

Induktion neuer Prodigiosin-Derivate in  
*Streptomyces coelicolor* M145 durch  
Kobaltionen-Stress

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium  
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Chemisch-Geowissenschaftlichen Fakultät der  
Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Diplom-Chemikerin  
Anne Morgenstern  
geboren am 06.05.1986 in Marienberg

Gutachter:

1. Prof. Dr. Wilhelm Boland, Max-Planck-Institut für Chemische Ökologie, Jena
2. Prof. Dr. Georg Pohnert, Friedrich-Schiller-Universität Jena

Tag der öffentlichen Verteidigung: 02.10.2013

**„Experience is what you get when you didn't get what you wanted.“**

**Randy Pausch, US-amerikanischer Informatiker**

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>VIII</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Streptomyceten . . . . .	3
1.1.1 Genetische Besonderheiten der Streptomyceten . . . . .	3
1.1.2 Regulation des Sekundärmetabolismus . . . . .	4
1.1.3 <i>Streptomyces coelicolor</i> . . . . .	6
1.2 Prodigiosine . . . . .	8
1.2.1 Frühe Studien zur Biosynthese von Undecylprodigiosin und Streptorubin B . . . . .	9
1.2.2 Das Prodigiosin-Biosynthesecluster ( <i>red</i> -Cluster) . . . . .	11
1.2.3 Die Biosynthese von 4-Methoxy-2,2'-bipyrrol-5-carboxaldehyd (MBC)	12
1.2.4 Die Biosynthese von 2-Undecylpyrrol . . . . .	13
1.2.5 Kondensation von 4-Methoxy-2,2'-bipyrrol-5-carboxyaldehyd und Undecylpyrrol zu Undecylprodigiosin und anschließende oxidative Zyklisierung zu Streptorubin B . . . . .	15
<b>2 Zielstellung</b>	<b>18</b>
<b>3 Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>20</b>
3.1 Der rote Phänotyp von <i>S. coelicolor</i> . . . . .	21
3.1.1 Isolierung unbekannter Verbindungen - die Coeligiosine . . . . .	23
3.1.2 Strukturaufklärung der Coeligiosine . . . . .	25
3.1.3 Eigenschaften der Coeligiosine . . . . .	45
3.2 Untersuchungen zur Biosynthese der Coeligiosine . . . . .	50
3.2.1 Fütterungsstudien zur Biosynthese der Coeligiosine . . . . .	50
3.2.2 Biomimetische Studien zur Bildung der Coeligiosine . . . . .	63
3.2.3 Die Biosynthese der Coeligiosine . . . . .	68
3.2.4 Untersuchungen zur Genregulation im roten Phänotyp von <i>S. coelicolor</i>	73

---

3.3	Die Bildung von Coeligosinen unter Stress - ein generelles oder spezifisches Phänomen? . . . . .	76
3.3.1	Kultivierung von <i>S. coelicolor</i> unter Einwirkung verschiedener Schwermetallionen . . . . .	76
3.3.2	Andere Prodigiosin-Produzenten unter Kobaltionenstress . . . . .	79
<b>4</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>82</b>
<b>5</b>	<b>Summary</b>	<b>85</b>
<b>6</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>88</b>
6.1	Kultivierung von Mikroorganismen . . . . .	88
6.1.1	Kultivierung von <i>Streptomyces</i> sp. . . . .	88
6.1.2	Differenzierung verschiedener Phänotypen von <i>Streptomyces coelicolor</i>	90
6.1.3	Anzucht des roten Phänotyps . . . . .	90
6.1.4	Differenzierung der Phänotypen von <i>S. coelicolor</i> unter Einwirkung anderer Schwermetallionen . . . . .	90
6.1.5	Differenzierung der Phänotypen von <i>S. coelicolor</i> M145 unter oxidativem Stress durch Wasserstoffperoxid . . . . .	91
6.1.6	Kultivierung von <i>Vibrio gazogenes</i> und <i>Pseudoalteromonas rubra</i> . . .	91
6.1.7	Kultivierung mariner Bakterien unter Kobaltionenstress . . . . .	92
6.2	Analyse flüchtiger Verbindungen von <i>Streptomyces coelicolor</i> M145 und des roten Phänotyps per Gaschromatographie-Massenspektrometrie . . . . .	93
6.2.1	Sammeln flüchtiger Verbindungen von <i>Streptomyces coelicolor</i> -Flüssigkulturen . . . . .	93
6.2.2	Gaschromatographie-Massenspektrometrie flüchtiger Verbindungen . .	94
6.3	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie ( <i>high performance liquid chromatography</i> - HPLC) . . . . .	94
6.3.1	Herstellung von Zellextrakten . . . . .	96
6.3.2	Direkter Nachweis von Prodigiosinen mittels <i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization</i> (MALDI) . . . . .	96
6.3.3	Messung hochaufgelöster Massenspektren . . . . .	96
6.4	Kernresonanzspektroskopie (NMR) . . . . .	97
6.5	Isolierung von Prodigiosinen und Coeligosinen aus <i>Streptomyces coelicolor</i> . .	97
6.5.1	Allgemein verwendete Trennmethode . . . . .	97
6.5.2	Isolierung von Undecylprodigiosin und Streptorubin B . . . . .	98

---

6.5.3	Isolierung der Coeligiosine . . . . .	100
6.6	Synthese . . . . .	104
6.6.1	Synthese von 2-Undecanoylpyrrol . . . . .	105
6.6.2	Synthese von 2-Undecylpyrrol . . . . .	106
6.6.3	Synthese von <i>N</i> -((5-bromo-3-methoxy-2 <i>H</i> -pyrrol-2-ylidene)methyl)- <i>N</i> -ethylethanamin . . . . .	107
6.6.4	Synthese von 4-Methoxy-2,2'-bipyrrol-5-carboxyaldehyd . . . . .	108
6.6.5	Synthese von [1',1'- <sup>2</sup> H <sub>2</sub> ]-2-Undecylpyrrol . . . . .	109
6.6.6	Synthese von [1',1'- <sup>2</sup> H <sub>2</sub> ]-5-Undecylpyrrol-2-carboxyaldehyd . . . . .	109
6.6.7	Synthese von [8- <sup>13</sup> C]- <i>N</i> -((5-Bromo-3-methoxy-2 <i>H</i> -pyrrol-2-ylidene)-methyl)- <i>N</i> -methylethanamin . . . . .	111
6.6.8	Synthese von [ <i>Formyl</i> - <sup>13</sup> C]-4-Methoxy-2,2'-bipyrrol-5-carboxyaldehyd . . . . .	111
6.6.9	Synthese von [1',1'- <sup>2</sup> H <sub>2</sub> ]-Undecylprodigiosin . . . . .	112
6.6.10	Synthese von Decanoylpyrrol . . . . .	113
6.6.11	Synthese von Decylpyrrol . . . . .	114
6.7	Fütterungsexperimente . . . . .	115
6.7.1	Fütterung von 2-Undecylpyrrol und [1',1'- <sup>2</sup> H <sub>2</sub> ]-2-Undecylpyrrol . . . . .	116
6.7.2	Fütterung von 4-Methoxy-2,2'-bipyrrol-5-carboxyaldehyd . . . . .	116
6.7.3	Fütterung von [ <i>Formyl</i> - <sup>13</sup> C, 1',1'- <sup>2</sup> H <sub>2</sub> ]-5-Undecylpyrrol-2-carboxyaldehyd . . . . .	116
6.7.4	Fütterung von [1',1'- <sup>2</sup> H <sub>2</sub> ]-Undecylprodigiosin . . . . .	117
6.7.5	Fütterung von 2-Decylpyrrol . . . . .	117
6.7.6	Fütterung <sup>13</sup> C-markierter Aminosäuren . . . . .	117
6.7.7	Fütterung von <sup>13</sup> C-markiertem Methanol . . . . .	118
6.7.8	Fütterung von [ <i>Formyl</i> - <sup>13</sup> C]-4-Methoxy-2,2'-bipyrrol-5-carboxyaldehyd . . . . .	118
6.8	Biomimetische Studien . . . . .	118
6.8.1	Biomimetische Kupplungsversuche mit Hilfe von Trifluoressigsäure . . . . .	118
6.8.2	Biomimetische Studien unter Radikalstress . . . . .	120
6.9	Bestimmung der Eigenschaften einiger Prodigiosine und Coeligiosine . . . . .	120
6.9.1	UV/VIS-Spektroskopie . . . . .	120
6.9.2	Zirkulardichroismus-Spektroskopie ( <i>circular dichroism</i> , CD) . . . . .	120
6.9.3	Komplexierung von Kobalt- und Kupfer-Ionen . . . . .	121
6.9.4	Radikalfänger-Test . . . . .	121
6.9.5	DNA-cleavage Assay . . . . .	121

6.9.6	Testung auf antiproliferative und zytotoxische Eigenschaften von Coeligiosin B . . . . .	123
6.10	Untersuchungen zur Genregulation im roten Phänotyp . . . . .	123
6.10.1	RNA-Isolation . . . . .	123
6.10.2	cDNA-Synthese . . . . .	124
6.10.3	Quantitative real time PCR (qPCR) . . . . .	124
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>126</b>
<b>A</b>	<b>Anhang</b>	<b>i</b>
A.1	NMR-Spektren synthetisierter Verbindungen . . . . .	i
A.2	NMR-Spektren von Undecylprodigiosin . . . . .	xiii
A.3	NMR-Spektren von Streptorubin B . . . . .	xiv
A.4	NMR-Spektren von Coeligiosin B . . . . .	xv
A.5	NMR-Spektren von Coeligiosin C . . . . .	xx
A.6	NMR-Spektren von Coeligiosin E . . . . .	xxiii
A.7	Massenspektren der Prodigiosine . . . . .	xxv
A.8	Massenspektren der Coeligiosine . . . . .	xxvi
A.9	Massenspektren von Syntheseprodukten . . . . .	xxix
A.10	Massenspektren der flüchtigen Verbindungen des roten Phänotyps . . . . .	xxxiv
A.11	UV-VIS und CD-Spektren . . . . .	xxxviii
A.12	DNA cleavage Assay . . . . .	xli
A.13	<i>S. coelicolor</i> unter dem Einfluss verschiedener Schwermetallionen . . . . .	xlii
A.14	Genexpression im roten Phänotyp über 10 Tage . . . . .	xliii
A.15	Prodigiosin- und Coeligiosin-Derivate nach Verfütterung von Decylpyrrol . . .	xlvii
A.16	TFA-katalysierte biomimetische Reaktion von Ethylpyrrol und 4-Methoxy-2,2'-bipyrrol-5-carboxyaldehyd . . . . .	xlviii
<b>B</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>xliv</b>
<b>C</b>	<b>Danksagung</b>	<b>li</b>
<b>D</b>	<b>Selbständigkeitserklärung</b>	<b>liii</b>

# Abkürzungsverzeichnis

BEGRIFF	BEDEUTUNG
®	geschütztes Warenzeichen
A	Adenosin
A	Adenylierungsdomäne
Abb.	Abbildung
ABTS	2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)
ACN	Acetonitril
ACP	Acyl Carrier Protein
AcOH	Essigsäure
AdoMet	S-Adenosylmethionin
APT	<i>Attached Proton Test</i>
AT	Acetyltransferase
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
amu	engl. <i>atomic mass units</i> , atomare Masseneinheit
bp	Basenpaar
BLAST	engl. <i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
C	Cytidin
c <sub>0</sub>	Stammkonzentration
c <sub>E</sub>	Endkonzentration
CC <sub>50</sub>	Konzentration bei 50 % Zytotoxizität (halbmaximale zytotoxische Konzentrationen)
cDNA	engl. <i>complementary DNA</i> , komplementäre DNA
CLF	engl. <i>chain length factor</i> , Kettenverlängerungsfaktor
COSY	<i>Correlated Spectroscopy</i>
d	engl. <i>day(s)</i> , Tag(e)
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
dest.	destilliert

---

DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	engl. <i>Desoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>eftu</i>	<i>sco1321</i> , Gen für den Elongationsfaktor TU von <i>S. coelicolor</i>
EI	engl. <i>electron impact</i> , Elektronenstoßionisation
engl.	aus dem Englischen
ent.	entionisiert
ESI	Elektro-Spray-Ionisation
EtOH	Ethanol
FabF	$\beta$ -Ketoacyl-ACP synthase II
FabH	$\beta$ -Ketoacyl-ACP synthase III
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FMN	Flavinmononucleotid
G	Guanosin
G/C	Guanosin/Cytidin
GI <sub>50</sub>	engl. <i>growth inhibition of 50 %</i> , 50 %ige Wachstumshemmung
<i>gyrB</i>	<i>sco3874</i> , Gen für die DNA Gyrase Untereinheit B von <i>S. coelicolor</i>
h	engl. <i>hour</i> , Stunde
HBC	4-Hydroxy-2,2'-bipyrrrol-5-carboxyaldehyd
HBM	4-Hydroxy-2,2'-bipyrrrol-5-methanol
HCHO	Formaldehyd
HCl	Salzsäure
HCOOH	Ameisensäure
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single-Quantum Correlation</i>
kbp	Kilobasenpaare
konz.	konzentriert
KS	Ketosynthase
LB	Luria - Bertani - Medium
LC-MS	engl. <i>liquid chromatography - mass spectrometry</i> , Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung

---

MALDI	engl. <i>Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization</i> , Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation
MB	<i>Marine Broth</i> , Medium zur Kultivierung mariner Bakterien
MBC	4-Methoxy-2,2'-bipyrrol-5-carboxyaldehyd
MBC- <sup>13</sup> C	[ <i>Formyl</i> - <sup>13</sup> C]-4-Methoxy-2,2'-bipyrrol-5-carboxyaldehyd
Mbp	Megabasenpaare
MeOH	Methanol
MOPS	$\gamma$ -Morpholinpropansulfonsäure
MS	Massenspektrometrie
<i>m/z</i>	Masse-zu-Ladung-Verhältnis
NAD(P)	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-(Phosphat)
<i>NCBI</i>	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i> , Nukleare Kernresonanz
NOESY	<i>Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy</i>
OD <sub>600</sub>	Optische Dichte bei $\lambda = 600$ nm
OAS	$\alpha$ -Oxoaminsynthase
ORF	engl. <i>open reading frame</i> , offener Leserahmen
ovlp.	engl. <i>overlapping</i> , überlappend
<i>P.</i>	<i>Pseudoalteromonas</i>
PCP	Peptidyl-Carrier-Protein
PCR	engl. <i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PEP	Phosphoenolpyruvat
PLP	Pyridoxalphosphat
pos.	positiv
PPDK	Pyruvat-Phosphat-Dikinase
(p)ppGpp	Guanosin-Polyphosphat
<i>p.a.</i>	<i>pro analysi</i>
qPCR	quantitative <i>real time</i> PCR
<i>redD</i>	<i>sco5877</i> , Transkriptionsregulator, Gen aus dem Prodigiosin-Biosynthesecluster von <i>S. coelicolor</i>
<i>redE</i>	<i>sco5899</i> , Gen aus dem Prodigiosin-Biosynthesecluster von <i>S. coelicolor</i>
<i>redF</i>	<i>sco5898</i> , Gen aus dem Prodigiosin-Biosynthesecluster von <i>S. coelicolor</i>

---

<i>redG</i>	<i>sco5897</i> , Oxidase, Gen aus dem Prodigiosin-Biosynthesecluster von <i>S. coelicolor</i>
<i>redH</i>	<i>sco5896</i> , Phosphoenolpyruvate-umsetzendes Enzym, Gen aus dem Prodigiosin-Biosynthesecluster von <i>S. coelicolor</i>
<i>redI</i>	<i>sco5895</i> , Methyltransferase, Gen aus dem Prodigiosin-Biosynthesecluster von <i>S. coelicolor</i>
<i>redJ</i>	<i>sco5894</i> , Thioesterase, Gen aus dem Prodigiosin-Biosynthesecluster von <i>S. coelicolor</i>
<i>redK</i>	<i>sco5893</i> , Oxidoreduktase, Gen aus dem Prodigiosin-Biosynthesecluster von <i>S. coelicolor</i>
<i>redL</i>	<i>sco5892</i> , Polyketidsynthase, Gen aus dem Prodigiosin-Biosynthesecluster von <i>S. coelicolor</i>
<i>redM</i>	<i>sco5891</i> , Peptidsynthase, Gen aus dem Prodigiosin-Biosynthesecluster von <i>S. coelicolor</i>
<i>redN</i>	<i>sco5890</i> , 8-Amino-7-oxononanoatsynthase, Gen aus dem Prodigiosin-Biosynthesecluster von <i>S. coelicolor</i>
<i>redO</i>	<i>sco5889</i> , Gen aus dem Prodigiosin-Biosynthesecluster von <i>S. coelicolor</i>
<i>redP</i>	<i>sco5888</i> , 3-Oxoacyl-ACP-Synthase, Gen aus dem Prodigiosin-Biosynthesecluster von <i>S. coelicolor</i>
<i>redQ</i>	<i>sco5887</i> , Acyl carrier protein, Gen aus dem Prodigiosin-Biosynthesecluster von <i>S. coelicolor</i>
<i>redR</i>	<i>sco5886</i> , 3-Oxoacyl-ACP-Synthase, Gen aus dem Prodigiosin-Biosynthesecluster von <i>S. coelicolor</i>
<i>redS</i>	<i>sco5885</i> , Gen aus dem Prodigiosin-Biosynthesecluster von <i>S. coelicolor</i>
<i>redT</i>	<i>sco5884</i> , Gen aus dem Prodigiosin-Biosynthesecluster von <i>S. coelicolor</i>
<i>redU</i>	<i>sco5883</i> , Gen aus dem Prodigiosin-Biosynthesecluster von <i>S. coelicolor</i>
<i>redV</i>	<i>sco5882</i> , Gen aus dem Prodigiosin-Biosynthesecluster von <i>S. coelicolor</i>
<i>redW</i>	<i>sco5879</i> , Acyl-CoA-Dehydrogenase, Gen aus dem Prodigiosin-Biosynthesecluster von <i>S. coelicolor</i>

---

<i>redx</i>	<i>sco5878</i> , Polyketidsynthase aus der Prodigiosin-Biosynthese in <i>S. coelicolor</i>
<i>redY</i>	<i>sco5880</i> , Gen aus dem Prodigiosin-Biosynthesecluster von <i>S. coelicolor</i>
<i>redZ</i>	<i>sco5881</i> , Response Regulator, Gen aus dem Prodigiosin-Biosynthesecluster von <i>S. coelicolor</i>
RelA	(p)ppGpp-Synthase I
RNA	engl. <i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
ROESY	<i>Rotating frame Overhauser Enhancement Spectroscopy</i>
ROX™	Referenzfarbstoff für die qPCR
RP	engl. <i>Reverse Phase</i> , Umkehrphase
rpm	engl. <i>revolutions per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
<i>S.</i>	<i>Streptomyces</i>
<i>S.</i>	<i>Serratia</i>
SAM	S-Adenosylmethionin
SELCOSY	selektives 1D-COSY
SELHSQC	selektives long range 1D-HSQC
SELNOESY	selektives 1D-NOESY
SELROESY	selektives 1D-ROESY
SELTOCSY	selektives 1D-TOCSY
SerT	Seryltransferase
SFM-Medium	<i>soya flour mannitol</i> , Mannit-Soja-Medium
SPE	engl. <i>solid phase extraction</i> , Festphasenextraktion
T	Thymin
Tab	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TEAC	engl. <i>Trolox Equivalent Antioxidative Capacity</i> , Trolox-Äquivalente
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TOCSY	<i>Total Correlation Spectroscopy</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UP	Undecylpyrrol

UPA	5-Undecylpyrrol-2-carboxyaldehyd
UPA- <sup>13</sup> C	[ <i>Formyl</i> - <sup>13</sup> C, 1',1'- <sup>2</sup> H <sub>2</sub> ]-5-Undecylpyrrol-2-carboxyaldehyd
UP-d <sub>2</sub>	[1',1'- <sup>2</sup> H <sub>2</sub> ]-2-Undecylpyrrol
UV/VIS	engl. <i>Ultraviolet - visible</i> , Frequenzbereich des ultravioletten und sichtbaren Lichts
V.	<i>Vibrio</i>
v/v	Volumen/Volumen
Vol.	Volumen
w/v	engl. <i>weight/volume</i> , Masse pro Volumen
Wt	Wildtyp

# 1 Einleitung

**„It’s time to close the book on infectious disease and declare the war against pestilence won.“ (1969) [1]**

**„We are running out of bullets for dealing with a number of bacterial infections. Patients are dying because we no longer in many cases have antibiotics that work.“ (2007) [2]**

Obwohl sie nicht einmal 40 Jahre auseinander liegen, könnten diese zwei Zitate von Militärarzt William H. Stewart und dem Nobelpreisträger Joshua Lederberg kaum gegensätzlicher sein. Sie verdeutlichen eindrucksvoll, wie schnell durch Auftreten von immer mehr resistenten Mikroorganismen aus dem schier unendlich scheinenden Reservoir an neuen, antibiotisch aktiven Naturstoffen in den 1970er Jahren bis heute nur noch wenige wirksame Verbindungen übrig geblieben sind.

Mit der Entdeckung des Penicillins (**1**) (Abb. 1.1, am Beispiel von Penicillin F) 1929 durch Alexander Fleming wurde erstmals ein von Mikroorganismen produzierter Naturstoff beschrieben, der gegen andere Mikroorganismen eine inhibierende Wirkung zeigte [3]. Daraufhin begannen Wissenschaftler, allen voran Selman Waksman, gezielt nach solchen Verbindungen zu suchen und schnell wurde dabei deutlich, dass von Bakterien und Pilzen die Gruppe der Actinomyceten (welche zu dem Zeitpunkt noch als eigenständige Zwischenform zwischen Pilzen und Bakterien galt) die vielversprechendste Quelle neuer Naturstoffe war [4]. Zunächst wurden mit Tyrocidin (**2**), Gramacidin (**3**), Actinomycin (**4**) und Streptothricin (**5**) (Abb. 1.1) Naturstoffe isoliert, die sich als zu toxisch für die klinische Verwendung erwiesen [4]. 1943 gelang Albert Schatz, ebenfalls aus Waksmans Labor, mit der Isolation von Streptomycin (**6**) die Isolation eines Naturstoffs, welcher exzellente Wirksamkeit gegen *Mycobacterium tuberculosis*, den Erreger der Tuberkulose zeigte. Es folgten Chlortetracyclin (**7**) (1945), Chloramphenicol (**8**) (1947), Erythromycin (**9**) (1952) und Kanamycin (**10**) (1957) [4]. Waksman schlug

1947 den Begriff 'Antibiotika' für alle aus Mikroorganismen isolierten Verbindungen vor, die eine inhibierende Wirkung gegen andere Mikroorganismen zeigen [5].

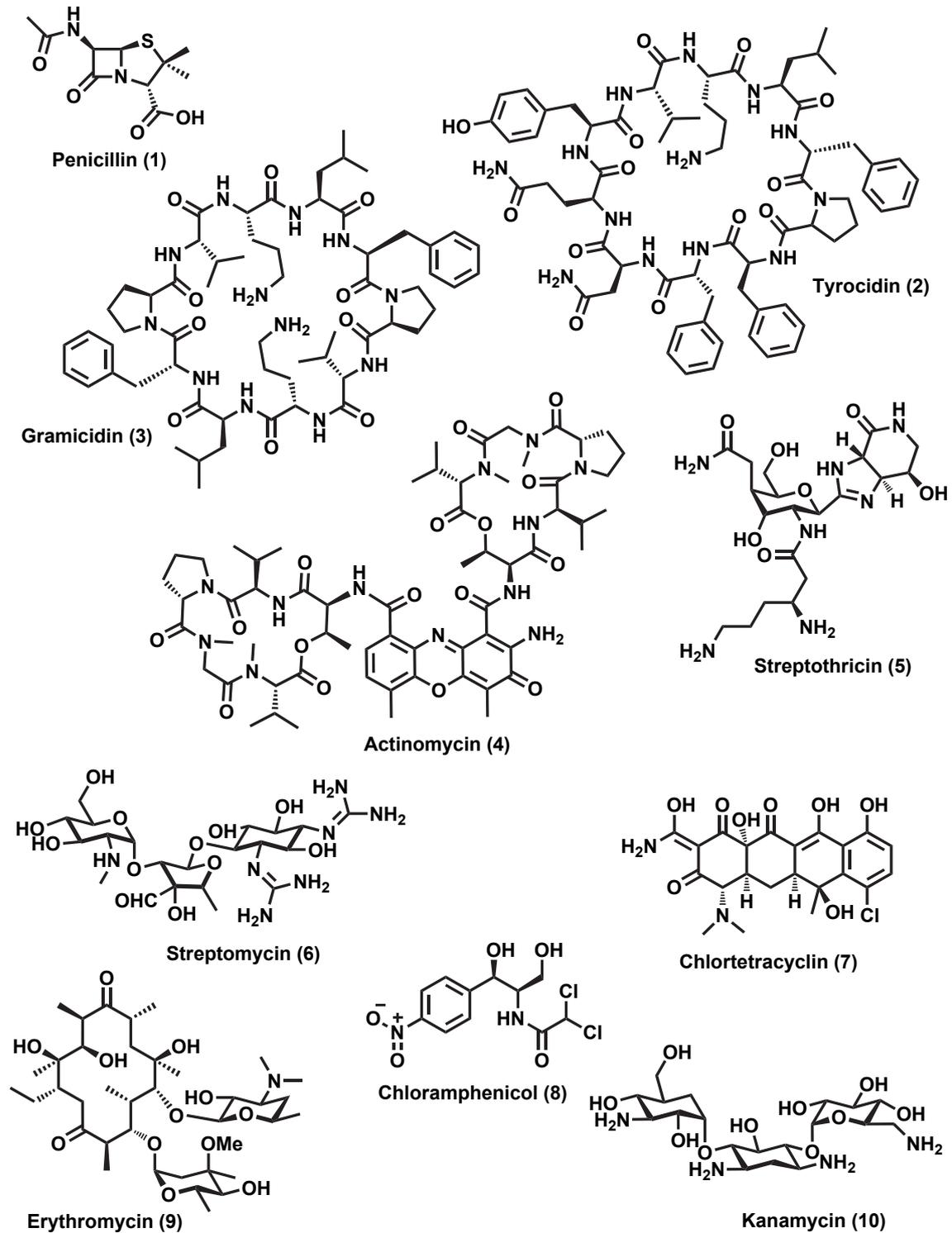


Abbildung 1.1: Beispiele einiger Antibiotika, die aus Actinomyceten isoliert wurden.

