 (C-3'), 120.8 (C-5), 122.3 (C-2'), 125.3 (C-2''), 126.8 (C-5'), 128.0 (C-4''), 128.5 (C-3''), 147.8 (C-2), 151.5 (C-5''), 165.8 (C-4); IR (ATR-Film):  $\tilde{\nu}$  [1/cm] = 2954, 2928, 2859, 1629, 1602, 1573, 1544, 1509, 1359, 1246, 1136, 1065, 992, 960, 838; HRMS (ESI-FTMS, positiv-Ion): Berechnet für C<sub>23</sub>H<sub>32</sub>N<sub>3</sub>O (M + H)<sup>+</sup> = 366.25399, gefunden = 366.25386.

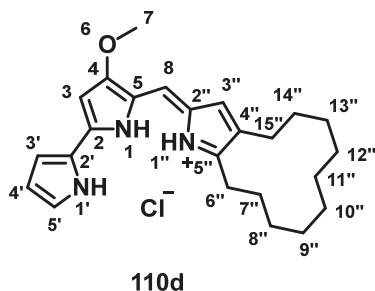
**5-[(5-Hexyl-4-pentyl-2*H*-pyrrol-2-yliden)methyl]-4-methoxy-1*H*,1'*H*-2,2'-bipyrrol-HCl (58d)**

**58d**

Entsprechend der Vorschrift für die Synthese von Prodigininen (8.2.4), wurde das Prodiginin **58d** aus Boc-MBC (**75**) und 2-Hexyl-3-pentyl-1*H*-pyrrol (**57d**) hergestellt und nach säulenchromatographischer Reinigung [Kieselgel; Dichlormethan/Ammoniak in Methanol (7 N) (Gradient von 99.5:0.5 bis 98.5:1.5) anschließend neutrales Aluminiumoxid, *n*-Pentan/EtOAc (Gradient von 95:5, 50:50 bis 0:100)] und

Ausfällung als Hydrochlorid als tiefrotes Öl (88.0 mg, 220 µmol, 65%) erhalten. <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 0.89 (m<sub>c</sub>, 6H, 16''-, 10''-H), 1.28–1.37 (m, 8H, 14''-, 8''-, 9''-H), 1.42 (m<sub>c</sub>, 2H, 13''-H), 1.55 (m<sub>c</sub>, 2H, 7''-H), 1.77 (m<sub>c</sub>, 2H, 12''-H), 2.39 (t, <sup>3</sup>J<sub>6'',7''</sub> = 7.7 Hz, 2H, 6''-H), 2.86 (t, <sup>3</sup>J<sub>11'',12''</sub> = 7.9 Hz, 2H, 11''-H), 3.95 (s, 3H, 7-H), 6.04 (d, <sup>4</sup>J<sub>3,1</sub> = 1.9 Hz, 1H, 3-H), 6.29 (m<sub>c</sub>, 1H, 4'-H), 6.65 (d, <sup>4</sup>J<sub>3'',1''</sub> = 2.6 Hz, 1H, 3''-H), 6.85–6.90 (m, 2H, 3'-, 8-H), 7.17 (m<sub>c</sub>, 1H, 5'-H), 12.59 (brs, 2H, 1'-, 1''-NH), 12.74 (brs, 1H, 1-NH).; <sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 14.1, 14.1, 22.6, 22.7, 25.3 (C-6''), 26.9 (C-11''), 29.3 (C-13''), 29.9 (C-12''), 30.1 (C-7''), 31.6, 31.6, 58.8, 92.9, 111.7 (C-4'), 115.9 (C-8), 117.1 (C-3'), 120.8 (C-5), 122.3 (C-2'), 125.3 (C-2''), 126.8 (C-5'), 128.0 (C-4''), 128.5 (C-3''), 147.8 (C-2), 151.4 (C-5''), 165.8 (C-4); IR (ATR-Film):  $\tilde{\nu}$  [1/cm] = 2927, 2954, 2859, 1633, 1603, 1603, 1544, 1508, 1412, 1352, 1143, 1066, 994, 960, 749; HRMS (ESI-FTMS, positiv-Ion): Berechnet für C<sub>25</sub>H<sub>36</sub>N<sub>3</sub>O (M + H)<sup>+</sup> = 394.28529, gefunden = 394.28521.



**2-[[4-methoxy-1*H*,1'-*H*-(2,2'-bipyrrol)-5-yl]methylene]-4,5,6,7,8,9,10,11,12,13-decahydro-2*H*-cyclododeca[*b*]pyrrol·HCl (**110d**)**



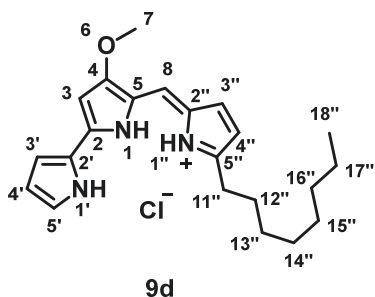
**Mutasyntese:** Entsprechend der Vorschrift für Mutasyntese im präparativen Maßstab (8.6.8) wurde das Prodiginin **110d** aus 4,5,6,7,8,9,10,11,12,13-Decahydro-1*H*-cyclododeca[*b*]pyrrol (**82d**) hergestellt und die erhaltene Menge mithilfe des Extinktionskoeffizienten auf 0.6 mg/L Kultur bestimmt.

**Chemische Synthese:** Entsprechend der Vorschrift für die Synthese von Prodigininen (8.2.4), wurde das Prodiginin **110d** aus Boc-MBC (**75**) und 4,5,6,7,8,9,10,11,12,13-Decahydro-1*H*-cyclododeca[*b*]pyrrol (**82d**) hergestellt und nach säulenchromatographischer Reinigung [Kieselgel; Dichlormethan/Ammoniak in Methanol (7 N) (Gradient von 99.5:0.5 bis 97:3) und Ausfällung als Hydrochlorid als tiefroter Feststoff (11.9 mg, 31.4 µmol, 13%) erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 1.29–1.38 (m, 9H, 8'', 9'', 12'', 13''-H), 1.38–1.46 (m, 4H, 10'', 11''-H), 1.66 (m<sub>c</sub>, 3H, 14''-H), 2.05 (m<sub>c</sub>, 2H, 7''-H), 2.44 (t, <sup>3</sup>J<sub>15'',14''</sub> = 7.0 Hz, 2H, 15''-H), 2.88 (t, <sup>3</sup>J<sub>6'',7''</sub> = 7.0 Hz, 2H, 6''-H), 4.01 (s, 3H, 7-H), 6.08 (d, <sup>4</sup>J<sub>3,1</sub> = 1.9 Hz, 1H, 3-H), 6.35 (dt, <sup>3</sup>J<sub>4',3'</sub> = 4.2 Hz, <sup>3</sup>J<sub>4',5'</sub> = 4.1 Hz, <sup>4</sup>J<sub>4',1'</sub> = 2.3 Hz, 1H, 4'-H), 6.70 (d, <sup>4</sup>J<sub>3'',1''</sub> = 2.5, 1H, 3''-H), 6.92 (m<sub>c</sub>, 1H, 3'-H), 6.96 (s, 1H, 8-H), 7.22 (m<sub>c</sub>, 1H, 5'-H), 12.48 (brs, 1H, 1''-NH), 12.65 (brs, 1H, 1'-NH), 12.89 (brs, 1H, 1-NH); **<sup>13</sup>C-NMR** (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 22.2 (C-15''), 23.0, 23.1, 23.6 (C-6''), 24.6, 25.0, 25.1, 25.7, 28.0 (C-7''), 29.2 (C-14''), 58.9 (C-7), 93.0 (C-3), 111.9 (C-4'), 116.1 (C-8), 117.4 (C-3'), 121.2 (C-5), 122.4 (C-2'), 126.2 (C-2''), 127.2 (C-5'), 128.7 (C-3''), 128.8 (C-4''), 148.3 (C-2), 151.5 (C-5''), 166.1 (C-4); **IR** (ATR-Film):  $\tilde{\nu}$  [1/cm] = 2921, 2848, 1634, 1605, 1548, 1504, 1465, 1348, 1278, 1241, 1214, 1129, 1064, 1042, 982, 960, 891, 840, 790, 759, 663, 599.

Die Analytikangaben stimmen mit der Literatur überein.<sup>[247]</sup>

**5-[(5-Octyl-2*H*-pyrrol-2-yliden)methyl]-4-methoxy-1*H*,1'-*H*-2,2'-bipyrrol·HCl (**9d**)**



Entsprechend der Vorschrift für die Synthese von Prodigininen (8.2.4), wurde das Prodiginin **9d** aus Boc-MBC (**75**) und 2-Octyl-1*H*-pyrrol (**27d**) hergestellt und nach säulenchromatographischer Reinigung [Kieselgel; Dichlormethan/Ammoniak in Methanol (7 N) (Gradient von 99.5:0.5 bis 96:4) anschließend neutrales Aluminiumoxid, *n*-Pentan/EtOAc (Gradient von 90:10, 50:50 bis 0:100)] und Ausfällung als Hydrochlorid als tiefroter Feststoff (34.4 mg, 88.7 µmol, 34%) erhalten.

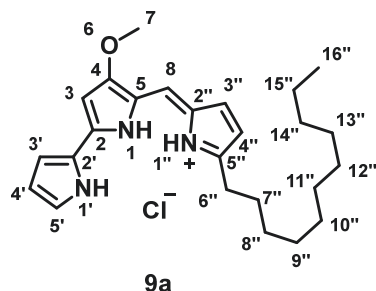
**<sup>1</sup>H-NMR** (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 0.86 (t, <sup>3</sup>J<sub>13'',12''</sub> = 6.8 Hz, 3H, 13''-H), 1.17–1.44 (m, 10H, 8'', 9'', 10'', 11'', 12''-H), 1.77 (m<sub>c</sub>, 2H, 7''-H), 2.94 (t, <sup>3</sup>J<sub>6'',7''</sub> = 7.7 Hz, 2H, 6''-H), 4.01 (s, 3H, 7-H), 6.08 (m<sub>c</sub>, 1H, 3-H), 6.20 (m<sub>c</sub>, 1H, 4''-H), 6.35 (m<sub>c</sub>, 1H, 4'-H), 6.83 (m<sub>c</sub>, 1H, 3''-H), 6.94 (m<sub>c</sub>, 1H, 3'-H), 6.99 (s, 1H, 8-H), 7.23 (m<sub>c</sub>, 1H, 5'-H), 12.66 (brs, 1H, 1''-NH), 12.71 (brs, 1H, 1'-NH), 12.88 (brs, 1H, 1-NH); **<sup>13</sup>C-NMR** (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 14.2 (C-13''), 22.8, 28.6 (C-6''), 29.4\*, 29.4\*, 29.5\*, 29.5\*, 32.0, 59.0 (C-7), 93.2 (C-3), 112.1 (C-4'), 112.7 (C-4''), 116.5 (C-8), 118.0 (C-3'), 121.5 (C-2), 122.3 (C-2'), 126.1

(C-2''), 127.6 (C-5'), 129.4 (C-3''), 148.9 (C-5), 153.3 (C-5''), 166.4 (C-4); IR (ATR-Film):  $\tilde{\nu}$  [1/cm] = 2921, 2851, 1635, 1607, 1550, 1513, 1364, 1285, 1271, 1253, 1184, 1040, 955, 772, 746, 669, 595.

\*Die Signale weisen eine geringe Differenz auf.

Das Prodiginin **9d** wurde von B. Sc. *Annabel Arens* im Rahmen ihrer Bachelorarbeit hergestellt.<sup>[259]</sup> Die <sup>1</sup>H- und die <sup>13</sup>C-NMR Daten stimmen mit der Literatur überein.<sup>[258]</sup>

#### 5-[(5-Undecyl-2H-pyrrol-2-yliden)methyl]-4-methoxy-1H,1'H-2,2'-bipyrrol-HCl (**9a**)



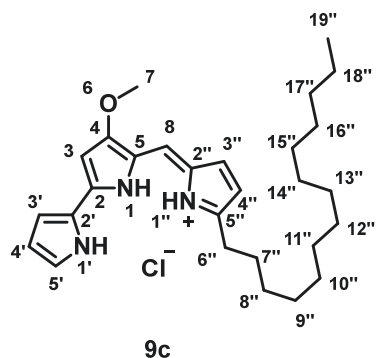
Entsprechend der Vorschrift für die Synthese von Prodigininen (8.2.4), wurde das Prodiginin **9a** aus Boc-MBC (**75**) und 2-Undecyl-1H-pyrrol (**27a**) hergestellt und nach säulenchromatographischer Reinigung [Kieselgel; Dichlormethan/Ammoniak in Methanol (7 N) (Gradient von 99.5:0.5 bis 97.5:2.5)] anschließend neutrales Aluminiumoxid,

*n*-Pentan/EtOAc (Gradient von 90:10, 50:50 bis 0:100)] und Ausfällung als Hydrochlorid als tiefroter Feststoff (23.1 mg, 60  $\mu$ mol, 24%) erhalten. <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 0.86 (t, <sup>3</sup>J<sub>16'',15''</sub> = 7.0 Hz, 3H, 16''-H), 1.16–1.35 (m, 14H, 9'', 10'', 11'', 12'', 13'', 14'', 15''-H), 1.35–1.42 (m, 2H, 8''-H), 1.76 (m<sub>c</sub>, 2H, 7''-H), 2.93 (t, <sup>3</sup>J<sub>6'',7''</sub> = 7.7 Hz, 2H, 6''-H), 3.99 (s, 3H, 7-H), 6.06 (d, <sup>4</sup>J<sub>3,1</sub> = 1.9 Hz, 1H, 3-H), 6.19 (dd, <sup>3</sup>J<sub>4'',3''</sub> = 3.8 Hz, <sup>4</sup>J<sub>4'',1''</sub> = 1.8 Hz, 1H, 4''-H), 6.34 (m<sub>c</sub>, 1H, 4'-H), 6.82 (m<sub>c</sub>, 1H, 3''-H), 6.93 (m<sub>c</sub>, 1H, 3'-H), 6.97 (s, 1H, 8-H), 7.22 (m<sub>c</sub>, 1H, 5'-H), 12.65 (brs, 1H, 1'-NH), 12.70 (brs, 1H, 1''-NH), 12.86 (brs, 1H, 1-NH); <sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 14.2 (C-16''), 22.8, 28.6 (C-6''), 29.4, 29.5\*, 29.5\*, 29.7, 29.8\*, 29.8\*, 32.0, 58.9 (C-7), 93.2 (C-3), 112.1 (C-4'), 112.6 (C-4''), 116.5 (C-8), 118.0 (C-3'), 121.5 (C-5), 122.2 (C-2'), 126.1 (C-2''), 127.6 (C-5'), 129.4 (C-3''), 148.9 (C-2), 153.2 (C-5''), 166.4 (C-4); IR (ATR-Film):  $\tilde{\nu}$  [1/cm] = 3102, 2920, 2851, 1737, 1635, 1606, 1575, 1549, 1513, 1464, 1410, 1366, 1286, 1272, 1253, 1182, 1138, 1068, 1038, 1004, 988, 956, 891, 878, 838, 814, 771, 746, 713, 697, 671, 639, 616, 595, 459.

\*Die Signale weisen eine geringe Differenz auf.

Die <sup>1</sup>H- und <sup>13</sup>C-NMR Daten stimmen mit der Literatur überein.<sup>[258]</sup>

#### 5-[(5-Tetradecyl-2H-pyrrol-2-yliden)methyl]-4-methoxy-1H,1'H-2,2'-bipyrrol-HCl (**9c**)



Entsprechend der Vorschrift für die Synthese von Prodigininen (8.2.4), wurde das Prodiginin **9c** aus Boc-MBC (**75**) und 5-Tetradecyl-1H-pyrrol (**27c**) hergestellt und nach säulenchromatographischer Reinigung [Kieselgel; Dichlormethan/Ammoniak in Methanol (7 N) (Gradient von 99.5:0.5 bis 98:2)] anschließend neutrales Aluminiumoxid, *n*-Pentan/EtOAc (90:10)] und Ausfällung als Hydrochlorid als tiefroter Feststoff (26.6 mg, 60  $\mu$ mol, 23%) erhalten.

<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 0.87 (t, <sup>3</sup>J<sub>19'',18''</sub> = 7.0 Hz, 3H, 19''-H), 1.17–1.44 (m, 22H, 7'', 8'', 9'', 10'', 11'', 12'', 13'', 14'', 15'', 16'', 17'', 18'', 19''-H), 1.77 (m<sub>c</sub>, 2H, 7''-H), 2.94 (t, <sup>3</sup>J<sub>6'',7''</sub> = 7.7 Hz,

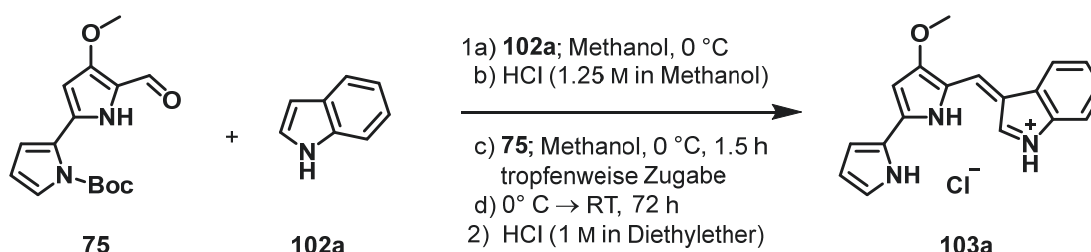
2H, 6''-H), 4.00 (s, 3H, 7-H), 6.07 (m<sub>c</sub>, 1H, 3-H), 6.19 (m<sub>c</sub>, 1H, 4''-H), 6.34 (m<sub>c</sub>, 1H, 4'-H), 6.83 (m<sub>c</sub>, 1H, 3''-H), 6.94 (m<sub>c</sub>, 1H, 3'-H), 6.98 (s, 1H, 8-H), 7.23 (m<sub>c</sub>, 1H, 5'-H), 12.66 (brs, 1H, 1'-NH), 12.71 (brs, 1H, 1''-NH), 12.88 (brs, 1H, 1-NH); <sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 14.3 (C-19''), 22.8, 28.6 (C-6''), 29.4 (C-7''), 29.5\*, 29.5\*, 29.5\*, 29.7, 29.8\*, 29.8\*, 29.8\*, 29.8\*, 32.1, 58.9 (C-7), 93.2 (C-3), 112.1 (C-4'), 112.6 (C-4''), 116.5 (C-8), 118.0 (C-3'), 121.5 (C-5), 122.3 (C-2'), 126.1 (C-2''), 127.6 (C-5'), 129.4 (C-3''), 148.9 (C-2), 153.3 (C-5''), 166.4 (C-4); IR (ATR-Film):  $\tilde{\nu}$  [1/cm] = 2917, 2849, 1636, 1607, 1550, 1514, 1464, 1410, 1365, 1286, 1253, 1183, 1138, 1040, 957, 814, 768, 746, 720, 671, 594; HRMS (ESI-FTMS, positiv-Ion): Berechnet für C<sub>28</sub>H<sub>42</sub>N<sub>3</sub>O (M + H)<sup>+</sup> = 436.3326, gefunden = 436.3322.

\*Die Signale weisen eine geringe Differenz auf.

Das Prodiginin **9c** wurde von B. Sc. *Annabel Arens* im Rahmen ihrer Bachelorarbeit hergestellt.<sup>[259]</sup>

## 8.2.5 Synthese von Indolprodigiosin (103a)

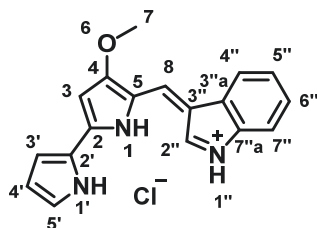
### 3-[[4-Methoxy-1H,1'H-(2,2'-bipyrrol)-5-yl]methylen]-3H-indol (103a, Indolprodigiosin)



Indolprodigiosin (**103a**) wurde nach einer modifizierten Vorschrift von Dr. *Andreas S. Klein* hergestellt.<sup>[17]</sup> Die Synthesemethode wurde im Rahmen der Bachelorarbeit von B. Sc. *Anne Vogt* untersucht und im Rahmen dieser Arbeit weiter abgewandelt.<sup>[293]</sup>

Vor Beginn der Reaktion wurde eine ausreichende Menge an trockenem Methanol 1 h mit Stickstoff begast, um so Sauerstoff zu entfernen. Die Reaktion wurde in einem *Schlenk*-Kolben unter Schutzgasatmosphäre durchgeführt. Zu einer Lösung aus Indol (**102a**, 5.0 Äq.) in trockenem Methanol (38 mL/mmol Boc-MBC) wurde bei 0 °C HCl in Methanol (1.25 M, 0.37 Äq.) zugetropft. Boc-MBC (**75**, 1 Äq.) wurde in trockenem und mit Stickstoff begastem Methanol (31 mL/mmol Boc-MBC) gelöst und mittels Spritzenpumpe (5 mL/min) bei 0 °C zugetropft, woraufhin sich die Farbe des Reaktionsansatzes langsam von farblos über orange hin zu rot veränderte. Das Reaktionsgemisch wurde für 72 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von wenigen Tropfen wässriger Ammoniak-Lösung (25 % (w/w)) gequencht, bis der Reaktionsansatz eine orangene Farbe zeigte, und im Anschluss erfolgte eine Extraktion mit Dichlormethan (3 × 10 mL). Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Die säulenchromatographische Reinigung [Kieselgel; Dichlormethan/Ammoniak in Methanol (7 N) (Gradient von 99.5:0.5 bis 95:5) anschließend neutrales Aluminiumoxid, *n*-Pentan/EtOAc (verschiedene Gradienten)] ergab Indolprodigiosin (**103a**, 9–28 % Rohprodukt, 20–120 µmol, 4.5–34 mg) als dunkelroten/violetten Feststoff. Das Produkt wurde in einer geringen Menge Diethylether aufgenommen, wenige Tropfen HCl (1 M in Diethylether) zugegeben und

das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt, so dass von Indolprodigiosin (**103a**) das Hydrochlorid gebildet wurde.



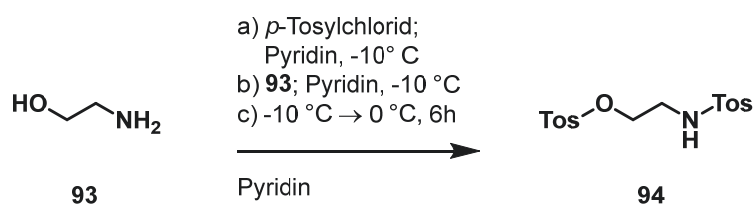
**103a**

<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 4.10 (s, 3H, 7-H), 6.16 (s, 1H, 3-H), 6.41 (m<sub>c</sub>, 1H, 4'-H), 7.08 (m<sub>c</sub>, 1H, 3'-H), 7.27–7.31 (m, 2H, 6''-H, 5''-H), 7.37 (m<sub>c</sub>, 1H, 5'-H), 7.50–7.59 (m, 1H, 4''-H), 7.63 (s, 1H, 8-H), 7.76–7.80 (m, 1H, 7''-H), 9.86 (d, <sup>3</sup>J<sub>2'',1''</sub> = 3.4 Hz, 1H, 2''-H), 10.44 (brs, 1-NH), 12.22 (brs, 1-NH), 13.60 (brs, 1-NH).

Die <sup>1</sup>H-NMR Daten stimmen mit den Daten der Dissertation von Dr. *Andreas S. Klein* überein.<sup>[17]</sup> Die Zuordnung der <sup>1</sup>H-NMR Signale erfolgte auf Basis dieser Daten, da im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht genügend Indolprodigiosin (**103a**) für <sup>13</sup>C-NMR sowie 2D-NMR-Spektren isoliert werden konnte, die eine Zuordnung der Signale erlauben würden. Eine Zuordnung der NH-Signale konnte nicht erfolgen, da das von Dr. *Andreas S. Klein* isolierte Indolprodigiosin (**103a**) in vollständig deprotonierter Form vorlag.

### 8.2.6 Synthese von Dodec-3-en-1-amin (**28a**, DDA)

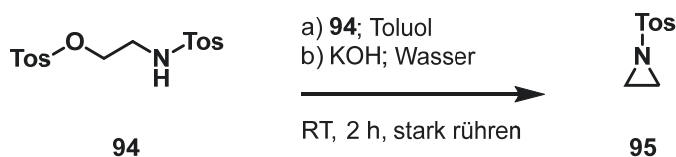
#### *N,O*-Ditosylethanolamin (**94**)



Die Synthese wurde nach einer modifizierten Vorschrift von *Moss et al.* durchgeführt.<sup>[261]</sup>

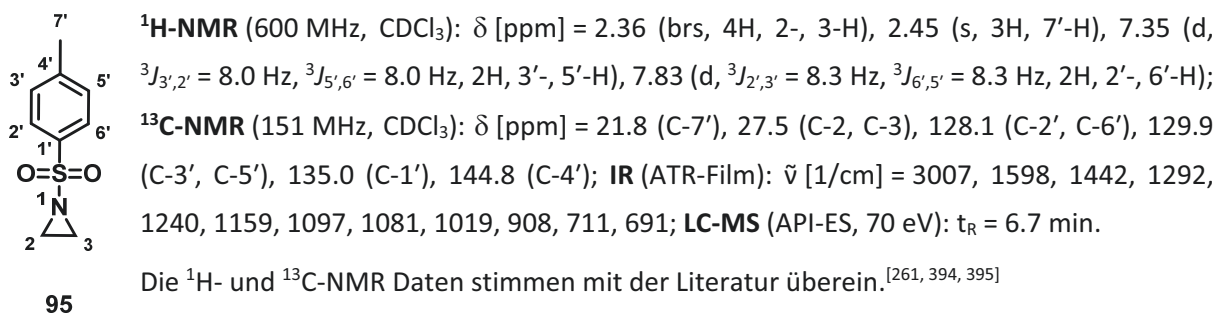
Zu einer Lösung aus *p*-Toluolsulfonsäurechlorid (13.1 g, 68.7 mmol, 2.10 Äq.) in trockenem Pyridin (8 mL) wurde unter Schutzgasatmosphäre bei -10 °C Ethanolamin (**93**, 2.00 g, 32.7 mmol, 1.00 Äq.) in trockenem Pyridin (4 mL) gelöst zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde auf 0 °C erwärmt und für 6 h gerührt, wobei die Farbe von hellgelb zu ockerfarben wechselte. Durch Zugabe von Wasser (10 mL) wurde die Reaktion beendet, der Feststoff in Chloroform gelöst (25 mL) und mit 1 N HCl (2× 10 mL) und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen (1× 10 mL). Die organische Phase wurde über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das Produkt **94** wurde als Feststoff erhalten und ohne weitere Reinigung in der nächsten Synthese eingesetzt.

### 1-Tosylaziridin (**95**)

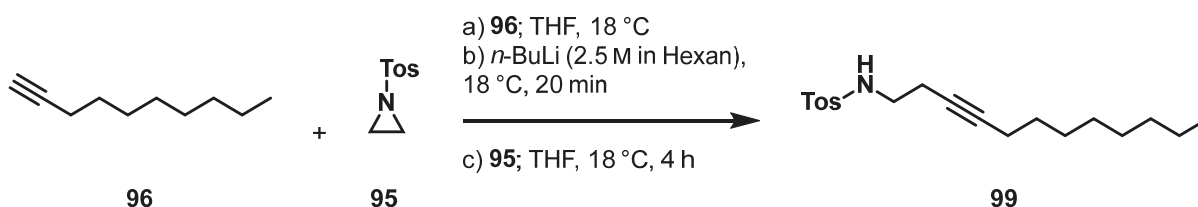


Die Synthese wurde nach einer Vorschrift von *Moss et al.* durchgeführt.<sup>[261]</sup>

Zu *N,O*-Ditosylethanolamin (**94**, 13.8 g, 37.2 mmol, 1.00 Äq.) in Toluol (70 mL) wurde unter Schutzgasatmosphäre KOH (2 g, 186 mmol, 5.00 Äq.) in Wasser (10 mL) gegeben. Die zweiphasige Mischung wurde für 2 h bei Raumtemperatur stark gerührt und anschließend die beiden Phasen voneinander getrennt. Die wässrige Phase wurde mit Toluol (3× 15 mL) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen mit Wasser (1× 20 mL) und gesättigter NaCl-Lösung (1× 20 mL) gewaschen und über MgSO<sub>4</sub> getrocknet. 1-Tosylaziridin (**95**, 5.83 g, 29.6 mmol, 79%) wurde als gelber Feststoff erhalten und ohne weitere Reinigung in der nächsten Synthese eingesetzt.

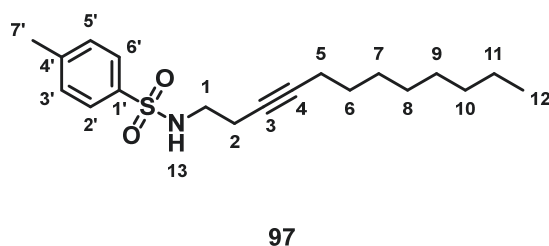


### *N*-Tosyldodec-3-yn-1-amin (**97**)



Die Synthese wurde nach einer Vorschrift von *Pinkerton et al.* durchgeführt.<sup>[260]</sup>

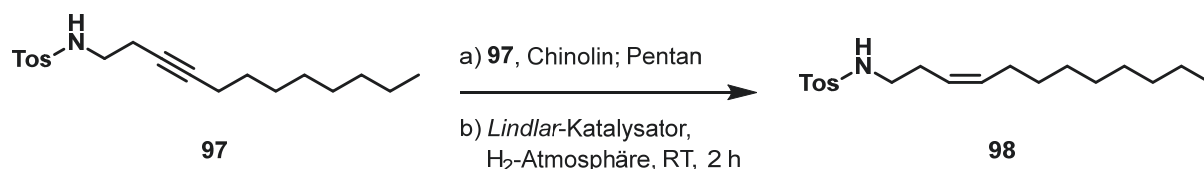
Unter Schutzgasatmosphäre und bei 18 °C wurde zu einer Lösung aus 1-Decin (**96**, 3.76 mL, 20.5 mmol, 4.05 Äq.) in trockenem THF (7.8 mL) tropfenweise *n*-Buthyllithium (2.5 M in Hexan, 8.31 mL, 20.8 mmol, 4.10 Äq.) gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde für 20 min bei 18 °C gerührt und im Anschluss 1-Tosylaziridin (**95**, 1.00 g, 5.07 mmol, 1 Äq.) in trockenem THF (3.8 mL) zugegeben. Der Reaktionsansatz wurde für 4 h bei 18 °C gerührt, dann die Reaktion durch Zugabe von gesättigter NaHCO<sub>3</sub>-Lösung beendet und mit Diethylether extrahiert (3× 100 mL). Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Die säulenchromatographische Reinigung [Kieselgel; *n*-Pentan/EtOAc (90:10)] ergab *N*-Tosyldodec-3-yn-1-amin (**97**, 390 mg, 1.16 mmol, 23%) als leicht gelbes Öl.



**<sup>1</sup>H-NMR** (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 0.88 (t, <sup>3</sup>J<sub>12,11</sub> = 7.0 Hz, 3H, 12-H), 1.19–1.39 (m, 10H, 7-, 8-, 9-, 10-, 11-H), 1.44 (m<sub>c</sub>, 2H, 6-H), 2.10 (tt, <sup>3</sup>J<sub>5,6</sub> = 7.2 Hz, <sup>5</sup>J<sub>5,2</sub> = 2.3 Hz, 2H, 5-H), 2.30 (tt, <sup>3</sup>J<sub>2,1</sub> = 6.5 Hz, <sup>5</sup>J<sub>2,5</sub> = 2.3 Hz, 2H, 2-H), 2.43 (s, 3H, 7'-H), 3.05 (m<sub>c</sub>, 2H, 1-H), 4.69 (brs, 1H, 13-NH), 7.31 (d, <sup>3</sup>J = 8.0 Hz, 2H, 3'-, 5'-H), 7.75 (d, <sup>3</sup>J = 8.0 Hz, 2H, 2'-, 6'-H); **<sup>13</sup>C-NMR** (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 14.3 (C-12), 18.8 (C-5), 20.1 (C-2), 21.7 (C-7'), 22.8, 29.0, 29.1, 29.2, 29.3, 32.0, 42.3 (C-1), 75.8 (C-4), 83.5 (C-3), 127.2 (C-2', C-6'), 129.9 (C-3', C-5'), 137.2 (C-1'), 143.6 (C-4'); **IR** (ATR-Film):  $\tilde{\nu}$  [1/cm] = 3268, 2954, 2920, 2853, 1739, 1598, 1494, 1461, 1433, 1377, 1341, 1318, 1305, 1287, 1213, 1163, 1154, 1096, 1075, 1040, 1018, 966, 918, 814, 705, 568, 550, 515, 493, 471.

Die <sup>1</sup>H-, <sup>13</sup>C-NMR und IR-Daten stimmen mit der Literatur überein.<sup>[155, 260, 396]</sup>

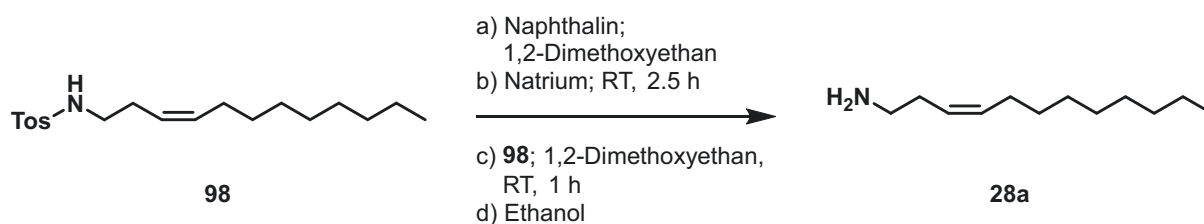
### (Z)-N-Tosyldodec-3-en-1-amin (98)



Die Synthese wurde nach einer modifizierten Vorschrift von *Pinkerton et al.* durchgeführt.<sup>[260]</sup>

Lindlar-Katalysator (6.00 mg) wurde zu einer Lösung aus *N*-Tosyldodec-3-yn-1-amin (**97**, 359 mg, 1.07 mmol, 1.00 Äq.) und Chinolin (53 µL, 0.41 mmol, 0.38 Äq.) in Pentan gegeben und bei Raumtemperatur für 2 h unter H<sub>2</sub>-Atmosphäre gerührt. Anschließend wurde die Reaktionsmischung über Watte und Celite filtriert, das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und das zurückbleibende Öl in Diethylether (30 mL) gelöst. Die Lösung wurde mit HCl (0.01 M, 3× 30 mL) und einer gesättigten NaCl-Lösung (1× 30 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das Produkt **98** wurde als klares gelbes Öl erhalten und ohne weitere Reinigung in der nächsten Synthese eingesetzt.

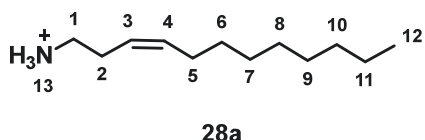
### (Z)-Dodec-3-en-1-amin (28a, DDA)



Die Synthese wurde nach einer Vorschrift von *Pinkerton et al.* durchgeführt.<sup>[260]</sup>

Zu einer Lösung aus Naphthalin (537 mg, 4.19 mmol, 3.98 Äq.) in 1,2-Dimethoxyethan (9 mL) wurde Natrium (163 mg, 7.08 mmol, 6.73 Äq.) gegeben und die Mischung für 2.5 h bei Raumtemperatur

gerührt. Nach Zugabe von (Z)-N-Tosyldodec-3-en-1-amin (**98**, 355 mg, 1.05 mmol, 1.00 Äq.) in 15 mL 1,2-Dimethoxyethan wurde der Reaktionsansatz für 1 h bei Raumtemperatur gerührt, dann Ethanol (1 mL) zugefügt. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und nach säulenchromatographischer Reinigung [Kieselgel; Methanol] (Z)-Dodec-3-en-1-amin (**28a**, 223 mg, 1.22 mmol, 71% Rohprodukt<sup>39</sup>) als gelbes Öl erhalten. Ausfällung als Hydrochlorid ergab das Produkt als hellgelben Feststoff.



**<sup>1</sup>H-NMR** (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 0.87 (t,  $^3J_{12,11}$  = 7.0 Hz, 3H, 12-H), 1.22–1.35 (m, 12H, 6-, 7-, 8-, 9-, 10-, 11-H), 2.05 (m<sub>c</sub>, 2H, 5-H), 2.50 (m<sub>c</sub>, 2H, 2-H), 2.99 (m<sub>c</sub>, 2H, 1-H), 5.32 (m<sub>c</sub>, 1H, 3-H), 5.57 (m<sub>c</sub>, 1H, 4-H), 8.22 (brs, 3H, 13-NH); **<sup>13</sup>C-NMR** (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 14.3 (C-12), 22.8 (C-10), 25.7 (C-2), 27.6 (C-5), 29.4, 29.5, 29.7\*, 29.7\*, 32.0 (C-11), 39.9 (C-1), 122.7 (C-3), 135.1 (C-4); **IR** (ATR-Film):  $\tilde{\nu}$  [1/cm] = 2923, 2853, 1738, 1567, 1465, 1377, 1217, 783, 722.

\* Die Signale weisen eine geringe Differenz auf.

Die <sup>1</sup>H-, <sup>13</sup>C-NMR und IR-Daten stimmen mit geringfügigen Abweichungen mit der Literatur überein. In den Literatur Referenzen wurde das nicht protonierte Molekül analysiert.<sup>[155, 260]</sup>

## 8.3 Molekularbiologische Methoden

### 8.3.1 Primerdesign

Standardprimer wurden so erstellt, dass der Schmelzpunkt – sofern möglich – bei etwa 50–60 °C lag und der Primer eine Länge von etwa 17–20 bp aufwies. Mithilfe des Online-Programms *Oligocalc*<sup>40</sup> und dem *Nearest Neighbor* Algorithmus.<sup>[397-399]</sup> wurde die Schmelztemperatur der Primer bestimmt. *Gibson Assembly*® Primer wurden mithilfe der Software *CloneManager* kreiert und die in der Software vorgegebenen Standardbedingungen verwendet (Schmelzpunkt 55–80 °C, minimaler GC-Anteil 10%, maximaler GC-Anteil 90%). Das 5'-Ende der *Gibson Assembly*® Primer war komplementär zum Zielvektor.

### 8.3.2 PCR-Methoden

Mittels PCR wurden Gene von genomischer DNA oder Plasmiden amplifiziert. In den PCR Reaktionen wurde hauptsächlich die *Phire Hot Start II* DNA Polymerase verwendet. In einigen Fällen wurde auch die *Phusion Hot Start II* oder die *Herculase II Fusion* DNA Polymerase getestet. Alle PCR Reaktionen folgten dem Standardprotokoll (Tabelle 23), wurden jedoch teilweise angepasst. Änderungen des Standardprotokolls wurden in den jeweiligen PCR-Methoden vermerkt. Die Zugabe von DMSO [3–10% (v/v)] senkte die Schmelztemperatur der Primer und erleichterte die Anlagerung der Primer an das Template, was besonders bei Amplifikation GC-reicher DNA-Abschnitte zu einer verbesserten DNA-Amplifikation führte.

<sup>39</sup> Das NMR zeigt noch Verunreinigungen unbekannter Art.

<sup>40</sup> November 2019: <http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>



**Tabelle 23.** Allgemeine Zusammensetzung und Temperaturprogramm der Standard PCR-Ansätze.

| Komponente                 | Stamm-konzentration | Menge      | Schritt                | Temp. [°C] | Dauer               |
|----------------------------|---------------------|------------|------------------------|------------|---------------------|
| Template DNA               | 20–50 ng/μL         | 1 μL       | Initiale Denaturierung | 98         | 30 s <sup>[a]</sup> |
| <i>forward</i> Primer      | 10 μM               | 1 μL       | Denaturierung          | 98         | 10 s                |
| <i>reverse</i> Primer      | 10 μM               | 1 μL       | Anlagerung             |            | 30 s                |
| dNTP-Mix                   | 10 mM               | 0.4 μL     | Elongation             | 72         | 15 s/kb             |
| Puffer                     | 5×                  | 4 μL       | finale Elongation      | 72         | 10 min              |
| Polymerase                 |                     | 0.4 μL     | Lagerung               | 10         | ∞                   |
| DMSO                       |                     | 0.6 – 2 μL |                        |            |                     |
| ad. dest. H <sub>2</sub> O |                     | 20 μL      |                        |            |                     |

<sup>[a]</sup> Die Dauer der initialen Denaturierung wurden von 30 s auf 3 min erhöht, sofern genomische DNA als Template DNA verwendet wurde, oder im Falle der Kolonie-PCR (8.3.2.1).

### 8.3.2.1 Kolonie-PCR

Die Kolonie-PCR wurde durchgeführt, um positive Transformanden — Kolonien, die Plasmid mit *insert* beinhalten — zu identifizieren. Dazu wurden nach erfolgter Transformation (8.4.3) und Inkubation über Nacht einzelne Kolonien mithilfe einer sterilen Pipettenspitze von der Agarplatte abgetragen und in je ein PCR-Reaktionsgefäß mit PCR-Reaktionsmix (Tabelle 23) eingetaucht. Anschließend wurde diese Pipettenspitze aus dem PCR-Reaktionsgefäß entnommen und damit eine Übernachtskultur inokuliert (8.4.1.2.2). Die initiale Denaturierung wurde im Falle der Kolonie-PCR entgegen dem Standard PCR-Protokoll (Tabelle 23) auf 3 min erhöht. Die Kolonie-PCR wurde *via* Agarosegelelektrophorese analysiert (8.3.5).

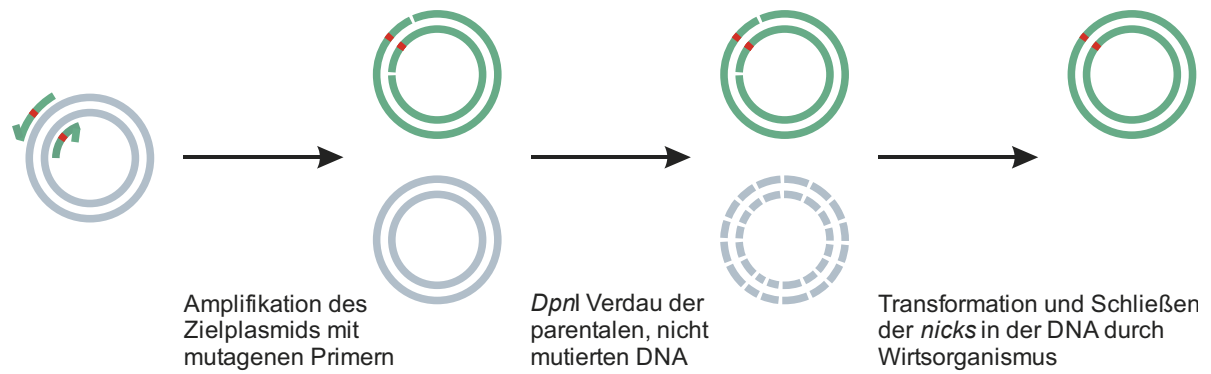
### 8.3.2.2 Test-PCR

Die Test-PCR wurde durchgeführt, um das Vorhandensein eines *inserts* in Plasmiden nach der Plasmidisolierung (8.3.3.1) nachzuweisen. Dazu wurden nach erfolgter Transformation (8.4.3) einzelne Kolonien als Übernachtskulturen (8.4.1.2.2) angezogen und die Plasmide isoliert (8.3.3.1). Die Plasmid DNA wurde als Template in der Test-PCR eingesetzt, die entsprechend den Standardbedingungen (8.3.2, Tabelle 23) angesetzt und durchgeführt wurde. Die Test-PCR wurde *via* Agarosegelelektrophorese analysiert (8.3.5).

### 8.3.2.3 QuikChange®-PCR

Die *QuikChange*®-PCR (Abbildung 92) wird zur gezielten Mutagenese genutzt und basiert auf dem Einsatz komplementärer Primer, die in der Mitte der Primersequenz die Nukleotide enthalten, die für die auszutauschende(n) Aminosäure(n) codieren. Die Bindung der Primer wird durch flankierende Bereiche ermöglicht, die komplementär zur Template DNA sind. Da es sich um komplementäre Primer handelt, wird die Template DNA während der *QuikChange*®-PCR linear amplifiziert.





**Abbildung 92.** QuikChange®-PCR. Abbildung wurde in Anlehnung Agilent Technologies Inc. erstellt.<sup>[400]</sup>

Die QuikChange®-PCR wurde in dieser Arbeit im speziellen eingesetzt, um eine Punktmutation in der Basensequenz des Gens *treaP*, die nach Genamplifikation und Assemblierung im Zielvektor entdeckt wurde, zu entfernen. Es wurde ein zweistufiges Protokoll durchgeführt (Tabelle 24), welches eine mögliche Dimerisierung der Primer verhindert. Dabei wurden zwei separate PCR-Reaktionen angesetzt, wobei entweder nur *forward* (fw) oder nur *reverse* (rv) Primer enthalten waren. Nach fünf PCR Zyklen wurden die Ansätze vereint und die PCR-Reaktion für weitere 20 Zyklen weitergeführt. Die Template DNA wurde im Anschluss durch *DpnI* Verdau (8.3.4) entfernt und der QuikChange®-Ansatz für eine anschließende Transformation (8.4.3) des Zielorganismus genutzt.

**Tabelle 24.** Zusammensetzung und Temperaturprogramm der zweistufigen QuikChange®-PCR.

| Komponente                 | Stamm-konzentration | Ansatz 1 | Ansatz 2 | Schritt (Stufe 1)                     | Temp. [°C] | Dauer  |
|----------------------------|---------------------|----------|----------|---------------------------------------|------------|--------|
| Template DNA               | 20–50 ng/μL         | 1 μL     | 1 μL     | Initiale Denaturierung                | 98         | 30 s   |
| fw Primer (HB79)           | 10 μM               | 1 μL     | —        | Denaturierung                         | 98         | 10 s   |
| rv Primer (HB80)           | 10 μM               | —        | 1 μL     | Anlagerung                            | 69         | 30 s   |
| dNTP-Mix                   | 10 mM               | 0.4 μL   | 0.4 μL   | Elongation                            | 72         | 90 s   |
| GC-Puffer                  | 5×                  | 4 μL     | 4 μL     | Vereinigung von Ansatz 1 und Ansatz 2 |            |        |
| Phire                      |                     | 0.4 μL   | 0.4 μL   | Schritt (Stufe 2)                     | Temp. [°C] | Dauer  |
| Hot Start II               |                     |          |          | Denaturierung                         | 98         | 10 s   |
| DMSO                       |                     | 0.6 μL   | 0.6 μL   | Anlagerung                            | 69         | 30 s   |
| ad. dest. H <sub>2</sub> O |                     | 20 μL    | 20 μL    | Elongation                            | 72         | 90 s   |
|                            |                     |          |          | finale Elongation                     | 72         | 20 min |
|                            |                     |          |          | Lagerung                              | 10         | ∞      |

### 8.3.2.4 Nested PCR

Die Nested PCR (Abbildung 93) dient einer erleichterten und spezifischen Amplifikation des Zielgens durch Anreicherung der Ziel-DNA und wird u. a. für diagnostische Zwecke genutzt.<sup>[401, 402]</sup> Bei dieser PCR-Methode werden in der Regel zwei Primerpaare genutzt. Eines dieser Primerpaare bindet *upstream* und *downstream* des Zielgens (äußere Primerpaar), während das andere Primerpaar an die Ziel-DNA bindet (innere Primerpaar). Der Einsatz des äußeren Primerpaars dient daher der Anreicherung von DNA, welche die gewünschte DNA enthält und erleichtert so die Amplifikation durch

die Standardprimer, also die inneren Primer. Es ist sowohl möglich beide Primerpaare gleichzeitig in einer PCR einzusetzen als auch zwei aufeinanderfolgende PCR Reaktionen durchzuführen.



**Abbildung 93.** *Nested PCR.*

In dieser Arbeit wurde die *Nested PCR* zur Amplifikation des Gens *mcpH* angewendet, wobei die inneren und äußeren Primerpaare sowohl in zwei einzelnen PCR-Reaktionen eingesetzt wurden als auch in einem gemeinsamen PCR-Ansatz. Im Anschluss an die *Nested PCR* wurde das Gen *mcpH* noch mit *Gibson* Primern amplifiziert für einen nachfolgenden *Gibson Assembly*<sup>®</sup> (8.3.8).

### 8.3.2.5 *Overlap Extension PCR*

Die *Overlap Extension PCR* ist eine für vielfältige Zwecke anwendbare PCR-Methode. Eine dieser Anwendungen der *Overlap Extension PCR* ist das zielgerichtete Einfügen von Mutationen.<sup>[403, 404]</sup> Zum Einfügen von Mutationen werden zunächst PCRs mit mutagenen Primern durchgeführt, sodass in den Amplifikaten der gewünschte Basenaustausch eingefügt wird (Abbildung 94). Diese Amplifikate werden in einer weiteren PCR eingesetzt, um diese zu assemblieren und zu verlängern. Auf diese Weise wird das Zielgen mit der entsprechenden Mutation erhalten. Mit der *Overlap Extension PCR* kann nicht nur eine Position mutiert werden, sondern bei Verwendung entsprechend vieler mutagener Primer auch die Mutation verschiedener Stellen gleichzeitig durchgeführt und im Anschluss assembliert werden. Diese Methode wurde im Rahmen dieser Arbeit verwendet, um mehrere Punktmutationen, die nach Amplifikation des Gens *mcpH* entstanden waren, entsprechend wieder zu entfernen.

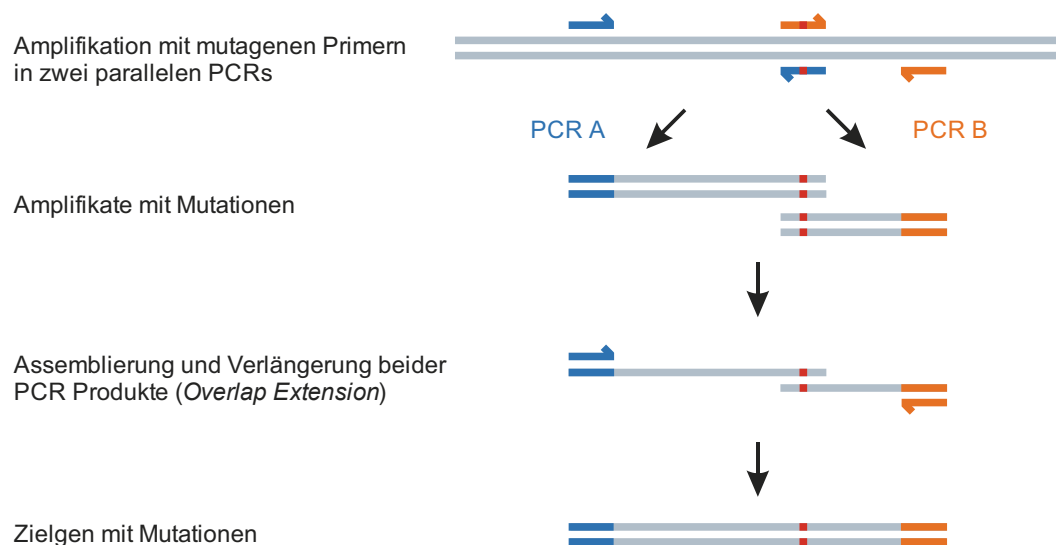


Abbildung 94. Overlap Extension PCR.

### 8.3.3 Isolierung von DNA

#### 8.3.3.1 Isolierung von Plasmid DNA

Die Isolierung von Plasmid DNA erfolgte mithilfe eines Fertigkits (innuPREP Plasmid Mini Kit, *Analytik Jena AG Life Science*, Jena, Deutschland). Von einer Übernachtskultur wurden 5–10 mL Kultur zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde den Herstellerangaben entsprechend behandelt und so die Plasmid DNA isoliert. Anders als im Protokoll des Herstellers vermerkt, wurde die Plasmid DNA jedoch mit sterilem dest. H<sub>2</sub>O eluiert.

#### 8.3.3.2 Isolierung genomischer DNA

##### 8.3.3.2.1 Isolierung genomischer DNA aus *Streptomycetaceae*

Die Isolierung von genomischer DNA aus *Streptomycetaceae* erfolgte nach einem Protokoll von Kumar *et al.*<sup>[273]</sup> Das Myzelium der *Streptomycetaceae* wurde dazu mit flüssigem Stickstoff tiefgefroren, mithilfe eines Mörsers zu einem feinen Pulver zerkleinert und in ein 2 mL Reaktionsgefäß überführt. Auf das fein zermahlene Myzel wurden 500 µL 1× TE-Puffer [10 mM TRIS-HCl, 1 mM Ethylendiamintetraacetat (EDTA), pH 8.0] sowie 20 mg/mL Lysozym gegeben und das Gemisch für 30 min bei 37°C inkubiert. Darauf folgend wurden 20 µL SDS-Lösung [10% (w/v)] und 20 µL Proteinase K zugegeben und für weitere 30 min bei 55°C inkubiert. Nach Abkühlen des Lysats wurden 500 µL einer Roti®-Phenol/Chloroform Lösung [1:1 (v/v)] hinzugegeben und mittels Vortexer gut durchmischt. Die Phasentrennung erfolgte durch Zentrifugation (9391 rcf, 5 min) und die wässrige Phase wurde nachfolgend in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Durch Zugabe von 500 µL eiskaltem Ethanol [90% (v/v)] wurde die DNA präzipitiert und nach Lagerung für 30 min bei -20°C pelletiert. Die Pelletierung der DNA erfolgte durch Zentrifugation (9391 rcf, 10 min). Der Überstand wurde verworfen, das Pellet zweimal mit 500 µL eiskaltem Ethanol [90% (v/v)] gewaschen und schließlich in 500 µL TE-Puffer resuspendiert. Zu dieser Lösung wurden 20 µL RNase A Lösung zugefügt und für 1 h bei 37°C inkubiert. Im Anschluss erfolgte eine zweite Extraktion und Präzipitation der DNA, so wie vorangehend beschrieben. Das schließlich erhaltene DNA-Pellet wurde in 50 µL dest. H<sub>2</sub>O

aufgenommen und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die Reinheit der DNA wurde mittels Agaraose Gelelektrophorese (8.3.5) überprüft.

### 8.3.3.2 Isolierung genomischer DNA aus *Pseudoalteromonadaceae*

Die genomische DNA aus *Pseudoalteromonadaceae* wurde mithilfe des DNeasy Plant Mini Kits (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) extrahiert. Dazu wurden 100 mg Zellpellet in ein 1.5 mL Reaktionsgefäß überführt und die DNA Extraktion nach Herstellerangaben [ab Schritt 7 (entspricht Schritt 1 der Kurzanleitung)] durchgeführt. Nach Elution mit dest.  $\text{H}_2\text{O}$  wurde die genomische DNA bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die Reinheit der DNA wurde mittels Agaraose Gelelektrophorese (8.3.5) überprüft.

### 8.3.4 Restriktionsverdau und Ligation

Der Restriktionsverdau zur Linearisierung von Vektoren für den anschließenden Gebrauch in *Gibson Assembly* Ansätzen oder zur klassischen Klonierung wurde mit Restriktionsendonukleasen gemäß Herstellerangaben und Empfehlungen des *DoubleDigest Calculators* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) durchgeführt. Nach Umstellung auf *FastDigest* Restriktionsenzyme, ebenfalls von Thermo Fisher (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), wurden Restriktionsansätze mit vorgenannten Enzymen durchgeführt. Auch hier wurde der Restriktionsverdau den Herstellerangaben entsprechend durchgeführt.

Eine anschließende Ligation wurde mit T4-DNA Ligase durchgeführt. Sowohl der geschnittene Vektor nach dem Restriktionsverdau, als auch das PCR-Amplifikat wurden vor Einsatz in der Ligation mittels Agarosegelelektrophorese und anschließender Gelelution gereinigt (8.3.5 und 8.3.6). Der Ligationsansatz wurde entsprechend Tabelle 25 angesetzt und für 16 h bei  $16^{\circ}\text{C}$  durchgeführt. Im Anschluss wurde der Ansatz für die Transformation genutzt (8.4.3).

**Tabelle 25.** Komponenten und Zusammensetzung des Ligationsansatzes.

| Bestandteil                       | Menge             |
|-----------------------------------|-------------------|
| T4 DNA Ligase Puffer (10×)        | 2 $\mu\text{L}$   |
| T4 DNA Ligase                     | 1 $\mu\text{L}$   |
| PCR-Amplifikat                    | (5× Menge Vektor) |
| geschnittener Vektor              | 25 ng             |
| dest. $\text{H}_2\text{O}$ Vektor | ad. 20            |

### 8.3.5 Agarosegelelektrophorese

Zur Analyse von PCR-Reaktionen, DNA-Restriktionen und zur Reinheitsbestimmung nach Plasmidisolierungen oder der Isolierung genomischer DNA wurde eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Hierfür wurden 0.8% (w/v) Agarose in 1× TAE-Puffer aufgeköcht, bis die Agarose vollständig gelöst war und anschließend mit 0.1% (v/v) Gel Red<sup>TM</sup> (Bioticum Inc., Hayward, CA, USA) versetzt. Zur Analyse sehr kleiner DNA-Fragmente wurde eine Agaroselösung mit 2% (w/v) Agarose angesetzt. Der Farbstoff Gel Red<sup>TM</sup> interkaliert mit der DNA und ermöglicht so die Visualisierung der DNA unter UV-Licht. Die Lagerung der fertigen Lösung erfolgte bei  $60^{\circ}\text{C}$ . Nach Gießen des Agarosegels fand die Polymerisation bei Raumtemperatur für etwa 30 min statt. Das polymerisierte Agarosegel

wurde in eine mit 1×TAE-Puffer befüllte Gelkammer gelegt. Die DNA-Proben wurden mit DNA-Probenpuffer versetzt und anschließend in die Probentaschen des Agarosegels pipettiert. Als Größenstandard wurden 1.5 µL des 1 kb DNA Ladders (*Thermo Scientific*, Waltham, MA, USA) eingesetzt oder in einzelnen Fällen der *Quick-Load*® 100 bp DNA Ladder (*New England BioLabs GmbH* (Frankfurt am Main, Deutschland)). Die Gelelektrophorese wurde bei 180 V für 26 min durchgeführt und die Gele im Anschluss dokumentiert (*INTAS Science Imaging Instruments GmbH*, Göttingen, Deutschland).

**Tabelle 26.** Lösungen für die Agarosegelelektrophorese.

| Lösung              | Komponente                             |
|---------------------|----------------------------------------|
| 50x TAE-Puffer      | 2.0 M TRIS                             |
|                     | 50 mM EDTA (Stocklösung: 0.50 M, pH 8) |
|                     | 0.90 M Essigsäure                      |
| 5x DNA-Probenpuffer | 0.10 M EDTA                            |
|                     | 43 % (v/v) Glycerin                    |
|                     | 0.05 % (w/v) Bromophenolblau           |
| Agarosegel          | 1x TAE-Puffer                          |
|                     | 0.8 % (w/v) Agarose [oder 2 % (w/v)]   |
|                     | 0.1 ‰ (v/v) Gel Red™                   |

### 8.3.6 Gelelution aus dem Agarosegel

Es wurde eine Gelelution aus dem Agarosegel durchgeführt, wenn DNA-Amplifikate für nachfolgende Assemblierungsreaktionen ohne aus der PCR resultierende Nebenprodukte benötigt wurden oder falls Plasmid-DNA nach der Restriktion isoliert werden sollte, um eine Religation zu vermeiden. Die entsprechenden Banden der gewünschten DNA-Fragmente wurden hierzu mithilfe eines Skalpell aus dem Agarosegel nach der Agarosegelelektrophorese ausgeschnitten und in ein 2 mL Reaktionsgefäß überführt. Die Extraktion der DNA aus dem Gel erfolgte mittels des *innuPREP DOUBLEpure Kit* (*AnalytikJena AG*, Jena, Deutschland). Abweichend von den Herstellerangaben wurde die DNA jedoch mit sterilem dest. H<sub>2</sub>O eluiert.

### 8.3.7 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration von DNA-Proben wurde photometrisch durch Messung der Absorption bei  $\lambda = 260$  nm mithilfe des *NanoDrop2000* (*Thermo Fisher Scientific*, Waltham, MA, USA) bestimmt. Zur Konzentrationsbestimmung wurden 2 µL der Probe aufgetragen und als Leerprobe 2 µL dest. H<sub>2</sub>O genutzt. Ebenfalls wurde die Absorption bei  $\lambda = 280$  nm gemessen. Der Quotient aus A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> diente als Indikation für die Reinheit der DNA.

### 8.3.8 Gibson Assembly®

Der *Gibson Assembly*® wurde für die Insertion von Genen in einen linearisierten Vektor verwendet. Diese Methode wurde von *Gibson et al.* in Zusammenarbeit mit dem *J. Craig Venter* Institut entwickelt.<sup>[405]</sup> Im Vergleich zur klassischen Klonierungsstrategie benötigt der *Gibson Assembly*® keine

kompatiblen Restriktionsschnittstellen und bietet dennoch die Möglichkeit der zielgerichteten Insertion von einem oder mehreren DNA-Fragmenten in einen Zielvektor. Die Assemblierungsmethode ermöglicht es ein zuvor speziell amplifiziertes Zielgen in einer isothermalen Reaktion in einen linearisierten Zielvektor einzubringen. Der Einsatz von *Gibson* Primern kreiert dabei während der PCR-Amplifikation überlappende doppelsträngige DNA-Fragmente. In der darauffolgenden isothermalen Reaktion wird Gebrauch von drei verschiedenen Enzymen gemacht. Eine T5-Exonuklease generiert durch teilweisen Verdau des 5'-Endes des DNA-Strangs *sticky ends*. Durch diese Überhänge können sich homologe Bereiche anlagern. Die entstandenen Lücken werden durch eine Polymerase aufgefüllt und *nicks* im DNA-Rückgrat durch eine Ligase geschlossen.

**Tabelle 27.** Zusammensetzung von *Gibson Assembly*® Mastermix und Zusammensetzung des 5x ISO-Puffers.

| <b><i>Gibson Assembly</i>® Mastermix</b>              |              | <b>5x ISO-Puffer</b>             |              |
|-------------------------------------------------------|--------------|----------------------------------|--------------|
| <b>Komponente</b>                                     | <b>Menge</b> | <b>Komponente</b>                | <b>Menge</b> |
| ISO-Puffer (5x)                                       | 60 µL        | Tris-HCl (1 M, pH 7.5)           | 500 µL       |
| T5-Exonuklease (100 U/mL)                             | 24 µL        | MgCl <sub>2</sub> (2 M)          | 25 µL        |
| <i>Phusion Hot Start II</i> DNA-Polymerase (0.4 U/µL) | 18 µL        | dGTP (100 mM)                    | 10 µL        |
| <i>Taq</i> DNA-Ligase (8000 U/mL)                     | 39 µL        | dCTP (100 mM)                    | 10 µL        |
| dest. H <sub>2</sub> O                                | 309 µL       | dATP (100 mM)                    | 10 µL        |
|                                                       |              | dTTP (100 mM)                    | 10 µL        |
|                                                       |              | 1,4-Dithio-D-threitol (DTT, 1 M) | 50 µL        |
|                                                       |              | Polyethylenglykol (PEG)-8000     | 0.25 g       |
|                                                       |              | NAD <sup>+</sup> (100 mM)        | 50 µL        |

### 8.3.9 DNA-Sequenzierung

Alle *inserts* in den erstellten Plasmiden wurden zur Verifizierung sequenziert. Die Sequenzierungen der isolierten Plasmide wurden von der Firma *GATC Biotech AG* (Konstanz, Deutschland; heute Teil von *Eurofins Scientific*, Luxemburg, Luxemburg) nach der Methode der Didesoxysequenzierung nach *Sanger* durchgeführt.<sup>[406]</sup>

## 8.4 Mikrobiologische Methoden

### 8.4.1 Anzucht und Lagerung von Mikroorganismen

#### 8.4.1.1 Medien und Medienzusätze

Komplexmedien wurden vor Verwendung autoklaviert, während Minimalmedien bzw. deren Bestandteile vor Gebrauch sterilfiltriert wurden. Im Falle der Minimalmedien wurden die jeweiligen Stammlösungen erst kurz vor Nutzung der Medien mit sterilem dest. H<sub>2</sub>O auf die Zielkonzentration verdünnt. Auch die Zugabe von Antibiotika oder anderen Medienzusätzen zu Komplex- oder Minimalmedien erfolgte erst kurz vor Inokulation der Medien. Für den Gebrauch der Medien als Nährbodenplatten, wurde vor dem Autoklavieren 1.5 % (w/v) Agar-Agar zugesetzt.

### 8.4.1.1.1 Komplexmedien

Zur Anzucht von Mikroorganismen wurden die folgenden Komplexmedien verwendet (Tabelle 28).

**Tabelle 28.** Komplexmedien und deren Zusammensetzung für die Anzucht von Mikroorganismen.

| Medium                                                                   | Bestandteil                      | Menge     | Verwendung                                                                                          |
|--------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|-----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>TB-Medium<sup>[a]</sup></b>                                           | Casein (enzym. verdaut)          | 12.0 g/L  | Anzucht von <i>E. coli</i> und <i>P. putida</i> Stämmen                                             |
|                                                                          | Hefeextrakt                      | 24.0 g/L  |                                                                                                     |
|                                                                          | K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>  | 12.5 g/L  |                                                                                                     |
|                                                                          | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>  | 2.31 g/L  |                                                                                                     |
|                                                                          | Glycerin                         | 4.00 mL/L |                                                                                                     |
| <b>LB-Medium</b>                                                         | Trypton                          | 10.0 g/L  | Anzucht von <i>E. coli</i> , <i>P. putida</i> , <i>B. subtilis</i> und <i>C. glutamicum</i> Stämmen |
|                                                                          | Hefeextrakt                      | 5.00 g/L  |                                                                                                     |
|                                                                          | NaCl                             | 10.0 g/L  |                                                                                                     |
| <b>SOB (engl. super optimal broth)-Medium</b>                            | Trypton                          | 20.0 g/L  | Anzucht von <i>P. putida</i> für die Herstellung elektrokompetenter Zellen                          |
|                                                                          | Hefeextrakt                      | 5.0 g/L   |                                                                                                     |
|                                                                          | NaCl                             | 0.60 g/L  |                                                                                                     |
|                                                                          | KCl                              | 0.20 g/L  |                                                                                                     |
|                                                                          | MgCl <sub>2</sub>                | 0.95 g/L  |                                                                                                     |
|                                                                          | MgSO <sub>4</sub>                | 1.21 g/L  |                                                                                                     |
| <b>SOC (engl. super optimal broth with catabolite repression)-Medium</b> | Trypton                          | 20.0 g/L  | Anzucht von <i>P. putida</i> nach Elektroporation                                                   |
|                                                                          | Hefeextrakt                      | 5.00 g/L  |                                                                                                     |
|                                                                          | NaCl                             | 0.60 g/L  |                                                                                                     |
|                                                                          | KCl                              | 0.200 g/L |                                                                                                     |
|                                                                          | MgCl <sub>2</sub>                | 0.950 g/L |                                                                                                     |
|                                                                          | MgSO <sub>4</sub>                | 1.21 g/L  |                                                                                                     |
|                                                                          | Glucose                          | 3.60 g/L  |                                                                                                     |
| <b>YEPD-Medium</b>                                                       | Glucose                          | 20.0 g/L  | Anzucht von Hefen                                                                                   |
|                                                                          | Hefeextrakt                      | 10.0 g/L  |                                                                                                     |
|                                                                          | Pepton                           | 20.0 g/L  |                                                                                                     |
| <b>Marine-Bouillon*</b>                                                  | NaCl                             | 19.4 g/L  | Anzucht von <i>Pseudoalteromonadaceae</i>                                                           |
|                                                                          | MgCl                             | 8.80 g/L  |                                                                                                     |
|                                                                          | Pepton                           | 5.00 g/L  |                                                                                                     |
|                                                                          | Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>  | 3.24 g/L  |                                                                                                     |
|                                                                          | CaCl                             | 1.80 g/L  |                                                                                                     |
|                                                                          | Hefeextrakt                      | 1.00 g/L  |                                                                                                     |
|                                                                          | KCl                              | 550 mg/L  |                                                                                                     |
|                                                                          | NaHCO <sub>3</sub>               | 160 mg/L  |                                                                                                     |
|                                                                          | Eisencitrat                      | 100 mg/L  |                                                                                                     |
|                                                                          | KBr                              | 80.0 mg/L |                                                                                                     |
|                                                                          | SrCl <sub>2</sub>                | 34.0 mg/L |                                                                                                     |
|                                                                          | H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>   | 22.0 mg/L |                                                                                                     |
|                                                                          | Natriumsilikat                   | 4.00 mg/L |                                                                                                     |
|                                                                          | NaF                              | 2.40 mg/L |                                                                                                     |
|                                                                          | NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>  | 1.60 mg/L |                                                                                                     |
|                                                                          | Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | 8.00 mg/L |                                                                                                     |
| <b>M65-Medium</b>                                                        | Glucose                          | 4.00 g/L  | Anzucht von <i>Streptomycetaceae</i>                                                                |
|                                                                          | Hefeextrakt                      | 4.00 g/L  |                                                                                                     |
|                                                                          | Malzextrakt                      | 10.0 g/L  |                                                                                                     |
|                                                                          | CaCO <sub>3</sub> <sup>[b]</sup> | 20.0 g/L  |                                                                                                     |
| <b>Glycerin-Medium</b>                                                   | Glycerin                         | 30.0 mL/L | Anzucht von <i>Streptomycetaceae</i>                                                                |
|                                                                          | Pepton aus Soja                  | 2.50 g/L  |                                                                                                     |
|                                                                          | NaCl                             | 1.00 g/L  |                                                                                                     |
|                                                                          | Fleischextrakt                   | 1.50 g/L  |                                                                                                     |

<sup>[a]</sup> Es handelt sich um kommerziell erhältliches, vorgemischtes Medium von *Carl Roth*, Karlsruhe, Germany.

<sup>[b]</sup> Bei Verwendung als Flüssigmedium erfolgte keine Zugabe von CaCO<sub>3</sub>.

### 8.4.1.1.2 Minimalmedien

Zur Anzucht des Stammes *P. putida* pig-r2 wurden verschiedene Minimalmedien verwendet. Zur Herstellung dieser Minimalmedien wurden zunächst die entsprechenden Stammlösungen hergestellt (Tabelle 29) und sterilfiltriert. Sofern nötig wurden die Stammlösungen vor Gebrauch entsprechend mit sterilem dest. H<sub>2</sub>O verdünnt.