Bis heute wurden 67 % aller Antibiotika aus Actinomyceten isoliert, wobei 80 % davon von Streptomyceten produziert werden [6]. Allerdings können von diesen rund 5000 isolierten Verbindungen bis heute nur wenige therapeutisch eingesetzt werden. Da aber immer mehr Krankheitserreger Resistenzen gegen gängige Antibiotika entwickeln, ist das Interesse an neuen Naturstoffen nach wie vor sehr groß [7].

## 1.1 Streptomyceten

Vertreter der Gattung *Streptomyces*<sup>1</sup> sind Gram-positive Bakterien, die zur Ordnung der Actinomycetales gehören. Sie kommen zahlreich und ubiquitär im Boden vor und leisten dabei durch Produktion hydrolytischer Exoenzyme einen wichtigen Beitrag zum Abbau von Biopolymeren [8].

Streptomyceten zeichnen sich durch einen außergewöhnlichen Lebenszyklus aus, der anfänglich zur irrtümlichen Einordnung in die Familie der Pilze führte [9]. Erst 1961, nachdem gezeigt werden konnte, dass die genomische DNA von *Streptomyces coelicolor* nicht von einem Zellkern umschlossen ist, erfolgte die Eingruppierung in die Familie der Prokaryoten [10].

Während ihres Lebenszyklus durchlaufen Streptomyceten mehrere morphologisch verschiedene Stadien (Abb. 1.2). In ihrer Dauerform liegen sie als Sporen vor und überstehen so widrige Bedingungen wie Trockenheit oder Nährstoffmangel. Verbessern sich die äußeren Bedingungen, bilden sich zwei bis drei Keimschläuche aus, aus denen sich schließlich das Substratmyzel entwickelt. Nach kurzer Zeit bilden sich schließlich die Hyphen des Luftmyzels, aus denen durch Abschnürung neue Sporenketten hervorgehen [11].

### 1.1.1 Genetische Besonderheiten der Streptomyceten

Streptomyceten unterscheiden sich nicht nur in ihrem Lebenszyklus von vielen anderen Bakterien, sondern auch im Aufbau ihres Genoms. So besitzen sie mit 70-80 % einen weit höheren G/C-Anteil als viele andere Bakterien [12]. Außerdem ist das Genom linear und mit 8 bis 10 Mbp überdurchschnittlich groß [13]. *Escherichia coli* besitzt beispielsweise ein zirkulares Genom mit einer Größe von nur 4,6 Mbp [14].

---

<sup>1</sup>Im Folgenden als Streptomyceten bezeichnet

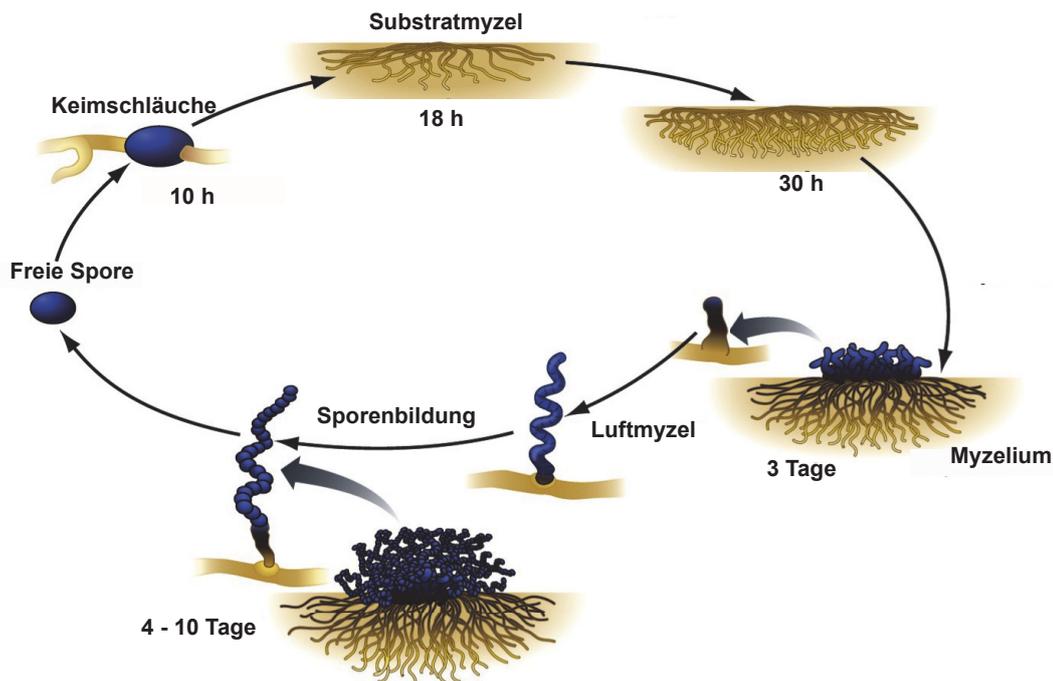


Abbildung 1.2: Lebenszyklus von Streptomyceten

Während sich die Gene für den Primärstoffwechsel hauptsächlich in der sogenannten *core*-Region des Chromosoms befinden, finden sich in den Randbereichen oder auf Plasmiden und Megaplasmiden bis zu 30 Gencluster für die Produktion von Sekundärmetaboliten [15]. Die Cluster sind dabei häufig von transposablen Elementen umgeben [16]. Transposable Elemente sind kurze DNA-Abschnitte, die ihre Position im Genom verändern können, wodurch auch gesamte Gencluster ihre Position wechseln oder dupliziert werden können. Auf den Plasmiden finden sich häufig Gene für Fertilitätsfaktoren, durch die eine Übertragung des vollständigen Plasmids auf eine andere Zelle durch Konjugation möglich wird [6].

Sowohl transposable Elemente als auch Plasmidübertragung durch Konjugation führen zu horizontalem Gentransfer von Biosyntheseclustern - unter anderem auch solchen, die für Resistenzen kodieren - auf andere Streptomyceten und sind damit hauptverantwortlich für das schnelle Auftreten Antibiotika resistenter Bakterien [17, 18].

### 1.1.2 Regulation des Sekundärmetabolismus

Obwohl Streptomyceten bis zu 30 Gencluster für verschiedene Sekundärmetabolite besitzen, werden die meisten Biosynthesecluster unter Kultivierungsbedingungen im Labor nicht exprimiert (sogenannte *silent gene cluster* oder stille Gencluster) [15]. Meist werden nur einige

Sekundärmetabolite vom Bakterium produziert, wobei die zugrundeliegende Regulation komplex und bis heute wenig verstanden ist. Viele Sekundärmetabolite wie Antibiotika werden in der stationären Phase des Bakterienwachstums in Flüssigkulturen bzw. während der Entwicklung des Luftmyzels auf festem Kulturmedium gebildet [6]. Zur direkten Stoffwechselregulation besitzen die meisten Gencluster spezifische Transkriptionsaktivatoren, welche wiederum von pleiotropen Regulatoren kontrolliert werden, die manchmal auch an der Ausbildung des Luftmyzels und der Sporen beteiligt sind [19].

Einen großen Einfluss auf die Produktion von Sekundärmetaboliten hat dabei die Verfügbarkeit von vorhandenen Nährstoffen. So wurde gezeigt, dass in *S. coelicolor* bei limitierter Stickstoffversorgung das hoch phosphorylierte Guanosin-Nukleotid (p)ppGpp und die ppGpp-Synthase (RelA) in die Aktivierung der Antibiotikabiosynthese involviert sind [20]. Ein Phosphatüberschuss bewirkt dagegen eine verminderte Biosynthese der Sekundärmetabolite [21]. Des Weiteren gibt es eine Vielzahl von extrazellulären Signalstoffen aus der Klasse der  $\gamma$ -Butyrolaktone, die von Streptomyceten produziert werden und die Produktion von Sekundärmetaboliten ebenfalls beeinflussen (*quorum sensing*) [19]. Um auch Zugang zu den Verbindungen der stillen Gencluster zu bekommen, wird deshalb heute vermehrt auf die Sequenzierung kompletter Genome gesetzt [15]. Dadurch lassen sich potentielle Gencluster ermitteln, durch Sequenzvergleich (BLAST) der einzelnen Gene das mögliche Produkt voraussagen<sup>2</sup> und anschließend der neue Naturstoff durch heterologe Expression produzieren [22, 23].

Eine Alternative bietet die Anzucht unter ungewöhnlichen Kultivierungsbedingungen, wodurch es zur Produktion neuer Sekundärmetabolite kommen kann. Ein Beispiel für ungewöhnliche Kultivierungsmethoden wurde von Linke *et al.* gezeigt. Hier wurde eine *Clostridium* sp. unter Zusatz von Kompostextrakten gezüchtet und so die Produktion von Closthioamid induziert [24]. Des Weiteren konnten Haferburg *et al.* zeigen, dass die Bildung unbekannter Verbindungen durch Schwermetallionen-Stress induziert werden kann [25]. Dazu wurden Streptomyceten von Uran-belasteten Böden in Thüringen, nickelhaltigen Böden in Italien und unbelasteten Böden isoliert und im Labor auf die Produktion unbekannter Verbindungen unter Schwermetallionen-Stress untersucht. Dabei zeigte sich, dass sowohl Streptomyceten, die von belasteten Böden isoliert wurden, als auch Streptomyceten von völlig unbelasteten Böden unter Stressbedingungen neue Verbindungen [25, 26] produzierten. Tanaka *et al.* konnten zeigen, dass auch *Streptomyces coelicolor* stark auf den Zusatz verschiedener Schwermetallsalze

---

<sup>2</sup>Dieses Vorgehen wird als *genome mining* bezeichnet.

aus der Gruppe der Seltenen Erden reagiert [27]. Besonders Scandium- und Lanthanionen führten zu einer starken Überproduktion des bereits bekannten Actinorhodins (**11**), aber auch zur Induktion schlafender Gencluster, wie mittels quantitativer real time PCR gezeigt werden konnte [27].

### 1.1.3 *Streptomyces coelicolor*

Einer der am besten untersuchten Vertreter der Streptomyceten ist *Streptomyces coelicolor*. Bereits 1908 wurde diese Art erstmals von Kartoffeln isoliert und als *Streptothrix coelicolor* beschrieben - erst später erhielt sie ihren heutigen Namen, *Streptomyces coelicolor* [28]. Intensive Untersuchungen vor allem von David Hopwood und die spätere Sequenzierung des Stammes durch das Sanger-Institut trugen sehr zum heutigen Verständnis über Streptomyceten bei [10, 29–33].

Der Stamm *S. coelicolor* A3(2) besitzt ein chromosomales Genom mit einer Größe von 8,67 Mbp, sowie ein lineares Plasmid (SPC1) mit einer Größe von 365 kbp und SPC2, ein zirkulares Plasmid mit einer Größe von 31 kbp. Auf den Plasmiden finden sich dabei Gene, die für verschiedene Regulationsproteine wie Sigma-Faktoren kodieren, sowie für Proteine, die auf der Sporenoberfläche zu finden sind [33–35]. Die Gencluster für die Sekundärmetabolite finden sich mit Ausnahme von Methylenomycin dagegen auf dem Chromosom.

*S. coelicolor* produziert verschiedene Sekundärmetabolite, wovon Actinorhodin (**11**) (Abb. 1.3) 1955 zuerst charakterisiert wurde [36]. Zunächst beschrieb man die Verbindung **11** als „der rote Farbstoff“, der beim Bedampfen rötlicher Kolonien mit Ammoniak einen Farbumschlag nach tiefblau bewirkte. Doch zeigten Kolonien diese intensiv blaue Farbe auch ohne das Einwirken irgendwelcher Basen. Erst 1996 konnten Bystrykh *et al.* zeigen, dass dies auf die Bildung der Lacton-Form und damit die Bildung von  $\gamma$ -Actinorhodin (**12**) zurückzuführen ist [37]. Ab 1980 folgten die Entdeckung von Undecylprodigiosin (**13**) und Streptorubin B (**14**), auf die im folgenden Kapitel näher eingegangen wird [30, 38]. 1976 konnte in *S. coelicolor*-Mutanten, welche das Plasmid SCP1 tragen, Methylenomycin (**15**) nachgewiesen werden, welches erstmals zwei Jahre zuvor im nahen Verwandten *Streptomyces violaceoruber* identifiziert wurde. Als letztes wurde das *calcium-dependent lipopeptide antibiotic* (CDA) (**16**) isoliert<sup>3</sup> [40]. Außerdem produziert *S. coelicolor* die leichtflüchtigen Verbindungen

---

<sup>3</sup>Die vollständige chemische Charakterisierung erfolgte erst 1997 durch Kemper *et al.* (Abb. 1.3 am Beispiel von CDA1b) [39].

dungen Geosmin (**17**) und Methylisoborneol (**18**), die für den typischen Geruch von feuchtem Waldboden verantwortlich sind [41, 42].

Dass die Biosynthese der *S. coelicolor*-Antibiotika stark von äußeren Bedingungen abhängig ist, konnte in mehreren Versuchen gezeigt werden [19, 43, 44]. So haben Schwermetallionen auch in diesem Stamm einen Einfluss auf die Regulation von Sekundärmetaboliten. Unter dem Einfluss einiger Metallionen aus der Gruppe der Seltenen Erden konnte eine stark gesteigerte Actinorhodin-Produktion beobachtet werden, wohingegen Salz-Stress eine starke Induktion der Prodigiosin-Biosynthese bewirkte [27, 45, 46].

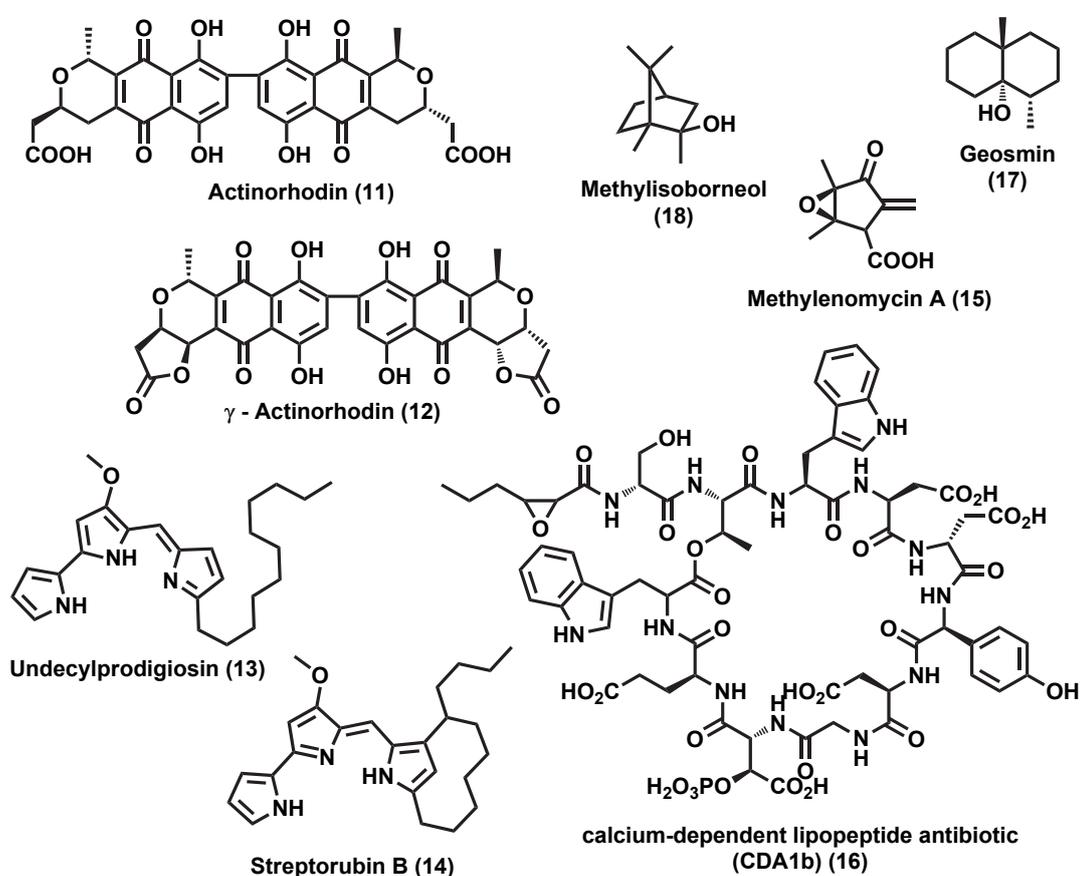


Abbildung 1.3: Isolierte Sekundärmetabolite aus *S. coelicolor*.

## 1.2 Prodigiosine

Prodigiosine sind eine Klasse von intensiv rot gefärbten Sekundärmetaboliten, die von verschiedenen Actinobacteria, darunter auch *S. coelicolor*, und anderen Eubacteria gebildet werden. Obwohl der Farbstoff Prodigiosin (**19**) aus *Serratia marcescens* bereits zu Beginn des 20. Jahrhunderts isoliert wurde, konnte die Struktur bis 1960 nicht aufgeklärt werden [47]. Berühmtheit erlangte dieses intensiv rot gefärbte Bakterium allerdings schon im 13. Jahrhundert als sogenanntes 'Wunder von Bolsena' [48]. Dabei entdeckte ein Priester 1263 im italienischen Bolsena „Blut“ auf einem Stück Messbrot. Heute weiß man, dass die blutrote Farbe durch Prodigiosin produzierende *S. marcescens* Kolonien verursacht wird [48]. Von diesen und anderen Blutwundern leitet sich *Bacterium prodigiosum*, der ursprüngliche Name von *S. marcescens*, und die spätere Bezeichnung der Prodigiosine ab - lateinisch: prodigium, „Wunderzeichen“.

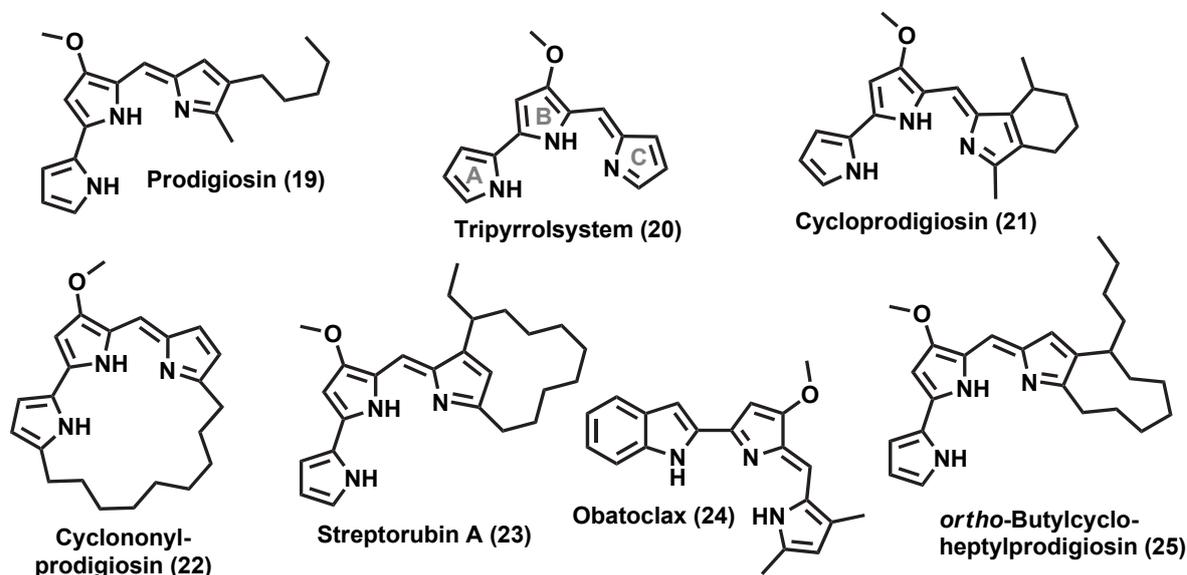
Nach Prodigiosin wurden nach und nach immer mehr Prodigiosin-ähnliche Verbindungen aus verschiedenen Bakterien isoliert. Da die systematischen Namen der Substanzen lang und kompliziert waren, schlug Nancy Gerber deshalb den Namen Prodiginin für alle Verbindungen vor, die als Grundeinheit das konjugierte Tripyrrolosystem (**20**) aufweisen [49].

Die verschiedenen Derivate unterscheiden sich dabei in Länge und Substitutionsmuster der Alkylkette am C-Ring des Grundgerüsts (Abb. 1.4). Man unterteilt in Vertreter mit linearer Seitenkette wie Prodigiosin und Undecylprodigiosin (**13**) aus *S. coelicolor* und Vertreter mit cyclischer Seitenkette, zu welchen Butyl-*meta*-cycloheptylprodigiosin (**14**) (später als Streptorubin B<sup>4</sup> bezeichnet) ebenfalls aus *S. coelicolor*, Cycloprodigiosin (**21**) aus *Vibrio gazogenes* oder *Pseudoalteromonas rubra*, sowie Cyclononylprodigiosin (**22**) aus *Actinomadura pelletieri* zählen (Abb. 1.4). Letzteres stellt dabei eine Besonderheit unter den Prodigiosinen dar, da es als einziges eine Verknüpfung der Seitenkette zum A-Ring zeigt [50].

Großes pharmakologisches Interesse weckt die Klasse der Prodigiosine durch ihr hohe biologische Aktivität. Obwohl es bis heute aufgrund der hohen unspezifischen Toxizität durch Abbau doppelsträngiger DNA in Gegenwart von Kupferionen noch keine klinische Verwendung für die Verbindungen gibt, ist das Interesse daran dennoch ungebrochen [48, 51]. Allerdings zeigen verschiedene Prodigiosine bereits vielversprechende Wirkung als immunsuppressive Wirkstoffe, sowie die zyklischen Vertreter, allen voran Streptorubin A (**23**), anti-Malaria-Aktivität [52–57]. Außerdem befindet sich das synthetische Prodigiosin-Derivat

<sup>4</sup>Die Bezeichnung Streptorubin B wird im Folgenden für die gesamte Arbeit verwendet.

Obatoclax (**24**) (Abb. 1.4) derzeit in Phase 1/2 klinischer Studien und zeigt bis jetzt hervorragende Wirkeigenschaften in onkologischen Tests [58].