**Tabelle 29.** Stammlösungen für Minimalmedien für die Anzucht des Stammes *P. putida* pig-r2.

| Minimalmedium                                             | Stammlösung                                            | Bestandteil                                           | Konzentration<br>in<br>Stammlösung |
|-----------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|------------------------------------|
| <b>Delft-Medium</b> <sup>[312]</sup>                      | <b>100× Puffer</b>                                     | K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>                       | 388 g/L                            |
|                                                           |                                                        | NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                      | 163 g/L                            |
|                                                           | <b>100× (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b> | (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>       | 200 g/L                            |
|                                                           | <b>100× minimal salts</b>                              | Na <sub>2</sub> EDTA · 2 H <sub>2</sub> O             | 1.00 g/L                           |
|                                                           |                                                        | MgCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O                | 10.0 g/L                           |
|                                                           |                                                        | FeSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O                | 500 mg/L                           |
|                                                           |                                                        | ZnSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O                | 200 mg/L                           |
|                                                           |                                                        | CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O                | 100 mg/L                           |
|                                                           |                                                        | MnCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O                | 100 mg/L                           |
|                                                           |                                                        | Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O | 20.0 mg/L                          |
|                                                           |                                                        | CuSO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O                | 20.0 mg/L                          |
|                                                           |                                                        | CoSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O                | 47.0 mg/L                          |
| <b>M9-Medium</b>                                          | <b>1× M9 Salze, adaptiert nach</b> <sup>[311]</sup>    | Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O | 8.50 g/L                           |
|                                                           |                                                        | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                       | 3.00 g/L                           |
|                                                           |                                                        | NaCl                                                  | 0.500 g/L                          |
|                                                           |                                                        | NH <sub>4</sub> Cl                                    | 1.00 g/L                           |
|                                                           | <b>500× MgSO<sub>4</sub> Lösung</b>                    | MgSO <sub>4</sub>                                     | 120 g/L                            |
|                                                           | <b>1000× US* trace elements</b> <sup>[407]</sup>       | 37%ige HCl                                            | 82.8 mL/L                          |
|                                                           |                                                        | FeSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O                | 4.87 g/L                           |
|                                                           |                                                        | CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O                | 4.12 g/L                           |
|                                                           |                                                        | ZnSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O                | 1.87 g/L                           |
|                                                           |                                                        | MnCl <sub>2</sub> · 4 H <sub>2</sub> O                | 1.50 g/L                           |
|                                                           |                                                        | Na <sub>2</sub> EDTA · 2 H <sub>2</sub> O             | 0.840 g/L                          |
|                                                           |                                                        | H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>                        | 0.300 g/L                          |
|                                                           |                                                        | Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O | 0.250 g/L                          |
|                                                           |                                                        | CuCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O                | 0.150 g/L                          |
| <b>M63-Medium</b>                                         | <b>5× M63 Salze</b> <sup>[313]</sup>                   | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                       | 68.0 g/L                           |
|                                                           |                                                        | (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>       | 10.0 g/L                           |
|                                                           | <b>1000× MgSO<sub>4</sub> Lösung</b>                   | MgSO <sub>4</sub>                                     | 120 g/L                            |
|                                                           | <b>1000× US* trace elements</b> <sup>[407]</sup>       | s.o.                                                  | s.o.                               |
| <b>Wilms-MOPS-Medium, adaptiert nach</b> <sup>[314]</sup> | <b>2.5× MOPS</b>                                       | MOPS                                                  | 105 g/L                            |
|                                                           | <b>50× P-Stock</b>                                     | K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>                       | 150 g/L                            |
|                                                           |                                                        | (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>       | 250 g/L                            |
|                                                           | <b>50× N-Stock</b>                                     | NH <sub>4</sub> Cl                                    | 25.0 g/L                           |
|                                                           |                                                        | Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>                       | 100 g/L                            |
|                                                           | <b>50× Na-Stock</b>                                    | Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>                       | 100 g/L                            |
|                                                           | <b>50× Mg-Stock</b>                                    | MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O                | 50.0 g/L                           |
|                                                           | <b>1000× Spurenelemente</b>                            | FeCl <sub>3</sub> · 6 H <sub>2</sub> O                | 41.8 g/L                           |
|                                                           |                                                        | Titriplex III                                         | 33.4 g/L                           |
|                                                           |                                                        | CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O                | 1.98 g/L                           |
|                                                           |                                                        | CoSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O                | 0.640 g/L                          |
|                                                           |                                                        | ZnSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O                | 0.540 g/L                          |
|                                                           |                                                        | CuSO <sub>4</sub>                                     | 0.310 g/L                          |
|                                                           |                                                        | MnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O                  | 0.300 g/L                          |



Als Kohlenstoffquelle wurde in allen Fällen Glucose in variierenden Konzentrationen genutzt. Dazu wurde eine Stammlösung mit 500 g/L Glucose angesetzt und auf Endkonzentrationen von 2.5 g/L–20 g/L Glucose verdünnt. Dies entspricht 0.25–2.0% (w/v) Glucose<sup>41</sup>. Die nachstehend beschriebenen besonderen Herstellungshinweise wurden zusätzlich berücksichtigt.

**Delft-Medium:** Bei der Herstellung der 100× Salzlösung wurde EDTA zuerst vollständig gelöst, bevor alle anderen Komponenten zugefügt wurden. So wurde zu 1 g EDTA 25 mL dest. H<sub>2</sub>O gegeben und anschließend so lange 10 M NaOH zugetropft, bis das EDTA vollständig gelöst war. Diese Lösung wurde zum restlichen benötigten Wasser gegeben und der pH-Wert mittels konzentrierter HCl auf pH 4 eingestellt. Abweichend zu *Hartmans et al.* wurden in der 100× Minimalsalzlösung CoSO<sub>4</sub> statt CoCl<sub>2</sub> eingesetzt.<sup>[312]</sup>

**M9-Medium**<sup>42</sup>: Abweichend von *Sambrook et al.* wurden lediglich 8.50 g/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2 H<sub>2</sub>O statt 12.8 g/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7 H<sub>2</sub>O eingesetzt.<sup>[311]</sup>

**M63-Medium:** Die 5× M63 Salze wurden eingewogen, in dest. H<sub>2</sub>O gelöst und anschließend der pH-Wert mit 5 M KOH auf pH 7 eingestellt. Abweichend zur *Elbing et al.* wurde auf den Zusatz von 2.5 g/L FeSO<sub>4</sub>·7 H<sub>2</sub>O verzichtet.<sup>[313]</sup> Zusätzlich wurde dem M63-Medium die gleiche Spurenelementlösung zugesetzt, wie auch im M9-Medium.

**Wilms-MOPS-Medium:** Abweichend zu *Scheidle et al.* wurden in der 1000× Spurenelementlösung CoSO<sub>4</sub> statt CoCl<sub>2</sub> eingesetzt.<sup>[314]</sup>

#### 8.4.1.1.3 Antibiotika und andere Stammlösungen für die Kultivierung von Mikroorganismen

In Tabelle 30 sind die verwendeten Antibiotikallösungen sowie andere benötigte Stammlösungen aufgeführt.

**Tabelle 30.** Antibiotika und andere Stammlösungen.

| Stammlösung                      | Konzentration | Lösungsmittel                               |
|----------------------------------|---------------|---------------------------------------------|
| Ampicillin (Amp, 1000x)          | 100 mg/mL     | dest. H <sub>2</sub> O                      |
| Chloramphenicol (Cm, 1000x)      | 34.0 mg/mL    | EtOH                                        |
| Kanamycin (Kan, 1000x)           | 50.0 mg/mL    | dest. H <sub>2</sub> O                      |
| Streptomycin (Sm, 1000x)         | 80.0 mg/mL    | dest. H <sub>2</sub> O                      |
| Tetracyclin (Tet, 1000x)         | 10.0 mg/mL    | dest. H <sub>2</sub> O/Ethanol (p.a.) (1:2) |
| IPTG (1000x)                     | 1.00 M        | dest. H <sub>2</sub> O                      |
| Ammonium Eisen-III-citrat (200x) | 100 mM        | dest. H <sub>2</sub> O                      |
| L-Cystein (200x)                 | 200 mM        | dest. H <sub>2</sub> O                      |
| Eisen-II-sulfat-7-hydrat (200x)  | 100 mM        | dest. H <sub>2</sub> O                      |

<sup>41</sup> In den Rohdaten und Laborbüchern wurde die Glucosemenge nahezu ausschließlich in % (w/v) angegeben.

<sup>42</sup> Es finden sich verschiedene Medienrezepte für M9 Medium, die in der Menge an Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> variieren. Hier wurde Bezug genommen auf das Rezept von *Sambrook et al.*<sup>[311]</sup>

## 8.4.1.2 Kultivierungsbedingungen

### 8.4.1.2.1 Allgemeine Kultivierungsbedingungen für Mikroorganismen

Der nachstehenden Tabelle können die für die verschiedenen Mikroorganismen genutzten Medien entnommen werden und ebenfalls die verwendeten Anzuchttemperaturen (Tabelle 31).

**Tabelle 31.** Übersicht über Medien und Anzuchttemperaturen für verwendete Mikroorganismen.

| Mikroorganismus           | Medium (vgl. 8.4.1.1) | Anzuchttemperatur |
|---------------------------|-----------------------|-------------------|
| <i>B. subtilis</i>        | LB                    | 37 °C             |
| <i>C. glutamicum</i>      | LB                    | 28 °C             |
| <i>E. coli</i>            | LB, TB, SOB, SOC      | 37 °C             |
| <i>P. pastoris</i>        | YEPD                  | 30 °C             |
| <i>P. citrea</i>          | Marine Boullion       | 25 °C             |
| <i>P. putida</i>          | LB, TB, Minimalmedien | 30 °C             |
| <i>P. tunicata</i> D2     | Marine Boullion       | 25 °C             |
| <i>S. cerevisiae</i>      | YEPD                  | 30 °C             |
| <i>S. longispororuber</i> | M65, Glycerin-Medium  | 28 °C             |

### 8.4.1.2.2 Übernachtskulturen

Übernachtskulturen wurden als Vorkulturen für Expressionskulturen (8.4.1.2.3) angelegt, oder für eine nachfolgende DNA-Isolierung (8.3.3). Zur Herstellung von Übernachtskulturen wurden 5 mL Medium (8.4.1.2.1) mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt, in ein Reagenzglas mit Deckel gegeben und über Nacht in einem Schüttler inkubiert. Die Temperatur wurde dabei den anzuziehenden Mikroorganismen entsprechend angepasst (Tabelle 31). Bei Nutzung der Übernachtskultur für Plasmidisolierungen, stellte sich die Nutzung einer 10 mL Vorkultur mit TB-Medium und entsprechendem Antibiotikum in einem 100 mL Erlenmeyerkolben als vorteilhaft für eine höhere Plasmidausbeute heraus.

### 8.4.1.2.3 Heterologe Expression in *E. coli*

#### Heterologe Expression der Kondensationsenzyme [pET28a(+)-Konstrukte] und allgemeine Beschreibung der heterologen Expression in *E. coli*

Für die heterologe Expression von Genen [u. a. Kondensationsenzyme; pET28a(+)-Konstrukte] in *E. coli* wurden 500 mL TB-Medium in einen 3 L Fernbachkolben mit Schikanen gegeben, mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt und mit einer Übernachtskultur auf eine  $OD_{600} = 0.05$  inokuliert. Die Kulturen wurden bei 37 °C und 120 rpm (2.5 cm Schütteldurchmesser) bis zu einer optischen Dichte von  $OD_{600} \approx 0.4\text{--}0.6$  inkubiert. Die Induktion der Genexpression erfolgte durch Zugabe von 0.1 mM IPTG. Anschließend wurde die Inkubationstemperatur auf 25 °C gesenkt, im Falle von pET28a(+):marH\_synth und pET28a(+):mcpH\_synth auf 18 °C, und die Kulturen über Nacht bei 120 rpm (2.5 cm Schütteldurchmesser) weiter inkubiert. Die Zellernte erfolgte durch Zentrifugation für 20 min bei 7 100 rcf und 4 °C. Das erhaltene Zellpellet wurde entweder direkt verwendet oder bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

### Heterologe Expression der Kondensationsenzyme [pET32a(+)-Konstrukte]

Für die heterologe Expression von *tamQ* und *treaP* [pET32a(+)-Konstrukte] in *E. coli* wurden 1 L TB-Medium in einen 3 L Fernbachkolben mit Schikanen gegeben, mit Ampicillin versetzt und mit einer Übernachtskultur auf eine  $OD_{600} = 0.05$  inokuliert. Zusätzlich wurden 1% (v/v) Glucose zum Medium gegeben. Die Kulturen wurden bei 37°C und 120 rpm (2.5 cm Schütteldurchmesser) bis zu einer optischen Dichte von  $OD_{600} \approx 0.4$ –0.6 inkubiert. Die Induktion der Genexpression erfolgte durch Zugabe von 0.5 mM IPTG. Anschließend wurde die Inkubationstemperatur auf 15°C gesenkt und die Kulturen über Nacht bei 120 rpm (2.5 cm Schütteldurchmesser) weiter inkubiert.<sup>[176, 408]</sup> Die Zellernte erfolgte durch Zentrifugation für 20 min bei 7 100 rcf und 4°C. Das erhaltene Zellpellet wurde entweder direkt verwendet oder bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

### Heterologe Expression der Kondensationsenzyme [pET28a(+)-Konstrukte] und Coexpression von Chaperonen

Für die heterologe Expression von Kondensationsenzymen [pET28a(+)-Konstrukte] unter gleichzeitiger Coexpression von Chaperonen in *E. coli* wurde das *Chaperone Plasmid Set* von *TaKaRa Bio Inc.* (Kusatsu, Präfektur Shiga, Japan) genutzt. Chemisch kompetente *E. coli* BL21(DE3) Zellen mit den Plasmiden pG-KJE8, pGRo7, pG-Tf2 und pTf16 wurden nach erfolgter Transformation mit den entsprechenden pET28a(+)-Konstrukten in 500 mL TB-Medium in einen 3 L Fernbachkolben mit Schikanen gegeben, mit Kanamycin und Chloramphenicol als Antibiotika versetzt und mit einer Übernachtskultur auf eine  $OD_{600} = 0.05$  inokuliert. Die Kulturen wurden bei 37°C und 130 rpm (2.5 cm Schütteldurchmesser) bis zu einer optischen Dichte von  $OD_{600} \approx 0.4$ –0.6 inkubiert. Die Induktion der Genexpression erfolgte durch Zugabe von L-Arabinose und/oder Tetracyclin entsprechend den Herstellerangaben des *Chaperone Plasmid Set* von *TaKaRa Bio Inc.* (Kusatsu, Präfektur Shiga, Japan). Anschließend wurde die Inkubationstemperatur auf 20°C gesenkt und die Kulturen über Nacht bei 130 rpm (2.5 cm Schütteldurchmesser) weiter inkubiert. Die Zellernte erfolgte durch Zentrifugation für 20 min bei 7 100 rcf und 4°C. Das erhaltene Zellpellet wurde entweder direkt verwendet oder bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

#### 8.4.1.3 Herstellung von Glycerinkulturen zur langfristigen Lagerung von Mikroorganismen

Für eine langfristige Lagerung von Mikroorganismen wurden Glycerinkulturen hergestellt, indem 900 µL einer Übernachtskultur mit 600 µL einer sterilen 50%igen Glycerinlösung (50% Glycerin in dest. H<sub>2</sub>O) versetzt wurden. Diese Glycerinkultur wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Im Falle von *Streptomycetaceae* wurden zusätzlich Glycerinkulturen der Sporen angelegt. Dafür wurde mehrfach über eine Agarplatte mit stark sporulierenden *Streptomycetaceae* steriles Wasser getropft und die Sporen mit einem Drigalskispatel leicht gelöst. Das Sporen enthaltende Wasser (800 µL) wurde dann mit der sterilen 50%igen Glycerinlösung (200 µL) versetzt und die Kultur wie oben beschrieben schockgefroren und bei -80°C gelagert.

## 8.4.2 Herstellung chemisch kompetenter Zellen

Zur Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* Zellen werden zunächst nachstehende Lösungen (Tabelle 32) hergestellt und sterilfiltriert.

**Tabelle 32.** Lösungen zur Herstellung chemisch kompetenter Zellen.

| Lösung | Bestandteil       | Konzentration |
|--------|-------------------|---------------|
| A      | MgCl <sub>2</sub> | 100 mM        |
| B      | CaCl <sub>2</sub> | 100 mM        |
|        | Glycerin          | 15% (w/v)     |

Für die Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* Zellen wurden 400 mL LB-Medium in einem 3 L Fernbachkolben mit Schikanen mit 2 mL einer Übernachtskultur des entsprechenden Stamms inokuliert. Sofern notwendig, wurden entsprechende Antibiotika als Selektionsmarker mit ins Medium gegeben. Die Kultur wurde bei 37°C und 120 rpm (2.5 cm Schütteldurchmesser) bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0.4–0.6 inkubiert. Die Zellen wurden anschließend geerntet (10 min, 1230 rcf, 4°C) und das Pellet vorsichtig in 10 mL auf Eis vorgekühlter Lösung A resuspendiert. Nach 20–30 min Inkubation auf Eis, wurden die Zellen erneut pelletiert (10 min, 1230 rcf, 4°C). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet vorsichtig in 2 mL auf Eis vorgekühlter Lösung B resuspendiert. Im Anschluss wurden die chemisch kompetenten Zellen in sterilen 1.5 mL Reaktionsgefäßen aliquotiert (50 µL) und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bis zur Nutzung bei -80°C.

Um die Qualität der hergestellten chemisch kompetenten Zellen zu gewährleisten, wurde zum einen ein Antibiotogramm gegenüber Ampicillin, Chloramphenicol, Kanamycin, Streptomycin und Tetracyclin erstellt. Dazu wurden Übernachtskulturen in LB-Medium angesetzt, die mit den entsprechenden Antibiotika versetzt wurden. Nicht vorhandenes Wachstum der chemisch kompetenten Zellen in diesen Übernachtskulturen bedeutete somit, dass keine Resistenzbildung stattgefunden hat und die Zellen verwendet werden können. Des Weiteren wurde eine Hitzeschocktransformation (8.4.3) durchgeführt, wobei zum einen der Vektor pET22a(+) verwendet wurde und zum anderen steriles dest. H<sub>2</sub>O als Negativkontrolle. Nach erfolgter Transformation wurden die Zellen auf LB<sub>Amp</sub>-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Durch Bestimmung der *colony forming units* (CFU) und unter Berücksichtigung der Konzentration der Plasmid DNA wurde die Transformationseffizienz berechnet. Die Negativkontrolle mit dest. H<sub>2</sub>O statt Plasmid DNA sollte keine Kolonien zeigen.

$$\text{Transformationseffizienz} = \frac{\text{CFU}}{\mu\text{g DNA ausplattiert}}$$

**Formel 2.** Berechnung der Transformationseffizienz.

## 8.4.3 Hitzeschocktransformation kompetenter Zellen

Die Transformation chemisch kompetenter Zellen erfolgte mittels Hitzeschock. Ein Aliquot der chemisch kompetenten Zellen wurde für 15 min auf Eis aufgetaut, mit 1 µL Plasmid-DNA bzw. 15 µL *Gibson Assembly* Reaktionsmix versetzt und anschließend 30 min auf Eis inkubiert. Im Falle von

*QuikChange* oder Ligationsansätzen wurden 10 µL Probe verwendet. Im Anschluss erfolgte der Hitzeschock durch Inkubation für 90 s bei 42 °C. Nach Zugabe von 700 µL LB-Medium wurde der Transformationsansatz für 1 h bei 37 °C zur phänischen Expression inkubiert. Die Zellen wurden durch kurze Zentrifugation (1 min, 2000 rcf, RT) sedimentiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde im verbleibenden Überstand resuspendiert und auf Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert.

## 8.5 Proteinbiochemische Methoden

### 8.5.1 Zellaufschluss

Das Zellpellet wurde im 5-fachen Volumen an KPi Puffer (50 mM, pH 7) oder Lysepuffer [50 mM 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES), 150 mM NaCl, 40 mM Imidazol, pH 7.5] resuspendiert und mittels SONOPULS Ultraschall Homogenisator (*Bandelin electronic GmbH & Co. KG*, Berlin, Deutschland; Sonotrode an Probenvolumen angepasst) aufgeschlossen. Der Lysepuffer wurde nur für die Expression von *pigC*, *tamQ* und *treaP* [pET32(a)+-Konstrukte] angewendet. Der Zellaufschluss erfolgte immer unter Eiskühlung und die Dauer des Zellaufschlusses wurde an das aufzuschließende Volumen angepasst. So wurden Volumina  $\geq 5$  mL für 2× 5 min (5× 10% Zyklus, 40% Leistung) lysiert, wobei das resuspendierte Pellet zwischen den beiden Ultraschallbehandlungen für 5 min auf Eis inkubiert wurde. Kleinere Volumina (<5 mL) wurden für 2× 3 min (5× 10% Zyklus 30% Leistung) aufgeschlossen mit dreiminütiger Inkubation auf Eis zwischen den beiden Zyklen.

### 8.5.2 SDS-PAGE

Proteinexpression oder Proteinreinigungen wurden mittels SDS-PAGE analysiert. Dazu wurden sowohl Glycin-SDS-PAGE und Tricin-SDS-PAGE Gele selbst hergestellt und genutzt, als auch kommerzielle Gele {NuPAGE™ 4–12% Bis-Tris [Bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methan]} Protein Gele; *Thermo Fischer*, Waltham, Massachusetts, USA] verwendet. Kommerzielle Gele wurden vorwiegend für Publikationen eingesetzt, während zunächst Glycin-SDS-PAGE und später Tricin-SDS-PAGE Gele routinemäßig genutzt wurden. Tricin-SDS-PAGE Gele bieten dabei den Vorteil einer höheren Auflösung im Bereich von 1–100 kDa.<sup>[409]</sup> Im Falle der Glycin-SDS-PAGE sowie der Tricin-SDS-PAGE wurde mithilfe des *Mini-Protean® Tetra Cell Casting Stand* (*Bio-Rad Laboratories GmbH*, München, Deutschland) zunächst das Trenngel gegossen und mit 2-Propanol überschichtet, um Luftblasen im Gel vorzubeugen und eine gerade Front zu erhalten. Nach Polymerisation des Trenngels wurde 2-Propanol entfernt, das Trenngel mit dem Sammelgel überschichtet und ein Probenkamm (10 oder 15 Taschen) eingesetzt. Die Proteinproben wurden – sofern nötig – mit dest. H<sub>2</sub>O in einem Volumen von 80 µL verdünnt, mit 20 µL 5× SDS-Ladepuffer versetzt und für 15 min bei 98 °C aufgeköcht. Die Gele wurden in die Elektrophoresekommer eingespant, mit dem entsprechenden Puffersystem versehen und die Proben in die Probentaschen pipettiert. Als Größenstandard wurde der Protein-Molekulargewichtsmarker Roti®-Mark 10–150 (*Carl Roth GmbH & Co KG*, Karlsruhe, Deutschland) verwendet. Bei der Glycin-SDS-PAGE wurde eine konstante Spannung von 180 V für 45–55 min angelegt und bei den NuPAGE™ 4–12% Bis-Tris Protein Gele eine konstante Spannung von 200 V für etwa 50 min, bis die Lauffront das untere

Ende des Gels erreicht hatte, wohingegen für die Tricin-SDS-PAGE folgendes Programm verwendet wurde: 30 V für 20 min; 60 V für 6 min; 190 V für 50 min. In allen Fällen wurden die Gele für 20 min in dest. H<sub>2</sub>O gewaschen, anschließend für 30 min in Fixierlösung inkubiert und erneut für 20 min gewaschen. Im Anschluss wurden die Gele in kolloidaler Coomassie G-250 Lösung über Nacht gefärbt und nach Entfernen der Färbelösung in dest. H<sub>2</sub>O entfärbt. Die Dokumentation der Gele erfolgte unter Verwendung eines Weißlicht Tisches (*Edvotek Inc.*, Washington, DC, USA) und einer digitalen EOS 1000D Spiegelreflexkamera mit einem EF-S 60 mm Objektiv (*Canon Deutschland GmbH*, Krefeld, Deutschland) mit folgenden Einstellungen: ISO 400, Belichtungszeit 1/250 s, Blende F/8.0.

**Tabelle 33.** Übersicht über alle für die SDS-PAGE benötigten Lösungen und deren Zusammensetzung.

| Lösung                                                 | Zusammensetzung                                                                                                                                                                                                                                 |
|--------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Glycin-SDS-PAGE</b>                                 |                                                                                                                                                                                                                                                 |
| Trenngel (12 %, 4 Gele)                                | 12 mL Trenngelpuffer (0.6 M Tris/HCl, pH 8.8, 0.16 % SDS), 7.9 mL Acrylamid/Bisacrylamid Lösung (30%, 37.5 : 1; <i>Carl Roth</i> ), 100 µL APS [Ammoniumperoxodisulfat; 10 % (w/v)], 100 µL <i>N,N,N',N'</i> -Tetra-methylethylendiamin (TEMED) |
| Sammelgel (4.5 %, 4 Gele)                              | 6.83 mL Sammelgelpuffer (0.13 M Tris/HCl, pH 6.8, 1.08 % SDS), 1.2 mL Acrylamid/Bisacrylamid Lösung (30%, 37.5 : 1; <i>Carl Roth</i> ), 100 µL APS [10 % (w/v)], 100 µL TEMED                                                                   |
| 1× SDS-Laufpuffer                                      | 25 mM TRIS, 192 mM Glycin, 0.1 % (w/v) SDS                                                                                                                                                                                                      |
| <b>Tricin-SDS-PAGE</b>                                 |                                                                                                                                                                                                                                                 |
| Trenngel                                               | 10 mL Acrylamid/Bisacrylamid Lösung (30%, 37.5 : 1; <i>Carl Roth</i> ), 10 mL Gelpuffer (3×), 70 mL dest. H <sub>2</sub> O., 3 g Glycerin, 150 µL APS [10 % (w/v)], 15 µL TEMED                                                                 |
| Sammelgel                                              | 1.6 mL Acrylamid/Bisacrylamid Lösung (30%, 37.5 : 1; <i>Carl Roth</i> ), 3 mL Gelpuffer (3×), 7.4 mL dest. H <sub>2</sub> O, 100 µL APS [10 % (w/v)], 10 µL TEMED                                                                               |
| 3× Gelpuffer                                           | 3 M TRIS, 1 M HCl, 0.3 % (w/v) SDS, pH 8.45                                                                                                                                                                                                     |
| 10× Anodenpuffer                                       | 1 M TRIS, 0.225 M HCl, pH 8.9                                                                                                                                                                                                                   |
| 10× Kathodenpuffer                                     | 1 M TRIS, 1 M Tricin, 1 % (w/v) SDS, pH 8.25                                                                                                                                                                                                    |
| <b>NuPAGE™ 4–12 % Bis-Tris Protein Gele</b>            |                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 20× MOPS-Puffer (NuPAGE™ 4–12 % Bis-Tris Protein Gele) | 50 mM MOPS, 50 mM TRIS, 0.1 % SDS, 1 mM EDTA, pH 7.7                                                                                                                                                                                            |
| <b>Generelle Lösungen</b>                              |                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 5× SDS-Ladepuffer                                      | 10 % (w/v) SDS, 30 % (w/v) Saccharose, 0.1 % (w/v) Bromphenolblau, 0.5 M Tris/HCl, pH 6.8, 50 mM DTT                                                                                                                                            |
| Kolloidale Coomassie G-250 Lösung                      | 2 % (w/v) H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> , 10 % (v/v) Ethanol, 5 % (w/v) Al <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> , 0.02 % (w/v) Coomassie Brilliant blue G-250                                                                          |

### 8.5.3 Isolierung der Membranfraktion

Die Membranfraktion wurde zum einen für kinetische Untersuchungen der Kondensationsenzyme isoliert (8.5.7) und zum anderen zur Proteinisolierung *via* Ablösung der Proteine von der Zellmembran

(8.5.4.1). Die Isolierung der Membranfraktion erfolgte nach heterologer Expression von *pigC*, *tamQ* und *treaP* in *E. coli* BL21(DE3) (8.4.1.2.3) und Zellaufschluss (8.5.1). Zur Entfernung von Zelltrümmern wurde das Lysat nach Zellaufschluss zentrifugiert (15 min, 18 500 rcf, 4 °C). Mittels Ultrazentrifugation (2 h, 107 000 g, 4 °C) wurde die Membranfraktion abgetrennt, der Überstand verworfen und die isolierte Membranfraktion als bräunliches Pellet erhalten. Alle Schritte wurden bei 4 °C durchgeführt und von jedem Schritt SDS-Proben genommen (8.5.2).

## 8.5.4 Proteinisolierung

### 8.5.4.1 Proteinisolierung *via* Ablösung von der Zellmembran

Bei den Kondensationsenzymen PigC und TamQ wurde eine Proteinisolierung durch Ablösung der Proteine mittels pH-*shift* und Hochsalzkonzentration von der Zellmembran durchgeführt. Dafür wurde nach Expression (8.4.1.2.3) die entsprechende Membranfraktion isoliert und alle weiteren Arbeitsschritte bei 4 °C durchgeführt. Nachdem die Membranfraktion durch Ultrazentrifugation des zellfreien Extrakts isoliert worden war (8.5.3), wurde das Membranfraktion enthaltende Pellet in verschiedenen Puffern und Salzlösungen resuspendiert (Tabelle 34).

**Tabelle 34.** Puffer und Lösungen zur Ablösung von Proteinen von der Zellmembran.

| Puffer/Lösung         | Bestandteile                           | pH-Wert |
|-----------------------|----------------------------------------|---------|
| Citratpuffer          | 100 mM Natriumcitrat                   | 4.0     |
|                       | 100 mM Zitronensäure                   |         |
| TRIS-HCl Puffer       | 100 mM TRIS-HCl                        | 8.5     |
|                       | 100 mM TRIS-HCl                        | 9.0     |
| Natriumcarbonatpuffer | 100 mM NaHCO <sub>3</sub>              | 9.5     |
|                       | 100 mM Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> | 10.0    |
|                       | 100 mM NaHCO <sub>3</sub>              |         |
|                       | 100 mM Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> | 10.5    |
|                       | 100 mM NaHCO <sub>3</sub>              |         |
|                       | 100 mM Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> |         |
| NaCl-Lösung           | 1.00 M NaCl                            | —       |
|                       | 1.50 M NaCl                            | —       |
| KCl-Lösung            | 1.00 M KCl                             | —       |
|                       | 1.50 M KCl                             | —       |

Zum Resuspendieren der Membranfraktion wurde jeweils 1 mL der Puffer und Lösungen verwendet und anschließend erneut ein Ultrazentrifugationsschritt durchgeführt (2 h, 107 000 g, 4 °C). Vom Überstand wurden im Anschluss SDS-Proben genommen, während die Membranfraktion vor Probennahme erneut in 1 mL KP<sub>i</sub> Puffer (50 mM, pH 7) resuspendiert wurde. Die Proben aller Fraktionen und Ansätze wurden mittels SDS-PAGE (8.5.2) analysiert.

### 8.5.4.2 Proteinisolierung *via* IMAC

Das Protein TamQ wurde einmalig mittels IMAC isoliert. Dafür wurde das Zielprotein unter Nutzung des Konstrukts pET32a(+):*tamQ* in *E. coli* BL21(DE3) exprimiert. Auf den Löslichkeitstag Thioredoxin folgt N-terminal ein His<sub>6</sub>-Tag, der für die Isolierung *via* IMAC genutzt wurde. Vom Zellpellet wurde 1 g in 5 mL Lysepuffer mittels Ultraschall aufgeschlossen (8.5.1). Das Lysat wurde zentrifugiert (20 min,



3554 rcf, 4°C) und der Überstand für die anschließende Proteinisolierung genutzt. Für die Proteinisolierung wurde eine 5 mL Nickel(II)-Nitrilotriessigsäure (Ni-NTA) Säule (*Superflow Cartridge*, Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) genutzt und mit 5 Säulenvolumina Lysepuffer äquilibriert. Die Säule wurde beladen indem das Lysat für 20 min mithilfe einer Peristaltikpumpe im Kreis über die Säule gepumpt wurde und so das Binden des Zielproteins an die Säulenmatrix *via* His<sub>6</sub>-Tag ermöglicht wurde. Die weiteren Schritte erfolgten unter Verwendung des ÄKTA™ Chromatographiesystems (ÄKTA™ Purifier, GE Healthcare, München, Deutschland) und unter Nutzung einer konstanten Flussrate von 5 mL/min. Die Säule wurde zunächst mit zwei Säulenvolumina Lysepuffer gewaschen, worauf ein 20-minütiger Gradient von 100% Lysepuffer hin zu 100% Elutionspuffer folgte. Im Anschluss wurde für 20 min mit 100% Elutionspuffer gespült. Um alle gebundenen Proteine von der Säule zu lösen, wurde final mit Waschpuffer gewaschen und die Säule im Anschluss mit 500 mM NaOH, dest. H<sub>2</sub>O und Ethanol [20% (v/v)] gereinigt und in Ethanol [20% (v/v)] bei 4°C gelagert. Während der Reinigung wurde die Absorption bei 280 nm verfolgt und so die Fraktionen identifiziert, die Proteine beinhalten. Die entsprechenden Fraktionen wurden vereinigt, entsalzt und aufkonzentriert. Der Erfolg der Isolierung wurde mittels SDS-PAGE (8.5.2) und Aktivitätsassay analysiert. Der Aktivitätsassay erfolgte in Anlehnung an die Versuche zur *Michaelis-Menten*-Kinetik (8.5.7), allerdings wurde als Monopyrrol nur MAP (**3a**) eingesetzt und dessen Konzentration nicht variiert, sondern konstant bei 1 mM (Endkonzentration) belassen. Die Absorption bei 535 nm wurde kontinuierlich verfolgt.

**Tabelle 35.** Für die Proteinisolierung via IMAC genutzte Puffer und deren Bestandteile.

| Puffer          | Bestandteile                               | pH-Wert |
|-----------------|--------------------------------------------|---------|
| Lysepuffer      | 50 mM HEPES, 150 mM NaCl, 40.0 mM Imidazol | 7.5     |
| Elutionspuffer  | 50 mM HEPES, 150 mM NaCl, 250 mM Imidazol  | 7.5     |
| Waschpuffer     | 50 mM HEPES, 150 mM NaCl, 1.00 M Imidazol  | 7.5     |
| Lagerungspuffer | 50 mM HEPES, 150 mM NaCl, 10.0 mM MgCl     | 7.0     |

#### 8.5.4.3 Entsalzen, Umpuffern und Aufkonzentrieren von Proteinlösungen

Nach der Isolierung des Zielproteins mittels IMAC, wurden die proteinhaltigen Fraktionen vereint und unter Nutzung von PD-10 *desalting columns* mit Sephadex G-25 (*GE Healthcare Europe* GmbH, Freiburg, Deutschland) entsalzt, so dass die hohen Imidazolkonzentrationen, die aus der Proteinisolierung resultieren, entfernt wurden. Gleichzeitig wurden die PD-10 *desalting columns* zur Umpufferung genutzt und so das Zielprotein in Lagerungspuffer (Tabelle 35) überführt. Die Säulen wurden zunächst mit drei Säulenvolumina Lagerungspuffer gewaschen, bevor 2.5 mL der proteinhaltigen Lösung aufgetragen wurden. Die Elution erfolgte mit 3.5 mL des Lagerungspuffers. Im Anschluss wurden die Säulen mit drei Säulenvolumina dest. H<sub>2</sub>O gewaschen und in Ethanol [20% (v/v)] bei 4°C gelagert.

Das Aufkonzentrieren der Proteinlösung erfolgte unter Nutzung von *Vivaspin*® 20 Zentrifugalkonzentratoren (*Sartorius* AG, Göttingen, Germany) mit einem *molecular weight cut-off* von 50 kDa. Die Proben wurden in die Zentrifugalkonzentratoren gegeben und zentrifugiert (3554 rcf, 4°C) bis das gewünschte Zielvolumen erreicht war.



### 8.5.5 Abschätzen der Proteinmenge in Membranfraktion *via* Densitometrie

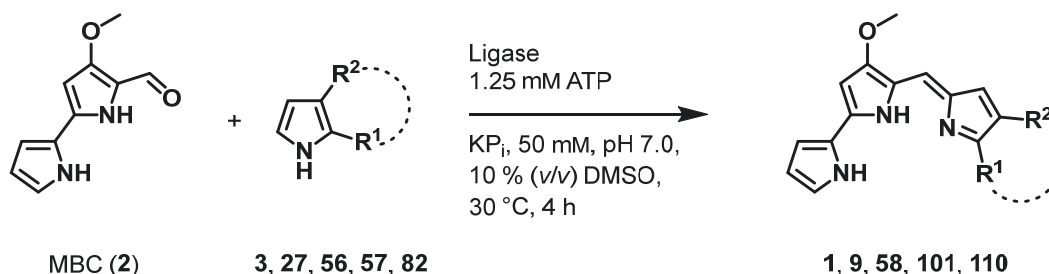
Für die Berechnung der spezifischen Aktivität bei *Michaelis-Menten*-Kinetiken wird die Konzentration des untersuchten Enzyms benötigt. Da dies für Proteine, die in der isolierten Membranfraktion enthalten und nicht gereinigt sind, nicht über Methoden wie den *Bradford*-Assay bestimmt werden kann, wurde die Proteinkonzentration densitometrisch abgeschätzt. Dies geschah mittels SDS-PAGE Analyse der Membranfraktion sowie Proteinstandards mit bekannter Konzentration.

Während der Isolierung der Membranfraktion (8.5.3) wurden SDS-Proben der Kondensationsenzym enthaltenden Membranfraktionen genommen und für eine SDS-PAGE vorbereitet. Als Standards wurde Lysozym (*Carl Roth*, Germany, Karlsruhe; 37.5 kDa) und ADH (Alkoholdehydrogenase) aus *S. cerevisiae* (*Sigma Aldrich*, St. Louis, MO, USA; 150 kDa) verwendet und SDS-Proben mit definierter Proteinmenge vorbereitet. Dafür wurden von diesen Proteinstandards Stammlösungen bekannter Konzentration (2 mg/mL in dest. H<sub>2</sub>O) angesetzt, entsprechend verdünnt (0.0625–1 mg/mL) und SDS-Proben vorbereitet (Endkonzentration in SDS Proben: 0.5–0.8 mg/mL). Von allen SDS-Proben – resuspendierte Membranfraktion und Proteinstandards – wurden 10 µL auf das Gel aufgetragen (*Invitrogen*<sup>™</sup>, Nu-PAGE<sup>™</sup> 4–12 % Bis-Tris Protein Gel, 1.0 mm, 15 Taschen).

Zur densitometrischen Datenauswertung wurde nach Durchführung der SDS-PAGE und fotografischer Dokumentation (8.5.2) ein Foto (Aufnahme im Rohdaten-Format) als 32 bit Graustufenbild [TIFF (engl. *Tagged Image File Format*)-Dateiformat] ausgegeben. Unter Verwendung der Software *ImageJ* wurde das Bild analysiert, indem zunächst Kontrast und Helligkeit der TIFF-Datei automatisch angepasst wurden.<sup>[295]</sup> Die Banden der Proteinstandards und der zu untersuchenden Proteine wurden im Hinblick auf das Integral ihres Graustufenwertes ausgewertet. Der Wert des Leervektorintegrals wurde entsprechend als Hintergrund von den Integralen der Proteinstandards subtrahiert. Anschließend wurden die sich so ergebenden Werte der Integrale gegen die Gesamtproteinmenge der Proteinstandards aufgetragen. Unter Anwendung linearer Regression (*Microsoft Excel* 2016, *Microsoft Corp.*) konnte so die Proteinmenge der Enzyme in der Membranfraktion bestimmt werden.

### 8.5.6 Kondensationsenzym *in vitro* Assay

Zur Überprüfung der Aktivität von Kondensationsenzymen und zur Bestimmung des Substratspektrums aktiver Kondensationsenzyme wurden *in vitro* Assays durchgeführt.<sup>[17]</sup> In diesen Assays wurde die enzymatische Kondensation von MBC (**2**) mit Monopyrrolen untersucht (Schema 35). Auch andere Heteroaromaten oder primäre Amine wurden unter Nutzung des Assays getestet.



**Schema 35.** Reaktionsschema des *in vitro* Assays für Kondensationsenzyme am Beispiel von Monopyrrolen.<sup>[17, 177, 247]</sup>

Für den *in vitro* Assay wurde Zelllysate, zellfreier Überstand oder resuspendierte Membranfraktion verwendet, ATP (1.25 mM), MBC (**2**, 1 mM) und Pyrrole (**3**, **27**, **56**, **57**, **82**; 1 mM), andere Heteroaromaten (**4**, **102**, **104–106**; 1 mM) und primäre Amine (**28**; 1 mM) (Tabelle 36). Die drei letztgenannten werden nachfolgend als Substrate bezeichnet. Durchgeführt wurde der *in vitro* Assay in 1.5 mL Reaktionsgefäßen und die Reaktionsprodukte wurden im Anschluss *via* LC-MS Messungen nachgewiesen. Der *in vitro* Assay wurde auch mit Leervektorproben als Negativkontrolle durchgeführt. Sollten die Reaktionsprodukte des *in vitro* Assays durch photometrische Messungen und unter Nutzung der molaren Extinktionskoeffizienten der Prodiginine quantifiziert werden (8.6.7), wurde der Assay in Triplikaten durchgeführt. Die Expression der Kondensationsenzyme und der Zellaufschluss wurden wie in 8.4.1.2.3 und 8.5.1 beschrieben durchgeführt.

**Tabelle 36.** Übersicht über die Bestandteile des *in vitro* Assays für Kondensationsenzyme

| Bestandteil               | Stammlösung                                           | Endkonzentration    | Volumen |
|---------------------------|-------------------------------------------------------|---------------------|---------|
| MBC ( <b>2</b> )          | 20 mM in DMSO                                         | 1 mM                | 25 µL   |
| Substrate                 | 20 mM in DMSO                                         | 1 mM <sup>[a]</sup> | 25 µL   |
| ATP                       | 62.5 mM ATP·Na <sub>2</sub> in dest. H <sub>2</sub> O | 1.25 mM             | 10 µL   |
| Zelllysate <sup>[b]</sup> | —                                                     | —                   | 440 µL  |
| Gesamtvolumen             |                                                       |                     | 500 µL  |

<sup>[a]</sup> Bei Nutzung resuspendierter Membranfraktion wurden 0.1 mM eingesetzt.

<sup>[b]</sup> Alternativ wurde zellfreier Überstand oder resuspendierte Membranfraktion genutzt.

Die Durchführung des *in vitro* Assays wird nachfolgend beschrieben. In ein 1.5 mL Reaktionsgefäß wurden 440 µL Zelllysate (in KPi Puffer, 50 mM, pH 7), zellfreier Überstand oder resuspendierte Membranfraktion (in KPi Puffer, 50 mM, pH 7, 0.1 mM MgCl<sub>2</sub>) gegeben und mit 25 µL der MBC-Lösung (**2**, 20 mM in DMSO) und 25 µL der entsprechenden Substrat-Lösung (20 mM in DMSO) versetzt. Durch Zugabe von 10 µL ATP (62.5 mM ATP·Na<sub>2</sub> in dest. H<sub>2</sub>O) wurde die Reaktion gestartet und der Reaktionsansatz für 4 h bei 30 °C bei 300 rpm geschüttelt. Der Reaktionsansatz wurde sedimentiert (5 min, 21 100 rcf, RT), der Überstand verworfen und so die Reaktion abgebrochen. Bei

der Aufarbeitung des Reaktionsansatzes wurde zwischen Proben für nachfolgende LC-MS Messungen und Proben für fotografische Dokumentation unterschieden.

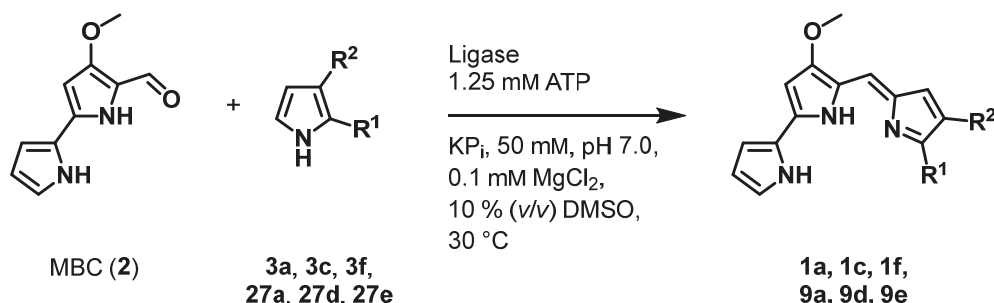
### Aufarbeitung des *in vitro* Assays für fotografische Dokumentation

Das nach Zentrifugation erhaltenen Zellpellet wurde in acidem Ethanol [4% (v/v) 1 N HCl in Ethanol] resuspendiert, erneut sedimentiert (5 min, 21100 rcf, RT) und der Überstand anschließend in ein neues 1.5 mL Reaktionsgefäß überführt. Im Anschluss wurden die ethanolischen Extrakte fotografisch dokumentiert.

### Aufarbeitung des *in vitro* Assays für LC-MS Proben

Das nach Zentrifugation erhaltenen Zellpellet wurde statt in acidem Ethanol [4% (v/v) 1 N HCl in Ethanol] in Methanol resuspendiert, um eine mögliche säurekatalysierte Reaktion während der Extraktion auszuschließen, die falsch positive Ergebnisse liefern würde. Das in Methanol resuspendierte Zellpellet wurde erneut sedimentiert (5 min, 21100 rcf, RT), der Überstand anschließend in ein neues 1.5 mL Reaktionsgefäß überführt und das Methanol in einer Vakuumzentrifuge (30 °C, ca. 10–20 mbar, 240 rcf) entfernt. Zur Entfernung wasserlöslicher Substanzen wurden 200 µL dest. H<sub>2</sub>O zum Rückstand hinzugegeben und dieser mit Dichlormethan (2× 200 µL) extrahiert. Das Dichlormethan wurde in einer Vakuumzentrifuge (RT bis 45 °C, ca. 10–20 mbar, 240 rcf) entfernt. Der Rückstand wurde in Methanol (HPLC-rein) gelöst, filtriert (0.45 µm, regenerierte Cellulose) und so die Analyten für die nachfolgende LC-MS Messung erhalten (8.2.1.6).

### 8.5.7 Michaelis-Menten-Kinetik



**Schema 36.** Reaktionsschema bei den Messungen der *Michaelis-Menten*-Kinetiken der Kondensationsenzyme.<sup>[17, 177]</sup>

Die kinetischen Messungen wurden für die Kondensationsenzyme PigC, TamQ und TreaP sowie mit Leervektorproben als Negativkontrolle durchgeführt.<sup>[17, 177]</sup> Alle Arbeitsschritte, die die Handhabung der Zellmembran betreffen, erfolgten bis zur Messung der Kinetik bei 4 °C. Nach Isolierung der Membranfraktion (8.5.3) wurde das aus 1 mL zellfreiem Extrakt erhaltene Pellet in 3 mL KPi Puffer (50 mM, pH 7.0, 0.1 mM MgCl<sub>2</sub>) resuspendiert. Der finale Reaktionsansatz bestand aus der vorgenannten resuspendierten Membranfraktion sowie MBC (2), Monopyrrol (3a, 3c, 3f, 27a, 27d, 27e) und ATP (Tabelle 37). Die Reinheit der verwendeten Monopyrrole (3a, 3c, 3f) wurde im Vorhinein mittels quantitativem NMR bestimmt (3a = 96 % ± 0.7 %, 3c = 97 % ± 0.8 %, 3f = 97 % ± 0.3 %). Vor Beginn des Assays wurden Verdünnungsreihen der Monopyrrole erstellt. Die Kinetiken wurden im

analytischen Maßstab (200 µL) in 96 × 300 µL Mikrotiterplatten (Polystyrol, transparent, flacher Boden; Greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich) in Triplikaten durchgeführt und die Absorption bei 535 nm mithilfe des *Tecan Infinite®* M1000 Pro Plattenlesegeräts (*Tecan Trading AG*, Männedorf, Schweiz) verfolgt.

**Tabelle 37.** Übersicht über die Bestandteile und deren Konzentration in der *Michaelis-Menten*-Kinetik

| Bestandteil                                                                          | Stammlösung                                           | Endkonzentration | Volumen |
|--------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|------------------|---------|
| MBC ( <b>2</b> )                                                                     | 2 mM in DMSO                                          | 0.1 mM           | 10 µL   |
| Pyrrole ( <b>3a</b> , <b>3c</b> , <b>3f</b> , <b>27a</b> , <b>27d</b> , <b>27e</b> ) | Verdünnungsreihe in DMSO                              | 0–2 mM           | 10 µL   |
| ATP                                                                                  | 62.5 mM ATP·Na <sub>2</sub> in dest. H <sub>2</sub> O | 1.25 mM          | 4 µL    |
| Resuspendierte Membranfraktion                                                       | —                                                     | —                | 176 µL  |
| Gesamtvolumen                                                                        |                                                       |                  | 200 µL  |

Im Detail wurden 176 µL resuspendierte Membranfraktion in die Mikrotiterplatten vorgelegt, 10 µL der MBC-Lösung (**2**, 2 mM in DMSO) und 10 µL der Monopyrrol-Lösung (**3a**, **3c**, **3f**, **27a**, **27d** und **27e**; Verdünnungsreihe in DMSO) zugegeben und die Reaktion im Anschluss durch Zugabe von 4 µL ATP (62.5 mM ATP·Na<sub>2</sub> in dest. H<sub>2</sub>O) gestartet. Direkt nach Start der Messung wurde die Absorption bei 535 nm gemessen und als Absorptionsblank verwendet. Im Folgenden wurde die Absorption alle 5 min gemessen bis eine Sättigung zu beobachten war oder genug Datenpunkte für eine lineare Regression aufgenommen wurden, wobei die Platte 1 min vor der Messung geschüttelt wurde (1 s, 306 rpm, orbitale Schüttelbewegung).

Die Datenanalyse erfolgte mithilfe der *Origin* Software. Zunächst wurde die Zeit gegen die Absorption geplottet und mittels linearer Regression die initiale Reaktionsgeschwindigkeit bestimmt. Dies erfolgte unter Berücksichtigung des *Lambert-Beer* Gesetzes, der molaren Extinktionskoeffizienten der Prodiginine sowie der geschätzten Konzentration der Kondensationsenzyme in der Membranfraktion (8.5.5). Die weitere Datenevaluierung wurde ebenfalls mit der *Origin* Software durchgeführt, mithilfe nicht-linearer Regression, der *Michaelis-Menten*-Kinetik und eines Modells der *Michaelis-Menten*-Kinetik mit Substratüberschussinhibierung (Formel 3) sowie mit dem *Levenberg-Marquardt* Iterationsalgorithmus.<sup>[410, 411]</sup>

$$v = \frac{v_{\max}[S]}{K_M + [S] \left(1 + \frac{[S]}{K_i}\right)}$$

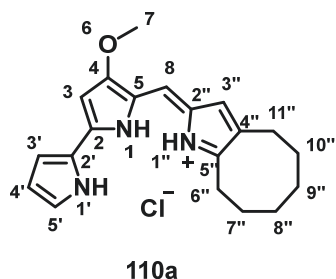
**Formel 3.** Modell einer *Michaelis-Menten*-Kinetik mit Substratüberschussinhibierung ( $v$  = Reaktionsgeschwindigkeit,  $v_{\max}$  = maximale Reaktionsgeschwindigkeit,  $S$  = Substratkonzentration,  $K_M$  = Michaeliskonstante,  $K_i$  = Dissoziationskonstante des Substrats als Inhibitor).

## 8.6 Spezieller Experimentaltteil

### 8.6.1 Biokatalyse zur Synthese von Prodigininen

Die semi-präparative Biokatalyse wurde mit 0.1 mmol Substrat durchgeführt. Dafür wurde 20 g tiefgefrorenes Zellpellet in 100 mL  $\text{KPi}$  Puffer (50 mM, pH 7) resuspendiert. Der finale Reaktionsansatz bestand aus resuspendierten Zellpellet sowie MBC (**2**, 1 mM), Monopyrrol (1 mM), ATP (1.25 mM) und 10% (v/v) DMSO. Im Detail wurden zum resuspendierten Zellpellet MBC-Lösung (**2**, 5 mL, 20 mM in DMSO), Monopyrrol-Lösung (5 mL, 20 mM in DMSO) und PU-Würfel zur *in situ* Produktextraktion (2 g; *Bornwasser*, Gölheim, Deutschland; Softpur, Dichte 25 kg/m<sup>3</sup>, 4 kPa Stauchhärte; ca. 1 cm<sup>3</sup>) gegeben. Die Biokatalyse wurde durch Zugabe von ATP (2 mL, 62.5 mM  $\text{ATP} \cdot \text{Na}_2$  in dest.  $\text{H}_2\text{O}$ ) gestartet und anschließend für 18 h (30 °C, 300 rpm, 2.5 cm Schütteldurchmesser) in einem 1 L Erlenmeyerkolben inkubiert. Nach Inkubation wurden die PU-Würfel mithilfe eines Metallsiebs vom Medium getrennt, ausgewrungen und mit dest.  $\text{H}_2\text{O}$  gewaschen. Im Anschluss wurden die Schwämme mit Diethylether (ca. 200 mL) extrahiert, die organische Phase mit Wasser gewaschen, über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Da die Reaktionsmischung nach 18 h immer noch rot war, wurde eine zweite Portion PU-Würfel (2 g) zugegeben, erneut für 18 h (30 °C, 300 rpm, 2.5 cm Schütteldurchmesser) inkubiert und wie zuvor beschrieben geerntet. Der gesammelte und vereinte Rohextrakt wurde im Anschluss mittels Säulenchromatographie gereinigt.

#### 2-[[4-Methoxy-1*H*,1'*H*-(2,2'-bipyrryl)-5-yl]methylene]-4,5,6,7,8,9-hexahydro-2*H*-cycloocta-*[b]*pyrrole·HCl (**110a**)



Entsprechend der Vorschrift für die Biokatalyse zur Synthese von Prodigininen (8.6.1) wurde das Prodiginin **110a** mit resuspendiertem Zellpellet von *E. coli* BL21(DE3)\_pET28a+::pigC, *E. coli* BL21(DE3)\_pET28a+::tamQ bzw. *E. coli* BL21(DE3)\_pET28a+::treaP und 0.1 mmol 4,5,6,7,8,9-Hexahydro-1*H*-cycloocta[*b*]pyrrol (**82a**) und 0.1 mmol MBC (**2**) hergestellt und nach säulenchromatographischer Reinigung [Kieselgel; Dichlormethan/Ammoniak in Methanol (7 N)

(Gradient von 99.5:0.5 bis 99:1)] und Ausfällung als Hydrochlorid als tiefroter Feststoff (TamQ: 23.5 mg, 73  $\mu\text{mol}$ , 73%; PigC: 12.5 mg, 39  $\mu\text{mol}$ , 39%; Treap: 9.8 mg, 30  $\mu\text{mol}$ , 30%) erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 1.43 ( $m_c$ , 4H, 8'', 9''-H), 1.61 ( $m_c$ , 2H, 10''-H), 1.85 ( $m$ , 2H, 7''-H), 2.57 (t,  $^3J_{11'',10''} = 6.4$  Hz, 2H, 11''-H), 3.06 (t,  $^3J_{6'',7''} = 6.4$  Hz, 2H, 6''-H), 3.98 (s, 3H, 7-H), 6.06 (d,  $^4J_{3,1} = 2.0$  Hz, 1H, 3-H), 6.32 ( $m_c$ , 1H, 4'-H), 6.61 (d,  $^4J_{3'',1''} = 2.6$  Hz, 1H, 3''-H), 6.89 ( $m_c$ , 1H, 3'-H), 6.92 (s, 1H, 8-H), 7.19 ( $m_c$ , 1H, 5'-H), 12.55 (brs, 1H, 1'-NH), 12.66 (brs, 1H, 1-NH), 12.70 (brs, 1H, 1''-NH); **<sup>13</sup>C-NMR** (151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 24.7 (C-11''), 25.5, 25.9\*, 25.9\*, 29.3 (C-7''), 31.1 (C-10''), 58.8 (C-7), 92.9 (C-3), 111.8 (C-4'), 116.0 (C-8), 117.0 (C-3'), 120.7 (C-5), 122.4 (C-2'), 125.3 (C-2''), 126.9 (C-5'), 128.4 (C-3''), 128.6 (C-4''), 147.6 (C-2), 152.5 (C-5''), 165.8 (C-4); **IR** (ATR-film):  $\tilde{\nu}$  [1/cm] = 2921, 1739, 1599, 1542, 1508, 1355, 1230, 1118, 959, 742.

\*Die Signale weisen eine geringe Differenz auf.

Die analytischen Daten stimmen mit der Literatur überein.<sup>[247]</sup>

### 8.6.2 Biotransformation von Undecylprodigiosin (9a)

Die Zyklasen TamC und TreaC wurden heterolog in *E. coli* BL21(DE3) exprimiert (8.4.1.2.3). Die Kulturgröße betrug jeweils 25 mL in einem 250 mL Erlenmeyerkolben. Bei einer von  $OD_{600} \approx 0.4\text{--}0.6$  wurde mit 0.1 mM IPTG induziert. Abweichend von der allgemeinen Vorschrift wurde die Temperatur kurz vor Induktion auf 19 °C gesenkt. Zusätzlich wurde Undecylprodigiosin (**9a**, 3  $\mu\text{M}$ ) als Substrat zur Kultur gegeben. Die Kulturen wurden über Nacht bei 19 °C und 120 rpm inkubiert und im Anschluss durch Zentrifugation (20 min, 4629 rcf, 4 °C) geerntet. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 1 mL acidem Ethanol [4 % (v/v) 1 N HCl in Ethanol] resuspendiert und erneut zentrifugiert (20 min, 4629 rcf, 4 °C). Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Extraktion ein zweites Mal mit 1 mL acidem Ethanol durchgeführt. Daraufhin wurde das acide Ethanol der gesammelten Überstände in einer Vakuumzentrifuge (30 °C, ca. 10–20 mbar, 240 rcf) entfernt. Zur Entfernung wasserlöslicher Substanzen wurden 200  $\mu\text{L}$  dest.  $\text{H}_2\text{O}$  zum Rückstand hinzugegeben und dieser mit Dichlormethan (2  $\times$  200  $\mu\text{L}$ ) extrahiert. Das Dichlormethan wurde erneut in einer Vakuumzentrifuge (RT bis 45 °C, ca. 10–20 mbar, 240 rcf) entfernt und der Rückstand in Methanol (HPLC-rein) gelöst, filtriert (0.45  $\mu\text{m}$ , regenerierte Cellulose) und so die Analyten für die nachfolgende LC-MS Messung (8.2.1.6) erhalten.

### 8.6.3 Toxizitätsassays mit biotechnologisch relevanten Organismen

Die Toxizitätsassays wurden in 96  $\times$  300  $\mu\text{L}$  Mikrotiterplatten (Polystyrol, transparent, flacher Boden; Greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich) durchgeführt. Die Wirkung von Prodigininen wurde im Rahmen dieser Arbeit gegenüber *P. pastoris* und *S. cerevisiae* getestet. Die Toxizitätsassays wurden im Detail wie folgt durchgeführt. LB-Flüssigmedium ohne Antibiotikum wurde mit einer Übernachtskultur der oben genannten Mikroorganismen auf eine  $OD_{600} = 0.02$  inokuliert. Die Prodiginine **1a**, **1f**, **58b**, **110a–110d** wurden in DMSO gelöst (10 mM Stammkonzentration) und Verdünnungsreihen in DMSO erstellt. In die Mikrotiterplatten wurden 145.5  $\mu\text{L}$  inokuliertes LB-Medium vorgelegt und 4.5  $\mu\text{L}$  der jeweiligen Prodigininlösungen zugegeben [Endkonzentration < 100  $\mu\text{M}$ , 3 % (v/v) DMSO]. Die Platten wurden mit einer luftdurchlässigen AeraSeal™ Folie (Excel Scientific, Victorville, CA, USA) zugeklebt und in einem Plattenschüttler für 16 h bei 30 °C und 800 rpm inkubiert. Die Temperatur wurde ungeachtet der idealen Anzuchttemperatur der Mikroorganismen einheitlich bei 30 °C belassen. Die Toxizitätsassays wurden jeweils als Triplikate durchgeführt, während als Kontrolle nicht inokuliertes LB-Medium diente, welches mit den zu testenden Prodigininen **1a**, **1f**, **58b**, **110a–110d** versehen wurde. Nach 16-stündiger Inkubation erfolgte eine Messung der  $OD_{750}$  in einem Tecan Infinite® M1000 Pro Plattenlesegerät (Tecan Trading AG, Männedorf, Schweiz). Zur anschließenden Datenauswertung wurde zunächst die Absorption der Kontrolle von den Werten der Kulturen subtrahiert und danach die  $OD_{750}$  gegen die Substratkonzentration halblogarithmisch aufgetragen. Die weitere Auswertung erfolgte mithilfe der Origin Software, indem ein nichtlinearer Fit einer Dosis-Wirkungs-Kurve mit Levenberg-Marquardt Iterationsalgorithmus angewendet wurde.<sup>[410, 411]</sup>

$$y_{dr} = A_1 + \frac{A_2 - A_1}{1 + 10^{(x_0 - x)p}}$$

**Formel 4.** 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].

$$MIC = 10^{\frac{A_1 - (\frac{A_1 + A_2}{2} m_{x0} x_0)}{m_{x0}}}$$

**Formel 5.** Formel zur Bestimmung des MIC Werts.

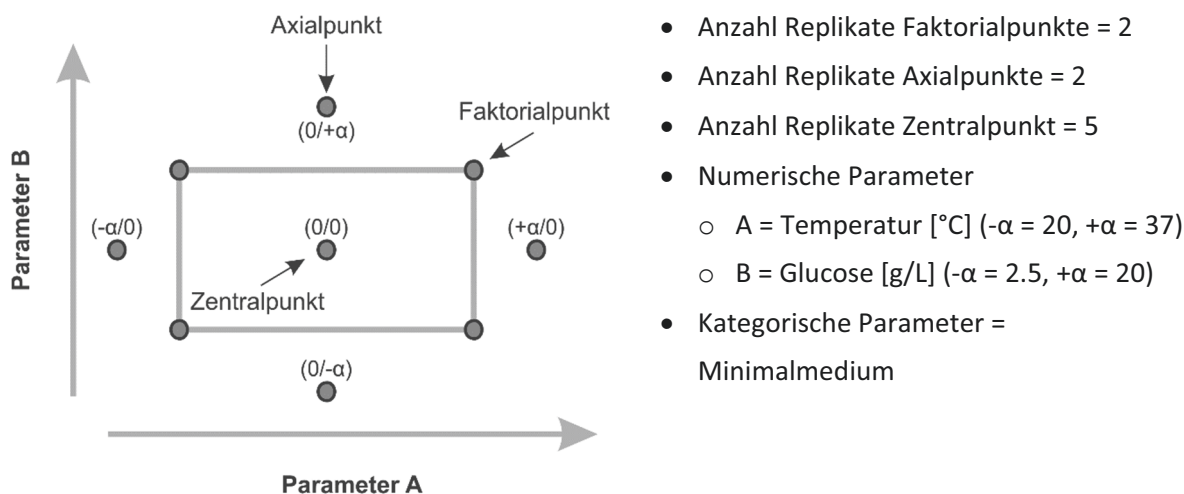
$$IC_{max} = 10^{\frac{A_2 - (\frac{A_1 + A_2}{2} m_{x0} x_0)}{m_{x0}}}$$

**Formel 6.** Formel zur Bestimmung des  $IC_{max}$  (maximale *inhibitory concentration*) Werts.

Die Herleitung der Formeln und genaue Beschreibung kann der Dissertationsschrift von Dr. *Andreas Klein* entnommen werden.<sup>[17]</sup>

#### 8.6.4 Medienoptimierung für Prodigiosin (1a) Produktion

Die Planung und Auswertung der Experimente zur Medienoptimierung für die Prodigiosin (**1a**) Produktion wurde mithilfe von statistischer Versuchsplanung (engl. *Design of Experiment*) mit der Software *Design Expert* (StatEase, Inc.) durchgeführt. Es wurden die in Abbildung 95 dargestellten Parameter gewählt.



**Abbildung 95.** Aufbau des *Central Composite Designs* für die Medienoptimierung zur Prodigiosin (**1a**) Produktion.

Die Kultivierung des Stammes *P. putida* pig-r2 zur Medienoptimierung wurde im analytischen Maßstab in einem *BioLector*® Mikrobioreaktor (*m2p labs* GmbH, Baesweiler, Deutschland) durchgeführt unter Nutzung von *FlowerPlates* (MTP-48-B, 48 Well; *m2p labs* GmbH, Baesweiler, Deutschland). Das Füllvolumen in den *FlowerPlates* betrug 800 µL und die Platten wurden bei 1000 rpm (3 mm Schütteldurchmesser) geschüttelt.

Die genaue Durchführung wird im Folgenden beschrieben: Die zu untersuchenden Minimalmedien (8.4.1.1.2) wurden in der *FlowerPlate* vorgelegt, mit Glucose (2.5 g/L–20 g/L) als Kohlenstoffquelle



versehen und mit einer *P. putida* pig-r2 Übernachtskultur (8.4.1.2.2) auf eine  $OD_{600} = 0.05$  inokuliert. Als Kontrolle wurden die Kultivierungen bei allen untersuchten Temperaturen auch mit TB-Medium durchgeführt. Die Platte wurde bei den zu untersuchenden Temperaturen (18–37 °C) und 1000 rpm inkubiert, wobei *online* das Streulicht als Maß für das Biomassewachstum gemessen wurde. Sobald aus der *online* Biomassemessung ersichtlich wurde, dass die Kulturen am Ende der stationären Phase bzw. am Übergang zur Absterbephase angekommen waren, wurde die Kultivierung abgebrochen, von jedem Ansatz 500 µL Probe genommen und die Menge an Prodigiosin quantifiziert (8.6.7).

### 8.6.5 Biosynthetische Produktion von Prodigiosin (1a)

Zur biosynthetischen Produktion von Prodigiosin (1a) wurde der Stamm *P. putida* pig-r2 genutzt. Die Kultivierung fand in 3 L Fernbachkolben mit 0.5–1 L TB-Medium oder 0.5–1 L Minimalmedium statt, die mit einer Übernachtskultur (8.4.1.2.2) auf  $OD_{600} = 0.05$  inokuliert wurden. Zur *in situ* Produktextraktion wurden 5 g PU-Würfel (*Bornewasser*, Gölheim, Deutschland; Softpur, Dichte 25 kg/m<sup>3</sup>, 4 kPa Stauchhärte; ca. 1 cm<sup>3</sup>) zugegeben. Vor Verwendung wurde der PU-Schaum in 1 cm<sup>3</sup> große Stücke geschnitten, autoklaviert (20 min, 121 °C) und über Nacht im Trockenschrank (60 °C) getrocknet. Die Kulturen wurden bei 30 °C (bei Minimalmedien 18 °C) und 120 rpm (2.5 cm Schütteldurchmesser) über Nacht inkubiert und die PU-Würfel anschließend mithilfe eines Metallsiebes von der Kulturbrühe getrennt und das Prodigiosin (1a) extrahiert (8.6.6).

### 8.6.6 Extraktion und Reinigung von Prodigiosin (1a)

#### 8.6.6.1 Extraktion aus PU-Würfeln

Aus Kulturen (8.6.5) geerntete PU-Würfel mit daran adsorbiertem Prodigiosin wurden ausgewrungen, mit dest. H<sub>2</sub>O gewaschen und anschließend in einem *Soxhlet*-Extraktor (250 mL oder 500 mL) extrahiert. Für die Extraktion wurde Diethylether über die PU-Würfel gegossen und diese ausgedrückt, bis die Schwämme farblos waren. Im Anschluss wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt, der Rohextrakt mit Dichlormethan extrahiert (3× 30 mL) und die gesammelten organischen Phasen mit Wasser und einer gesättigten NaCl-Lösung gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel erneut am Rotationsverdampfer entfernt. Optional wurde der Rohextrakt zur Quantifizierung von Prodigiosin (1a) genutzt (8.6.7) oder *via* Säulenchromatographie gereinigt [Kieselgel; Dichlormethan/Ammoniak in Methanol (7 N) (Gradient) anschließend neutrales Aluminiumoxid, *n*-Pentan/Essigsäureethylester (EtOAc) (Gradient)].

#### 8.6.6.2 Extraktion aus Zellpellets

Zur Extraktion aus Zellpellets wurden die Kulturen auf 50 mL Reaktionsgefäße aufgeteilt und mittels Zentrifugation (20 min, 8228 rcf, 4 °C) sedimentiert, die Pellets in acidem Ethanol (ca. 20 mL/50 mL Kulturvolumen) resuspendiert und abermals zentrifugiert (20 min, 8228 rcf, 4 °C). Der Überstand wurde gesammelt und das verbleibende Zellpellet ein zweites Mal mit acidem Ethanol (ca. 20 mL/50 mL Kulturvolumen) resuspendiert und zentrifugiert (20 min, 8228 rcf, 4 °C). Am Rotationsverdampfer wurde das Lösungsmittel des gesammelten ethanolischen Extrakts entfernt, der Rohextrakt mit Dichlormethan extrahiert (3× 30 mL) und die gesammelten organischen Phasen mit

Wasser und einer gesättigten NaCl-Lösung gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel erneut am Rotationsverdampfer entfernt. Im Anschluss erfolgte eine Quantifizierung von Prodigiosin (**1a**) (8.6.7) oder eine Reinigung *via* Säulenchromatographie [Kieselgel; Dichlormethan/Ammoniak in Methanol (7 N) (Gradient) anschließend neutrales Aluminiumoxid, *n*-Pentan/EtOAc (Gradient)].

### 8.6.7 Quantifizierung von Prodigininen und Bestimmung molarer Extinktionskoeffizienten

Prodiginine wurden entweder gravimetrisch nach Reinigung *via* Säulenchromatographie (8.2.1.2) quantifiziert oder photometrisch durch Absorptionsmessung bei  $\lambda = 535 \text{ nm}$  in acidem Ethanol.

Zur photometrischen Quantifizierung von Prodigininen wurde eine definierte Menge einer Prodiginin enthaltenen Lösung (*in vitro* Assay, Fermentationsbrühe) entnommen, das Zellpellet durch Zentrifugation gebildet (21 000 rcf, 5 min, RT) und dieses im Anschluss mit der gleichen Menge acidem Ethanol resuspendiert, ggf. unter Zuhilfenahme des Ultraschallbads. Nach erneuter Zentrifugation (21 000 rcf, 5 min, RT) wurde der Überstand abgenommen und bei  $\lambda = 535 \text{ nm}$  im Photometer vermessen. Aus der gemessenen Absorption und dem molaren Extinktionskoeffizienten (Formel 7) konnte die Prodigininmenge berechnet werden.

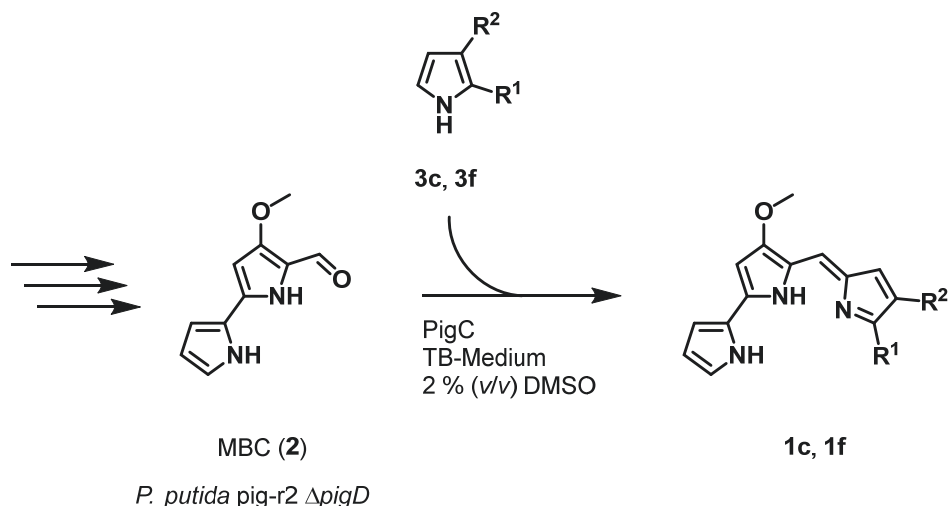
Die molaren Extinktionskoeffizienten ( $\epsilon$ ) wurden experimentell von den Prodigininen **9a**, **9c**, **9d**, **58c**, **58d** und **58e** bestimmt. Dazu wurden 3× ca. 1 mg des reinen Prodiginins in acidem Ethanol gelöst und jeweils 3× verdünnt. Die Absorption der entstandenen neun Verdünnungen wurde bei  $\lambda = 535 \text{ nm}$  gemessen und im Anschluss mithilfe des *Lambert-Beer'schen* Gesetzes (Formel 7) die Konzentration bestimmt. Nach Abtragen der Absorption der Prodiginine gegen die Konzentration, wurde der molare Extinktionskoeffizient ( $\epsilon$ ) mittels linearer Regression ermittelt. Dabei entspricht der molare Extinktionskoeffizient ( $\epsilon$ ) der Steigung der Geraden.

$$A = \epsilon \cdot c \cdot d$$

**Formel 7.** *Lambert-Beer'sches* Gesetz ( $A$  = Absorption,  $\epsilon$  = molarer Extinktionskoeffizient,  $c$  = Konzentration,  $d$  = Schichtdicke der Küvette).

### 8.6.8 Mutasyntese im präparativen Maßstab

Zur biologisch basierten Produktion von Prodigininderivaten wurden Mutasyntese Versuche durchgeführt (Schema 37). Die Mutasynteseansätze wurden in Zusammenarbeit mit Dr. *Andreas S. Klein* durchgeführt.



**Schema 37.** Reaktionsschema der Mutasynteseansätze unter Nutzung von *P. putida pig-r2 ΔpigD*

Mutasynteseansätze im präparativen Maßstab wurden in 3 L Fernbachkolben mit 500 mL TB-Medium mit Streptomycin durchgeführt. Das Medium enthielt ebenfalls *Precursor*-Lösung (0.5 mM in DMSO) und so einen DMSO Anteil von 2% (v/v). Zur *in situ* Produktextraktion wurden sterile PU-Würfel zugegeben (5 g; *Bornwasser*, Göllheim, Deutschland; Softpur, Dichte 25 kg/m<sup>3</sup>, 4 kPa Stauchhärte; ca. 1 cm<sup>3</sup>). Im Detail wurde TB-Medium mit Streptomycin mit einer Übernachtskultur des Stammes *P. putida pig-r2 ΔpigD* auf eine OD<sub>600</sub> = 0.02 inokuliert. Von der *Precursor*-Lösung (**3c**, **3f**, 25 mM in DMSO) wurden 10 mL zum Kulturmedium gegeben (Endkonzentration 1.25 mM). Nach Zugabe der PU-Würfel wurde die Kultur für 24 h bei 25 °C und 125 rpm (2.5 cm Schütteldurchmesser) inkubiert. Die Extraktion der PU-Würfel erfolgte analog zu den Angaben in 8.6.6.1. Die Prodiginine **1c** und **1f** wurden im Anschluss an die Extraktion säulenchromatographisch gereinigt (8.2.1.2).