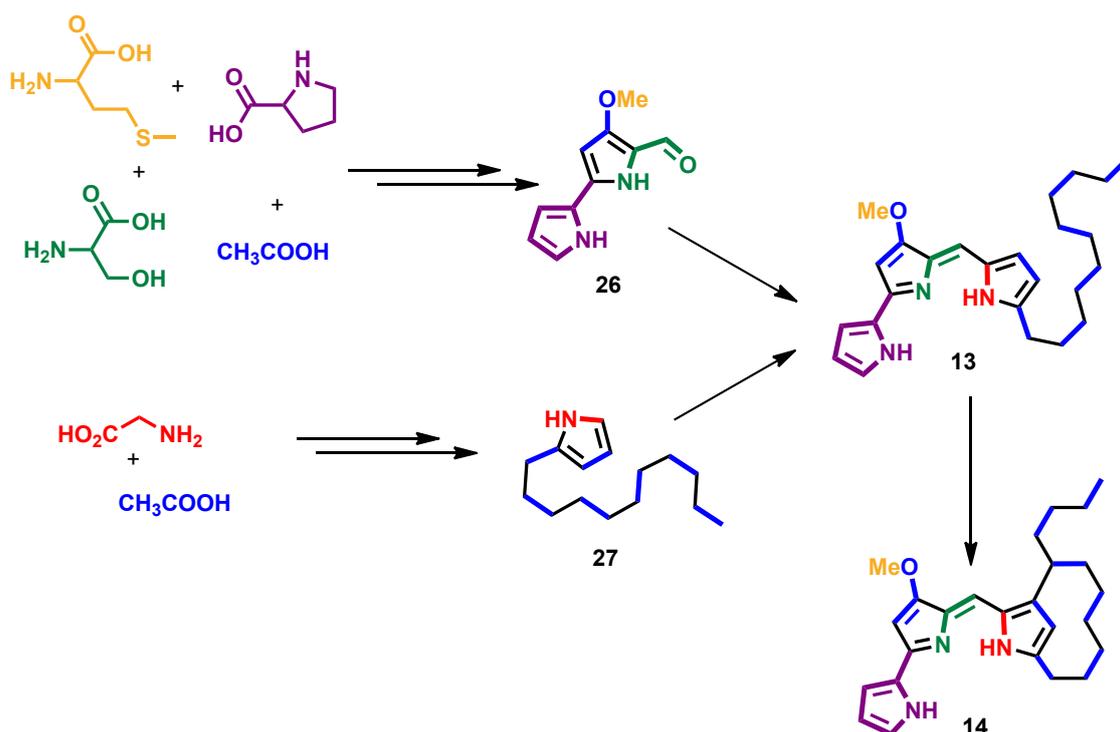


**Abbildung 1.4:** Der Grundaufbau der Prodigiosine (**20**) und Beispiele einiger Prodigiosine, darunter das synthetische Obatoclax (**24**).

### 1.2.1 Frühe Studien zur Biosynthese von Undecylprodigiosin und Streptorubin B

Während Mutagenese-Arbeiten zur Aufklärung der Biosynthese von Actinorhodin (**11**) stellten Hopwood und Rudd 1980 fest, dass *S. coelicolor* neben den schon bekannten Verbindungen Actinorhodin (**11**) und Methylenomycin A (**15**) noch ein drittes Antibiotikum produziert [30]. Aufgrund der roten Farbe der Verbindung und dem typischen Farbwechsel von rot nach gelb im Basischen, vermuteten sie bereits, dass es sich dabei um ein Prodigiosin handeln könnte. Der endgültige Beweis erfolgte aber erst 5 Jahre später durch Tsao und Rudd, die zeigen konnten, dass es sich bei dem roten Sekundärmetabolit aus *S. coelicolor* um eine Mischung aus Undecylprodigiosin (**13**) und Butylcycloheptylprodigiosin (**25**) handelt. Dabei ging man anfangs fälschlicherweise vom *ortho*-Isomer **25** aus. Erst 1991 kamen Zweifel auf und es wurde vorgeschlagen die Struktur zugunsten von Streptorubin B zu revidieren [59]. Die *meta*-verbrückte Struktur der Alkylkette und damit die Bildung eines 10-Ringes in Streptorubin B (**14**) konnte schließlich 1998 durch Totalsynthese nachgewiesen werden [60].

Bereits in den siebziger Jahren wurden Studien zur Aufklärung der Prodigiosin-Biosynthese durchgeführt. 1973 konnte Wasserman durch Verfütterung der  $^{13}\text{C}$ -markierten Aminosäuren



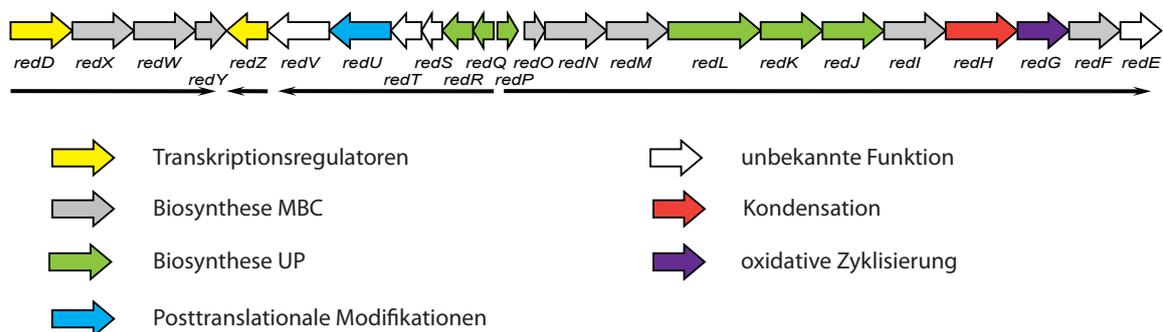
**Abbildung 1.5:** Biosynthese von Undecylprodigiosin (**13**) und Streptorubin B (**14**) aus den Aminosäuren Prolin (violett), Serin (grün), Methionin (gelb) und Glycin (rot), sowie Acetat (blau).

Serin, Glycin, Prolin und Methionin an *S. marcescens* deren Einbau mittels NMR-Spektroskopie zeigen [61]. Durch die strukturelle Identität der Bipyrrol-Untereinheit (Pyrrolring A und B), nahm man auch für Undecylprodigiosin die Aminosäuren Prolin und Serin als Vorstufe der Pyrrolringe, sowie Methionin als Vorläufer der Methoxygruppe an. Spätere Studien an *Streptomyces longispororuber*, welches genau wie *S. coelicolor* Undecylprodigiosin produziert, bestätigten diese Vermutung [62]. Außerdem konnte in der gleichen Studie gezeigt werden, dass Pyrrolring C, sowie die Alkylkette aus Glycin und Acetat aufgebaut werden (Abb. 1.5). Des Weiteren wurde aufgrund des selben Einbaumusters der  $^{13}\text{C}$ -Markierungen in Streptorubin A (**23**), des zweiten Sekundärmetaboliten aus *S. longispororuber*, klar, dass dieses auf dem gleichen Biosyntheseweg wie Undecylprodigiosin entsteht. Daraufhin nahm man für die Biosynthese zunächst die Bildung von 4-Methoxy-2,2'-bipyrrol-5-carboxaldehyd (**26**) (MBC) und 2-Undecylpyrrol (**27**) (UP) als zwei Vorstufen an, aus denen Undecylprodigiosin (**13**) und Streptorubin A (**23**) entstehen. Kurze Zeit später konnte gezeigt werden, dass Streptorubin B (**14**) auf die gleiche Weise entsteht [63].

## 1.2.2 Das Prodigiosin-Biosynthesecluster (*red*-Cluster)

Das *red*-Gencluster wurde 2002 mit der vollständigen Sequenzierung des Genoms von *S. coelicolor* zugänglich [33]. Zuvor gab es bereits Studien mit *knock-out*-Mutanten, die klassisch durch Mutation mittels UV-Licht erzeugt wurden [30]. Durch Komplementationsstudien einer Mutante mit anderen Mutanten konnten DNA-Abschnitte identifiziert werden, die zur Bildung von Undecylprodigiosin benötigt werden [31, 64]. Dadurch wurde es möglich alle benötigten Gene für die Biosynthese heterolog in *Streptomyces parvulus*, welcher das *red*-Cluster selbst nicht besitzt, zu exprimieren [65].

Durch die Genomsequenzierung konnte man das *red*-Cluster schließlich auch auf genetischer Ebene weiter untersuchen. Es umfasst insgesamt 23 Gene, die in vier Transkriptionseinheiten unterteilt sind (Abb. 1.6). Sequenzvergleiche mit Genen bekannter Funktion (BLAST) machten eine Zuordnung putativer Funktionen zu einzelnen Gene möglich [66]. In zahlreichen Studien konnten diese Funktionen nach und nach bestätigt werden [67–70].



**Abbildung 1.6:** Das *red*-Biosynthesecluster aus *S. coelicolor* [66].

Heute weiß man, dass für die Bildung von Undecylpyrrol (**27**) sechs Gene und für die Bildung von 4-Methoxy-2,2'-bipyrrrol-5-carboxaldehyd (**26**) sieben Gene benötigt werden. Des Weiteren kodiert das Gen *redH* für das Enzym, das die Kondensation von Undecylpyrrol (**27**) mit 4-Methoxy-2,2'-bipyrrrol-5-carboxaldehyd (**26**) katalysiert [67]. Für die oxidative Zyklisierung der Alkylkette zu Streptorubin B wird das Gen *redG* benötigt, welches Ähnlichkeiten zu Eisen-abhängigen nicht-Häm Rieske-Oxidase zeigt [71]. Außerdem gibt es zwei spezifische Transkriptionsregulatoren *redD* und *redZ* [72–74]. Die Funktionen von *redE*, *redF*, *redS*, *redT* und *redV* sind weitgehend unbekannt. Einzig das Gen *redT* scheint eine

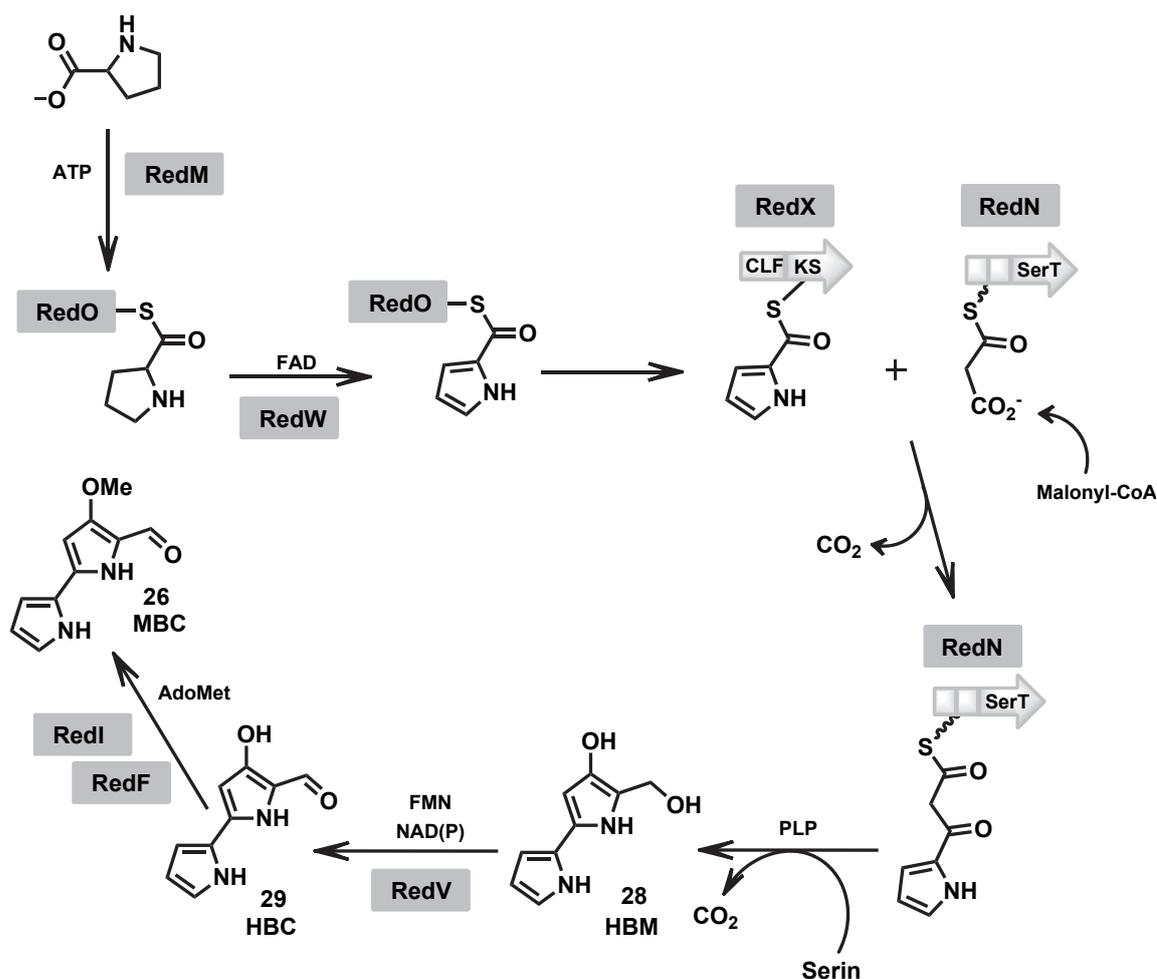
Rolle in der Biosynthese zu spielen, da *knock-out*-Mutanten des Gens eine stark verminderte Undecylprodigiosin-Produktion zeigten [75].

### 1.2.3 Die Biosynthese von 4-Methoxy-2,2'-bipyrrol-5-carboxaldehyd (MBC) (26)

Untersuchungen zur Biosynthese von 4-Methoxy-2,2'-bipyrrol-5-carboxaldehyd (26) wurden hauptsächlich in *S. marcescens* durchgeführt. Dabei wurden *knock out*-Mutanten jedes Biosynthese-Gens hergestellt, die akkumulierten Zwischenstufen mittels LC-MS analysiert, sowie die der vollständige Biosyntheseweg durch *cross feeding* mit anderen Mutanten oder durch Komplementation des *knock outs* wieder hergestellt. Dadurch konnte jedem Enzym eine spezifische Rolle in der Biosynthese zugewiesen werden [76]. Da in *S. coelicolor* homologe Proteine zu denen aus *S. marcescens* zu finden sind, wird ein identischer Biosyntheseweg angenommen [77].

Die Biosynthese von MBC (26) beginnt mit der RedM-, RedO- und RedW-abhängigen Oxidation von Prolin zu einem Pyrrolring [66, 76, 78]. Dabei wird Prolin zunächst durch RedM als AMP-Ester aktiviert und anschließend auf die Thiol-Gruppe der Phosphopantethein-Untereinheit des Peptidyl-Carrier-Proteins (PCP) RedO übertragen. Anschließend erfolgt durch RedW die Oxidation zu Pyrrolyl-2-carboxy-S-PCP (Abb. 1.7). Zusätzlich wird für diesen ersten Schritt RedU, eine 4'-Phosphopantetheinyltransferase benötigt, welche die inaktive (apo) Form des PCP durch Übertragung einer Phosphopantetheinyl-Gruppe auf einen konservierten Serin-Rest in die aktive (holo) Form überführt [68].

Im nächsten Schritt erfolgt eine Polyketid-artige Kettenverlängerung des Pyrrolyl-2-carboxy-S-PCP-Intermediates [68, 76, 77]. Zunächst wird dazu die Pyrrolyl-2-carboxy-Einheit von RedO auf einen Cystein-Rest im aktiven Zentrum von RedX übertragen. Außerdem wird eine Malonyl-Gruppe aus Malonyl-S-CoA stammend auf das Acyl-Carrierprotein (ACP) von RedN übertragen, welche anschließend unter Decarboxylierung an den Pyrrolyl-2-carboxy-Thioester kondensiert. Der daraus entstehende Pyrrolyl- $\beta$ -ketothioester kondensiert im Anschluss ebenfalls im RedN-Enzymkomplex unter Abspaltung von Kohlendioxid mit Serin zu 4-Hydroxy-2,2'-bipyrrol-5-methanol (HBM) (28). Durch RedV erfolgt dann die Oxidation der Alkoholgruppe zum 4-Hydroxy-2,2'-bipyrrol-5-carboxyaldehyd (HBC) (29). Die Methylierung der Hydroxygruppe zu 4-Methoxy-2,2'-bipyrrol-5-carboxaldehyd (26) erfolgt durch RedI, einer SAM-abhängigen Methyltransferase. Dabei scheint auch RedF eine entscheidende Rolle zu spielen, wobei die genaue Funktion unklar ist [31, 64, 77].

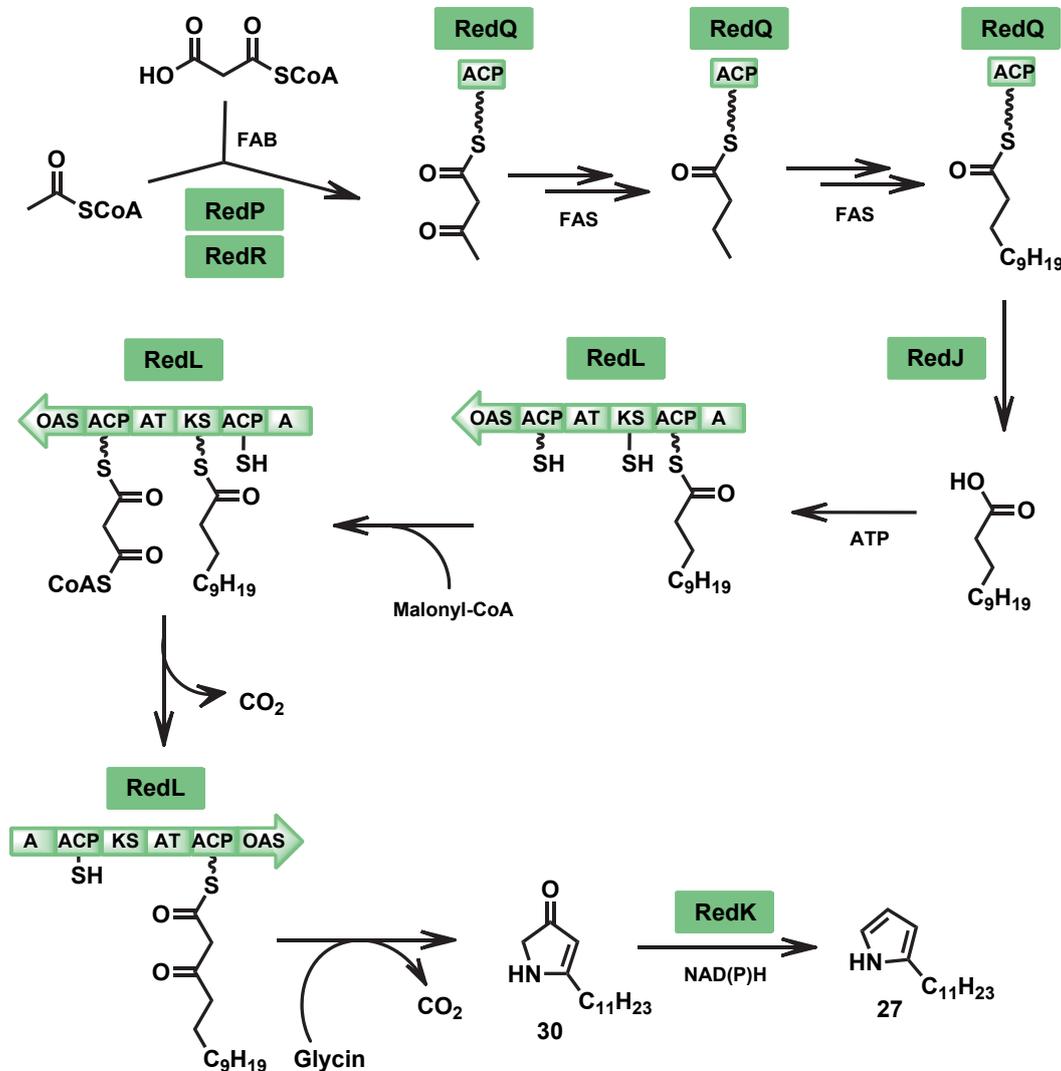


**Abbildung 1.7:** Schema der Biosynthese von 4-Methoxy-2,2'-bipyrrrol-5-carboxyaldehyd (**26**) (MBC) in *S. coelicolor* nach Williamson *et al.* [77]. CLF: *chain length factor*, KS: Ketosynthase, SerT: Seryltransferase

#### 1.2.4 Die Biosynthese von 2-Undecylpyrrol (UP) (**27**)

Die Biosynthese von 2-Undecylpyrrol (UP) (**27**) wurde intensiv von Mo *et al.* studiert [69, 79]. Zunächst war nur die Rolle von RedP als erstem Enzym in der Biosynthese von UP (**27**) bekannt. *Knock out*-Mutanten dieses Enzyms zeigten eine stark verminderte Biosynthese von UP (**27**). Die Produktion konnte entweder durch eine Komplementierung mit dem Gen selbst oder aber durch FabH aus *Streptomyces glaucescens* wieder hergestellt werden, wobei es jedoch zu Nebenprodukten mit längeren und verzweigten Alkylketten kam [79]. FabH ist eine Typ III 3-Ketoacyl-Acetyl-Carrier-Protein-Synthase und damit das erste Enzym der Fettsäuresynthese im Typ II Fettsäuresynthase-Komplex von Bakterien [80]. RedR stellt ein Homolog der Typ II 3-Ketoacyl-Acetyl-Carrier-Protein-Synthase (FabF) dar [66]. Beide Enzyme, RedP

und RedR, katalysieren gemeinsam die Bildung einer RedQ-aktivierten-Dodekansäure, welche analog der Fettsäuresynthese verläuft (Abb. 1.8).



**Abbildung 1.8:** Schema der Biosynthese von 2-Undecylpyrrol (27) in *S. coelicolor* nach Williamson *et al.* [77]. A: Adenylierungsdomäne, ACP: Acyl-Carrierprotein, AT: Acetyltransferase, KS: Ketosynthase, OAS:  $\alpha$ -Oxoaminsynthase

Zunächst wird durch RedP eine Acetyl-S-CoA-Startereinheit mit einer an RedQ gebundenen Malonyl-Einheit kondensiert, welches dann durch die Ketoreduktase, die Dehydratase und die Enoylreduktase einer Fettsäuresynthese Typ II zu Butyryl-S-RedQ reduziert wird [79]. Anschließend erfolgt eine Verlängerung der Kette mit vier Malonyl-S-CoA-Einheiten durch RedR. Der entstandene Dodekanoyl-Thioester wird anschließend auf RedL übertragen [77].

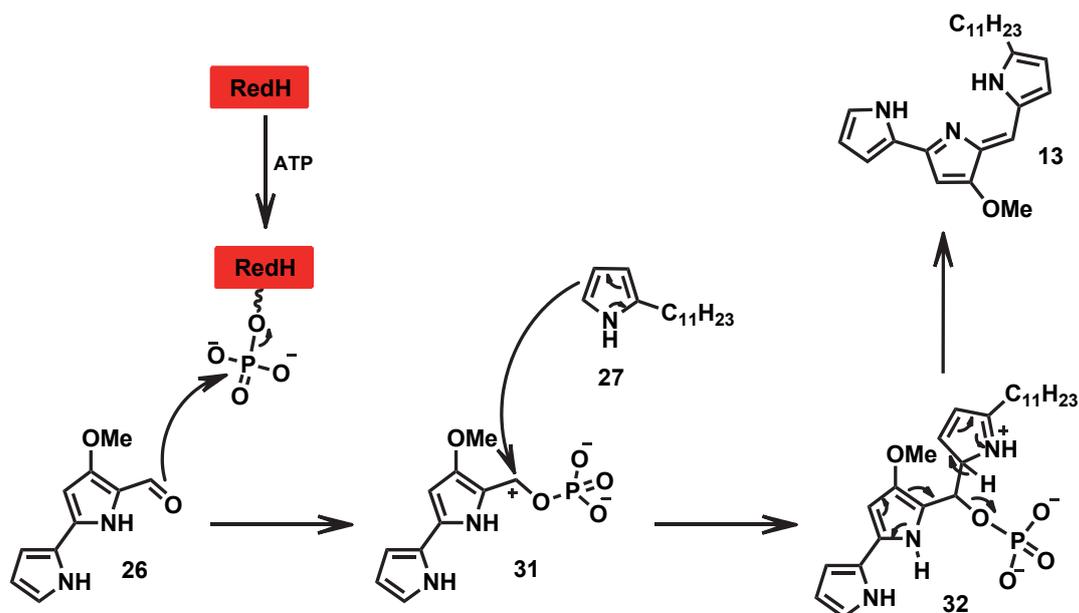
Hierbei wurden lange Zeit zwei Mechanismen diskutiert: Einerseits wäre eine direkte Übertragung durch Transacetylierung von Dodekanoyl-S-RedQ auf einen Cystein-Rest im aktiven Zentrum der Ketosynthaseuntereinheit von RedL denkbar, andererseits wäre eine Hydrolyse des Dodekanoyl-Thioesters zu Dodekansäure aus dem RedQ-Komplex möglich, welche anschließend durch Adenylierung aktiviert und auf die *N*-terminale ACP-Einheit von RedL übertragen wird [69]. Whicher *et al.* zeigten 2011, dass die Thioesterase RedJ den Dodekanoyl-S-ACP(RedQ)-Komplexes selektiv hydrolysiert und somit zunächst Dodekansäure gebildet wird, die anschließend neu an RedL gebunden wird [70]. Jedoch konnte die Produktion von Undecylprodigiosin in  $\Delta redJ$ -Mutanten nicht einfach durch Verfütterung von Dodekansäure wieder hergestellt werden, was auf einen komplexen Zusammenhang der Enzyme RedP, RedR, RedQ, RedJ und RedL schließen lässt, der weiter untersucht werden muss [70].

Nach Übertragung der Dodekanoyl-Gruppe auf RedL erfolgt die Bildung von 2-Undecylpyrrolin-4-on. RedL ist aus einer Adenylierungsdomäne (A), zwei Acetyl-Carrier-Proteinen (ACP), einer Acetyltransferase (AT), einer Ketosynthase (KS) sowie einer  $\alpha$ -Oxoaminsynthase (OAS) aufgebaut [69]. Zunächst erfolgt unter Decarboxylierung durch die Ketosynthase eine Kettenverlängerung durch Kondensation mit einem Malonyl-Thioester, welcher an die *C*-terminale ACP-Domäne von RedL gebunden ist. Durch die OAS-Domäne erfolgt im Anschluss die Kondensation mit Glycin zu einer  $\beta$ -Keto- $\alpha$ -Aminosäure, und schließlich durch Decarboxylierung, Zyklisierung und Dehydratisierung die Bildung von 2-Undecylpyrrolin-4-on (**30**) [69]. Im letzten Schritt erfolgt durch RedK die Reduktion der Ketogruppe zum Alkohol mit anschließender Dehydratisierung zu 2-Undecylpyrrol (**27**) [66, 69].

### 1.2.5 Kondensation von 4-Methoxy-2,2'-bipyrrol-5-carboxyaldehyd und Undecylpyrrol zu Undecylprodigiosin und anschließende oxidative Zyklisierung zu Streptorubin B

Die Reaktion von 4-Methoxy-2,2'-bipyrrol-5-carboxyaldehyd (**26**) mit Undecylpyrrol (**27**) zu Undecylprodigiosin (**13**) wird durch RedH katalysiert [67]. RedH besitzt dabei drei funktionelle Domänen: eine ATP-Binde-Domäne wie man sie auch in der Phosphoenolpyruvat-synthase (PEP-Synthase) findet, eine Phosphotransferdomäne wie in der Pyruvat-Phosphat-Dikinase (PPDK) und eine dritte Domäne, die keine Sequenzähnlichkeit zu bekannten Proteinen aufweist [66]. In Analogie zu PEP-Synthase und PPDK nimmt man einen Mechanismus an, in dem RedH die ATP-abhängige Phosphorylierung des Aldehyd-Sauerstoffs von

4-Methoxy-2,2'-bipyrrol-5-carboxyaldehyd katalysiert (**31**), wodurch der Carbonyl-Kohlenstoff für nukleophile Angriffe aktiviert wird (Abb. 1.9) [67]. Dadurch wird der Angriff des C-5-Atoms von Undecylpyrrol (**27**) möglich (**32**), was zur Übertragung und damit Abspaltung des Aldehydsauerstoffs an das Phosphat führt [67].



**Abbildung 1.9:** Kondensation von 4-Methoxy-2,2'-bipyrrol-5-carboxyaldehyd (**26**) und 2-Undecylpyrrol (**27**) zu Undecylprodigiosin (**13**) durch RedH nach Haynes *et al.* [67]

Die weitere Zyklisierung von Undecylprodigiosin (**13**) zu Streptorubin B (**14**) erfolgt durch das Enzym RedG [66, 71]. Das Enzym zeigt große Ähnlichkeit zu Rieske-Oxygenasen, wie der Naphtalin-Dioxygenase [81]. Es besitzt die typischen CXH und CXXH Sequenzmotive in der *N*-terminalen Domäne des Enzyms, die für den Aufbau des [2Fe-2S]-Rieske Clusters verantwortlich sind [81], sowie das DXHX<sub>4</sub>H-Motiv in der C-terminalen Domäne des Enzyms, welches in den Elektronentransfer vom Rieske-Cluster auf ein nicht-Häm-gebundenes Eisenatom involviert ist [81].

Der genaue Mechanismus ist noch ungeklärt. Es wird diskutiert, ob die Zyklisierung über ein Fe<sup>IV</sup>=O-Intermediat oder aber über ein Fe<sup>III</sup>-OOH/(OH)Fe<sup>V</sup>=O-Intermediat verläuft [71]. Ein Vorschlag für den Reaktionsmechanismus ist in Abb. 1.10 angegeben.

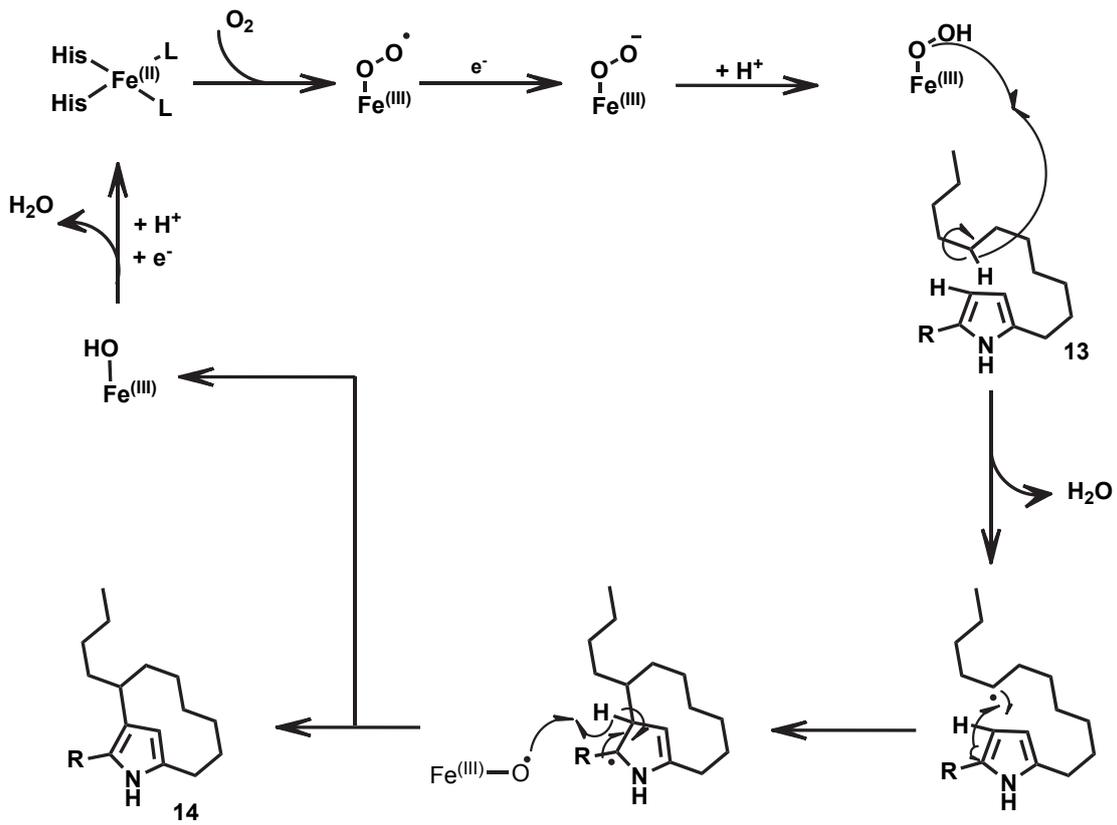


Abbildung 1.10: Vorschlag für den Reaktionsmechanismus der oxidativen Zyklisierung von Undecylprodigiosin (13) zu Streptorubin B (14) durch RedG nach Haynes [75]

## 2 Zielstellung

Bakterielle Sekundärmetabolite sind bis heute die größte Quelle antibiotisch wirksamer Verbindungen [4]. Aufgrund des verstärkten Auftretens multiresistenter Bakterien, wie beispielsweise dem Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus*, wird weiter intensiv nach neuen, antibiotisch wirksamen Verbindungen gesucht. Actinomyceten sind dabei vielversprechende Kandidaten, um noch unbekannte Verbindungen zu isolieren, besitzen sie doch viele Gencluster für unterschiedliche Sekundärmetabolite in ihrem Genom [6, 15]. Die Bildung dieser Verbindungen ist jedoch streng reguliert. Unter Standardkultivierungsbedingungen werden häufig nur einige wenige Sekundärmetabolite produziert. Die Aktivierung der restlichen, so genannten *silent gene cluster*, ist somit eine vielversprechende Möglichkeit, um neue Sekundärmetabolite zu isolieren.

Im Rahmen dieser Dissertation sollte deshalb die Produktion von Sekundärmetaboliten durch Schwermetallionen-Stress im Modellorganismus *Streptomyces coelicolor* angeregt und neu gebildete Verbindungen charakterisiert werden.

In der Dissertation von Anne Behrend, welche die Grundlage dieser Arbeit bildet, konnten unter Kobaltionen-Stress mehrere Phänotypen von *S. coelicolor* isoliert werden, welche im Vergleich zum ungestressten Wildtyp eine stark reduzierte Sporenbildung zeigten oder intensiv pigmentiert waren [82]. Neben verschiedenen mehrfarbigen und einem blauen Phänotyp wurde auch ein intensiv rot gefärbter Phänotyp isoliert. Außer Undecylprodigiosin (**13**) und Streptorubin B (**14**), welche für die intensive Rotfärbung der Kolonien verantwortlich sind, produziert dieser Phänotyp noch andere, bislang unbekannte Sekundärmetabolite. Daher sollten in der vorliegenden Dissertation die folgenden Punkte bearbeitet werden:

- Zunächst sollten die unbekanntesten Verbindungen aus dem komplexen Gemisch an produzierten Substanzen isoliert werden. Dazu sollten verschiedene Trennungsmethoden, wie Größenausschluss-, Normal- und Umkehrphasenchromatographie, semipräparative HPLC oder Festphasenextraktion (SPE) so kombiniert werden, dass eine möglichst

schnelle, einfache und effiziente Isolierung möglich ist. Im Anschluss sollten die isolierten Verbindungen charakterisiert und ihre Strukturen durch hochauflösende Massenspektrometrie, Tandemmassenspektrometrie, sowie 1D- und 2D-NMR-Spektroskopie aufgeklärt werden.

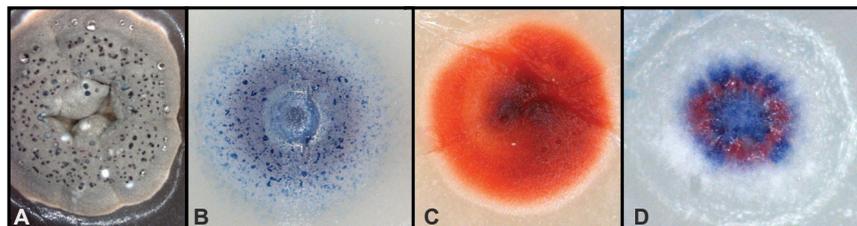
- Nach erfolgreicher Isolierung der reinen Substanzen sollten diese auf ihre biologische Funktion untersucht werden. Dazu sollten die komplexierenden Eigenschaften der Verbindungen gegenüber den eingesetzten Schwermetallionen studiert werden. Außerdem sollte auf ihre antiproliferativen und zytotoxischen Eigenschaften getestet werden.
- Da sich im Verlaufe der Arbeit herausstellte, dass es sich bei den neuen Verbindungen um Prodigiosin-Derivate handelt, sollten bekannte und vermutete Vor- und Zwischenstufen aus der Prodigiosin-Biosynthese synthetisiert und an *S. coelicolor* verfüttert werden, um Einblicke in die Biosynthese der neuen Verbindungen zu erhalten. Außerdem sollte mittels quantitativer RT-PCR die Aktivität der Biosynthesegene bei Schwermetallionen-Stress analysiert werden.
- Des Weiteren sollte untersucht werden, ob die Bildung neuer Prodigiosin-Derivate nicht nur in *S. coelicolor* bei Metallionen-Stress auftritt. Dazu sollten verschiedene Prodigiosin-produzierende Bakterien unter Kobaltionen-Stress kultiviert und auf die Bildung neuer Derivate untersucht werden.

Damit sollte durch die vorliegende Dissertation ein Beitrag zur intensiven Suche nach neuen bioaktiven Naturstoffen geleistet werden, indem unbekannte Verbindungen isoliert und charakterisiert werden.

### 3 Ergebnisse und Diskussion

Die Produktion von Sekundärmetaboliten in *S. coelicolor* ist sehr stark von den Kultivierungsbedingungen abhängig, wobei verschiedene Faktoren ihre Biosynthese induzieren können [44]. Neben dem Einfluss von Nährstoffverfügbarkeit und chemischen Signalmolekülen ( $\gamma$ -Butyrolaktonen), spielen vor allem Stressbedingungen eine große Rolle [27, 44–46, 83]. Bereits seit 1990 werden die Auswirkungen verschiedener Schwermetallionen auf die Produktion von Actinorhodin (**11**) untersucht. Abbas *et al.* zeigten, dass unter Einfluss von Cadmium-, Nickel-, Kupfer-, Mangan-, Kobalt-, Blei- oder Quecksilberionen sowohl die Biomasse- als auch die Actinorhodin-Produktion stark reduziert sind [83]. Chrom- und Zinkionen führten dagegen zu einer verstärkten Actinorhodin-Bildung, verhielten sich jedoch unterschiedlich in Bezug auf den Biomassezuwachs. Wirkten diese Metallionen zumeist noch inhibierend auf die Actinorhodin-Synthese, bewirken die Metallionen der Seltenen Erden genau den gegenteiligen Effekt [27, 45]. Vor allem Scandium- und Lanthanionen führten zu einem starken Konzentrationsanstieg des blauen Pigments **11** in *S. coelicolor*. Ein Einfluss auf die Undecylprodigiosin-Biosynthese wurde aber bisher mit keinem der getesteten Metallionen beobachtet. Allerdings konnten Servcikova *et al.* einen Anstieg der Undecylprodigiosin-Produktion unter erhöhten Natriumchloridkonzentrationen (2,5 % w/v) nachweisen, wobei die Actinorhodin-Produktion ebenfalls erhöht war [46].

Anne Behrend konnte erstmals in ihrer Dissertation zeigen, dass *S. coelicolor* unter Einfluss von Kobaltionenstress zur Bildung mehrerer Phänotypen neigt, die sich in der Produktion ihrer Sekundärmetabolite stark voneinander und auch vom Wildtyp unterscheiden [82]. Eines der auffälligsten Merkmale war die im Vergleich zum Wildtyp verminderte Fähigkeit Sporen zu bilden. Außerdem traten intensiv pigmentierte Phänotypen auf, die sich deutlich in der Produktion von Actinorhodin (**11**) und Undecylprodigiosin (**13**) unterschieden. Insgesamt wurden von A. Behrend zwei farbige Phänotypen isoliert: ein intensiv blau gefärbter Phänotyp sowie ein stark rot gefärbter Phänotyp (Abb. 3.1). Außerdem traten gemischtfarbige Kolonien auf.



**Abbildung 3.1:** Auftretende Phänotypen von *S. coelicolor* unter Kobaltionenstress. A: Wildtyp, B: blauer Phänotyp, C: roter Phänotyp, D: gemischter Phänotyp

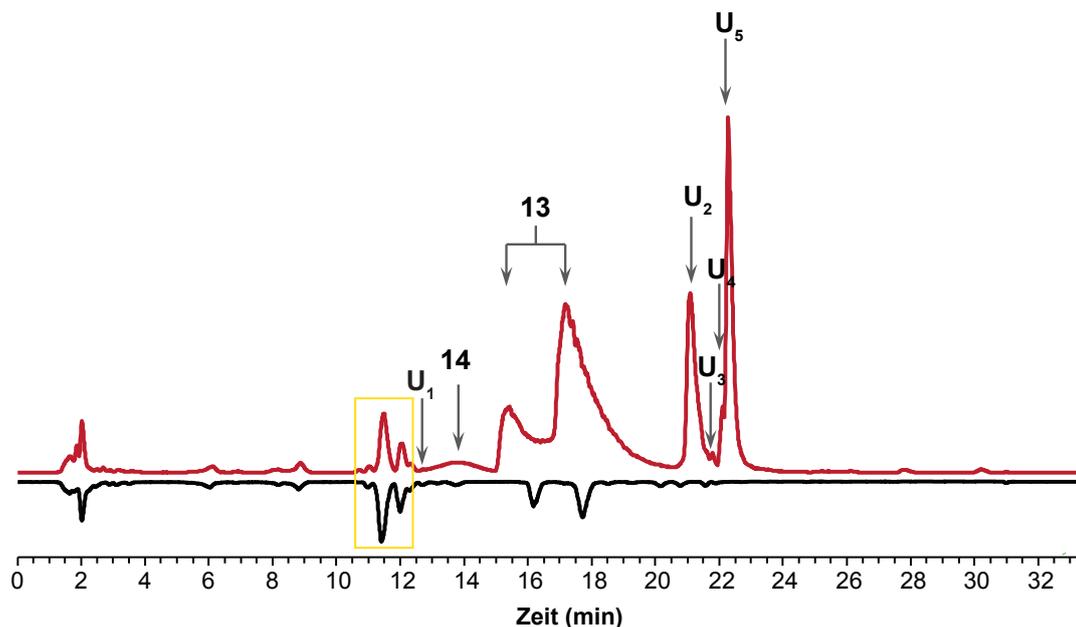
### 3.1 Der rote Phänotyp von *S. coelicolor*

In der vorliegenden Arbeit sollte der rote Phänotyp von *S. coelicolor* (in SFM-Medium unter Kobaltionen-Stress), näher untersucht werden, da dieser im Vergleich zum Wildtyp (*S. coelicolor* in SFM-Medium ohne Kobaltionen) ein stark verändertes Metabolitenprofil aufweist (Abb. 3.2). Dazu wurde der rote Phänotyp zunächst wie von A. Behrend beschrieben isoliert und kultiviert (Kap. 6.1.2, S. 90) [82].

Anschließend wurden methanolische Zellextrakte (Kap. 6.3.1, S. 96) vom Wildtyp und rotem Phänotyp per LC-MS (Kap. 6.3, S. 94) analysiert. Einzig die aus dem Medium stammenden Matrixverbindungen (Abb. 3.2, gelber Rahmen) kommen in beiden Extrakten vor. Der Wildtyp (Abb. 3.2, schwarzes Chromatogramm) zeigt ansonsten nur wenige Peaks. Der rote Phänotyp (Abb. 3.2, rotes Chromatogramm) zeigt unter den gewählten Analysebedingungen dagegen ein deutlich größeres Produktspektrum. Die Peaks bei ca. 14 Minuten und der Doppelpeak bei 15 bzw. 17 Minuten zeigten die Quasimolekülonen  $[M+H]^+ = 392$  für Streptorubin B (**14**) und  $[M+H]^+ = 394$  Undecylprodigiosin (**13**), die bekannten Prodigiosine aus *S. coelicolor* [38, 59]. Bereits während der Dissertation von A. Behrend wurden hochaufgelöste Massenspektren des Zellextrakts gemessen, die diese Vermutung unterstützen [82].

**Tabelle 3.1:** Daten der hochauflösenden Massenspektrometrie

gefundene Masse $[M+H]^+$	Summenformel	theoretische Masse $[M+H]^+$	Verbindung
392,26932	$C_{25}H_{34}ON_3$	392,26964	Streptorubin B ( <b>14</b> )
394,28524	$C_{25}H_{36}ON_3$	394,28529	Undecylprodigiosin ( <b>13</b> )



**Abbildung 3.2:** Vergleich der LC-ESI-MS-Profile von *S. coelicolor* wt (schwarz) und rotem Phänotyp (rot). Neben Undecylprodigiosin (**13**) (Doppelpeak) und Streptorubin B (**14**) bildet der rote Phänotyp eine Reihe unbekannter Verbindungen ( $U_1$  -  $U_5$ ). Im Wildtyp sind diese Analyte nicht nachweisbar. Aus dem Medium stammende Peaks wurden durch einen gelben Rahmen markiert.

Da bei Streptorubin B (**14**) aus der Summenformel nicht auf die Konformation des Alkylringes geschlossen werden kann (*ortho*- oder *meta*-Isomer, 10- oder 12-Ring), sollten Undecylprodigiosin (**13**) und Streptorubin B (**14**) als authentische Standards aus *S. coelicolor* isoliert werden. Die Prodigiosine **13** und **14** wurden aus dem Wildtyp von *S. coelicolor* isoliert, da dieser in Glycerolmedium (Kap. 6.1.1.2, S. 88) ausschließlich diese Verbindungen produziert. Nach Extraktion und Reinigung durch semipräparative HPLC (Kap. 6.3, S. 94, Methode C) konnten so mehrere Milligramm Streptorubin B (**14**) und Undecylprodigiosin (**13**) isoliert werden. Durch NMR-Messung und Vergleich mit publizierten Daten konnten beide Verbindungen eindeutig identifiziert werden (siehe Anhang) [38, 84, 85]. Für Streptorubin B (**14**) wurde vor allem das charakteristische Signal bei  $\delta_H = -1,44$  ppm zur Identifizierung des *meta*-verbrückten 10-Ringes herangezogen [59, 86].

Anschließend wurde durch Vergleich von Retentionszeiten und Tandem-Massenspektren der Verbindungen aus dem roten Phänotyp mit den authentischen Standards die Vermutung bestätigt, dass es sich um Undecylprodigiosin (**13**) und Streptorubin B (**14**) handelt.

Neben den Prodigiosinen **13** und **14** werden vom roten Phänotyp aber noch mindestens

fünf weitere, bislang unbekannte Verbindungen gebildet (Abb. 3.2, U<sub>1</sub> - U<sub>5</sub>). Für die entsprechenden Analyte wurden zunächst hochaufgelöste Massenspektren zur Bestimmung der molekulare Zusammensetzung gemessen (Tab. 3.2). Dabei fällt auf, dass sich die Summenformeln für U<sub>2</sub> und U<sub>3</sub>, sowie U<sub>4</sub> und U<sub>5</sub> allein durch 2 Wasserstoffatome unterscheiden, was eine Verwandtschaftsbeziehung ähnlich der von Streptorubin B (**14**) und Undecylprodigiosin (**13**) vermuten lässt. Dies ist ein erster Hinweis auf die Verwandtschaft der neuen Verbindungen zu den Prodigiosinen. Zur Vereinfachung wird im Folgenden die in Tab. 3.2 angegebene Nomenklatur der Analyte als Coeligiosin A bis E verwendet.

Tabelle 3.2: Daten der hochauflösenden Massenspektrometrie

Verbindung	gefundene Masse [M+H] <sup>+</sup>	Summenformel	theoretische Masse [M+H] <sup>+</sup>	Coeligiosin
U <sub>3</sub>	613,48407	C <sub>40</sub> H <sub>61</sub> ON <sub>4</sub>	613,48399	A ( <b>33</b> )
U <sub>2</sub>	611,46857	C <sub>40</sub> H <sub>59</sub> ON <sub>4</sub>	611,46834	B ( <b>34</b> )
U <sub>5</sub>	672,61938	C <sub>46</sub> H <sub>78</sub> N <sub>3</sub>	672,61903	C ( <b>35</b> )
U <sub>4</sub>	670,60345	C <sub>46</sub> H <sub>76</sub> N <sub>3</sub>	670,60338	D ( <b>36</b> )
U <sub>1</sub>	552,33301	C <sub>34</sub> H <sub>42</sub> O <sub>2</sub> N <sub>5</sub>	552,33330	E ( <b>37</b> )

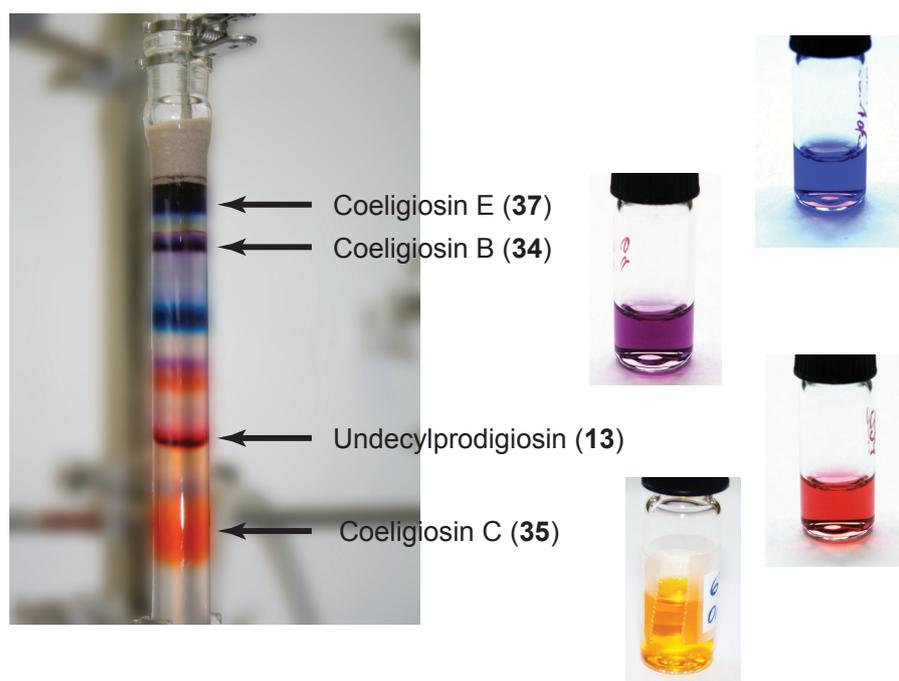
### 3.1.1 Isolierung unbekannter Verbindungen - die Coeligiosine

Da die Coeligiosine nur in geringen Mengen von *S. coelicolor* gebildet werden, war es für die Isolierung der neuen Verbindungen wichtig, möglichst viel Rohextrakt zu erhalten. Deshalb wurden mehrere Liter Kultur angezogen, wobei das Kulturvolumen maximal 200 ml pro Kolben (500 ml) betragen durfte, da jeder Kolben mit einer intensiv rot gefärbten, sporenfreien Einzelkolonie des roten Phänotyps angeimpft werden musste. Die Nutzung einer Vorkultur und damit das Inokulieren größerer Kulturvolumina war nicht möglich, da dies zu einem stark unterschiedlichen Wachstum der einzelnen Kulturen führt, wobei häufig eine verminderte Produktion der Prodigiosine **13** und **14**, sowie aller Coeligiosine A - E zu beobachten war. Eine mögliche Ursache könnte der schlechtere Sauerstoffeintrag ins Medium bei

größeren Kulturvolumina sein. Dieser wird während der Kultivierung durch die Benutzung von Edelstahlspiralen unterstützt, welche bei der Verwendung eines größeren Kulturvolumen womöglich nicht mehr zur effizienten Durchlüftung ausreichen.