### 8.6.9 Fermentation des Prodigiosin (1a) Produzenten *P. putida pig-r2* im 1.5 L Maßstab

In Kooperation mit Dipl.-Ing. *Carl Brehl* (AVT.BioVT, RWTH Aachen) wurde gemeinsam eine Fermentation des Prodigiosin (**1a**) Produzenten *P. putida pig-r2* in den Laboratorien der AVT.BioVT der RWTH Aachen durchgeführt. Nach Ende der Fermentation wurden 1.2 L der Kulturbrühe geerntet. Diese Kulturbrühe wurde im Anschluss wie in 8.6.6.2 beschrieben extrahiert und der Rohextrakt mittels Säulenchromatographie gereinigt (8.2.1.2).

## 9 Anhang

### 9.1 Genclusteranalysen

**Tabelle A 1.** Homologie und NCBI *accession numbers* der Enzyme, die in die Biosynthese von Undecylprodigiosin (9a) und dessen Derivate **11**, **12**, **19–22** involviert sind. Fett hervorgehoben sind die Kondensationsenzyme. Die Namen für die CDS (engl. *coding sequence*) wurden aus den NCBI Referenznummern abgeleitet. NCBI Referenz Sequenzen für Genome und *GenBank* Nummern: *S. coelicolor* A3(2) chromosome, complete genome, NC\_003888.3; *S. griseoviridis* DNA, includes prodigiosin biosynthetic gene cluster, strain: 2464-S5, *GenBank*: AB469822.2; *S. longispororuber* strain DSM 40667 McpI (mcpI) gene, partial cds, and McpH (mcpH) and McpG (mcpG) genes, complete cds, *GenBank*: JF288762.1.<sup>[45, 68, 164-166, 199]</sup>

| <i>S. coelicolor</i> A3(2)                      |                    | <i>S. longispororuber</i> (DSM 40667) <sup>[a]</sup> |                   | <i>S. griseoviridis</i> 2464-S5               |                   | <i>S. sp.</i> CNQ-617                   |                   |
|-------------------------------------------------|--------------------|------------------------------------------------------|-------------------|-----------------------------------------------|-------------------|-----------------------------------------|-------------------|
| Undecylprodigiosin (9a)/<br>Streptorubin B (12) |                    | Undecylprodigiosin (9a)/<br>Streptorubin A (11)      |                   | Roseophilin (19)/<br>Dechlororoseophilin (20) |                   | Marineosin A (21)/<br>Marineosin B (22) |                   |
| Protein                                         | CDS                | Protein                                              | CDS               | Protein                                       | CDS               | Protein                                 | CDS               |
| RedO                                            | NP_630010.1        | —                                                    | —                 | RphO                                          | BAG84262.1        | MarO                                    | AHF22851.1        |
| RedG                                            | NP_630017.1        | McpG                                                 | AEL16995.1        | RphG                                          | BAG84256.2        | MarG                                    | AHF22859.1        |
| RedN                                            | NP_630011.1        | —                                                    | —                 | RphN                                          | BAG84263.1        | MarN                                    | AHF22852.1        |
| RedM                                            | NP_630012.1        | —                                                    | —                 | RphM                                          | BAG84247.1        | MarM                                    | AHF22853.1        |
| RedX                                            | NP_630000.1        | —                                                    | —                 | RphX                                          | BAG84242.1        | MarX                                    | AHF22841.1        |
| RedW                                            | NP_630001.1        | —                                                    | —                 | RphW                                          | BAG84241.1        | MarW                                    | AHF22842.1        |
| RedV                                            | NP_630003.1        | —                                                    | —                 | RphV                                          | BAG84258.1        | MarV                                    | AHF22845.1        |
| RedI                                            | NP_630016.1        | McpI <sup>[b]</sup>                                  | AEL16994.1        | RphI                                          | BAG84254.1        | MarI                                    | AHF22857.1        |
| <b>RedH</b>                                     | <b>NP_733678.1</b> | <b>McpH</b>                                          | <b>AEL16993.1</b> | <b>RphH</b>                                   | <b>BAG84255.1</b> | <b>MarH</b>                             | <b>AHF22858.1</b> |
| RedY                                            | NP_630002.1        | —                                                    | —                 | RphY                                          | BAG84240.1        | MarY                                    | AHF22843.1        |
| RedU                                            | NP_630004.1        | —                                                    | —                 | RphU                                          | BAG84259.1        | MarU                                    | AHF22846.1        |
| RedS                                            | NP_630006.1        | —                                                    | —                 | —                                             | —                 | —                                       | —                 |
| RedF                                            | NP_630018.1        | —                                                    | —                 | —                                             | —                 | —                                       | —                 |
| RedD                                            | NP_629999.1        | —                                                    | —                 | RphD                                          | BAG84243.1        | MarD                                    | AHF22840.1        |
| RedE                                            | NP_630019.1        | —                                                    | —                 | —                                             | —                 | MarE                                    | AHF22860.1        |
| RedJ                                            | NP_630015.1        | —                                                    | —                 | RphJ                                          | BAG84250.1        | MarJ                                    | AHF22856.1        |
| RedK                                            | NP_630014.1        | —                                                    | —                 | RphK                                          | BAG84249.1        | MarK                                    | AHF22855.1        |
| RedL                                            | NP_630013.1        | —                                                    | —                 | RphL                                          | BAG84248.1        | MarL                                    | AHF22854.1        |
| RedP                                            | NP_630009.1        | —                                                    | —                 | RphP                                          | BAG84261.1        | MarP                                    | AHF22850.1        |
| RedQ                                            | NP_630008.1        | —                                                    | —                 | —                                             | —                 | MarQ                                    | AHF22840.1        |
| RedR                                            | NP_630007.1        | —                                                    | —                 | —                                             | —                 | MarR                                    | AHF22860.1        |
| RedT                                            | NP_630005.1        | —                                                    | —                 | RphT                                          | BAG84260.1        | MarT                                    | AHF22856.1        |
| RedZ                                            | NP_733677.1        | —                                                    | —                 | RphZ                                          | BAG84257.1        | MarZ                                    | AHF22855.1        |
| —                                               | —                  | —                                                    | —                 | RphA1                                         | BAG84244.1        | MarA                                    | AHF22854.1        |
| —                                               | —                  | —                                                    | —                 | RphA2                                         | BAG84245.1        | —                                       | —                 |
| —                                               | —                  | —                                                    | —                 | RphA3                                         | BAG84246.1        | —                                       | —                 |
| —                                               | —                  | —                                                    | —                 | RphB                                          | BAU09526.1        | —                                       | —                 |
| —                                               | —                  | —                                                    | —                 | RphG2                                         | BAG84251.1        | —                                       | —                 |
| —                                               | —                  | —                                                    | —                 | RphG3                                         | BAG84252.1        | —                                       | —                 |
| —                                               | —                  | —                                                    | —                 | RphG4                                         | BAG84253.1        | —                                       | —                 |

<sup>[a]</sup>keine Sequenzen für das vollständige Gencluster oder Genom vorhanden

<sup>[b]</sup>nur partielle Gensequenz vorhanden

**Tabelle A 2.** Homologie und NCBI *accession numbers* der Enzyme, die in die Biosynthese von Prodigiosin (**1a**) und dessen Derivat **14** involviert sind. Fett hervorgehoben sind die Kondensationsenzyme. Die Namen für die CDS wurden aus den NCBI Referenznummern abgeleitet. NCBI Referenz Sequenzen für Genome und *GenBank* Nummern: *S. marcescens* WW4, complete genome, NC\_020211.1; *H. chejuensis* KCTC 2396, complete genome, NC\_007645.1; *P. rubra* strain W5, whole genome shotgun sequence, NZ\_RHIA01000005.1 und *P. rubra* DSM 6842 strain ATCC 29570 contig004, whole genome shotgun sequence, NZ\_AHCD02000004.1.<sup>[170, 171, 173, 175, 264]</sup>

| <i>S. marcescens</i> WW4  |                       | <i>H. chejuensis</i> KCTC 2396 |                       | <i>P. rubra</i> (DSM 6842) <sup>[a]</sup> und W5 <sup>[b]</sup> |                       |
|---------------------------|-----------------------|--------------------------------|-----------------------|-----------------------------------------------------------------|-----------------------|
| Prodigiosin ( <b>1a</b> ) |                       | Prodigiosin ( <b>1a</b> )      |                       | Cycloprodigiosin ( <b>14</b> )                                  |                       |
| Protein                   | CDS                   | Protein                        | CDS                   | Protein <sup>[c]</sup>                                          | CDS                   |
| PigG                      | WP_004940224.1        | HapG                           | WP_011399738.1        | I                                                               | WP_049866001.1        |
| PigH                      | WP_015376881.1        | HapH                           | WP_011399739.1        | J                                                               | WP_125559938.1        |
| PigI                      | WP_021504654.1        | HapI                           | WP_083769831.1        | K                                                               | WP_125559936.1        |
| PigJ                      | WP_015376879.1        | HapJ                           | WP_011399741.1        | L                                                               | WP_125559934.1        |
| PigA                      | WP_015376887.1        | HapA                           | WP_011399729.1        | C                                                               | WP_125559952.1        |
| PigE                      | WP_015376883.1        | HapE                           | WP_011399736.1        | G                                                               | WP_125559943.1        |
| PigM                      | WP_015376877.1        | HapM                           | WP_011399744.1        | O                                                               | WP_125559929.1        |
| PigF                      | WP_015376882.1        | HapF                           | WP_011399737.1        | H                                                               | WP_125559941.1        |
| <b>PigC</b>               | <b>WP_015376885.1</b> | <b>HapC</b>                    | <b>WP_011399733.1</b> | <b>E</b>                                                        | <b>WP_125559948.1</b> |
| PigK                      | WP_004940233.1        | HapK                           | WP_011399742.1        | M                                                               | WP_010382568.1        |
| PigL                      | WP_015376878.1        | HapL                           | WP_011399743.1        | N                                                               | WP_125559931.1        |
|                           |                       | WP_011399731.1                 | WP_011399731.1 +      |                                                                 |                       |
| PigB                      | WP_015376886.1        | + HapB                         | WP_011399732.1        | D                                                               | WP_125559950.1        |
| PigD                      | WP_015376884.1        | HapD                           | WP_011399735.1        | F                                                               | WP_125559946.1        |
| PigN                      | WP_015376876.1        | HapN                           | WP_011399745.1        | B                                                               | WP_010386915.1        |
| —                         | —                     | —                              | —                     | A                                                               | WP_010386914.1        |

<sup>[a]</sup>Proteine A und G

<sup>[b]</sup>Proteine B, C–F, H–O

<sup>[c]</sup>Beschriftung entsprechend Abbildung 19

**Tabelle A 3.** Homologie und NCBI *accession numbers* der Enzyme, die in die Biosynthese von Tambjaminen involviert sind. Fett hervorgehoben sind die Kondensationsenzyme. Die Namen für die CDS wurden aus den NCBI Referenznummern abgeleitet. NCBI Referenz Sequenzen für Genome und *GenBank* Nummern: *P. tunicata* strain D2 chromosome 1, complete sequence, NZ\_CP031961.1; *P. citrea* DSM 8771 strain NCIMB 1889 contig222, NZ\_AHBZ02000222.1.<sup>[175, 289]</sup>

| <i>P. tunicata</i> D2 |                       | <i>P. citrea</i> (DSM 8771) |                       |
|-----------------------|-----------------------|-----------------------------|-----------------------|
| Tambjamin YP1 (26a)   |                       | Tambjamin MYP1 (26b)        |                       |
| Protein               | CDS                   | Protein                     | CDS                   |
| TamA                  | WP_119081495.1        | TreaA                       | WP_010362071.1        |
| TamB                  | WP_009837242.1        | TreaB                       | WP_010362070.1        |
| TamC                  | WP_009837241.1        | TreaC                       | WP_010362069.1        |
| TamD                  | WP_009837240.1        | TreaD                       | WP_010362068.1        |
| TamE                  | WP_009837239.1        | TreaE                       | WP_010362067.1        |
| TamF                  | WP_009837238.1        | TreaF                       | WP_010362066.1        |
| TamG                  | WP_009837237.1        | TreaG                       | WP_010362065.1        |
| TamH                  | WP_009837236.1        | TreaH                       | WP_010362064.1        |
| TamJ                  | WP_009837235.1        | TreaI                       | WP_010362063.1        |
| TamK                  | WP_009837234.1        | TreaJ                       | WP_010362062.1        |
| TamL                  | WP_009837233.1        | TreaK                       | WP_010362061.1        |
| TamM                  | WP_009837232.1        | TreaL <sup>[a]</sup>        | WP_010362060.1        |
| TamN                  | WP_119081492.1        | TreaM                       | WP_010362059.1        |
| TamO                  | WP_119081590.1        | TreaN                       | WP_010362058.1        |
| TamP                  | WP_009837229.1        | TreaO                       | WP_010362057.1        |
| <b>TamQ</b>           | <b>WP_009837228.1</b> | <b>TreaP</b>                | <b>WP_010362056.1</b> |
| TamR                  | WP_009837227.1        | TreaQ                       | WP_010362055.1        |
| TamS                  | WP_009837226.1        | TreaR                       | WP_010362054.1        |
| TamT                  | WP_009837225.1        | TreaS                       | WP_010362053.1        |
| —                     | —                     | —                           | WP_010362052.1        |

<sup>[a]</sup>Die Annotation von TamL entspricht der Publikation von *Burke et al.*<sup>[135]</sup>

**Tabelle A 4.** Homologie, Funktion und Rolle in der Biosynthese der Enzyme, die in die Biosynthese von Tambjaminen und Prodiginen involviert sind. Fett hervorgehoben sind die Kondensationsenzyme. Es sind die Enzyme aus den folgenden Clustern aufgeführt: *red* [*S. coelicolor* A3(2)], *mcp* (*S. longispororuber*), *rph* (*S. griseoviridis*), *mar* (*S. sp.* CNQ-617), *pig* (*S. marcescens*), *hap* (*H. chejuensis* KCTC 2396), bisher unbenanntes Cluster (*P. rubra*), *tam* (*P. tunicata* D2), *trea* (*P. citrea*). Die Namen für die CDS wurden aus den NCBI Referenznummern abgeleitet.

| <i>red</i> | <i>mcp</i> | <i>rph</i> | <i>mar</i> | <i>pig</i> | <i>hap</i> | <i>P. rubra</i> | <i>tam</i> | <i>trea</i> | Funktion                                                                             | Rolle                 |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-----------------|------------|-------------|--------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| -          | -          | -          | -          | -          | -          | -               | TamA       | TreaA       | $\beta$ -Ketoacyl-Synthase                                                           | DDA (28a)             |
| RedO       | -          | RphO       | MarO       | PigG       | HapG       | WP_049866001.1  | TamB       | TreaB       | Peptidyl-Carrier Protein                                                             | MBC (2)               |
| RedG       | McpG       | RphG       | MarG       | -          | -          | WP_010386914.1  | TamC       | TreaC       | Rieske Oxygenase                                                                     | Zyklisierung          |
| RedN       | -          | RphN       | MarN       | PigH       | HapH       | WP_125559938.1  | TamD       | TreaD       | Aminotransferase                                                                     | MBC (2)               |
| RedM       | -          | RphM       | MarM       | PigI       | HapI       | WP_125559936.1  | TamE       | TreaE       | L-prolyl-AMP-Ligase                                                                  | MBC (2)               |
| RedX       | -          | RphX       | MarX       | PigJ       | HapJ       | WP_125559934.1  | TamF       | TreaF       | $\beta$ -ketoacyl-Synthase                                                           | MBC (2)               |
| RedW       | -          | RphW       | MarW       | PigA       | HapA       | WP_125559952.1  | TamG       | TreaG       | L-Prolyl-PCP-Dehydrogenase                                                           | MBC (2)               |
| -          | -          | -          | -          | PigE       | HapE       | WP_125559943.1  | TamH       | TreaH       | Aminotransferase                                                                     | MAP (3a)/<br>DDA(28a) |
| RedV       | -          | RphV       | MarV       | PigM       | HapM       | WP_125559929.1  | TamJ       | TreaJ       | (HBC) Oxidase/Dehydrogenase                                                          | MBC (2)               |
| -          | -          | -          | -          | -          | -          | -               | TamK       | TreaJ       | Outer membrane lipoprotein-sorting Protein                                           |                       |
| -          | -          | -          | -          | -          | -          | -               | TamL       | TreaK       | ABC-Typ Transportsystem, involviert in Lipoprotein Freisetzung, Permease Bestandteil |                       |
| -          | -          | -          | -          | -          | -          | -               | TamM       | TreaL       | ABC-Typ Transportsystem, involviert in Lipoprotein Freisetzung, Permease Bestandteil |                       |
| -          | -          | -          | -          | -          | -          | -               | TamN       | TreaM       | ABC Transporter, ATP-Bindeprotein                                                    |                       |
| -          | -          | -          | -          | -          | -          | -               | TamO       | TreaN       | hypothetisches Protein                                                               |                       |



| <i>red</i>  | <i>mcp</i>  | <i>rph</i>  | <i>mar</i>  | <i>pig</i>  | <i>hap</i>                            | <i>P. rubra</i>       | <i>tam</i>  | <i>trea</i>  | Funktion                                                                                                                       | Rolle                               |
|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|---------------------------------------|-----------------------|-------------|--------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|
| RedI        | McpI        | RphI        | MarI        | PigF        | HapF                                  | WP_125559941.1        | TamP        | TreaO        | SAM-abhängige O-methyl Transferase                                                                                             | MBC (2)                             |
| <b>RedH</b> | <b>McpH</b> | <b>RphH</b> | <b>MarH</b> | <b>PigC</b> | <b>HapC</b>                           | <b>WP_125559948.1</b> | <b>TamQ</b> | <b>TreaP</b> | Kondensation                                                                                                                   | Kondensation                        |
| RedY        | –           | RphY        | MarY        | PigK        | HapK                                  | WP_010382568.1        | TamR        | TreaQ        | Unbekannte Funktion                                                                                                            | putativ MBC (2)                     |
| RedU        | –           | RphU        | MarU        | PigL        | HapL                                  | WP_125559931.1        | TamS        | TreaR        | Phosphopantetheinyl-Transferase                                                                                                | MBC (2)                             |
| –           | –           | –           | –           | –           | –                                     | –                     | TamT        | TreaS        | Acyl-CoA-Dehydrogenase                                                                                                         | DDA (28a)                           |
| –           | –           | –           | –           | –           | –                                     | –                     | –           | TreaT        | Phosphohistidin-Phosphatase                                                                                                    | Putativ nicht zum Cluster zugehörig |
| RedS        | –           | –           | –           | PigB        | WP_011399731.1 + WP_011399731.1, HapB | WP_125559950.1        | –           | –            | FAD-abhängige Oxidoreduktase (PigB, WP_011399731.1, HapB); hypothetisches Protein (RedS); NAD(P)-Bindeprotein (WP_125559950.1) | MAP (3a, PigB)                      |
| –           | –           | –           | –           | PigD        | HapD                                  | WP_125559946.1        | –           | –            | THDP-abhängige Carboligation                                                                                                   | MAP (3a)                            |
| RedF        | –           | –           | –           | PigN        | HapN                                  | WP_010386915.1        | –           | –            | Phospholipid-Methyltransferase                                                                                                 | putativ MBC (2)                     |
| RedD        | –           | RphD        | MarD        | –           | –                                     | –                     | –           | –            | Regulatorische Funktion                                                                                                        |                                     |
| RedE        | –           | –           | MarE        | –           | –                                     | –                     | –           | –            | Unbekannte Funktion                                                                                                            |                                     |
| RedJ        | –           | RphJ        | MarJ        | –           | –                                     | –                     | –           | –            | Unbekannte Funktion; putative Thioesterase (RphJ, MarJ, RedJ)                                                                  |                                     |
| RedK        | –           | RphK        | MarK        | –           | –                                     | –                     | –           | –            | NAD-abhängige Dehydratase                                                                                                      | 2-UP (27a)                          |
| RedL        | –           | RphL        | MarL        | –           | –                                     | –                     | –           | –            | Polyketidsynthase                                                                                                              | 2-UP (27a)                          |

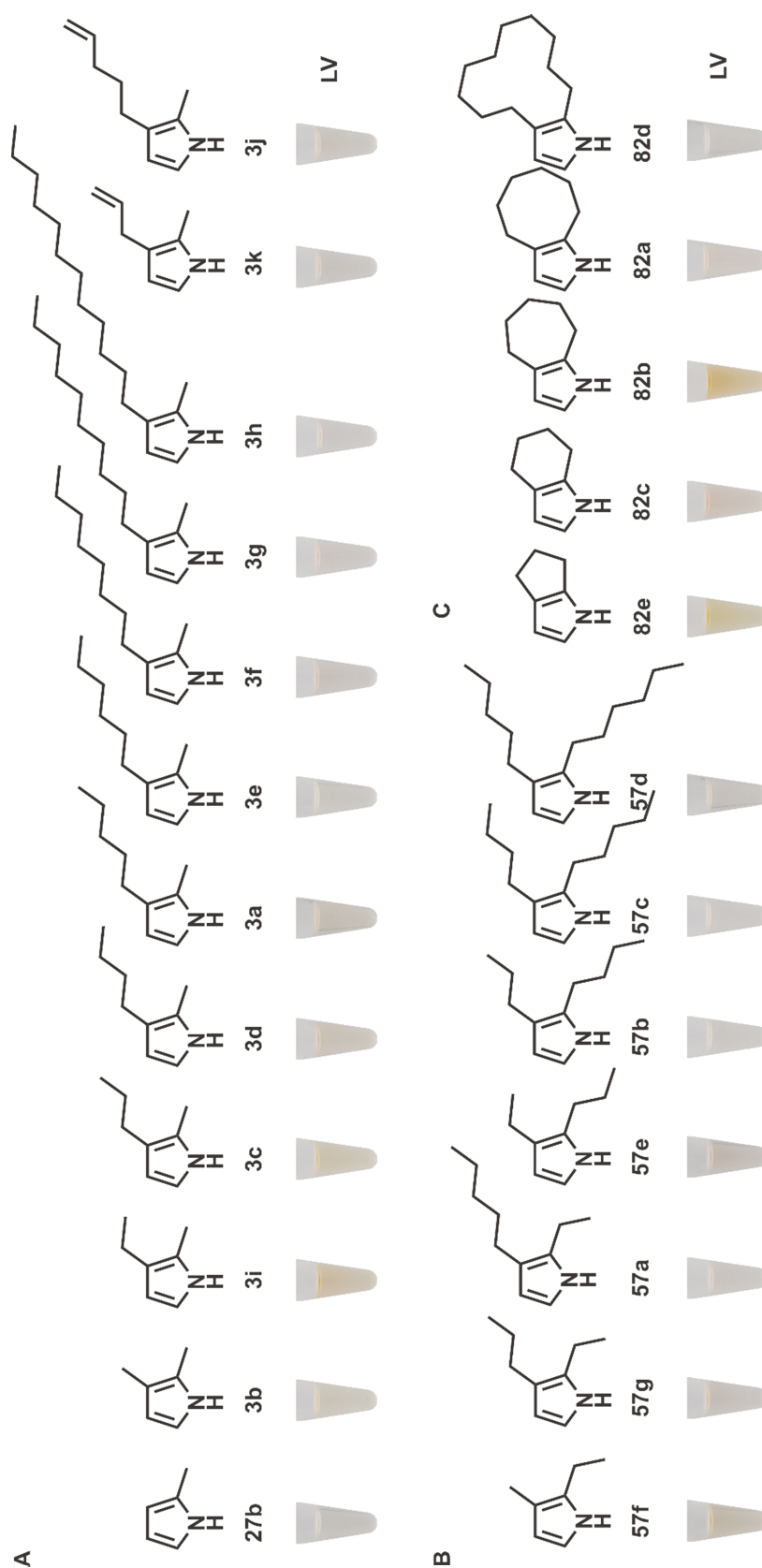
| <i>red</i> | <i>mcp</i> | <i>rph</i> | <i>mar</i> | <i>pig</i> | <i>hap</i> | <i>P. rubra</i> | <i>tam</i> | <i>trea</i> | Funktion                                        | Rolle                                          |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-----------------|------------|-------------|-------------------------------------------------|------------------------------------------------|
| RedP       | –          | RphP       | MarP       | –          | –          | –               | –          | –           | Ketosynthase                                    | 2-UP (27a)                                     |
| RedQ       | –          | –          | MarQ       | –          | –          | –               | –          | –           | Acyl-Carrier-Protein                            | 2-UP (27a)                                     |
| RedR       | –          | –          | MarR       | –          | –          | –               | –          | –           | Ketosynthase                                    | 2-UP (27a)                                     |
| RedT       | –          | RphT       | MarT       | –          | –          | –               | –          | –           | Unbekannte Funktion                             |                                                |
| RedZ       | –          | RphZ       | MarZ       | –          | –          | –               | –          | –           | Regulatorische Funktion                         |                                                |
| –          | –          | –          | MarA       | –          | –          | –               | –          | –           | Dehydrogenase                                   |                                                |
| –          | –          | RphA1      | –          | –          | –          | –               | –          | –           | putativer ABC-Transporter                       | außerhalb des <i>red</i> -Clusters lokalisiert |
| –          | –          | RphA2      | –          | –          | –          | –               | –          | –           | putatives ABC-Transporter ATP-Bindeprotein      | außerhalb des <i>red</i> -Clusters lokalisiert |
| –          | –          | RphA3      | –          | –          | –          | –               | –          | –           | putativer TetR-Familie Transkriptions Regulator | außerhalb des <i>red</i> -Clusters lokalisiert |
| –          | –          | RphB       | –          | –          | –          | –               | –          | –           | putative Thioesterase                           | Putativ Zyklisierung                           |
| –          | –          | RphG2      | –          | –          | –          | –               | –          | –           | putative <i>Rieske</i> Oxygenase                | Putativ Zyklisierung                           |
| –          | –          | RphG3      | –          | –          | –          | –               | –          | –           | putative <i>Rieske</i> Oxygenase                | Putativ Zyklisierung                           |
| –          | –          | RphG4      | –          | –          | –          | –               | –          | –           | putative <i>Rieske</i> Oxygenase                | Putativ Zyklisierung                           |

**Tabelle A 5.** Homologie der Enzyme, die in die Biosynthese von Undecylprodigiosin (**9a**), dessen Derivat Streptorubin B (**12**) bzw. den Tambjaminen **26a** und **26h** involviert sind, sowie die des Genclusters aus *S. albus* NRRL B-2362. Fett hervorgehoben sind die Kondensationsenzyme. Die Namen für die CDS wurden aus den NCBI Referenznummern abgeleitet. NCBI Referenz Sequenzen für Genome und *GenBank* Nummern: *S. albus* subsp. *albus* NRRL B-2362 contig4.1, whole genome shotgun sequence, NZ\_JODZ01000004.1; *S. coelicolor* A3(2) chromosome, complete genome, NC\_003888.3; *P. tunicata* strain D2 chromosome 1, complete sequence, NZ\_CP031961.1.<sup>[164-166, 289]</sup>

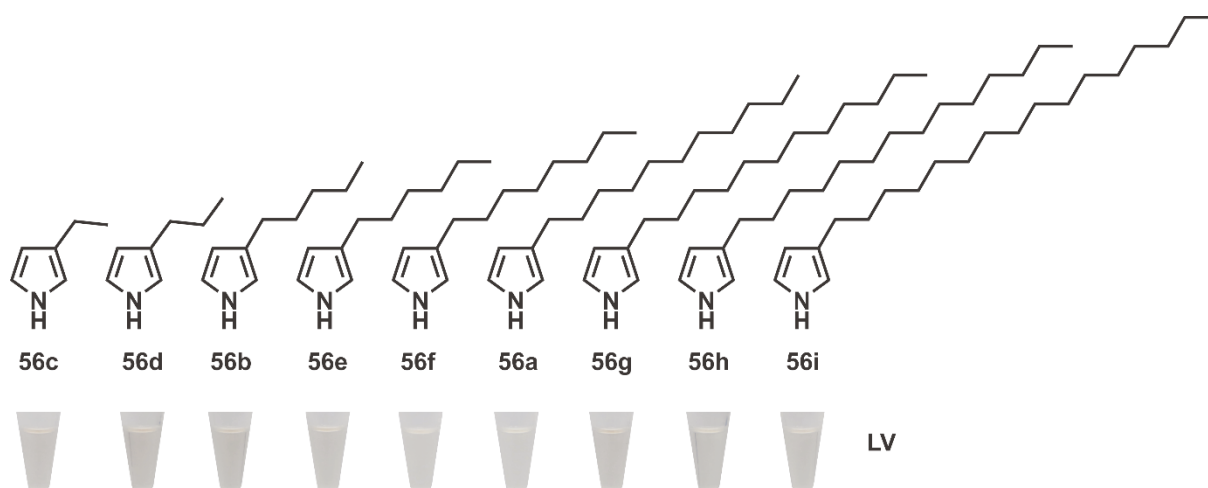
| <i>S. albus</i> NRRL B-2362 (26h) |                | <i>S. coelicolor</i> A3(2) (9a, 12) | <i>P. tunicata</i> D2 (26a) |                                                                                                  |                             |
|-----------------------------------|----------------|-------------------------------------|-----------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|
| Protein                           | CDS            | Protein                             | Protein                     | Funktion                                                                                         | Rolle                       |
| TabO                              | WP_016467644.1 | RedO                                | TamA                        | β-Ketoacyl-Synthase                                                                              | DDA ( <b>28a</b> )          |
| —                                 | —              | RedG                                | TamB                        | Peptidyl-Carrier Protein                                                                         | MBC ( <b>2</b> )            |
| TabN                              | WP_016467643.1 | RedN                                | TamC                        | <i>Rieske</i> Oxygenase                                                                          | Zyklisierung                |
| TabM                              | WP_051803379.1 | RedM                                | TamD                        | Aminotransferase                                                                                 | MBC ( <b>2</b> )            |
| TabX                              | WP_037611838.1 | RedX                                | TamE                        | L-Prolyl-AMP-Ligase                                                                              | MBC ( <b>2</b> )            |
| TabW                              | WP_106963666.1 | RedW                                | TamF                        | β-Ketoacyl-Synthase                                                                              | MBC ( <b>2</b> )            |
| —                                 | —              | —                                   | TamG                        | L-Prolyl-PCP-Dehydroge<br>nase                                                                   | MBC ( <b>2</b> )            |
| TabA                              | WP_078565688.1 | —                                   | TamH                        | Aminotransferase                                                                                 | DDA ( <b>28a</b> )          |
| TabV                              | WP_107410779.1 | RedV                                | TamJ                        | (HBC) Oxidase/<br>Dehydrogenase                                                                  | MBC ( <b>2</b> )            |
| —                                 | —              | —                                   | TamK                        | <i>Outer membrane<br/>lipoprotein-sorting<br/>Protein</i>                                        |                             |
| —                                 | —              | —                                   | TamL                        | ABC-Typ<br>Transportsystem,<br>involviert in Lipoprotein<br>Freisetzung, Permease<br>Bestandteil |                             |
| —                                 | —              | —                                   | TamM                        | ABC-Typ<br>Transportsystem,<br>involviert in Lipoprotein<br>Freisetzung, Permease<br>Bestandteil |                             |
| —                                 | —              | —                                   | TamN                        | ABC-Transporter,<br>ATP-Bindeprotein                                                             |                             |
| —                                 | —              | —                                   | TamO                        | hypothetisches Protein                                                                           |                             |
| TabI                              | WP_037611836.1 | RedI                                | TamP                        | SAM-abhängige<br><i>O</i> -Methyltransferase                                                     | MBC ( <b>2</b> )            |
| <b>TabH</b>                       | WP_037611834.1 | <b>RedH</b>                         | <b>TamQ</b>                 | Kondensation                                                                                     | Kondensa-<br>tion           |
| TabY                              | WP_016467647.1 | RedY                                | TamR                        | unbekannte Funktion                                                                              | hypo-<br>thetisch           |
| TabU                              | WP_041968511.1 | RedU                                | TamS                        | Phosphopantetheinyl-<br>Transferase                                                              | MBC ( <b>2</b> )            |
| —                                 | —              | —                                   | TamT                        | Acyl-CoA-<br>Dehydrogenase                                                                       | DDA ( <b>28a</b> )          |
| —                                 | —              | RedS                                | —                           | hypothetisches Protein,<br>Homologie zu PigB                                                     | MAP ( <b>3a</b> )<br>(PigB) |
| —                                 | —              | RedF                                | —                           | Phospholipid-<br>Methyltransferase                                                               | hypothe-<br>tisch           |
| TabD                              | WP_016467654.1 | RedD                                | —                           | Regulatorische Funktion                                                                          | MBC ( <b>2</b> )            |
| —                                 | —              | RedE                                | —                           | unbekannte Funktion                                                                              |                             |
| TabJ                              | WP_106963665.1 | RedJ                                | —                           | unbekannte Funktion;<br>putative Thioesterase                                                    |                             |

# Anhang

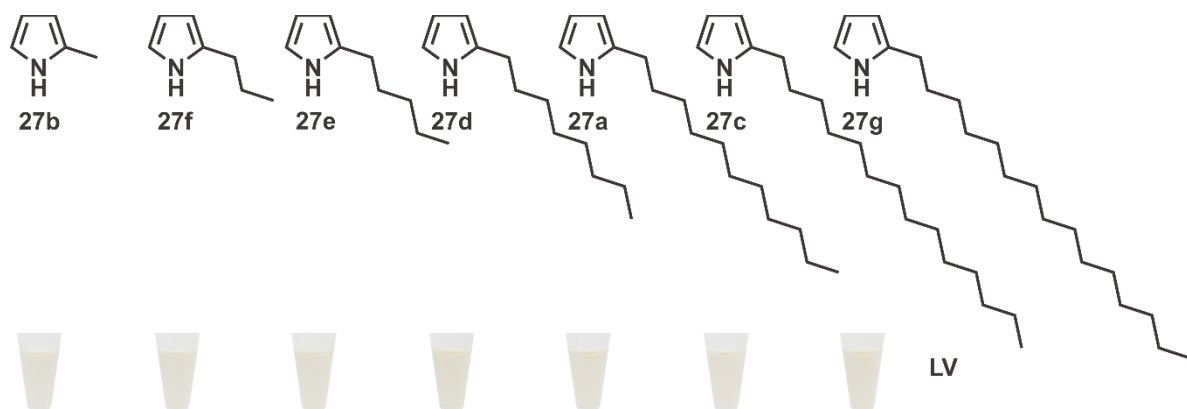
|      |                |      |   |                                              |                     |
|------|----------------|------|---|----------------------------------------------|---------------------|
| —    | —              | RedK | — | NAD-abhängige<br>Dehydratase                 | 2-UP ( <b>27a</b> ) |
| —    | —              | RedL | — | Polyketidsynthase                            | 2-UP ( <b>27a</b> ) |
| TabP | WP_016467650.1 | RedP | — | Ketosynthase                                 | 2-UP ( <b>27a</b> ) |
| TabQ | WP_016467649.1 | RedQ | — | Acyl-Carrier-Protein                         | 2-UP ( <b>27a</b> ) |
| TabR | WP_016467648.1 | RedR | — | Ketosynthase                                 | 2-UP ( <b>27a</b> ) |
| —    | —              | RedT | — | unbekannte Funktion                          |                     |
| —    | —              | RedZ | — | regulatorische Funktion                      |                     |
| TabC | WP_016467651.1 | —    | — | hypothetisches Protein<br>(putative Cyclase) | DA ( <b>28b</b> )   |
| TabE | WP_031174883.1 | —    | — | Aldehyd-<br>Dehydrogenase                    | DA ( <b>28b</b> )   |

9.2 *In vitro* Assays

**Abbildung A 1.** *In vitro* Assays mit pET28a(+) Leervektor. [Es wurde Zelllysate genutzt; Assaybedingungen: 1 mM MBC (**2**), 1 mM Pyrrole **3a–3j**, **27b**, **57a–57g**, **82a–82e**, 1.25 mM ATP,  $\text{KPi}$ -Puffer (50 mM, pH 7.0), 10% (v/v) DMSO, 30 °C, 4 h, 300 rpm, 500  $\mu\text{L}$  Assayvolumen].

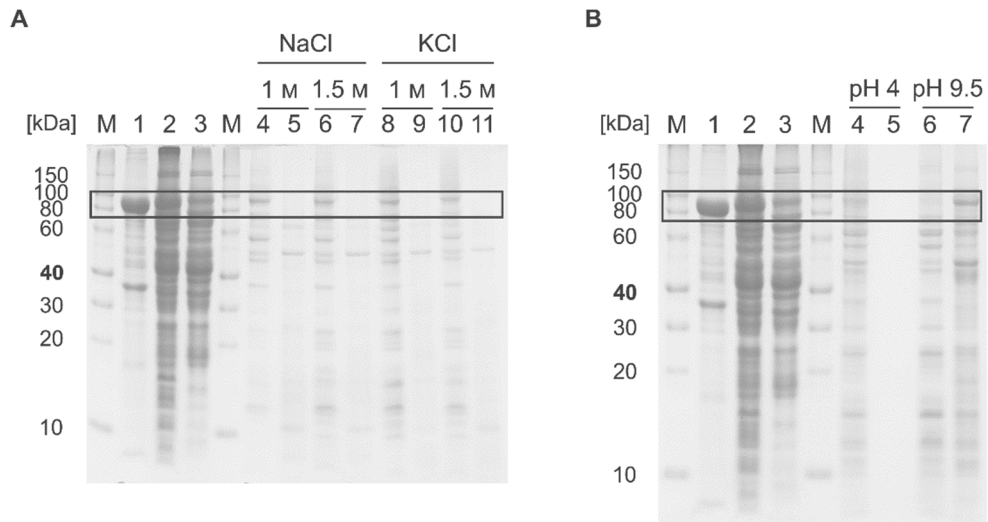


**Abbildung A 2.** *In vitro* Assays mit pET28a(+) Leervektor. [Es wurde Zelllysat genutzt; Assaybedingungen: 1 mM MBC (**2**), 1 mM Pyrrol **56a–56i**, 1.25 mM ATP,  $\text{KPi}$ -Puffer (50 mM, pH 7.0), 10% (v/v) DMSO, 30°C, 4 h, 300 rpm, 500  $\mu\text{L}$  Assayvolumen].

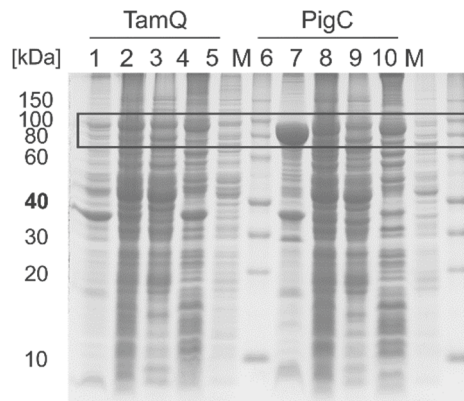


**Abbildung A 3.** *In vitro* Assays mit pET28a(+) Leervektor. Die hier dargestellten Ergebnisse wurden von B. Sc. *Annabel Arens* im Rahmen ihrer Bachelorarbeit erhalten und die Abbildung entstand in Anlehnung an ihre Arbeit.<sup>[259]</sup> [Es wurde Zelllysat genutzt; Assaybedingungen: 1 mM MBC (**2**), 1 mM Pyrrol **27a–27g**, 1.25 mM ATP,  $\text{KPi}$ -Puffer (50 mM, pH 7.0), 10% (v/v) DMSO, 30°C, 4 h, 300 rpm, 500  $\mu\text{L}$  Assayvolumen].

### 9.3 Extraktion der Kondensationsenzyme TamQ und PigC von der Zellmembran

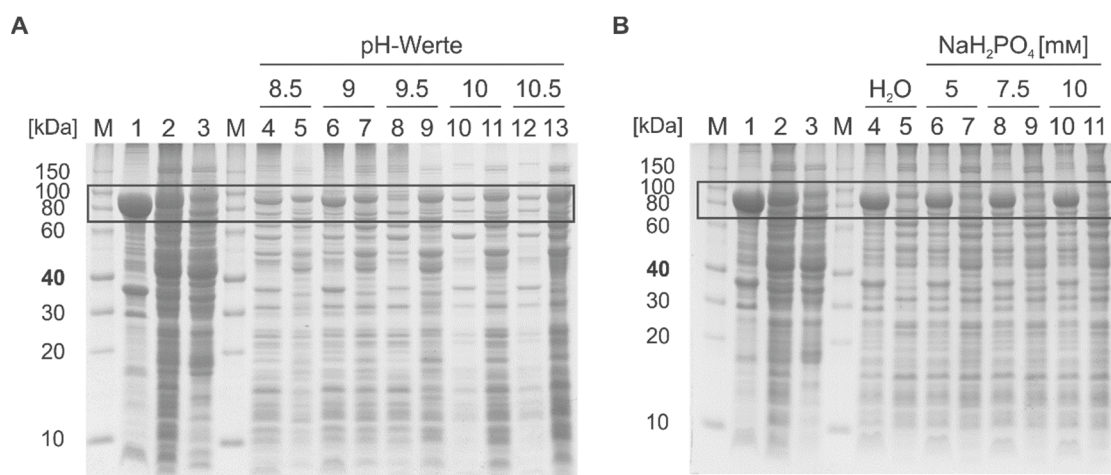


**Abbildung A 4.** SDS-PAGE Analyse zur Extraktion von PigC (99 kDa) aus der Membranfraktion. **A:** Extraktion mit Lösungen hoher Ionenstärke. [M = Marker (Roti®-Mark 10–150), 1 = Pellet; 2 = CFE; 3 = Überstand, UZ; 4, 6, 8, 10 = Pellet nach Extraktion mit Lösungen hoher Ionenstärke und UZ; 5, 7, 9, 11 = Überstand nach Extraktion mit Lösungen hoher Ionenstärke und UZ]. **B:** Extraktion mit alkalischem und saurem Puffer. [M = Marker (Roti®-Mark 10–150), 1 = Pellet; 2 = CFE; 3 = Überstand nach UZ, 4, 6 = Pellet nach Extraktion mit Puffer und UZ; 5, 7 = Überstand nach Extraktion mit Puffer und UZ].



**Abbildung A 5.** SDS-PAGE Analyse des Kontrolllexperiments zur Extraktion von PigC (99 kDa) und TamQ (101 kDa) aus der Membranfraktion. Die Extraktion wurde mit 50 mM  $\text{KP}_i$ -Puffer pH 7 durchgeführt. [M = Marker (Roti®-Mark 10–150); 1 = Pellet; 2 = CFE; 3 = Überstand nach Ultrazentrifugation (UZ); 4 = Pellet nach UZ; 5 = Überstand nach Extraktion mit 50 mM  $\text{KP}_i$ -Puffer pH 7 und UZ; 6 = Pellet; 7 = CFE; 8 = Überstand nach Ultrazentrifugation (UZ); 9 = Pellet nach UZ; 10 = Überstand nach Extraktion mit 50 mM  $\text{KP}_i$ -Puffer pH 7 und UZ]





**Abbildung A 6.** SDS-PAGE Analyse zur Extraktion von PigC (99 kDa) aus der Membranfraktion. **A:** Extraktion mit Puffern verschiedener pH-Werte (pH 8.5 und pH 9: 100 mM TRIS-HCl; pH 9.5, 10 und 10.5: 100 mM NaHCO<sub>3</sub>/Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>). [M = Marker (Roti®-Mark 10–150), 1 = Pellet; 2 = CFE; 3 = Überstand, UZ; 4, 6, 8, 10, 12 = Pellet nach Extraktion mit Puffer und UZ; 5, 7, 9, 11, 13 = Überstand nach Extraktion mit Puffer und UZ]. **B:** Extraktion dest. H<sub>2</sub>O, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Lösung. [M = Marker (Roti®-Mark 10–150), 1 = Pellet; 2 = CFE; 3 = Überstand, UZ, 4, 6, 8, 10 = Pellet nach Extraktion und UZ; 5, 7, 9, 11 = Überstand nach Extraktion und UZ].

## 9.4 Rohdaten der Optimierung der Kultivierungsparameter

**Tabelle A 6.** Rohdaten der *Design of Experiment* Untersuchungen zur Optimierung der Kultivierungsparameter für eine hohe Prodigiosin (**1a**) Produktion. [Daten für Kultivierungstemperatur von 20–37 °C].

| Temperatur [°C] | Glucose [g/L] | Minimalmedium | Prodigiosin ( <b>1a</b> ) [mg/L <sub>Kultur</sub> ] |
|-----------------|---------------|---------------|-----------------------------------------------------|
| 20              | 10            | Delft         | 43.6                                                |
| 20              | 10            | Delft         | 40.7                                                |
| 20              | 10            | M9            | 7.74                                                |
| 20              | 10            | M9            | 5.95                                                |
| 20              | 10            | M63           | 68.6                                                |
| 20              | 10            | M63           | 63.0                                                |
| 20              | 10            | Wilms-MOPS    | 33.9                                                |
| 20              | 10            | Wilms-MOPS    | 28.0                                                |
| 23              | 5.0           | Delft         | 75.6                                                |
| 23              | 5.0           | Delft         | 71.5                                                |
| 23              | 15            | Delft         | 81.5                                                |
| 23              | 15            | Delft         | 74.0                                                |
| 23              | 5.0           | M9            | 3.4                                                 |
| 23              | 5.0           | M9            | 3.3                                                 |
| 23              | 15            | M9            | 7.9                                                 |
| 23              | 15            | M9            | 9.3                                                 |
| 23              | 5.0           | M63           | 47.0                                                |
| 23              | 5.0           | M63           | 47.3                                                |
| 23              | 15            | M63           | 126                                                 |
| 23              | 15            | M63           | 188                                                 |
| 23              | 5.0           | Wilms-MOPS    | 40.7                                                |
| 23              | 5.0           | Wilms-MOPS    | 38.7                                                |
| 23              | 15            | Wilms-MOPS    | 67.9                                                |
| 23              | 15            | Wilms-MOPS    | 71.3                                                |
| 29              | 2.5           | Delft         | 2.15                                                |
| 29              | 2.5           | Delft         | 2.89                                                |
| 29              | 20            | Delft         | 27.4                                                |
| 29              | 20            | Delft         | 27.1                                                |
| 29              | 10            | Delft         | 36.0                                                |
| 29              | 10            | Delft         | 35.0                                                |
| 29              | 10            | Delft         | 31.7                                                |
| 29              | 10            | Delft         | 34.2                                                |
| 29              | 10            | Delft         | 35.0                                                |
| 29              | 2.5           | M9            | 0.68                                                |
| 29              | 2.5           | M9            | 0.68                                                |
| 29              | 20            | M9            | 94.1                                                |
| 29              | 20            | M9            | 112                                                 |
| 29              | 10            | M9            | 43.2                                                |
| 29              | 10            | M9            | 42.0                                                |
| 29              | 10            | M9            | 48.5                                                |
| 29              | 10            | M9            | 46.5                                                |
| 29              | 10            | M9            | 55.9                                                |
| 29              | 2.5           | M63           | 4.23                                                |
| 29              | 2.5           | M63           | 3.40                                                |
| 29              | 20            | M63           | 52.9                                                |
| 29              | 20            | M63           | 75.7                                                |
| 29              | 10            | M63           | 61.2                                                |
| 29              | 10            | M63           | 59.1                                                |
| 29              | 10            | M63           | 53.4                                                |
| 29              | 10            | M63           | 51.5                                                |
| 29              | 10            | M63           | 48.1                                                |
| 29              | 2.5           | Wilms-MOPS    | 1.62                                                |

## Anhang

|       |     |            |      |
|-------|-----|------------|------|
| 29    | 2.5 | Wilms-MOPS | 1.53 |
| 29    | 20  | Wilms-MOPS | 10.3 |
| 29    | 20  | Wilms-MOPS | 15.3 |
| 29    | 10  | Wilms-MOPS | 12.5 |
| 29    | 10  | Wilms-MOPS | 14.0 |
| 29    | 10  | Wilms-MOPS | 13.4 |
| 29    | 10  | Wilms-MOPS | 12.2 |
| 29    | 10  | Wilms-MOPS | 12.0 |
| <hr/> |     |            |      |
| 35    | 5.0 | Delft      | 22.6 |
| 35    | 5.0 | Delft      | 17.1 |
| 35    | 15  | Delft      | 27.9 |
| 35    | 15  | Delft      | 24.6 |
| 35    | 5.0 | M9         | 1.16 |
| 35    | 5.0 | M9         | 1.09 |
| 35    | 15  | M9         | 3.96 |
| 35    | 15  | M9         | 4.21 |
| 35    | 5.0 | M63        | 2.02 |
| 35    | 5.0 | M63        | 2.28 |
| 35    | 15  | M63        | 5.49 |
| 35    | 15  | M63        | 5.14 |
| 35    | 5.0 | Wilms-MOPS | 2.09 |
| 35    | 5.0 | Wilms-MOPS | 1.97 |
| 35    | 15  | Wilms-MOPS | 8.80 |
| 35    | 15  | Wilms-MOPS | 8.08 |
| <hr/> |     |            |      |
| 37    | 10  | Delft      | 15.5 |
| 37    | 10  | Delft      | 16.9 |
| 37    | 10  | M9         | 3.01 |
| 37    | 10  | M9         | 2.91 |
| 37    | 10  | M63        | 4.81 |
| 37    | 10  | M63        | 6.45 |
| 37    | 10  | Wilms-MOPS | 2.84 |
| 37    | 10  | Wilms-MOPS | 2.78 |

**Tabelle A 7.** Rohdaten der *Design of Experiment* Untersuchungen zur Optimierung der Kultivierungsparameter für eine hohe Prodigiosin (**1a**) Produktion. [Daten für Kultivierungstemperatur von 18 °C].

| Temperatur [°C] | Glucose [g/L] | Minimalmedium | Prodigiosin ( <b>1a</b> ) [mg/L <sub>Kultur</sub> ] |
|-----------------|---------------|---------------|-----------------------------------------------------|
| 18              | 2.5           | Delft         | 1.22                                                |
| 18              | 2.5           | Delft         | 1.38                                                |
| 18              | 2.5           | M9            | 16.7                                                |
| 18              | 2.5           | M9            | 17.0                                                |
| 18              | 2.5           | M63           | 2.87                                                |
| 18              | 2.5           | M63           | 2.94                                                |
| 18              | 2.5           | Wilms-MOPS    | 0.53                                                |
| 18              | 2.5           | Wilms-MOPS    | 0.37                                                |
| 18              | 5.0           | Delft         | 73.4                                                |
| 18              | 5.0           | Delft         | 75.7                                                |
| 18              | 5.0           | M9            | 35.0                                                |
| 18              | 5.0           | M9            | 37.3                                                |
| 18              | 5.0           | M63           | 82.1                                                |
| 18              | 5.0           | M63           | 49.9                                                |
| 18              | 5.0           | Wilms-MOPS    | 1.37                                                |
| 18              | 5.0           | Wilms-MOPS    | 1.49                                                |
| 18              | 10            | Delft         | 174                                                 |
| 18              | 10            | Delft         | 162                                                 |
| 18              | 10            | M9            | 78.9                                                |
| 18              | 10            | M9            | 69.2                                                |
| 18              | 10            | M63           | 160                                                 |
| 18              | 10            | M63           | 218                                                 |
| 18              | 10            | Wilms-MOPS    | 10.7                                                |
| 18              | 10            | Wilms-MOPS    | 8.49                                                |
| 18              | 15            | Delft         | 63.1                                                |
| 18              | 15            | Delft         | 222                                                 |
| 18              | 15            | M9            | 67.6                                                |
| 18              | 15            | M9            | 58.3                                                |
| 18              | 15            | M63           | 305                                                 |
| 18              | 15            | M63           | 364                                                 |
| 18              | 15            | Wilms-MOPS    | 32.1                                                |
| 18              | 15            | Wilms-MOPS    | 96.6                                                |
| 18              | 20            | Delft         | 300                                                 |
| 18              | 20            | Delft         | 151                                                 |
| 18              | 20            | M9            | 58.6                                                |
| 18              | 20            | M9            | 57.2                                                |
| 18              | 20            | M63           | 76.0                                                |
| 18              | 20            | M63           | 85.7                                                |
| 18              | 20            | Wilms-MOPS    | 51.0                                                |
| 18              | 20            | Wilms-MOPS    | 51.2                                                |

**Tabelle A 8.** Mittelwert und Standardabweichung der hochgerechneten Menge an Prodigiosin (**1a**) in mg pro Liter Kulturvolumen. Die Daten stammen aus den *Design of Experiment* Untersuchungen zur Optimierung der Kultivierungsparameter für eine hohe Prodigiosin (**1a**) Produktion.

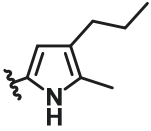
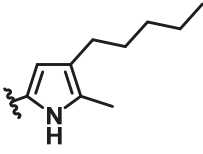
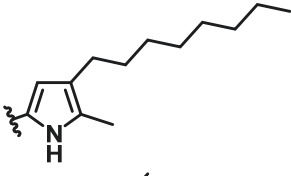
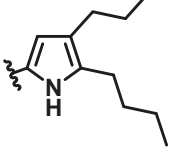
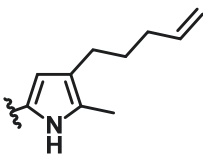
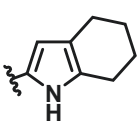
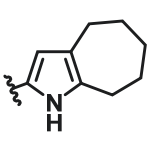
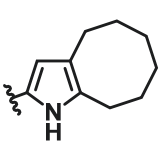
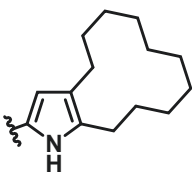
| Temperatur [°C] | Glucose [g/L] | Minimalmedium | Prodigiosin ( <b>1a</b> ) [mg/L <sub>Kultur</sub> ] | Standardabweichung [mg/L <sub>Kultur</sub> ] |
|-----------------|---------------|---------------|-----------------------------------------------------|----------------------------------------------|
| 18              | 2.5           | Delft         | 1.30                                                | 0.1                                          |
| 18              | 2.5           | M9            | 16.9                                                | 0.2                                          |
| 18              | 2.5           | M63           | 2.91                                                | 0.1                                          |
| 18              | 2.5           | Wilms-MOPS    | 0.45                                                | 0.1                                          |
| 18              | 5.0           | Delft         | 74.5                                                | 1.6                                          |
| 18              | 5.0           | M9            | 36.1                                                | 1.6                                          |

# Anhang

|    |     |            |      |     |
|----|-----|------------|------|-----|
| 18 | 5.0 | M63        | 66.0 | 23  |
| 18 | 5.0 | Wilms-MOPS | 1.43 | 0.1 |
| 18 | 10  | Delft      | 168  | 8.1 |
| 18 | 10  | M9         | 74.0 | 6.8 |
| 18 | 10  | M63        | 189  | 41  |
| 18 | 10  | Wilms-MOPS | 9.59 | 1.6 |
| 18 | 15  | Delft      | 143  | 112 |
| 18 | 15  | M9         | 62.9 | 6.6 |
| 18 | 15  | M63        | 334  | 41  |
| 18 | 15  | Wilms-MOPS | 64.3 | 46  |
| 18 | 20  | Delft      | 226  | 105 |
| 18 | 20  | M9         | 57.9 | 1.0 |
| 18 | 20  | M63        | 80.8 | 6.8 |
| 18 | 20  | Wilms-MOPS | 51.1 | 0.2 |
| 20 | 10  | Delft      | 42.1 | 2.0 |
| 20 | 10  | M9         | 6.84 | 1.3 |
| 20 | 10  | M63        | 65.8 | 3.9 |
| 20 | 10  | Wilms-MOPS | 30.9 | 4.1 |
| 23 | 5.0 | Delft      | 73.5 | 2.9 |
| 23 | 15  | Delft      | 77.8 | 5.3 |
| 23 | 5.0 | M9         | 3.34 | 0.1 |
| 23 | 15  | M9         | 8.60 | 1.0 |
| 23 | 5.0 | M63        | 47.2 | 0.2 |
| 23 | 15  | M63        | 157  | 44  |
| 23 | 5.0 | Wilms-MOPS | 39.7 | 1.4 |
| 23 | 15  | Wilms-MOPS | 69.6 | 2.4 |
| 29 | 2.5 | Delft      | 2.52 | 0.5 |
| 29 | 20  | Delft      | 27.3 | 0.2 |
| 29 | 10  | Delft      | 34.4 | 1.6 |
| 29 | 2.5 | M9         | 0.68 | 0.0 |
| 29 | 20  | M9         | 104  | 13  |
| 29 | 10  | M9         | 47.2 | 5.5 |
| 29 | 2.5 | M63        | 3.82 | 0.6 |
| 29 | 20  | M63        | 64.3 | 16  |
| 29 | 10  | M63        | 54.8 | 5.6 |
| 29 | 2.5 | Wilms-MOPS | 1.57 | 0.1 |
| 29 | 20  | Wilms-MOPS | 12.8 | 3.5 |
| 29 | 10  | Wilms-MOPS | 12.8 | 0.8 |
| 35 | 5.0 | Delft      | 19.8 | 3.9 |
| 35 | 15  | Delft      | 26.3 | 2.3 |
| 35 | 5.0 | M9         | 1.12 | 0.1 |
| 35 | 15  | M9         | 4.08 | 0.2 |
| 35 | 5.0 | M63        | 2.15 | 0.2 |
| 35 | 15  | M63        | 5.31 | 0.2 |
| 35 | 5.0 | Wilms-MOPS | 2.03 | 0.1 |
| 35 | 15  | Wilms-MOPS | 8.44 | 0.5 |
| 37 | 10  | Delft      | 16.2 | 1.0 |
| 37 | 10  | M9         | 2.96 | 0.1 |
| 37 | 10  | M63        | 5.63 | 1.2 |
| 37 | 10  | Wilms-MOPS | 2.81 | 0.0 |

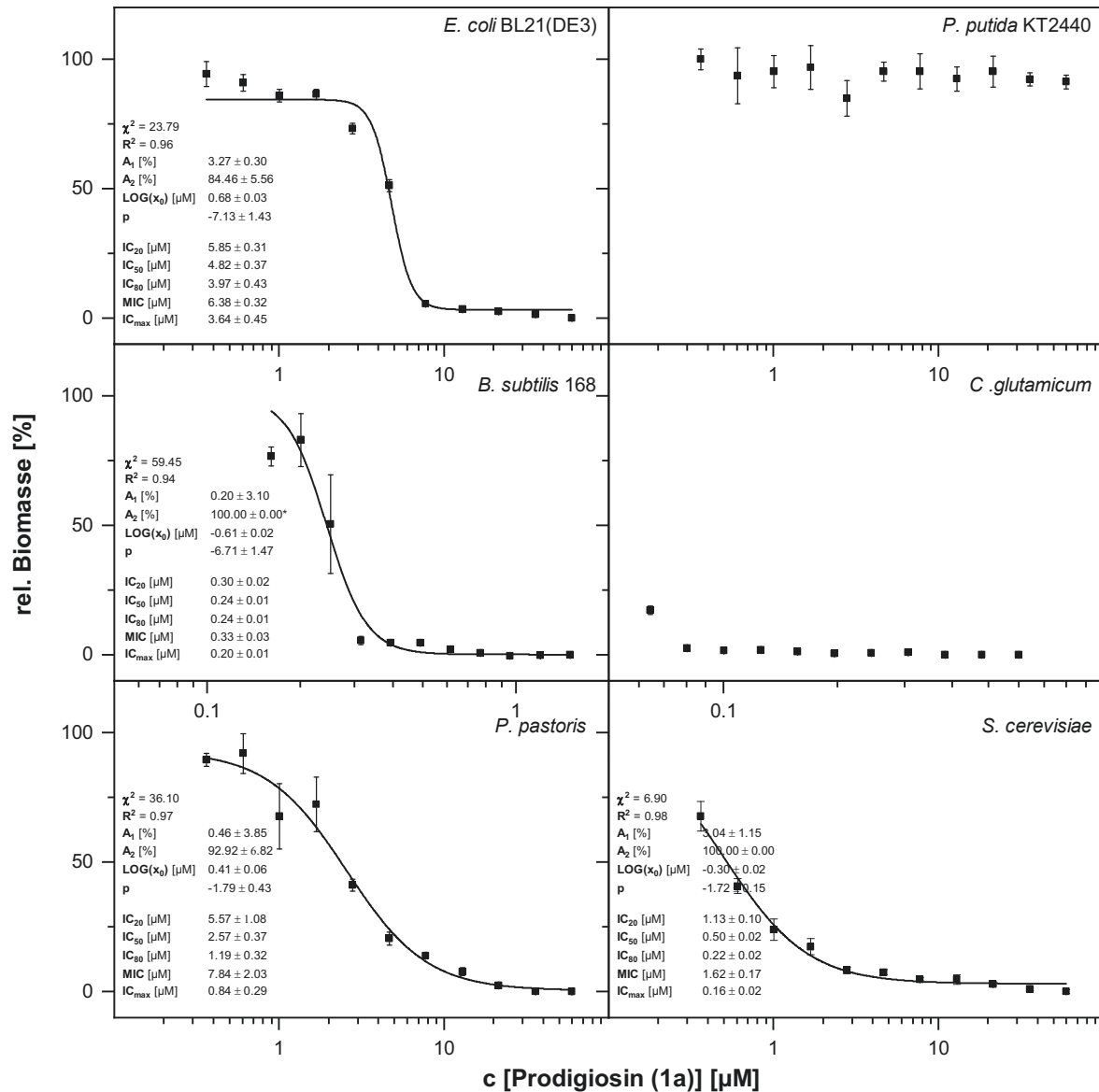
## 9.5 Toxizitätsassays

**Tabelle A 9.** Ergebnisse der Toxizitätsassays mit den Prodigininen **1a**, **1c**, **1f**, **1j**, **58b**, **110a–110d**. Aufgelistet sind die Werte für MIC und IC<sub>50</sub>. [n.b. = nicht bestimmt]

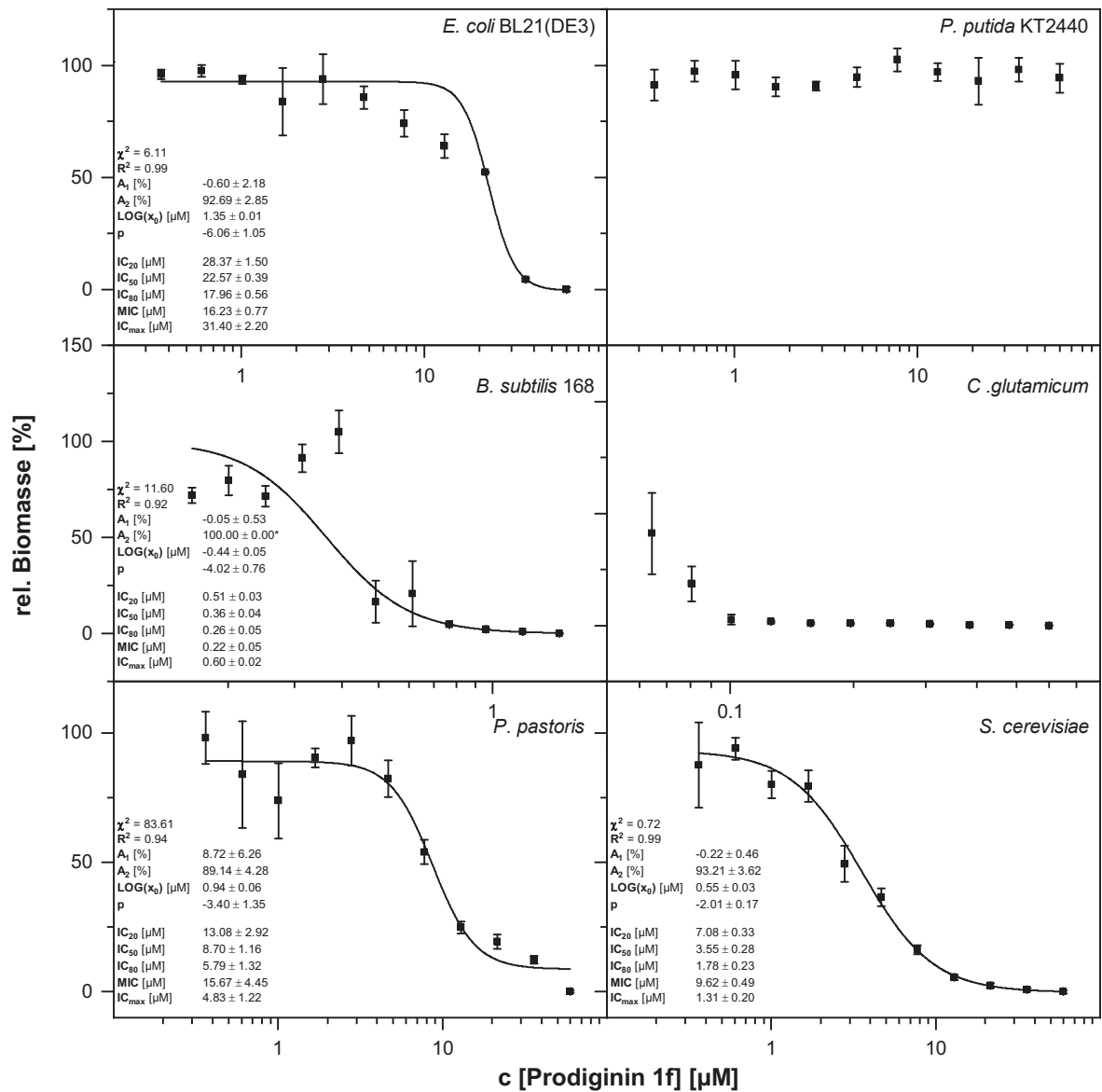
| Prodiginin                                                                          |             | <i>C. glutamicum</i><br>MIC/IC <sub>50</sub><br>[μM]       | <i>B. subtilis</i> 168<br>MIC/IC <sub>50</sub><br>[μM]     | <i>E. coli</i> BL21(DE3)<br>MIC/IC <sub>50</sub><br>[μM]     | <i>P. putida</i> KT2440<br>MIC/IC <sub>50</sub><br>[μM] |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------|------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|
|    | <b>1c</b>   | n.b.<br>> 0.1 kein Wachstum <sup>[a]</sup>                 | 0.40 ± 0.03 <sup>[a]</sup> /<br>0.34 ± 0.04 <sup>[a]</sup> | 3.45 ± 0.38 <sup>[a]</sup> /<br>2.22 ± 0.40 <sup>[a]</sup>   | n.b.<br>keine Inhibition des Wachstums <sup>[a]</sup>   |
|    | <b>1a</b>   | n.b.<br>> 0.1 kein Wachstum <sup>[a]</sup>                 | 0.33 ± 0.03 <sup>[a]</sup> /<br>0.24 ± 0.01 <sup>[a]</sup> | 6.38 ± 0.32 <sup>[a]</sup> /<br>4.82 ± 0.37 <sup>[a]</sup>   | n.b.<br>keine Inhibition des Wachstums <sup>[a]</sup>   |
|    | <b>1f</b>   | n.b.<br>> 0.1 kein Wachstum <sup>[a]</sup>                 | 0.22 ± 0.05 <sup>[a]</sup> /<br>0.36 ± 0.04 <sup>[a]</sup> | 16.23 ± 0.77 <sup>[a]</sup> /<br>22.57 ± 0.39 <sup>[a]</sup> | n.b.<br>keine Inhibition des Wachstums <sup>[a]</sup>   |
|   | <b>58b</b>  | n.b.<br>> 0.1 kein Wachstum <sup>[a]</sup>                 | 0.20 ± 0.02 <sup>[a]</sup> /<br>0.24 ± 0.01 <sup>[a]</sup> | 4.67 ± 0.71 <sup>[a]</sup> /<br>7.35 ± 0.67 <sup>[a]</sup>   | n.b.<br>keine Inhibition des Wachstums <sup>[a]</sup>   |
|  | <b>1j</b>   | n.b.<br>> 0.1 kein Wachstum <sup>[a]</sup>                 | 0.50 ± 0.05 <sup>[a]</sup> /<br>0.46 ± 0.07 <sup>[a]</sup> | 4.87 ± 0.58 <sup>[a]</sup> /<br>2.67 ± 0.52 <sup>[a]</sup>   | n.b.<br>keine Inhibition des Wachstums <sup>[a]</sup>   |
|  | <b>110c</b> | 0.37 ± 0.01 <sup>[b]</sup> /<br>0.26 ± 0.01 <sup>[b]</sup> | 1.21 ± 0.06 <sup>[b]</sup> /<br>1.07 ± 0.05 <sup>[b]</sup> | 8.30 ± 0.24 <sup>[b]</sup> /<br>6.16 ± 0.15 <sup>[b]</sup>   | n.b.<br>keine Inhibition des Wachstums <sup>[b]</sup>   |
|  | <b>110b</b> | 0.30 ± 0.01 <sup>[b]</sup> /<br>0.24 ± 0.01 <sup>[b]</sup> | 1.12 ± 0.03 <sup>[b]</sup> /<br>0.93 ± 0.03 <sup>[b]</sup> | 8.12 ± 0.27 <sup>[b]</sup> /<br>5.88 ± 0.27 <sup>[b]</sup>   | n.b.<br>keine Inhibition des Wachstums <sup>[b]</sup>   |
|  | <b>110a</b> | 0.18 ± 0.01 <sup>[b]</sup> /<br>0.14 ± 0.00 <sup>[b]</sup> | 0.78 ± 0.02 <sup>[b]</sup> /<br>0.63 ± 0.03 <sup>[b]</sup> | 6.17 ± 0.51 <sup>[b]</sup> /<br>5.03 ± 0.14 <sup>[b]</sup>   | n.b.<br>keine Inhibition des Wachstums <sup>[b]</sup>   |
|  | <b>110d</b> | 0.14 ± 0.01 <sup>[b]</sup> /<br>0.11 ± 0.00 <sup>[b]</sup> | 0.59 ± 0.01 <sup>[b]</sup> /<br>0.49 ± 0.02 <sup>[b]</sup> | 12.09 ± 0.77 <sup>[b]</sup> /<br>8.66 ± 0.28 <sup>[b]</sup>  | n.b.<br>keine Inhibition des Wachstums <sup>[b]</sup>   |

<sup>[a]</sup>Daten entstammen der Dissertation von Dr. *Andreas S. Klein* und sind zu Vergleichszwecken hier aufgeführt<sup>[17]</sup>

<sup>[b]</sup>Daten entstammen der Masterarbeit von M. Sc. *David P. Klebl* und sind zu Vergleichszwecken hier aufgeführt<sup>[248]</sup>

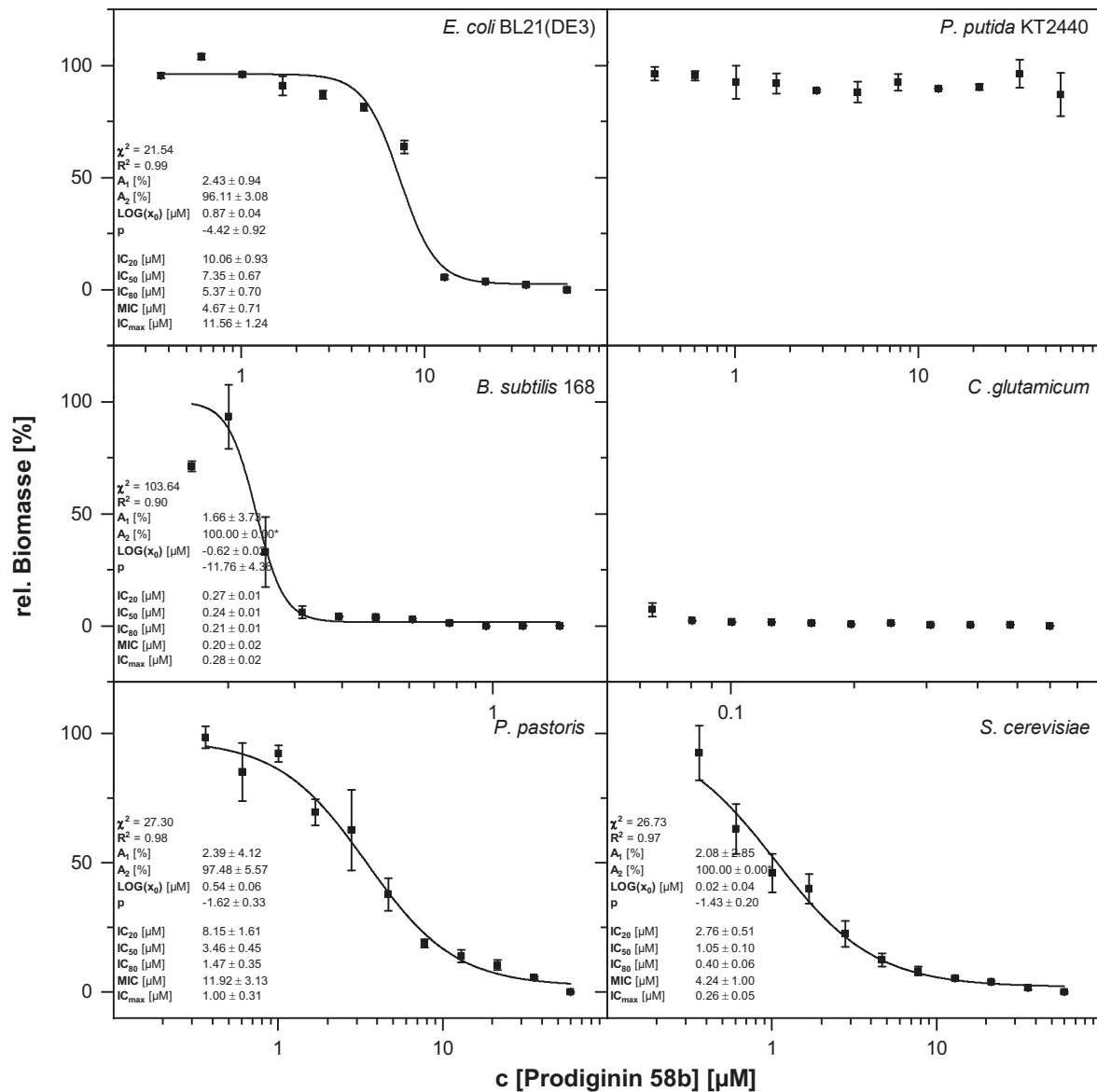


**Abbildung A 7.** Ergebnisse des Toxizitätsassays für Prodigiosin (1a). Die Ergebnisse zu *E. coli* BL21(DE3), *P. putida* KT2440, *B. subtilis* 168 und *C. glutamicum* entstammen der Dissertation von Dr. Andreas S. Klein.<sup>[17]</sup> Die Ergebnisse zu *P. pastoris* und *S. cerevisiae* sind im Rahmen dieser Arbeit entstanden.