Aufgrund der Beobachtung, dass sowohl auf Festmedium, als auch in Flüssigkulturen nur mäßig bis wenig Pigmente in das Medium abgegeben werden, wurde die von A. Behrend angewandte Extraktionsmethode verändert [82]. Es wurde nicht wie bisher der Kulturüberstand mit Ethylacetat extrahiert, sondern direkt das zentrifugierte Zellpellet. Dazu wurde ähnlich wie bei Tsao *et al.* mit HCl angesäuertes Methanol verwendet, welches im Anschluss mit Wasser verdünnt und mit Chloroform extrahiert wurde [38]. In ersten Versuchen wurde der in Methanol aufgenommene Rohextrakt direkt mittels semipräparativer HPLC auf einer XTerra MS C18 Säule (Waters) getrennt, wobei jedoch auf der Vorsäule ausfallende Verbindungen diese verstopften und eine quantitative Trennung unmöglich machten. Deshalb musste ein anderer Reinigungsschritt vorgeschaltet werden, um diese störenden Verbindungen abzutrennen. Als Methode der Wahl stellte sich die Säulenchromatographie des Rohextrakts über Sephadex LH-20 heraus (Kap. 6.5.1.1, S. 97). Dadurch wurde eine erste Vortrennung aller Verbindungen anhand ihrer Größe erreicht, wobei die Prodigiosine **13** und **14** und die Coeligiosine A - E erfolgreich von allen störenden Bestandteilen des Extrakts abgetrennt werden konnten. Im Anschluss folgten für jedes der Coeligiosine verschiedene Kombinationen aus Normal- und Umkehrphasenchromatographie (Kap. 6.5.3, S. 100). Beispielhaft wird in Abb. 3.3 eine Säulenchromatographie zur Reinigung von Coeligiosin E (**37**) gezeigt, wobei sich in der aufgetragenen Ausgangsprobe auch noch Coeligiosin B (**34**) und C (**35**), sowie Undecylprodigiosin (**13**) befand. Außerdem sind auf der Säule noch weitere stark pigmentierte Verbindungen erkennbar, die nicht näher untersucht wurden.

So konnten ca. 2 mg Coeligiosin B (**34**), eine intensiv violett gefärbte Verbindung, gereinigt werden. Coeligiosin C (**35**), von welchem ca. 6 mg isoliert werden konnten, war dagegen ein leuchtend gelb-oranger Feststoff. Die Reinigung von Coeligiosin A (**33**) und D (**36**) war in größeren Mengen nicht möglich, da sie vom roten Phänotyp nur in sehr geringen Mengen gebildet werden und eine Abtrennung von Coeligiosin B (**34**) oder C (**35**) mit hohen Verlusten verbunden war. Von Coeligiosin E (**37**), einer intensiv blau gefärbten Verbindung, konnten etwa 400  $\mu\text{g}$  soweit gereinigt werden, dass im Folgenden ein Strukturvorschlag gemacht werden kann.



**Abbildung 3.3:** Beispiel eines säulenchromatographischen Reinigungsschrittes an Silicagel (2 % MeOH in  $\text{CHCl}_3$  + 0,5 %  $\text{NH}_3$ ). Rechts sind von oben nach unten jeweils die gereinigten Verbindungen Coeligiosin E (**37**), Coeligiosin B (**34**), Undecylprodigiosin (**13**) und Coeligiosin C (**35**) abgebildet.

### 3.1.2 Strukturaufklärung der Coeligiosine

Bereits durch die massenspektrometrischen Untersuchungen während der Reinigung der Coeligiosine lag die Verwandtschaft zu den Prodigiosinen nahe. Wie bereits in Kap. 3.1, S. 21 erwähnt, ließ sich aus den durch hochauflösende Massenspektrometrie ermittelten Summenformeln (Tab. 3.2) eine strukturelle Verwandtschaft zwischen Coeligiosin A (**33**) und Coeligiosin B (**34**), sowie zwischen Coeligiosin C (**35**) und Coeligiosin D (**36**) vermuten, wie sie zwischen Undecylprodigiosin (**13**) und Streptorubin B (**14**) vorliegt: Die jeweiligen Derivate könnten zum einen mit einer linearen Alkylkette vorliegen (Coeligiosin A (**33**) und Coeligiosin C (**35**), Undecylprodigiosin (**13**)) und zum anderen in der zyklischen Variante der Alkylkette (Coeligiosin B (**34**) und Coeligiosin D (**36**), Streptorubin B (**14**)). Deshalb wird im Folgenden die Strukturaufklärung der Coeligiosine A (**33**) und B (**34**), sowie C (**35**) und D (**36**) gemeinsam betrachtet.

Einen weiteren Hinweis auf die Verwandtschaft der Coeligiosine zu den Prodigiosinen lieferten erste Tandem-Massenspektren der Verbindungen (Abb. 3.4).

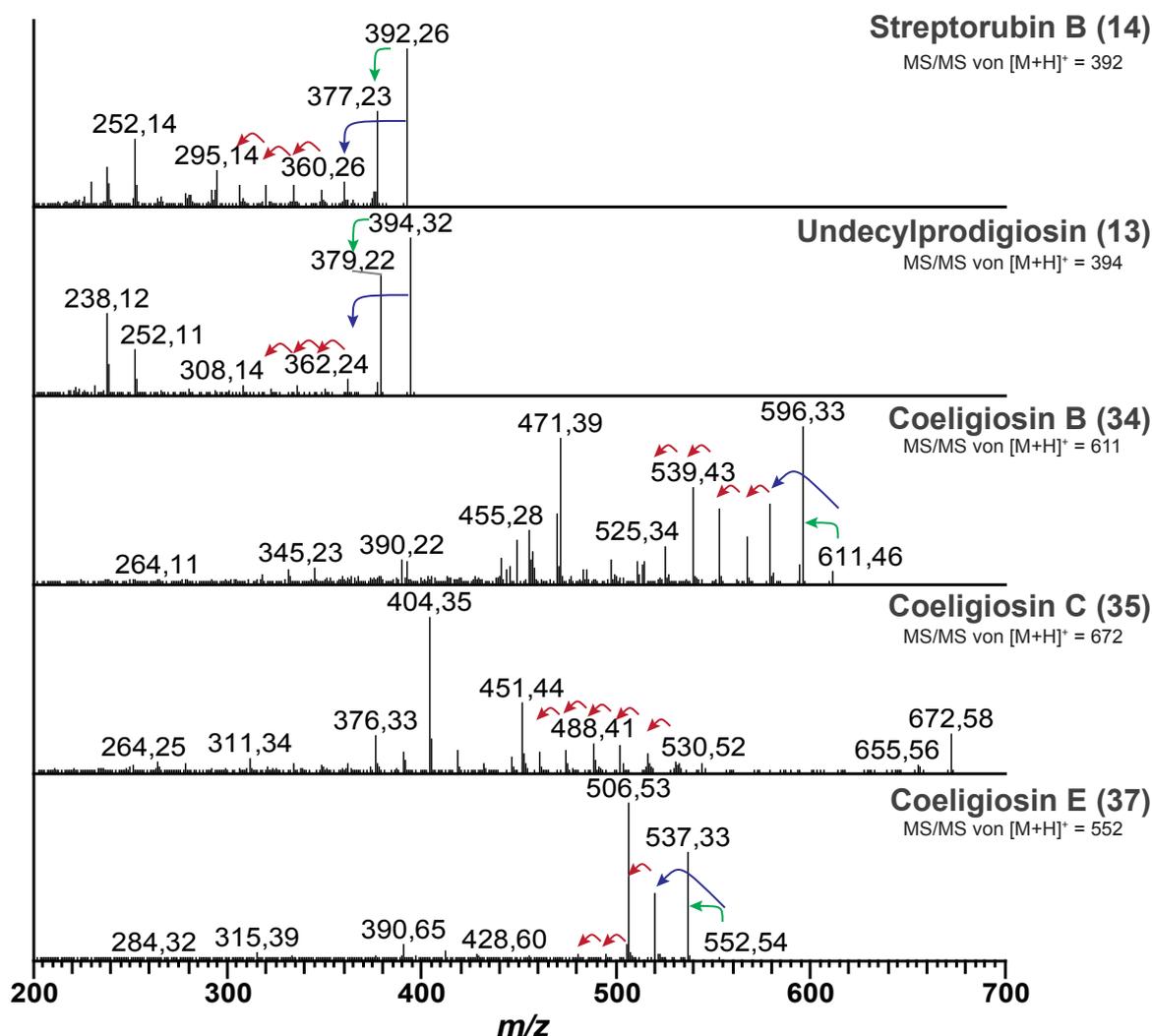


Abbildung 3.4: Vergleich der Fragmentierungsmuster der Tandem-Massenspektrometrie (ESI-MS<sup>2</sup>, pos. Mode,  $[M+H]^+$ ) von Streptorubin B (14), Undecylprodigiosin (13) und Coeligiosin B (34), C (35) und E (37). Alle Verbindungen zeigen einen wiederholten Massenverlust von 14 amu (roter Pfeil). Außerdem zeigen alle Verbindungen bis auf Coeligiosin C (35) als erste Abspaltungen den Verlust von 15 amu (grüner Pfeil) bzw. 32 amu (blauer Pfeil).

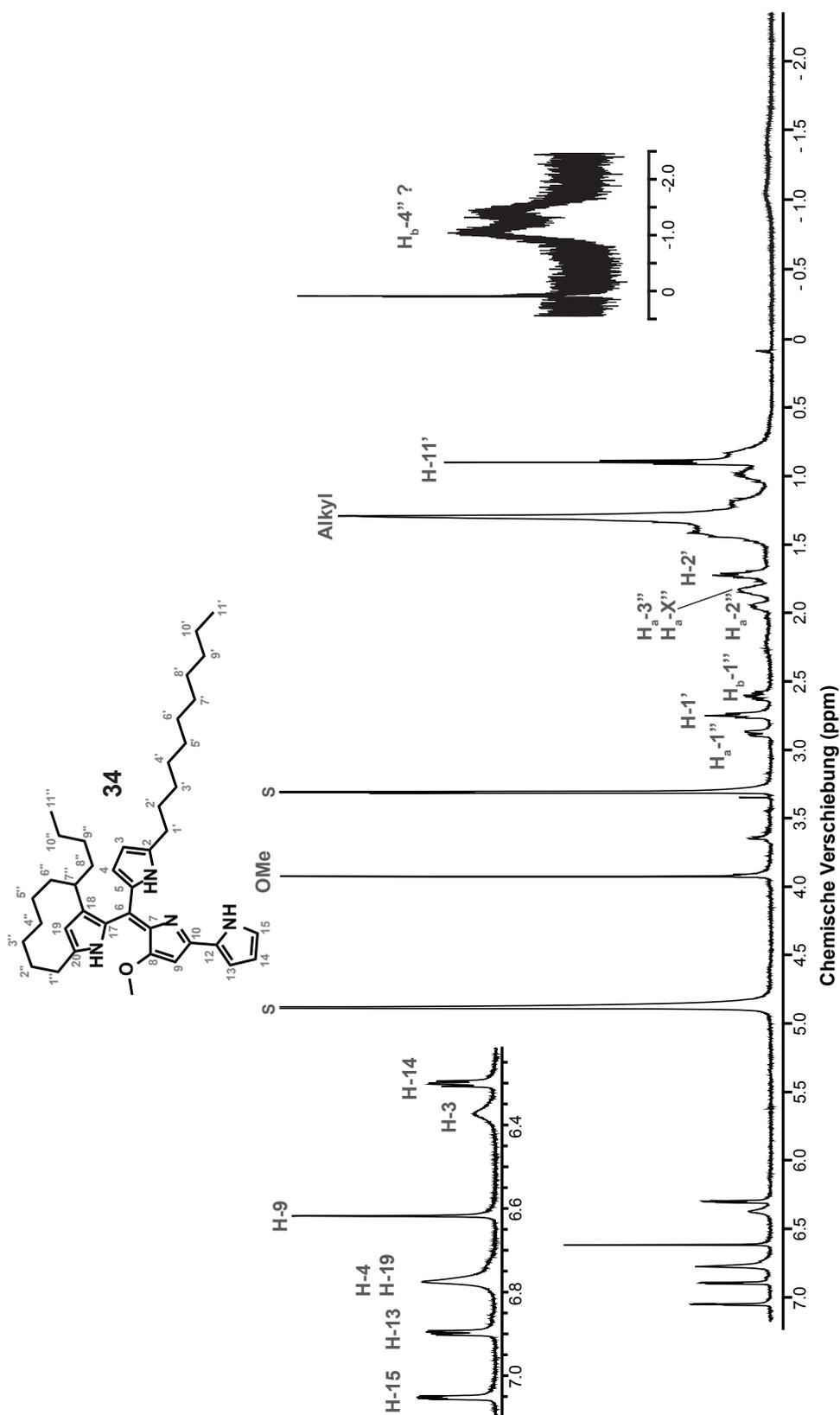
Alle Verbindungen zeigten eine mehrfache Abspaltung von 14 amu zu  $[M+H-14]^+$ . Dies ist ein typisches Fragmentierungsmuster langer Alkylketten bei Elektronenstoßionisierung (*electron impact*, EI), wird bei Elektrospray-Ionisation (ESI) jedoch eher selten beobachtet. Für Prodigiosine ist diese Fragmentierung unter ESI-MS-Bedingungen jedoch typisch. Coeligiosin E zeigte ebenfalls dieses typische Fragmentierungsmuster. Eine weitere Gemeinsamkeit zeigte sich in der anfänglichen Abspaltung von 15 amu zu  $[M+H-15]^+$  ( $[M+H-CH_3]^+$ ) bzw. 32 amu zu  $[M+H-32]^+$  ( $[M+H-CH_3OH]^+$ ) (Abb. 3.4). Nach Chen *et al.* entsteht dieses Fragmentierungsmuster durch die Abspaltung der Methoxygruppe [87]. Da Coeligiosin C (35) und

D (**36**) diese typische Abspaltung nicht zeigten, wurde vermutet, dass diesen beiden Coeligiosinen die Methoxygruppe fehlt. Auf die genauen Fragmentierungen wird in den Abschnitten zur Strukturaufklärung der einzelnen Coeligiosine eingegangen.

### 3.1.2.1 Strukturaufklärung von Coeligiosin A (**33**) und B (**34**)

Coeligiosin B (**34**) ist eine Verbindung, die vom roten Phänotyp in vergleichsweise großen Mengen gebildet wurde, Coeligiosin A (**33**) dagegen nur in sehr geringen Mengen. Mit molekularen Massen von  $[M+H]^+ = 611,46834$  für Coeligiosin B (**34**) und  $[M+H]^+ = 613,48399$  für Coeligiosin A (**33**) unterschieden sich die Verbindungen von Streptorubin B (**14**) bzw. Undecylprodigiosin (**13**) genau um die Masse 219, welche einem zusätzlich gebundenen Undecylpyrrol (**27**) entspricht. Dies wurde auch aus den durch hochauflösende Massenspektrometrie ermittelten Summenformeln (Coeligiosin A (**33**):  $C_{40}H_{61}ON_4$ , Coeligiosin B (**34**):  $C_{40}H_{59}ON_4$ , Tab. 3.2) deutlich, da sich die Coeligiosine durch  $C_{15}H_{25}N$  von den Prodigiosinen unterscheiden.

Die Verknüpfung des zusätzlichen Undecylpyrrols am verbrückenden Kohlenstoff zwischen Pyrrolring B und C (Abb. 1.4, Grundaufbau der Prodigiosine (**20**)) konnte bereits aus dem Protonen-NMR abgeleitet werden, da das typische Singulett für das entsprechende Proton fehlte (Abb. 3.5). Die Zuordnung der Pyrrolprotonen lies sich eindeutig anhand von 2D-NMR-Spektren, wie COSY und HMBC bestimmen (siehe Anhang), wobei auffällt, dass die Protonen aus den beiden Undecylpyrrolringen (H-3, H-4, H-19) schlecht aufgelöst als sehr breite Peaks erscheinen (Abb. 3.5). Die Doppelbindung vom zentralen Kohlenstoff C-6 kann mesomer zu C-5, zu C-7 oder C-17 liegen, wodurch es zu einer Delokalisierung der Elektronendichte kommt, die zu einer schnellen Relaxation der entsprechenden Protonen im NMR und damit zu schlecht aufgelösten Signalen führt. Dies führte auch zu Problemen bei heteronuklearen 2-D NMR-Spektren, wobei ein Signal des zentralen Kohlenstoffs C-6 im HMBC-Spektrum nur schwer detektierbar war.

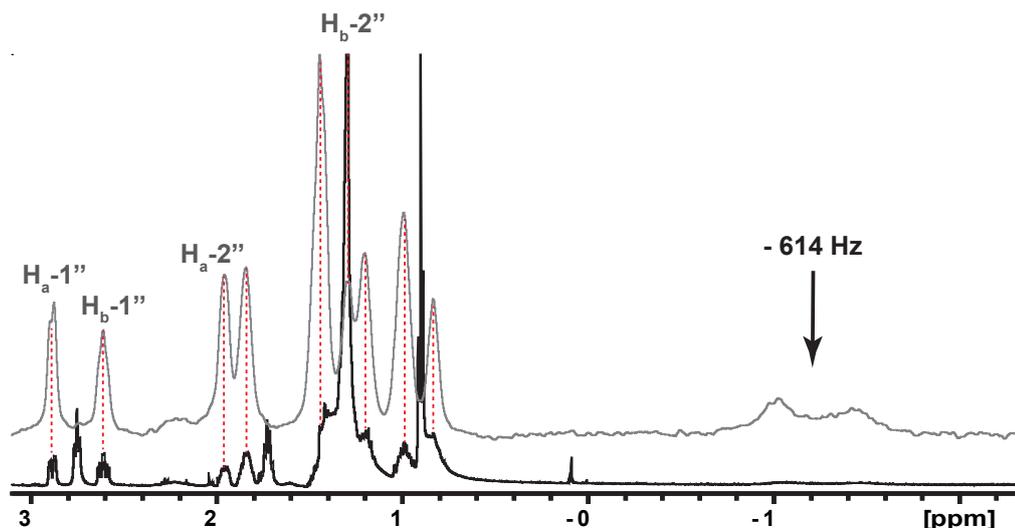


**Abbildung 3.5:**  $^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) und Struktur von Coeligosin B (34). Der aromatische Bereich (links) und das Signal im negativen ppm Bereich (rechts) sind vergrößert dargestellt. Eine Zuordnung der Protonen ist, soweit möglich, angegeben. H<sub>a</sub>-X'' gibt ein Proton des zyklisierten Ringes an, welches nicht eindeutig zugeordnet werden konnte. Mit einem ? gekennzeichnete Protonen sind nur unter Vorbehalt zugeordnet. S: Signale des Lösungsmittels

Die Zuordnung der Protonen der zwei Alkylketten gelingt nur bedingt, da die Signale im Bereich von  $\sim 1,2 - 1,4$  ppm stark überlappen. Direkt an den Pyrrolring angrenzende Protonen H-1' und H-1'' zeigen eine chemische Verschiebung im Bereich von 2,5 - 3,0 ppm, die Nachbarprotonen H-2' und H-2'' noch eine Verschiebung von 1,7 - 2,0 ppm. In einem ähnlichen Bereich würde man die Signale für H-7'', H-6'' und H-8'' erwarten: so liegt beispielsweise das Signal in Streptorubin B, welches H-7'' entspricht, bei 2,86 ppm (siehe Anhang). Diese Signale konnten jedoch im fraglichen Bereich nicht identifiziert werden. Somit stellen sich folgende zwei Fragen: 1. Liegt in Coeligiosin B (**34**) eventuell nicht ein meta-verbrückter 10-Ring wie in Streptorubin B (**14**) vor, sondern vielleicht ein ortho-verbrückter Ring analog zu **25** oder ein 12-Ring wie in Streptorubin A (**23**)? 2. Bewirken sterische Effekte eine andere Konformation des Alkylringes, wodurch es zu einer anderen chemischen Verschiebung der entsprechenden Alkylsignale kommt? Dass überhaupt ein zyklisierter Ring in Coeligiosin B (**34**) vorliegen muss, konnte mittels Zirkulardichroismus nachgewiesen werden, da sich hier eindeutig ein Signal ermitteln ließ (siehe Anhang) und somit ein Chiralitätszentrum im Molekül vorliegen muss. Außerdem zeigte H-1'' in Coeligiosin B (**34**) eine Aufspaltung in 2 Signale bei 2,61 und 2,88 ppm, die ähnlich nur in Streptorubin B (**14**) und damit der alizyklischen Variante, nicht aber in Undecylprodigiosin (**13**) auftrat.

Durch die Faltung des Alkylringes über den Pyrrolring kommt es zu einer Hochfeld-Verschiebung aller Alkylprotonen des Ringes, wobei ein Proton, das dem Pyrrolring zugewandt ist, stärker Hochfeld-verschoben wird als dem Pyrrolring abgewandte Protonen [86]. Am stärksten ist dieser Effekt bei H-4'', was bei Streptorubin B (**14**) zu einem Signal bei -1,44 ppm führt. Dieses stark Hochfeld-verschobene Signal war in Coeligiosin B (**34**) auf den ersten Blick nicht vorhanden. Durch Vergrößerung des entsprechenden Bereichs konnte jedoch auch hier ein Signal im negativen ppm-Bereich detektiert werden, das jedoch stark verbreitert und schlecht aufgelöst war. Durch ein selektives 1-D-TOCSY Experiment konnte die Zugehörigkeit dieses Signals zum Spinsystem des verbrückten Alkylringes von Coeligiosin B (**34**) bewiesen werden (Abb. 3.6) [88]. Dabei wurde direkt mit der Frequenz des Signals (- 614 Hz) eingestrahlt und somit nur die Korrelationen zu diesem Signal ermittelt. Deutlich lies sich die Korrelation zu den Signalen von H-1'' und H-2'' ermitteln. Außerdem traten Korrelationen zu weiteren Signalen aus dem Ring auf, deren Positionen aber nicht eindeutig zugeordnet werden konnten.

Leider ließ sich auch durch dieses Experiment die chemische Verschiebung von H-7'' nicht eindeutig ermitteln. Obwohl H-7'' zum Spinsystem des Alkylringes gehört, könnte eine un-



**Abbildung 3.6:** Selektives TOCSY des Signals bei 614 Hz (- 1,25 ppm) (grau) und Ausschnitt des  $^1\text{H}$ -NMR von Coeligiosin B (34) (schwarz). Identische Protonen sind durch rote Linien kenntlich gemacht. Protonen sind benannt, wenn die Zuordnung möglich war.

gewöhnliche Konfiguration des Alkytringes und somit eine ungünstige Stellung benachbarter Protonen zueinander eine Übertragung der Magnetisierung über alle Protonen des Spinsystems verhindern.

Auch die Zuordnung der Kohlenstoffe erwies sich teilweise als schwierig. Zur besseren Übersichtlichkeit wird dabei im Folgenden auf die Darstellung des klassischen HMBC-Spektrums verzichtet. Stattdessen werden die aus dem HMBC-Spektrum extrahierten  $^{13}\text{C}$ -Korrelationen eines bestimmten Protons in einer 1D-Ansicht gezeigt (Abb. 3.7 am Beispiel von H-9). Dies erleichterte die Darstellung von Korrelationssignalen mit sehr unterschiedlichen Intensitäten. Außerdem konnten so Korrelationssignale von Protonen mit deutlich unterschiedlicher chemischer Verschiebung (z. B. Alkylproton und Pyrrolproton) zum gleichen Kohlenstoff besser gezeigt werden. Dies war besonders bei Kohlenstoffen, die eine ähnliche chemische Verschiebung besitzen, sehr hilfreich, da so eine eindeutige Unterscheidung möglich war.

Die Kohlenstoffe und Protonen des A-Ringes konnten anhand von Korrelationen in COSY-, HSQC- und HMBC-Spektren zugeordnet werden (Abb. 3.8, A; COSY und HSQC: siehe Anhang). Die Verknüpfung von A- und B-Ring konnte durch die HMBC-Korrelation von H-9 und H-13 zu C-10 und C-12 zweifelsfrei identifiziert werden. Die Kohlenstoffe des B-Ringes konnten ausgehend von H-9 zugeordnet werden (Abb. 3.8).

Der Nachweis des zentralen Kohlenstoffs C-6 und damit die Verknüpfung des zusätzlichen Pyrrolringes war dagegen schwierig. Im  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum konnte kein Signal dafür detek-

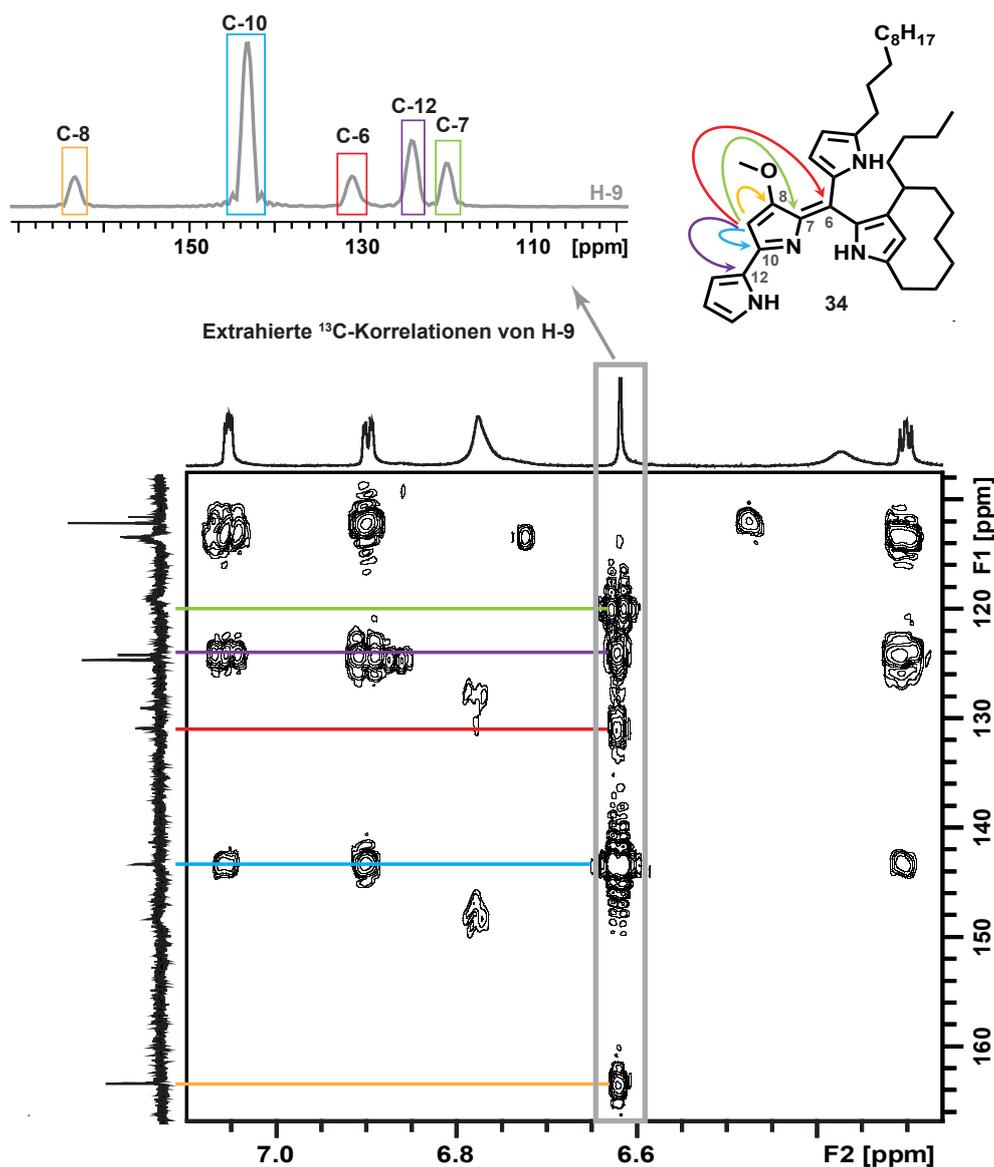
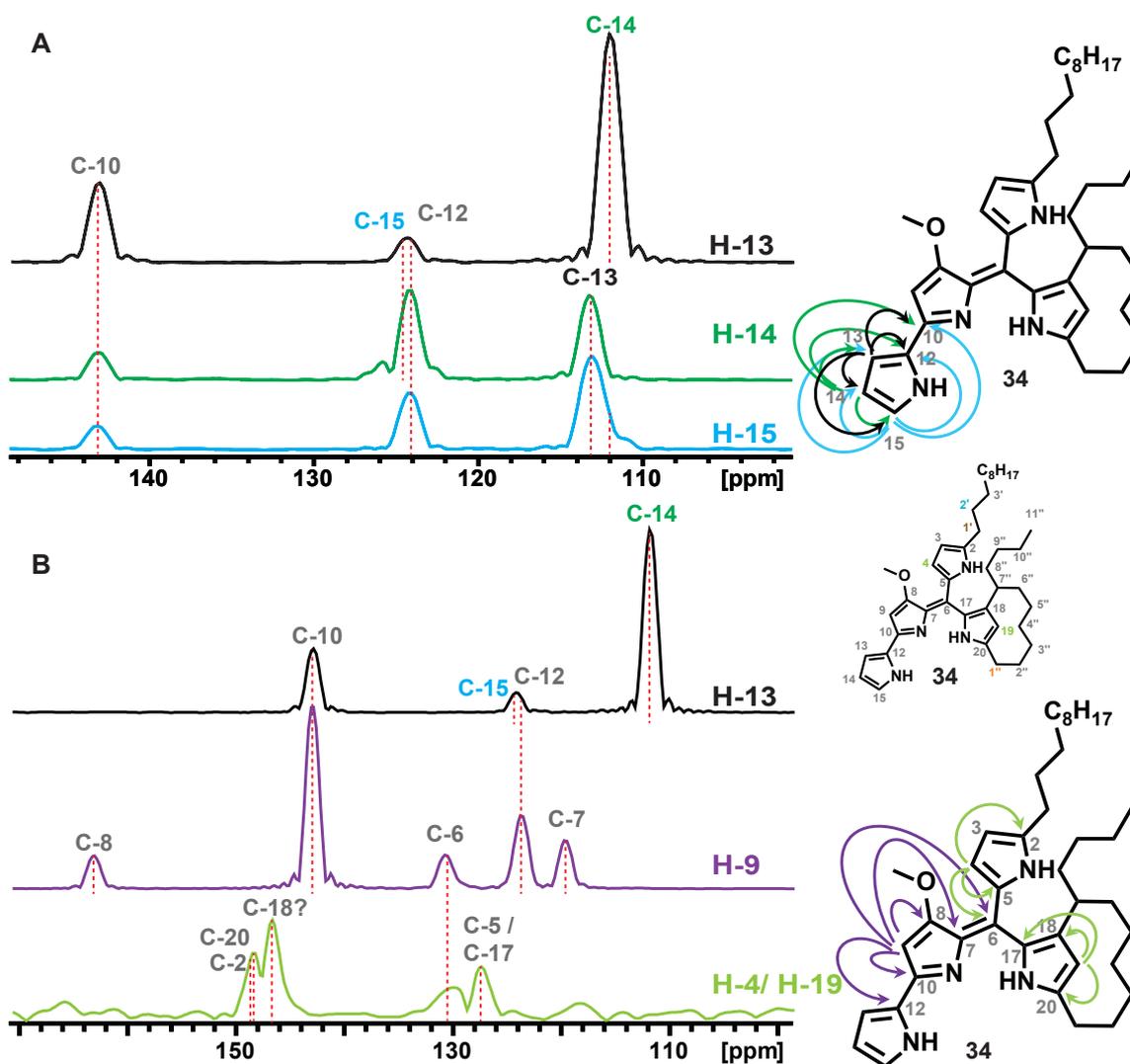


Abbildung 3.7: Extraktion der  $^{13}\text{C}$ -Korrelation von H-9 aus dem HMBC-Spektrum von Coeligiosin B (34). Extrahierte  $^{13}\text{C}$ -Korrelationen verschiedener Protonen wurden zur besseren Darstellung von Korrelationen zu dem gleichen Kohlenstoffatom verwendet.

tiert werden (siehe Anhang). Im HMBC-Spektrum sollte jedoch von H-4 aus eine Zuordnung möglich sein, da es sich um eine  $^3J_{\text{H,C}}$ -Korrelation handelt - diese Signale sind in HMBC-Experimenten am stärksten. Allerdings zeigte H-4 anfänglich keine Korrelationen, genauso wie H-19 und H-3. Erst durch Akkumulation von 1024 Scans und optimierten Mischzeiten<sup>1</sup> konnten schwache Korrelationen von H-4 und H-19 beobachtet werden, H-3 zeigte weiterhin keine Signale (siehe Anhang). Bei 130,7 ppm konnte ein Signal detektiert werden, welches sowohl eine Korrelation von H-4 zeigte als auch von H-9 (Abb. 3.8, B).

<sup>1</sup>Zeit im 2-D NMR-Experiment, in der die Magnetisierung zwischen verschiedenen Kernen ausgetauscht wird.

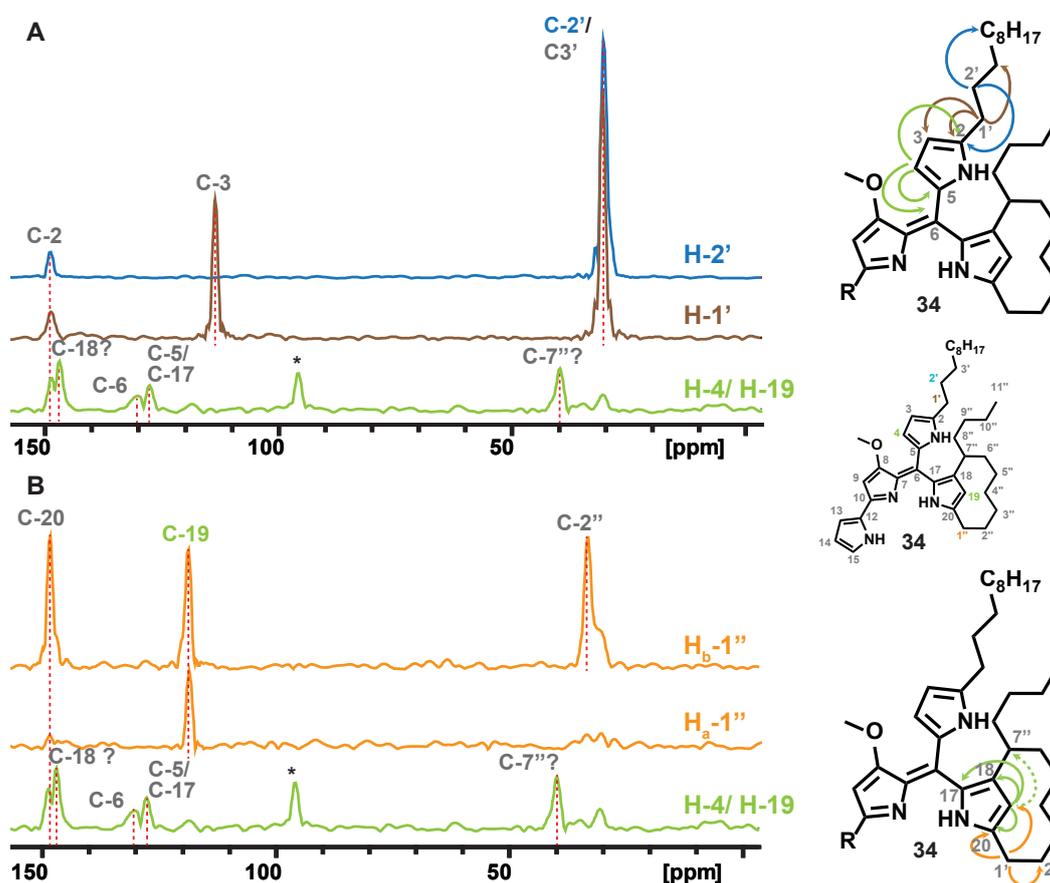


**Abbildung 3.8:** Extrahierte  $^{13}\text{C}$ -Korrelationen verschiedener Protonen aus dem HMBC-Spektrum von Coeligiosin B (34). **A:** Protonen des A-Ringes (H-13, H-14, H-15); **B:** Verknüpfung der Pyrrolringe anhand von H-13, H-9 und H-3/H-19. Kohlenstoffe sind durch Benennung und rote Linien kenntlich gemacht. Mit einem ? gekennzeichnete Kohlenstoffe sind nur unter Vorbehalt zugeordnet.

Üblicherweise sind  $^3J_{H,C}$ -Korrelationen im HMBC-Experiment stärker als Kopplungen über 2 oder 4 Bindungen. Dies trifft auf die Coeligiosine nur bedingt zu. Zwar sind die  $^3J_{H,C}$ -Korrelationen von H-9 zu C-7 und C-12 (Abb. 3.8, B) stärker als die  $^4J_{H,C}$ -Korrelation zu C-6, doch ist beispielsweise die  $^2J_{H,C}$ -Kopplung - welche normalerweise im HMBC-Spektrum nicht oder nur sehr schwach auftritt - zu C-10 am stärksten (Abb. 3.8). Die  $^4J_{H,C}$ -Korrelation von H-9 trat außerdem stärker auf als die  $^3J_{H,C}$ -Kopplung von H-4. Deshalb konnte anhand der Intensität der Kreuzsignale zwischen Proton und Kohlenstoff nur schwer auf deren Entfernung geschlossen werden, was die Strukturaufklärung weiter erschwerte.

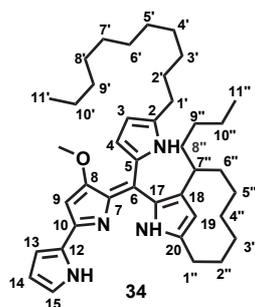
Es konnten weiterhin schwache Korrelationen von H-4 bzw. H-19 zu den quartären Kohlenstoff 148,3 (C-20) und 148,9 ppm (C-2) identifiziert werden (Abb. 3.8, **B**), sowie zu 127,7 (C-5) und 128,1 ppm (C-17). Eine Korrelation zu C-18 könnte im Bereich von 146,9 ppm liegen, lässt sich aber nicht zweifelsfrei identifizieren.

Einen besserer Zugang zu C-20 und C-2 konnte von den Alkylketten aus erhalten werden. So zeigen H-1' und H-2' eine sehr starke Kopplung zu C-2 (148,9 ppm) (Abb. 3.9, **A**). H-1'' zeigt dagegen eine starke Kopplung zu C-20 (148,3 ppm). Von H-1' aus erfolgte außerdem die Kopplung mit C-3, von H-1'' mit C-19. Im extrahierten Kohlenstoffspektrum von H-4/H-19 ließ sich außerdem eine Kopplung zu 39,8 ppm beobachtet, bei dem es sich um C-7 handeln könnte. Dies ließ sich jedoch nicht zweifelsfrei nachweisen.



**Abbildung 3.9:** Extrahierte  $^{13}\text{C}$ -Korrelationen verschiedener Protonen aus dem HMBC von Coeligosin B (34). **A:** Protonen der linearen Alkylkette (H-1', H-2') und H-3/H-19; **B:** H-1''-Protonen der zyklisierten Alkylkette und H-3/H-19. Kohlenstoffe sind durch Benennung und rote Linien kenntlich gemacht. Mit einem \* gekennzeichnete Signale sind Satellitensignale. Mit einem ? gekennzeichnete Kohlenstoffe sind nur unter Vorbehalt zugeordnet.

Die Signale aus  $^1\text{H}$  und  $^{13}\text{C}$ -NMR, sowie Kopplungen im HMBC-Spektrum sind in Tab. 3.3 zusammengefasst. Für die Protonen des Alkyrrings (H-3'' - H-11'') werden die zusammengehörigen Protonen angegeben, wenn sie im HSQC-Spektrum einem gemeinsamen Kohlenstoff zugeordnet werden konnten. Eine Zuordnung zur jeweiligen Position im Alkyrring war aber durch zu starke Überlappung nicht möglich.



**Tabelle 3.3:** NMR-Daten von Coeligosin B (34) (Methanol- $d_4$ ,  $^1\text{H}$ : 500 MHz,  $^{13}\text{C}$ : 125 MHz,  $\delta$  in ppm relativ zu Methanol  $\delta_{\text{H}}$ : 3,31 ppm,  $\delta_{\text{C}}$ :49,0 ppm)

Position	$\delta$ $^{13}\text{C}$	$\delta$ $^1\text{H}$	HMBC
1	-	NH	
2	148,9	-	
3	113,6	6,37	
4	125,1	6,78	C-2, C-5, C-6
5	127,7	-	
6	130,7	-	
7	120,1	-	
8	163,3	-	
9	95,6	6,62	C-6, C-7, C-8, C-10, C-12
10	143,3	-	
11	-	NH	
12	124,1	-	
13	113,3	6,90	C-10, C-12, C-14,C-15
14	112,0	6,30	C-10,C-12, C-13, C-15
15	124,6	7,06	C-10,C-12, C-13, C-14
16	-	NH	
17	128,1	-	

18	146,9 ?	-	
19	118,9	6,78	C-20, C-1''
20	148,3	-	
21	-	NH	
1'	29,2	2,75	C-2, C-3, C-2'
2'	30,6	1,72	C-2, C-1'
3' - 10'	~ 30,5	~ 1,2 - 1,4	
11'	14,5	0,90	
1''	30,3	2,88 / 2,61	C-19, C-20, C-2''
2''	33,2	1,95 / 1,28	C-1''
3'' - 11'' <sup>a</sup>	39,2	1,42 / 0,82	
	32,0	1,84 / 1,19	
	25,9	1,43 / 0,99	
	30,3	1,84 / 0,97	
OMe	59,2	3,92	C-8, C-9

<sup>a</sup>: Die Signale für 3'' bis 11'' können nicht eindeutig zugeordnet werden. Die angegebene Reihenfolge spiegelt nicht die Reihenfolge in der Kette wider.

Obwohl eine zweifelsfreie Identifizierung der Größe des Alkylringes durch NMR-Spektroskopie nicht möglich war, konnte durch biomimetische Reaktionen gezeigt werden, dass Coeligiosin B (**34**) direkt aus Streptorubin B (**14**) entsteht und somit einen identischen *meta*-verbrückten 10-Ring besitzen muss (siehe Kap. 3.2.3, S. 70).

Da Coeligiosin A (**33**) nur in sehr geringen Mengen von *S. coelicolor* gebildet wird, war eine vollständige Charakterisierung durch NMR-Spektroskopie nicht möglich. Durch Vergleich der MS/MS-Spektren (Abb. 3.10) von Coeligiosin A (**33**) und B (**34**), lässt sich das gleiche Fragmentierungsverhalten beobachten. Coeligiosin A (**33**) (Abb. 3.10 unten) zeigt eine um zwei erhöhte Masse nahezu aller Fragmentmassen. Durch diese massenspektrometrischen Daten und die biomimetischen Studien, die zeigen, dass Coeligiosin A (**33**) aus Undecylprodigiosin (**13**) und Undecylpyrrol (**27**) entsteht (Kap. 3.2.2, S. 63), muss Coeligiosin A (**33**) zwei lineare Undecylketten und somit die in Abb. 3.10 rot umrahmte Struktur besitzen. Es wird außerdem ein Vorschlag für die Fragmentierung in Analogie zur Fragmentierung von Undecylprodigiosin (**13**) und Streptorubin B (**14**) nach Chen *et al.* angegeben [87].

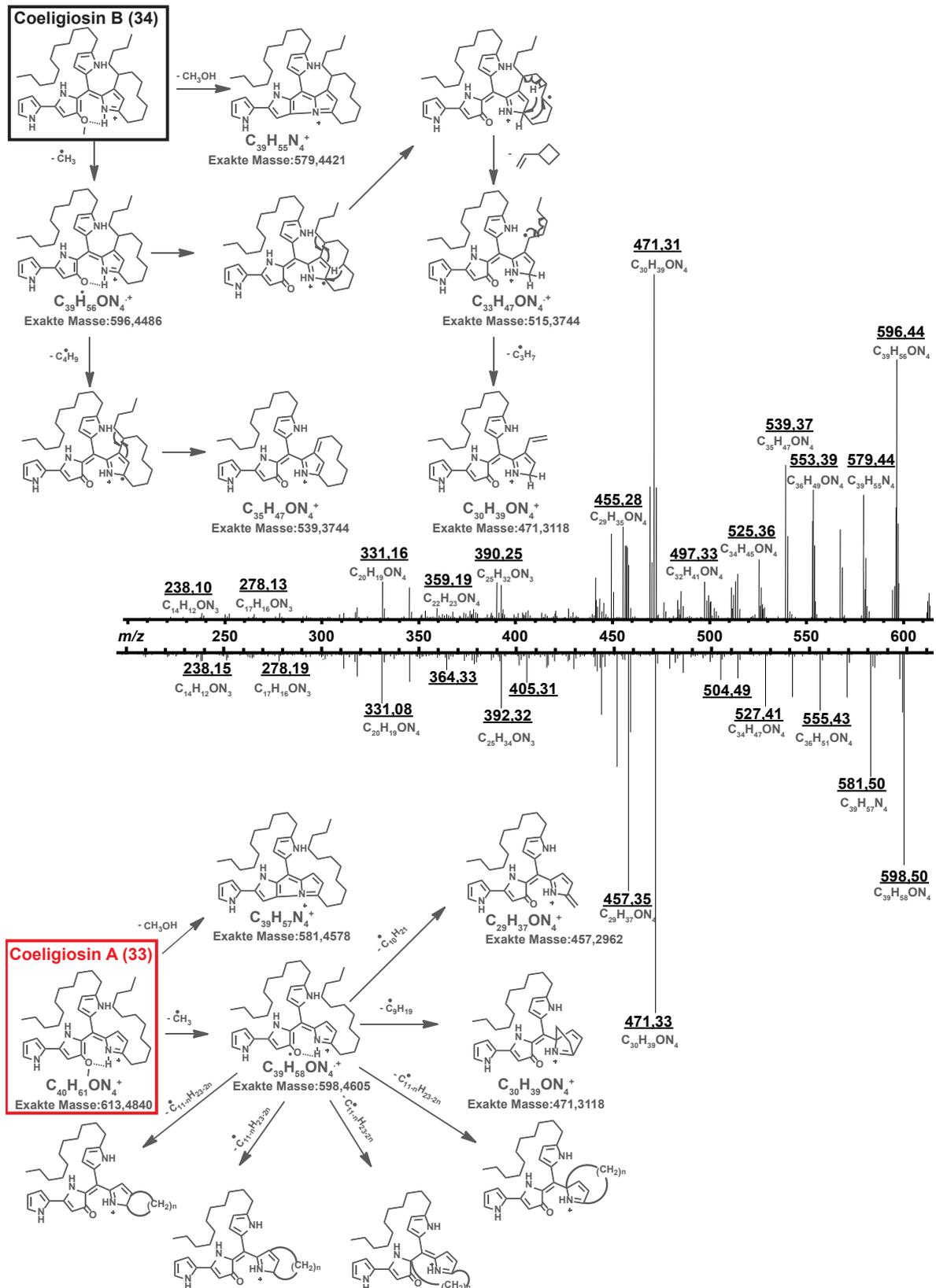


Abbildung 3.10: Vergleich der Fragmentierungsmuster von Coeligiosin A (33) ( $[M+H]^+ = 613$ , unten) und B (34) ( $[M+H]^+ = 611$ , oben) im ESI-MS-MS. Die Struktur von Coeligiosin A (33) ist rot umrahmt. Es werden außerdem Vorschläge für die Fragmentierung von Coeligiosin A (33) und Coeligiosin B (34) analog zu Chen *et al.* gezeigt [87].