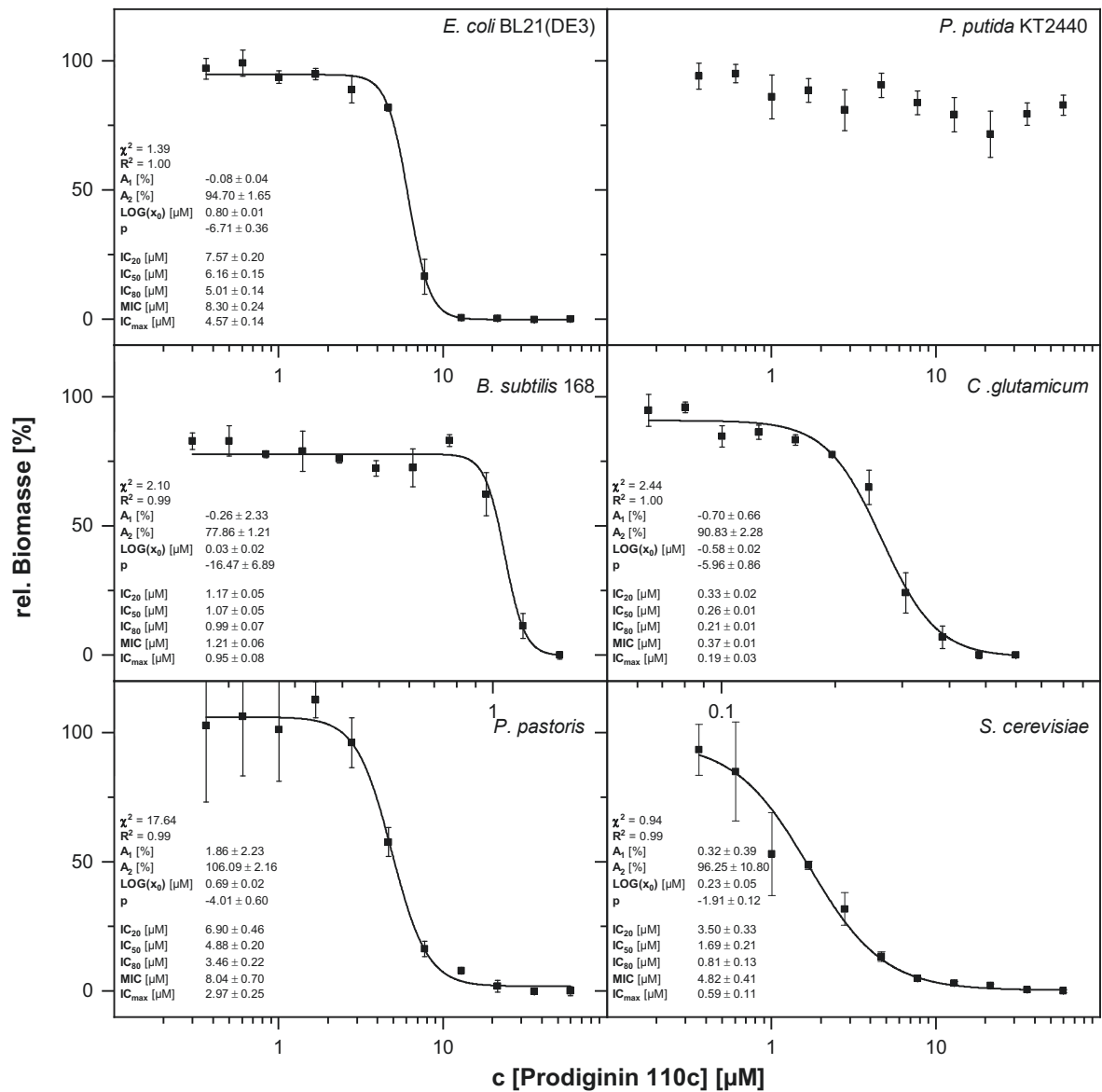


**Abbildung A 8.** Ergebnisse des Toxizitätsassays für Prodiginin **1f**. Die Ergebnisse zu *E. coli* BL21(DE3), *P. putida* KT2440, *B. subtilis* 168 und *C. glutamicum* entstammen der Dissertation von Dr. Andreas S. Klein.<sup>[17]</sup> Die Ergebnisse zu *P. pastoris* und *S. cerevisiae* sind im Rahmen dieser Arbeit entstanden.

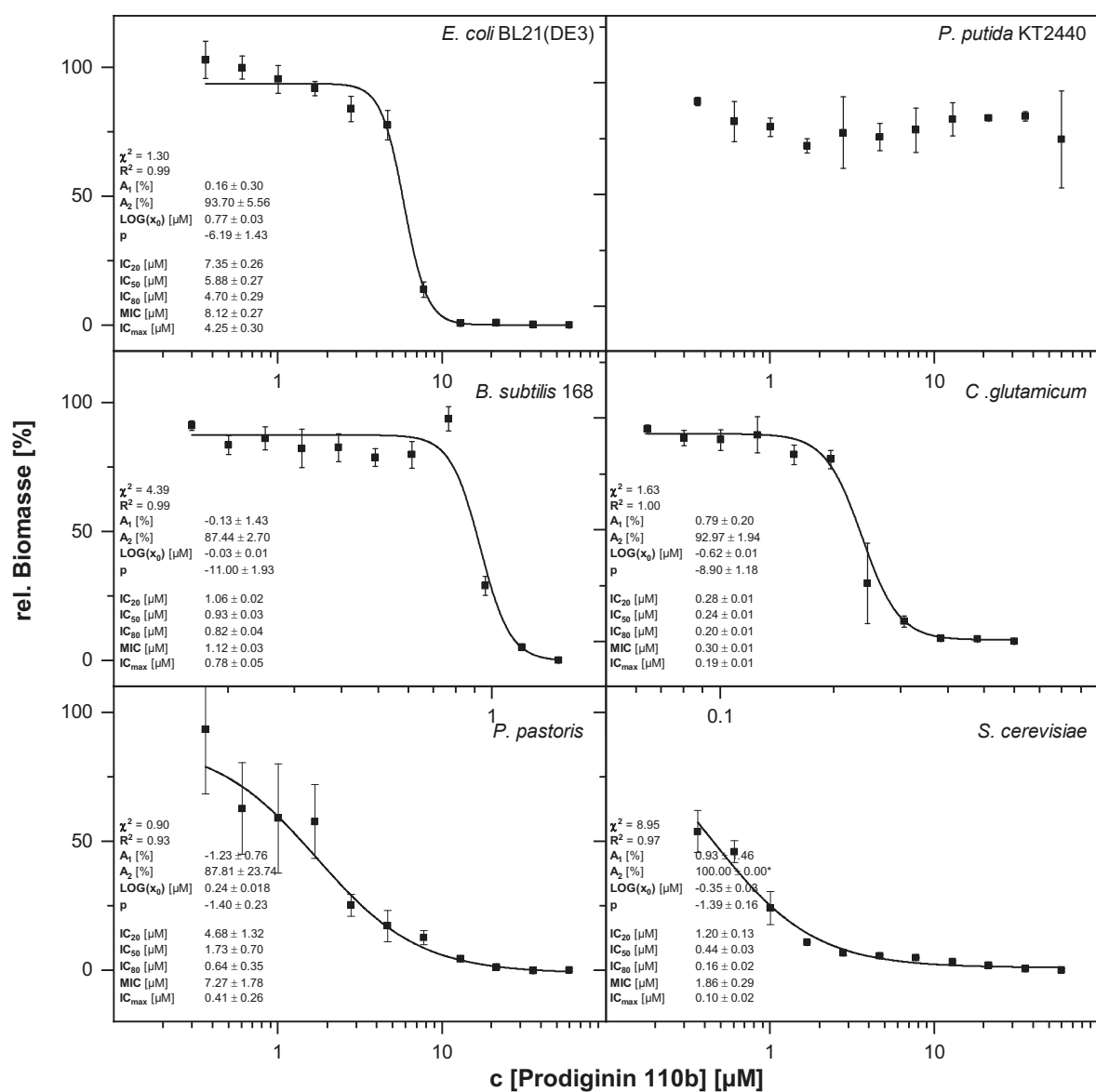




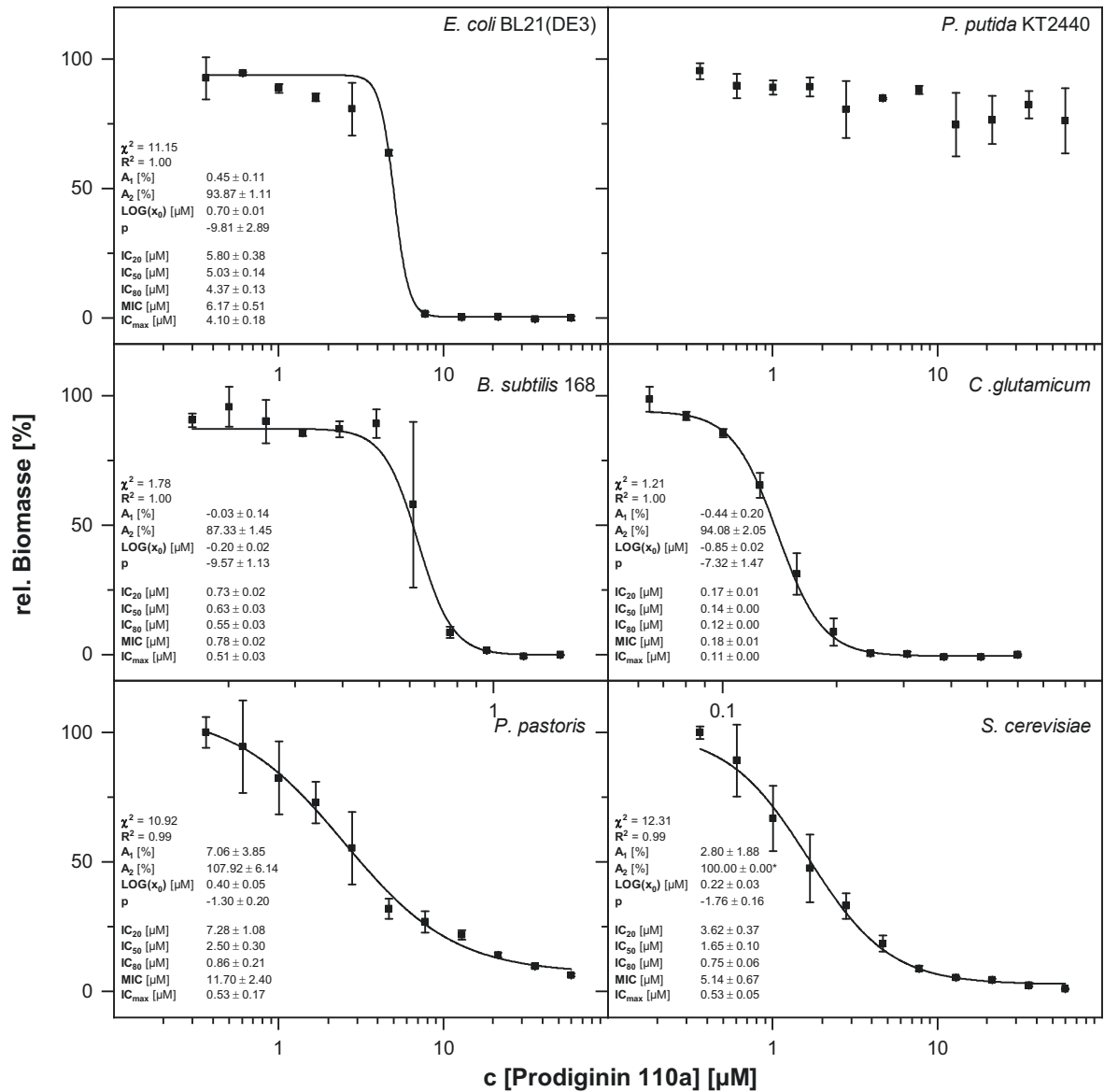
**Abbildung A 9.** Ergebnisse des Toxizitätsassays für Prodiginin 58b. Die Ergebnisse zu *E. coli* BL21(DE3), *P. putida* KT2440, *B. subtilis* 168 und *C. glutamicum* entstammen der Dissertation von Dr. Andreas S. Klein.<sup>[17]</sup> Die Ergebnisse zu *P. pastoris* und *S. cerevisiae* sind im Rahmen dieser Arbeit entstanden.



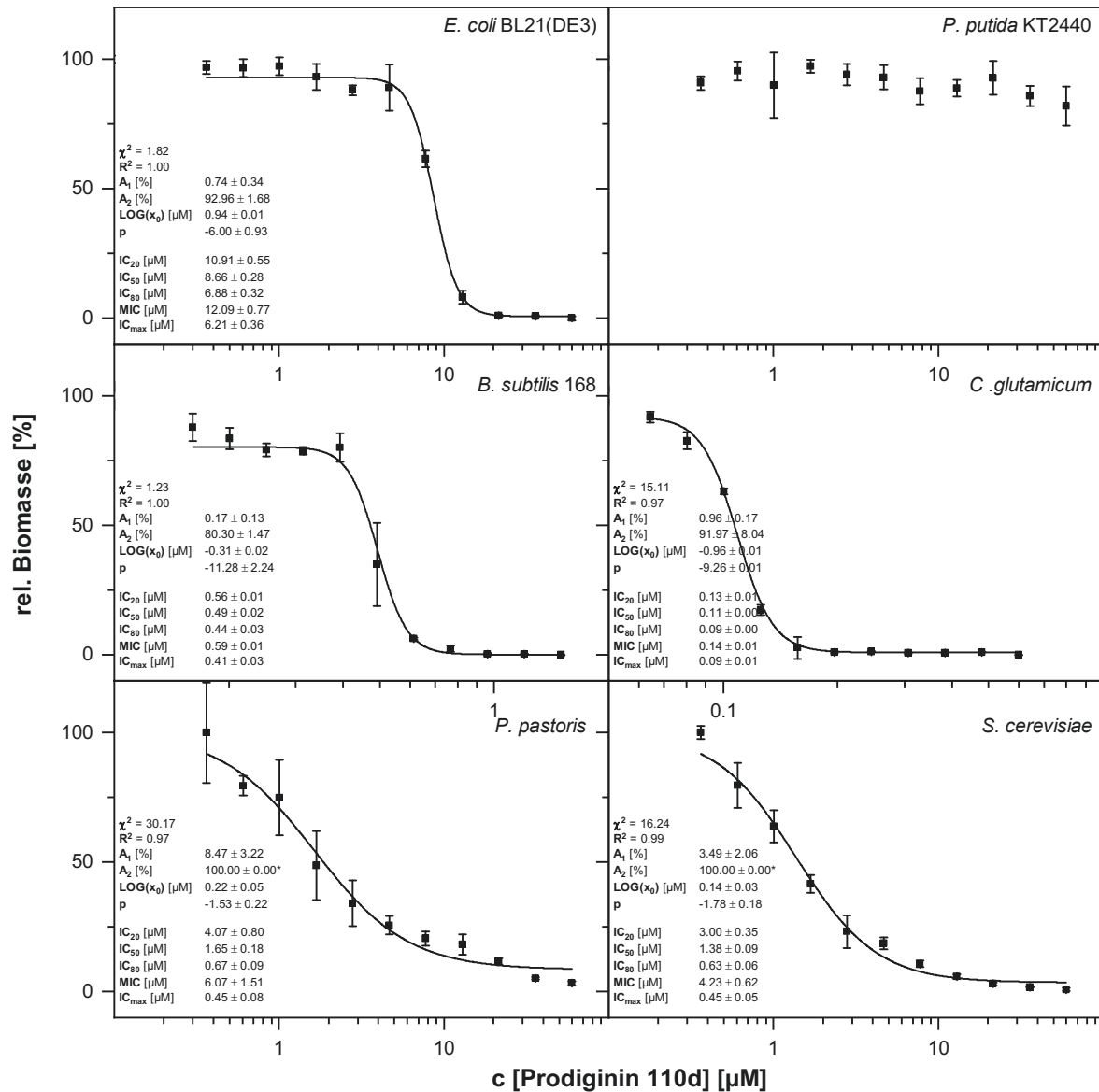
**Abbildung A 10.** Ergebnisse des Toxizitätsassays für Prodiginin 110c. Die Ergebnisse zu *E. coli* BL21(DE3), *P. putida* KT2440, *B. subtilis* 168 und *C. glutamicum* entstammen der Masterarbeit von M. Sc. David P. Klebl.<sup>[248]</sup> Die Ergebnisse zu *P. pastoris* und *S. cerevisiae* sind im Rahmen dieser Arbeit entstanden.



**Abbildung A 11.** Ergebnisse des Toxizitätsassays für Prodiginin 110b. Die Ergebnisse zu *E. coli* BL21(DE3), *P. putida* KT2440, *B. subtilis* 168 und *C. glutamicum* entstammen der Masterarbeit von M. Sc. David P. Klebl. <sup>[248]</sup> Die Ergebnisse zu *P. pastoris* und *S. cerevisiae* sind im Rahmen dieser Arbeit entstanden.



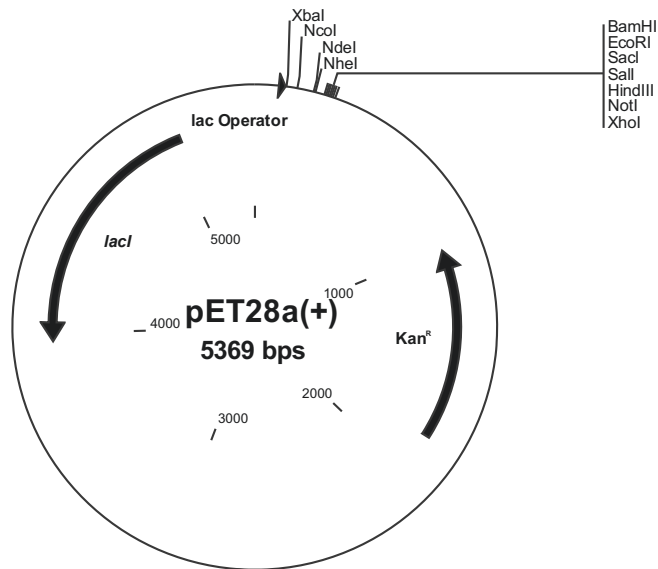
**Abbildung A 12.** Ergebnisse des Toxizitätsassays für Prodiginin 110a. Die Ergebnisse zu *E. coli* BL21(DE3), *P. putida* KT2440, *B. subtilis* 168 und *C. glutamicum* entstammen der Masterarbeit von M. Sc. David P. Klebl.<sup>[248]</sup> Die Ergebnisse zu *P. pastoris* und *S. cerevisiae* sind im Rahmen dieser Arbeit entstanden.



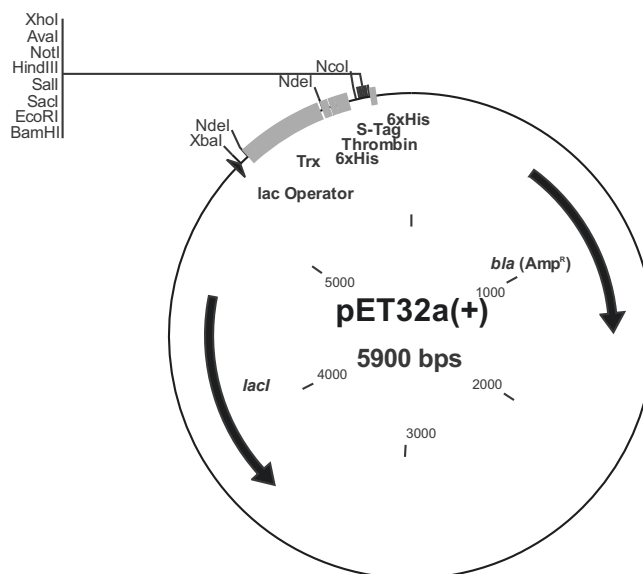
**Abbildung A 13.** Ergebnisse des Toxizitätsassays für Prodiginin 110d. Die Ergebnisse zu *E. coli* BL21(DE3), *P. putida* KT2440, *B. subtilis* 168 und *C. glutamicum* entstammen der Masterarbeit von M. Sc. David P. Klebl. <sup>[248]</sup> Die Ergebnisse zu *P. pastoris* und *S. cerevisiae* sind im Rahmen dieser Arbeit entstanden.

## 9.6 Vektorkarten, Nukleotid- und Aminosäuresequenzen

### 9.6.1 Standardexpressionsvektoren



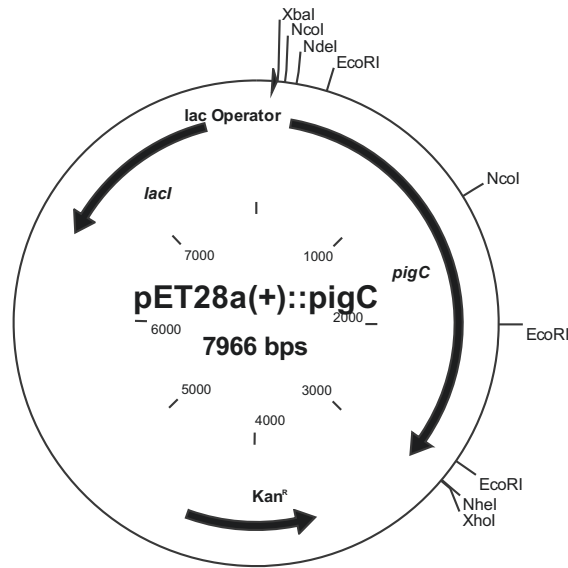
**Abbildung A 14.** Vektorkarte des Standardexpressionsvektor pET28a(+). Dargestellt sind die Positionen der Schnittstellen ausgewählter Restriktionsenzyme.



**Abbildung A 15.** Vektorkarte des Standardexpressionsvektor pET32a(+). Dargestellt sind die Positionen der Schnittstellen ausgewählter Restriktionsenzyme.

### 9.6.2 Vektorkarten – Ligasen im pET28a(+) Vektor

*pigC* – Ligase aus *S. marcescens*



**Abbildung A 16.** Vektorkarte von pET28a(+):pigC. Der Vektor wurde von Dr. Andreas S. Klein im Rahmen seiner Dissertation erstellt (dort als pPigC\_3 bezeichnet) und von ihm erhalten.<sup>[17]</sup>

An Position 952 des Vektors pET28a(+):pigC (Position 735 des Gens *pigC*) befindet sich eine stille Mutation (Guanin wurde gegen Adenin ausgetauscht, siehe **Markierung**).

#### Nukleotidsequenz von *pigC*:

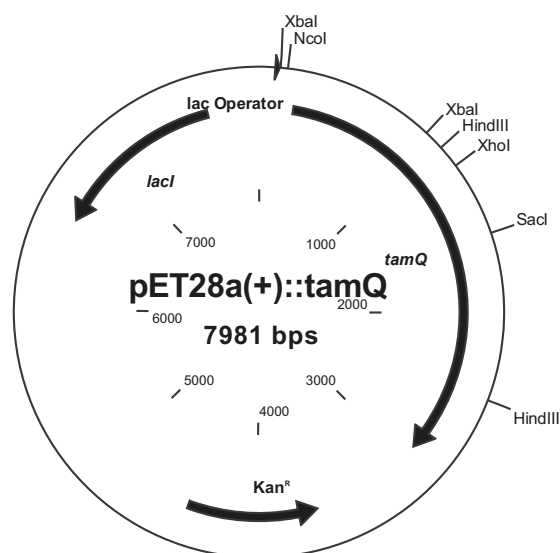
```
ATGAATCCTACCCTGGTGGTTGAACTTTCCGGCGATAAAACGCTGGAACCCCATCGCCTGGGCGGCAAAGCCC
ATTCGTTGAATCATTTGATTACAGGCGGGCTTGCCGGTGCCGCCGGCGTTTTGCATCACCGCGCAGGCTTACCG
GCAGTTTATCGAATTCGCCGTGCCGGGAGCGCTGCTCGACACGGGCGCGCCGGGCAACGTGCGCGATATGAT
TTTGAGCGCCGCCATCCCCGCCCGCTCGATCTGGCGATCCGTACGCCTGCAAACAGTTGGGCGACGGCGCC
TCGCTCGCCGTGCGCTCTTCGGCGCTGGAAGAAGACGGCCTGACCCACTCTTTCGCCGGGCAATACGACACTT
ACCTGCACGTGCGCGGGGATGACGAGGTGGTGCGCAAGGTGCAATCCTGCTGGGCGTCGCTCTGGGCGGAA
CGCGCCGCCAGTATAGCCGGACATCGGCGGCGCAGAGCGATATCGCCGTCGTCTTGCAAATCATGGTGGAT
GCAGACGCCGCCGCGTCATGTTTACCCAAGATCCGCTGACAGGCGATGCCAACCACATCGTCATCGACAGCT
GCTGGGGGCTGGGGGAAGGCGTGGTCTCCGGACAGGTACCCACCGACAGCTTCATTTTGGATAAGGCGAGCG
GCGAGATCCGCGAGCAGCAAATTCGTCACAAACCGCACTATTGCCAACGCGATCCGCAGGGACGGGTCACGC
TGCTGCAAACGCTGAAGCCAGGCGAGACGCCCCCAGCCTAACCCCGGAACAGCTGCAACAGCTTGCCAGGC
TGGCCAGGCAAACGCGGATGATTTACGGCGCGGAACTGGATATCGAATGGGCGGTGAAAGACGATCGCGTG
TGGCTCCTGCAGGCGCGGCCGATCACACGCAGGCCAAACCGGTTTCAGATGCTTTACGCCAACCCGTGGGAAA
GCGATCCGGCGATCAAGGAACGGGCCTTTTTCTCCGAATGGACACCGGCGAGATCGTCACCGGCTTGATGAC
GCCGCTGGGGCTGTCGTTTTGCCAGTTCTACCAAAAGCATATTCATGGCCCCGCGATCAAACCATGGGGCTG
GCGGATATCGGCGATTGGCAGATTTATATGGGGTATTTGCAAGGCTACGTCTATCTGAATATCTCCGGATCGG
CCTACATGCTCCGCCAATGCCCGCCACCCGCGACGAAATGAAGTTCACGACCCGCTACGCCACCGCCGATATC
GATTTACGCGGTACAAAAACCCCTATGGCCCTGGCGTACAGGGATGGGCTTATCTCAAGAGCGCCTGGCATT
GGCTGAAACAGCAGAGGCATAACCTGCGCAGCGCCGGCGCGACCGTCGATGCCATGATCGCCCTGCGCCAGC
GCGAAACGCGCCGCTTTCTGGCGCTGGATCTGACCACCATGACGCATCAGGAGCTGGAGCGGGAAGTACGCC
GCATCGACGGTTACTTCTCGACAGCTGCGCCGCTATATGCCCTTCTTCTTCAGTCGTTTCGCGCTCTACGATG
CGCTGGCACTGACCTGCGAACGTTACCTTAAAGGCCGCGGCAACGGATTGCAAAATCGCATCAAGGCGTCGAT
GAACAACCTACGCACCATCGAAGTCACGCTGGGCATTCTCAGCCTGGTGGAGACGGTCAATCGTCAACCGGCG
TTGAAGGCCGTGTTTCGAGCGACACAGCGCACAGGAAGTGGTACCCTGCTGCCACCGATCCCGAATCGCGCG
CCTTCTGGCAAAGCGACTTCAGCGCCTTCTGTTTCAATTCGGCGCCCGTGGCCGCCAGGAGTTCGAATTGAGT
```

CTTCCGCGCTGGAACGACGATCCCAGCTACCTGCTGCAAGTGATGAAAATGTATCTGCAACATCCGGTGGATC  
 TGCACACGAAACTGCGGGAAACAGAGCGGCTGCGCCATGAAGACAGCGCGACGCTGCTTAAAGCGATGCCCT  
 GGTTTGGCCGGATGAAGCTGAAGTTCATCACCAAAGTATGGCGTGATGGCCGAACGCCGGAAGCGACCC  
 GGCCAACCTTCGTACCGAAACCTGGTTCTACCGCCGCATCATGTTGGAAGTGCTGCGGCGCCTGGAGGCGCA  
 AGGCCTGGTCAAACAGGCCGATCTGCCCTATGTGGACTTCGAGCGCTTCCGCGCGTTTATGGCGGGGAACA  
 GTCGGCGCAGGAGGCGTTCGCCGCCGATCTGATCGAGCGCAATCGCCACCAGCATCTGCTGAACCTGCATGCG  
 GAAGAGCCGCCGATGGCGATCGTCGGGGGGTATCAGCCCAGGATGAAAGCCCCACGGCGGAAAAACGCCGC  
 CGGCATGCTGTCCGGCCTGGCGGCCAGCCCCGGCAAAGTGGTGCGAAAGCGCGCGTCATACCGATCTGCT  
 GGCGCAGGCCGGCGAGCTGCAGCCCAACGAAATCCTGGTGCGCGCTTTACCGACGCCAGCTGGACCCCGCT  
 CTTGCGCTGGCGGCGGGCATCGTCACCGATATCGGCTCCGCGCTGTCCACAGCTGCATCGTCGCACGCGAA  
 TTCGGCATCCCCGCGGCGGTCAATCTCAAGAACGCCACCCAGCTGATCAACAGCGGCGACACCTTGATTCTCG  
 ACGGCGACAGCGGGACGGTCATTATTCAACGCGGAGAACGTGCCGATGGCTAG

#### Aminosäuresequenz von PigC:

MNPTLVVELSGDKTLEPHRLGGKAHSLNHLIQAGLPVPPAFCITAQAYRQFIEFAVPGALLDTGAPGNVRDMILSAA  
 IPAPLDLAIRHACKQLGDGASLAVRSSALEEDGLTHSFAGQYDYLHVRGDDEVVRKVQSCWASLWAERAAQYSRT  
 SAAQSDIAVVLQIMVDADAAGVMFTQDPLTG DANHIVIDSCWGLGEGVVSGQVTTDSFILDKASGEIREQQIRHK  
 PHYCQRDPQGRVTLQTPEARRDAPSLTPEQLQQLARLARQTRMIYGAELDIEWAVKDDRVWLLQARPITTAQKP  
 VQMLYANPWESDPAIKERAFFSRMDTGEIVTGLMTPLGLSFCQFYQKHIHGPAIKTMGLADIGDWQIYMGYLQGY  
 VYLNISGSAYMLRQCPPTREMKFTTRYATADIDFSGYKNPYGPGVQGWAYLKSAAWHWLKQQRHNLRSAGATV  
 DAMIALRQRETRRFLALDLTTMTHQELERELSRIDGYFLDSCAAYMPFFLQSFALYDALALTCERYLKGRGNGLQNR  
 KASMNNLRTIEVTGLILSLVETVNRQPALKAVFERHSAQELVTVLPTDPESRAFWQSDFAFLFEFGARGRQEFELSL  
 PRWNDDPSYLLQVMKMYLQHPVDLHTKLRETERLRHEDSATLLKAMPWFGRMKLKFITKLYGVMAERREATRPT  
 FVTETW FYRRIMLEVLRRLEAQGLVKQADLPYVDFERFRAFMAEQSAQEAFADLIERNRHQHLLNLHAEPPM  
 AIVGGYQPRMKAPTAENAAGMLSLAASPGKVVA KARVITDLLAQAGELQPNEILVARFTDASWTPLFALAAGIVT  
 DIGSALSHSCIVAREFGIPAAVNLNATQLINSGDTLILDGDSGTVIIQRGERADG

#### *tamQ* – Ligase aus *P. tunicata* D2 (DSM 14096)



**Abbildung A 17.** Vektorkarte von pET28a(+):*tamQ*.

An Position 2566 des Vektors pET28a(+):*tamQ* (Position 2355 des Gens *tamQ*) befindet sich eine stille Mutation (Cytosin wurde gegen Thymin ausgetauscht, siehe **Markierung**).

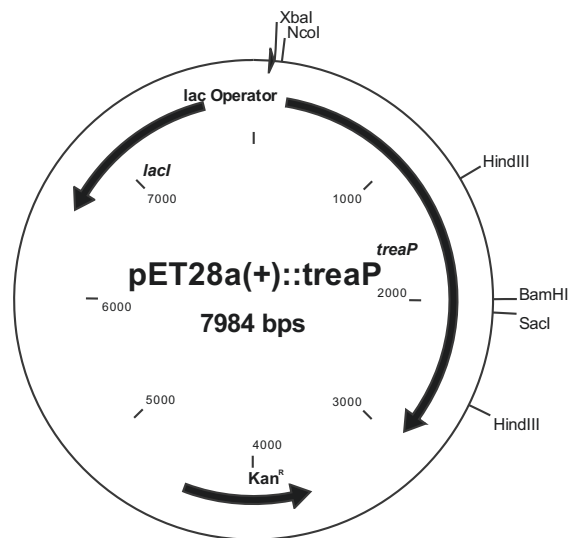


**Nukleotidsequenz von *tamQ*:**

ATGATTAACGCTGCGATGAAGCTCTCTACTGAGAGCGATAATATTTTCCGCTTTACAGATATGCCGCTTCAGTC  
GGTATCACATATTGGTGGCAAAGGAGCCTCATTGTGTGCAATGTCAGCCGAGGTCTTCCGGTTCCTGCAGGT  
GTTTGTTTGAGTGTGGCTTTGTTTGATGACTTTGCGGCGCACATTGAGCTACTGACAAGTTTCGACCTTACTGA  
GGGGTATGAACAGTGGCAAGCTGCTGCCAAAGCGATTAAAGAGTCTCCATTACCAAATACATTACAAGATACG  
ATAAGCGCTGCAATAGCACACCTAAAAGGGCCGTTGGCTGTTTCGTTTCATCAGCACTTGATGAAGATGGTGAAA  
GTAGCTCTTTTGTCTGGGCAACATCTGACTAAATTGGCCTTGTGCGGGCTTGATACTATCCTCGATGCGATTAAA  
GAATGTTGGGCATCTGCTTTTAGCGAGGCTGCGTATCGCTATCGTCAGCATACCGACAAACACCTCGACATGCC  
TCGTATGGCGGTGGTTGTGCAACAGATGCAATTTGGAGATGTTTCAGGCGTCGCGTTTGGTCAACATCCAACG  
ACCTTTGCTCGTGATGCCTTTTTGGTTGAAAACCTGTTTTGGTTTGTGTGAAGGGTTGGTTTCTGGTCAGGTTGTT  
AGCGATAGCTGGCAAATTGATAAAGCGTCGGGCGAAGTAAGGGAAAGTGACTATCGCCGATAAATCTGAGCAA  
ATAATTTATCTAGATGGCGAAATACAAAAGGTTGCGGTATCCGACGAGCAGCGCCAACAACCTGCTTTAGGGC  
CAATGGCACAGCAGGCGTTATACACCTTATTATGTAAAGTTGAAGCTTATTTTGGTGTGCCACAAGATGTGGA  
GTGGACCTGGAGTGAAGGAAAAATTTGGTTATTACAAAGCCGCCCTATCACGACACATGCACCGCAACTCGAT  
GATTTTACCTAGGTTCTCGAGATGTTGACTTGCAAAAAACCATGTTATGGTCACGTATGGATATTGGGGAAAT  
ATTCACCGGTCGCATGACGCCGCTTGGTTTATCATTTGCCGTTACTATCAGCAACAGGTCCACACAGGTTGTG  
GTAAAGGGTAGGTTTGTGGACTTAGGTGAGGCGGATGAAACCATCGCCTATTATCGAGGTCATGTATATCT  
CAATGTTTCTTATACTGCTTGGAATTGGCTCAAACCTCAAATTGGTGAAGATCAATTGCCGTTTTTACAGCGTTT  
CAGTAGTGAGGCTATTGATTTAGCAGGTTACCGCAATCCTTATGGCGAAAAGCATAGCCATCAGGATTATAGC  
GCCAAACAGTGCCTCGTTATTGGCTGAAAAAGAACATTAAAGAGCTCTTTTGTGCCAAACGTCGTGCGCGCA  
GTATGATAGCTTCGCGCTATAAACAGTTCGACCGGGCTCAGCAAAAACCACTGCAGCAGCTTTCTTTAGAGCA  
GTTGGCCGCAGAAATGCGACATGCTTTGGCTTATTTTAAAGCCATGCATGAAGGTTATTTGCCTTACTACATTA  
ACGCTTTTGCCTGTTACGGAATTTAGAGGAATTAAGTGCCTGTGGCTTGGCGACAAAGGTAAACAATTACAT  
AACCAAATTAAGGCGATATGTCTAACTTGCGAACTGTTGCAAGTGCACAGGAGCTGTGGCTGCTGTGCCAAC  
AATTAGCCGATTGGCCACAAGTGAAGCAAGCATTTTATGATTAGAGCTGGACGAACTTGAAGTATTTCTCAAT  
GAACATCAAGCTGGAATTAATATTCTCGTGGTCCATTAGCGCAGTTTATGCGCGAAAATGGTGTGCGTGAC  
GCGAAGAAATGGAGCTGACACATCCACGCTGGCTCGATGACCGAACTTATTTATTGCAGATGATTAAAGTGTA  
TCTGCATCAAGGTTATGCGGTAGATGACGCCATCGCCACACAACAACGTAAGCAACGTAACAAACAGCAATGAA  
ATATTAACAAACAATCCCTTGGTATCAACGCCGAGTAATGAAGCTGGTCATTTGCTCTACAGTGGTTGTGCCAA  
ATTACGTGAAGAGACACGTATGAGTATGGTGACCTCCATCTGGTTAGTTCGTCTGATTGTTTATGAACTAGGAC  
AGCGTTTGGTTGCAACTCAGCAACTCACATCACTGGATGATATTGCTTATTTAGATTTTGCAGAGATCTTAAGTT  
ATCTTGAAGGCGCATCGATGTGCACCAGCTCACTGAGCCTGCAAAGCTTGCAACGTCATCGGCTTATCAT  
CTTTGGCAATCAATGCCTGAGCCACCGTTAACCTTTATTGGCTCGCAAAGAGCCAACCGGATTTAATTTAGA  
TCCAACATTGACACAGCTGTCTGGCCTTGCCACTTCAGCCGGTTTTTCCGTGGCAAAGCATGTGTGATCACTG  
ATTTAGCCAAGCAAGCAGGGCAATTTAAAAAAGGCGATATTAATTGCTCCTTTTACCGATGCATCTTGGACG  
CCACTTTTTGCACTTGCGGGTGCGGTAGTGACAGACATTGGCTCAATGTTGTCTCACAGTTCATTGTTGCCAG  
AGAATTTGGCATCCCATGTGTGGTCAATACCAATCATGCCAGCGCGTTGTTTAAATCTGGCGACATGCTGATAG  
TTGATGCACAAAATGGCATCGTAGTTTTAGATAAGGAAAGTTAA

**Aminosäuresequenz von TamQ:**

MINAAMKLSTESDNIFRFTDMPLQSVSHIGGKGASLCAMSAAGLPVPAGVCLSVLFDDFAAHIELLTRFDLTEGYE  
QWQAAAKAIKESPLPNTLQDTISAAIAHLKGPLAVRSSALDEGEDSSSFAGQHCLKLALCGLDITLDAIKECWASAFS  
EAAAYRYRQHTDKHLDMPRMAVVVVQMQMFGDVSGVAFGQHPTTFARDAFLVENCFLCEGLVSGQVVSWSWQI  
DKASGEVREVTIADKSEQIYLDGEIQKVAVSDEQRQOPALGPMAQQALYTLCKVEAYFGVPQDVEWTWSEGKI  
WLLQSRPITTHAPQLDDFYLGSRDVLQKTMWLSRMDIGEFTGRMTPLGLSFARYYQQQVHTGCGKGLLLDLG  
EADETIAYYRGHVYLVNSYTAWQLAQTPIGEDQLPFLQRFSSAIDLAGYRNPYGEKSHQDYSKQCTRYWLKKN  
KELFCAKRRARSMIASRYKQFDRAQQKPLQQLSLEQLAAEMRHALAYFKAMHEGYLPYYINAFACYGILEELSALWL  
GDKGKQLHNQIKGDMNSLRTVASAQELWLLCQQLADWPQVKQAFLDLELDELEVFLNEHQAGIKYSRGPQAQFM  
RENGVRAREEMELTHPRWLDDRTYLLQMIKVYLHQGYAVDDAIATQQRKQRKNSNEILKTIPWYQRRVMKLVISL  
YSGCAKLREETRMSMVTSIWLVRRIYVELGQRLVATQQLTSLDDIAYLDFAEILSYLEKRIDVHQLTEPAKLAQRQSA  
YHLWQSMPEPLTFIGSPKSQPDILDLPTLTQLSGLATSAGFCRGKACVITDLAKQAGQFKKGDIAPFTDASWTPLF  
ALAGAVVTDIGSMLSHSSIVAREFGIPCVVNTNHASALFKSGDMLIVDAQNGIVVLDKES

***treaP* – Ligase aus *P. citrea* (DSM 8771)****Abbildung A 18.** Vektorkarte von pET28a(+):treaP.

Eine nicht-stumme Mutation an Position 1806 des Vektors pET28a(+):treaP (Position 1595 des Gens *treaP*) wurde mittels QuikChange® entfernt, sodass die ursprüngliche Gensequenz (s.u.) wieder erhalten wurde. Die nicht-stumme Mutation (Thymin wurde zu Cytosin ausgetauscht) hatte zum Aminosäureaustausch L532S geführt.

**Nukleotidsequenz von *treaP*:**

ATGACAGTTAACTCTCTGGCTATTGAACAACCACTTAATGATGGGATTGTTCAATTTGATAGCCAACAATCCGCC  
TCTGTAGAACTGGTTGGCGGAAAAGGCGCATCTTTATGTGCCATGCATAATGCAGGTCTGCCGTCCTATCG  
GCTACTGCATTACAGTCAATGTATTTGAAGAGTTTTTACAACAACTGAAGTACTGAGTCGATTTGATCCGAGT  
AAAGGCGTCACTGAGTGGCGTGCTTAGCAACCGCAATTACAAGCGTTGCCATGCCGGAACAAATTGCCACAC  
AGATAAGCAATGCAAGTGCGTTATTAATTGGCCCCGTCGCCGTTGCTCTTCTGCAACAGATGAAGACAGTGA  
TAGTCATTCGTTTGCAGGGCAACACGTCACAAAACCTCGCTGTTGAAGGCATAGACCATATTCTTGAAGCTGTT  
AGGCATGCTGGGCATCAGCTTTTAGCGAAGCAGCCTTCAATATCGCCAAACAACAGGTCAAACAACGGATAT  
TCCGAAGATTGCAGTCGTGGTACAGCAAAATGCAGTTTGGCGATGCATCAGGTGTTGCGTTTGGTCAGCACCCC  
ACTACCTTTGCAAAAAATGCCTTTGTTATAGAAGGCTGTTATGGTCTATGCGAAGGCTTAGTTTCTGGTCAAGT  
CAGTAGCGATAGCTATGAAATTGACAACTCAGTGGCGAGCTGATTGCTCATACTGTTGAGCCAAAACAGCAC  
CAAATTGTACATATCGACGGCTCTATAAAAAAAGTCCCGTACCGCTGCTTTACAAAATGAGCAAGTACTTAA  
CCATCTTGACAGCAATCGTTATACAGTGTATTGCGTCAAGTTGAGTCGTACTACGGCTGCCCTCAGGATGTAG  
AGTGGACACTCAGTGATGGGAAGATTTGGCTTTTACAAGTCTGTCGATCACCACCAAAAAATACCAAAGCTGA  
TCCATTCTATTTAGGCAATAAATCTGAGCATGTGCAAAAAGACATTCTCTGGTCTCGCATGGATATAGGGGAAA  
TATTCACCGGCCGAATGACACCTTAGGATTATCGTTTGCACACTATTACCAAAGTCCGCTTACATCGATTGTG  
GTAAAAAGCTTGGTTTACTTGATCTTGGTGAAGCGAATGAAACCATGCTTATCATAAAGGTCATGTGTACCTC  
AATGTGCTTATACCGCATGGCAACTGGCTCAAACCTCAGTTGGGGAAGATCAAACCCATTTTTAGCCCGCTT  
TAGTAGTGAAGCCATTGACCTAACTGGCTATGAAAACCCATACGGTGCTAAACACAGTCACCCGAATATGACG  
CCAAAACAGTGTCTACGCTATTGGATAAAGCAAAACGTCAAAGAAGTATTTAGGCTAAGCGTCGCGCAAAAT  
CTATGGTCAACTCAGTTATCAAGAATTTGATAGAGTGCAAAGCCAGGACATTACAAACCTCTCTCATGACGAG  
TTACGCTACGAACTTGATCATTGCTTAGGCTACTTTAAAGCCATGCACGAGGGCTATTTACCCTATTATATCAAC  
GCTTTTGTGTTATGGCTTGTGTTGAAGAACTCAGTGCGAAATGGTTGGGCGATAAAAGTAAGCATCTCCAAA  
ATAAAATCAAAGGTGACATGTCTAATTGAGAACAGTCGCCAGTGCACAAGAGCTTTGGCAACTATGTAAAGT  
ACTTAATGCATGGCCTCAAGTGAAAGATGTGTTTACCAATAAAGACATTGCCGATATTGAGGATTTTCTTACCT  
CAACGCCACTGGGGATCCGATTTACCAACGGGCTCTTGTGTAATTTATGCGTGATAATGGTGTACGCGGGCG

TGAAGAAATGGAGCTCACTCACCCCTCGCTGGTTAGATGACAGAACCTACGTACTGCAAATGATTAAGTTGTATC  
TAAAGCAAGGCTATGAAGTGGACGACGCCTTAGTTGAACAAACACAGAAGCAGCAAAAAGATAAGCGATGAGC  
TACTCAATGAATTAAGTTGGACCCAGCGCTTTACGATTAACCGTGTCATCTCTTTGTACTCTGGTTGCGCTAAAC  
TACGTGAAGAAACACGAATGAGTATGACTACCTCAATTTGGCTCGTTCGTCGAGTCGTGTATGAAGTAGCAAG  
ACGATTAATTGATAAATCACTTTTGAGCAGCTTTGACGATGTTGCCTACCTCGACTTTGAAAATGTCATTAGTA  
TTTAAATAACACCATCACTGCTGAACAACTACCGATGCACTGCTTATCAGTAAAAACCGTGCTCAATATCAACA  
ATGGCAAGCACAACCAGAACCGCCTCTCACATTTATCGGCAAGCCGAGTAGCCAACCAGATCTCATTTTTGATC  
CAAGCTTAACATCACTAGAAGGGCTTGAACATCCGAAGGCTTTTGTGCGCGCGCTGCTTGTGTGATCACTGAT  
TTAGCTTCACAAGCCGGTGAATTTCAAAAAGGCGACATATTGATCGCCCCTTTCACCGACGCTTCTTGGACTCC  
CCTGTTTGCCTAGCAAGCGCCGTAGTCACCGATATTGGTTCAATGCTGTACACAGCTCTATTGTTGCCAGAG  
AGTTTGGCATTCTTGTGTGGTGAACACTCACCATGCAAGCGCCCTGATAAACACCGGTGACATCATCACCGTA  
GATGCACACAAAGGTCTAATAATTGTAAATAAGGAAGATTAA

#### Aminosäuresequenz von TreapP:

MTVNSLAIEQPLNDGIVHFDSQQSASVELVGGKGASLCAMHNAGLPVPIGYCITVNVFEEFLQQTELLSRFDPSKGV  
TEWRALATAITSVAMPEQIATQISNASALLIGPVAVRSSATDESDSHSFAGQHVTKLAVEGIDHILEAVQACWASA  
FSEAAFQYRQTTGQTTDIPKIAVVVQMQFGDASGVAFGQHPTTFAKNAFVIEGCGYGLCEGLVSGQVSSDSYEIDK  
LSGELIAHTVQPKQHQIVHIDGSIKKLAVPPALQNEQVLNHLAQQLSVLRQVESYSGCPQDVEWTLSDGKIWLLQ  
SRPITTKNTKADPFYLGKSEHVQKDILWSRMDIGEFTGRMTPLGLSFAHYQTRVHIDCGKKLGLLDLGEANETIA  
YHKGHVYLVNSYTAWQLAQTPVGEDQTPFLARFSSEIDLTGYENPYGAKHSHPNMTPKQCLRYWIKQNVKELFQ  
AKRRAKSMVNSRYQEFDRVQSQDITNLSHDELRYELDHCLGYFKAMHEGYLPYYINAFACYGLLEELSAKWLGDKS  
KHLQNKIKGDMSNLRTVASAQELWQLCKVLNAWPQVKDVFTNKDIADIEDFLTSTPLGIRFTNGPLAEFMRDNGV  
RGREEMELTHPRWLDDRTYVLQMIKLYLKQGYEVDDALVEQTQKQKISDELLNELSWTQRFTINRVISLYSGCAKL  
REETRMSMTTSIWLVRVVEVARRLIDKSLSSFFDDVAYLDFENVIQYLNNTITAEQLTDALLISKNNRAQYQQWQA  
QPEPPLTFIGKPSQPDILFDPSLTSLEGLATSEGFCRARACVITDLASQAGEFQKGDILIAFPFTDASWTPLFALASAVV  
TDIGSMLSHSSIVAREFGIPCVVNTHHASALINTGDIITVDAHKGIIIVNKED

#### *redH* – Ligase aus *S. coelicolor* A3(2)

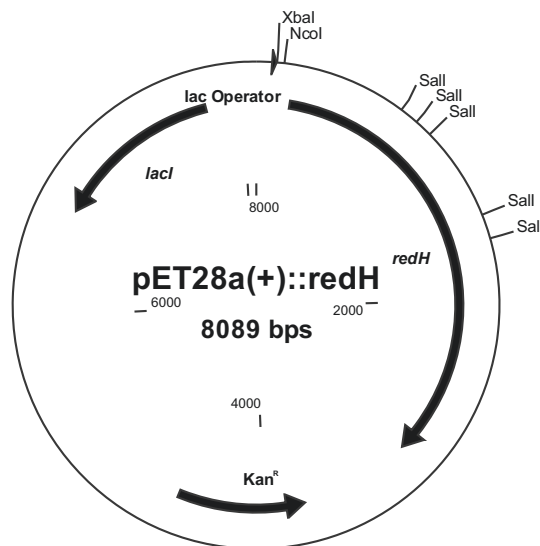


Abbildung A 19. Vektorkarte von pET28a(+):redH.

An Position 1246 des Vektors pET28a(+):redH (Position 1035 des Gens *redH*) und Position 2941 des Vektors pET28a(+):redH (Position 2730 des Gens *redH*) befinden sich stille Mutationen (Position 1246: Guanin wurde gegen Adenin ausgetauscht; Position 2941: Cytosin wurde gegen Thymin ausgetauscht, siehe Markierung).

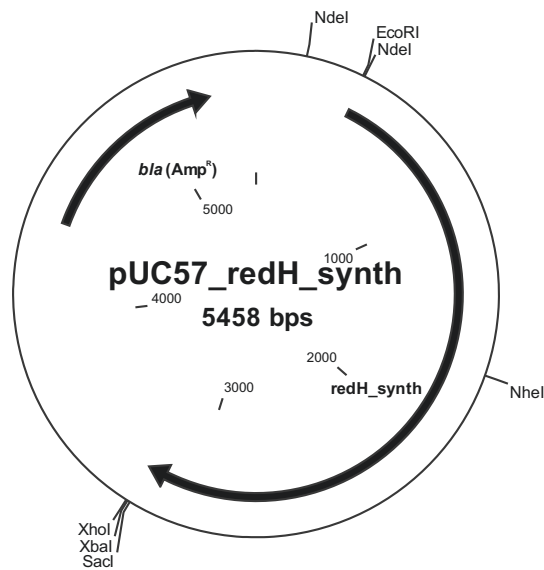
**Nukleotidsequenz von *redH*:**

ATGGACACGCACGTCAGCGACACGACGACCCCCGCCGGAGCAGGCGAAGGCCCCGCCGGCCCGGTACCGAC  
 CCGGCCGGGCACGCCGCTGCGTCGTACCCCTGGGCGCGGGCGGCCGACCGGAGGCCACCGGGGGAACT  
 GGGCGGAAGGGCACCCGCTCGCGGAGCTGTCCGCCGCGGGTCTGCCCCTCCCGCCGCTTCTGCCTGACC  
 ACCGCCCTCTTCGACGCTACCTGCGGGAGACCGGGATCGCCGCCGAGGCGGCGGGCGCCGACCCCCGACCC  
 CTGCGCGAGCGCATCCTGGGCACCCGGATGCCCGCTCGATCGCGGACGCCGTCTTCGACGCTACGGCAGCA  
 TGGGCCGCCCCGCGTGGCGGTGCGCTCCTCCGGAAGTGGGAGGACTCCGCTGCACAGTCTTCGCCGGCCA  
 GCACGACACGGTCTTCGACGTCTGCGGCGACGAGGACGTAAGTGGACGCGGTCTGCGGTGCTGGGCCTCGCT  
 GTGGTCCGACCGCGCCACGGTGTACCGGGACACGGACGCCCCGACGCCCTCGCCGTGGTCTGTCAGGAGAT  
 GATCCACACCGACGTCAGCGGCGTGATGTTACCGTCGACCCGGTCAACCCCCGCCGACCGCCTCGTGGTG  
 GAGGCTGCCAGGGCCTGGGCGAAGGGTGGTCTCCGGGAGGTCTCCAGCGACTTCTTCGTCGTCGACGAC  
 GAGAAGCTGGAGGTCGTCGAGGAACGGGTCCGCTACAAGGTACCAAGTGCAGCGCCCTGGAGCCCCGGCCG  
 CATCGGCATGACGAAGGTCGACGCGGCGGCCCGCAGCGTCCCCTGCCTACCCACGACCAACTGCGCGAACTC  
 GGCGCCCTGGCCGTCCGCATCCGCGACCTGTACGGCAGCGAGCAGGACATCGAGTGGGGCGTGGCGGACGG  
 CGTCTTCCACCTGTTCCAGACCCGCCGATCACCACCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCTCCGGCGCGCTCA  
 GCGCGTACGTCGCCCCGAGCCAGAGCCGGTCTCAACGGCACCTGTGGTGGCGCATGGACATCGGGGAGA  
 TCTTCGTCGGCCTGATGACCCCGCTCGGCCTGAGCTTCGCCCGCTACTACCAGCGCAACGTGCACACCGACTGC  
 GCGGGCGCCCTCGGCGTGGCGGACACCGGCGAGGCCGACCTGCACATGGGCTTCTACCAGGGCCACGTCTAC  
 CTAACATCTCTACAGCTCCTACCTGTTGGCCAGTGCTGCCACCCGCGACAGCGCCACTTCACCAGCCG  
 CTTGTCGACGAGGAGGTGACCTCGCCGACTACGAGAACCCGTTCCGGCACCTTCCCCGGCGGCATGGAGGA  
 CCTGCTCTCCACCGTCCACTGGCTGCAGCACACGGCCCGTGAGATGACGCAGATGAAGTCCCGCTCCCAGCAG  
 ATGGTCGACGCCCCGGTCTACGAGTTCGACCGGGCCCGCGGCTCGACCTGACCCGGATGAGCAGGCGCGAA  
 CTGCACGGCGAACTCCACCGGACCTCGCCTGGTTCACGACATGCACATCGGCTACATGCCGTACTACATCAA  
 CGCGTTCGCTTCTACGGCCTGCTACCGAGCTGTGCGCCCGCTGGCTCGGCAGCGACGGCGTGGGCCTGCAG  
 AACCAGCTCAAGACCGACATGTCCAGCCTGCGCACCGTCGAGTCGGCCAAGGAGGTCTGGTCGGTCGCCAG  
 GCCGCCAAGAACGACCCGGCCGCTCTGCGGATCATCAAGGACGAACCGCTGGAGGACATCGCCCGGCTGCTG  
 CGCGAGGACCCCGCCGACAGCGCTTCTGGGACCGGCACATGGAGCCGTTCTGCGCGCAACGGCACCCGC  
 GGCCACCAGGAGATGGAGATCACCACCCGAGGTGGATCGACGACCCCTCCTACATCTCCAGATGATCCGGC  
 GCTACGTCGCCGACGGCTTCTCCATCGACGACATCCTCCGCCGACGAGCGGCTGGTCCGACGACTCCCGCGA  
 GGTGCTGGGCGCGCTGCCGATGCCAAGCGCCAGGTCTGGACACCGTCATCTCCCTTACGCCCTGTGCAGC  
 GAGTGGCGGGAGACACCCGGATGTCCATGATCACGTCCATCTGGCTGGTGGCGAACGTGGTCTACGAGGTC  
 GGCCGGCGCCTGGTCGCCGACGGCGTCTGCACTCCCGGACGAGATCGCCACCTGGACTTCGAGGACGTG  
 CGCCGCTACCTCGCCGGCGACGAGGACGCCGTACGCGTCTTCGACCGGGCCCGCATCGACGCGGCCCGCCGG  
 CTGCACGAACACAACAAGCGGCTCCCGGAACCGCCGTTGACCTTCGTCGGCGTCCACGACATCACCGCCTCGG  
 TCCGGCCCCGCCCGACGGCGCCCGGCTCGAAGGCCTCGCCGCCAGCCCCGACGGATCGTGGGCCGCGCCC  
 GCATCGTCGAGGACCTGGTGTGGCAGGCCGACGAGTTCGAGGCCGGGAGATCCTCGTGACCGGGTACACC  
 GACGCTCCTGGACGCCGCTGTTGCCATCGCGGGCGGGGTGTCACCGACATCGGGTCGATGCTCTCGACA  
 GTTCCATCGTGGCCCGCGAGTTCACGTCCCGTCGGTGGTGAACACCAAGGACGCCACCCAGCGCATCAACAC  
 CGGCGACCTGATCGTGGTGGACGGCGACGCGGGCACGGTCGAGGTCTGAGAGCGCGGACACCGACCCGC  
 AGGGCCCCGGCGGGGCCCGGGACCCCGGCCGGAGCCACCACCGACTGA

**Aminosäuresequenz von RedH:**

MDTHVSDTTTPAGAGEGPAGPVTDPAGHAACVVTLGAGGPTGGHRGELGGKGTRLAELSAAGLPVPPAFCLTTA  
 LFDAYLRETGIAAEAAGADPRTLRLRILGTRMPASIADAVLDAYGSMGRPRVAVRSSGLREDSAAQSFAGQHDIVL  
 DVCGEDEDVLDVLRVWASLWSDRATVYRDTDAPDALAVVVQEMIHTDVSGVMFTVDPVNPRLVVEACQGL  
 GEGLVSGQVSSDFVVDDEKLEVVEERVYKVKCAPLEPGRIGMTKVDAAARVPCLTLDQLRELGAVALRIRDL  
 GSEQDIEWGVRDGVFHLFQTRPITTRPAAPAAPSGALSPYVAPQPEVLNGTLWSRMDIGEIVGLMTPLGLSFAR  
 YYQRNVHTDCAGALGVRDTGEADLHMGFYQGHVYLNISYSSYLLAQCLPTRDQRHFTSRFVSEEDLADYENPFGT  
 FPGGMEDLLSTVHWLQHTAREMTQMKSRSQMVVDARLYEFDRARGLDLTRMSRRELHGHLDLAWFHDHMI  
 GYMPYYINAFYFGLLTELARWLGSDBGVLQNRVKTDMSLRVESAKEVWSVAQAANKNDPAVLRIKDEPLEDI  
 ARLLREDPAGQRFWDRHMEPFLRANGTRGHQEMEITHPRWIDDPYIFQMIRRYVADGFSIDILRRSSGWSDDS  
 REVLGRLPMPKRQVLDTVISLYALCSELRETRMSMITSIWLVNRNVVYEVGRRLVADGVVHSPDEIAHLDFEDVRRYL  
 AGDEDAVRVFDARIDAARRLHEHNKRLPEPPLTFVGVHDITASVRPAADGARLEGLAASPGRIVGRARIVEDLVW

QADEFEAGEILVTGYTDASWTPFLFAIAGGVVTDIGSMLSHSSIVAREFHVPSVVNTKDATQRINTGDLIVVDGDAGT  
VEVVESADTDPQGPAGAAGTPAGATTD



**Abbildung A 20.** Vektorkarte von pUC57::redH\_synth. Das Plasmid wurde von *GenScript USA Inc.* (Piscataway, NJ, USA) erworben.

Der Vektor pUC57::redH\_synth wurde von *GenScript USA Inc.* (Piscataway, NJ, USA) erworben. Es wurde eine Codon-Harmonisierung für *P. putida* vorgenommen. Zusätzlich wurden *upstream* des Gens Sequenzen für EcoRI und NdeI Schnittstellen eingefügt und *downstream* für SacI, XbaI und XhoI. Die Schnittstellen sind kursiv markiert.

***Streptomyces coelicolor* A3(2) [gbtct]: 8375 CDS's (2743050 codons)**

fields: [triplet] [amino acid] [fraction] [frequency: per thousand] [(number)]

|                          |                          |                          |                          |
|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| UUU F 0.02 0.4 ( 1222)   | UCU S 0.01 0.6 ( 1781)   | UAU Y 0.05 1.0 ( 2696)   | UGU C 0.09 0.7 ( 1986)   |
| UUC F 0.98 25.9 ( 71022) | UCC S 0.41 20.2 ( 55452) | UAC Y 0.95 19.5 ( 53525) | UGC C 0.91 7.1 ( 19435)  |
| UUA L 0.00 0.1 ( 175)    | UCA S 0.02 1.1 ( 2987)   | UAA * 0.05 0.1 ( 383)    | UGA * 0.78 2.4 ( 6523)   |
| UUG L 0.02 2.4 ( 6706)   | UCG S 0.28 13.7 ( 37630) | UAG * 0.18 0.5 ( 1468)   | UGG W 1.00 15.2 ( 41567) |
| CUU L 0.02 1.6 ( 4399)   | CCU P 0.03 1.6 ( 4261)   | CAU H 0.07 1.7 ( 4680)   | CGU R 0.07 5.5 ( 15031)  |
| CUC L 0.36 36.5 (100256) | CCC P 0.41 25.5 ( 69887) | CAC H 0.93 21.8 ( 59920) | CGC R 0.47 39.1 (107385) |
| CUA L 0.00 0.4 ( 981)    | CCA P 0.02 1.4 ( 3706)   | CAA Q 0.05 1.4 ( 3708)   | CGA R 0.03 2.6 ( 7101)   |
| CUG L 0.60 60.9 (167041) | CCG P 0.54 33.4 ( 91515) | CAG Q 0.95 25.2 ( 69255) | CGG R 0.38 31.9 ( 87371) |
| AUU I 0.02 0.6 ( 1736)   | ACU T 0.02 1.2 ( 3276)   | AAU N 0.04 0.7 ( 1985)   | AGU S 0.03 1.5 ( 4180)   |
| AUC I 0.96 27.5 ( 75512) | ACC T 0.65 39.8 (109099) | AAC N 0.96 16.3 ( 44627) | AGC S 0.25 12.5 ( 34157) |
| AUA I 0.02 0.7 ( 1811)   | ACA T 0.03 1.7 ( 4528)   | AAA K 0.05 1.1 ( 2921)   | AGA R 0.01 0.8 ( 2129)   |
| AUG M 1.00 15.8 ( 43327) | ACG T 0.31 19.0 ( 52030) | AAG K 0.95 19.6 ( 53671) | AGG R 0.04 3.7 ( 10061)  |
| GUU V 0.02 1.5 ( 4008)   | GCU A 0.02 3.1 ( 8453)   | GAU D 0.05 3.1 ( 8438)   | GGU G 0.10 9.2 ( 25257)  |
| GUC V 0.55 46.9 (128649) | GCC A 0.57 78.4 (215055) | GAC D 0.95 58.2 (159730) | GGC G 0.64 60.9 (167167) |
| GUA V 0.03 2.7 ( 7306)   | GCA A 0.04 5.6 ( 15417)  | GAA E 0.15 8.7 ( 23997)  | GGA G 0.08 7.2 ( 19677)  |
| GUG V 0.41 35.0 ( 95906) | GCG A 0.36 49.5 (135712) | GAG E 0.85 48.2 (132351) | GGG G 0.19 18.2 ( 49822) |

Coding GC 72.30% 1st letter GC 72.67% 2nd letter GC 51.39% 3rd letter GC 92.83%

**Abbildung A 21.** Codon-Usage-Tabelle von *S. coelicolor* A3(2), die als Referenz für die Codon-Harmonisierung von redH<sub>synth</sub> genutzt wurde.<sup>43</sup>

***Pseudomonas putida* [gbtct]: 6891 CDS's (2266762 codons)**

fields: [triplet] [amino acid] [fraction] [frequency: per thousand] [(number)]

|                          |                          |                          |                          |
|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| UUU F 0.21 7.3 ( 16643)  | UCU S 0.05 2.7 ( 6008)   | UAU Y 0.28 7.2 ( 16352)  | UGU C 0.19 2.1 ( 4657)   |
| UUC F 0.79 28.2 ( 63984) | UCC S 0.15 8.7 ( 19764)  | UAC Y 0.72 18.3 ( 41515) | UGC C 0.81 8.6 ( 19420)  |
| UUA L 0.01 1.5 ( 3409)   | UCA S 0.05 3.0 ( 6902)   | UAA * 0.22 0.7 ( 1525)   | UGA * 0.66 2.0 ( 4562)   |
| UUG L 0.14 16.4 ( 37276) | UCG S 0.25 13.9 ( 31597) | UAG * 0.12 0.4 ( 804)    | UGG W 1.00 14.4 ( 32681) |
| CUU L 0.06 7.3 ( 16535)  | CCU P 0.12 6.0 ( 13687)  | CAU H 0.34 8.1 ( 18365)  | CGU R 0.19 12.7 ( 28781) |
| CUC L 0.13 14.9 ( 33870) | CCC P 0.23 11.4 ( 25776) | CAC H 0.66 15.5 ( 35229) | CGC R 0.55 36.0 ( 81497) |
| CUA L 0.02 2.7 ( 6183)   | CCA P 0.15 7.1 ( 16042)  | CAA Q 0.24 10.9 ( 24676) | CGA R 0.05 3.4 ( 7651)   |
| CUG L 0.63 71.6 (162266) | CCG P 0.50 24.3 ( 55081) | CAG Q 0.76 35.1 ( 79469) | CGG R 0.16 10.3 ( 23257) |
| AUU I 0.21 9.7 ( 22031)  | ACU T 0.10 4.7 ( 10676)  | AAU N 0.22 6.7 ( 15079)  | AGU S 0.09 5.2 ( 11881)  |
| AUC I 0.74 34.4 ( 77875) | ACC T 0.64 31.0 ( 70177) | AAC N 0.78 23.3 ( 52817) | AGC S 0.41 23.1 ( 52465) |
| AUA I 0.05 2.1 ( 4785)   | ACA T 0.08 3.6 ( 8205)   | AAA K 0.29 9.9 ( 22530)  | AGA R 0.02 1.2 ( 2645)   |
| AUG M 1.00 23.1 ( 52389) | ACG T 0.18 8.9 ( 20190)  | AAG K 0.71 24.5 ( 55631) | AGG R 0.04 2.3 ( 5286)   |
| GUU V 0.10 7.5 ( 16932)  | GCU A 0.11 12.1 ( 27420) | GAU D 0.31 16.6 ( 37515) | GGU G 0.20 16.4 ( 37240) |
| GUC V 0.29 21.4 ( 48528) | GCC A 0.51 56.7 (128572) | GAC D 0.69 36.5 ( 82685) | GGC G 0.61 48.9 (110770) |
| GUA V 0.10 7.5 ( 16955)  | GCA A 0.12 13.7 ( 30985) | GAA E 0.48 27.1 ( 61508) | GGA G 0.04 3.3 ( 7395)   |
| GUG V 0.50 36.2 ( 82121) | GCG A 0.26 28.3 ( 64235) | GAG E 0.52 29.6 ( 67176) | GGG G 0.15 11.7 ( 26599) |

Coding GC 61.88% 1st letter GC 65.07% 2nd letter GC 43.77% 3rd letter GC 76.81%

**Abbildung A 22.** Codon-Usage-Tabelle von *P. putida*, die als Referenz für die Codon-Harmonisierung von redH<sub>synth</sub> genutzt wurde.<sup>44</sup>

<sup>43</sup> November 2018: <http://www.kazusa.or.jp/codon/><sup>44</sup> November 2018: <http://www.kazusa.or.jp/codon/>

```

redH      1 atggacacgcacgtcagcgacacgacgacccccgcccggagcaggcgaaggcccccgcgggc
redH_synth 10 .....gtcg.....g.....t.....g.....

redH      61 ccggtcaccgacccggcgccggcacgcccgcctgcgtcgtcaccctgggcgcggcgcccg
redH_synth 70 .....g.....t.....g.....g.....c.....

redH      121 accggaggccaccggggggaactggcggaagggcacccgcctcgcgagctgtccgcc
redH_synth 130 .....c..t.....t.g..c.....ag....

redH      181 gcgggtctgcccgtcccgccgccttctgcctgaccacggccctcttcgacgcctacctg
redH_synth 190 ..c..g.....g..g.....g.....t.g.....

redH      241 cgggagaccgggatcgccgccgaggcgggcgccgaccccgccaccctgcgcgagcgc
redH_synth 250 ..c.....t.....c..c.....g.....

redH      301 atcctgggcacccggatgcccgcctcgatcgcgagcgcgtcctcgacgcctaccggcagc
redH_synth 310 .....c.....g.....c.....gt.g.....tcg

redH      361 atggggccgcccccgcgtggcggtgcgtcctccggactgcgggaggactccgctgcacag
redH_synth 370 .....g.....c.....ag.ag.....c.....ag.....t...

redH      421 tccttcgcccggccagcacgacacggctcctcgacgtctgcccgcacgaggacgtactggac
redH_synth 430 ag.....t.....gt.g.....g.....t.....

redH      481 gcggtcctgcggtgctgggcctcgctgtggtccgaccgcgccacggtgtaccgggacacg
redH_synth 490 ..c..g.....c.....ag.....c.....

redH      541 gacgccccgacgcctcgccgtggtcgtccaggagatgatccacaccgacgtcagcggc
redH_synth 550 .....g.....t.g.....g..g.....gtcg...

redH      601 gtgatgttcaccgtcgaccgggtcaaccccgcgccgacccgctcgtggtggaggcctgc
redH_synth 610 .....g.....g.....g.....t.g.....

redH      661 cagggcctgggcgaagggtcgttcgcccaggtctccagcgacttcttcgtcgtcgac
redH_synth 670 .....t.....gag...t.....gagttcg.....g..g...

redH      721 gacgagaagctggaggtcgtcgaggaacgggtccgctacaaggtcaccaagtgcgcgcc
redH_synth 730 .....g..g.....c..g.....g.....c..g

redH      781 ctggagcccggccgcatcggcacgacgaaggtcgacgcggcgcccgacgcgtcccttgc
redH_synth 790 .....g.....g.....c..c.....tcg..g..g...

redH      841 ctacccacgaccaactgcgcgaactcgccgccttgccgtccgcatccgcgacctgtac
redH_synth 850 t.g.....t.g.....g.....

redH      901 ggcagcgagcaggacatcgagtggggcgtgcgcgacggcgtcttcacactgttcagacc
redH_synth 910 ...tcg.....g.....

redH      961 cgcccgatcaccacccggcccgccgccccgcggcccggtccggcgcgctcagcccgtag
redH_synth 970 .....c..g.....g..c.....ag.....ct.gtcg.....

redH      1021 gtgccccgcagccggagccggtcctcaacggcacccctgtggtcgcgcacatggacatcggg
redH_synth 1030 ..g.....gt.g.....t

redH      1081 gagatcttcgtcggcctgatgaccccgctcggcctgagcttcgcccgctactaccagcgc
redH_synth 1090 .....g.....t.g.....tcg.....

redH      1141 aacgtgcacaccgactgcgcggcgccctcggcgtgcgcgacaccggcgaggccgacctg
redH_synth 1150 .....c.....t.g.....

redH      1201 cacatgggcttctaccaggccacgtctacctcaacatctcctacagctcctacctgttg
redH_synth 1210 .....g...t.g.....ag....tctag.....c.a

redH      1261 gccagtgacctgccaccccgacacgcgcacttcaccagccgcttcgtcagcgaggag
redH_synth 1270 .....g.....tcg.....gtcg.....

redH      1321 gtgcacctcgccgactacgagaacccgttcggcaccttccccggcgccatggaggacctg
redH_synth 1330 ..g...t.g.....g.....

redH      1381 ctctccaccgtccactggctgcagcacacggcccgtagatgacgcagatgaagtcccg
redH_synth 1390 t.gag.....g.....a.....ag....

redH      1441 tcccagcagatgggtcgacgcccggctctacgagttcgaccgggccccggcgccctgacctg
redH_synth 1450 ag.....g.....ct.g.....c.....t.g.....

```



|            |      |                                                                 |
|------------|------|-----------------------------------------------------------------|
| redH       | 1501 | accggtgatgagcaggcgcgaaactgcacggcgaaactccaccgcgacctcgctggttcac   |
| redH_synth | 1510 | .....c...tcgc.a.....t.g.....t.g.....                            |
| redH       | 1561 | gacatgcacatcggtacatgccgtactacatcaacgcgttcgccttctacggcctgctc     |
| redH_synth | 1570 | .....c.....t.g                                                  |
| redH       | 1621 | accgagctgtgccccgctggctcggcagcgacggcgtggcctgcagaaccgcgtcaag      |
| redH_synth | 1630 | .....t.g...tcg.....g...                                         |
| redH       | 1681 | accgacatgtccagcctcgcgaccgtcgagtcggccaaggaggtctggctcgtcgccacg    |
| redH_synth | 1690 | .....agttcg.....g.....g.....g.....                              |
| redH       | 1741 | gccgccaagaacgaccggcgctcctcgcgatcatcaaggacgaaccgctggaggacatc     |
| redH_synth | 1750 | .....g.....c.....                                               |
| redH       | 1801 | gcccggctgctgctgctgagggaccccgccggacagcgcttctgggaccggcacatggagccg |
| redH_synth | 1810 | .....c.....g.....c.....                                         |
| redH       | 1861 | ttcctgctgcgccaacggcaccggcgccaccaggagatggagatcacccaccggaggtgg    |
| redH_synth | 1870 | .....c.a...                                                     |
| redH       | 1921 | atcgacgacccctcctacatcttcagatgatccggcgctacgtcgccgacggcttctcc     |
| redH_synth | 1930 | .....gag.....c.....g.....ag.                                    |
| redH       | 1981 | atcgacgacatcctcgcgcgacgagcggtgtccgacgactcccgcgaggtgctgggc       |
| redH_synth | 1990 | .....t.g.....tcgtcg.....ag.....ag.....                          |
| redH       | 2041 | cggctgccgatgcccaagcgccaggctcctggacacggctcatctccctctacgccctgtgc  |
| redH_synth | 2050 | ..c.....g.....g.....g.....ag.t.g.....                           |
| redH       | 2101 | agcgagctgcgggagaccaccggatgtccatgatcacgtccatctggctggtgcggaac     |
| redH_synth | 2110 | tcg.....c.....c...ag.....ag.....c...                            |
| redH       | 2161 | gtggtctacgaggtcgccggcgccctggtcgccgacggcgctcctgcactcccgagcag     |
| redH_synth | 2170 | .....g.....g.....c.....g.....g.....ag.....                      |
| redH       | 2221 | atcgccacctggacttcgaggacgtgcgcgctacctcgccggcgacgaggacgcgcta      |
| redH_synth | 2230 | .....t.g.....t                                                  |
| redH       | 2281 | cgcgtcttcgacggggcccgcatcgacgcggcccgcc                           |
| redH_synth | 2290 | .....g.....c.....c.....                                         |

**Abbildung A 23.** Sequenzvergleich der Nukleotidsequenzen von *redH* und *redH\_synth*. [Die Unterschiede sind in grau hervorgehoben].

#### Nukleotidsequenz von *redH\_synth*:

GAATTCATATGGACACGCACGTGTCGGACACGACGACCCCGGCCGGAGCTGGCGAAGGCCCGGCCGGCCCG  
 GTGACCGACCCGGCCGGTCACGCCGCTGCGTGGTGACCTGGGCGCCGGCGGCCCGACCGGAGGCCACCGC  
 GGTGAACCTGGGCGCAAGGGCACCCGCTTGCCGAGCTGAGCGCCGCCGGGCTGCCGGTGCCGCCGCCCTTC  
 TGCCTGACCACCGCCTTGTCGACGCCTACCTGCGCGAGACCGGTATCGCCGCCGAGGCCGCCGGCGCCGACC  
 CGCGCACCTGCGCGAGCGCATCCTGGGCACCCGCATGCCGGCCTCGATCGCCGACGCCGTGTTGGACGCCTA  
 CGGCTCGATGGGCCGCCCGCGCGTGGCCGTGCGCAGCAGCGGACTGCGCGAGGACAGCGCTGCTCAGAGCTT  
 CGCCGGCCAGCACGACACGGTGTGGACGTGTGCGGCGACGAGGACGTTCTGGACGCCGTGCTGCGCTGCTG  
 GGCCTCGCTGTGGAGCGACCGCGCCACGGTGTACCGCGACACGGACGCCCGGACGCCTTGGCCGTGGTGGT  
 GCAGGAGATGATCCACACCGACGTGTCGGGCGTGATGTTACCGTGACCCGGTGAACCCGCGCCCGCACCG  
 CTTGGTGGTGGAGGCCTGCCAGGGCCTGGGCGAAGGTCTGGTGAGCGGTGAGGTGAGTTGCGACTTCTTCGT  
 GGTGGACGACGAGAAGCTGGAGGTGGTGGAGGAACGCGTGCCTACAAGGTGACCAAGTGCGCCCCGCTGG  
 AGCCGGGCCGCATCGGCATGACGAAGGTGGACGCCGCCGCCGCTCGGTGCCGTGCTTGACCCACGACCAAC  
 TGCGCGAATTGGGCGCCCTGGCCGTGCGCATCCGCGACCTGTACGGCTCGGAGCAGGACATCGAGTGGGGCG  
 TGCGCGACGGCGTGTTCACCTGTTCCAGACCCGCCGATCACCACCCGCCGGCCGCCGCCGCCGCCGAG  
 CGGCGCCTTGTGCCGTACGTGGCCCCGACGCCGAGCCGGTGTGAAACGGCACCTGTGGTTCGCGCATGGA  
 CATCGGTGAGATCTTCGTGGGCTGATGACCCGTTGGGCTGTCGTTGCCCGCTACTACCAGCGCAACGTG  
 CACACCGACTGCGCCGGCGCCTTGGGCGTGCAGACACCGGCGAGGCCGACCTGCACATGGGCTTCTACCAG  
 GGCCACGTGTACTTGAACATCAGCTACTCTAGCTACCTGCTAGCCAGTGCCTGCCGACCCGCGACCGAGCGCCA  
 CTTACCTCGCGCTTCGTGTCGGAGGAGGTGGAATTGGCCGACTACGAGAACCCGTTCCGGCACCTTCCCGGGC

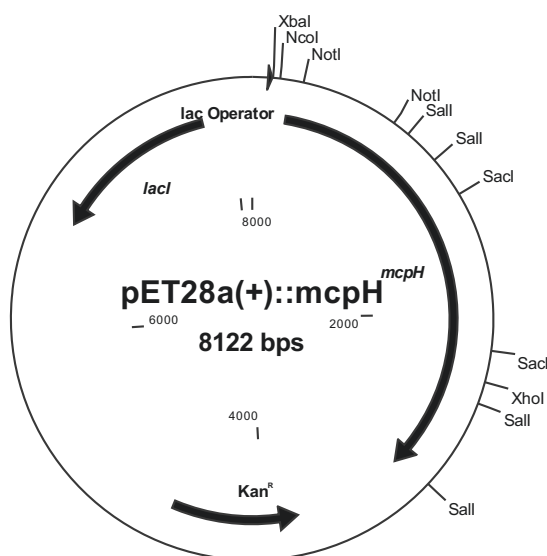


GGCATGGAGGACCTGTTGAGCACCGTGCACTGGCTGCAGCACACGGCCCGAGAGATGACGCAGATGAAGAG  
CCGCAGCCAGCAGATGGTGGACGCCCCTTGTACGAGTTCGACCGCGCCCGCGGCTTGGACCTGACCCGCAT  
GTCGCGACGCGAACTGCACGGCGAATTGCACCGCGACTTGGCCTGGTTCACGACATGCACATCGGCTACATG  
CCGTACTACATCAACGCCTTCGCCTTCTACGGCCTGTTGACCGAGCTGTGCGCCCGCTGGTTGGGCTCGGACG  
GCGTGGGCTGCAGAACCGCGTGAAGACCGACATGAGTTCGCTGCGCACCGTGGAGTCGGCCAAGGAGGTG  
TGGTCGGTGGCCAGGCCGCCAAGAACGACCCGGCCGTGCTGCGCATCATCAAGGACGAACCGCTGGAGGAC  
ATCGCCCGCTGCTGCGCGAGGACCCGGCCGACAGCGCTTCTGGGACCGCCACATGGAGCCGTTCTGCGC  
GCCAACGGCACCCGCGGCCACCAGGAGATGGAGATACCCACCCGCGATGGATCGACGACCCGAGCTACATC  
TTCCAGATGATCCGCCGCTACGTGGCCGACGGCTTCAGCATCGACGACATCTTGCGCCGCTCGTCGGGCTGGA  
GCGACGACAGCCGCGAGGTGCTGGGCCGCTGCCGATGCCGAAGCGCCAGGTGCTGGACACCGTGATCAGCT  
TGACGCCCTGTGCTCGGAGCTGCGCGAGACCACCCGCATGAGCATGATCACGAGCATCTGGCTGGTGCGCAA  
CGTGGTGTACGAGGTGGGCCCGCCGCTGGTGGCCGACGGCGTGTGTCACAGCCCGGACGAGATCGCCACCT  
GGACTTCGAGGACGTGCGCCGCTACTTGGCCGGCGACGAGGACGCCGTTTCGCGTGTTCGACCGCGCCCGCAT  
CGACGCCGCCCGCCGCTGCACGAACACAACAAGCGCTTGCCGGAACCGCCGCTAACCTTCGTGGGCGTGAC  
GACATACCGCCTCGGTGCGCCCGGCCGCCGACGGCGCCGCTTGGAAGGCTTGCCGCTCGCCGGGACGC  
ATCGTGGGCCGCGCCCGCATCGTGGAGGACCTGGTGTGGCAGGCCGACGAGTTCGAGGCCGGTGAGATCTTG  
GTGACCGGTTACACCGACGCCAGCTGGACGCCGCTGTTGCCATCGCCGGCGGTGTGGTGACCGACATCGGTT  
CGATGTTGTGCACTCTAGCATCGTGGCCCGGAGTTCACGTGCCGTCGGTGGTGAACACCAAGGACGCCAC  
CCAGCGCATCAACACCGGCGACCTGATCGTGGTGGACGGCGACGCCGGCACGGTGGAGGTGGTGGAGTCGG  
CCGACACCGACCCGAGGGCCCGGCCGCTGCCGCCGTACCCCGGCCGAGCCACCACCGACGAGCTCTGAT  
CTAGACTCGAG

#### Aminosäuresequenz von RedH\_synth:

Durch das Einfügen der Restriktionsschnittstellen ist das Protein RedH\_synth um zwei Aminosäuren C-terminal verlängert.

MDTHVSDTTTPAGAGEGPAGPVTDPAGHAACVVTLAGAGPTGGHRGELGGKGTRLAELSAAGLPVPPAFCLTTA  
LFDAYLRETGIAAEAAGADPRTLRLRILGTRMPASIADAVLDAYGSMGRPRVAVRSSGLREDSAAQSFAGQHDTV  
DVCGEDVLDVAVLRCWASLWSDRATVYRDTDAPDALAVVVQEMIHTDVSGVMFTVDPVNPRLVVEACQGL  
GGLVSGQVSSDFFVVDDEKLEVVEERVRYKVKCAPLEPGRIGMTKVDAAARSVPLTHDQLRELALAVRIRDLY  
GSEQDIEWGVVDGVFHLFQTRPITRPAAPAAPSGALSPYVAPQPEVLNGLWSRMDIGEIVGLMTPLGLSFAR  
YYQRNVHTDCAGALGVVDTEADLHMGFYQGHVYLNISYSSYLLAQCLPTRDQRHFTSRFVSEEDLADYENPFGT  
FPGGMEDLLSTVHWLQHTAREMTQMKSRQQMVDARLYEFDRARGLDLTRMSRRELHGELHRDLAWFHDHMI  
GYMPYYINAFYGLLTELARWLGS DGVGLQNRVKTDMSLRVTESAKEVWSVAQAANKNDPAVLRIIKDEPLEDI  
ARLLREDPAGQRFWDRHMEPFLRANGTRGHQEMEITHPRWIDDPSYIFQMIRRYVADGFSIDILRRSSGWSDDS  
REVLGRLPMPKRQVLDTVISLYALCSELRETRMSMITSIWLVRNVVYEVGRRVLADGVLHSPDEIAHLDFEDVRRYL  
AGDEDAVRVDFDRARIDAARRLHEHNKRLPEPPLTFVGVHDITASVRPAADGARLEGLAASPGRIVGRARIVEDLVW  
QADEFAGEILVTGYTDASWTPLFAIAGGVVTDIGSMLSHSSIVAREFHVPSVVNTKDATQRINTGDLIVVDGDAGT  
VEVVESADTDPQGPAGAAGTPAGATTDEL

***mcpH* – Ligase aus *S. longispororuber* (DSM 40667)****Abbildung A 24.** Vektorkarte von pET28a(+):mcpH.

Der Vektor pET28a(+):mcpH wurde nur in einer Version mit verschiedenen stummen und nicht-stummen Punktmutationen erhalten. Diese Mutationen sind in Tabelle A 10 aufgeführt und alle **stummen Mutationen** und **nicht-stummen Mutationen** in der Nukleotidsequenz markiert.

**Tabelle A 10.** Übersicht über die Mutationen des Gens *mcpH*.

| Position des Vektors | Position des Gens | Nukleotidaustausch | Aminosäureaustausch |
|----------------------|-------------------|--------------------|---------------------|
| 255                  | 44                | C → T              | T15I                |
| 337                  | 126               | T → C              | stumme Mutation     |
| 686                  | 475               | G → A              | A159T               |
| 842                  | 631               | G → A              | A211T               |
| 1463                 | 1252              | G → A              | A418T               |
| 2037                 | 1826              | A → T              | E609V               |
| 2039                 | 1828              | A → G              | T610A               |
| 2070                 | 1859              | A → T              | K620M               |
| 2257                 | 2046              | C → T              | stumme Mutation     |

**Nukleotidsequenz von *mcpH* (mit Mutationen erhaltene Sequenz):**

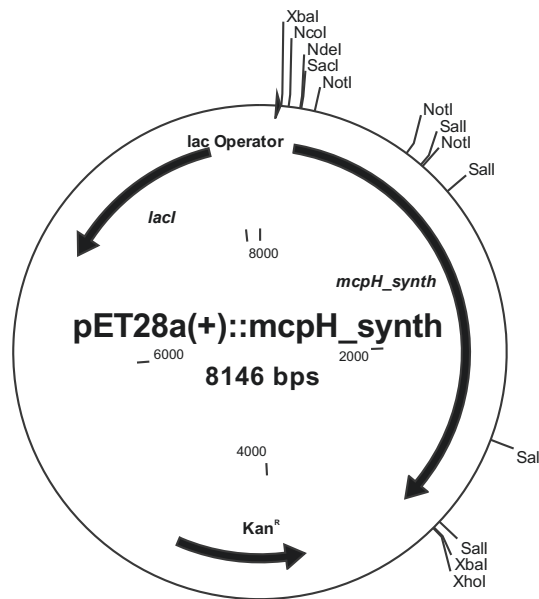
ATGACGACGAAGGCGACCACCGACACGCCCACCGCCGACGACA**T**CGCCACGGGTCCCGCCGCCACCGCGGCC  
 GCCGACACCCCGAGAGCACCGGGAGCACCGAGAGCACCGAGAGTCCCCAGGCC**C**ACCACCGACCGCCCGGCC  
 GATGCCCCGCACGCCGACCTCGTCGCCGTGCTCGGCCGCCCCACACCGCCACACCCGACGA**A**CTCGGCGGCA  
 AGGGGGCCCGGCTCGACGAGCTGACCGCGGCGGGCCTTCCGGTGGCGCCCGCGTTCTGCCTCACCACCGGCC  
 TGTTGACCTGTTCTCGCGAGAGCGGCCTCGCCGCCGAGATCCGCGCCGCCGAGGCCCGGGCCGAACCAG  
 CCCTCACCCTGCGCGAGGCGATCCTCGCCCGGGACGTCCCCGAGCCGATCGCCCGTACGATCCTCGCGGCGTA

CGAGGACCTGGGCGCCCCGCGTCGCGGTGCGCTCCTCCACGCCGCGCGAGGACTCCGCCGAGCGGTCTT  
CGCGGGCCAGCACGACACGGTCTCGACGTGTCGGGGGACGCGGCGCTGCTCGACGCGGTCAAGGTCTGCTG  
GGCGTCGCTGTGGTCGGACCGGGCGGCCCTACCGCTCGGGGCTGGCCCCACGGGTCTCATCGCCGTCGT  
GGTGAGGAGATGGTGCCCCGCGACGTGACGGGTGCTCTGTTACCGTCGACCCGATCGGCGGCAGGCCAA  
CCGCCTTGTTGGTGAAGCCTGTTGCGGGCTCGGCGAGGGCCTGGTGTGCGGCCGGGTCTCCAGTGAATCTTCT  
GTCGTGGACGACCGCACGCTCGACGTGTCGAGGAACGCGTCCGCTACAAGGTACCAAATGCGCCTCGCTCT  
CCCCGCGCCGATCGGCATGACGAAGGTGACGCGCGCGACCGGGACGCCCCCTGCCTGACCCGCGACCAGC  
TCGCGGCCCTGGCCCGCTCGCCCTGGACGTGCGCGACCGCTACGGCACCGAGCAGGACATCGAGTGGGCGC  
TGCGCGACGGCACCTGCACCTGCTGCAGGCCCGCCGATACCAACCGGCCCCGCCCCGAGACCTCCGACGA  
CGCCCGCAGCCCCTACCTCCCCAGCACCTGAAGGAGTCCCGGACGCCACCCGGCACGGCACCTGTGGTCC  
CGCATGGACATCGGCGAGATCTTCGTCGGCCTGATGTACCGCTCGGCCTGAGCTTCGCCCGGCACTACCAGG  
ACCATGTGCACGGCGACTGACAGGCGGCCCTCGGCGTGCGCGACACCGGCGACGTGCGCCTGCACATGGGCT  
TCTTCAGGGCCACGTCTACCTGAACATCTCTACACCGCGTACCTGCTCGGCCAGGCCGTGCCACCCGCGAC  
CAGCGGCACTTACGCGCCGCTTCGTCAGCGAGGAGGTGGACCTGGCGACGTACGAGAACCCCTTCGGCACC  
TTCCCCGGCGGCATGGCGGACCTGCTGTCCACGACGCACTGGCTGCGGGCCACCGGCAACGAGATGCTGGTC  
ATGAAGGGCCGCGCCCGGACATGGCCGAGGCCCGCTGTACGAGTTCGACCGCGCCCGGCGCCTGGACCTG  
ACCCGATGGGCCGCGCGAACTGCAGCCGAACCTACCCGCTACCTCGACTACTTCCACGACGCGCACGTGCG  
GCTACATGCCGTACTACATCAACGCGTTGCGGTTCTACGGCATCCTACCGAGCTGTGCGCAAGTGGCTCGG  
CTCCGCGGGCGACAACCTGCAGAACCGCATCAAGACCGACATGTCGAGCCTGCGCACGGTGGCATCGGCGCA  
GGAGATCTGGAGCGTGGCGCAGGCCGCGAAGGCCAGGCCCGGGTCATGGAGATCATCGAGGCGGCCCGC  
TGAGGAGGTCGCGGACAAGCTGCGCGCGGACCCGGACGGCGAGGCGTTCTGGCAGTCGAGATGGAGCCG  
TTCCTGCGCGCAACGGCACCCGGGGCGCCAGGAGATGGAGCTACCCATCAGCGCTGGATCGACGACCCG  
TCGTACATCTTCCAGATGATTCGCGGCTACGCCGCGGACGGCTTACCGCCGACGACATCATGGGCCGAGCC  
GCGCGCGCCAGGAGGGCGACACCCGCGCCGTCTGAAGAACTGCCGTGCGCGAGCGCAAGACCCTCGAG  
GGCCTCATCTCCATGTACGCCCTGTGACGCGAGCTGCGCGAGACCACCCGGATGTCGATGATCACGTGATCT  
GGCTGGTCAGGAACGTGCTGTACGAAGTGGGCCGGCAGCTGGTCGACGAGGGCGTGTGCACTCCCTGGAC  
GAGGTGGCCTTCTGGACTTCGCCGACGTACGCGGCTACTTGGCCGGTGAAGTGGCCGCGCGAGGCGTTCT  
CGCGGCCCGTGATCGAGGAGCGGCGCGCTGCACGAGTACCACAACCGGCTGCCGAGCCGCGCTCACCT  
TCGTGCGCGAGCAGACTGCACCCGCGCGGTGCGGCCGTGAAGGAGGGGACGCGCCTGGAGGGGCTCGGC  
TCGTGCCCCGGGCGGATCGTCGGCCGGGCGCCGATCGTCGAGGACCTGGTGTGGCAGGCCGACGATTCCAG  
GCCGCGAGATCCTCGTCACCCGCCACACCGACGCGTCTGGACGCTCTGTTGCCATCGCCGGCGGCGTCG  
TCACCGACATCGGGTCGATGCTCTGCACAGCTCCATCGTGTGCGGGAGTTCAACGTGCCCTCGGTGGTCAA  
CACCAAGTACGCCACGAAGTATCAACACCGGCGACATGGTCATGGTCGACGGCGACACCGGAGTCGTCGA  
GGTCGTGGAGGGCTGA

**Nukleotidsequenz von *mcpH* (originale, nicht erhaltene Sequenz):**

ATGACGACGAAGGCGACCACCGACACGCCCACCGCCGACGACACCGCCACGGGTCCCGCCGCCACCGCGGCC  
GCCGACACCCCCGAGAGCACCGGGAGCACCGAGAGCACCGAGAGTCCCCAGGCTACCACCGACCGCCCGGCC  
GATGCCCCGACGCGACCTCGTCGCCGTGCTCGGCCGCCCCACACCGCCACACCCGACGAACCTGGCGGCA  
AGGGGGCCCGGCTCGACGAGCTGACCGCGGCGGGCCTTCCGGTGCCGCCCGCGTTCTGCCTACCAACGGCC  
TGTTGACCTGTTCTGCGCGAGAGCGGCCCTCGCCGCCGAGATCCGCGCCGCCGAGGCCCGGGCCGAACAG  
CCCTACCGTGCGCGAGGCGATCCTCGCCCGGACGTCCCCGAGCCGATCGCCCGTACGATCCTCGCGGCGTA  
CGAGGACCTGGGCCGCCCCGCGTCGCGGTGCGCTCCTCCGCGCCGCGGAGGACTCCGCCGAGCGGTCTT  
CGCGGGCCAGCACGACACGGTCTCGACGTGTCGGGGGACGCGGCGCTGCTCGACGCGGTCAAGGTCTGCTG  
GGCGTCGCTGTGGTCGGACCGGGCGGCCCTACCGCTCGGGGCTGGCCCCGCGGGTCTCATCGCCGTCGT  
GGTGAGGAGATGGTGCCCCGCGACGTGACGGGTGCTCTGTTACCGTCGACCCGATCGGCGGCAGGCCAA  
CCGCCTTGTTGGTGAAGCCTGTTGCGGGCTCGGCGAGGGCCTGGTGTGCGGCCGGGTCTCCAGTGAATCTTCT  
GTCGTGGACGACCGCACGCTCGACGTGTCGAGGAACGCGTCCGCTACAAGGTACCAAATGCGCCTCGCTCT  
CCCCGCGCCGATCGGCATGACGAAGGTGACGCGCGCGACCGGGACGCCCCCTGCCTGACCCGCGACCAGC  
TCGCGGCCCTGGCCCGCTCGCCCTGGACGTGCGCGACCGCTACGGCACCGAGCAGGACATCGAGTGGGCGC  
TGCGCGACGGCACCTGCACCTGCTGCAGGCCCGCCGATACCAACCGGCCCCGCCCCGAGACCTCCGACGA  
CGCCCGCAGCCCCTACCTCCCCAGCACCTGAAGGAGTCCCGGACGCCACCCGGCACGGCACCTGTGGTCC  
CGCATGGACATCGGCGAGATCTTCGTCGGCCTGATGTACCGCTCGGCCTGAGCTTCGCCCGGCACTACCAGG

ACCATGTGCACGGCGACTGCGCGGCGGCCCTCGGCGTGCGCGACACCGGCGACGTCGGCCTGCACATGGGCT  
TCTTCCAGGGCCACGTCTACCTGAACATCTCCTACACCGGTACCTGCTCGGCCAGGCCGTGCCACCCGCGAC  
CAGCGGCACTTCACGCGCCGCTTCGTACGCGAGGAGGTGGACCTGGCGACGTACGAGAACCCCTTCGGCACC  
TTCCCCGGCGGCATGGCGGACCTGCTGTCCACGACGCACTGGCTGCGGGCCACCGGCAACGAGATGCTGGTC  
ATGAAGGGCCGCGCCCGGACATGGCCGAGGCCCGCTGTACGAGTTCGACCGCGCCCGGCGCCTGGACCTG  
ACCCGCATGGGCCCGCGCAACTGCACGCCGAACCTACCCGCTACCTCGACTACTTCCACGACGCGCACGTCG  
GCTACATGCCGTACTACATCAACGCGTTTCGGGTTCTACGGCATCCTACCGAGCTGTGCGCCAAGTGGCTCGG  
CTCCGCGGGCGACAACCTGCAGAACCGCATCAAGACCGACATGTGCGAGCCTGCGCACGGTGGCATCGGCGCA  
GGAGATCTGGAGCGAGACGCAGGCCGCGAAGGCCAGGCCCGGGTCAAGGAGATCATCGAGGCGGCCCCGC  
TGGAGGAGGTGCGCGACAAGCTGCGCGCGGACCCGACGGCGAGGCGTTCTGGCAGTCGCAGATGGAGCCG  
TTCCTGCGCGCCAACGGCACCCGGGGCCGCCAGGAGATGGAGCTACCCATCAGCGCTGGATCGACGACCCG  
TCGTACATCTTCCAGATGATCCGCCGCTACGCCGCGGACGGCTTCACCGCCGACGACATCATGGGCCGACGCC  
GCGCGCGCCAGGAGGGCGACACCCGCGCCGTCTGAAGAACTGCCGCTGCCGACGCGCAAGACCCTCGAG  
GGCTCATCTCCATGTACGCCCTGTGACGCGAGCTGCGCGAGACCACCCGGATGTGATGATCACGTTCGATCT  
GGCTGGTCAGGAACGTCGTGTACGAAGTGGGCCGGCAGCTGGTCGACGAGGGCGTGTGCACTCCCTGGAC  
GAGGTGGCCTTCTGGACTTCGCCGACGTACGCGGCTACTTGGCCGGTGAGCTGCCGCGCGCGAGGGCGTTCT  
CGCGGCCCGTGATCGAGGAGCGGCGGCGCGTGCACGAGTACCACAACCGGCTGCCGGAGCCGCCGCTCACCT  
TCGTGCGCGAGCACGACTGCACCCGCGCGGTGCGGCCGGTGAAGGAGGGGACGCGCCTGGAGGGGCTCGGC  
TCGTGCGCCGGGCGGATCGTCGCCGGGCGCCGATCGTCGAGGACCTGGTGTGGCAGGCCGACGAGTTCCAG  
GCCGCGAGATCCTCGTCACCCGCCACACCGACGCGTCTGGACGCTCTGTTGCCATCGCCGGCGGCGTCTG  
TCACCGACATCGGGTCGATGCTCTCGCACAGCTCCATCGTGTGCGGGGAGTTCAACGTGCCCTCGGTGGTCAA  
CACCAAGTACGCCACGCAAGTGATCAACACCGGCGACATGGTCATGGTCGACGGCGACACCGGAGTCGTCGA  
GGTCGTGGAGGGCTGA



**Abbildung A 25.** Vektorkarte von pET28a(+):mcpH\_synth. Das Plasmid wurde von *GenScript USA Inc.* (Piscataway, NJ, USA) erworben.

Der Vektor pET28a(+):mcpH\_synth wurde von *GenScript USA Inc.* (Piscataway, NJ, USA) erworben. Es wurden in *E. coli* und *P. putida* selten vorhandene Codons durch Einfügen stummer Mutationen manuell abgeändert und SacI und XhoI Schnittstellen innerhalb des Gens entfernt. Die Änderungen sind hervorgehoben.

#### Nukleotidsequenz von mcpH\_synth:

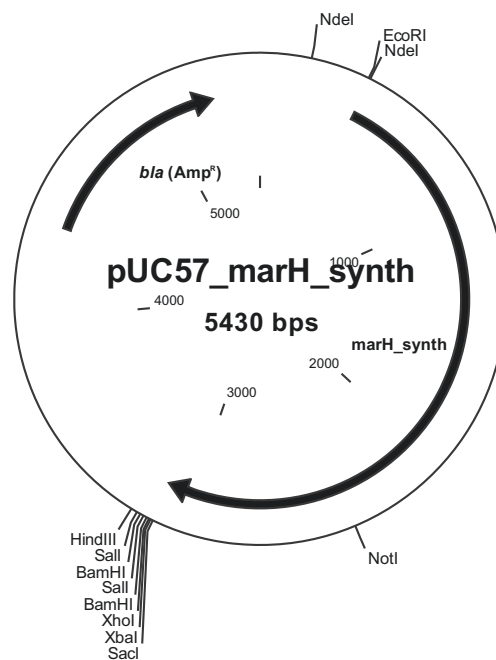
ATGGAGCTCATGACGACGAAGGCGACCACCGACACGCCCCACCGCCGACGACACCGCCACGGGTCCC GCCGCC  
ACCGCGGCCGCCGACACCCCGAGAGCACC GGAGCACC GAGAGCACC GAGAGTCCCCAGGCTACCACCGAC

CGCCCGGCGATGCCCCGACGCCGACCTCGTCGCCGTGCTCGGCCGCCCCACACCGCCACCCCCGACGAAC  
TCGGCGGCAAGGGGGCCCGGCTCGACGAGCTGACCGCGCGGGGCTCCCGGTGCCGCCCCGCTTCTGCCTCA  
CCACCGGCTGTTTCGACCTGTTCTGCGCGAGAGCGGCCTCGCCGCCGAGATCCGCGCCGCCGAGGCCCGGG  
CCGAACCAGCCCTACCGTGCGGAGGCGATCCTCGCCCGGACGTCCCCGAGCCGATCGCCCGTACGATCCT  
CGCGGCGTACGAGGACCTGGGCCGCCCCCGCTCGCGGTGCGCTCCTCCGCGCCGCGCGAGGACTCCGCCGA  
GCGGTCTTCGCGGGCCAGCACGACACGGTCTCGACGTGTCGGGGGACGCGGCGCTGCTCGACGCGGTCAA  
GGTCTGCTGGGCGTCGCTGTGGTCGGACCGGGCGGCCCTACCGCTCGGGGCTGGCCCCGCGGGCTCCAT  
CGCCGTCGTGGTGACGAGATGGTGCCCGCCGACGTGACGGGTGCTCTGTTACCGTCGACCCGATCGGCGG  
CCGCCCCAACCGCTCGTGGTGAAAGCCTGTTGCGGGCTCGGCGAGGGCCTGGTGCGGGCCGGGTCTCCAG  
TGACTTCTTCGTCGTGGACGACCGCACGCTCGACGTGTCGAGGAACGCGTCCGCTACAAGGTCACCAAATGC  
GCCTCGCTCTCCCCGCGCCGATCGGCATGACGAAGGTCGACGCCGCCGACCGGGACGCCCCCTGCCTGACCC  
GCGACAGCTCGCGGCCCTGGCCCGGCTCGCCCTGGACGTGCGCGACCGCTACGGCACCGAGCAGGACATCG  
AGTGGGCGCTGCGCGACGGCACCTGCACCTGCTGAGGCCCGCCGATACCAACCGGCCCGCCCCGAGA  
CCTCCGACGACGCCCCGAGCCCCCTACCTCCCCAGCACCTGAAGGAACTCCCGACGCCACCCGGCACGGCAC  
CCTGTGGTCCCGCATGGACATCGGCGAGATCTTCGTCGGCCTGATGTCGCCGCTCGGCCTGAGCTTCGCCCCG  
CACTACCAGGACCATGTGCACGGCGACTGCGCGGCGGCCCTCGGCGTGCGCGACACCGGCGACGTGCGCCTG  
CACATGGGCTTCTCCAGGGCCACGTCTACCTGAACATCTCTACACCGCGTACCTGCTCGGCCAGGCCGTGCC  
CACCCGCGACCGGCACTTCACGCGCGCTTCGTCAGCGAGGAGTGACCTGGCGACGTACGAGAACCC  
CTTCGGCACCTTCCCCGGCGGCATGGCGGACCTGCTGTCCACGACGCACTGGCTGCGGGCCACCGGCAACGA  
GATGCTGGTCATGAAGGGCCGCGCCCGGACATGGCCGAGGCCCGCCTGTACGAGTTCGACCGCGCCCGGCG  
CCTGGACCTGACCCGCATGGGCCGCCGGAAGTGCACGCCGAAGTCAACCGCTACCTCGACTACTTCCACGAC  
GCGCACGTGCGGTACATGCCGTACTACATCAACGCGTTCGGGTTCTACGGCATCCTACCGAGCTGTGCGCCA  
AGTGGCTCGGCTCCGCGGGCGACAACCTGCAGAACCGCATCAAGACCGACATGTCGAGCTGCGCACGGTGG  
CATCGGCGCAGGAGATCTGGAGCGAGACGACGAGGCCGGAAGGCCCGCCCCCGGGTCAAGGAGATCATCGAG  
GCGGCCCGCTGGAGGAGGTGCGGACAAGCTGCGCGCGGACCCGGACGCGGAGGCGTTCTGGCAGTCGCA  
GATGGAGCCGTTCTGCGCGCCAACGGCACCCGGGGCCGCCAGGAGATGGAACTACCCATCAGCGCTGGAT  
CGACGACCCGTCGTACATCTTCAGATGATCCGCCGCTACGCCGCGGACGGCTTACCGCCGACGACATCATG  
GGCCGACGCCGCGCGCCAGGAGGGCGACACCCGCGCCGTCCTGAAGAACTGCCGCTGCCGACGCGAA  
GACCTCGAAGGCCTCATCTCCATGTACGCCCTGTGACGCGAGCTGCGCGAGACCACCCGGATGTGATGATC  
ACGTCGATCTGGCTGGTCCGCAACGTCGTGTACGAAGTGGGCCGGCAGCTGGTCGACGAGGGCGTGCTGCAC  
TCCCTGGACGAGGTGGCTTCTGGAAGTTCGCCGACGTCCGCGGCTACTTGGCCGGTGAGCTGCCGCGCGCG  
AGGCGTTCTCGCGGCCCGTGATCGAGGAGCGGCGGCGCTGCACGAGTACCACAACCGGCTGCCGGAGCCG  
CCGCTCACCTTCGTCGCGGAGCAGACTGCACCCGCGCGGTGCGGCCGGTGAAGGAGGGGACGCGCCTGGA  
GGGGCTCGGCTCGTCGCCCGGGCGGATCGTCGGCCGGGCGCATCGTCGAGGACCTGGTGTGGCAGGCCG  
ACGAGTTCCAGGCCGGCGAGATCCTCGTACCCGCCACACCGACGCGTCTGGACGCCTCTGTTGCCATCGC  
CGGGCGGTCGTCACCGACATCGGGTCGATGCTCTCGACAGCTCCATCGTGTGCGGGGAGTTCAACGTGCCC  
TCGGTGGTCAACACCAAGTACGCCACGCAAGTATCAACACCGGCGACATGGTCATGGTCGACGGCGACACC  
GGCGTGCTCGAGGTCGTGGAGGGCTGA

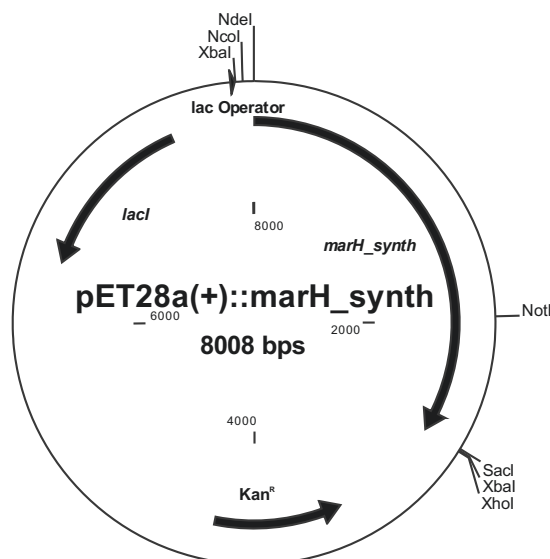
#### Aminosäuresequenz von McpH<sub>synth</sub>:

MTTKATDTPTADDTATGPAATAAADTPESTGSTESTESPQATTDPRADAPHADLVAVLGRPHTATPDELGGKGA  
RLDELTAAGLPVPPAFCLTTGLFDLFLRESGLAAEIRAAEARAEPALTVREAILARDVPEPIARTILAAAYEDLGRPRVAV  
RSSAPREDSAERSFAGQHDTVLDVSGDAALLDAVKVCWASLWSDRAAAYRSGPGPAGSIAVVQEMVPADVSGV  
LFTVDPIGGRPNRLVVEACCLGEGLVSGRVSSDFVVDRTLDVVEERVRYKVTKCASLSPGRIGMTKVDAADR  
APCLTRDQLAALARLALDVRDRYGTEQDIEWALRDGTLHLLQARPITTRPRPETSDDARSPYLPQHLKELPDATRHG  
TLWSRMDIGEIVGLMSPLGLSFARHYQDHHVHGDCAALGVDRDGDVGLHMGFFQGHVYLNISYAYLLGQAVP  
TRDQRHFTRRFVSEEVLDATYENPFGTFPGGMADLLSTTHWLRATGNEMLMKGRARDMAEARLYEFDARRRLD  
LTRMGRRELHAELTRYLDYFHDHAVGYMPYYINAFGYGILTELCAKWLGSAAGDNLQNRKTDMSLRVVASAQEI  
WSETQAAKARPRVKEIEAAPLEEADKLADPDGEAFWQSQMEPFLRANGTRGRQEMELTHQRWIDDPYIFQ  
MIRRYAADGFTADDIMGRSRARQEGDTRAVLKKLPLPQRKTLEGLISMYALCSELRETRMSMITSIVLVRNVVYEV  
GRQLVDEGLVHSLDEVAFLDFADVRYLAGELPAREAFSRPVIERRRVHEYHNRLPEPPLTFVGEHDCTRAVRPVK  
EGTRLEGLGSSPGRIVGRARIVEDLVWQADEFAQEILVTRHTDASWTPLFAIAGGVVTDIGSMLSHSSIVSREFNV  
PSVVNTKYATQVINTGDMVMVDGDTGVVEVVEG

**marH – Ligase aus *S. sp.* CNQ-617**



**Abbildung A 26.** Vektorkarte von pUC57::marH\_synth. Das Plasmid wurde von *GenScript USA Inc.* (Piscataway, NJ, USA) erworben.



**Abbildung A 27.** Vektorkarte von pET28a(+):marH\_synth. Das Plasmid wurde von B. Sc. *Annabel Arens* im Rahmen ihrer Bachelorarbeit erstellt.<sup>[259]</sup>

Der Vektor pUC57::marH\_synth wurde von *GenScript USA Inc.* (Piscataway, NJ, USA) erworben. Das Gen marH\_synth wurde codonoptimiert<sup>45</sup> für *P. putida* KT2440. Zusätzlich wurden *upstream* des Gens Sequenzen für eine EcoRI und NdeI Schnittstelle eingefügt und *downstream* für SacI, XbaI und XhoI. Die Schnittstellen sind kursiv markiert.

<sup>45</sup> November 2018: <http://www.jcat.de/> <sup>[412]</sup>

|            |      |                                                               |
|------------|------|---------------------------------------------------------------|
| marH       | 1    | atgacaacgcacgcaaccgacaccccggtcaccgaggagtacgcccaccaggtcgtcctc  |
| marH_synth | 10   | .....C..C.....C.....g.....C..a.....g..g..g                    |
| marH       | 61   | ctggcgcgggaccgcagccgacccggccgtcctggcggaaggccgcccgatcggc       |
| marH_synth | 70   | ..g.....C..C.....g.....g.....C.....C.....                     |
| marH       | 121  | gagatgctggctgacggactgcgggtaccgcccgccttctgcctcaccacgaactcttc   |
| marH_synth | 130  | ..a.....C.....C.....g.....g.....g.....g...                    |
| marH       | 181  | gccgcgtatctgagcgagaccggcctggcgtccgaactgcgcggcaccgacagcgcgtcc  |
| marH_synth | 190  | .....C..C...tcg..a.....C..g.....tcg.....g                     |
| marH       | 241  | gcgcgggagcgggtgctggccaccgggataccgccgccatcgcgaggcgatcatcgcc    |
| marH_synth | 250  | ..C..C..a...C.....C..C.....g.....C..a..C.....                 |
| marH       | 301  | ggatacacccggttggggcgccccgggtgggcgtgcgctcctcgccctgcgcgaggac    |
| marH_synth | 310  | ..C.....cc.....C.....g..C.....g..g.....a...                   |
| marH       | 361  | tcgcggggccagtcgttcgccggccagcacgacgatcctggacgtgtcggcgacgcg     |
| marH_synth | 370  | ..g..C.....C.....g.....C.....                                 |
| marH       | 421  | gatctgctggacgcctacgcacttgcctgggctcctgtggtcggaccgcgccaccgcc    |
| marH_synth | 430  | ..C.....g.....C.....g.....                                    |
| marH       | 481  | taccgcgacgacgacagcgccccggcgccatcgcggtggtggtgcaggagatggtccac   |
| marH_synth | 490  | .....tcg..C..g.....C.....a.....g...                           |
| marH       | 541  | gcggacgtgagcgggtgtgccttcacggtcgaccctgcagcgccccgccgcaccgcac    |
| marH_synth | 550  | ..C.....tcg..C..g.....C..g.....g..gtcg.....                   |
| marH       | 601  | gtcgtcgaggcgtgccaggcctgggggaggggctggtctcggccgggtgtccagcgac    |
| marH_synth | 610  | ..g..g..a..C.....C..a..C.....g..g.....C.....gtcg...           |
| marH       | 661  | tacttcgtgctcgacgaccgcaccctcgaggtcgtcgaggagcgggtccggcacaagggtg |
| marH_synth | 670  | .....g.....g..a..g..g..a..a..C..g..C.....                     |
| marH       | 721  | accaagtgcgccccgctggcgccccggaagatcgggatgaccagggtcgaggccgcggcc  |
| marH_synth | 730  | .....C..g..C.....C.....C..C..g..a.....C...                    |
| marH       | 781  | cgcaatgtgccctgtctgtcggggagcagctggccgaactctccggcatgccctgcgg    |
| marH_synth | 790  | .....C.....g..C.....C..a.....g..g..C.....C.....               |
| marH       | 841  | ctgcgcagcaggtacggcgccggagcaggacatcgagtgggggatgcgcgacggtgcgctc |
| marH_synth | 850  | .....tcgc..C.....C..a.....a.....C.....C..C..g                 |
| marH       | 901  | tggttcttccagacgcggcccatcaccaccgcccgcgcgcgggtcggcgaccgtccg     |
| marH_synth | 910  | .....C..C..g.....g.....C..g.....C...                          |
| marH       | 961  | ggggcgcccgagtcctgtatgtcaccccgagaaggacgcgatcgagcagggcaccttg    |
| marH_synth | 970  | ..C.....tcg.....C..g.....C.....a.....                         |
| marH       | 1021 | tggtcgcggtatggacatcgagagatcttcgtcgggctgatgaccccgctgggctgagc   |
| marH_synth | 1030 | .....C.....C..a.....g..C.....C...tcg                          |
| marH       | 1081 | ttcgcgggtactaccagcagcatgtgcacctggactgcacctcgccctcggcgcccg     |
| marH_synth | 1090 | .....C.....C.....g.....C.....                                 |
| marH       | 1141 | gtcaccggcgaccccgatctgccgatgggctatgtgcaagggcacgtctacctcaacatc  |
| marH_synth | 1150 | ..g.....g..C.....C.....g..C.....g.....g.....                  |
| marH       | 1201 | tcctacagcgctatgtgatggcgagtgctgcccacccgggaccagtggcgcttcacc     |
| marH_synth | 1210 | ..g...tcg.....C.....C.....C.....g.....C.....                  |
| marH       | 1261 | agccggttcgtcagcgaggaggtggacctgaccgggtacgagaaccccttcggcgccgttc |
| marH_synth | 1270 | tcg..C.....gtcg..a..a.....C.....a.....g.....C...              |
| marH       | 1321 | ccggcgccctcaccgacgccctgtcgatcgcttcttggtccgcaccacggccaacgag    |
| marH_synth | 1330 | ..g.....g.....g.....C.....a                                   |



|            |      |                                                               |
|------------|------|---------------------------------------------------------------|
| marH       | 1381 | ctgacgacatgaaggcccgggccgagcggatgtcctcctccgcgcctatgagttcgac    |
| marH_synth | 1390 | .....c.....c.....a..c.....g..g..g.....c..a..t...              |
| marH       | 1441 | cgcgacagggttttgacctgaccggatgggcccgcagcgaactggacatggagctcaag   |
| marH_synth | 1450 | .....c..c..cc.....c.....tcg.....a..g...                       |
| marH       | 1501 | cgccgcctcgggtacttccacgacatgcatgtgggtacatgccctactacatccacgcg   |
| marH_synth | 1510 | .....g..c.....c.....c.....g.....c.....c                       |
| marH       | 1561 | ttcggcttctacgcgggtgctggcgagctgtgcaagcagtggtcggcgacgagggcgctc  |
| marH_synth | 1570 | .....c.....c..a.....g.....a.....g                             |
| marH       | 1621 | aacctgcagaaccgcgtgaagaccgacatgtccaaacctgcgcacagtggagtcggccaag |
| marH_synth | 1630 | .....g.....c.....a.....                                       |
| marH       | 1681 | gagatctggtccgtggcccaggccgccaaggaccggccgcgggtgctggaactcatcgag  |
| marH_synth | 1690 | ..a.....g.....c.....c.....c.....g.....a                       |
| marH       | 1741 | gaactgccgctggacggcatcgaggaaagccctccgcgcggacgaagagggccgcgagttc |
| marH_synth | 1750 | .....a.....g.....c.....a.....a..t                             |
| marH       | 1801 | tggcaggagcagatggagcccttctcgcgcccacggcaccgcgggcccgcaggagatg    |
| marH_synth | 1810 | .....a.....a..g.....c.....a...                                |
| marH       | 1861 | gagatcacccaccccggtggatcgacgaccgtcgtagctttccagatgatccggcgcg    |
| marH_synth | 1870 | ..a.....g..c.....g.....c.....                                 |
| marH       | 1921 | tacgccgcggacgggttctccatcgacgacatcctccggcgccagggcgccggcaggac   |
| marH_synth | 1930 | .....c.....c.....g.....g..c.....tcg.....c.....                |
| marH       | 1981 | gcctcgcacacgggtgtgaagcaactgccgctgccaaacggcgggccgtggaggcgcc    |
| marH_synth | 1990 | .....c.....g.....g..g..c..c.....a..c...                       |
| marH       | 2041 | atctcgatgtaccggacctacagcgagcttcgcgaggtcaccggatgtcgatgatcacc   |
| marH_synth | 2050 | .....c.....tcg..a..g.....a..g.....c.....                      |
| marH       | 2101 | tcgatctggctggtgcgcaacgtggtctacgaagtgggcccgcgcctgctggaggccggg  |
| marH_synth | 2110 | .....g.....c.....a.....c                                      |
| marH       | 2161 | gtgctgcactccatggacgaggtggcgctacctgacttcgaggacatccgcgcctatctg  |
| marH_synth | 2170 | .....g.....a.....c.....g.....a.....c...                       |
| marH       | 2221 | gccggtgagctgtccgagggcgaggcggttcgaccgggccaagatcgacggagcccggcg  |
| marH_synth | 2230 | .....c..a.....g..a..c..a..c.....c.....c.....c                 |
| marH       | 2281 | ctgcacgaataaccacaagcggctgcccggagccgcgctcaccttcgtgggcgagcacgac |
| marH_synth | 2290 | .....c.....a.....g.....a.....                                 |
| marH       | 2341 | ccggcttcgcgcgtgcggcccggtcccgcaggggagcacctggagggctcggttcacagc  |
| marH_synth | 2350 | .....c..g.....c..g..g..g.....c..a.....a..c..g..c..gtcg        |
| marH       | 2401 | ccgggcccgcgtggtggccggggcccggtcgtcgaggacctcgtctggcaggccgacgag  |
| marH_synth | 2410 | ..g.....c.....c.....c..g..a.....g..g.....a                    |
| marH       | 2461 | ttccaggccggggaaatcctgatcacccgctacaccgacgcacatggaccccgcttttc   |
| marH_synth | 2470 | ..t.....c.....c.....c.....g...                                |
| marH       | 2521 | gccatcgcgaggcggtcgtcacgacatcggatcgatgctctcgcacagttcgatcgctg   |
| marH_synth | 2530 | .....c..c.....g..g.....c.....g.....tcg.....                   |
| marH       | 2581 | gcgcgggaattcaatgtgccgtccgtcgtgaacaccaagttcgcgacgcaggtcatccac  |
| marH_synth | 2590 | ..c..c.....t..c.....g..g.....c..c.....g.....                  |
| marH       | 2641 | accggggacctgatcgtggtcgacggggacgccggcac                        |
| marH_synth | 2650 | .....c.....g.....c.....                                       |

**Abbildung A 28.** Sequenzvergleich der Nukleotidsequenzen von *marH* und *marH\_synth*. [Die Unterschiede sind in grau hervorgehoben].



**Nukleotidsequenz von *marH\_synth*:**

ATGACCACCCACGCCACCGACACCCCGGTGACCGGCGAATACGCCGACCAGGTGGTGTCTGCTGGGCGCCGGC  
 CCGCAGCCGGACCCGGCCGTGCTGGGCGGCAAGGCCGCCGCATCGGCCGAAATGCTGGCCGACGGCCTGCC  
 GGTGCCGCCGGCCTTCTGCTGACCACCGAACTGTCGCCGCTACCTGTCGGAACCGGCCTGGCCTCGGAA  
 CTGCGCGGCACCGACTCGCGCTCGGCCCCGGAACGCGTGCTGGCCACCGGCATCCCGCCGGCCATCGCCGAA  
 GCCATCATCGCCGGCTACACCCGCTGGGCCGCCCGCGCGTGCCGTGCGCTCGTCGGCCCTGCGCGAAGACT  
 CGGCCGGCCAGTCGTTCCGCCGCCAGCAGACACCATCTGGACGTGTCGGGCGACGCCGACCTGCTGGACG  
 CCGTGCGCACCTGCTGGGCCTCGCTGTGGTCGGACCGCGCCACCGCCTACCGCGACGACGACTCGGCCCCGG  
 GCGCCATCGCCGTGGTGGTGACGAAATGGTGACGCCGACGTGTCGGGCGTGCCCTTACCGTGGACCCGG  
 TGTCGGCCCCGCCGACCGCATCGTGGTGGAAGCCTGCCAGGGCCTGGGCGAAGGCCTGGTGTGGGCCCGCG  
 TGTCGTGCGACTACTCTGTGCTGGACGACCGCACCTGGAAGTGGTGGAAGAACGCGTGCGCCACAAGGTGA  
 CCAAGTGCGCCCCGCTGGCCCCGGGCAAGATCGGCATGACCCGCGTGGAAGCCGCCGCCGCAACGTGCCGT  
 GCCTGTCGCGCGAACAGCTGGCCGAAGTGTGCGGCCACGCCCTGCGCCTGCGCTCGCGCTACGGCGCCGAACA  
 GGACATCGAATGGGGCATGCGCGACGGCGCCCTGTGGTTCTCCAGACCCGCCGATACCAACCCGCCCGGCC  
 GCCGGCTCGGGCGACCGCCCCGGGCGGCGCCCGCTCGCCGTACGTGACCCCGCAGAAGGACGCCATCGAACAG  
 GGCACCCTGTGGTCGCGCATGGACATCGGCGAAATCTTCGTGGGCCTGATGACCCCGCTGGGCCTGTCTTCG  
 CCCGCTACTACCAGCAGCACGTGCACCTGGACTGCACCTCGGCCCTGGGCGCCCGCGTGACCGGCGACCCGGA  
 CCTGCCGATGGGCTACGTGCAGGGCCACGTGTACCTGAACATCTCGTACTCGGCCTACGTGATGGCCCAAGTGC  
 CTGCCGACCCGCGACCAAGTGGCGCTTACCTCGCGCTTCTGTGCGGAAGAAGTGGACCTGACCGGCTACGAAA  
 ACCCGTTGCGCCGCTTCCCGGGCGGCCTGACCGACGCCCTGTGATCGCCTTCTGGCTGCGCACCAACCGCCAA  
 GAACTGACCGACATGAAGGCCCGCGCCGAACGCATGTCGTCGTCGCGCCTACGAATTTGACCGCGACCGC  
 GCCCTGGACCTGACCCGCATGGGCCGCTCGGAAGTGGACATGGAAGTGAAGCGCCGCTGGGCTACTTCCAC  
 GACATGCACGTGGGCTACATGCCGTACTACATCCACGCCTTCGGCTTCTACGCCGTGCTGGCCGAAGTGTGCAA  
 GCAGTGGCTGGGCGACGAAGGCGTGAACCTGCAGAACCGCGTGAAGACCGACATGTGCAACCTGCGCACCGT  
 GGAATCGGCCAAGGAAATCTGGTCGGTGGCCAGGCCGCCAAGGACCGCCCGCGCGTGCTGGAAGTATCGA  
 AGAAGTGGCGCTGGACGGCATCGAAGAAGCCCTGCGCGCCGACGAAGAAGGCCGCGAATTTGGCAGGAAC  
 AGATGGAACCGTTCTGCGCGCCACGGCACCCGCGGCCCGCAGGAAATGGAATACCCACCCGCGCTGGA  
 TCGACGACCCGCTGATCGTGTTCAGATGATCCGCCGCTACGCCGCCGACGGCTTCTCGATCGACGACATCCTG  
 CGCCGCTCGGGCGGCCCGCCAGGACGCCTCGCACACCGTGCTGAAGCAGCTGCCGCTGCCGAAGCGCCGCGCC  
 GTGGAAGCCGCCATCTCGATGTACCGCACCTACTCGGAAGTGCAGCAAGTACCCGCGATGTCGATGATCACT  
 CGATCTGGCTGGTGCAGAACGTGGTGTACGAAGTGGGCCGCCGCTGCTGGAAGCCGGCGTGCTGCACTCGA  
 TGGACGAAGTGGCTACCTGGACTTCGAAGACATCCGCGCCTACCTGGCCGGCGAAGTGTGGAAGCCGAAG  
 CCTTCGACCGCGCAAGATCGACGGCGCCCGCCGCTGCACGAATACCAAGCGCCTGCCGGAACCGCCGCT  
 GACCTTCGTGGGCGAACACGACCCGGCCTCGGCCGTGCGCCCGTGCCGGACGGCGAACACCTGGAAGGCCT  
 GGGCTCGTCGCCGGGCCGCGTGCTGGTGGGCCGCGCCGCGTGCTGGTGAAGACCTGGTGTGGCAGGCCGACGAAT  
 TTCAGGCCGGCGAAATCCTGATCACCCGCTACACCGACGCCACCTGGACCCCGCTGTTCCGCATCGCCGGCGG  
 CGTGGTGACCGACATCGGCTCGATGCTGTCGCACTCGTCGATCGTGGCCCGCAATTTAACGTGCCGTGGTG  
 GTGAACACCAAGTTCGCCACCCAGGTGATCCACACCGCGACCTGATCGTGGTGGACGGCGACGCCGGCACC  
 GTGGAAGTGGTGGAAGTCTCGAGCTCTGA

**Aminosäuresequenz von *MarH\_synth*:**

Durch das Einfügen der Restriktionsschnittstellen ist das Protein *MarH\_synth* um zwei Aminosäuren C-terminal verlängert.

MTTHATDTPVTGEYADQVLLGAGPQDPVAVLGGKAARIGEMLADGLPVPPAFCLTTELFAYLSETGLASELRGT  
 DRSARERVLATGIPPAIAEIIAGYTRLGRPRVAVRSSALREDSAGQSFAQHDTILDVSGDADLLDAVRTCWASL  
 WSDRATAYRDDDSAPGAIAVVVQEMVHADVSGVAFTVDPVSARPHRIVVEACQGLGEGLVSGRVSSDYFVLDDR  
 TLEVVEERVRHKVTKAPLAPGKIGMTRVEAAARNVPCLSREQLAELSRHALRLRSRYGAEQDIEWGMRDGLWF  
 FQTRPITRPAAGSGDRPGGARSPYVTPQKDAIEQGLWSRMDIGEIVGLMTPGLLSFARYYQQHVHLDCTSLG  
 ARVTGDPDLPNGYVQGHVYLNISYSAYVMAQCLPTRDQWRFTSRFVSEVDLTGYENPFGRFPGGTLTALSIAFW  
 LRTTANELTDMKARAERMSSSRAYEFDRLDRLTRMGRSELDMELEKRRLLGYFHDHMHVGYMPYIHAFFYAVLA  
 ELCKQWLGDGEGVNLQNRVKTDMSNLRTVESAKEIWSVAQAAKDRPRVLELIEELPLDGIEELRADEEGREFWQE

QMEPFLRAHGTRGPQEMEITHPRWIDDPSYVFQMIRRYAADGFSIDDILRRSGGRQDASHTVLKQLPLPKRRAVE  
 AAISMYRTYSELREVTRMSMITSIWLVNRNVYEVGRRLLEAGVLHSMDEVAYLDFDIRAYLAGELSEAEAFDRAKID  
 GARRLHEYHKRLPEPPLTFVGEHDPASAVRPVPDGEHLEGLGSSPGRVVGRARVVEDLVWQADEFQAGEILITRYT  
 DATWTPLFAIAGGVVTDIGSMLSHSSIVAREFNVPSVVNTKFATQVIHTGDLIVVDGDAGTVEVVENSEL

### 9.6.3 Vektorkarten – Ligasen im pET32a(+) Vektor

*pigC* – Ligase aus *S. marcescens*

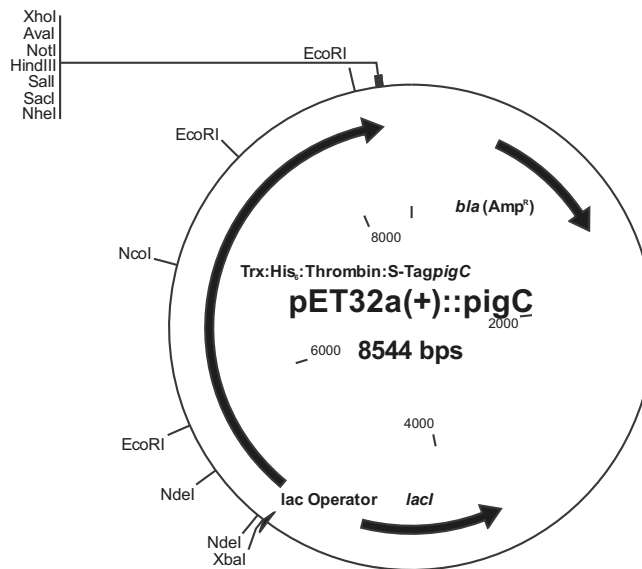


Abbildung A 29. Vektorkarte von pET32a(+):*pigC*.

#### Nukleotidsequenz von *pigC*:

Die unterstrichenen Nukleotide stammen von den verschiedenen an das Gen fusionierten Elementen des Vektors: Thioredoxin, His<sub>6</sub>-tag, Thrombin und S-Tag. Die für *pigC* codierende Sequenz ist **fett** hervorgehoben.

An Position 6081 des Vektors pET32a(+):*pigC* (Position 396 des Gens *pigC*) und Position 6420 des Vektors pET32a(+):*pigC* (Position 735 des Gens *pigC*) befinden sich stille Mutationen (an beiden Stellen wurde Guanin gegen Adenin ausgetauscht, siehe **Markierung**).

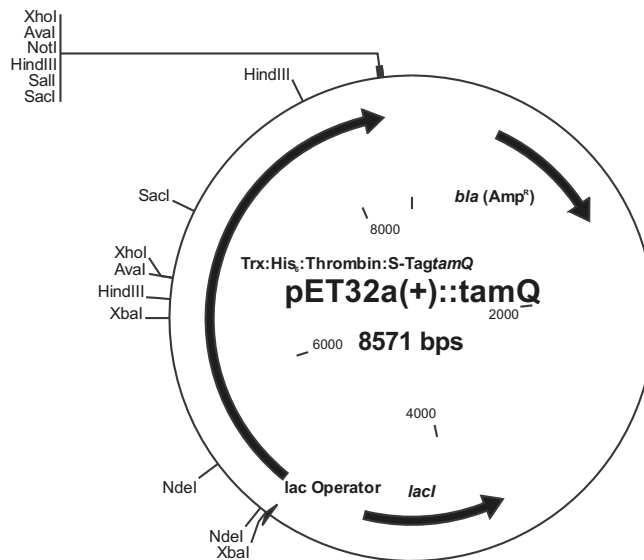
ATGAGCGATAAAATTATTCACCTGACTGACGACAGTTTTGACACGGATGTACTCAAAGCGGACGGGGCGATCC  
 TCGTCGATTTCTGGGCAGAGTGGTGCGGTCCGTGCAAATGATCGCCCCGATTCTGGATGAAATCGCTGACGA  
 ATATCAGGGCAAACCTGACCGTTGCAAACCTGAACATCGATCAAACCCCTGGCACTGCGCCGAAATATGGCATC  
 CGTGGTATCCCGACTCTGCTGCTGTTCAAAAACGGTGAAGTGCGCGCAACCAAAGTGGGTGCACTGTCTAAAG  
 GTCAGTTGAAAGAGTTCTCGACGCTAACCTGGCCGTTCTGGTTCTGGCCATATGCACCATCATCATCATCAT  
 TCTTCTGGTCTGGTGCCACGCGGTTCTGGTATGAAAGAAACCGCTGCTGCTAAATTCGAACGCCAGCACATGG  
 ACAGCCCAGATCTGGGTACCGACGACGACGACAAGGCAATGAATCCTACCCTGGTGGTTGAACTTTCCGGCG  
**ATAAAACGCTGGAACCCCATCGCCTGGGCGGCAAAGGCCATTCTGTTGAATCATTTGATTAGGCGGGCTTGC**  
**CGGTGCCGCCGGCGTTTTGCATCACCGCGCAGGCTTACCGGCAGTTTATCGAATTCGCCGTGCCGGGAGCGC**  
**TGCTCGACACGGGCGCGCCGGGCAACGTGCGCGATATGATTTTGAGCGCCGCCATCCCCGCCCGCTCGATC**  
**TGGCGATCCGTCACGCCTGCAAACAGTTGGGCGACGGCGCCTCGCTCGCCGTGCGCTCTTCGGCGCTGGAAG**  
**AAGACGGCCTGACCACTCTTTCGCCGGGCAATACGACACTTACCTGCACGTGCGCGGGGATGACGAGGTG**  
**GTACGCAAGGTGCAATCCTGCTGGGCGTCGCTCTGGGCGGAACGCGCCGCCAGTATAGCCGGACATCGGC**  
**GGCGCAGAGCGATATCGCCGTGCTTTCGAAATCATGGTGGATGCAGACGCCGCCGGCGTCATGTTTACCCA**  
**AGATCCGCTGACAGGCGATGCCAACACATCGTCATCGACAGCTGCTGGGGGCTGGGGGAAGGCGTGGTCT**  
**CCGGACAGGTACCAACCGACAGCTTCATTTTGATAAGGCGAGCGCGAGATCCGCGAGCAGCAAATTCGT**

CACAAACCGCACTATTGCCAACGCGATCCGCGAGGGACGGGTACGCTGCTGCAAACACCTGAAGCCAGGCG  
 AGACGCCCCCAGCCTAACCCCGGAACAGCTGCAACAGCTTGCCAGGCTGGCCAGGCAAACGCGGATGATTT  
 ACGGCGCGGAACTGGATATCGAATGGGCGGTGAAAGACGATCGCGTGTGGCTCCTGCAGGCGCGGCCGAT  
 CACCACGCAGGCCAAACCGGTTACAGATGCTTTACGCCAACCCGTGGGAAAGCGATCCGGCGATCAAGGAAC  
 GGGCCTTTTTCTCCGAATGGACACCGGCGAGATCGTCACCGGCTTGATGACGCCGCTGGGGCTGTGCTTTT  
 GCCAGTTCTACCAAAGCATATTCATGGCCCCGGCGATCAAAACCATGGGGCTGGCGGATATCGGCGATTGG  
 CAGATTTATATGGGGTATTTGCAAGGCTACGTCTATCTGAATATCTCCGGATCGGCCTACATGCTCCGCAAT  
 GCCCCGCCACCCGCGACGAAATGAAGTTCACGACCCGCTACGCCACCGCCGATATCGATTTCAGCGGGTACA  
 AAAACCCCTATGGCCCTGGCGTACAGGGATGGGCTTATCTCAAGAGCGCTGGCATTGGCTGAAACAGCAG  
 AGGCATAACCTGCGCAGCGCCGGCGGACCGTCGATGCCATGATCGCCCTGCGCCAGCGCGAAACGCGCCG  
 CTTTCTGGCGCTGGATCTGACCACCATGACGCATCAGGAGCTGGAGCGGGAACCTCAGCCGCATCGACGGTTA  
 CTTCTCGACAGCTGCGCCGCTATATGCCCTTCTCCTTCAGTCGTTGCGGCTCTACGATGCGCTGGCACTGA  
 CCTGCGAACGTTACCTTAAAGGCCGCGGCAACGGATTGCAAATCGCATCAAGGCGTCGATGAACAACCTAC  
 GCACCATCGAAGTCACGCTGGGCATTCTCAGCCTGGTGGAGACGGTCAATCGTCAACCGGCGTTGAAGGCC  
 GTGTTTCGAGCGACACAGCGCACAGGAACTGGTCACCGTCCTGCCACCGATCCCGAATCGCGCGCCTTCTGG  
 CAAAGCGACTTCAGCGCCTTCTGTTTGAATTCGGCGCCCGTGGCCGCCAGGAGTTCGAATTGAGTCTTCCGC  
 GCTGGAACGACGATCCAGCTACCTGCTGCAAGTGATGAAATGTATCTGCAACATCCGGTGGATCTGCACA  
 CGAAACTGCGGGAAACAGAGCGGCTGCGCCATGAAGACAGCGCGACGCTGCTTAAAGCGATGCCCTGGTTT  
 GGCCGGATGAAGCTGAAGTTCATCACCAAACCTGTATGGCGTGATGGCCGAACGCCGCGAAGCGACCCGGCC  
 AACCTTCGTACCCGAAACCTGGTTCTACCGCCGCATCATGTTGGAAGTGCTGCGGCGCCTGGAGGCGCAAGG  
 CCTGGTCAAACAGGCCGATCTGCCCTATGTGGACTTCGAGCGCTTCCGCGCGTTTATGGCGGGGGAACAGTC  
 GGCGCAGGAGGCGTTCGCCGCCGATCTGATCGAGCGCAATCGCCACCAGCATCTGCTGAACCTGCATGCGG  
 AAGAGCCGCCGATGGCGATCGTCGGGGGGTATCAGCCCAGGATGAAAGCCCCACGGCGGAAACGCCGC  
 CGGCATGCTGTCCGGCCTGGCGGCCAGCCCCGGCAAAGTGGTGGCGAAAGCGCGCGTCATACCGATCTGC  
 TGGCGCAGGCCGGCGAGCTGCAGCCCAACGAAATCCTGGTGGCGCGCTTACCAGCGCCAGCTGGACCCCG  
 CTCTTCGCGCTGGCGGGCGGGCATCGTCACCGATATCGGCTCCGCGCTGTCCACAGCTGCATCGTCGACGCG  
 AATTCGGCATCCCCGCGGCGGTCAATCTCAAGAACGCCACCCAGCTGATCAACAGCGGCGACACCTTGATTC  
 TCGACGGCGACAGCGGGACGGTCATTATTCAACGCGGAGAACGTGCCGATGGCTAG

#### Aminosäuresequenz von PigC:

Die unterstrichenen Aminosäuren stammen von den verschiedenen, fusionierten Elementen: Thioredoxin, His<sub>6</sub>-tag, Thrombin und S-Tag. Die Sequenz von PigC ist **fett** hervorgehoben.

MSDKIIHLTDDSFDTDLKADGAILVDFWAEWCGPCKMIAPILDEIADEYQGKLTVAKLNIDQNPGTAPKYGIRGIP  
TLLLFKNGEVAATKVGALSKGQLKEFLDANLAGSGSGHMHHHHHHSSGLVPRGSGMKETAAAKFERQHMDSPDL  
GTDDDDKAMNPTLVVELSGDKTLEPHRLGGKAHSLNHLIQAGLPVPPAFCITAQAYRQFIEFAVPGALLDTGAPG  
NVRDMILSAAIPAPLDLAIRHACKQLGDGASLAVRSSALEEDGLTHSFAGQYDTYLHVRGDDEVVRKVQSCWAS  
LWAERAAQYSRTSAAQSDIAVVLQIMVDADAAGVMFTQDPLTGDANHIVIDSCWGLGEGVVSGQVTTDSFIL  
DKASGEIREQQIRHKPHYCQRDPQGRVTLLQTPEARRDAPSLTPEQLQLARLARQTRMIYGAELDIEWAVKDD  
RVWLLQARPITTAQKPVMLYANPWESDPAIKERAFSRMDTGEIVTGLMTPLGLSFCQFYQKHIHGPAIKTM  
GLADIGDWQIYMGYLQGYVYLNISGSAYMLRQCPPTRDEMKFTTRYATADIDFSGYKNPYGPGVQGWAYLKS  
AWHWLQQRHNLRSAGATVDAMIALRQRETRRFLALDLTMTHQELERELSRIDGYFLDSCAAYMPFFLQSFAL  
YDALALTCERYLKGRGNGLQNRKASMMNLRTIETVLGILSLVETVNRQPALKAVFERHSAQELVTVLPTDPESRA  
FWQSDFSAFLEFGARGRQEFELSLPRWNDPSYLLQVMKMYLQHPVDLHTKLRETERLRHEDSATLLKAMPW  
FGRMKLKFITKLYGVMAERREATRPTFVTETWFYRRIMLEVLRRLEAQGLVKQADLPYVDFERFRAFMAEQSA  
QEAFAADLIERNRHQHLNLHAEPPMAIVGGYQPRMKAPTAENAAGMLSGLAASPGKVVAKARVITDLLAQAGELQ  
PNEILVARFTDASWTPLFALAAGIVTDIGSALSHSCIVAREFGIPAAVNLKNATQLINSGDTLILDGDSGTVII  
QRGERADG

**tamQ – Ligase aus *P. tunicata* D2 (DSM 14096)****Abbildung A 30.** Vektorkarte von pET32a(+):tamQ.**Nukleotidsequenz von *tamQ*:**

Die unterstrichenen Nukleotide stammen von den verschiedenen an das Gen fusionierten Elementen des Vektors: Thioredoxin, His<sub>6</sub>-tag, Thrombin und S-Tag. Die für *tamQ* codierende Sequenz ist **fett** hervorgehoben.