### 3.1.2.2 Strukturaufklärung von Coeligiosin C (35) und D (36)

Coeligiosin C (**35**) wird von *S. coelicolor* im späten Verlauf der Kultivierung in verhältnismäßig großen Mengen gebildet. Es handelt sich dabei um eine leuchtend gelb-orange gefärbte Verbindung mit einer Quasimolekülmasse von  $[M+H]^+ = 672,61938$  und der Summenformel  $C_{46}H_{78}N_3$ . Coeligiosin C (**35**) zeigt wie bereits erwähnt im MS/MS des  $[M+H]^+$ -Ions nicht die typische Abspaltung der Methoxygruppe (Abb. 3.4). Auch im NMR-Spektrum findet sich kein passendes Signal zwischen 3 und 4 ppm, wodurch die Vermutung, dass keine Methoxygruppe im Molekül vorhanden ist, bestätigt wird (Abb. 3.11).

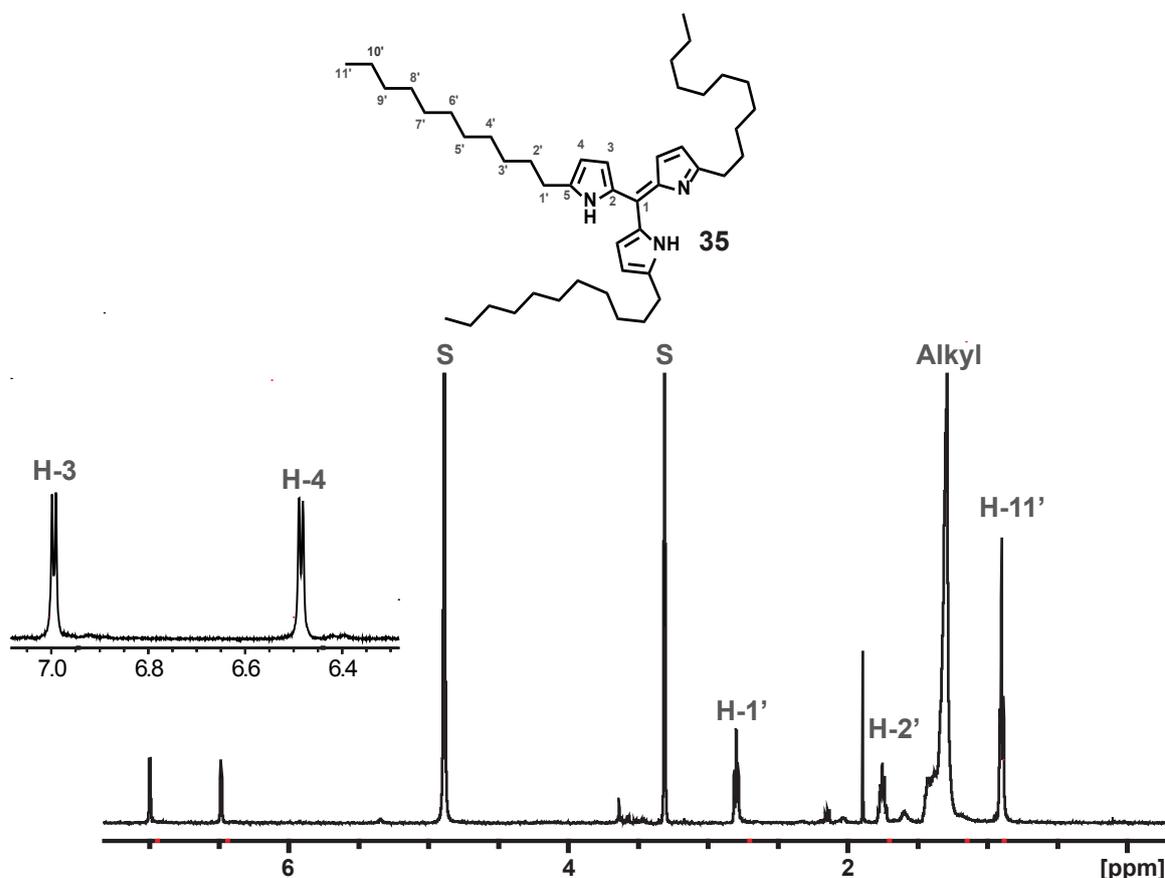


Abbildung 3.11:  $^1\text{H}$ -NMR (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) von Coeligiosin C (**35**). Protonen sind bezeichnet, sofern eine Zuordnung möglich war. S: Signale des Lösungsmittels

Generell zeigten sich im NMR von Coeligiosin C (**35**) verhältnismäßig wenig Signale - zwei Signale im Bereich der Pyrrolprotonen, sowie die typischen Signale einer daran anknüpfenden Alkylkette. Die Summenformel, ermittelt durch hochaufgelöste Massenspektrometrie, und NMR lassen auf eine Verbindung schließen, bei der drei Undecylpyrrole (**27**) über ein zentrales Kohlenstoffatom verknüpft sind. Da es nur zwei Dubletts für die Pyrrol-Protonen gibt, besitzt

die Verbindung eine  $C_3$ -Symmetrie. Damit ist die Doppelbindung nicht fest in Richtung eines Ringes lokalisiert, sondern über alle 3 Ringe delokalisiert. Dies führt wie bei Coeligiosin B (**34**) dazu, dass das Korrelationssignal zwischen H-3 bzw. H-4 und C-1 im HMBC-Spektrum nur durch lange Messzeiten und optimierte Mischzeiten zu sehen ist (Abb. 3.13). Da die Korrelation zu C-1 ( $\delta_C = 137,1$  ppm) nur sehr schwach im HMBC-Spektrum zu detektieren ist, wurde zur zweifelsfreien Identifizierung ein selektives 1D-*long-range*-HSQC gemessen [89]. In gewöhnlichen HSQC-Experimenten wird mit der Frequenz der Protonen eingestrahlt und die auftretenden Korrelationen mit den entsprechenden Kohlenstoffen detektiert. In einem selektiven HSQC kann der andere Weg gewählt werden, indem man mit der Frequenz des fraglichen Kohlenstoffs ( $\delta_C = 137,1$  ppm) einstrahlt. Durch Anpassung der Pulssequenz werden im selektiven 1D-*long-range*-HSQC nicht nur das Proton direkt am Kohlenstoff, sondern auch in unmittelbarer Nachbarschaft liegende Protonen anhand von Korrelationssignalen im jeweiligen Frequenzbereich sichtbar. Durch Überlagern von selektivem HSQC und  $^1\text{H}$ -NMR lassen sich so die gesuchten Protonen ermitteln (Abb. 3.12).

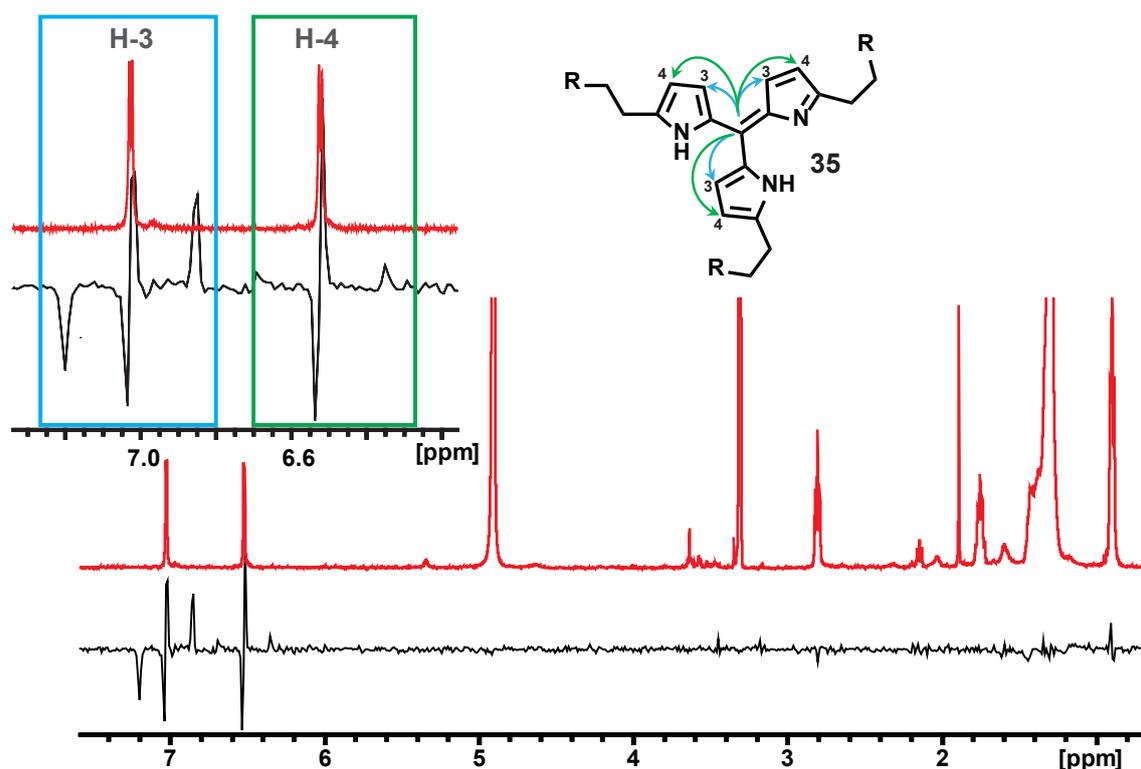


Abbildung 3.12: Selektives HSQC mit Einstrahlungsfrequenz von C-1 (schwarz) und überlagertes  $^1\text{H}$ -NMR von Coeligiosin C (**35**) (rot). Der aromatische Bereich ist vergrößert dargestellt und die Kopplungen zu H-3 und H-4 farblich in NMR und Struktur kenntlich gemacht.

Außerdem kann auch die Entfernung der Protonen vom Kohlenstoff anhand der Intensität von Satellitensignalen (positive und negative Peaks rechts und links des eigentlichen Impuls-signals; besonders deutlich bei H-3 zu beobachten) bestimmt werden - je intensiver diese auftreten, umso näher befindet sich das Proton am Kohlenstoff. Der wesentliche Vorteil in dieser Methode liegt in der deutlich höheren Akkumulation an Scans, die innerhalb kurzer Zeit erreicht werden kann.

Eindeutig lässt sich auch die Verknüpfung der Alkylkette an den Pyrrolring im HMBC beweisen, da die Protonen H-1' und auch H-2' mit dem quartären Kohlenstoff C-5 koppeln. Dieser koppelt ebenfalls mit H-3 und H-4 (Abb. 3.13). Außerdem koppelt H-1' mit C-4 (Abb. 3.13), wodurch auch die Zuordnung von H-3 und H-4 eindeutig möglich wird.

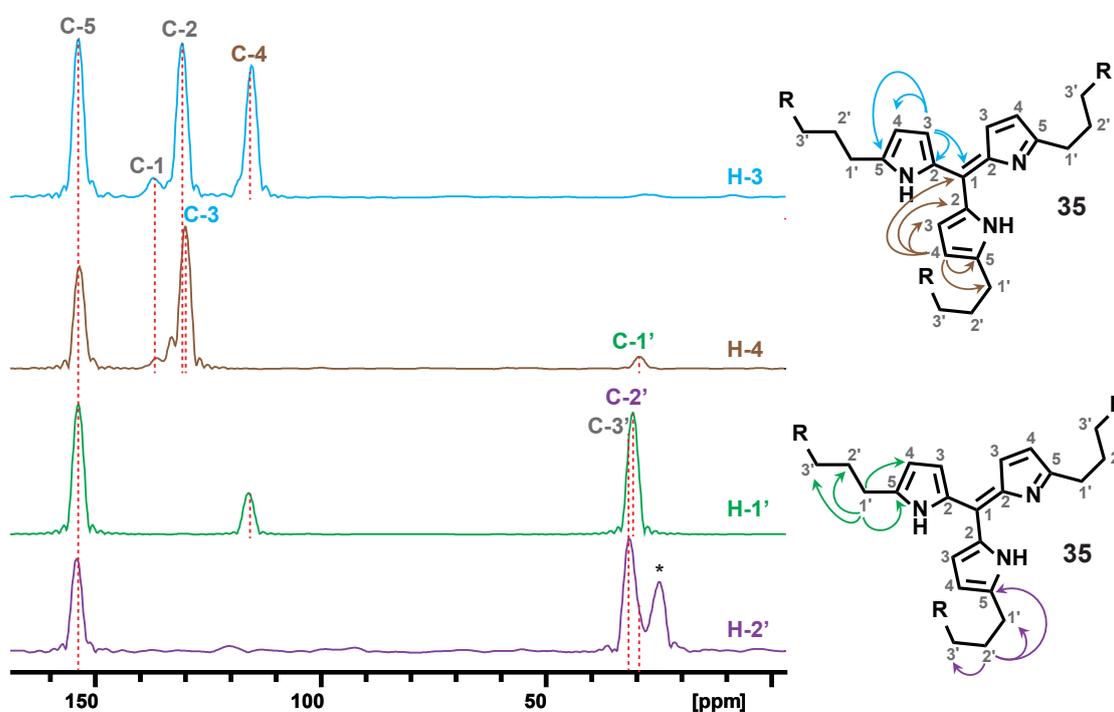


Abbildung 3.13: Extrahierte  $^{13}\text{C}$ -Korrelationen von H-3, H-4, H-1' und H-2' aus dem HMBC von Coeligosin C (35). Kohlenstoffe sind durch Benennung und rote Linien kenntlich gemacht. Mit einem \* gekennzeichnete Signale sind Satellitensignale.

Die genaue Zuordnung aller Alkylprotonen ist durch ihre hohe Äquivalenz und damit einer starken Überlappung im Bereich von 1,2 - 1,4 ppm nicht möglich. H-1' und H-2' können anhand ihrer Tieffeld-Verschiebung durch die Nähe zum Pyrrolring zugeordnet werden. H-11' kann als Triplett bei 0,90 ppm identifiziert werden. Die NMR-Daten von Coeligosin C (35) sind in Tab. 3.4 zusammengefasst.

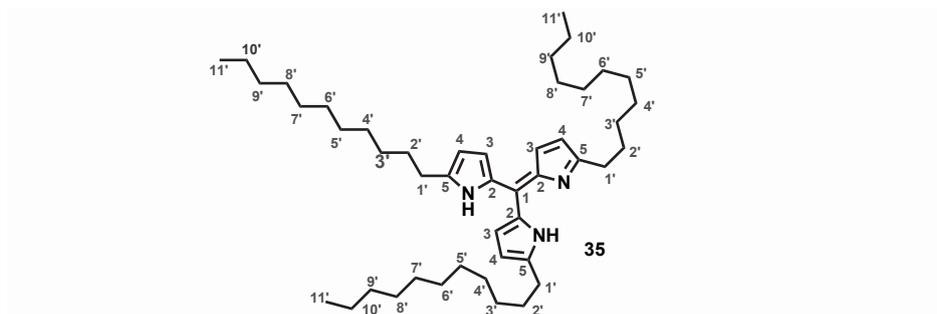


Tabelle 3.4: NMR-Daten von Coeligiosin C (**35**) (Methanol- $d_4$ ,  $^1\text{H}$ : 500 MHz,  $^{13}\text{C}$ : 125 MHz,  $\delta$  in ppm relativ zu Methanol  $\delta_{\text{H}}$ : 3,31 ppm,  $\delta_{\text{C}}$ : 49,0 ppm)

Position	$\delta$ $^{13}\text{C}$	$\delta$ $^1\text{H}$	HMBC
1	137,1	-	
2	130,8	-	
3	129,4	6,99	C-1, C-2, C-4, C-5
4	115,5	6,49	C-1, C-2, C-3, C-5
5	153,3	-	
6	-	NH	
1'	29,4	2,80	C-4, C-5, C-2'
2'	30,3	1,75	C-5, C-1'
3' - 10'	$\sim 30,8$	$\sim 1,25 - 1,45$	
11'	14,5	0,90	

Die Struktur von Coeligiosin D (**36**) wurde wie bei Coeligiosin A (**33**) anhand des MS/MS-Spektrums abgeleitet (Abb. 3.14). Dabei kommt es zur gleichzeitigen Fragmentierung der linearen und zyklisierten Alkylkette in Coeligiosin D, erkennbar an den Fragmenten mit einer Massendifferenz von 2 amu (Pfeile in Abb. 3.14) Außerdem konnte die Bildung von Coeligiosin D (**36**) in biomimetischen Studien (Kap. 3.2.2, S. 63) aus Streptorubin B (**14**) und Undecylpyrrol (**27**) nachgewiesen werden. Somit muss auch in Coeligiosin D (**36**) an einem der Pyrrolringe die Alkylkette zu einen *meta*-verbrückten 10-Ring geschlossen sein.

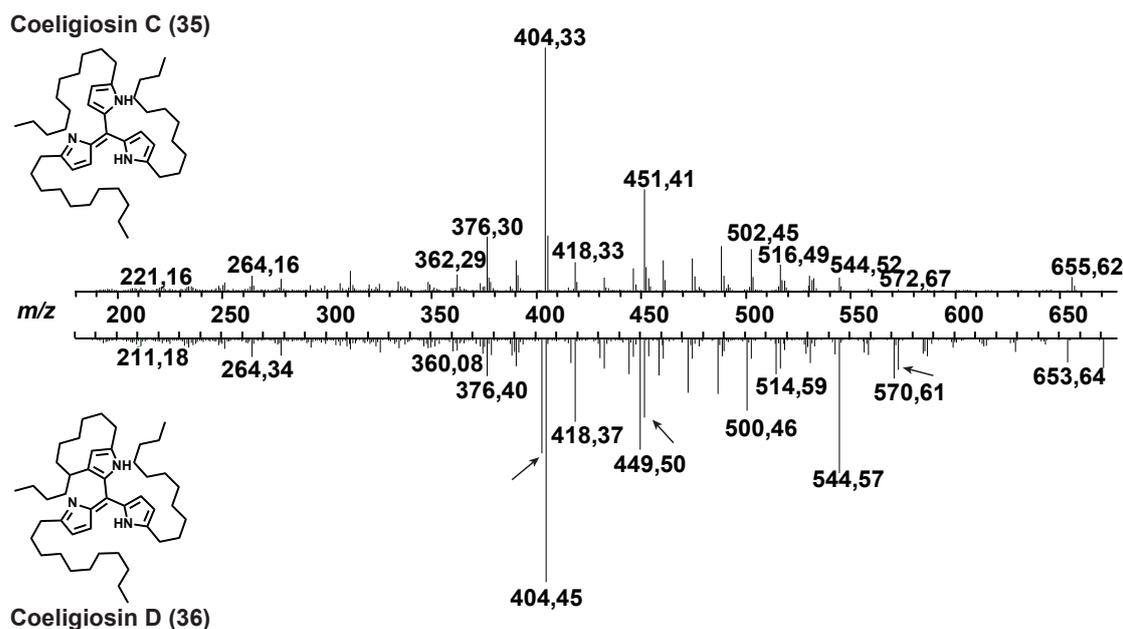


Abbildung 3.14: Vergleich der MS-MS-Spektren von Coeligiosin C (35) ( $[M+H]^+ = 672$ , oben) und Coeligiosin D (36) ( $[M+H]^+ = 670$ , unten). Durch die gleichzeitige Fragmentierung der linearen und zyklisierten Alkylkette in Coeligiosin D (36) kommt es zu Fragmenten mit einer Massendifferenz von 2 amu (Pfeile).

### 3.1.2.3 Strukturaufklärung von Coeligiosin E (37)

Coeligiosin E (37) wird nur in sehr geringen Mengen vom roten Phänotyp von *S. coelicolor* gebildet und ist eine tiefblaue Verbindung mit einer Quasimolekülmasse  $[M+H]^+ = 552,33301$  und der Summenformel  $C_{34}H_{42}O_2N_5$ . Es war möglich etwa 400  $\mu\text{g}$  soweit zu reinigen, dass ein Strukturvorschlag gemacht werden konnte (Abb. 3.15, B). Im Protonen NMR-Spektrum von Coeligiosin E (37) (Abb. 3.15) finden sich charakteristische Signale, wie sie auch im NMR-Spektrum von Coeligiosin B (34) oder Streptorubin B (14) zu finden sind. Zunächst fällt das Signal bei ca. -1,0 ppm auf, was auf einen *meta*-verbrückten 10-Ring wie in Streptorubin B (14) schließen lässt. Außerdem zeigen die Signale für H-1' das typische Aufspaltungsmuster für einen Alkylring (im Gegensatz zu einem eindeutigen Triplett für eine lineare Alkylkette). Die Zuordnung weiterer Protonen der Alkylkette ist nicht möglich, da noch geringe Verunreinigungen in der Probe enthalten waren und diese mit den Alkylprotonen überlagern.

Das Integral der Methoxygruppe ist mit sechs (Abb. 3.15, A) doppelt so groß wie für die Prodigiosine 13 und 14 sowie Coeligiosine B (34), was auf zwei Methoxygruppen schließen lässt. Im Bereich der Pyrrolprotonen konnten drei schlecht aufgelöste Signale mit einem Integral

von jeweils zwei identifiziert werden (Abb. 3.15, A). Außerdem gibt es ein breites überlappendes Signal mit einem Integral von drei. Durch Messung eines HSQC-Spektrums konnten die zugehörigen Verschiebungen der Kohlenstoffatome ermittelt werden (Abb. 3.15, C).

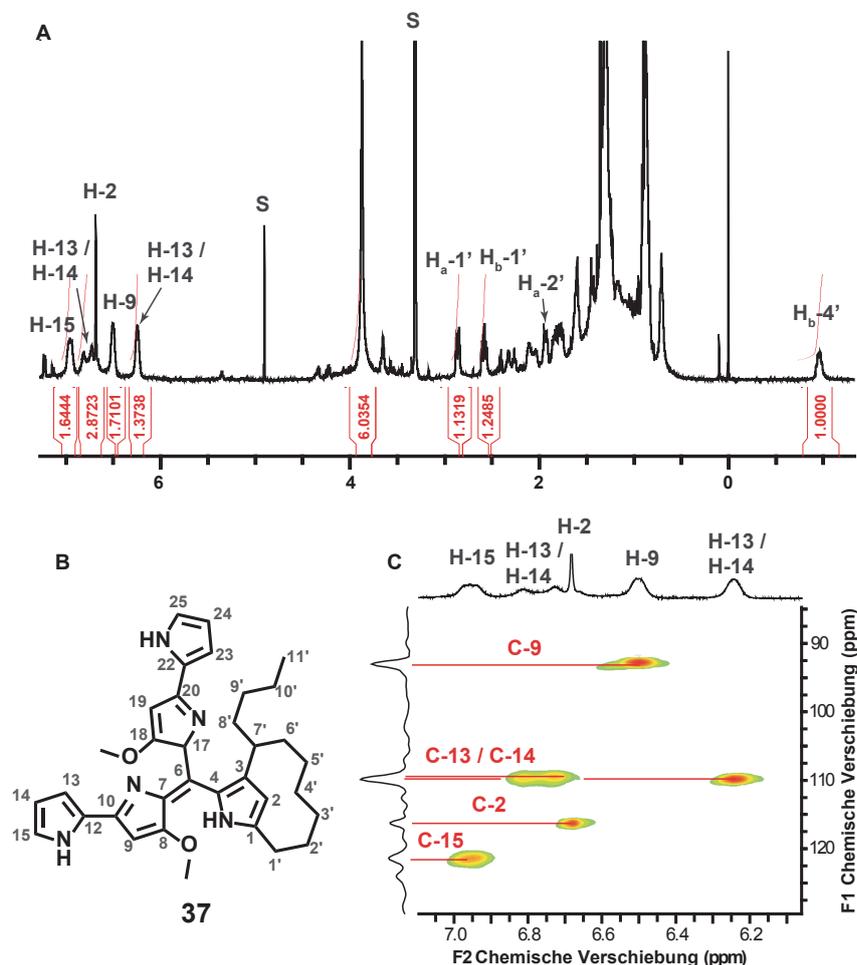


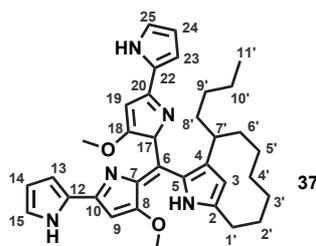
Abbildung 3.15:  $^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) (A) und Ausschnitt des HSQC (C) von Coeligiosin E (37) inklusive Strukturvorschlag (B). S: Signale des Lösungsmittels

In Analogie zu den Prodigiosinen und Coeligiosinen kann man davon ausgehen, dass das Signal bei 92 ppm dem Kohlenstoff C-9 zugeordnet werden kann. Alle weiteren Signale zeigen üblichen Verschiebungen für Pyrrolprotonen des A oder C-Ringes ((20) Abb. 1.4). Daher ist es möglich, eine Struktur für Coeligiosin E (37) vorzuschlagen (Abb. 3.15, B). Durch die verdoppelten Integrale von Methoxygruppe und H-9 kann man davon ausgehen, dass im Fall von Coeligiosin E (37) eine zweite Bipyrrroleinheit an das Grundgerüst von Streptorubin B (14) gebunden ist. In Analogie zu den bereits identifizierten Coeligiosinen kann man mit hoher Wahrscheinlichkeit davon ausgehen, dass die zweite Bipyrrroleinheit ebenfalls am Brücken-Kohlenstoff C-6 in das Molekül integriert ist. Wertvolle Hinweise zur Strukturaufklärung

von Coeligiosin E (**37**) lieferte außerdem die Veröffentlichung von Wasserman *et al.* [90]. Er isolierte aus einer *S. marcescens*-Mutante einen tiefblauen Metaboliten, der als Verbindung zweier Bipyrrroleinheiten über eine Methenbrücke identifiziert werden konnte.