An Position 8040 des Vektors pET32a(+):tamQ (Position 2355 des Gens *tamQ*) befindet sich eine stille Mutationen (Cytosin wurde gegen Thymin ausgetauscht, siehe **Markierung**).

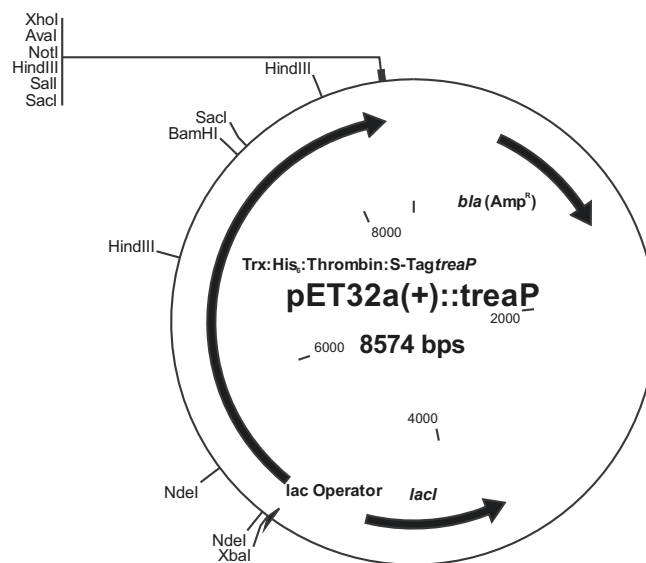
ATGAGCGATAAAATTATTCACCTGACTGACGACAGTTTTGACACGGATGTACTCAAAGCGGACGGGGCGATCC  
 TCGTCGATTTCTGGGCAGAGTGGTGCGGTCCGTGCAAATGATCGCCCCGATTCTGGATGAAATCGCTGACGA  
 ATATCAGGGCAAACCTGACCGTTGCAAACCTGAACATCGATCAAACCTGGCACTGCGCCGAAATATGGCATC  
 CGTGGTATCCCGACTCTGCTGCTGTTCAAAAACGGTGAAGTGCGGCAACCAAAGTGGGTGCACTGTCTAAAG  
 GTCAGTTGAAAGAGTTCTCGACGCTAACCTGGCCGTTCTGGTTCTGGCCATATGCACCATCATCATCATCAT  
 TCTTCTGGTCTGGTGCCACGCGGTTCTGGTATGAAAGAAACCGCTGCTGCTAAATTCGAACGCCAGCACATGG  
ACAGCCCAGATCTGGGTACCGACGACGACGACAAGGCAATGATTAACGCTGCGATGAAGCTCTCTACTGAGA  
GCGATAATATTTCCGCTTTACAGATATGCCGCTTCAGTCGGTATCACATATTGGTGGCAAAGGAGCCTCATT  
GTGTGCAATGTCAGCCGCAAGTCTTCCGTTTCTGCAGGTGTTTGTGAGTGTGGCTTTGTTTGATGACTTT  
GCGGCGCACATTGAGCTACTGACAAGGTTTCGACCTTACTGAGGGGTATGAACAGTGGCAAGCTGCTGCCAA  
AGCGATTAAAGAGTCTCCATTACCAAATACATTACAAGATACGATAAGCGCTGCAATAGCACACCTAAAAGG  
GCCGTTGGCTGTTCTGTTTCATCAGCACTTGATGAAGATGGTGAAGTAGCTCTTTGCTGGGCAACATCTGACT  
AAATTGGCCTTGTCGGGCTTGATACTATCCTCGATGCGATTAAAGAATGTTGGGCATCTGCTTTAGCGAG  
GCTGCGTATCGCTATCGTCAGCATACCGACAAACACCTCGACATGCCTCGTATGGCGGTGGTTGTGCAACAG  
ATGCAATTTGGAGATGTTTCAGGCGTCGCGTTTGGTCAACATCCAACGACCTTTGCTCGTGATGCCTTTTGG  
TTGAAAACGTTTTGTTTTGTGTGAAGGGTTGGTTTCTGGTCAGGTTGTTAGCGATAGCTGGCAAATTGATA  
AAGCGTCGGGCGAAGTAAGGGAAGTGACTATCGCCGATAAATCTGAGCAAATAATTTATCTAGATGGCGAA  
ATACAAAAGGTTGCGGTATCCGACGAGCAGCGCCAACAACCTGCTTTAGGGCCAATGGCACAGCAGGCGTT  
ATACACCTTATTATGTAAAGTTGAAGCTTATTTGGTGTGCCACAAGATGTGGAGTGGACCTGGAGTGAAGG  
AAAAATTTGGTTATTACAAAGCCGCCCTATCACGACACATGCACCGCAACTCGATGATTTTACCTAGGTTCT  
CGAGATGTTGACTTGCAAAAACCATGTTATGGTCACGTATGGATATTGGGGAAATATTCACCGGTCGCATG  
ACGCCGCTTGGTTTATCATTTGCCGTTACTATCAGCAACAGGTCCACACAGGTTGTGGTAAAGGGTTAGGTT  
TGTTGGACTTAGGTGAGGCGGATGAAACCATCGCCTATTATCGAGGTCATGTATATCTCAATGTTTCTTATAC

TGCTTGGCAATTGGCTCAAACCTCCAATTGGTGAAGATCAATTGCCGTTTTTACAGCGTTTCAGTAGTGAGGCT  
ATTGATTTAGCAGGTTACCGCAATCCTTATGGCGAAAAGCATAGCCATCAGGATTATAGCGCCAAACAGTGC  
ACTCGTTATTGGCTGAAAAAGAACATTAAGAGCTCTTTGTGCCAAACGTCGTGCGCGCAGTATGATAGCT  
TCGCGCTATAAACAGTTTCGACCGGGCTCAGCAAAAACCACTGCAGCAGCTTTCTTTAGAGCAGTTGGCCGCA  
GAAATGCGACATGCTTTGGCTTATTTAAAGCCATGCATGAAGGTTATTTGCCTTACTACATTAACGCTTTTGC  
CTGTTACGGAATTTTAGAGGAATTAAGTGCAGTGTGGCTTGGCGACAAAGGTAAACAATTACATAACCAAAT  
TAAAGGCGATATGTCTAACTTGCAGACTGTTGCAAGTGCACAGGAGCTGTGGCTGCTGTGCCAACAATTAGC  
CGATTGGCCACAAGTGAAGCAAGCATTTTTAGATTTAGAGCTGGACGAACTTGAAGTATTTCTCAATGAACA  
TCAAGCTGGAATTAATATTCTCGTGGTCCATTAGCGCAGTTTATGCGCGAAAATGGTGTGCGTGCACGCGA  
AGAAATGGAGCTGACACATCCACGCTGGCTCGATGACCGAACTTATTTATTGCAGATGATTAAAGTGTATCT  
GCATCAAGGTTATGCGGTAGATGACGCCATCGCCACACAACAACGTAAGCAACGTAAAAACAGCAATGAAA  
TATTAACCAATCCCTTGGTATCAACGCCGAGTAATGAAGCTGGTCATTTGCTCTACAGTGGTTGTGCCAA  
ATTACGTGAAGAGACACGTATGAGTATGGTGACCTCCATCTGGTTAGTTGCTCGTATTGTTTATGAACTAGG  
ACAGCGTTTGGTTGCAACTCAGCAACTCACATCACTGGATGATATTGCTTATTTAGATTTTGCAGAGATCTTA  
AGTTATCTTGAAGAGCGCATCGATGTGCACCAGCTCACTGAGCCTGCAAAGCTTGACAACGTCAATCGGCT  
TATCATCTTTGGCAATCAATGCCTGAGCCACCGTTAACCTTTATTGGCTCGCCAAAGAGCCAACCGGATTTAA  
TTTTAGATCCAACATTGACACAGCTGTCTGGCCTTGCCACTTCAGCCGGTTTTTGGCGTGGCAAAGCATGTGT  
GATCACTGATTTAGCCAAGCAAGCAGGGCAATTTAAAAAAGGCGATATATTAATTGCTCCTTTTACCGATGC  
ATCTTGAGCGCACTTTTTGCACTTGCGGGTGCGGTAGTGACAGACATTGGCTCAATGTTGTCTCACAGTTCC  
ATTGTTGCCAGAGAATTTGGCATCCCATGTGTGGTCAATACCAATCATGCCAGCGCGTTGTTTAAATCTGGCG  
ACATGCTGATAGTTGATGCACAAAATGGCATCGTAGTTTTAGATAAGGAAAGTTAA

#### Aminosäuresequenz von TamQ:

Die unterstrichenen Aminosäuren stammen von den verschiedenen, fusionierten Elementen: Thioredoxin, His<sub>6</sub>-tag, Thrombin und S-Tag. Die Sequenz von TamQ ist **fett** hervorgehoben.

MSDKIIHLTDDSFDTDLKADGAILVDFWAEWCGPCKMIAPILDEIADEYQGKLTVAKLNIDQNPGETAPKYGIRGIP  
TLLLFKNGEVAATKVGALSKGQLKEFLDANLAGSGSGHMHSHHSSGLVPRGSGMKETAAKFERQHMDSPDL  
GTDDDDKAMINAAMKLSTESDNIFRFTDMPLQSVSHIGGKGASLCAMSAAGLPVPAGVCLSVLFDDFAAHIEL  
LTRFDLTEGYEQWQAAAKAIKESPLPNTLQDTISAAIAHLKGPLAVRSSALDEDESSSFAGQHCLKLALCGLDTIL  
DAIKECWASAFSEAAAYRYRQHTDKHLDMPRMAVVVQQMQFGDVSGVAFGQHPTTFARDAFLVENCFLCEG  
LVSGQVVSWSWQIDKASGEVREVTIADKSEQIIYLDGEIQKVAVSDEQRQQPALGPMAQQALYTLCKVEAYFG  
VPQDVEWTWSEGKIWLLQSRPITTHAPQLDDFYLGSRDVLQKTMILWSRMDIGEIFTGRMTPLGLSFARYYQQ  
QVHTGCGKGLGLDLGEADETIAYYRGHVYLVSYTAWQLAQTPIGEDQLPFLQRFSSAIDLAGYRNPYGEKHS  
HQDYSKQCTRYWLKKNIKELFCAKRRARSMIASRYKQFDRAQQKPLQQLSLEQLAAEMRHALAYFKAMHEG  
YLPYYINAFACYGILEELSALWLGDKGKQLHNQIKGDMSNLRTVASAQELWLLCQQQLADWPQVKQAFDLLELDE  
LEVFLNEHQAGIKYSRGPLAQFMRENGVRAREEMELTHPRWLDDRTYLLQMIKVYLHQGYAVDDAIATQQRK  
QRKNSNEILKTIPWYQRRVMKLVISLYSGCAKLREETRMSMVTSIWLVRRIYELGQRLVATQQLTSLDDIAYLDF  
AEILSYLEKRIDVHQLTEPAKLAQRQSAYHLWQSMPEPPLTFIGSPKSQPDILDPILTQLSGLATSAGFCRGKACV  
ITDLAKQAGQFKKGDILIPFTDASWTPFLALAGAVVTDIGSMLSHSSIVAREFGIPCVVNTNHASALFKSGDMLI  
VDAQNGIVVLDKES

***treaP* – Ligase aus *P. citrea* (DSM 8771)****Abbildung A 31.** Vektorkarte von pET32a(+):treaP.**Nukleotidsequenz von *treaP*:**

Die unterstrichenen Nukleotide stammen von den verschiedenen an das Gen fusionierten Elementen des Vektors: Thioredoxin, His<sub>6</sub>-tag, Thrombin und S-Tag. Die für *treaP* codierende Sequenz ist **fett** hervorgehoben.

An Position 6408 des Vektors pET28a(+):treaP (Position 723 des Gens *treaP*) befindet sich eine stille Mutation (Guanin wurde gegen Adenin ausgetauscht, siehe **Markierung**).

ATGAGCGATAAAATTATTCACCTGACTGACGACAGTTTTGACACGGATGTACTCAAAGCGGACGGGGCGATCC  
TCGTCGATTTCTGGGCAGAGTGGTGCGGTCCGTGCAAATGATCGCCCCGATTCTGGATGAAATCGCTGACGA  
ATATCAGGGCAAACCTGACCGTTGCAAACCTGAACATCGATCAAACCCCTGGCACTGCGCCGAAATATGGCATC  
CGTGGTATCCCGACTCTGCTGCTGTTCAAAAACGGTGAAGTGCGCGCAACCAAAGTGGGTGCACTGTCTAAAG  
GTCAGTTGAAAGAGTTCTCGACGCTAACCTGGCCGTTCTGGTTCTGGCCATATGCACCATCATCATCATCAT  
TCTTCTGGTCTGGTGCCACGCGGTTCTGGTATGAAAGAAACCGCTGCTGCTAAATTCGAACGCCAGCACATGG  
ACAGCCCAGATCTGGGTACCGACGACGACGACAAGGCAATGACAGTTAACTCTCTGGCTATTGAACAACCAC  
TTAATGATGGGATTGTTCAATTTGATAGCCAACAATCCGCCTCTGTAGAACTGGTTGGCGGAAAAGGCGCAT  
CTTTATGTGCCATGCATAATGCAGGTCTGCCCGTCCCTATCGGCTACTGCATTACAGTCAATGTATTTGAAGA  
GTTTTTACAACAACTGAACTACTGAGTCGATTGATCCGAGTAAAGGCGTCACTGAGTGCGTGCATTAGC  
AACCGCAATTACAAGCGTTGCCATGCCGGAACAAATTGCCACACAGATAAGCAATGCAAGTGCGTTATTAAT  
TGGCCCCGTGCGCGTTGCTCTTCTGCAACAGATGAAGACAGTGATAGTCATTTCGTTTGACGGGCAACACGTC  
ACAAAACCTCGCTGTTGAAGGCATAGACCATATTCTTGAAGCTGTTTCAGGCATGCTGGGCATCAGCTTTTAGC  
GAAGCAGCCTTTCAATATCGCCAAACAACAGGTCAAACAACGGATATTCCGAAGATTGCAGTCGTGGTACA  
GCAAATGCAGTTTGGCGATGCATCAGGTGTTGCGTTTGGTCAGCACCCCACTACCTTTGCAAAAAATGCCTTT  
GTTATAGAAGGCTGTTATGGTCTATGCGAAGGCTTAGTTTCTGGTCAAGTCAGTAGCGATAGCTATGAAATT  
GACAACTCAGTGGCGAGCTGATTGCTCATACTGTTCAACCAAAACAGCACCAAAATTGTACATATCGACGGC  
TCTATAAAAAAACTCGCCGTACCGCCTGCTTTACAAAATGAGCAAGTACTTAACCATCTTGACAGCAATCGT  
TATACAGTGTATTGCGTCAAGTTGAGTCGTAACGCTGCCCTCAGGATGTAGAGTGGACACTCAGTGATG  
GGAAGATTTGGCTTTTACAAAGTCGTCCGATCACCACCAAAAATACCAAAGCTGATCCATTCTATTTAGGCAA  
TAAATCTGAGCATGTGCAAAAAGACATTCTCTGGTCTCGCATGGATATAGGGGAAATATTCACCGGCCGAAT  
GACACCTTTAGGATTATCGTTTGACACTATTACCAAACCTCGCGTTCACATCGATTGTGGTAAAAAGCTTGGT  
TTACTTGATCTTGGTGAAGCGAATGAAACCATTGCTTATCATAAAGGTCATGTGTACCTCAATGTGTCTTATA

CCGCATGGCAACTGGCTCAAACCTCCAGTTGGGGAAGATCAAACCCCATTTTTAGCCCGCTTTAGTAGTGAAG  
 CCATTGACCTAACTGGCTATGAAAACCCATACGGTGCTAAACACAGTCACCCGAATATGACGCCAAAACAGT  
 GTCTACGCTATTGGATAAAGCAAAACGTCAAAGAACTATTTAGGCTAAGCGTCGCGCAAAATCTATGGTCA  
 ACTCACGTTATCAAGAATTTGATAGAGTGCAAAGCCAGGACATTACAAACCTCTCTCATGACGAGTTACGCT  
 ACGAACTTGATCATTGCTTAGGCTACTTTAAAGCCATGCACGAGGGGCTATTTACCCTATTATATCAACGCTTTT  
 GCTTGTTATGGCTTGCTTGAAGAACTCAGTGCGAAATGGTTGGGCGATAAAAAGTAAGCATCTCCAAAATAA  
 AATCAAAGGTGACATGTCTAACTTGAGAACAGTCGCCAGTGACAAGAGCTTTGGCAACTATGTAAAGTACT  
 TAATGCATGGCCTCAAGTGAAAGATGTGTTTACCAATAAAGACATTGCCGATATTGAGGATTTTCTTACCTCA  
 ACGCCACTGGGGATCCGATTTACCAACGGGCCTCTTGCTGAATTTATGCGTGATAATGGTGTACGCGGGCGT  
 GAAGAAATGGAGCTCACTCACCTCGCTGGTTAGATGACAGAACCTACGTACTGCAAATGATTAAGTTGTAT  
 CTAAAGCAAGGCTATGAAGTGGACGACGCCTTAGTTGAACAAACACAGAAGCAGCAAAAGATAAGCGATG  
 AGCTACTCAATGAATTAAGTTGGACCCAGCGCTTTACGATTAACCGTGTCATCTCTTGTACTCTGGTTGCGCT  
 AAACCTACGTGAAGAAACACGAATGAGTATGACTACCTCAATTTGGCTCGTTCGTCGAGTCGTGTATGAAGTA  
 GCAAGACGATTAATTGATAAATCACTTTTGAGCAGCTTTGACGATGTTGCCTACCTCGACTTTGAAAATGTCA  
 TTCAGTATTTAAATAACACCATCACTGCTGAACAACCTACCGATGCACTGCTTATCAGTAAAAACCGTGCTCA  
 ATATCAACAATGGCAAGCACAAACGAGAACCGCCTCTCACATTTATCGGCAAGCCGAGTAGCCAACAGATCT  
 CATTTTTGATCCAAGCTTAACATCACTAGAAGGGCTTGCAACATCCGAAGGCTTTTGTGCGCGCGTGCTTGT  
 GTGATCACTGATTTAGCTTACAAGCCGGTGAATTTCAAAAAGGCGACATATTGATCGCCCTTTTACCGACG  
 CTTCTTGGACTCCCCTGTTTGAAGTACGCAAGCGCCGTAGTCACCGATATTGGTTCAATGCTGTACACAGCTCT  
 ATTGTTGCCAGAGAGTTTGGCATTCTTGTGTGGTGAACACTCACCATGCAAGCGCCCTGATAAACACCGGT  
 GACATCATCACCGTAGATGCACACAAAGGTCTAATAATTGTAAATAAGGAAGATTAA

#### Aminosäuresequenz von TreaP:

Die unterstrichenen Aminosäuren stammen von den verschiedenen, fusionierten Elementen: Thioredoxin, His<sub>6</sub>-tag, Thrombin und S-Tag. Die Sequenz von TreaP ist **fett** hervorgehoben.

MSDKIIHLTDDSFDTDLKADGAILVDFWAEWCGPCKMIAPILDEIADEYQGKLTVAKLNIQNPQTAPKYGIRGIP  
 TLLLFKNGEVAATKVGALSKGQLKEFLDANLAGSGSGHMHSHHSSGLVPRGSGMKETAAAKFERQHMDSPDL  
 GTDDDDKAMTVNSLAIEQPLNDGIVHFDSQQSASVELVGGKGASLCAMHNAGLPVPIGYCITVNVFEFLQQTE  
 LLSRFDPSKGVTEWRALATAITSVAMPEQIATQISNASALLIGPVAVRSSATDESDSHSFAGQHVTKLAVEGIDH  
 ILEAVQACWASAFSEAAFQYRQTTGQTTDIPKIAVVVQQMQFGDASGVAFGQHPTTFAKNAFVIEGCGYGLCEG  
 LVSGQVSSDSYEIDKLSGELIAHTVQPKQHQIVHIDGSIKKLAVPPALQNEQVLNHLAQQLSVLRQVESYYGCP  
 QDVEWTLSDGKIWLLQSRPITTKNTKADPFYLGKSEHVQKDILWSRMDIGEIFTGRMTPLGLSFAHYQTRVHI  
 DCGKKLGLLDLGEANETIAYHKGHVYLNVSYTAWQLAQTPVGEDQTPFLARFSSEIDLTGYENPYGAKHSHPN  
 MTPKQCLRYWIKQNVKELFQAKRRAKSMVNSRYQEFDRVQSQDITNLSDHCLRYELDHCLGYFKAMHEGYLPY  
 YINAFACYGLLELSAKWLGDKSKHLQNKIKGDMNSLRTVASAQELWQLCKVLNAWPQVKDVFTNKDIADIEDF  
 LTSTPLGIRFTNGPLAEFMRDNGVRGREEMELTHPRWLDDRTYVLQMIKLYLKQGYEVDDALVEQTQKQKISD  
 ELLNELSWTQRFTINRVISLYSGCAKLREETRMSMTTSIWLVRVVVEVARRLIDKSLSSFDDVAYLDFENVIQYL  
 NNTITAEQLTDALLISKNNRAQYQQWQAQPEPPLTFIGKPSSQPDIFDPSLTSLEGLATSEGFCRARACVITDLASQ  
 AGEFQKGDILIAFPFTDASWTPFLALASAVVTDIGSMLSHSSIVAREFGIPCVVNTHHASALINTGDIITVDAHKLII  
 VNKED

### 9.6.4 Vektorkarten – Zyklen im pET28a(+) Vektor

*tamC* – Zyklastase aus *P. tunicata* D2 (DSM 14096)

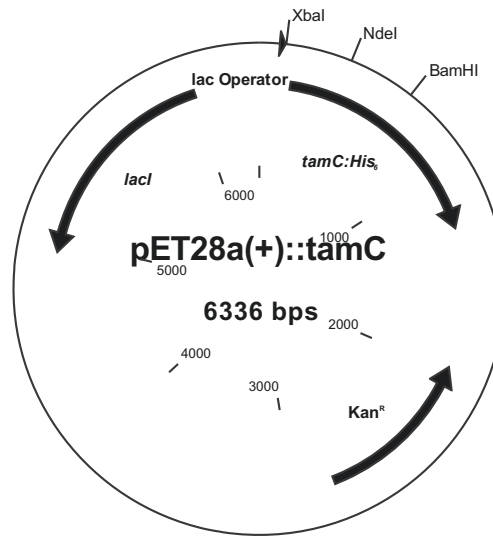


Abbildung A 32. Vektorkarte von pET28a(+):*tamC*.

#### Nukleotidsequenz von *tamC*:

Die unterstrichenen Nukleotide stammen vom Vektor.

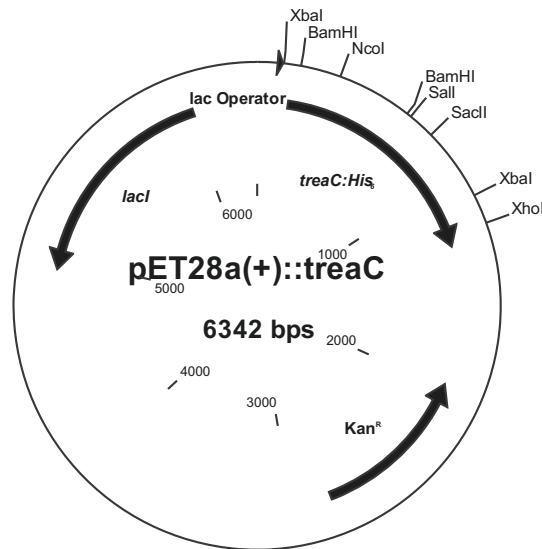
ATGATCCCTAATCAATGGTATGCGATTTTACGCACCCAAGACGTTAAGAAAAAACCTGTAGGTATTAACGATT  
 AGAAAAGCTGTTGGTACTTTATCGTGATACAGCGGGTGAATTAGTTTGTCTTGATGATCGTTGCCCTCACAAAG  
 GCGTTAAATTAAGTTTGGGTCAACAACATGGTGATCTGATTGCCTGTCCTTATCATGGTTTTCAATACGATCAGC  
 AAGGTGATTGTGTTTCATATGCCAGTGCTAGGTCAAAAAGGTAATGTGCCAAAAGGCATGTGCGTTAAAGCTA  
 CAAGGTTAAAGAAGAGTTAGGCCTGATTTGGTTTTGGTTTGGAGACGTGCGTCAAGAGCATGAATATCCAGAT  
 ATCCCAATGTTTAAACAACCTAAGGAATATAAAGGCCACTATTCTATTATGGCTGGGATGCTCCAATCAATTA  
 CACCCGCTATGTGGAAAGTGTGTGTGAGATTTATCATATTCCATTTGTCCATAAAGGTTTCAGCCATCAATATTTG  
 GGATCCAAAAGGAGGTGCGAGTTGATAATTCGAGTGTAAGGTGCAAGACACGCTGATCACCAGTGACTTTATT  
 TTACGTCCAGATGATGACCGCACCGCTGAGGAAACCTTAGTTGCTCGTAAACCTTGACTCGCGGCTGGCGTTT  
 TGGCATTGACGTGCAATGCCGAATTTAATCCTTATTCGCAGTGATGTGTTTATGATGATTTTTATCCCTACACC  
 TATCGATGAAAATACCTGCTGGGTATGCGTTTGTATCAAGAGCCTAAACGTGACTTGCTTTTACCACTCATTAA  
 ACCGTTGCCAATTCCATTTTGGGGGCCTGTGCGACCTTGGTATATGTGCCGAATTGAGCGTTTTGTGCAGCAAG  
 CAAAAGATATGGCAGTCATTGCCATCAAGAGCCTAAAGTGTCTCATCCAAAAGCAAACCGTTTAATCCCACTT  
 GATAAAGTTAATGCTCATTATATTCGCTTTTCGTGAAAAGCTAATTCGTGAAGCAAAAGAGCAACAACAAGTGA  
 AAGAGCTTGCCAAGTCTAATCCAGAATTTGCAGCGCCGACACTTGAACAGATTATCGGCATTGAAGAAGTACA  
TCACCACCACCACCACCACTGA

#### Aminosäuresequenz von TamC:

Die unterstrichenen Aminosäuren stammen vom fusionierten His<sub>6</sub>-tag.

MIPNQWYAILRTQDVKKKPVGIKRLKLLVLYRDTAGELVCLDDRCPHKGVKLSLGGQQHGDLIACPYHGFQYDQQG  
 DCVHMPVLGQKGNVPKGMVCVSKYKVEELGLIWFVFGDVRQEHEYDPDIPMFQQLKEYKGHSYYGWDAPINYT  
 RYVESVCEIYHIPFVHKGSAINIWDPKGGRVDNFECKVEDTLTSDFILRPDDRTAEETLVARKPWTRGWRFIDV  
 QMPNLILIRSDVFDVFIPTIDENTCWVCVCYQEPKRDLLPLIKPLIPFWGPVRPWYMCRIERFVQQAQDMAVIA  
 HQEPKVSHPKANRLIPLDKVNAHYIRFREKLIREAKEQQQVKELAKSNPEFAAPTLEQIIGIEEVHHHHHHH



***treaC* – Zyklase aus *P. citrea* (DSM 8771)****Abbildung A 33.** Vektorkarte von pET28a(+):*treaC*.**Nukleotidsequenz von *treaC*:**

Die unterstrichenen Nukleotide stammen vom Vektor.

ATGATCCCTAATCAATGGTATGCAATTCACGGATCCAAGATGTCAAAAAGAAACCTATCGGCATCAAACGTCT  
 AAACAAGTTACTGGTATTGTACCGGATACCAAAGGTGAAGTGGTTTGTATGGACGATAAATGCCACATAAA  
 GCGGTTATGCTCAGTCGCGGAAAACAGCACGGTGATATTATTGCCTGCCCTTACCATGGTTTTCAATTTGACCA  
 AAAGGGTGACTGCGTTCACATGCCTGTACTAGGTAAAAATGGTGATGTACCAAAGGGATGTGTGTCAAACT  
 TATAAAGTAAAAGAAGAATTTGGCCTTATTTGGTTTTGGTATGGCGATTTAATGCCTGAAAATGACTACCCTGA  
 AGTGCCGATGTTCAAACAGTTCAAAGAGTACAAAGGATACTATTCTTTTATGGCTGGGATGCGCCAATTAAT  
 ATACCCGTTATGTAGAAAGTGTGTGTGAGATTTATCACATTCCATTTGTACATAAAGGATCTGCGATTAATATTT  
 GGGATCCCAAAGGCGGCAAAGTCGACAACTTTGAATGTAAAGTTGACGGGACATTAAATTACCAGTGATTTTGT  
 ACTTCGCCCAGATGACGAGCGCACGGCAGAAGAAACATTAGTTGCACGTAAACCTTGGACCCGCGGTTGGCA  
 GTTTGGCATTGATGTACAAATGCCTAATCTTGTTTGATCCGAAGCGATGTTTTCGATGTAATGTTCAATCCAAC  
 ACCTATCGACGACAATACATGCTGGGTTTGTGTATGTTACCAAGAACCAAACCGTGACTTGTGTTACCGTTAA  
 TTAACCATTAACCAATTCATTTTGGCGCCCTGTCGCCCTTGGTACATGTGTCGTATCGAGCGATTTGTACAAC  
 AAGATAAAGATATGGCGGTTATTTTCATATCAAAACCCGAAAGTGTCTAGTCCAAAAGCCAATCGATTGATCCCT  
 CTAGATAAAGTAAACGCTCACTATATTCGTTTTAGAGAGAAGTTAATTCGCGAAGCCAATGAAGAAAAAGCAC  
 TAAAAGCAAACTGCAAACTAAACCACACACTGATGTCGAGGCACCCTCACTCGAGCAAATCATTGGTATTGA  
 AGAAATTAACCACCACCACCACCACCCTGA

**Aminosäuresequenz von Treac:**

Die unterstrichenen Aminosäuren stammen vom fusionierten His<sub>6</sub>-tag.

MIPNQWYAISRIQDVKKKPIGIKRLNKLVLRYRDTKGELVCMDDKCPHKGVMLSRGKQHGDIIACPYHGFQFDQKG  
 DCVHMPVLGKNGDVPKGMVCVTKYKVEEFLIWFWYGDLMPENDYPEVPMFKQFKEYKGYSFYGWDAPINYT  
 RYVESVCEIYHIPFVHKGSAINIWDPKGGKVDNFECKVDGTLITSDFVLRPDDERTAEETLVARKPWTRGWQFGIDV  
 QMPNVLVLRSDVFDVMFIPTIDDNTCWVCVCYQEPKRDLLPLIKPLPIFWRPVRPWYMCRIERFVQQDKDMA  
 VISYQNPKVSSPKANRLIPLDKVNAHYIRFREKLIREANEEKALKAKLQTKPHTDVEAPSLEQIIGIEEINHHHHHH

### 9.6.5 Vektorkarten – Zyklen im pET32a(+) Vektor

*tamC* – Zykase aus *P. tunicata* D2 (DSM 14096)

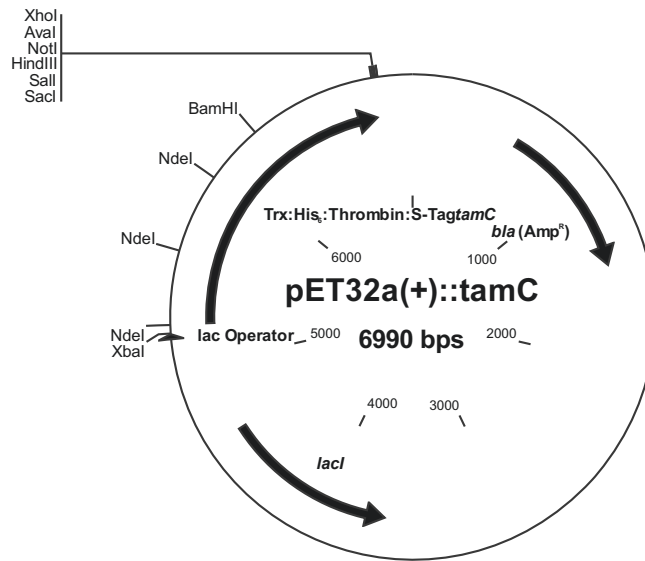


Abbildung A 34. Vektorkarte von pET32a(+):*tamC*.

#### Nukleotidsequenz von *tamC*:

Die unterstrichenen Nukleotide stammen von den verschiedenen an das Gen fusionierten Elementen des Vektors: Thioredoxin, His<sub>6</sub>-tag, Thrombin und S-Tag. Die für *tamC* codierende Sequenz ist **fett** hervorgehoben.

ATGAGCGATAAAATTATTCACCTGACTGACGACAGTTTTGACACGGATGTACTCAAAGCGGACGGGGCGATCC  
TCGTCGATTTCTGGGCAGAGTGGTGC GGTCGGTCCGTGCAAATGATCGCCCCGATTCTGGATGAAATCGCTGACGA  
ATATCAGGGCAAACCTGACCGTTGCAAACCTGAACATCGATCAAACCTGGCACTGCGCCGAAATATGGCATC  
CGTGGTATCCCGACTCTGCTGCTGTTCAAAAACGGTGAAGTGCGGCAACCAAAGTGGGTGCACTGTCTAAAG  
GTCAGTTGAAAGAGTTCCTCGACGCTAACCTGGCCGTTCTGTTCTGGCCATATGCACCATCATCATCATCAT  
TCTTCTGGTCTGGTGCACGCGGTTCTGGTATGAAAGAAACCGCTGCTGCTAAATTCGAACGCCAGCACATGG  
ACAGCCCAGATCTGGGTACCGACGACGACGACAAGGCAATGATCCCTAATCAATGGTATGCGATTTTACGCA  
CCCAAGACGTTAAGAAAAAACCTGTAGGTATTAACGATTAGAAAAGCTGTTGGTACTTTATCGTGATACAG  
CGGGTGAATTAGTTTGTCTTGATGATCGTTGCCCTCACAAAGGCGTTAAATTAAGTTTGGGTCAACAACATG  
GTGATCTGATTGCCTGTCCTTATCATGGTTTTCAATACGATCAGCAAGGTGATTGTGTTTCATATGCCAGTGCT  
AGGTCAAAAAGGTAATGTGCCAAAAGGCATGTGCGTTAAAGCTACAAGGTTAAAGAAGAGTTAGGCCTG  
ATTTGGTTTTGGTTTGGAGACGTGCGTCAAGAGCATGAATATCCAGATATCCCAATGTTTAAACAACCTTAAG  
GAATATAAAGGCCACTATTCCTATTATGGCTGGGATGCTCCAATCAATTACACCCGCTATGTGGAAAGTGTG  
TGTGAGATTTATCATATTCCATTTGTCCATAAAGGTTGAGCCATCAATATTTGGGATCCAAAAGGAGGTGCA  
GTTGATAATTCGAGTGTAAGGTCGAAGACACGCTGATCACCAGTGACTTTATTTTACGTCCAGATGATGAC  
CGCACCCTGAGGAAACCTTAGTTGCTCGTAAACCTGGACTCGCGGCTGGCGTTTTGGCATTGACGTGCAA  
ATGCCGAATTTAATCCTTATTCGAGTGATGTGTTTGATGTGATTTTATCCCTACACCTATCGATGAAAATAC  
CTGCTGGGTATGCGTTTGTATCAAGAGCCTAAACGTGACTTGCTTTTACCACTATTAAACCGTTGCCAATTC  
CATTTTGGGGGCTGTGCGACCTGGTATATGTGCCGAATTGAGCGTTTTGTGCAGCAAGCAAAAAGATATGG  
CAGTCATTGCCCATCAAGAGCCTAAAGTGTCTCATCCAAAAGCAAACCGTTTAATCCCACTTGATAAAGTTAA  
TGCTCATTATATTCGCTTTTCGTGAAAAGCTAATTCGTGAAGCAAAAGAGCAACAACAAGTGAAAGAGCTTGC  
CAAGTCTAATCCAGAATTTGCAGCGCCGACACTTGAACAGATTATCGGCATTGAAGAAGTACATTAA

### Aminosäuresequenz von TamC:

Die unterstrichenen Aminosäuren stammen von den verschiedenen, fusionierten Elementen: Thioredoxin, His<sub>6</sub>-tag, Thrombin und S-Tag. Die Sequenz von TamC ist **fett** hervorgehoben.

MSDKIIHLTDDSFDTDLKADGAILVDFWAEWCGPCKMIAPILDEIADEYQGKLTVAKLNIDQNPGETAPKYGIRGIP  
 TLLLFKNGEVAATKVGALSKGQLKEFLDANLAGSGSGHMHSSGLVPRGSGMKETAAAKFERQHMDSPDL  
 GTDDDDKAMIPNQWYAILRTQDVKKKPVGIKRLKLLVLYRDTAGELVCLDDRCPHKGVKLSLGQQHGDLIACP  
 YHGFQYDQQGDCVHMPVLGQKGNVPKGMVCVSKYKVKEELGLIWFVFGDVRQEHEYPDIPMFKQLKEYKGHY  
 SYYGWDAPINYTRYVESVCEIYHIPFVHKGSAINIWDPKGGRVDNFECKVEDTLITSDFILRPDDRTAEETLVARK  
 PWTRGWRFGIDVQMPNLILIRSDVFDVIFIPTIDENTCWVCVCYQEPKRDLLPLIKPLPIFWGPVRPWYMCRI  
 ERFVQQAQDMAVIAHQEPKVSHPKANRLIPLDKVNAHYIRFREKLIREAKEQQQVKELAKSNPEFAAPTLEQIIGI  
 EEVH

### *treaC* – Zyklastase aus *P. citrea* (DSM 8771)

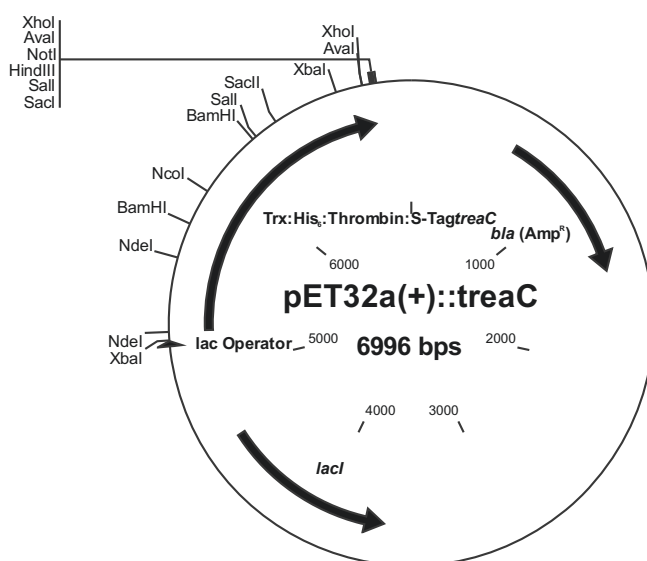


Abbildung A 35. Vektorkarte von pET32a(+):treaC.

### Nukleotidsequenz von *treaC*:

Die unterstrichenen Nukleotide stammen von den verschiedenen an das Gen fusionierten Elementen des Vektors: Thioredoxin, His<sub>6</sub>-tag, Thrombin und S-Tag. Die für *treaC* codierende Sequenz ist **fett** hervorgehoben.

ATGAGCGATAAAATTATTCACCTGACTGACGACAGTTTGGACACGGATGTACTCAAAGCGGACGGGGCGATCC  
 TCGTCGATTTCTGGGCAGAGTGGTGCGGTCCGTGCAAAATGATCGCCCCGATTCTGGATGAAATCGCTGACGA  
 ATATCAGGGCAAACCTGACCGTTGCAAACTGAACATCGATCAAAACCTGGCACTGCGCCGAAATATGGCATC  
 CGTGGTATCCCGACTCTGCTGCTGTTCAAAAACGGTGAAGTGGCGGCAACCAAAGTGGGTGCACTGTCTAAAG  
 GTCAGTTGAAAGAGTTCCTCGACGCTAACCTGGCCGGTCTGGTCTGGCCATATGCACCATCATCATCATCAT  
 TCTTCTGGTCTGGTGCCACGCGGTTCTGGTATGAAGAAACCGCTGCTGCTAAATTCGAACGCCAGCACATGG  
ACAGCCAGATCTGGGTACCGACGACGACGACAAGGCAATGATCCCTAATCAATGGTATGCAATTCACGGA  
TCCAAGATGTCAAAAAGAAACCTATCGGCATCAACGTCTAAACAAGTTACTGGTATTGTACCGCGATACCA  
AAGGTGAACTGGTTTGTATGGACGATAAATGCCACATAAAGGCGTTATGCTCAGTCGCGGAAAACAGCAC  
GGTGATATTATTGCCTGCCCTTACCATGGTTTTCAATTTGACCAAAAGGGTGACTGCGTTCACATGCCTGTAC  
TAGGTAAAAATGGTGATGTACCAAAAGGGATGTGTGTCAAACTTATAAAGTAAAAGAAGAATTTGGCCTT  
ATTTGGTTTTGGTATGGCGATTTAATGCCTGAAAATGACTACCCTGAAGTGCCGATGTTCAAACAGTTCAA  
GAGTACAAAGGATACTATTCTTTTATGGCTGGGATGCGCCAATTAACCTATACCCGTTATGTAGAAAGTGTTT

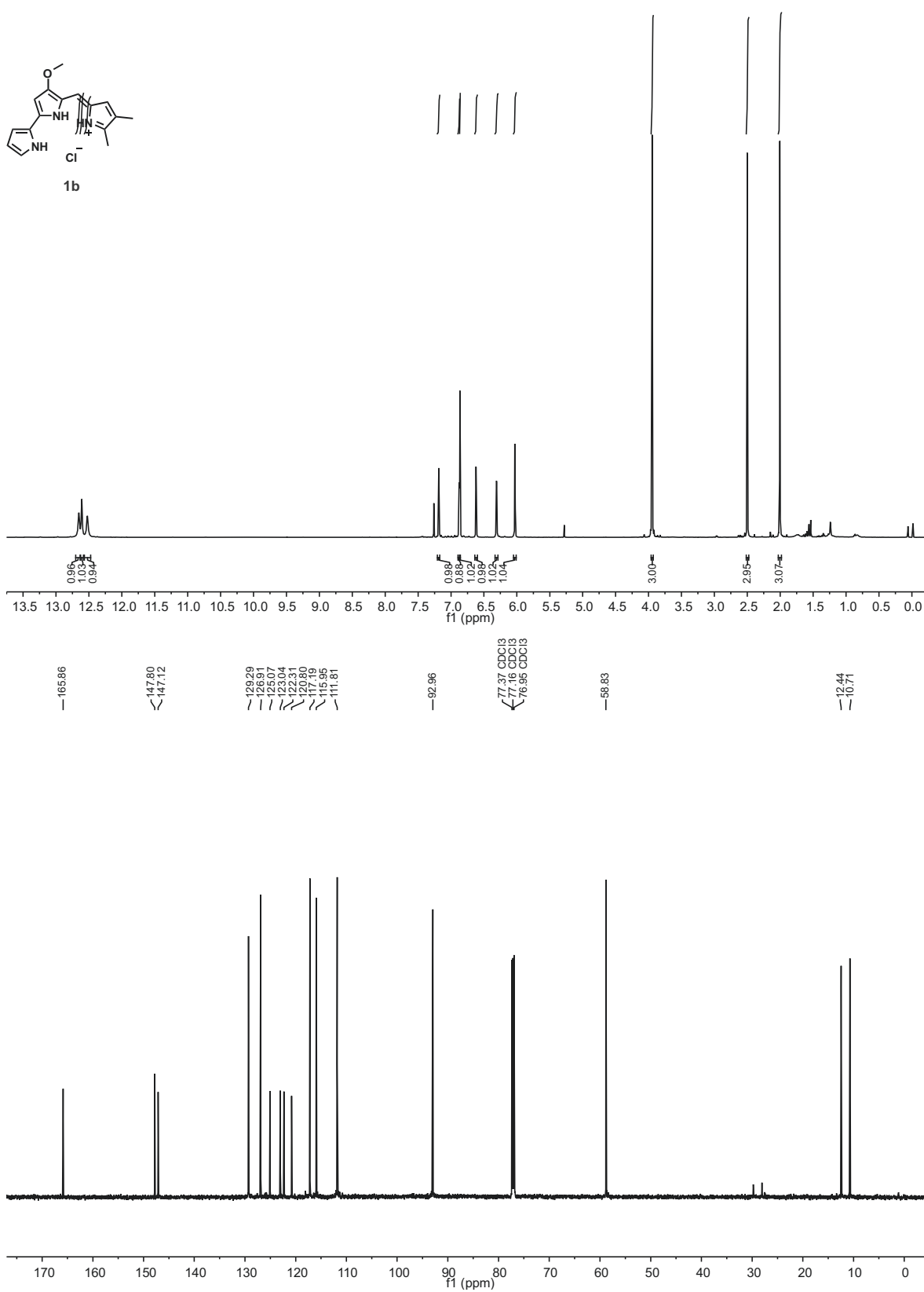
GTGAGATTTATCACATTCCATTTGTACATAAAGGATCTGCGATTAATATTTGGGATCCCAAAGGCGGCAAAG  
TCGACAACTTTGAATGTAAAGTTGACGGGACATTAATTACCAGTGATTTTGTACTTCGCCCAGATGACGAGC  
GCACGGCAGAAGAAACATTAGTTGCACGTAAACCTTGGACCCGCGGTTGGCAGTTTGGCATTGATGTACAA  
ATGCCTAATCTTGTTTTGTATCCGAAGCGATGTTTTCGATGTAATGTTTCATTCCAACACCTATCGACGACAATAC  
ATGCTGGGTTTGTGTATGTTACCAAGAACCAAAACGTGACTTGTTGTTACCGTTAATTAAACCATTACCAATT  
CCATTTTGGCGCCCTGTTGCGCCCTTGGTACATGTGTCGTATCGAGCGATTTGTACAACAAGATAAAGATATGG  
CGGTTATTTTCATATCAAAACCCGAAAGTGCTAGTCCAAAAGCCAATCGATTGATCCCTCTAGATAAAGTAA  
ACGCTCACTATATTCGTTTTAGAGAGAAGTTAATTCGCGAAGCCAATGAAGAAAAAGCACTAAAAGCAAAA  
CTGCAAACTAAACCACACACTGATGTCGAGGCACCCTCACTCGAGCAAATCATTGGTATTGAAGAAATTAAC  
TAG

#### Aminosäuresequenz von TreaC:

Die unterstrichenen Aminosäuren stammen von den verschiedenen, fusionierten Elementen: Thioredoxin, His<sub>6</sub>-tag, Thrombin und S-Tag. Die Sequenz von TreaC ist **fett** hervorgehoben

MSDKIIHLTDDSFDTDVLKADGAILVDFWAEWCGPCKMIAPILDEIADEYQGKLTVAKLNIDQNPGTAPKYGIRGIP  
TLLLFKNGEVAATKVGALSKGQLKEFLDANLAGSGSGHMHSHHHHSSGLVPRGSGMKETAAAKFERQHMDSPDL  
GTDDDDKAMIPNQWY**AI**SRIQDVKKKPIGIKRLNKL**LV**YRDTKGELVCMDDKCPHKGVMLSRGKQHGDIIACP  
YHGFQFDQKGDCVHMPVLGKNGDVPKGM**CV**KTYKVKEEFGLIWFWDLMPENDYPEVPMFKQFKEYKGY  
YSFYGWDAPINYTRYVESVCEIYHIPFVHKGSAINIWDPKGGKVDNFECKVDGTLITSDFVLRPDDERTAEETLVA  
RKPWTRGWQFGIDVQMPNLVLRSDVFDV**MF**IPTIDDNTCWVCVCYQEPKRDLLPLIKPLIPFWRPVRPWY  
MCRIERFVQQDKDMAVISYQNP**KV**SSPKANRLIPLDKVNAHYIRFREKLIREANEEKALKAKLQTKPHTDVEAPS  
LEQII**GIEE**IN

## 9.7 Ausgewählte NMR-Spektren

Abbildung A 36.  $^1\text{H}$ -und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von **1b** in  $\text{CDCl}_3$  (600 MHz/ $^{13}\text{C}$  151 MHz).

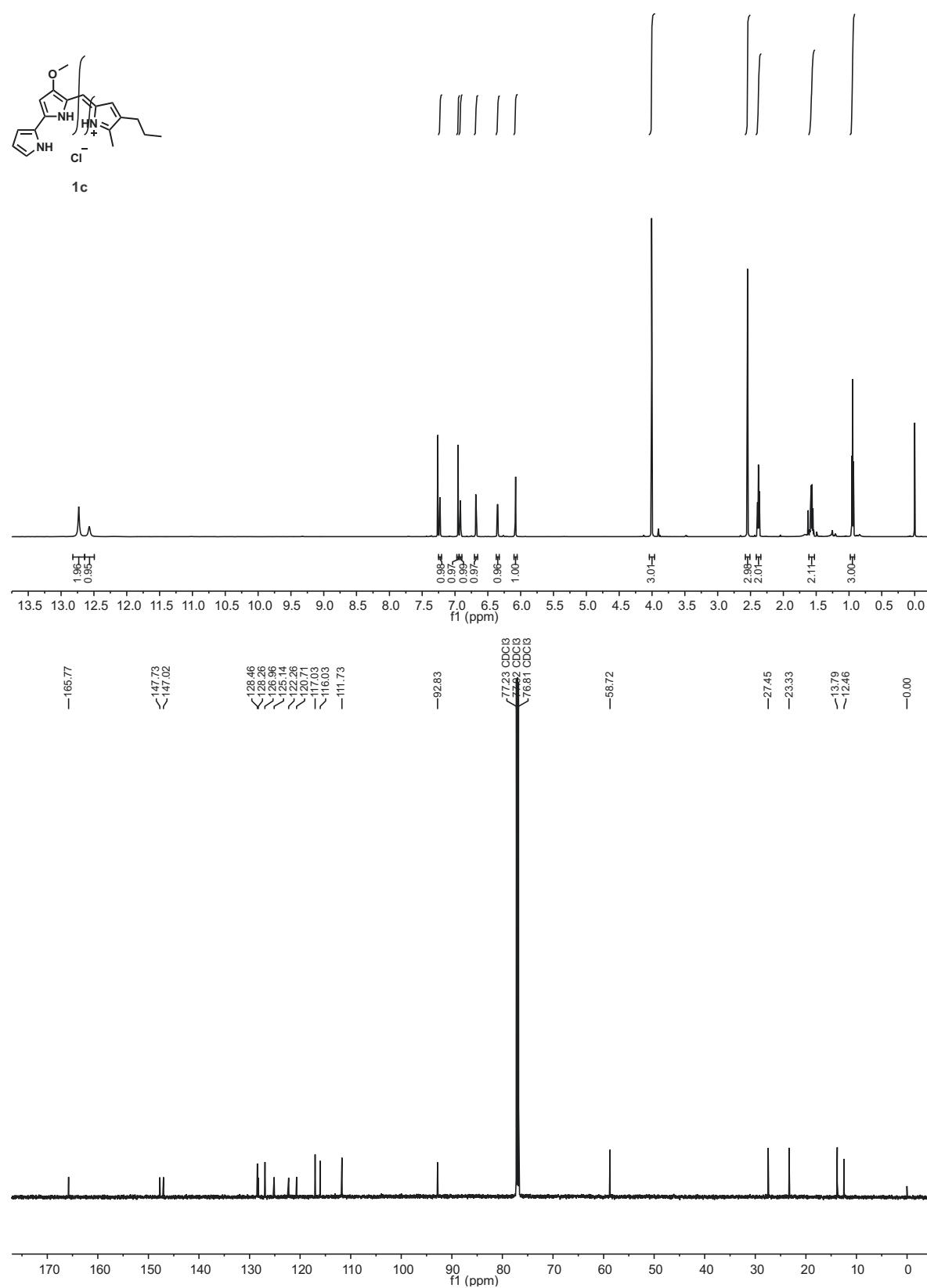


Abbildung A 37.  $^1\text{H}$ -und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von **1c** in  $\text{CDCl}_3$  (600 MHz/151 MHz).

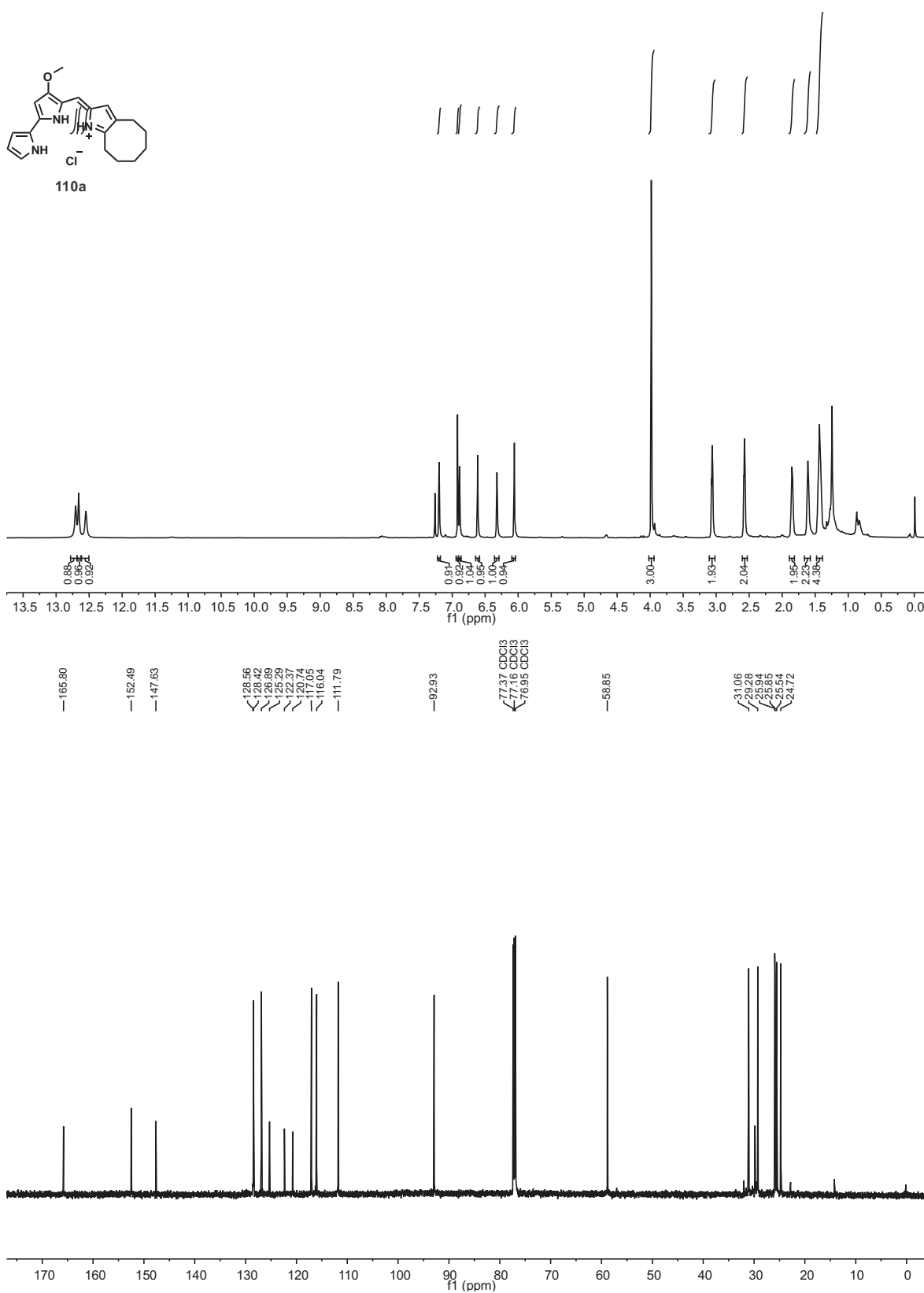


Abbildung A 38.  $^1\text{H}$ -und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von **110a** in  $\text{CDCl}_3$  (600 MHz/151 MHz).

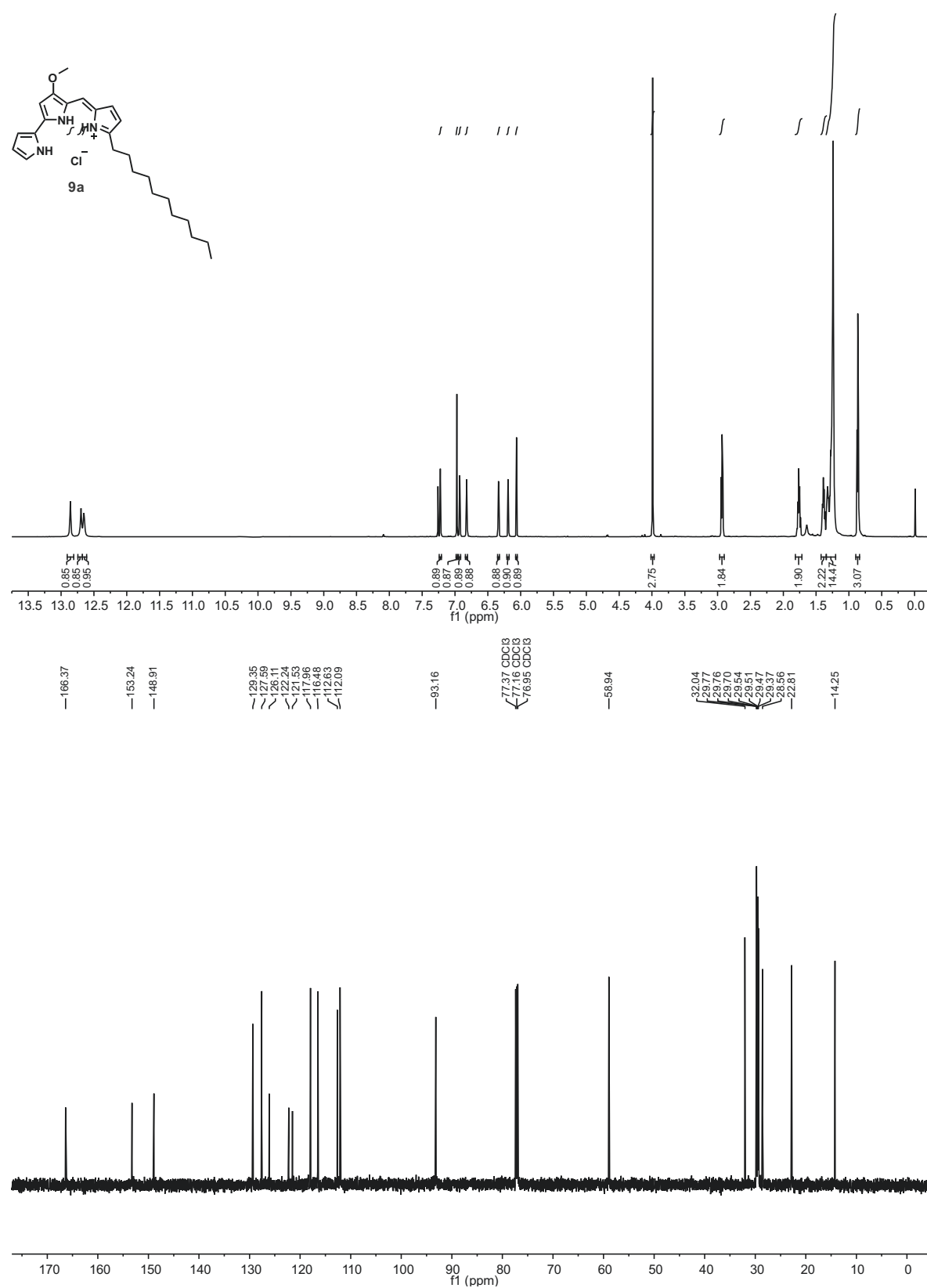


Abbildung A 39.  $^1\text{H}$ -und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von **9a** in  $\text{CDCl}_3$  (600 MHz/151 MHz).

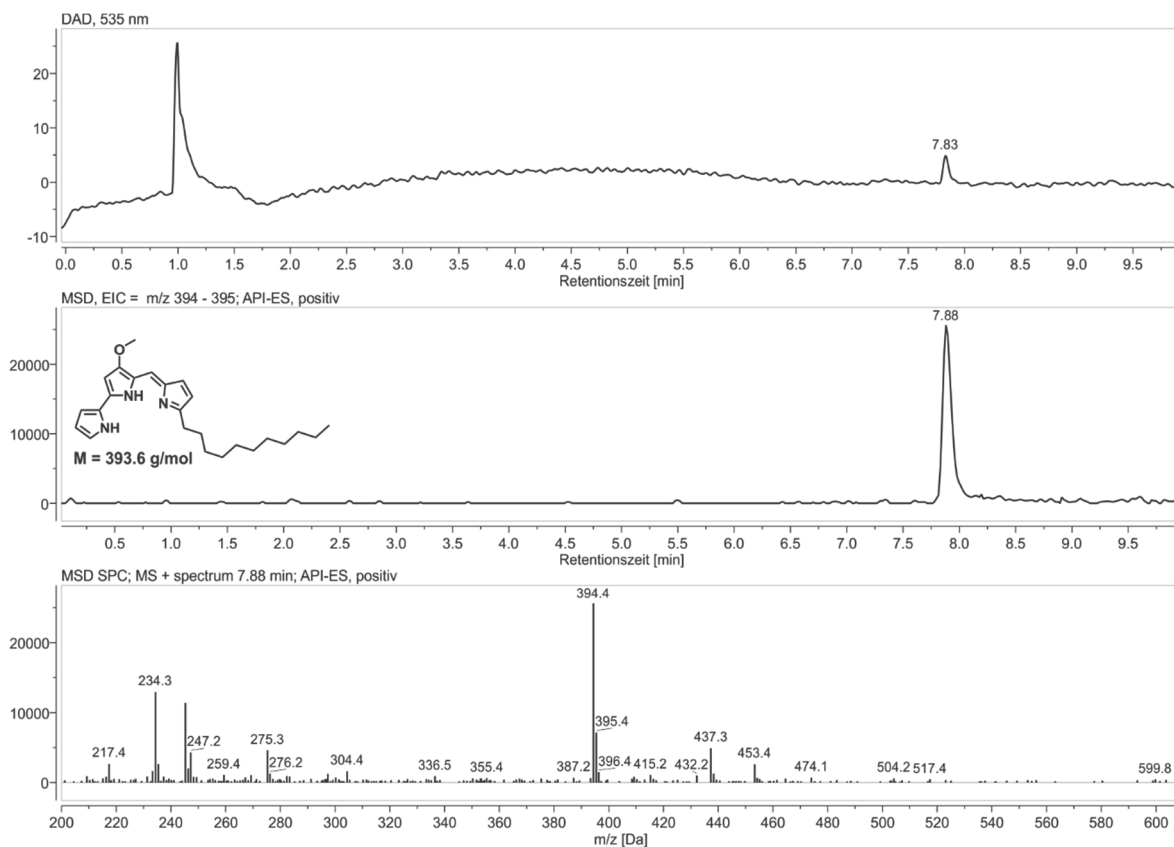


## 9.8 Ausgewählte LC-MS Analytik

### 9.8.1 LC-MS Analytik der *in vitro* Assays

In den Bildunterschriften ist in Klammern jeweils angegeben welches Enzym in Form von Zelllysat eingesetzt wurde. Leervektorproben wurden mit der Abkürzung LV bezeichnet.

#### 9.8.1.1 Initiale *in vitro* Assays



**Abbildung A 40.** DAD-Chromatogramm, Massenchromatogramm und Massenspektrum von **9a** (RedH). [EIC = engl. *extracted ion chromatogram*, ES = engl. *electrospray*, MSD = engl. *mass selective detector*].

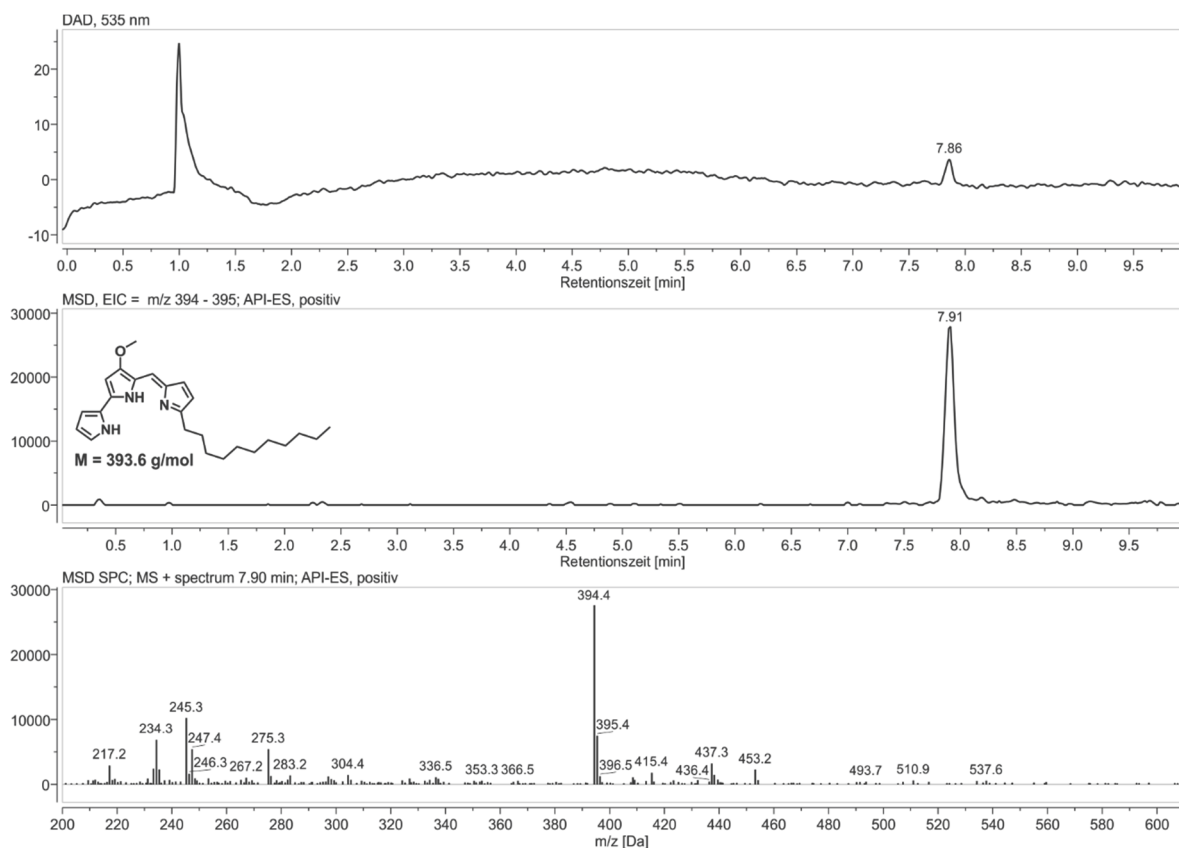


Abbildung A 41. DAD-Chromatogramm, Massenchromatogramm und Massenspektrum von 9a (RedH).

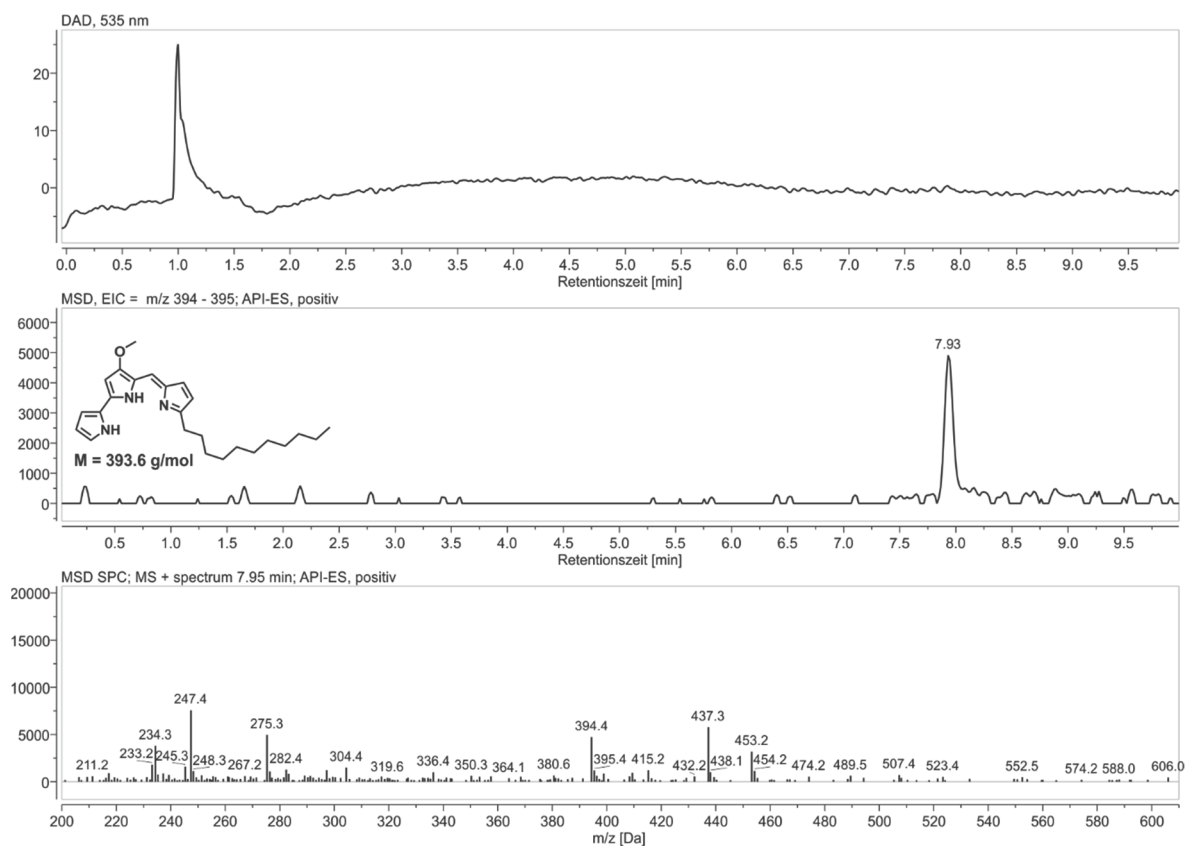


Abbildung A 42. DAD-Chromatogramm, Massenchromatogramm und Massenspektrum von 9a (LV).

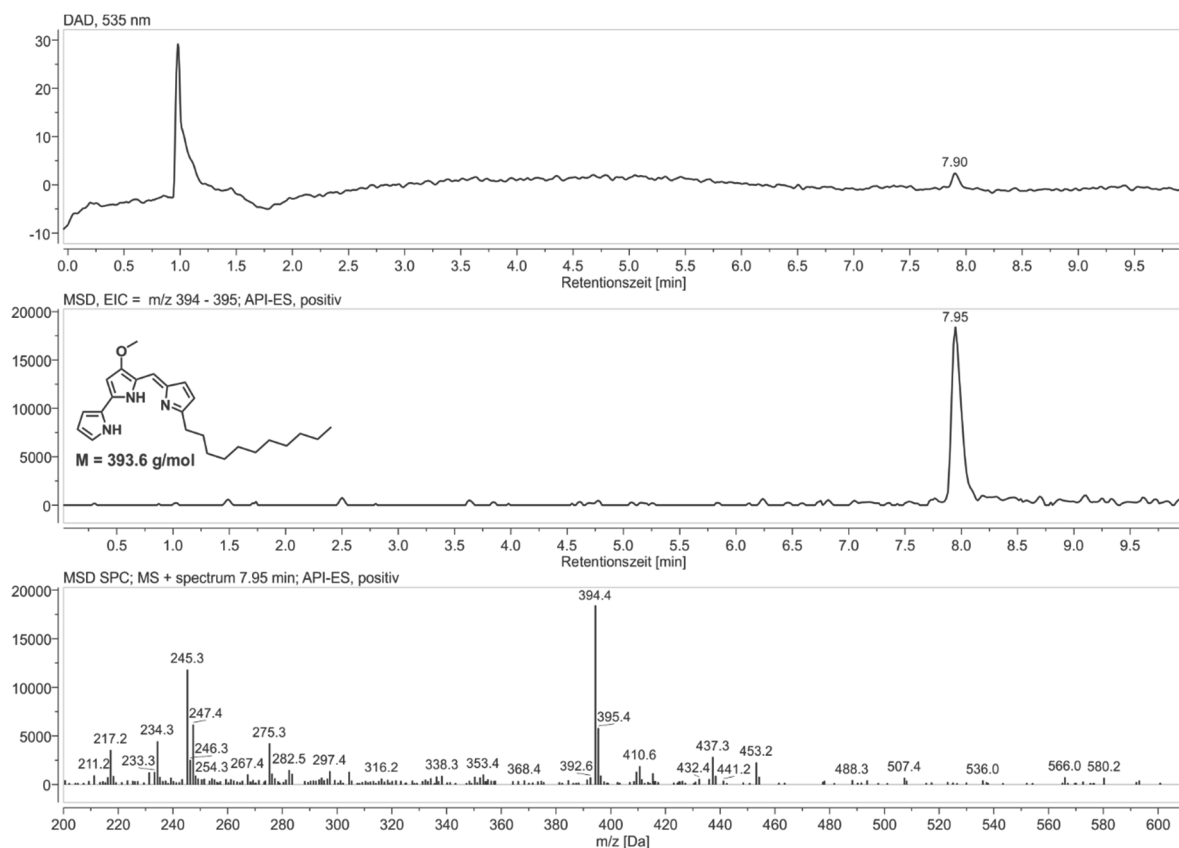


Abbildung A 43. DAD-Chromatogramm, Massenchromatogramm und Massenspektrum von 9a (McpH).

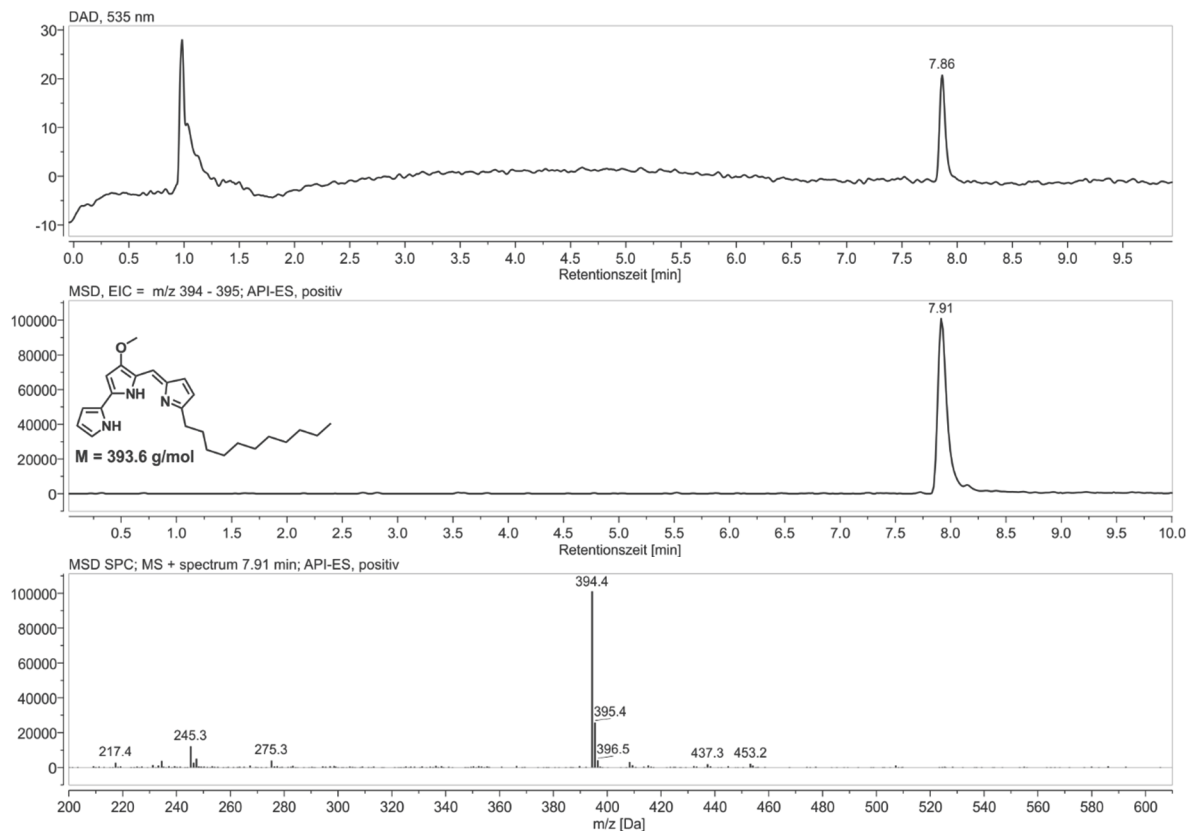


Abbildung A 44. DAD-Chromatogramm, Massenchromatogramm und Massenspektrum von 9a (MarH).

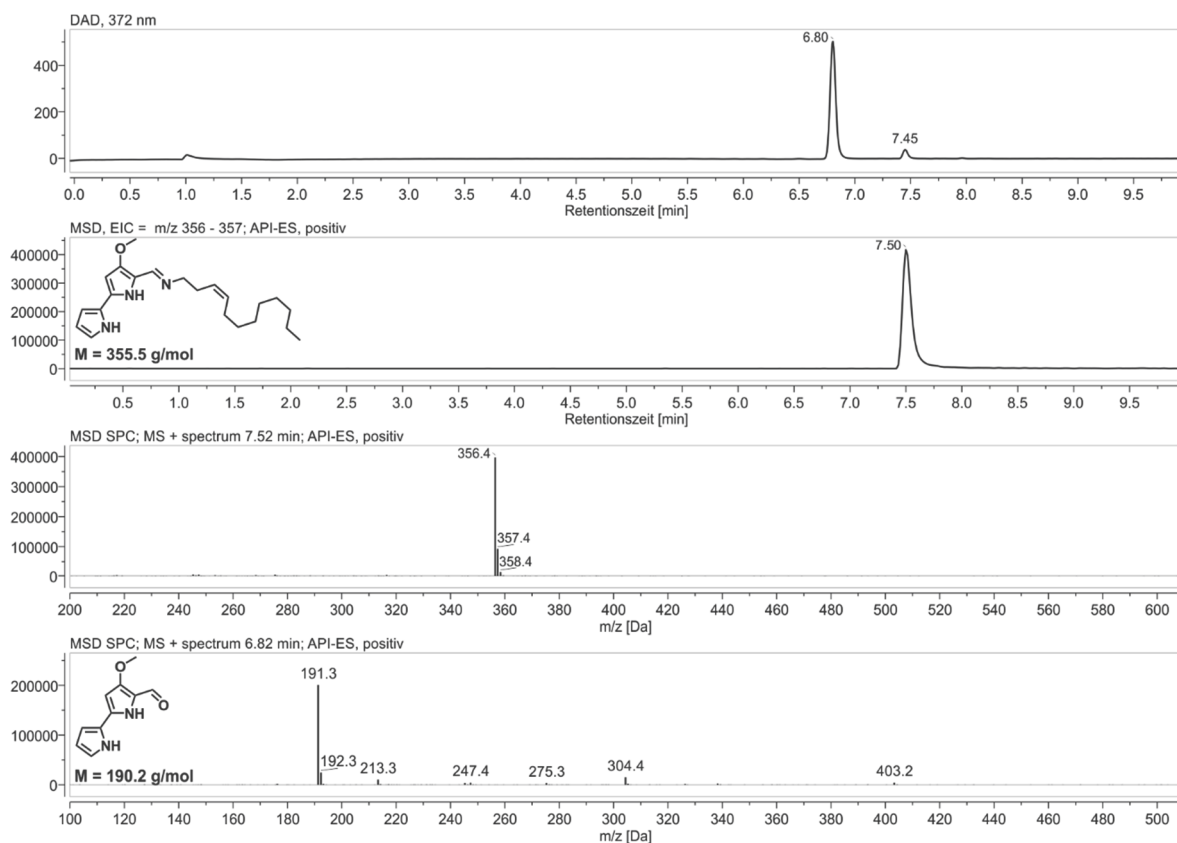


Abbildung A 45. DAD-Chromatogramm, Massenchromatogramm und Massenspektrum von 26a (PigC).

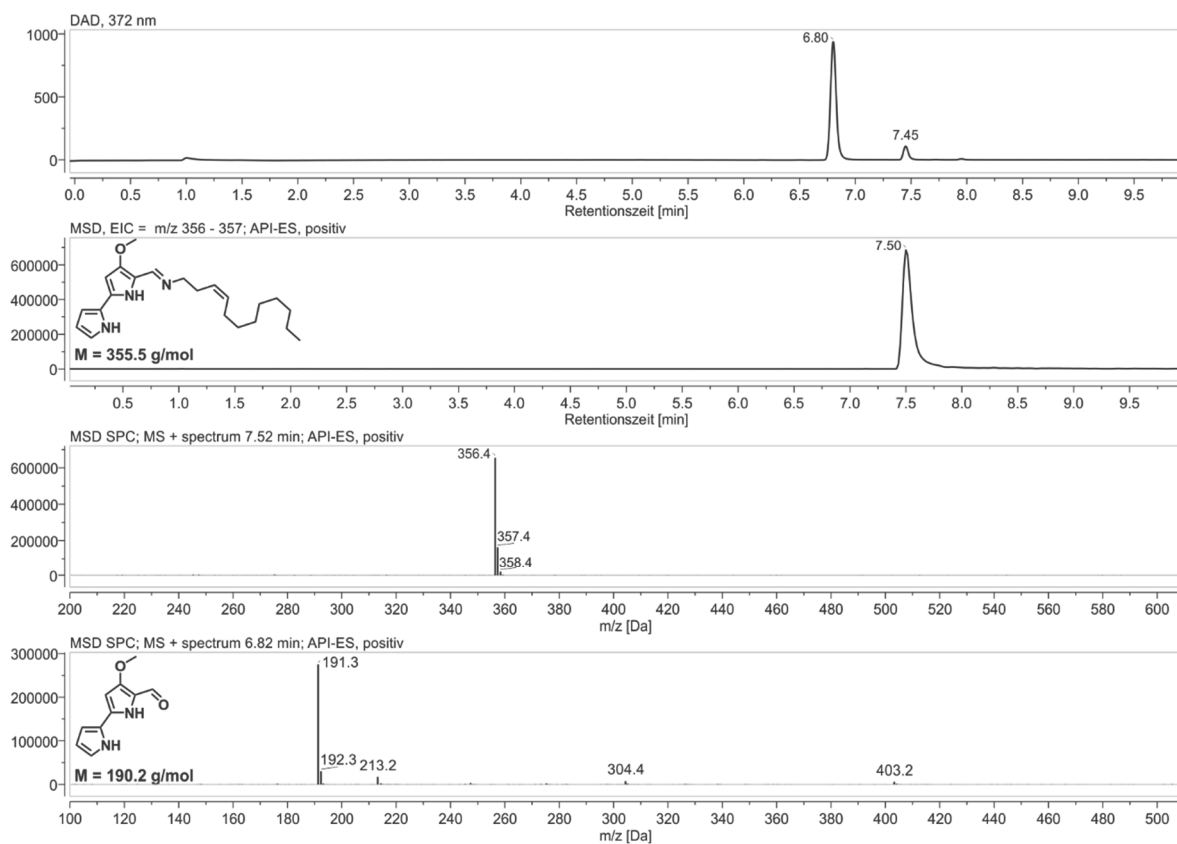


Abbildung A 46. DAD-Chromatogramm, Massenchromatogramm und Massenspektrum von 26a (TamQ).

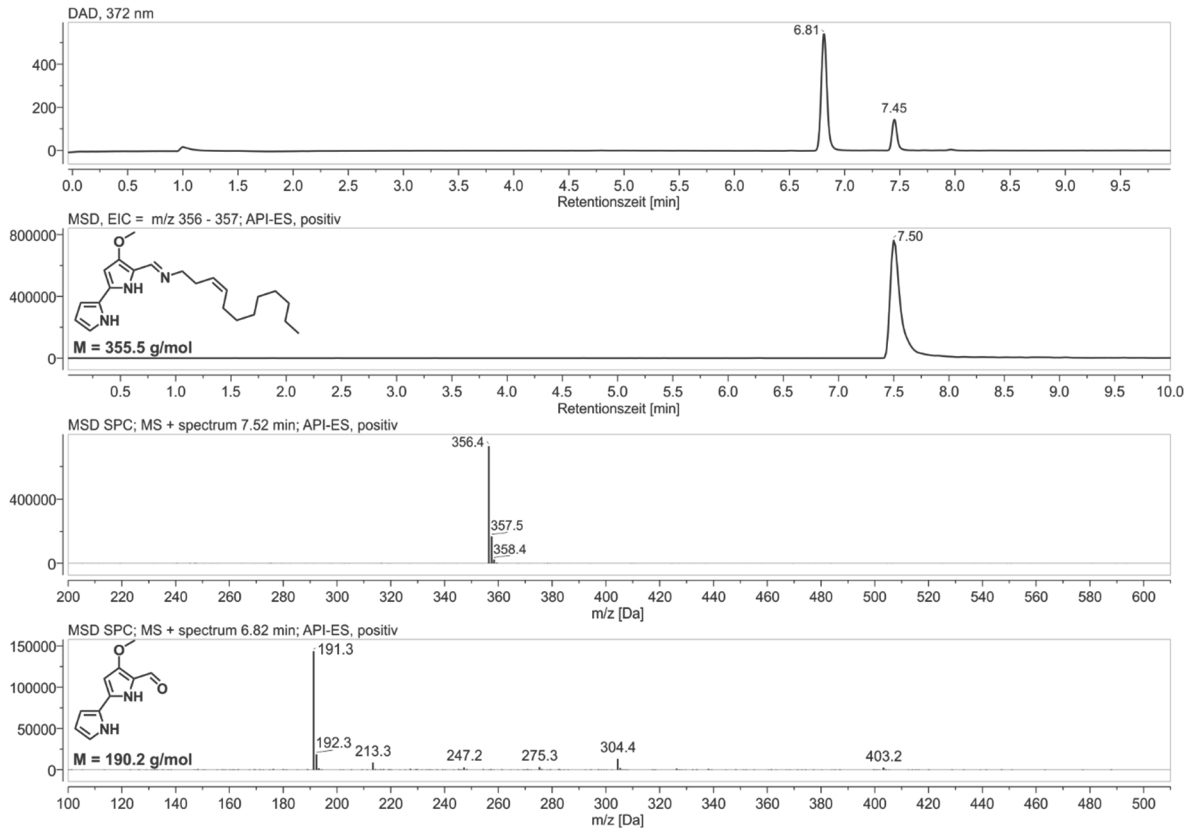


Abbildung A 47. DAD-Chromatogramm, Massenchromatogramm und Massenspektrum von 26a (TreaP).

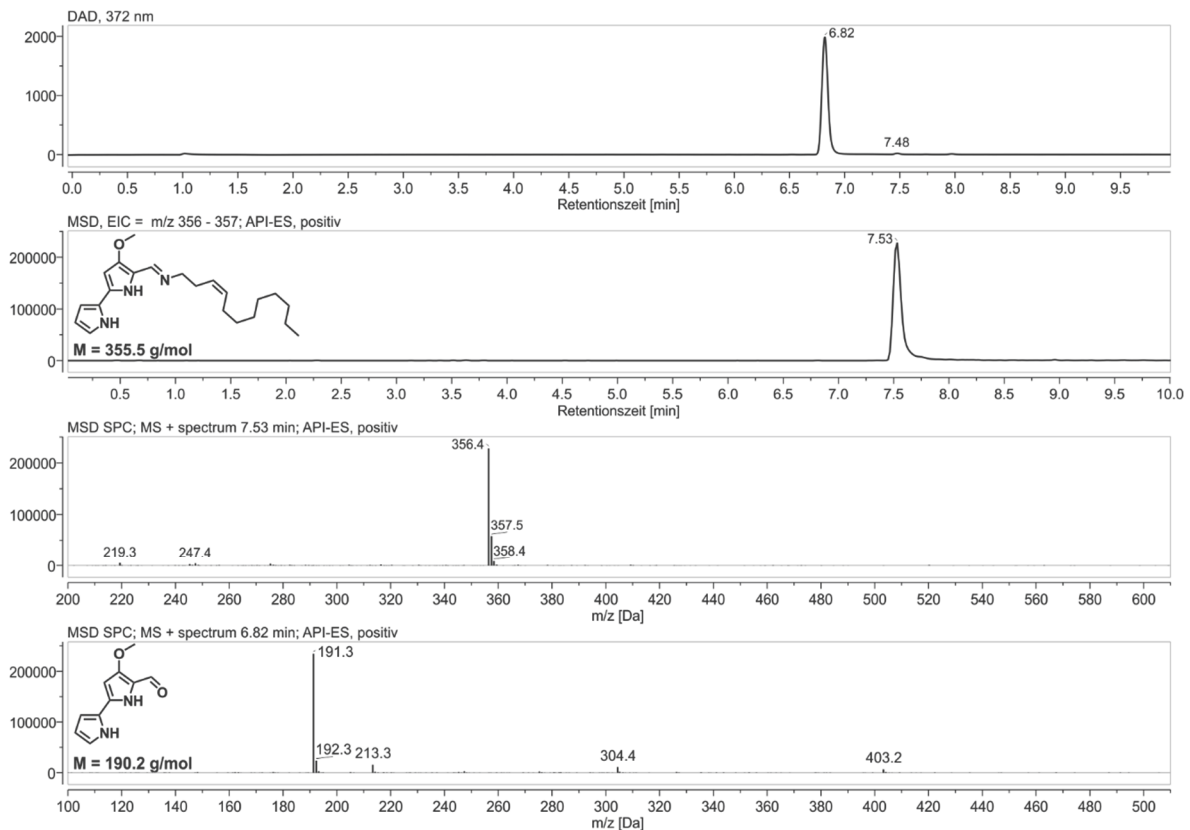
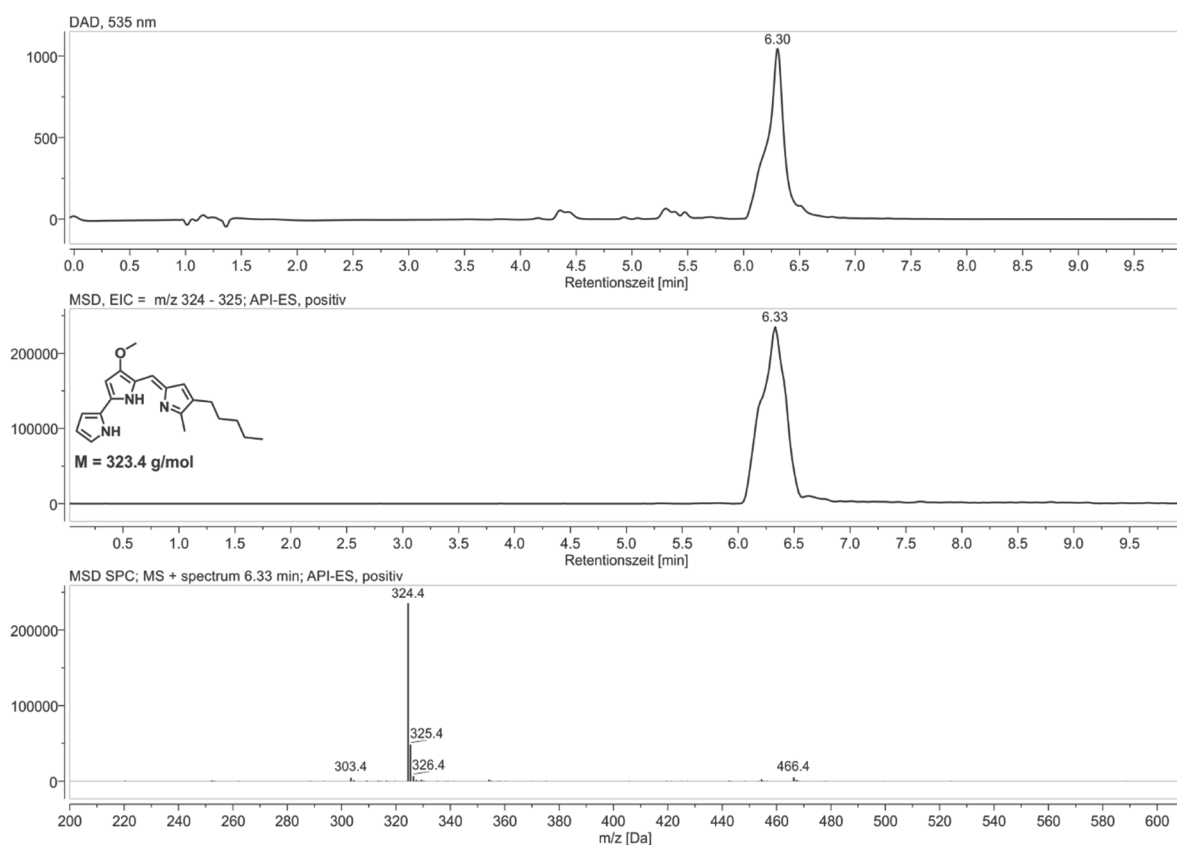
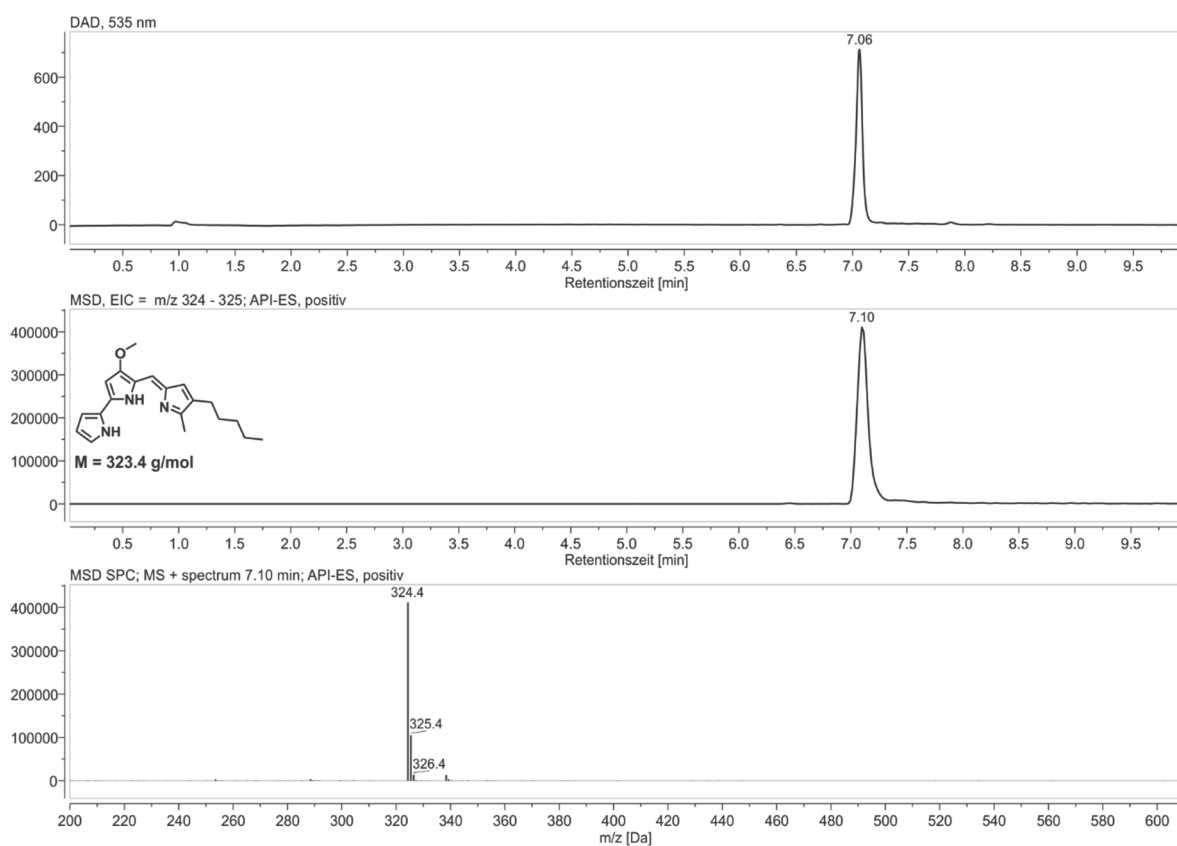


Abbildung A 48. DAD-Chromatogramm, Massenchromatogramm und Massenspektrum von 26a (LV).

Abbildung A 49. DAD-Chromatogramm, Massenchromatogramm und Massenspektrum von **1a** (PigC).Abbildung A 50. DAD-Chromatogramm, Massenchromatogramm und Massenspektrum von **1a** (TamQ).

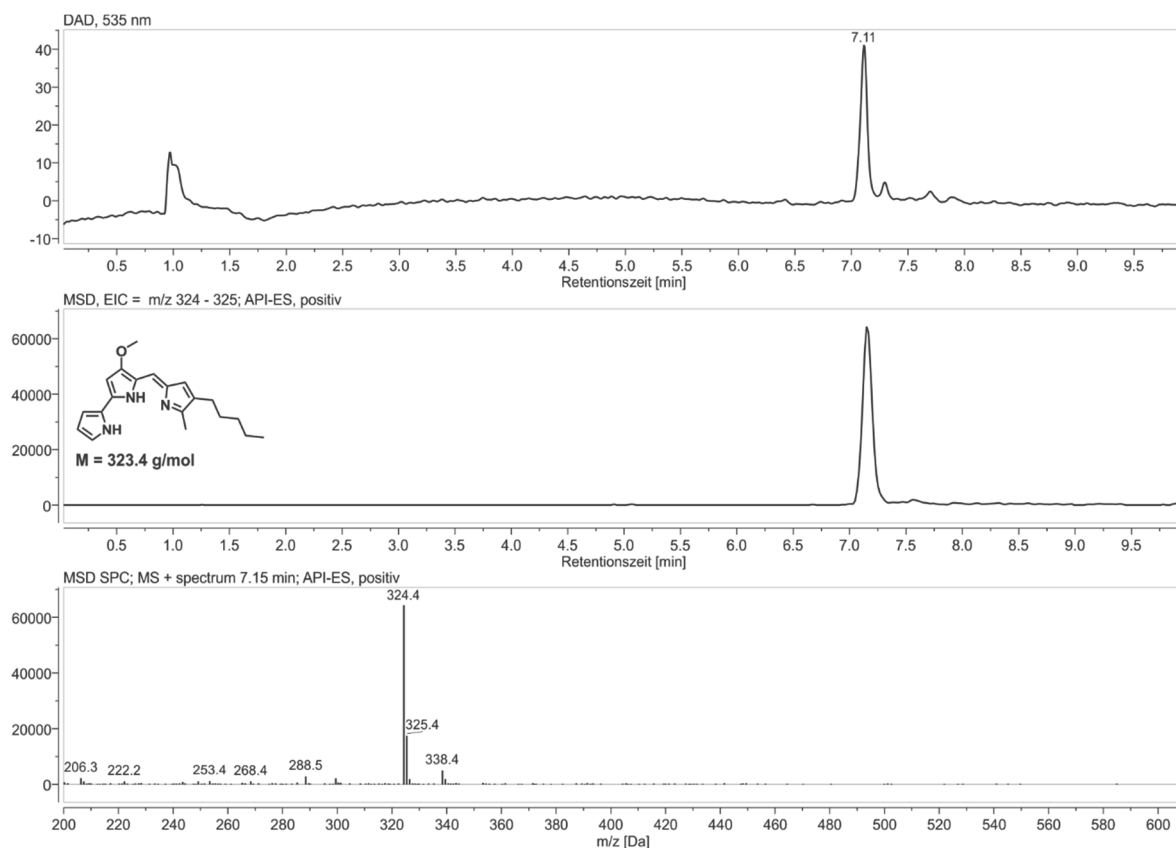


Abbildung A 51. DAD-Chromatogramm, Massenchromatogramm und Massenspektrum von **1a** (TreaP).

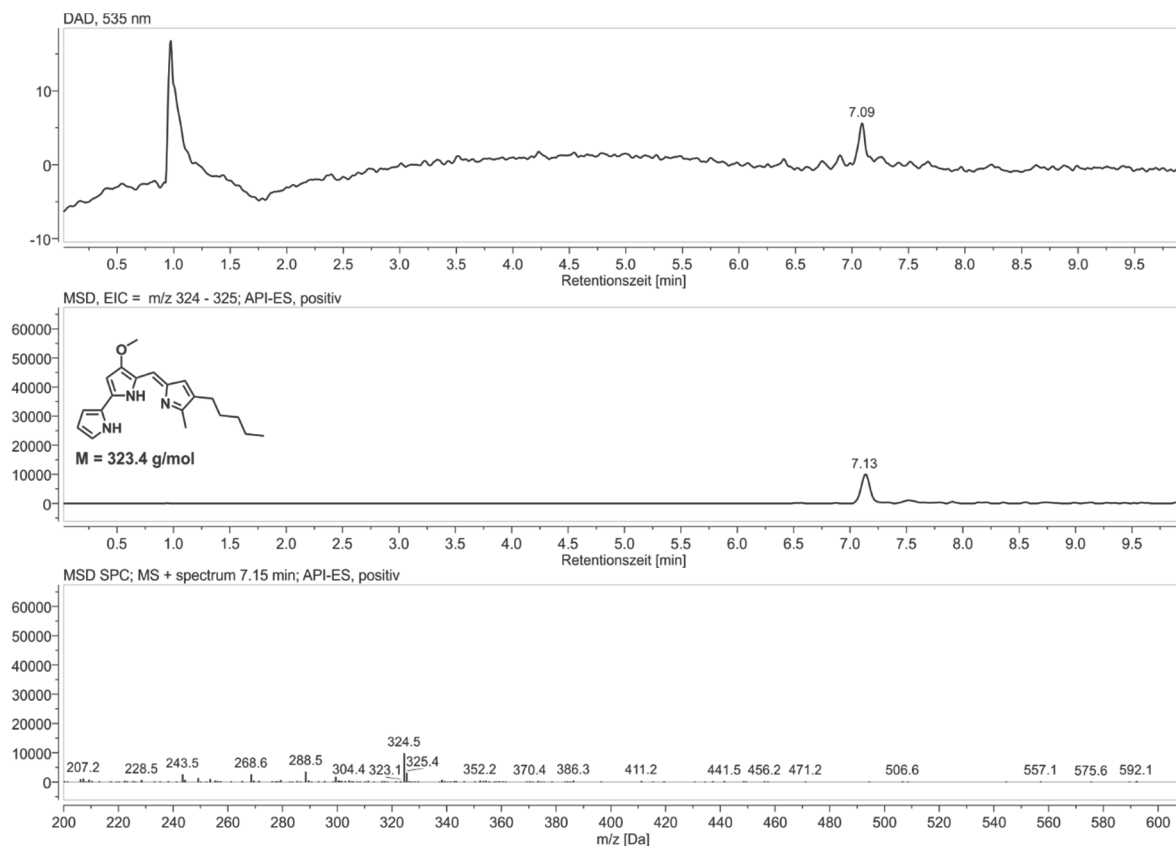
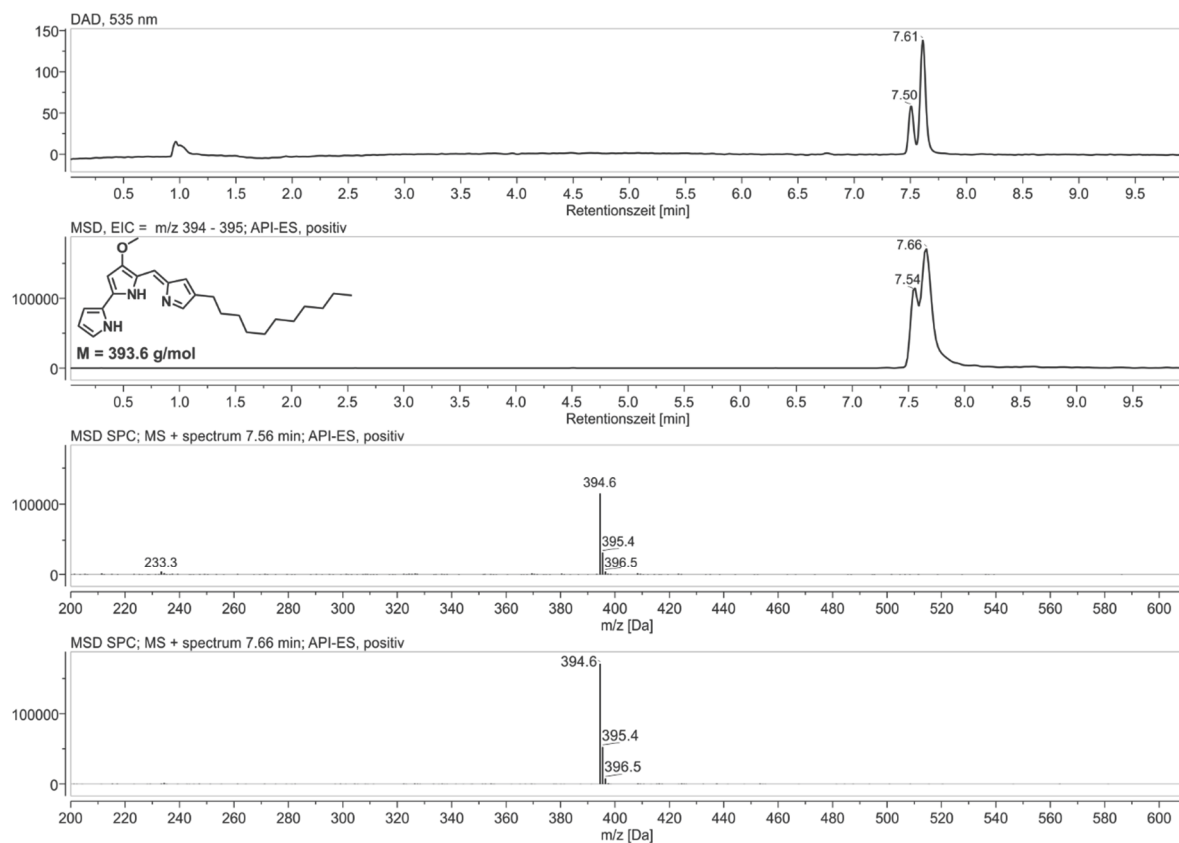
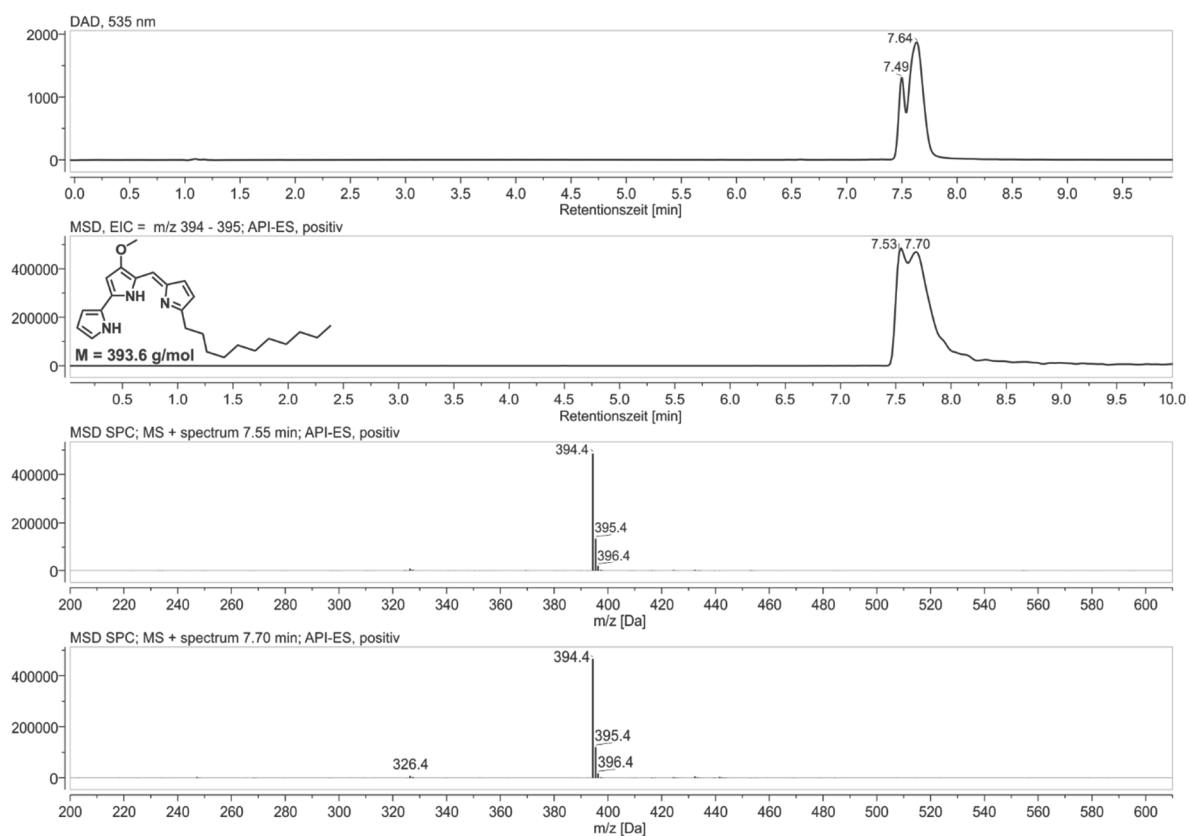


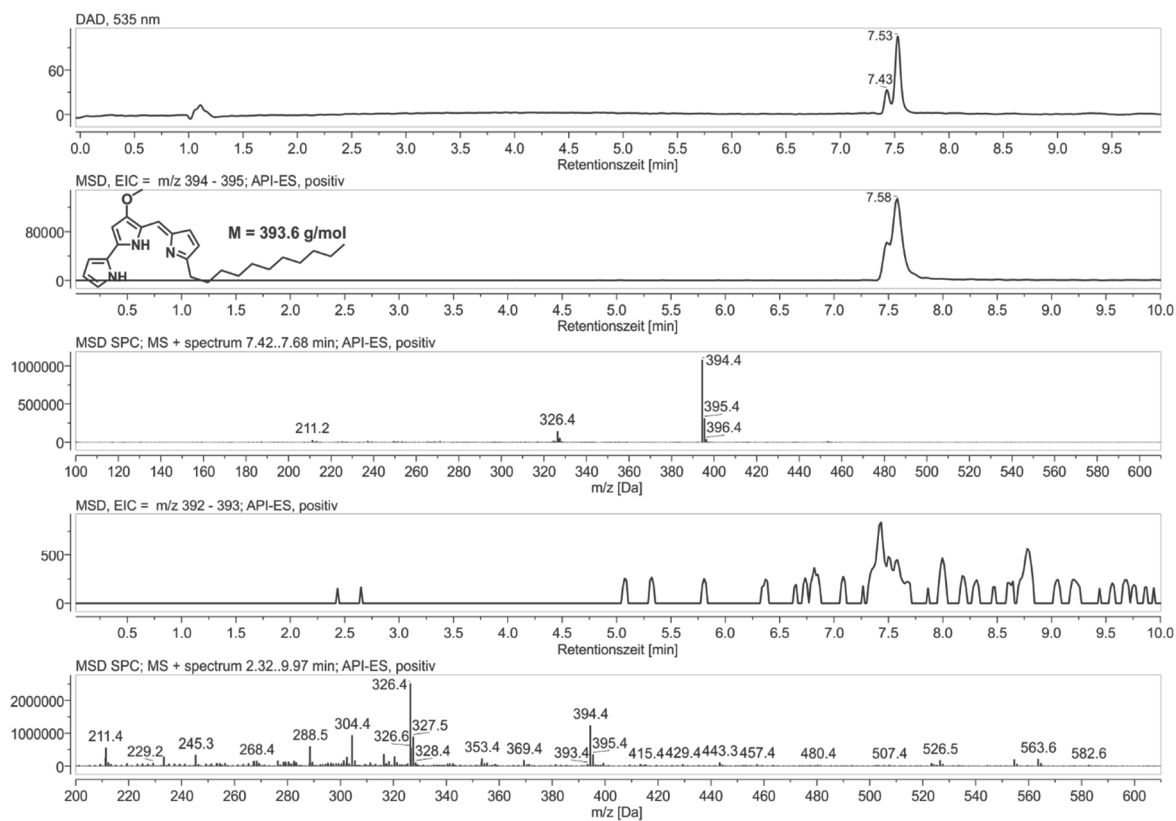
Abbildung A 52. DAD-Chromatogramm, Massenchromatogramm und Massenspektrum von **1a** (LV).

9.8.1.2 *In vitro* Assays mit 3-alkylierten PyrrolenAbbildung A 53. DAD-Chromatogramm, Massenchromatogramm und Massenspektrum von **101a** (TamQ).

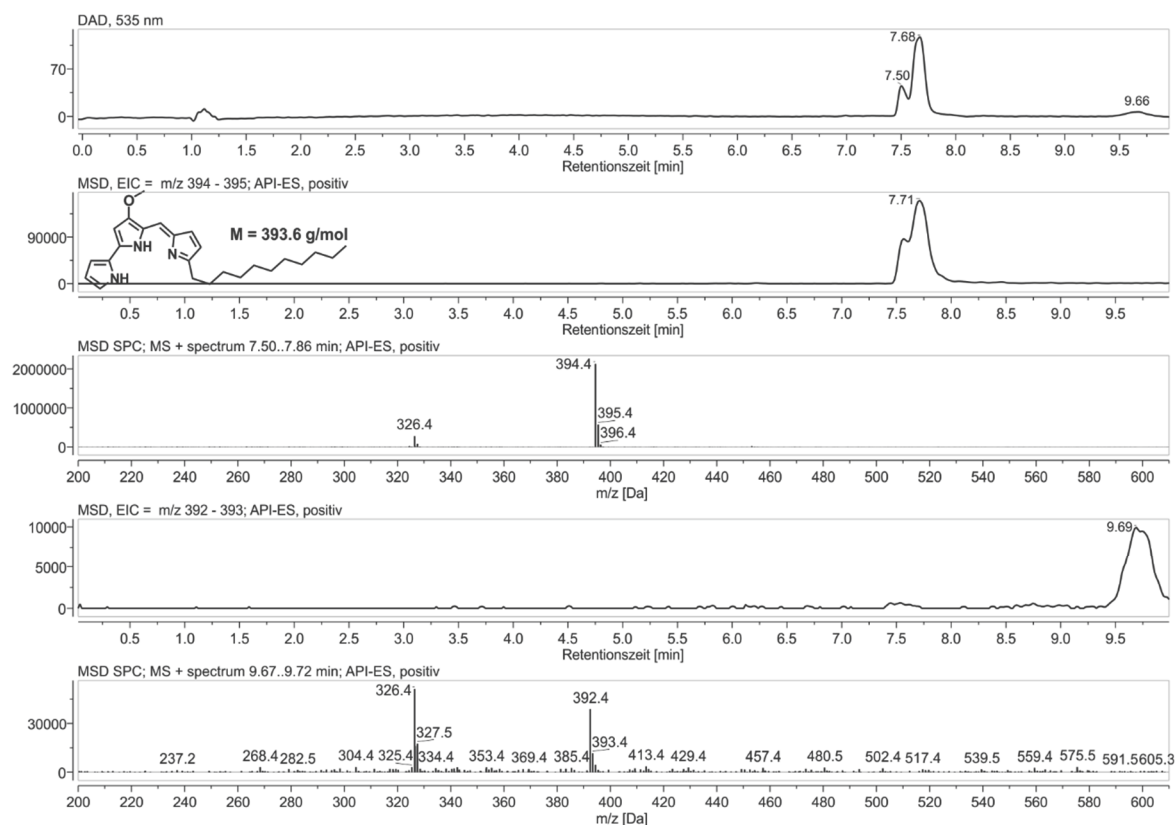


9.8.1.3 *In vitro* Assays mit 2-alkylierten PyrrolenAbbildung A 54. DAD-Chromatogramm, Massenchromatogramm und Massenspektrum von **9a** (TamQ).

### 9.8.2 LC-MS Analytik der Biotransformation von Undecylprodigiosin (9a)



**Abbildung A 55.** DAD-Chromatogramm, Massenchromatogramm und Massenspektrum der Biotransformation von 9a [pET28a(+)\_LV].



**Abbildung A 56.** DAD-Chromatogramm, Massenchromatogramm und Massenspektrum der Biotransformation von 9a [pET28a(+)\_treaC].

## 9.9 Eigenanteile an den veröffentlichten Publikationen dieser Arbeit

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*'.

Die oben genannte Publikation enthält die folgenden Eigenanteile: Die Prodiginine **1c**, **1f** und **58b** wurden in Zusammenarbeit mit A. S. Klein im präparativen Maßstab für physiologische Testungen mit Brustkrebszelllinien hergestellt.

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**, 19, 1545–1552; 'Preparation of cyclic prodiginines by mutasynthesis in *Pseudomonas putida* KT2440'.

Die oben genannte Publikation enthält die folgenden Eigenanteile: Die Experimente zur antimikrobiellen Aktivität der Prodiginine **110a–110d** gegenüber den Hefen *P. pastoris* und *S. cerevisiae* wurden zusammen mit A. S. Klein durchgeführt und ausgewertet. Die Mutasynthese im analytischen Maßstab unter Nutzung der Pyrrole **82a–82d** sowie die Mutasynthese im präparativen Maßstab mit Pyrrol **82d** wurde von mir durchgeführt und ausgewertet. Der erste Entwurf des Manuskripts wurde von A. S. Klein und mir verfasst.

H. U. C. Brass, A. S. Klein, S. Nyholt, T. Classen, J. Pietruszka, *Adv. Synth. Catal.* **2019**, 361, 2659–2667; 'Condensing Enzymes from *Pseudoalteromonadaceae* for Prodiginine Synthesis'.

Die oben genannte Publikation enthält die folgenden Eigenanteile: Die Identifizierung der Proteine TamQ und TreaP als potentiell neue Kondensationsenzyme für die Prodigininsynthese, die Klonierung der Konstrukte pET28a(+):tamQ und pET28a(+):treaP ebenso wie die Expression von *pigC*, *tamQ* und *treaP* in *E. coli* BL21(DE3) wurde durchgeführt. Die *in vitro* Assays, die Quantifizierung der *in vitro* Assays, die kinetischen Untersuchungen der Kondensationsenzyme und die zugehörigen Auswertungen wurden durchgeführt. Ebenso erfolgte die Synthese der Prodiginine **58c**, **58d** und **58e**, die Erhebung der zugehörigen analytischen Daten und die Bestimmung der Extinktionskoeffizienten dieser Prodiginine. Ein Teil der Synthesen und Erhebung der analytischen Daten der Vorläuferverbindungen für die *in vitro* Assays wurde durchgeführt. Der Biokatalyseansatz im semi-präparativen Maßstab wurde durchgeführt. Der erste Entwurf des Manuskripts wurde verfasst.

Samer S. Habash, Hannah U. C. Brass, Andreas S. Klein, David P. Klebl, Tim Moritz Weber, Thomas Classen, Jörg Pietruszka, Florian M. W. Grundler, A. Sylvia S. Schleker; '5826 19 ProdiProPlant', Erfindungsmeldung (Erstellungsdatum Universität Bonn: 11.12.2019).

Die oben genannte Erfindungsmeldung enthält die folgenden Eigenanteile (5%): Prodigiosin (**1a**) wurde hergestellt.

S. Brands, H. U. C. Brass, J. Pietruszka, A. J. Ruff, U. Schwaneberg, *Chem. Commun.* **2020**, 56, 8631–8634; 'A colourimetric high-throughput screening system for directed evolution of prodigiosin ligase PigC'.

Die oben genannte Publikation enthält die folgenden Eigenanteile: Die Prodiginine **1a** und **1b**, die Pyrrole **3a** und **3b** sowie MBC (**2**) wurden synthetisiert und die Analytik des Prodiginins **1b** aufgenommen. Für den Material und Methoden Teil des Manuskripts wurden die Synthesearbeiten beschrieben und die Abbildung des <sup>1</sup>H- und <sup>13</sup>C-NMRs von Prodiginin **1b** erstellt. Es wurden Korrekturen des ersten Entwurfs des Manuskripts durchgeführt.

S. S. Habash, H. U. C. Brass, A. S. Klein, D. P. Klebl, T. M. Weber, T. Classen, J. Pietruszka, F. M. W. Grundler, S. Schleker, *Front. Plant Sci.* **2020**, 11, 1545; 'Novel prodiginine derivatives demonstrate bioactivities on plants, nematodes, and fungi'

Die oben genannte Publikation enthält die folgenden Eigenanteile: Bereitstellung des Naturstoffs Prodigiosin (**1a**) für biologische Testungen. Es wurden Beiträge zur Erstellung des Manuskripts geliefert und Korrekturen des Manuskripts vorgenommen.

## 10 Literaturverzeichnis

- [1] 'Nationale Bioökonomiestrategie Kabinetttversion, 15.01.2020', Seitenaufruf: 04. März 2020, Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) und Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL). Redaktion: Projektträger Jülich, <https://www.bmbf.de/files/bio%c3%b6konomiestrategie%20kabinett.pdf>,
- [2] *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**.
- [3] *Nationale Forschungsstrategie BioÖkonomie 2030 – Unser Weg zu einer bio-basierten Wirtschaft*, Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) Referat Bioökonomie, Bonn, Berlin, **2010**.
- [4] *A sustainable Bioeconomy for Europe: strengthening the connection between economy, society and the environment – Updated Bioeconomy Strategy*, European Commission Directorate-General for Research and Innovation Unit F – Bioeconomy, Brüssel, **2018**.
- [5] '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](https://www.mkw.nrw/fileadmin/Medien/Dokumente/Forschung/Fortschritt/Biooekonomiestrategie_NRW.pdf), **2013**.
- [6] 'Bioökonomie in Deutschland', Seitenaufruf: 04. März 2020, bioökonomie.de ist eine Initiative des Bundesministeriums für Bildung und Forschung (BMBF), <https://biooekonomie.de/biooekonomie-deutschland>, **2020**.
- [7] 'Das Bioeconomy Science Center (BioSC)', Seitenaufruf: 04. März 2020, BioSC, [https://www.biosc.de/bioeconomy\\_science\\_center](https://www.biosc.de/bioeconomy_science_center),
- [8] 'FocusLab CombiCom – Combinatorial creation of structural diversity for novel high-value compounds', Seitenaufruf: 04. März 2020, BioSC, <https://www.biosc.de/combicom>,
- [9] G. M. Cragg, D. J. Newman, *Biochim. Biophys. Acta, Gen. Subj.* **2013**, 1830, 3670–3695; 'Natural products: A continuing source of novel drug leads'.
- [10] I. Shaw, P. Nicholson, *Reclams Lexikon des alten Ägypten*, Reclam, Stuttgart, **1998**.
- [11] 'Papyrus Ebers', Seitenaufruf: 24. März 2020, <https://papyrusebers.de/>,
- [12] R. Germer, *Die Heilpflanzen der alten Ägypter*, Artemis & Winkler, Düsseldorf/Zürich, **2002**.
- [13] A. Fürstner, *Angew. Chem.* **2003**, 115, 3706–3728; 'Chemie und Biologie des Roseophilins und der Prodigiosin-Alkaloide: 2500 Jahre im Überblick'.
- [14] D. J. Newman, G. M. Cragg, *J. Nat. Prod.* **2016**, 79, 629–661; 'Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014'.
- [15] T. Classen, J. Pietruszka, *Bioorg. Med. Chem.* **2018**, 26, 1285–1303; 'Complex molecules, clever solutions - Enzymatic approaches towards natural product and active agent syntheses'.
- [16] 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'.
- [17] A. S. Klein, Inaugural-Dissertation, 'Methoden zur Herstellung von Prodigininen als Wirkstoffe – Eine farbenfrohe Brücke zwischen Chemie und Biologie', Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (Düsseldorf), **2017**.
- [18] 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'.
- [19] 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*'.

- [20] 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'.
- [21] J. R. Hanson, *Natural products: The secondary metabolites*, Vol. 17, Royal Society of Chemistry, **2003**.
- [22] G. Fuchs, *Allgemeine Mikrobiologie*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, **2017**.
- [23] A. Tissier, J. Ziegler, T. Vogt, in *Ecological biochemistry: environmental and interspecies interactions* (Eds.: G.-J. Krauss, D. H. Nies), Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA **2014**, pp. 14–37.
- [24] J. W. Bennett, R. Bentley, *Adv. Appl. Microbiol.* **2000**, 47, 1–32; 'Seeing red: The story of prodigiosin'.
- [25] L. Garlaschelli, *Chemie in unserer Zeit* **1999**, 33, 152–157; 'Chemie der Wunder'.
- [26] F. Wrede, O. Hettche, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1929**, 62, 2678–2685; 'Über das Prodigiosin, den roten Farbstoff des *Bacillus Prodigiosus* (l. Mitteil.)'.
- [27] 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'.
- [28] 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'.
- [29] U. V. Santer, H. J. Vogel, *Biochim. Biophys. Acta* **1956**, 19, 578–579; 'Prodigiosin synthesis in *Serratia marcescens*: isolation of a pyrrole-containing precursor'.
- [30] H. H. Wasserman, J. E. McKeon, L. Smith, P. Forgione, *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, 82, 506–507; 'Prodigiosin. Structure and Partial Synthesis'.
- [31] H. Rapoport, K. G. Holden, *J. Am. Chem. Soc.* **1962**, 84, 635–642; 'The synthesis of prodigiosin'.
- [32] H. Rapoport, K. G. Holden, *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, 82, 5510–5511; 'The synthesis of Prodigiosin'.
- [33] H. Rapoport, C. D. Willson, *J. Am. Chem. Soc.* **1962**, 84, 630–635; 'The Preparation and Properties of Some Methoxypyrroles'.
- [34] 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*'.
- [35] N. N. Gerber, *Appl. Microbiol.* **1969**, 18, 1–3; 'Prodigiosin-Like Pigments from *Actinomadura* (*Nocardia*) *pelletieri* and *Actinomadura madurae*'.
- [36] N. N. Gerber, *Crit. Rev. Microbiol.* **1975**, 3, 469–485; 'Prodigiosin-Like Pigments'.
- [37] 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'.
- [38] 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'.
- [39] K. Harashima, N. Tsuchida, T. Tanaka, J. Nagatsu, *Agric. Biol. Chem.* **1967**, 31, 481–489; 'Prodigiosin-25 C: isolation and the chemical structure'.
- [40] H. H. Wasserman, G. C. Rodgers, D. D. Keith, *Chemical Communications (London)* **1966**, 825–826; 'The structure and synthesis of undecylprodigiosin. A prodigiosin analogue from *Streptomyces*'.
- [41] 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*'.
- [42] H. H. Wasserman, C. K. Shaw, R. J. Sykes, R. J. Cushley, *Tetrahedron Lett.* **1974**, 15, 2787–2790; 'The biosynthesis of metacycloprodigiosin and undecylprodigiosin'.
- [43] N. N. Gerber, *J. Antibiot.* **1975**, 28, 194–199; 'New Prodiginine (Prodigiosin-Like) Pigment from *Streptomyces* - Antimalarial Activity of Several Prodiginines'.
- [44] S. Mo, P. K. Sydor, C. Corre, M. M. Alhamadsheh, A. E. Stanley, Stuart W. Haynes, L. Song, K. A. Reynolds, G. L. Challis, *Chem. Biol.* **2008**, 15, 137–148; 'Elucidation of the *Streptomyces*



- coelicolor* Pathway to 2-Undecylpyrrole, a Key Intermediate in Undecylprodiginine and Streptorubin B Biosynthesis'.
- [45] 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'.
- [46] T. Kawasaki, F. Sakurai, Y. Hayakawa, *J. Nat. Prod.* **2008**, *71*, 1265–1267; 'A prodigiosin from the roseophilin producer *Streptomyces griseoviridis*'.
- [47] Y. Hayakawa, K. Kawakami, H. Seto, K. Furihata, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 2701–2704; 'Structure of a New Antibiotic, Roseophilin'.
- [48] N. N. Gerber, *Tetrahedron Lett.* **1983**, *24*, 2797–2798; 'Cycloprodigiosin from *Beneckeia Gazogenes*'.
- [49] H. Laatsch, R. H. Thomson, *Tetrahedron Lett.* **1983**, *24*, 2701–2704; 'A Revised Structure for Cycloprodigiosin'.
- [50] N. N. Gerber, *Tetrahedron Lett.* **1970**, 809–812; 'A novel, cyclic, tripyrrole pigment from *Actinomadura (nocardia) madurae*'.
- [51] N. N. Gerber, *J. Antibiot.* **1971**, *24*, 636–640; 'Prodigiosin-like pigments from *Actinomadura (Nocardia) pelletieri*'.
- [52] N. N. Gerber, *J. Heterocycl. Chem.* **1973**, *10*, 925–929; 'Minor prodiginine pigments from *Actinomadura madurae* and *Actinomadura pelletieri*'.
- [53] Y. Hayakawa, S. Nagatsuka, T. Kawasaki, *J. Antibiot.* **2009**, *62*, 531–532; 'Dechlororoseophilin: a new cytotoxic metabolite from *Streptomyces griseoviridis*'.
- [54] C. Boonlarpadab, 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'.
- [55] H. Slater, M. Crow, L. Everson, G. P. Salmond, *Mol. Microbiol.* **2003**, *47*, 303–320; 'Phosphate availability regulates biosynthesis of two antibiotics, prodigiosin and carbapenem, in *Serratia* via both quorum-sensing-dependent and-independent pathways'.
- [56] R. Hubbard, C. Rimington, *Biochem. J.* **1950**, *46*, 220–225; 'The biosynthesis of prodigiosin, the tripyrrylmethene pigment from *Bacillus prodigiosus (Serratia marcescens)*'.
- [57] G. Berg, *J. Appl. Microbiol.* **2000**, *88*, 952–960; 'Diversity of antifungal and plant-associated *Serratia plymuthica* strains'.
- [58] 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'.
- [59] 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'.
- [60] N. Gandhi, J. Nazareth, P. Divekar, H. Kohl, N. De Souza, *J. Antibiot.* **1973**, *26*, 797–798; 'Magnesidin, a novel magnesium-containing antibiotic'.
- [61] J. D'Aoust, N. N. Gerber, *J. Bacteriol.* **1974**, *118*, 756–757; 'Isolation and purification of prodigiosin from *Vibrio psychroerythrus*'.
- [62] N. N. Gerber, D. P. Stahly, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1975**, *30*, 807–810; 'Prodiginine (Prodigiosin-Like) Pigments from *Streptoverticillium rubrireticuli*, an Organism That Causes Pink Staining of Polyvinyl Chloride'.
- [63] 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'.
- [64] 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'.
- [65] P. K. Sydor, PhD Thesis, 'Elucidation of the Prodiginine Biosynthetic Pathway in *Streptomyces coelicolor* A3(2)', University of Warwick (Warwick), **2010**.
- [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] T. Kawasaki, F. Sakurai, S. Nagatsuka, Y. Hayakawa, *J. Antibiot.* **2009**, *62*, 271–276; 'Prodigiosin biosynthesis gene cluster in the roseophilin producer *Streptomyces griseoviridis*'.
- [69] F. E. Sakai-Kawada, C. G. Ip, K. A. Hagiwara, J. D. Awaya, *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 1715; 'Biosynthesis and Bioactivity of Prodiginine Analogs in Marine Bacteria, *Pseudoalteromonas*: A Mini Review'.
- [70] N. Stankovic, L. Senerovic, T. Ilic-Tomic, B. Vasiljevic, J. Nikodinovic-Runic, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2014**, *98*, 3841–3858; 'Properties and applications of undecylprodigiosin and other bacterial prodigiosins'.
- [71] E. Marchal, M. I. Uddin, D. A. Smithen, C. L. A. Hawco, M. Lantaigne, D. P. Overy, R. G. Kerr, A. Thompson, *RSC Adv.* **2013**, *3*, 22967–22971; 'Antimicrobial activity of non-natural prodigiosenes'.
- [72] 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'.
- [73] A. Samrot, K. Chandana, P. Senthikumar, 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'.
- [74] 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*'.
- [75] 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'.
- [76] T. Danevčič, M. Boric Vezjak, M. Tabor, M. Zorec, D. Stopar, *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, 27; 'Prodigiosin Induces Autolysins in Actively Grown *Bacillus subtilis* Cells'.
- [77] T. Danevčič, M. Boric Vezjak, M. Zorec, D. Stopar, *PLoS One* **2016**, *11*, e0162412; 'Prodigiosin - A Multifaceted *Escherichia coli* Antimicrobial Agent'.
- [78] Z. Y. You, S. P. Zhang, X. X. Liu, J. Zhang, Y. J. Wang, Y. J. Peng, W. J. Wu, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2019**, *103*, 2873–2887; 'Insights into the anti-infective properties of prodiginines'.
- [79] A. J. Castro, G. R. Gale, G. E. Means, G. Tertzakian, *J. Med. Chem.* **1967**, *10*, 29–32; 'Antimicrobial properties of pyrrole derivatives'.
- [80] 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'.
- [81] 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**, *13*, e0200940; 'Natural biocide cocktails: Combinatorial antibiotic effects of prodigiosin and biosurfactants'.
- [82] 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'.
- [83] J. Regourd, A. A. S. Ali, A. Thompson, *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 1528–1536; 'Synthesis and anti-cancer activity of C-ring-functionalized prodigiosin analogues'.
- [84] R. Manderville, *Curr. Med. Chem.: Anti-Cancer Agents* **2001**, *1*, 195–218; 'Synthesis, proton-affinity and anti-cancer properties of the prodigiosin-group natural products'.

- [85] 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'.
- [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. Díaz, J. Regourd, P. V. Santacroce, 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, W. Dehaen, *Anion recognition in supramolecular chemistry*, Vol. 24, Springer Science & Business Media, **2010**.
- [89] M. S. Melvin, M. W. Calcutt, R. E. Nofle, 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, 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-methoxypyrrolic natural products'.
- [91] 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'.
- [92] 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'-bipyrrrole coupling procedure'.
- [93] S. Cheung, D. Wu, H. C. Daly, N. Busschaert, M. Morgunova, J. C. Simpson, D. Scholz, P. A. Gale, D. F. O'Shea, *Chem* **2018**, *4*, 879–895; 'Real-time recording of the cellular effects of the anion transporter prodigiosin'.
- [94] P. A. Gale, E. N. W. Howe, X. Wu, *Chem* **2016**, *1*, 351–422; 'Anion Receptor Chemistry'.
- [95] T. Sato, H. Konno, Y. Tanaka, T. Kataoka, K. Nagai, H. H. Wasserman, S. Ohkuma, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 21455–21462; 'Prodigiosins as a new group of H<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> symporters that uncouple proton translocators'.
- [96] S. Ohkuma, T. Sato, M. Okamoto, H. Matsuya, K. Arai, T. Kataoka, K. Nagai, H. H. Wasserman, *Biochem. J.* **1998**, *334*, 731–741; 'Prodigiosins uncouple lysosomal vacuolar-type ATPase through promotion of H<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> symport'.
- [97] T. Nakashima, T. Tamura, M. Kurachi, K. Yamaguchi, T. Oda, *Biol. Pharm. Bull.* **2005**, *28*, 2289–2295; 'Apoptosis-mediated cytotoxicity of prodigiosin-like red pigment produced by gamma-proteobacterium and its multiple bioactivities'.
- [98] H. Konno, H. Matsuya, M. Okamoto, T. Sato, Y. Tanaka, K. Yokoyama, T. Kataoka, K. Nagai, H. H. Wasserman, S. Ohkuma, *Journal of Biochemistry* **1998**, *124*, 547–556; 'Prodigiosins uncouple mitochondrial and bacterial F-ATPases: Evidence for their H<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> symport activity'.
- [99] J. L. Seganish, J. T. Davis, *Chem. Commun.* **2005**, 5781–5783; 'Prodigiosin is a chloride carrier that can function as an anion exchanger'.
- [100] 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<sup>+</sup>-ATPase, inhibits vacuolar acidification and affects glycoprotein processing'.
- [101] H. Matsuya, M. Okamoto, T. Ochi, A. Nishikawa, S. Shimizu, T. Kataoka, K. Nagai, H. H. Wasserman, S. Ohkuma, *Biochem. Pharmacol.* **2000**, *60*, 1855–1863; 'Reversible and potent uncoupling of hog gastric (H<sup>+</sup>+K<sup>+</sup>)-ATPase by prodigiosins'.
- [102] 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<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> symporter, induces apoptosis in human breast cancer cell lines'.
- [103] W. Castillo-Ávila, M. Abal, S. Robine, R. Pérez-Tomás, *Life Sci.* **2005**, *78*, 121–127; 'Non-apoptotic concentrations of prodigiosin (H<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> symporter) inhibit the acidification of lysosomes and induce cell cycle blockage in colon cancer cells'.

- [104] 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'.
- [105] 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'.
- [106] R. Pérez-Tomas, B. Montaner, R. Llagostera, V. Soto-Cerrato, *Biochem. Pharmacol.* **2003**, *66*, 1447–1452; 'The prodigiosins, proapoptotic drugs with anticancer properties'.
- [107] A. M. Kaufmann, J. P. Krise, *J. Pharm. Sci.* **2007**, *96*, 729–746; 'Lysosomal Sequestration of Amine-Containing Drugs: Analysis and Therapeutic Implications'.
- [108] C. A. Lamb, T. Yoshimori, S. A. Tooze, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2013**, *14*, 759–774; 'The autophagosome: origins unknown, biogenesis complex'.
- [109] C. A. Lamb, H. C. Dooley, S. A. Tooze, *BioEssays* **2013**, *35*, 34–45; 'Endocytosis and autophagy: Shared machinery for degradation'.
- [110] Z. F. Yang, D. J. Klionsky, *Nat. Cell Biol.* **2010**, *12*, 814–822; 'Eaten alive: a history of macroautophagy'.
- [111] D. C. Rubinsztein, P. Codogno, B. Levine, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2012**, *11*, 709–730; 'Autophagy modulation as a potential therapeutic target for diverse diseases'.
- [112] M. Pérez-Hernández, A. Arias, D. Martínez-García, R. Pérez-Tomás, R. Quesada, V. Soto-Cerrato, *Cancers* **2019**, *11*, 1599; 'Targeting Autophagy for Cancer Treatment and Tumor Chemosensitization'.
- [113] J. M. M. Levy, C. G. Towers, A. Thorburn, *Nat. Rev. Cancer* **2017**, *17*, 528–542; 'Targeting autophagy in cancer'.
- [114] 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 Obatoclax Accumulates in Lysosomes and Causes Their Alkalinization'.
- [115] 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 Obatoclax Mesylate in Patients with Advanced Hematologic Malignancies'.
- [116] 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 obatoclax mesylate administered as a 3- or 24-hour infusion in older patients with previously untreated acute myeloid leukemia'.
- [117] 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 Obatoclax Mesylate in Patients With Previously Untreated Myelodysplastic Syndromes With Anemia or Thrombocytopenia'.
- [118] Y. Oki, A. Copeland, F. Hagemeister, L. E. Fayad, M. Fanale, J. Romaguera, A. Younes, *Blood* **2012**, *119*, 2171–2172; 'Experience with obatoclax mesylate (GX15-070), a small molecule pan-Bcl-2 family antagonist in patients with relapsed or refractory classical Hodgkin lymphoma'.
- [119] 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 obatoclax mesylate in extensive-stage small cell lung cancer'.
- [120] 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'.
- [121] 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'.

- [122] 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'.
- [123] 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- $\kappa$ B and AP-1 Activation'.
- [124] S. M. Stepkowski, R. A. Erwin-Cohen, F. Behbod, M. E. Wang, X. Qu, N. Tejpal, Z. S. Nagy, B. D. Kahan, R. A. Kirken, *Blood* **2002**, *99*, 680–689; 'Selective inhibitor of Janus tyrosine kinase 3, PNU156804, prolongs allograft survival and acts synergistically with cyclosporine but additively with rapamycin'.
- [125] S. M. Stepkowski, Z. S. Nagy, M. E. Wang, F. Behbod, R. Erwin-Cohen, B. D. Kahan, R. A. Kirken, *Transplant. Proc.* **2001**, *33*, 3272–3273; 'PNU156804 inhibits Jak3 tyrosine kinase and rat heart allograft rejection'.
- [126] 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'.
- [127] P. Kancharla, J. X. Kelly, K. A. Reynolds, *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 7286–7309; 'Synthesis and Structure-Activity Relationships of Tambjamines and B-Ring Functionalized Prodiginines as Potent Antimalarials'.
- [128] 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'.
- [129] A. J. Castro, *Nature* **1967**, *213*, 903–904; 'Antimalarial Activity of Prodigiosin'.
- [130] 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'.
- [131] H. S. Kim, M. Hayashi, Y. Shibata, Y. Wataya, T. Mitamura, T. Horii, K. Kawauchi, H. Hirata, S. Tsuboi, Y. Moriyama, *Biol. Pharm. Bull.* **1999**, *22*, 532–534; 'Cycloprodigiosin hydrochloride obtained from *Pseudoalteromonas denitrificans* is a potent antimalarial agent'.
- [132] M. A. Phillips, J. N. Burrows, C. Manyando, R. H. van Huijsduijnen, W. C. Van Voorhis, T. N. C. Wells, *Nat Rev Dis Primers* **2017**, *3*; 'Malaria'.
- [133] G. R. Froemming, K. Ohlendieck, *Bba-Protein Struct M* **1998**, *1387*, 226–238; 'Oligomerisation of Ca<sup>2+</sup>-regulatory membrane components involved in the excitation-contraction-relaxation cycle during postnatal development of rabbit skeletal muscle'.
- [134] L. N. Aldrich, S. L. Stoops, B. C. Crews, L. J. Marnett, C. W. Lindsley, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 5207–5211; 'Total synthesis and biological evaluation of tambjamine K and a library of unnatural analogs'.
- [135] 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*'.
- [136] A. Franks, P. Haywood, C. Holmström, S. Egan, S. Kjelleberg, N. Kumar, *Molecules* **2005**, *10*, 1286–1291; 'Isolation and structure elucidation of a novel yellow pigment from the marine bacterium *Pseudoalteromonas tunicata*'.
- [137] K. Picott, J. Deichert, G. Schatte, A. Ross, *MedChemComm* **2019**, *10*, 478–483; 'Isolation and characterization of tambjamine MYP1, a macrocyclic tambjamine analogue from marine bacterium *Pseudoalteromonas citrea*'.
- [138] V. Agarwal, A. A. El Gamal, K. Yamanaka, D. Poth, R. D. Kersten, M. Schorn, E. E. Allen, B. S. Moore, *Nat. Chem. Biol.* **2014**, *10*, 640–U182; 'Biosynthesis of polybrominated aromatic organic compounds by marine bacteria'.
- [139] J.-M. Kornprobst, *Encyclopedia of marine natural products*, John Wiley & Sons, **2014**.
- [140] B. Carté, D. J. Faulkner, *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 2314–2318; 'Defensive Metabolites from 3 Nembrothid Nudibranchs'.



- [141] M. Carbone, C. Irace, F. Costagliola, F. Castelluccio, G. Villani, G. Calado, V. Padula, G. Cimino, J. L. Cervera, R. Santamaria, M. Gavagnin, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 2668–2670; 'A new cytotoxic tambjamine alkaloid from the Azorean nudibranch *Tambja ceutae*'.
- [142] N. Lindquist, W. Fenical, *Experientia* **1991**, *47*, 504–506; 'New Tambjamine Class Alkaloids from the Marine Ascidian *Atapozoa* sp. and Its Nudibranch Predators – Origin of the Tambjamines in *Atapozoa*'.
- [143] A. J. Blackman, C. Li, *Aust. J. Chem.* **1994**, *47*, 1625–1629; 'New tambjamine alkaloids from the marine bryozoan *Bugula dentata*'.
- [144] M. J. Gauthier, *Int. J. Syst. Bacteriol.* **1977**, *27*, 349–354; '*Alteromonas citrea*, a New Gram-Negative, Yellow-Pigmented Species from Seawater'.
- [145] C. Holmström, S. Egan, A. Franks, S. McCloy, S. Kjelleberg, *FEMS Microbiol. Ecol.* **2002**, *41*, 47–58; 'Antifouling activities expressed by marine surface associated *Pseudoalteromonas* species'.
- [146] S. Nakajima, K. Kojiri, H. Suda, *J. Antibiot.* **1993**, *46*, 1894–1896; 'A New Antitumor Substance, BE-18591, Produced by a *Streptomyces* II. Structure Determination'.
- [147] K. Kojiri, S. Nakajima, H. Suzuki, A. Okura, H. Suda, *J. Antibiot.* **1993**, *46*, 1799–1803; 'A New Antitumor Substance, BE-18591, Produced by a *Streptomyces* .I. Fermentation, Isolation, Physicochemical and Biological Properties'.
- [148] S. Egan, S. James, C. Holmström, S. Kjelleberg, *Environ. Microbiol.* **2002**, *4*, 433–442; 'Correlation between pigmentation and antifouling compounds produced by *Pseudoalteromonas tunicata*'.
- [149] C. Holmström, S. Kjelleberg, *FEMS Microbiol. Ecol.* **1999**, *30*, 285–293; 'Marine *Pseudoalteromonas* species are associated with higher organisms and produce biologically active extracellular agents'.
- [150] P. D. Steinberg, R. De Nys, S. Kjelleberg, *J. Chem. Ecol.* **2002**, *28*, 1935–1951; 'Chemical cues for surface colonization'.
- [151] B. Carté, D. J. Faulkner, *J. Chem. Ecol.* **1986**, *12*, 795–804; 'Role of Secondary Metabolites in Feeding Associations between a Predatory Nudibranch, 2 Grazing Nudibranchs, and a Bryozoan'.
- [152] F. Ballestrero, J. Nappi, G. Zampi, P. Bazzicalupo, E. Di Schiavi, S. Egan, *Scientific Reports* **2016**, *6*, 1–8; '*Caenorhabditis elegans* employs innate and learned aversion in response to bacterial toxic metabolites tambjamine and violacein'.
- [153] D. M. Pinkerton, M. G. Banwell, M. J. Garson, N. Kumar, M. O. de Moraes, B. C. Cavalcanti, F. W. A. Barros, C. Pessoa, *Chem. Biodiversity* **2010**, *7*, 1311–1324; 'Antimicrobial and Cytotoxic Activities of Synthetically Derived Tambjamines C and E-J, BE-18591, and a Related Alkaloid from the Marine Bacterium *Pseudoalteromonas tunicata*'.
- [154] A. M. Rodilla, L. Korrodi-Gregório, E. Hernando, P. Manuel-Manresa, R. Quesada, R. Pérez-Tomás, V. Soto-Cerrato, *Biochem. Pharmacol.* **2017**, *126*, 23–33; 'Synthetic tambjamine analogues induce mitochondrial swelling and lysosomal dysfunction leading to autophagy blockade and necrotic cell death in lung cancer'.
- [155] D. M. Pinkerton, PhD Thesis, 'Total synthesis of the tambjamine alkaloids and certain epoxyquinol-type natural products', The Australian National University (Canberra), **2010**.
- [156] L. N. Aldrich, PhD Thesis, '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**.
- [157] P. I. Hernández, D. Moreno, A. A. Javier, T. Torroba, R. Pérez-Tomás, R. Quesada, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 1556–1558; 'Tambjamine alkaloids and related synthetic analogs: efficient transmembrane anion transporters'.
- [158] E. Hernando, V. Soto-Cerrato, S. Cortés-Arroyo, R. Pérez-Tomás, R. Quesada, *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 1771–1778; 'Transmembrane anion transport and cytotoxicity of synthetic tambjamine analogs'.

- [159] M. Kotev, P. Manuel-Manresa, E. Hernando, V. Soto-Cerrato, M. Orozco, R. Quesada, R. Pérez-Tomás, V. Guallar, *J. Chem. Inf. Model.* **2017**, *57*, 2089–2098; 'Inhibition of Human Enhancer of Zeste Homolog 2 with Tambjamine Analogs'.
- [160] P. Manuel-Manresa, L. Korrodi-Gregório, E. Hernando, A. Villanueva, D. Martínez-García, A. Rodilla, R. Ramos, M. Fardilha, J. Moya, R. Quesada, V. Soto-Cerrato, R. Pérez-Tomás, *Molecular Cancer Therapeutics* **2017**, *16*, 1224–1235; 'Novel Indole-based Tambjamine-Analogues Induce Apoptotic Lung Cancer Cell Death through p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Activation'.
- [161] K. Tanigaki, T. Sato, Y. Tanaka, T. Ochi, A. Nishikawa, K. Nagai, H. Kawashima, S. Ohkuma, *FEBS Lett.* **2002**, *524*, 37–42; 'BE-18591 as a new H<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> symport ionophore that inhibits immunoproliferation and gastritis'.
- [162] V. Soto-Cerrato, P. Manuel-Manresa, E. Hernando, S. Calabuig-Fariñas, A. Martínez-Romero, V. Fernández-Dueñas, K. Sahlholm, T. Knöpfel, M. García-Valverde, A. M. Rodilla, E. Jantus-Lewintre, R. Farràs, F. Ciruela, R. Pérez-Tomás, R. Quesada, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 15892–15898; 'Facilitated Anion Transport Induces Hyperpolarization of the Cell Membrane That Triggers Differentiation and Cell Death in Cancer Stem Cells'.
- [163] S. Borah, M. S. Melvin, N. Lindquist, R. A. Manderville, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 4557–4562; 'Copper-mediated nuclease activity of a tambjamine alkaloid'.
- [164] M. Redenbach, H. M. Kieser, D. Denapaite, A. Eichner, J. Cullum, H. Kinashi, D. Hopwood, *Mol. Microbiol.* **1996**, *21*, 77–96; 'A set of ordered cosmids and a detailed genetic and physical map for the 8 Mb *Streptomyces coelicolor* A3 (2) chromosome'.
- [165] S. D. Bentley, K. F. Chater, A. M. Cerdono-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. Rabinowitsch, 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)'.
- [166] N.-H. Hsiao, R. Kirby, *Antonie van Leeuwenhoek* **2008**, *93*, 1–25; 'Comparative genomics of *Streptomyces avermitilis*, *Streptomyces cattleya*, *Streptomyces maritimus* and *Kitasatospora aureofaciens* using a *Streptomyces coelicolor* microarray system'.
- [167] A. M. Cerdeño, M. J. Bibb, G. L. Challis, *Chem. Biol.* **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'.
- [168] 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'.
- [169] 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'-bipyrrrole-5-carboxaldehyde, an intermediate in prodiginine biosynthesis'.
- [170] W.-C. Chung, L.-L. Chen, W.-S. Lo, P.-A. Kuo, J. Tu, C.-H. Kuo, *Genome Announc.* **2013**, *1*, e0012613–e0012613; 'Complete Genome Sequence of *Serratia marcescens* WW4'.
- [171] P.-A. Kuo, C.-H. Kuo, Y.-K. Lai, P. L. Graumann, J. Tu, *FEMS Microbiol. Ecol.* **2013**, *84*, 577–587; 'Phosphate limitation induces the intergeneric inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* by *Serratia marcescens* isolated from paper machines'.
- [172] 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'.
- [173] H. Jeong, J. H. Yim, C. Lee, S. H. Choi, Y. K. Park, S. H. Yoon, C. G. Hur, H. Y. Kang, D. Kim, H. H. Lee, K. H. Park, S. H. Park, H. S. Park, H. K. Lee, T. K. Oh, J. F. Kim, *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, 7066–7073; 'Genomic blueprint of *Hahella chejuensis*, a marine microbe producing an algicidal agent'.

- [174] W. Song, T. Thomas, R. Edwards, *Marine Genomics* **2019**, *48*, 100687; 'Complete genome sequences of pooled genomic DNA from 10 marine bacteria using PacBio sequencing'.
- [175] B.-B. Xie, Y.-L. Shu, Q.-L. Qin, J.-C. Rong, X.-Y. Zhang, X.-L. Chen, M. Shi, H.-L. He, B.-C. Zhou, Y.-Z. Zhang, *J. Bacteriol.* **2012**, *194*, 2746–2747; 'Genome sequences of type strains of seven species of the marine bacterium *Pseudoalteromonas*'.
- [176] K. J. Picott, J. A. Deichert, E. M. deKemp, V. Snieckus, A. C. Ross, *ChemBioChem* **2019**, *21*, 1036–1042; 'Purification and kinetic characterization of the essential condensation enzymes involved in prodiginine and tambjamine biosynthesis'.
- [177] H. U. C. Brass, A. S. Klein, S. Nyholt, T. Classen, J. Pietruszka, *Adv. Synth. Catal.* **2019**, *361*, 2659–2667; 'Condensing Enzymes from *Pseudoalteromonadaceae* for Prodiginine Synthesis'.
- [178] W. Turner, *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine* **1940**, *26*, 323–330; 'A theory of porphyrinogenesis'.
- [179] G. S. Marks, L. Bogorad, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1960**, *46*, 25–28; 'Studies on the biosynthesis of prodigiosin in *Serratia marcescens*'.
- [180] 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'.
- [181] M. L. Murat-Onana, C. Berini, F. Minassian, N. Pelloux-Leon, J. N. Denis, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 2204–2211; 'An efficient method for the synthesis of unsymmetrical 2,2'-bis(pyrrolyl)alkanes'.
- [182] B. A. Rudd, D. A. Hopwood, *Microbiology* **1980**, *119*, 333–340; 'A pigmented mycelial antibiotic in *Streptomyces coelicolor*: control by a chromosomal gene cluster'.
- [183] C. Dresen, M. Richter, M. Pohl, S. Ludeke, M. Muller, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2010**, *49*, 6600–6603; 'The Enzymatic Asymmetric Conjugate Umpolung Reaction'.
- [184] P. M. Marchetti, V. Kelly, J. P. Simpson, M. Ward, D. J. Campopiano, *Org. Biomol. Chem.* **2018**, *16*, 2735–2740; 'The carbon chain-selective adenylation enzyme TamA: the missing link between fatty acid and pyrrole natural product biosynthesis'.
- [185] C.-C. Chang, W.-C. Chen, T.-F. Ho, H.-S. Wu, Y.-H. Wei, *J. Biosci. Bioeng.* **2011**, *111*, 501–511; 'Development of natural anti-tumor drugs by microorganisms'.
- [186] Q. Long, D. E. Jeffries, S. Lin, X. Chen, W. He, Y. Wang, Z. Deng, C. W. Lindsley, M. Tao, *Appl. Environ. Microbiol.* **2020**, *86*, e02331-02319; 'RedH and PigC Catalyze the Biosynthesis of Hybrubins via Phosphorylation of 4'-Methoxy-2, 2'-Bipyrrole-5'-Carbaldehyde'.
- [187] S. M. Barry, G. L. Challis, *ACS Catal.* **2013**, *3*, 2362–2370; 'Mechanism and Catalytic Diversity of Rieske Non-Heme Iron-Dependent Oxygenases'.
- [188] C. Perry, E. L. C. de los Santos, L. M. Alkhalaf, G. L. Challis, *Nat. Prod. Rep.* **2018**, *35*, 622–632; 'Rieske non-heme iron-dependent oxygenases catalyse diverse reactions in natural product biosynthesis'.
- [189] 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'.
- [190] D. M. Withall, PhD Thesis, 'Mechanistic investigation of the RedG-catalysed oxidative carbocyclisation of undecylprodigiosin to streptorubin B', University of Warwick (Warwick), **2014**.
- [191] 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'.
- [192] L. Jeske, S. Placzek, I. Schomburg, A. Chang, D. Schomburg, *Nucleic Acids Res.* **2019**, *47*, D542–D549; 'BRENDA in 2019: a European ELIXIR core data resource'.
- [193] Z. Y. You, X. X. Liu, S. P. Zhang, Y. J. Wang, *Biochem. Eng. J.* **2018**, *134*, 1–11; 'Characterization of a prodigiosin synthetase PigC from *Serratia marcescens* jx-1 and its application in prodigiosin analogue synthesis'.

- [194] J. S. Papadopoulos, R. Agarwala, *Bioinformatics* **2007**, *23*, 1073–1079; 'COBALT: constraint-based alignment tool for multiple protein sequences'.
- [195] S. F. Altschul, W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, D. J. Lipman, *J. Mol. Biol.* **1990**, *215*, 403–410; 'Basic local alignment search tool'.
- [196] N. R. Coordinators, *Nucleic Acids Res.* **2017**, *45*, D12; 'Database resources of the national center for biotechnology information'.
- [197] 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*'.
- [198] S. Mo, B. S. Kim, K. A. Reynolds, *Chem. Biol.* **2005**, *12*, 191–200; 'Production of Branched-Chain Alkylprodiginines in *S. coelicolor* by Replacement of the 3-Ketoacyl ACP Synthase III Initiation Enzyme, RedP'.
- [199] S. M. Salem, P. Kancharla, G. Florova, S. Gupta, W. L. Lu, K. A. Reynolds, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 4565–4574; 'Elucidation of Final Steps of the Marineosins Biosynthetic Pathway through Identification and Characterization of the Corresponding Gene Cluster'.
- [200] W. Lu, P. Kancharla, K. A. Reynolds, *Org. Lett.* **2017**, *19*, 1298–1301; 'MarH, a Bifunctional Enzyme Involved in the Condensation and Hydroxylation Steps of the Marineosin Biosynthetic Pathway'.
- [201] K. J. Picott, J. A. Deichert, E. M. deKemp, A. Ross, *ChemRxiv* **2019**, doi.org/10.26434/chemrxiv.8001410.v1; 'In vitro reconstitution and kinetic characterization of the essential condensation enzymes involved in prodiginine and tambjamine biosynthesis'.
- [202] T. Classen, J. Pietruszka, *Bioorg. Med. Chem.* **2018**, *26*, 1285–1303; 'Complex molecules, clever solutions – Enzymatic approaches towards natural product and active agent syntheses'.
- [203] D. L. Boger, M. Patel, *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 2499–2502; 'Total Synthesis of Prodigiosin'.
- [204] H. H. Wasserman, L. J. Lombardo, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 1725–1728; 'The chemistry of vicinal tricarbonyls a total synthesis of prodiginine'.
- [205] 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 prodiginine in *Pseudomonas putida*'.
- [206] 'Bekanntmachung der Liste risikobewerteter Spender- und Empfängerorganismen für gentechnische Arbeiten', Seitenaufruf: 24. März 2020, Zentrale Kommission für die Biologische Sicherheit (ZKBS), [http://www.zkbs-online.de/ZKBS/SharedDocs/Downloads/Organismenliste.html?jsessionid=B1CA2ACF9B6E0FA5D5A5D1FE9A28FEA0.1\\_cid332?nn=8952582](http://www.zkbs-online.de/ZKBS/SharedDocs/Downloads/Organismenliste.html?jsessionid=B1CA2ACF9B6E0FA5D5A5D1FE9A28FEA0.1_cid332?nn=8952582), **05.07.2013**.
- [207] W. C. Chen, W. J. Yu, C. C. Chang, J. S. Chang, S. H. Huang, C. H. Chang, S. Y. Chen, C. C. Chien, C. L. Yao, W. M. Chen, Y. H. Wei, *Biochem. Eng. J.* **2013**, *78*, 93–100; 'Enhancing production of prodiginine from *Serratia marcescens* C3 by statistical experimental design and porous carrier addition strategy'.
- [208] W. T. Su, T. Y. Tsou, H. L. Liu, *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* **2011**, *42*, 217–222; 'Response surface optimization of microbial prodiginine production from *Serratia marcescens*'.
- [209] H. W. Casullo de Araújo, K. Fukushima, G. M. C. Takaki, *Molecules* **2010**, *15*, 6931–6940; 'Prodiginine production by *Serratia marcescens* UCP 1549 using renewable-resources as a low cost substrate'.
- [210] L. F. C. Kampers, R. J. M. Volkers, V. A. P. M. dos Santos, *Microb. Biotechnol.* **2019**, *12*, 845–848; '*Pseudomonas putida* KT2440 is HV1 certified, not GRAS'.
- [211] A. Loeschcke, S. Thies, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2015**, *99*, 6197–6214; '*Pseudomonas putida* – a versatile host for the production of natural products'.
- [212] A. Domröse, Inaugural-Dissertation, 'Anwendung und Optimierung des TREX-Systems zur effektiven heterologen Sekundärmetabolit-Produktion in *Pseudomonas putida*', Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (Düsseldorf), **2017**.



- [213] A. Loeschcke, Inaugural-Dissertation, 'Funktionelle Koexpression geclusterter Gene in verschiedenen Bakterien mithilfe des TREX-Systems', Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (Düsseldorf), **2012**.
- [214] 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'.
- [215] A. Domröse, J. Hage-Hülsmann, S. Thies, R. Weihmann, L. Kruse, M. Otto, N. Wierckx, K. E. Jaeger, T. Drepper, A. Loeschcke, *Scientific Reports* **2019**, *9*, 1–13; '*Pseudomonas putida* rDNA is a favored site for the expression of biosynthetic genes'.
- [216] E. Belda, R. G. A. van Heck, M. J. Lopez-Sanchez, S. Cruveiller, V. Barbe, C. Fraser, H. P. Klenk, J. Petersen, A. Morgat, P. I. Nikel, D. Vallenet, Z. Rouy, A. Sekowska, V. A. P. M. dos Santos, V. de Lorenzo, A. Danchin, C. Médigue, *Environ. Microbiol.* **2016**, *18*, 3403–3424; 'The revisited genome of *Pseudomonas putida* KT2440 enlightens its value as a robust metabolic chassis'.
- [217] K. E. Nelson, C. Weinell, I. T. Paulsen, R. J. Dodson, H. Hilbert, V. A. P. M. d. Santos, D. E. Fouts, S. R. Gill, M. Pop, M. Holmes, L. Brinkac, M. Beanan, R. T. DeBoy, S. Daugherty, J. Kolonay, R. Madupu, W. Nelson, O. White, J. Peterson, H. Khouri, I. Hance, P. C. Lee, E. Holtzapple, D. Scanlan, K. Tran, A. Moazzez, T. Utterback, M. Rizzo, K. Lee, D. Kosack, D. Moestl, H. Wedler, J. Lauber, D. Stjepandic, J. Hoheisel, M. Straetz, S. Heim, C. Kiewitz, J. Eisen, K. N. Timmis, A. Düsterhöft, B. Tümmler, C. M. Fraser, *Environ. Microbiol.* **2002**, *4*, 799–808; 'Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440'.
- [218] 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'.
- [219] J. Kennedy, *Nat. Prod. Rep.* **2008**, *25*, 25–34; 'Mutasyntesis, chemobiosynthesis, and back to semi-synthesis: combining synthetic chemistry and biosynthetic engineering for diversifying natural products'.
- [220] F. Taft, M. Brünjes, H. G. Floss, N. Czempinski, S. Grond, F. Sasse, A. Kirschning, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 1057–1060; 'Highly active ansamitocin derivatives: mutasyntesis using an AHBA-blocked mutant'.
- [221] S. Eichner, T. Knobloch, H. G. Floss, J. Fohrer, K. Harmrolfs, J. Hermene, A. Schulz, F. Sasse, P. Spiteller, F. Taft, A. Kirschning, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2012**, *51*, 752–757; 'The Interplay between Mutasyntesis and Semisynthesis: Generation and Evaluation of an Ansamitocin Library'.
- [222] K. L. Rinehart, *Pure and Applied Chemistry* **1977**, *49*, 1361–1384; 'Mutasyntesis of new antibiotics'.
- [223] S. Weist, R. D. Süßmuth, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2005**, *68*, 141–150; 'Mutational biosynthesis – a tool for the generation of structural diversity in the biosynthesis of antibiotics'.
- [224] O. Bilyk, A. Luzhetskyy, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2016**, *42*, 98–107; 'Metabolic engineering of natural product biosynthesis in actinobacteria'.
- [225] K. J. Weissman, *Trends Biotechnol.* **2007**, *25*, 139–142; 'Mutasyntesis – uniting chemistry and genetics for drug discovery'.
- [226] S. Eichner, H. G. Floss, F. Sasse, A. Kirschning, *ChemBioChem* **2009**, *10*, 1801–1805; 'New, Highly Active Nonbenzoquinone Geldanamycin Derivatives by Using Mutasyntesis'.
- [227] 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'.
- [228] 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'.
- [229] L. B. Dong, J. D. Rudolf, B. Shen, *Org. Lett.* **2016**, *18*, 4606–4909; 'A Mutasyntetic Library of Platensimycin and Platencin Analogues'.

- [230] J. Hermene, S. Eichner, L. Mancuso, B. Schröder, F. Sasse, C. Zeilinger, A. Kirschning, *Org. Biomol. Chem.* **2019**, *17*, 5269–5278; 'New geldanamycin derivatives with anti Hsp properties by mutasynthesis'.
- [231] 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'.
- [232] H. H. Wasserman, A. K. Petersen, M. Xia, J. Wang, *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 7587–7589; 'Pyrrole-singlet oxygen reactions leading to  $\alpha,\alpha'$ -bipyrroles. Synthesis of prodigiosin and analogs'.
- [233] K. Dai, S. Tripathy, G. Attardo, J. F. Lavalley, *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 2605–2606; 'Two-step synthesis of the bipyrrole precursor of prodigiosins'.
- [234] K. Dai, 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 Obatoclax'.
- [235] 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'.
- [236] B. A. Trofimov, A. S. Atavin, A. I. Mikhaleva, G. A. Kalbin, E. G. Chebotareva, *Zhur. Org. Khim.* **1973**, *9*, 2205.
- [237] B. A. Trofimov, *Russ. Chem. Rev.* **1981**, *50*, 138–150; 'Reactions of acetylene in superbasic media'.
- [238] B. A. Trofimov, I. M. Al'bina, E. Y. Schmidt, L. N. Sobenina, *Chemistry of pyrroles*, CRC Press, **2014**.
- [239] 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'.
- [240] A. Hantzsch, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1890**, *23*, 1474–1476; 'Neue Bildungsweise von Pyrrolderivaten'.
- [241] C. Paal, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1885**, *18*, 367–371; 'Synthese von Thiophen- und Pyrrolderivaten'.
- [242] L. Knorr, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1885**, *18*, 299–311; 'Einwirkung des Diacetbernsteinsäureesters auf Ammoniak und primäre Aminbasen'.
- [243] B. A. Trofimov, A. 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'.
- [244] 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'.
- [245] 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'.
- [246] A. S. Bobkov, N. M. Vitkovskaya, B. A. Trofimov, *J. Org. Chem.* **2020**, *85*, 6463–6470; 'Cascade assembly of 4, 5, 6, 7-tetrahydroindole from cyclohexanone oxime and acetylene in KOH/DMSO superbase medium: a quantum chemical study'.
- [247] 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**, *19*, 1545–1552; 'Preparation of cyclic prodiginines by mutasynthesis in *Pseudomonas putida* KT2440'.
- [248] D. P. Klebl, Masterarbeit, 'Wunderbare Derivate: Mutasynthese von Prodiginin-Analoga', Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (Düsseldorf), **2017**.
- [249] 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'.
- [250] K. Lv, L.-L. Wang, X.-B. Zhou, M.-L. Liu, H.-Y. Liu, Z.-B. Zheng, S. Li, *Med. Chem. Res.* **2012**, *22*, 1723–1729; 'Synthesis and in vitro antitumor activity of 1-(3-dimethylamino)propyl indolin-2-one derivatives'.

- [251] A. Treibs, H. Scherer, *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1952**, 577, 139–146; 'Reduktionen mit Lithium-aluminium-hydrid in der Pyrrol-Reihe. Di-alkylpyrrol-methane und Polymethane'.
- [252] A. Treibs, H. Derra-Scherer, *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1954**, 589, 188–195; 'Reduktionen mit Lithium-aluminium-hydrid in der Pyrrol-Reihe, 2. Mitteilung'.
- [253] S. Gracia, J. Schulz, S. Pellet-Rostaing, M. Lemaire, *Synlett* **2008**, 1852–1856; 'Synthesis of New Pyrrolobenzazepines via Pictet-Spengler Cyclization'.
- [254] 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'.
- [255] H. H. Wasserman, G. C. Rodgers, D. D. Keith, *Tetrahedron* **1976**, 32, 1851–1854; 'Undecylprodigiosin'.
- [256] G. A. Hunter, H. McNab, K. Withell, *Synthesis* **2010**, 2010, 1707–1711; 'The Meldrum's Acid Route to Prodigiosin Analogues'.
- [257] 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'.
- [258] J. Li, Q. Zhang, J. Yin, C. Yu, K. Cheng, Y. Wei, E. Hao, L. Jiao, *Org. Lett.* **2016**, 18, 5696–5699; 'Metal-Free and Versatile Synthetic Routes to Natural and Synthetic Prodiginines from Boron Dipyrin'.
- [259] A. Arens, Bachelorarbeit, 'Chemoenzymatische Synthese von Undecylprodigiosin und Derivaten - Untersuchungen zum Substratspektrum von Ligasen', Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (Düsseldorf), **2019**.
- [260] D. M. Pinkerton, M. G. Banwell, A. C. Willis, *Org. Lett.* **2007**, 9, 5127–5130; 'Total syntheses of tambjamines C, E, F, G, H, I and J, BE-18591, and a related alkaloid from the marine bacterium *Pseudoalteromonas tunicata*'.
- [261] T. A. Moss, D. M. Barber, A. F. Kyle, D. J. Dixon, *Chem. Eur. J.* **2013**, 19, 3071–3081; 'Catalytic Asymmetric Alkylation Reactions for the Construction of Protected Ethylene-Amino and Propylene-Amino Motifs Attached to Quaternary Stereocentres'.
- [262] F. Cheng, L. Zhu, U. Schwaneberg, *Chem. Commun.* **2015**, 51, 9760–9772; 'Directed evolution 2.0: improving and deciphering enzyme properties'.
- [263] 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. Rabinowitsch, 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)'.
- [264] B.-B. Xie, Y.-L. Shu, Q.-L. Qin, J.-C. Rong, X.-Y. Zhang, X.-L. Chen, B.-C. Zhou, Y.-Z. Zhang, *J. Bacteriol.* **2012**, 194, 1637–1638; 'Genome sequence of the cycloprodigiosin-producing bacterial strain *Pseudoalteromonas rubra* ATCC 29570T'.
- [265] T. de Rond, P. Stow, I. Eigl, R. E. Johnson, L. J. G. Chan, G. Goyal, E. E. K. Baidoo, N. J. Hillson, C. J. Petzold, R. Sarpong, J. D. Keasling, *Nat. Chem. Biol.* **2017**, 13, 1155–1159; 'Oxidative cyclization of prodigiosin by an alkylglycerol monooxygenase-like enzyme'.
- [266] M. J. Sullivan, N. K. Petty, S. A. Beatson, *Bioinformatics* **2011**, 27, 1009–1010; 'Easyfig: a genome comparison visualizer'.
- [267] K. Watschinger, J. E. Fuchs, V. Yarov-Yarovoy, M. A. Keller, G. Golderer, A. Hermetter, G. Werner-Felmayer, N. Hulo, E. R. Werner, *Biochem. J.* **2012**, 443, 279–286; 'Catalytic residues and a predicted structure of tetrahydrobiopterin-dependent alkylglycerol mono-oxygenase'.
- [268] K. Watschinger, E. R. Werner, *IUBMB Life* **2013**, 65, 366–372; 'Alkylglycerol Monooxygenase'.
- [269] A. Tietz, M. Lindberg, E. P. Kennedy, *J. Biol. Chem.* **1964**, 239, 4081–4090; 'A new pteridine-requiring enzyme system for the oxidation of glyceryl ethers'.

- [270] 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'.
- [271] J. S. Feitelson, D. A. Hopwood, *Mol. Gen. Genet.* **1983**, *190*, 394–398; 'Cloning of a *Streptomyces* gene for an O-methyltransferase involved in antibiotic biosynthesis'.
- [272] J. S. Feitelson, F. Malpartida, D. A. Hopwood, *Microbiology* **1985**, *131*, 2431–2441; 'Genetic and biochemical characterization of the red gene cluster of *Streptomyces coelicolor* A3 (2)'.
- [273] V. Kumar, A. Bharti, O. Gusain, G. Bisht, *Journal of Sci. Engg. & Tech. Mgt.* **2010**, *2*, 10–13; 'An improved method for isolation of genomic DNA from filamentous actinomycetes'.
- [274] C. Mülhardt, *Der Experimentator: Molekularbiologie /Genomics*, Spektrum Akademischer Verlag, **2008**.
- [275] K. Varadaraj, D. M. Skinner, *Gene* **1994**, *140*, 1–5; 'Denaturants or cosolvents improve the specificity of PCR amplification of a G+C-rich DNA using genetically engineered DNA polymerases'.
- [276] M. A. Jensen, M. Fukushima, R. W. Davis, *PLoS One* **2010**, *5*, e11024; 'DMSO and betaine greatly improve amplification of GC-rich constructs in de novo synthesis'.
- [277] 'Herculase II Fusion DNA Polymerase', Seitenaufruf: 24. März 2020, Agilent Technologies Inc., <https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/600675.pdf>, **2015**.
- [278] F. R. Blattner, G. Plunkett, C. A. Bloch, N. T. Perna, V. Burland, M. Riley, J. Collado-Vides, J. D. Glasner, C. K. Rode, G. F. Mayhew, J. Gregor, N. W. Davis, H. A. Kirkpatrick, M. A. Goeden, D. J. Rose, B. Mau, Y. Shao, *Science* **1997**, *277*, 1453–1462; 'The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12'.
- [279] F. Katzen, *Expert Opin. Drug Discovery* **2007**, *2*, 571–589; 'Gateway® recombinational cloning: a biological operating system'.
- [280] J. L. Hartley, G. F. Temple, M. A. Brasch, *Genome Res.* **2000**, *10*, 1788–1795; 'DNA cloning using *in vitro* site-specific recombination'.
- [281] S. Shuman, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 32678–32684; 'Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using vaccinia DNA topoisomerase'.
- [282] J. G. Thomas, A. Ayling, F. Baneyx, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **1997**, *66*, 197–238; 'Molecular chaperones, folding catalysts, and the recovery of active recombinant proteins from *E. coli*'.
- [283] K. Nishihara, M. Kanemori, M. Kitagawa, H. Yanagi, T. Yura, *Appl. Environ. Microbiol.* **1998**, *64*, 1694–1699; 'Chaperone coexpression plasmids: Differential and synergistic roles of DnaK-DnaJ-GrpE and GroEL-GroES in assisting folding of an allergen of Japanese cedar pollen, Cryj2, in *Escherichia coli*'.
- [284] K. Nishihara, M. Kanemori, H. Yanagi, T. Yura, *Appl. Environ. Microbiol.* **2000**, *66*, 884–889; 'Overexpression of trigger factor prevents aggregation of recombinant proteins in *Escherichia coli*'.
- [285] T. B. Inc.; 'Chaperone Plasmid Set'.
- [286] G. Gardini, in *Advances in Heterocyclic Chemistry*, Vol. 15 (Eds.: A. R. Katritzky, A. J. Boulton), Academic Press, **1973**, pp. 67–98.
- [287] J. A. Joule, K. Mills, *Heterocyclic Chemistry*, John Wiley & Sons, **2010**.
- [288] 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'.
- [289] W. Song, T. Thomas, E. R., 'Complete genome sequences of pooled genomic DNA from 10 marine bacteria using PacBio sequencing', University of New South Wales (Sydney), **2018**.
- [290] N. Kobayashi, Y. Ichikawa, *Microbiol. Immunol.* **1989**, *33*, 257–263; 'A Protein Associated with Prodigiosin Formation in *Serratia marcescens*'.
- [291] M. Couturier, H. D. Bhalara, S. R. Chawrai, R. Monson, N. R. Williamson, G. P. Salmond, F. J. Leeper, *ChemBioChem* **2019**, *21*, 523–530; 'Substrate flexibility of the flavin-dependent dihydropyrrrole oxidases PigB and HapB involved in antibiotic prodigiosin biosynthesis'.



- [292] C. M. Baldino, J. Parr, C. J. Wilson, S.-C. Ng, D. Yohannes, H. H. Wasserman, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 701–704; 'Indoloprodigiosins from the C-10 bipyrrolic precursor: New antiproliferative prodigiosin analogs'.
- [293] A. Vogt, Bachelorarbeit, 'Auf dem Weg zu neuen Prodiginin-Derivaten: Synthese und Untersuchung der biologischen Aktivität', Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (Düsseldorf), **2017**.
- [294] S. G. Vincent, P. R. Cunningham, N. L. Stephens, A. J. Halayko, J. T. Fisher, *Electrophoresis* **1997**, *18*, 67–71; 'Quantitative densitometry of proteins stained with Coomassie Blue using a Hewlett Packard scanjet scanner and Scanplot software'.
- [295] C. A. Schneider, W. S. Rasband, K. W. Eliceiri, *Nat. Methods* **2012**, *9*, 671–675; 'NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis'.
- [296] M. D. Abràmoff, P. J. Magalhães, S. Ram, *Biophotonics Int.* **2004**, *11*, 36–42; 'Image processing with ImageJ'.
- [297] 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'.
- [298] 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'.
- [299] S. J. Singer, G. L. Nicolson, *Science* **1972**, *175*, 720–731; 'The fluid mosaic model of the structure of cell membranes'.
- [300] S. M. Smith, in *Protein Chromatography - Methods and Protocols* (Eds.: D. Walls, S. T. Loughran), Humana Press, New York, **2011**, pp. 485–496.
- [301] I. M. Rosenberg, in *Protein Analysis and Purification: Benchtop Techniques*, Birkhäuser Boston **1996**, pp. 135–152.
- [302] K. Ohlendieck, in *Protein purification protocols* (Ed.: P. Cutler), Springer Science & Business Media, **2004**, pp. 283–293.
- [303] H. S. Penefsky, A. Tzagoloff, in *Methods Enzymol.*, Vol. **22**, **1971**, pp. 204–219.
- [304] R. K. Scopes, *Purification of Special Types of Proteins*, Springer Science & Business Media, New York, **2013**.
- [305] H. Rehm, *Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics*, Springer Spektrum Akademischer Verlag, **2006**.
- [306] H. K. Chenault, E. S. Simon, G. M. Whitesides, *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* **1988**, *6*, 221–270; 'Cofactor regeneration for enzyme-catalysed synthesis'.
- [307] D. C. Crans, G. M. Whitesides, *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 3130–3132; 'A convenient synthesis of disodium acetyl phosphate for use in in situ ATP cofactor regeneration'.
- [308] D. C. Crans, R. J. Kazlauskas, B. L. Hirschbein, C.-H. Wong, O. Abril, G. M. Whitesides, in *Methods Enzymol.*, Vol. **136**, Elsevier, **1987**, pp. 263–280.
- [309] B. L. Hirschbein, F. P. Mazenod, G. M. Whitesides, *J. Org. Chem.* **1982**, *47*, 3765–3766; 'Synthesis of phosphoenolpyruvate and its use in ATP cofactor regeneration'.
- [310] T. M. Weber, Masterarbeit, 'Towards the kinetic resolution with the condensing enzyme PigC – A promising method for preparation of complex chiral Prodiginines', Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (Düsseldorf), **2019**.
- [311] J. Sambrook, D. W. Russel, *Molecular cloning: a laboratory manual*, **2001**.
- [312] S. Hartmans, J. P. Smits, M. J. Vanderwerf, F. Volkering, J. A. M. Debont, *Appl. Environ. Microbiol.* **1989**, *55*, 2850–2855; 'Metabolism of Styrene Oxide and 2-Phenylethanol in the Styrene-Degrading *Xanthobacter* Strain 124X'.
- [313] K. L. Elbing, R. Brent, *Curr. Protoc. Mol. Biol.* **2002**, *59*; 'Media preparation and bacteriological tools'.
- [314] M. Scheidle, B. Dittrich, J. Klinger, H. Ikeda, D. Klee, J. Büchs, *BMC Biotechnol.* **2011**, *11*, 25; 'Controlling pH in shake flasks using polymer-based controlled-release discs with pre-determined release kinetics'.

- [315] P. Fonseca, R. Moreno, F. Rojo, *Environ. Microbiol. Rep.* **2011**, *3*, 329–339; 'Growth of *Pseudomonas putida* at low temperature: global transcriptomic and proteomic analyses'.
- [316] T. Anderlei, W. Zang, M. Papaspyrou, J. Büchs, *Biochem. Eng. J.* **2004**, *17*, 187–194; 'Online respiration activity measurement (OTR, CTR, RQ) in shake flasks'.
- [317] E. Bosdriesz, D. Molenaar, B. Teusink, F. J. Bruggeman, *FEBS J.* **2015**, *282*, 2029–2044; 'How fast-growing bacteria robustly tune their ribosome concentration to approximate growth-rate maximization'.
- [318] J. Duan, L. Reimer, J. J. Heikkilä, B. R. Glick, *FEMS Microbiol. Lett.* **2014**, *361*, 181–189; 'Differential expression of the seven rRNA operon promoters from the plant growth-promoting bacterium *Pseudomonas* sp. UW4'.
- [319] C. M. Kurylo, M. M. Parks, M. F. Juetter, B. Zinshteyn, R. B. Altman, J. K. Thibado, C. T. Vincent, S. C. Blanchard, *Cell Rep.* **2018**, *25*, 236–248; 'Endogenous rRNA sequence variation can regulate stress response gene expression and phenotype'.
- [320] R. Ernst, P. Kueppers, J. Stindt, K. Kuchler, L. Schmitt, *FEBS J.* **2010**, *277*, 540–549; 'Multidrug efflux pumps: Substrate selection in ATP-binding cassette multidrug efflux pumps - first come, first served?'.
- [321] S. C. Dos Santos, M. C. Teixeira, T. R. Cabrito, I. Sa-Correia, *Frontier in Genetics* **2012**, *3*, 63; 'Yeast toxicogenomics: genome-wide responses to chemical stresses with impact in environmental health, pharmacology, and biotechnology'.
- [322] H. Jungwirth, K. Kuchler, *FEBS Lett.* **2006**, *580*, 1131–1138; 'Yeast ABC transporters - A tale of sex, stress, drugs and aging'.
- [323] 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'.
- [324] 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'.
- [325] 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*'.
- [326] L. Eggeling, M. Bott, *Handbook of Corynebacterium glutamicum*, CRC Press, **2005**.
- [327] European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing of the European Society of Clinical Microbiology Infectious Diseases, *Clin. Microbiol. Infect.* **2003**, *9*, ix–xv; 'Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by broth dilution'.
- [328] European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing of the European Society of Clinical Microbiology Infectious Diseases, *Clin. Microbiol. Infect.* **2000**, *6*, 503–508; 'Terminology relating to methods for the determination of susceptibility of bacteria to antimicrobial agents'.
- [329] ISO 20776-14:2006-11, Clinical Laboratory Testing and in Vitro Diagnostic Test Systems – Susceptibility Testing of Infectious Agents and Evaluation of Performance of Antimicrobial Susceptibility Test Devices – Part 1 Reference Method for Testing the in Vitro Activity of Antimicrobial Agents Against Rapidly Growing Aerobic Bacteria Involved in Infectious Diseases.
- [330] 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'.
- [331] H. R. Pugsley, *Methods* **2017**, *112*, 147–156; 'Quantifying autophagy: Measuring LC3 puncta and autolysosome formation in cells using multispectral imaging flow cytometry'.
- [332] 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'.
- [333] 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 Oxazatwistane Autophagy Inhibitors'.

- [334] C. Zhao, S. Qiu, J. He, Y. Peng, H. Xu, Z. Feng, H. Huang, Y. Du, Y. Zhou, Y. Nie, *Cancer Lett.* **2020**, *481*, 15–23; 'Prodigiosin impairs autophagosome-lysosome fusion that sensitizes colorectal cancer cells to 5-fluorouracil-induced cell death'.
- [335] M. Mauthe, I. Orhon, C. Rocchi, X. Zhou, M. Luhr, K.-J. Hjelkema, R. P. Coppes, N. Engedal, M. Mari, F. Reggiori, *Autophagy* **2018**, *14*, 1435–1455; 'Chloroquine inhibits autophagic flux by decreasing autophagosome-lysosome fusion'.
- [336] 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'.
- [337] J. D. Rabinowitz, E. White, *Science* **2010**, *330*, 1344–1348; 'Autophagy and metabolism'.
- [338] M. H. Kang, C. P. Reynolds, *Clin. Cancer Res.* **2009**, *15*, 1126–1132; 'Bcl-2 Inhibitors: Targeting Mitochondrial Apoptotic Pathways in Cancer Therapy'.
- [339] 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'.
- [340] D. Chiriac, Master Thesis, 'Genomic and Metabolic Guided Discovery of Bacterial Natural Products', Queen's University (Kingston, Ontario, Canada), **2019**.
- [341] U. T. Bornscheuer, M. Pohl, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2001**, *5*, 137–143; 'Improved biocatalysts by directed evolution and rational protein design'.
- [342] R. A. Chica, N. Doucet, J. N. Pelletier, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2005**, *16*, 378–384; 'Semi-rational approaches to engineering enzyme activity: combining the benefits of directed evolution and rational design'.
- [343] N. J. Turner, *Nat. Chem. Biol.* **2009**, *5*, 567–573; 'Directed evolution drives the next generation of biocatalysts'.
- [344] 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'.
- [345] C. Zeymer, D. Hilvert, *Annu. Rev. Biochem.* **2018**, *87*, 131–157; 'Directed evolution of protein catalysts'.
- [346] K.-E. Jaeger, T. Eggert, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2004**, *15*, 305–313; 'Enantioselective biocatalysis optimized by directed evolution'.
- [347] J. S. Kim, R. T. Raines, *Protein Sci.* **1993**, *2*, 348–356; 'Ribonuclease S-peptide as a carrier in fusion proteins'.
- [348] P. K. Sydor, G. L. Challis, in *Methods Enzymol.*, Vol. 516 (Ed.: A. H. David), **2012**, pp. 195–218.
- [349] B. Kauppi, K. Lee, E. Carredano, R. E. Parales, D. T. Gibson, H. Eklund, S. Ramaswamy, *Structure* **1998**, *6*, 571–586; 'Structure of an aromatic-ring-hydroxylating dioxygenase–naphthalene 1, 2-dioxygenase'.
- [350] F. Sievers, D. G. Higgins, *Protein Sci.* **2018**, *27*, 135–145; 'Clustal Omega for making accurate alignments of many protein sequences'.
- [351] D. J. Ferraro, L. Gakhar, S. Ramaswamy, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *338*, 175–190; 'Rieske business: Structure-function of Rieske non-heme oxygenases'.
- [352] L. P. Wackett, *Enzyme Microb. Technol.* **2002**, *31*, 577–587; 'Mechanism and applications of Rieske non-heme iron dioxygenases'.
- [353] R. E. Parales, J. V. Parales, D. T. Gibson, *J. Bacteriol.* **1999**, *181*, 1831–1837; 'Aspartate 205 in the catalytic domain of naphthalene dioxygenase is essential for activity'.
- [354] 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'.
- [355] 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'.
- [356] A. Fürstner, H. Krause, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 8281–8286; 'Flexible synthesis of metacycloprodigiosin and functional derivatives thereof'.

- [357] M. D. Clift, R. J. Thomson, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 14579–14583; 'Development of a merged conjugate addition/oxidative coupling sequence. Application to the enantioselective total synthesis of metacycloprodigiosin and prodigiosin R1'.
- [358] M.-Y. Chang, C.-L. Pai, H.-P. Chen, *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 7705–7709; 'Synthesis of streptorubin B core'.
- [359] S. Kirner, P. E. Hammer, D. S. Hill, A. Altmann, I. Fischer, L. J. Weislo, M. Lanahan, K.-H. van Pée, J. M. Ligon, *J. Bacteriol.* **1998**, *180*, 1939–1943; 'Functions encoded by pyrrolnitrin biosynthetic genes from *Pseudomonas fluorescens*'.
- [360] P. C. Dorrestein, E. Yeh, S. Garneau-Tsodikova, N. L. Kelleher, C. T. Walsh, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, *102*, 13843–13848; 'Dichlorination of a pyrrolyl-S-carrier protein by FADH<sub>2</sub>-dependent halogenase PltA during pyoluteorin biosynthesis'.
- [361] E.-C. Oerke, H.-W. Dehne, F. Schönbeck, A. Weber, *Crop production and crop protection: estimated losses in major food and cash crops*, Elsevier, **2012**.
- [362] J. Bridge, *Annu. Rev. Phytopathol.* **1996**, *34*, 201–225; 'Nematode management in sustainable and subsistence agriculture'.
- [363] S. Habash, L. Al-Banna, *J. Nematol.* **2011**, *43*, 95–100; 'Phosphonate fertilizers suppressed root knot nematodes *Meloidogyne javanica* and *M. incognita*'.
- [364] A. Heydari, M. Pessarakli, *Journal of Biological Sciences* **2010**, *10*, 273–290; 'A review on biological control of fungal plant pathogens using microbial antagonists'.
- [365] R. Noble, S. Roberts, *Plant Pathol.* **2004**, *53*, 548–568; 'Eradication of plant pathogens and nematodes during composting: a review'.
- [366] P. Timper, *J. Nematol.* **2014**, *46*, 75–89; 'Conserving and enhancing biological control of nematodes'.
- [367] N. Someya, M. Nakajima, K. Hirayae, H. Tadaaki, K. Akutsu, *J. Gen. Plant Pathol.* **2001**, *67*, 312–317; 'Synergistic antifungal activity of chitinolytic enzymes and prodigiosin produced by biocontrol bacterium, *Serratia marcescens* strain B2 against gray mold pathogen, *Botrytis cinerea*'.
- [368] S. Rahul, P. Chandrashekhar, B. Hemant, N. Chandrakant, S. Laxmikant, P. Satish, *Nat. Prod. Res.* **2014**, *28*, 1399–1404; 'Nematicidal activity of microbial pigment from *Serratia marcescens*'.
- [369] D. L. Lee, *The biology of nematodes*, CRC Press, **2002**.
- [370] H. Börner, *Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*, Springer Berlin **2009**.
- [371] 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'.
- [372] D. Hanahan, *J. Mol. Biol.* **1983**, *166*, 557–580; 'Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids'.
- [373] F. R. Bloom, B. J. Schmidt, J. J. Lin, *United States Patent US6,709,852 B1* **2011**; 'Rapid growing microorganisms for biotechnology applications'.
- [374] Y. Yamada, M. Matsuda, K. Maeda, K. Mikata, *Biosci., Biotechnol., Biochem.* **1995**, *59*, 439–444; 'The phylogenetic relationships of methanol-assimilating yeasts based on the partial sequences of 18S and 26S ribosomal RNAs: the proposal of *Komagataella* gen. nov. (*Saccharomycetaceae*)'.
- [375] C. Holmström, S. James, B. A. Neilan, D. C. White, S. Kjelleberg, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **1998**, *48*, 1205–1212; '*Pseudoalteromonas tunicata* sp. nov., a bacterium that produces antifouling agents'.
- [376] C. Baker Brachmann, A. Davies, G. J. Cost, E. Caputo, J. Li, P. Hieter, J. D. Boeke, *Yeast* **1998**, *14*, 115–132; 'Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications'.
- [377] 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'.
- [378] E. B. Shirling, D. Gottlieb, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **1972**, *22*, 265–394; 'Cooperative description of type strains of *Streptomyces*'.

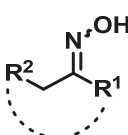
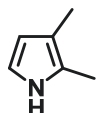
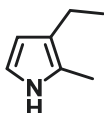
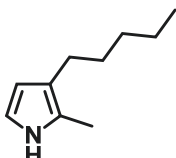
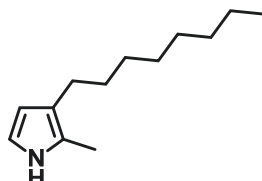
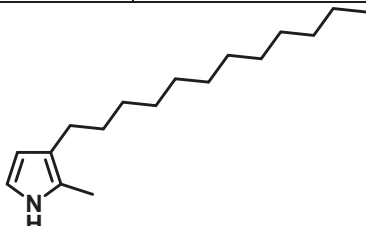
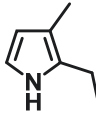
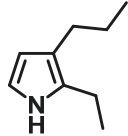
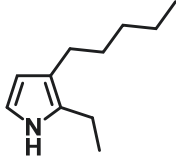
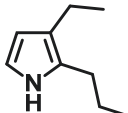
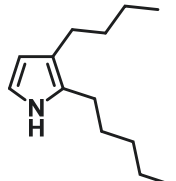
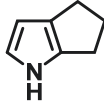


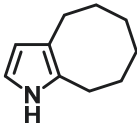
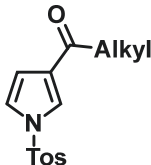
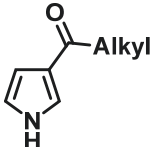
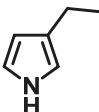
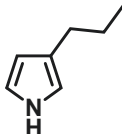
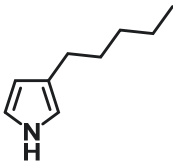
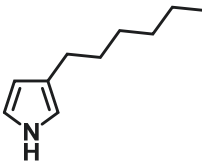
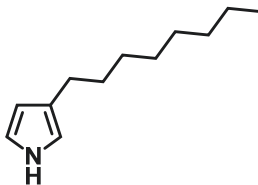
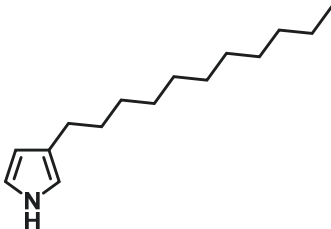
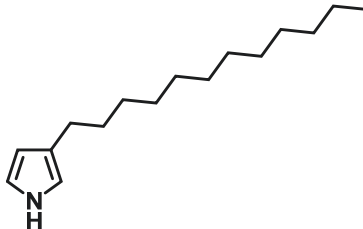
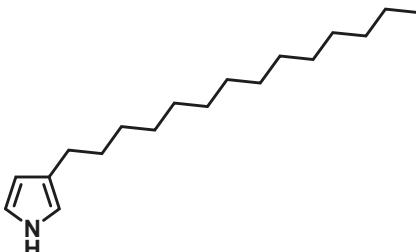
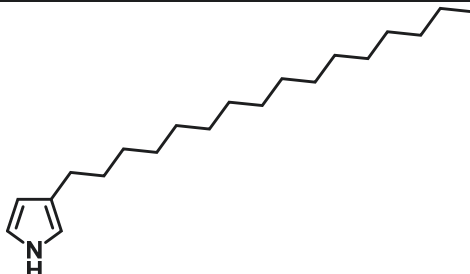
- [379] A. Poirel, A. De Nicola, P. Retailleau, R. Ziessel, *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 7512–7525; 'Oxidative coupling of 1,7,8-unsubstituted BODIPYs: synthesis and electrochemical and spectroscopic properties'.
- [380] W. Aelterman, N. De Kimpe, V. Tyvorskii, O. Kulinkovich, *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 53–58; 'Synthesis of 2,3-disubstituted pyrroles and pyridines from 3-halo-1-azaallylic anions'.
- [381] M. Sigalov, B. Trofimov, A. Mikhaleva, G. Kalabin, *Tetrahedron* **1981**, *37*, 3051-3059; <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR study of conformational and electronic structure of 1-vinylpyrroles'.
- [382] D. Dhanak, C. B. Reese, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1987**, 2829–2832; 'Synthesis of [6](2,4)pyridinophanes'.
- [383] A. R. Katritzky, S. Ledoux, S. K. Nair, *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 5728–5730; 'Benzannulation of 3-substituted pyrroles to indoles'.
- [384] 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'.
- [385] M. Kakushima, P. Hamel, R. Frenette, J. Rokach, *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 3214–3219; 'Regioselective synthesis of Acylpyrroles'.
- [386] 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'.
- [387] 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'.
- [388] 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'.
- [389] C. Chenthamarakshan, J. Eldo, A. Ajayaghosh, *Macromolecules* **1999**, *32*, 251–257; 'Synthesis and Properties of Alternating Acceptor–Donor Copolymers of Squaric Acid with 1-Dodecyl- and 3-Dodecylpyrroles'.
- [390] D. O. A. Garrido, G. Buldain, B. Frydman, *J. Org. Chem.* **1984**, *49*, 2619–2622; '1, 4-Diaminoalkanes from pyrroles. A new synthetic approach to substituted putrescines'.
- [391] F. J. Hidalgo, E. Gallardo, R. Zamora, *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 10254–10259; 'Strecker type degradation of phenylalanine by 4-hydroxy-2-nonenal in model systems'.
- [392] A. Morgenstern, Inaugural-Dissertation, 'Induktion neuer Prodigiosin-Derivate in *Streptomyces coelicolor* M145 durch Kobaltionen-Stress', Friedrich-Schiller-Universität Jena (Jena), **2013**.
- [393] M. Taniguchi, K. Umez, T. Shirasaka, S. Inoue, T. Shinpuku, M. Mitsuka, M. Hirata, 1992, Pyrrolecarboxylic acid derivatives, USA, Mitsubishi Kasei Corp, US5082856A.
- [394] F. d. r. Beltran, I. Fabre, I. Ciofini, L. Miesch, *Org. Lett.* **2017**, *19*, 5042–5045; 'Direct Spirocyclization from Keto-sulfonamides: An Approach to Azaspiro Compounds'.
- [395] Z. Yan, C. Guan, Z. Yu, W. Tian, *Tetrahedron Lett.* **2013**, *54*, 5788–5790; 'Fluoroalkanosulfonyl fluorides-mediated cyclodehydration of  $\beta$ -hydroxy sulfonamides and  $\beta$ -hydroxy thioamides to the corresponding aziridines and thiazolines'.
- [396] Q. Li, Z. X. Yu, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2011**, *50*, 2144-2147; 'Enantioselective Rhodium-Catalyzed Allylic C–H Activation for the Addition to Conjugated Dienes'.
- [397] N. Sugimoto, S.-i. Nakano, M. Yoneyama, K.-i. Honda, *Nucleic Acids Res.* **1996**, *24*, 4501–4505; 'Improved thermodynamic parameters and helix initiation factor to predict stability of DNA duplexes'.
- [398] K. J. Breslauer, R. Frank, H. Blöcker, L. A. Marky, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1986**, *83*, 3746–3750; 'Predicting DNA duplex stability from the base sequence'.
- [399] W. A. Kibbe, *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, W43–W46; 'OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator'.

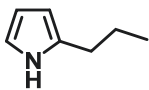
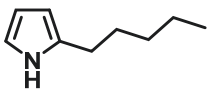
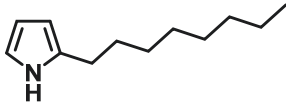
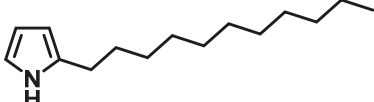
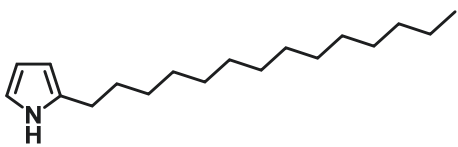
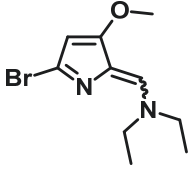
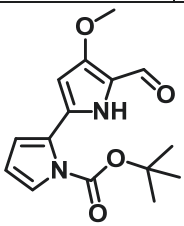
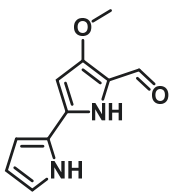
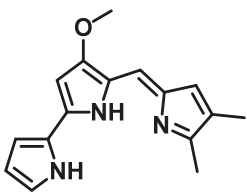
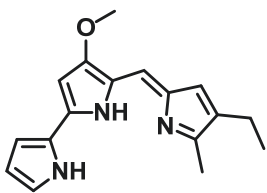
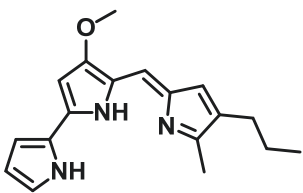
- [400] 'Site-Directed Mutagenesis Kits – QuikChange', Seitenaufruf: 25. März 2020, Agilent Technologies Inc., <https://www.agilent.com/en/product/mutagenesis-cloning/mutagenesis-kits/site-directed-mutagenesis-kits/quikchange-233116>,
- [401] J. Albert, E. Fenyő, *J. Clin. Microbiol.* **1990**, *28*, 1560–1564; 'Simple, sensitive, and specific detection of human immunodeficiency virus type 1 in clinical specimens by polymerase chain reaction with nested primers'.
- [402] J. Yourno, J. Conroy, *J. Clin. Microbiol.* **1992**, *30*, 2887–2892; 'A novel polymerase chain reaction method for detection of human immunodeficiency virus in dried blood spots on filter paper'.
- [403] S. N. Ho, H. D. Hunt, R. M. Horton, J. K. Pullen, L. R. Pease, *Gene* **1989**, *77*, 51–59; 'Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction'.
- [404] R. Higuchi, B. Krummel, R. Saiki, *Nucleic Acids Res.* **1988**, *16*, 7351–7367; 'A general method of in vitro preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions'.
- [405] D. G. Gibson, in *Methods Enzymol.*, Vol. 498 (Ed.: V. Christopher), Academic Press, **2011**, pp. 349–361.
- [406] F. Sanger, S. Nicklen, A. R. Coulson, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1977**, *74*, 5463–5467; 'DNA sequencing with chain-terminating inhibitors'.
- [407] S. Panke, A. Meyer, C. M. Huber, B. Witholt, M. G. Wubbolts, *Appl. Environ. Microbiol.* **1999**, *65*, 2324–2332; 'An alkane-responsive expression system for the production of fine chemicals'.
- [408] K. J. Picott, Master Thesis, 'Biosynthesis of prodiginine and tambjamine natural products in *Pseudoalteromonas* sp. ', Queen's University (Kingston, Ontario, Canada), **2018**.
- [409] H. Schägger, *Nat. Protoc.* **2006**, *1*, 16–22; 'Tricine-SDS-PAGE'.
- [410] K. Levenberg, *Q. Appl. Math.* **1944**, *2*, 164–168; 'A method for the solution of certain non-linear problems in least squares'.
- [411] D. W. Marquardt, *J. Soc. Ind. Appl. Math.* **1963**, *11*, 431–441; 'An algorithm for least-squares estimation of nonlinear parameters'.
- [412] A. Grote, K. Hiller, M. Scheer, R. Münch, B. Nörtemann, D. C. Hempel, D. Jahn, *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, W526–W531; 'JCat: a novel tool to adapt codon usage of a target gene to its potential expression host'.

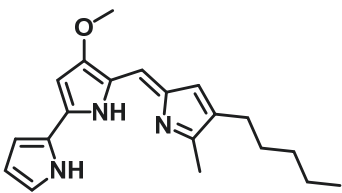
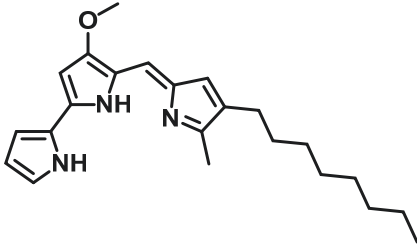
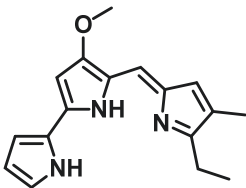
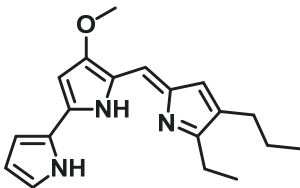
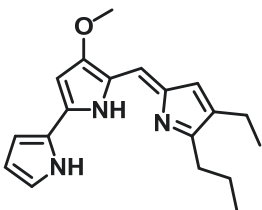
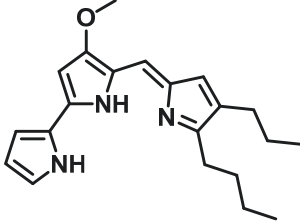
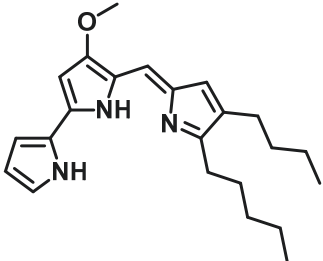
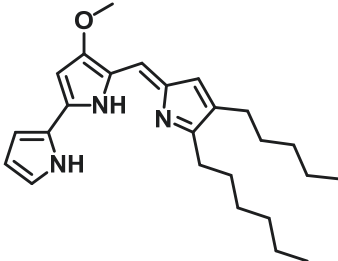
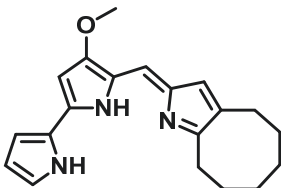
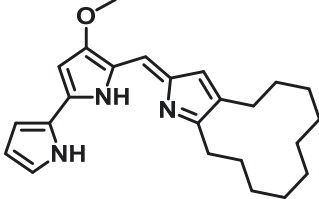
## 11 Formelregister

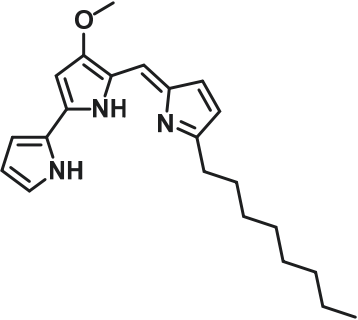
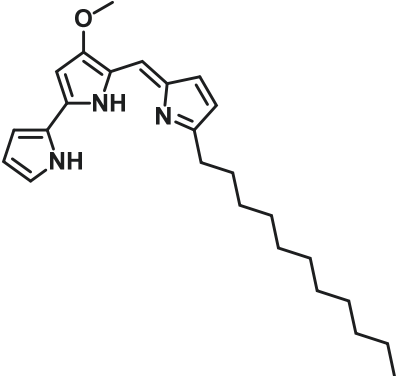
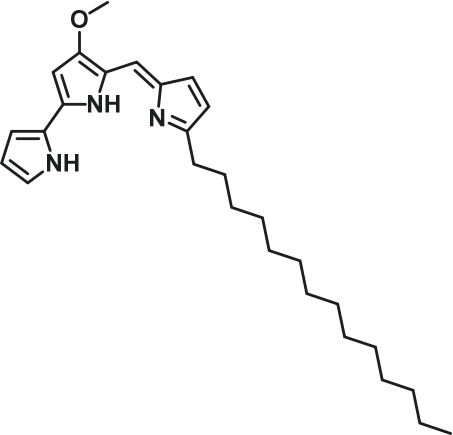
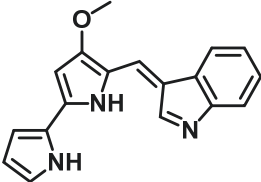
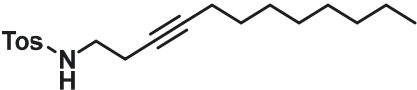
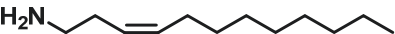
Nachfolgend sind die im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Verbindungen aufgeführt und die entsprechende Nummerierung im Laborbuch vermerkt.

|                                                                                     |                                                                                                                                                              |                                                                                     |                   |                                                                                      |                       |
|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
|    |                                                                                                                                                              |    |                   |    |                       |
| <b>83</b>                                                                           | HBR_013, HB_035,<br>HB_051, HB_052,<br>HB_055, HB_076,<br>HB_RT_002,<br>HB_RT_003,<br>SNY_007, SNY_008,<br>SNY_013, SNY_019,<br>SNY_035, SNY_050,<br>SNY_052 | <b>3b</b>                                                                           | HB_036<br>SNY_014 | <b>3i</b>                                                                            | SNY_020               |
|  |                                                                                                                                                              |   |                   |   |                       |
| <b>3a</b>                                                                           | HBR_001_03<br>SNY_036                                                                                                                                        | <b>3f</b>                                                                           | HB_053            | <b>3h</b>                                                                            | HB_001_03<br>HB_01_01 |
|  |                                                                                                                                                              |  |                   |  |                       |
| <b>57f</b>                                                                          | SNY_010                                                                                                                                                      | <b>57g</b>                                                                          | HB_057<br>SNY_009 | <b>57a</b>                                                                           | HB_054                |
|  |                                                                                                                                                              |  |                   |  |                       |
| <b>57e</b>                                                                          | HB_079<br>HB_RT_004                                                                                                                                          | <b>57c</b>                                                                          | HB_077            | <b>82e</b>                                                                           | HB_056<br>SNY_053     |

|                                                                                     |                                                                                                 |                                                                                     |                                                                                      |                                                                                       |                                                                                                       |         |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|
|    |                                                                                                 |    |                                                                                      |    |                                                                                                       |         |
| 82a                                                                                 | SNY_051                                                                                         | 90                                                                                  | HB_RT_001<br>SNY_037                                                                 | 91                                                                                    | HB_049, HB_062,<br>HB_064, HB_RT_005,<br>HB_RT_006, SNY_038,<br>SNY_041, SNY_043,<br>SNY_047, SNY_054 |         |
|    |                                                                                                 |    |                                                                                      |    |                                                                                                       |         |
| 92                                                                                  | HB_058, HB_059,<br>HB_065, HB_066,<br>HB_067, SNY_039,<br>SNY_042, SNY_044,<br>SNY_048, SNY_055 | 56c                                                                                 | HB_068                                                                               | 56d                                                                                   | HB_060                                                                                                |         |
|  |                                                                                                 |  |                                                                                      |  |                                                                                                       |         |
| 56b                                                                                 | HB_069                                                                                          | 56e                                                                                 | SNY_040<br>SNY_056                                                                   | 56f                                                                                   | HB_070                                                                                                |         |
|  |                                                                                                 |                                                                                     |  |                                                                                       |                                                                                                       |         |
| 56a                                                                                 |                                                                                                 | HB_061                                                                              |                                                                                      | 56g                                                                                   |                                                                                                       | SNY_045 |
|  |                                                                                                 |                                                                                     |  |                                                                                       |                                                                                                       |         |
| 56h                                                                                 |                                                                                                 | SNY_046                                                                             |                                                                                      | 56i                                                                                   |                                                                                                       | SNY_049 |

|                                                                                     |            |                                                                                      |                      |
|-------------------------------------------------------------------------------------|------------|--------------------------------------------------------------------------------------|----------------------|
|    |            |     |                      |
| 27f                                                                                 | HB_AAR_013 | 27e                                                                                  | HB_AAR_011           |
|    |            |    |                      |
| 27d                                                                                 | HB_AAR_015 | 27a                                                                                  | HB_006<br>HB_AAR_006 |
|    |            |    |                      |
| 27c                                                                                 | HB_AAR_017 | 27g                                                                                  | HB_AAR_023           |
|  |            |   |                      |
| 79                                                                                  | HB_003     | 75                                                                                   | HB_007               |
|  |            |  |                      |
| 2                                                                                   | HB_038     | 1b                                                                                   | HB_009_18<br>SNY_028 |
|  |            |  |                      |
| 1i                                                                                  | SNY_024    | 1c                                                                                   | HB_009_04<br>SNY_057 |

|                                                                                     |                                                                        |                                                                                      |                        |
|-------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|
|    |                                                                        |    |                        |
| 1a                                                                                  | HBR_009_08<br>SNY_059<br>HB_088 (Fermentation)<br>HB_089 (Biosynthese) | 1f                                                                                   | HB_009_05              |
|    |                                                                        |    |                        |
| 58f                                                                                 | SNY_022                                                                | 58g                                                                                  | SNY_021                |
|  |                                                                        |  |                        |
| 58e                                                                                 | HB_009_13                                                              | 58b                                                                                  | HB_009_03              |
|  |                                                                        |  |                        |
| 58c                                                                                 | HB_009_14<br>HB_009_16                                                 | 58d                                                                                  | HB_009_12<br>HB_009_15 |
|  |                                                                        |  |                        |
| 110a                                                                                | HB_083 (Biokatalyse)                                                   | 110d                                                                                 | HB_009_11              |

|                                                                                     |            |                                                                                      |                                        |
|-------------------------------------------------------------------------------------|------------|--------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|
|    |            |    |                                        |
| 9d                                                                                  | HB_AAR_027 | 9a                                                                                   | HB_009_17                              |
|   |            |    |                                        |
| 9c                                                                                  | HB_AAR_026 | 103a                                                                                 | HB_030_01–05, 07, 09, 10<br>HB_AVO_003 |
|  |            |  |                                        |
| 95                                                                                  | HB_022     | 97                                                                                   | HB_023                                 |
|  |            |                                                                                      |                                        |
| 28a                                                                                 | HB_025     |                                                                                      |                                        |

## 12 Danksagung

An erster Stelle möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Jörg Pietruszka danken. Jörg, ich danke dir, dass du mir damals das Vertrauen geschenkt hast und mich in deinem Arbeitskreis aufgenommen hast. Du hast mir viele Freiheiten gelassen das Prodiginin Thema auch zu meinem Thema zu machen und mir gleichzeitig immer dort Rückhalt und Zuspruch gegeben wo es nötig war. Danke, dass du immer ein offenes Ohr für mich hast. Vielen Dank auch für all die wissenschaftlichen und nicht-wissenschaftlichen Gespräche, die mir immer Freude bringen.

Bei Prof. Dr. Karl-Erich Jaeger möchte ich mich sehr herzlich für die Übernahme des Zweitgutachtens bedanken.

Ein großer Dank geht an die gesamte Prodigininfamilie, die über die Jahre immer weiter gewachsen ist, und alle Kooperationspartner in Dortmund, Aachen, Bonn und natürlich in Jülich. Gerade das Prodiginin Projekt lebt und profitiert von den verschiedenen Expertisen und ich möchte allen für ihre Ideen und die tatkräftige Unterstützung danken. Zu der Prodigininfamilie zählen natürlich auch meine Schützlinge, die ich auf einem Teil ihres Weges begleiten durfte. Anne und Annabel, euch durfte ich während eurer Bachelorarbeit betreuen – danke für eure Hilfe. Annabel, danke, dass du mir in meinen letzten Monaten im Labor geholfen hast einige meiner Projektideen noch zu verwirklichen. Silke, es hat mir viel Freude bereitet dich im praktischen Teil deiner Ausbildung begleiten zu dürfen, auch dir vielen Dank für all deine Hilfe. Dewi, danke für deine Unterstützung gerade bei den Klonierungen während deines Praktikums bei mir.

Ein großes Dankeschön geht auch an alle, die meine Arbeit so fleißig Korrektur gelesen haben. Marc, Andreas, Marvin, Andi, Birthe und meinen Eltern danke ich sehr für all ihre Anmerkungen, Verbesserungsvorschläge, die konstruktiven Diskussionen und Ideen!

Bedanken möchte ich mich ebenso bei allen (!) aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern des IBOC. Was wäre eine Doktorarbeit ohne die richtigen Kollegen?! Ihr habt mir unglaublich viel beigebracht, mir Hilfestellung geleistet und ich habe sehr gerne mit euch zusammengearbeitet. Bei zahlreichen Gelegenheiten habe ich viele Lachtränen vergossen und wenn es dann doch mal echte Tränen waren, war immer einer von euch da, um mich zu trösten und aufzufangen. All unsere mal mehr und mal weniger sinnvollen Gespräche beim Mittagessen, im Venn, bei Feiern und zwischendurch habe ich sehr genossen.

Andreas, du hast all dein Wissen über Prodiginine an mich weitergegeben, mir „die Chemie“ beigebracht, mich mit der Begeisterung für unser Thema angesteckt und immer tatkräftig unterstützt. Mit dir kann ich Pläne zur Weltherrschaft schmieden, übers Fotografieren fachsimpeln oder über die großen und kleinen Dinge des Lebens philosophieren. Danke dafür! Marc, du hast mir neben allem biologischen Wissen auch beigebracht Ruhe in stressigen Situationen zu bewahren und an mich zu glauben. Mit dir macht jegliche Laborarbeit Spaß. Danke für deine Freundschaft! Roxy, danke für deine



Unterstützung im Labor als Teil von „Team Pink“. Du hast immer ein offenes Ohr für mich, fühlst mit und unterstützt wo du nur kannst. Ich bin froh dich als Freundin zu haben. Birgit, du hast mich immer tatkräftig bei allen bürokratischen Hürden mit einer unglaublichen Geduld unterstützt. Danken möchte ich dir vor allem aber für die vielen persönlichen Gespräche zwischendurch, die mir sehr viel bedeuten. Tom, dir möchte ich für all deine Unterstützung, Betreuung und all deine Ideen danken. Ganz besonders zum Anfang meiner Zeit im IBOC hat mir dein Rückhalt sehr geholfen und vieles leichter gemacht. Fabian, du warst der beste Großbratendienst Partner, den ich mir hätte wünschen können und wir haben uns wunderbar ergänzt. Auch wenn wir uns bei der Einteilung von Obst und Gemüse und der Bekämpfung meiner Flugangst nicht einig sind, freue ich mich immer sehr über unsere Gespräche. Um es in deinen Worten zu sagen – Ich danke Fabian für alles! Marvin, danke für die vielen tollen Unterhaltungen, die Beantwortung meiner unzähligen Fragen zur Chemie, das Erweitern meines musikalischen Horizonts und für die tolle Zeit als Büropartner. Julian, danke, dass du dir immer Zeit für meine Fragen nimmst, für all die wunderbaren Unterhaltungen und deine Herzlichkeit. Ich freue mich sehr, dass ich dich kennenlernen durfte. Moritz K., danke für all die lustigen Momente, deinen kroko-coolen Humor und die richtigen Ra(h)menbedingungen. C'est la vie! Basti, deine gute Laune und dein Lachen haben mich immer aufgeheitert! Danke, dass du immer Anteil genommen hast und mich aufgebaut hast. Alex und Jan danke, dass ich in 205 willkommen war und für all die vielen witzigen Momente. Jan, danke, dass du immer Zeit für eine Tasse Kaffee hast, fürs quatschen und zuhören! Claus, danke für die vielen langen Telefonate über dieses und jenes! Vera, Bea, Moni, Rainer, Erik, Birgit, danke, dass ihr alles am Laufen haltet und uns unterstützt wo ihr könnt!

Auch außerhalb des Instituts konnte ich mich auf tolle Menschen verlassen. Esther, Lena, Ursel, Birthe und Sarah – Danke für eure Freundschaft! Birthe und Sarah ihr beide habt mich durch alle Phasen des Studiums und der Doktorarbeit begleitet. Danke, dass ihr immer ein offenes Ohr für mich habt und danke für all die *fruitful discussions*.

Ein unglaublich großer Dank gebührt meiner Familie. Ihr habt mich immer in allen Situationen unterstützt und wart mir Rückhalt, Motivation und Trost gleichzeitig. Ohne all eure Unterstützung wäre so vieles nicht möglich gewesen. Andi, auch dir danke ich sehr für all deine Motivation in schweren Phasen, deine Hilfe und deine große Geduld mit mir. Ich bin sehr glücklich dich an meiner Seite zu wissen.

### **13 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.

---

Hannah Braß