Geht man davon aus, dass wie in Coeligiosin B (**34**) die Signale der doppelt vorkommenden Undecylpyrrolringe schlecht aufgelöst sind, so könnte dies auch bei Coeligiosin E (**37**) zu breiten und schlecht aufgelösten Signalen der doppelt vorkommenden Bipyrrrolprotonen H-9, H-13, H-14 und H-15 führen, das Signal H-3 sollte dagegen gut aufgelöst detektierbar sein. Unter dieser Annahme kann das einzig klare Singulett bei ca. 6,7 ppm H-3 zugeordnet werden. Von den drei verbleibenden, schlecht aufgelösten Signalen kann unter Vorbehalt H-15 ebenfalls zugeordnet werden, da in allen Prodigiosinen und Coeligiosinen H-15 die stärkste Tieffeldverschiebung des A-Ringes zeigte.

Die zugeordneten Signale von Coeligiosin E (**37**) sind in Tab. 3.5 angegeben.



**Tabelle 3.5:** NMR-Daten von Coeligiosin E (**37**) (Methanol- $d_4$ ,  $^1\text{H}$ : 500 MHz,  $^{13}\text{C}$ : 125 MHz,  $\delta$  in ppm relativ zu Methanol  $\delta_{\text{H}}$ : 3,31 ppm,  $\delta_{\text{C}}$ : 49,0 ppm)

Position	$\delta$ $^{13}\text{C}$	$\delta$ $^1\text{H}$
3	116,2	6,68
9 / 19	92,9	6,50
13 / 23 <sup>(a)</sup>	109,9	6,25
14 / 24 <sup>(a)</sup>	109,6	6,78
15 / 25	121,5	6,96
1'	28,9	2,86 / 2,58
2'	32,1	1,93 / 1,28
4'	26,8	- 0,95 / 1,19
11'	12,91	0,91

<sup>a</sup>: Die Signale für C 13/ 23 und 14/24 können nicht eindeutig den jeweiligen Positionen zugeordnet werden und sind vertauschbar.

Das MS/MS-Spektrum des Quasimoleküls von Coeligiosin E (**37**) (Abb. 3.16) unterscheidet sich dahingehend von den anderen Coeligiosinen, dass es nur sehr wenige Abspaltungen von 14 amu zeigt. Durch die zweite Methoxygruppe kommt es zur Bildung des Ions mit einer Masse von  $m/z$  506 (**38**), das relativ stabil ist und ohne weitere Einwirkung nicht zerfällt.

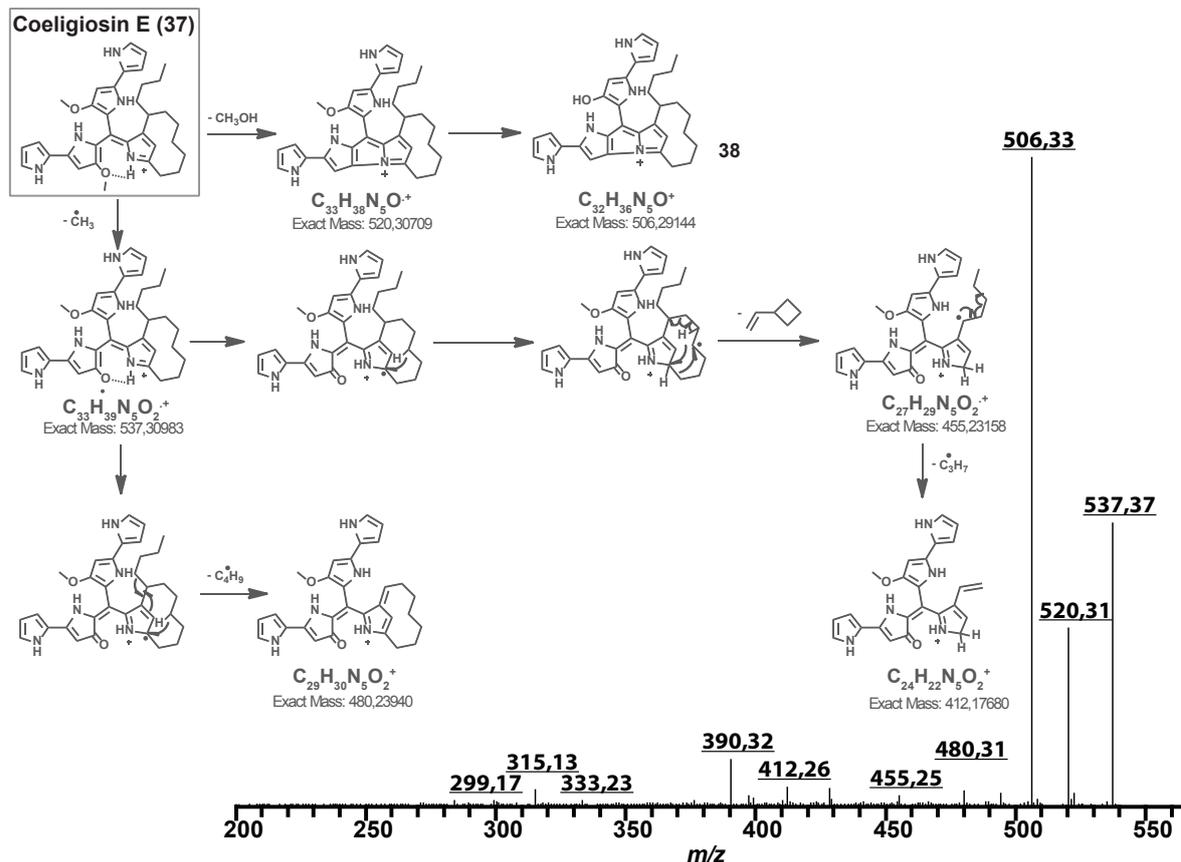


Abbildung 3.16: MS-MS-Spektrum des Quasimoleküls von Coeligiosin E (**37**) ( $[\text{M}+\text{H}]^+ = 552$ ) und Vorschlag für die beobachtete Fragmentierung.

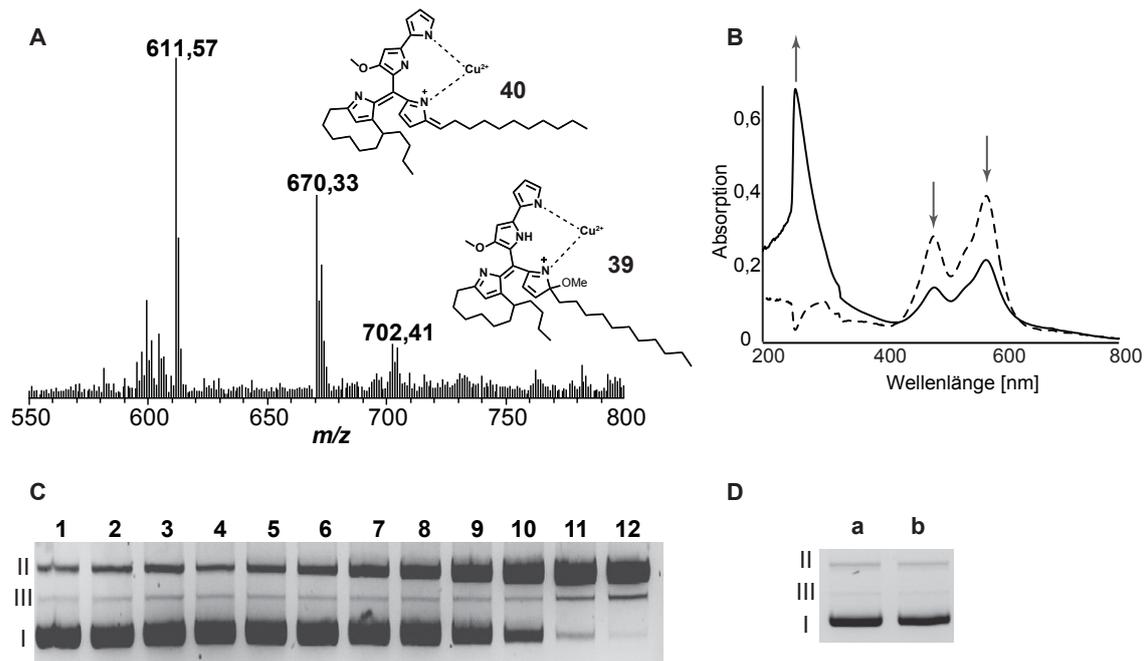
### 3.1.3 Eigenschaften der Coeligiosine

#### 3.1.3.1 Restriktion doppelsträngiger DNA durch Coeligiosin B - Kupferionen - Komplexe

Wegen der Verwandtschaft der Coeligiosine zu den Prodigiosinen wurden zunächst Eigenschaften untersucht, die für die Prodigiosine bereits bekannt sind. So ist beispielsweise von Prodigiosin-Kupferionen-Komplexen bekannt, dass sie doppelsträngige DNA schneiden [51, 91]. Coeligiosin B (**34**) ist ebenfalls in der Lage, Kupfer(II)-Ionen zu komplexieren, erkennbar an einem veränderten UV/VIS-Spektrum nach Zugabe von Kupfer(II)acetat zu einer methanolischen Coeligiosin B - Lösung (Abb. 3.17, **B**). Die Komplexe konnten auch mittels Massenspektrometrie bestimmt werden. Analog zu Park *et al.* konnte eine oxidierte Spezies mit  $m/z = 702$  (**39**) bestimmt werden, die aus der Reaktion des Kupferion-Coeligiosin-Komplexes mit Methanol resultiert. Außerdem war auch die reduzierte Form mit  $m/z = 670$  (**40**) nachweisbar, die durch die Abspaltung des vorher gebundenen Methanols entsteht (Abb. 3.17, **A**). Dadurch kann wie im Fall von Prodigiosin auf einen 1:1 Komplex aus Kupfer(II)ion und Coeligiosin B (**34**) geschlossen werden [51]. Sehr gut nachweisbar sind die Kupfer(II)komplexe durch das Isotopenmuster von Kupfer, welches aus den natürlichen Kupferisotopen  $^{63}\text{Cu}$  und  $^{65}\text{Cu}$  resultiert.

Da Coeligiosin B (**34**), genau wie die Prodigiosine, Kupfer(II)ionen komplexieren kann, wurde auf die damit assoziierte Fähigkeit, doppelsträngige DNA zu schneiden, getestet. Dazu wurde analog zu Melvin *et al.* Plasmid-DNA im Assay eingesetzt und anschließend auf einem Agarosegel analysiert [91]. Durch den Kupferionkomplex werden zunächst Einzelstrangbrüche in der Plasmid-DNA erzeugt (Form II), wodurch die verdrillte (*supercoiled*) Form des Plasmids aufgelöst wird. Dadurch läuft die entsprechende DNA während der Agarosegelelektrophorese langsamer. Durch die Restriktion des zweiten DNA-Stranges kommt es schließlich zur Linearisierung des Plasmids (Form III). Eine vollständige Umsetzung der intakten Plasmid-DNA (Form I) hin zu DNA mit Einzelstrangbrüchen (Form II) und linearisierter DNA (Form III) konnte nach fünf Stunden nachgewiesen werden (Abb. 3.17, **C**). Coeligiosin B (**34**) zeigt damit etwa die gleiche Reaktivität im DNA-cleavage Assay wie Undecylprodigiosin (**13**) (siehe Anhang). Für Coeligiosin C (**35**) konnten keine DNA-restriktierenden Eigenschaften nachgewiesen werden (siehe Anhang), alle anderen Coeligiosine konnten aufgrund der geringen isolierten Mengen nicht getestet werden.

Es wurde außerdem getestet, ob Coeligiosin B (**34**) in Gegenwart von Kobalt(II)ionen ebenfalls zur Restriktion doppelsträngiger DNA führt. Dazu wurde im Restriktionsassay



**Abbildung 3.17: Restriktion doppelsträngiger DNA durch Coeligiosin B-Kupferionen-Komplexe.** **A:** Nachweis der 1:1 Coeligiosin B - Kupferionen-Komplexe **39** und **40** im ESI-MS-Spektrum einer kupferhaltigen Coeligiosin B-Lösung analog zu Park *et al.* [51]; **B:** Veränderung des UV/VIS-Spektrum von Coeligiosin B (**34**) (gestrichelte Linie) nach Zugabe von  $\text{Cu}(\text{OAc})_2$  (durchgehende Linie); **C:** Restriktion doppelsträngiger Plasmid-DNA durch *in vitro* erzeugte Coeligiosin B-Kupferion-Komplexe. Dabei wurde die Reaktion anhand der Umsetzung von verdrehter Plasmid-DNA (I) zu Plasmid-DNA mit Einzelstrangbrüchen (II) und zu linearisierter Plasmid-DNA (III) auf einem Agarosegel analysiert. Ansätze aus Plasmid-DNA, Coeligiosin B (**34**) und Kupferacetat wurden in MOPS Puffer und 10 % Acetonitril für 0, 10, 20, 30, 40, 60, 90, 180 und 300 Minuten (4-12) bei 37 °C inkubiert. Die Ansätze 1-3 wurden 300 Minuten bei 37 °C inkubiert und enthielten nur Plasmid-DNA (1), keine Kupfer(II)-Ionen (2) oder kein Coeligiosin B (**34**) (3); **D:** Restriktion doppelsträngiger Plasmid DNA mit Coeligiosin-Kobaltionen-Komplexen. Nach 300 Minuten zeigte sich kein Unterschied zwischen Plasmid-DNA (a) und der mit dem Coeligiosin-Kobaltionen-Komplex inkubierten Plasmid-DNA (b).

Kupfer(II)acetat durch Kobalt(II)acetat ersetzt. Jedoch konnte auch nach fünf Stunden keine Restriktion der Plasmid-DNA nachgewiesen werden (Abb. 3.17, **D**). Es konnte anschließend per ESI-MS nachgewiesen werden, dass Coeligiosin B (**34**) nicht in der Lage ist, Kobalt(II)ionen zu komplexieren. Auch im UV/VIS-Spektrum zeigte sich nach Zugabe von Kobalt(II)acetat zur Coeligiosin-Lösung keine Änderung. Dies ist ein Hinweis, dass Coeligiosin B (**34**) von den Zellen nicht als Siderophor zur Komplexierung von überschüssigen Kobalt(II)ionen gebildet wird. Außerdem kann so verhindert werden, dass innerhalb der Zellen von *S. coelicolor* unter erhöhten Kobaltionenkonzentrationen die eigene DNA durch Coeligiosin-Kobaltionen-Komplexe angegriffen wird. Unter Kupfer(II)ionen-Stress kommt es

ebenfalls zum Auftreten des roten Phänotyps und der Bildung von Coeligiosinen (Kap. 3.3.1, S. 76). Allerdings ist die Toleranz gegenüber diesem Schwermetallion deutlich geringer, was unter anderem am Angriff von Coeligiosin- und Prodigiosin-Kupferionen-Komplexen auf die eigene DNA liegen könnte.

### 3.1.3.2 Antiproliferative und zytotoxische Eigenschaften von Coeligiosin B (34)

Da Undecylprodigiosin (**13**) und Streptorubin B (**14**) für ihre hohe zytotoxische Aktivität bekannt sind, sollte Coeligiosin B (**34**) aufgrund seiner Ähnlichkeit ebenfalls auf antiproliferative und zytotoxische Eigenschaften untersucht werden [48, 56]. Die entsprechenden Tests wurden freundlicherweise durch Dr. Hans-Martin Dahse am Leibniz Institut für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie e.V., Hans-Knöll-Institut (HKI), Jena durchgeführt. Der Test auf antiproliferative Eigenschaften wurde an humanen Endothelzellen (HUVEC - *human umbilical vein endothelial cells*), sowie der humanen Leukämiezelllinie K-562 durchgeführt. Die Zytotoxizität wurde an Zervixkarzinom-Zellen (Gebärmutterhalskrebs, HeLa - *Henrietta Lacks*) bestimmt. Dabei zeigte Coeligiosin B (**34**) nur eine schwache bzw. moderate zytotoxische und antiproliferative Wirkung und ist damit wesentlich schwächer als Undecylprodigiosin (**13**) und Streptorubin B (**14**), die zu Vergleichszwecken ebenfalls getestet wurden und eine sehr hohe Wirkung zeigten. Die Ergebnisse sind in Tab. 3.6 zusammengefasst.

**Tabelle 3.6:** Ergebnisse der antiproliferativen und zytotoxischen Testung von Undecylprodigiosin (**13**), Streptorubin B (**14**) und Coeligiosin B (**34**)

Verbindung	Antiproliferativer Effekt		Zytotoxizität
	HUVEC	K-562	HeLa
	GI <sub>50</sub> [ $\mu\text{g/ml}$ ]	GI <sub>50</sub> [ $\mu\text{g/ml}$ ]	CC <sub>50</sub> [ $\mu\text{g/ml}$ ]
Undecylprodigiosin ( <b>13</b> )	$3,3 \times 10^{-1}$	$1,1 \times 10^{-1}$	$7,2 \times 10^{-2}$
Streptorubin B ( <b>14</b> )	$5,4 \times 10^{-2}$	$8,0 \times 10^{-2}$	$6,7 \times 10^{-2}$
Coeligiosin B ( <b>34</b> )	19,8	13,0	15,0

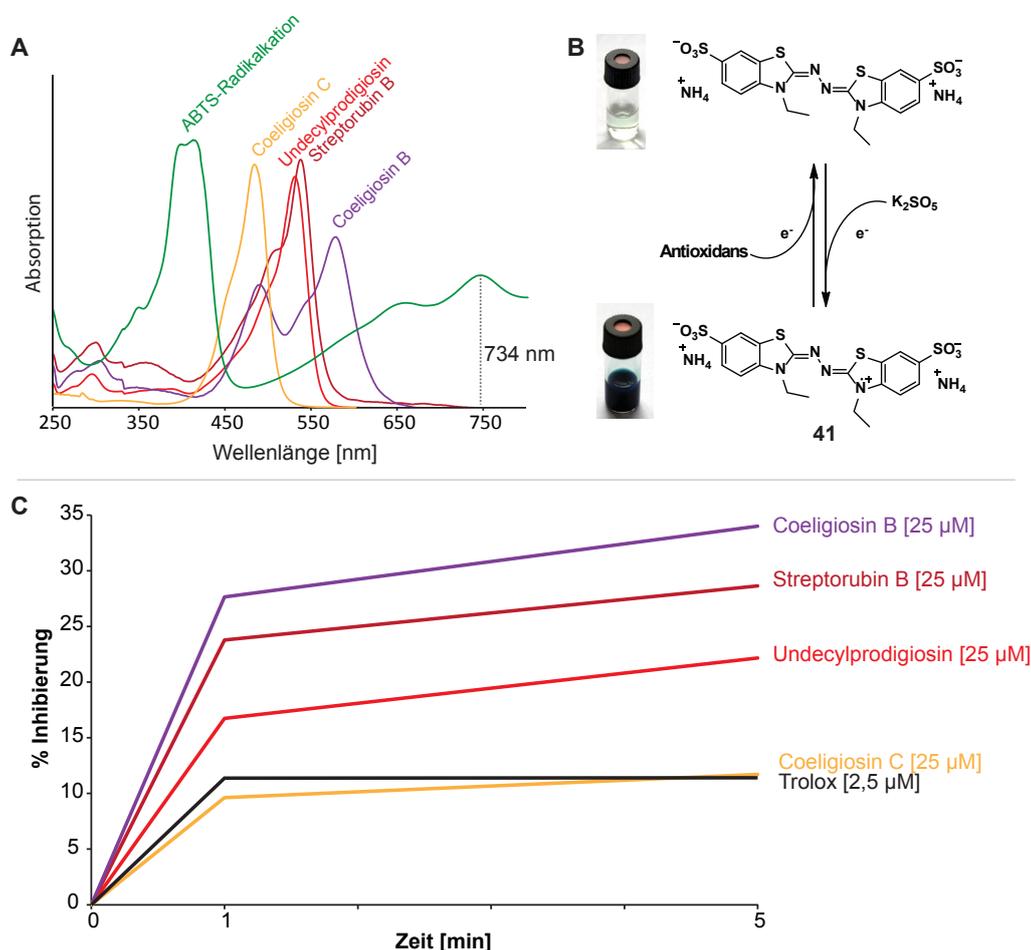
### 3.1.3.3 Radikalfangende Eigenschaften

Sowohl Undecylprodigiosin (**13**) und Streptorubin B (**14**), als auch die Coeligiosine besitzen ein ausgedehntes konjugiertes Doppelbindungssystem. Verbindungen, die ebenfalls über ein ausgedehntes konjugiertes System verfügen, wie beispielsweise Vitamin C,  $\alpha$ -Tocopherol oder Kaempferol sind bekannte Radikalfänger, da sie die entstehenden Radikal-Ionen über das konjugierte System stabilisieren können und somit zum Abbruch der Radikalkettenreaktion führen [92, 93]. Da eine Stabilisierung eines auftretenden Radikalions in den Prodigiosinen oder Coeligiosinen durch deren konjugiertes System ebenfalls erwartet werden kann, sollten die Verbindungen auf ihre radikalfangenden Eigenschaften geprüft werden.

Dazu wurden die Prodigiosine und Coeligiosine im ABTS-Assay nach Re *et al.* (Kap. 6.9.4, S. 121) getestet [94]. Zunächst wird aus 2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure) (ABTS) mit Hilfe von Kaliumpersulfat das tief dunkelgrüne ABTS-Radikalkation (**41**) hergestellt, welches im Anschluss durch Antioxidantien zeit- und konzentrationsabhängig zurück zu ABTS entfärbt wird (Abb. 3.18, **B**). Die Reaktion kann anhand der Absorptionsänderung des ABTS-Radikalkations (**41**) verfolgt werden, wobei die Absorptionsmaxima bei 415, 645, 734 und 815 nm genutzt werden können. Die Prodigiosine, als auch die Coeligiosine besitzen jedoch selbst eine starke Absorption im Bereich von 400 bis 650 nm, wodurch in diesem Bereich nicht zwischen der Änderung des Absorptionsspektrums bedingt durch das ABTS-Radikal (**41**) oder das Prodigiosin bzw. Coeligiosin selbst unterschieden werden kann. Es wurde deshalb 734 nm als Detektionswellenlänge für den Assay gewählt (Abb. 3.18, **A**) um allein die Absorptionsänderung des ABTS-Radikals (**41**) ohne störenden Hintergrund zu ermitteln.

Es konnten sowohl für Undecylprodigiosin (**13**) und Streptorubin B (**14**), als auch die Coeligiosine B (**34**) und C (**35**) radikalfangende Eigenschaften nachgewiesen werden (Abb. 3.18, **C**). Coeligiosin B (**34**) zeigte von den getesteten Verbindungen die größte Aktivität, was auf das größte konjugierte System der getesteten Verbindungen und damit die beste Stabilisierung des entstandenen Radikals zurückzuführen ist. Es folgen Streptorubin B (**14**) und Undecylprodigiosin (**13**), wobei Streptorubin B (**14**) das Radikal zusätzlich über den Alkylring stabilisieren kann und somit eine größere Aktivität als Undecylprodigiosin (**13**) besitzt. Coeligiosin C (**35**) weist durch das kleinste konjugierte System die geringste Aktivität auf. Die Coeligiosine A (**33**), D (**36**) und E (**37**) konnten wegen zu geringer isolierter Mengen nicht getestet werden. Man würde jedoch aufgrund der Größe des konjugierten Systems folgende

Aktivitäten im Vergleich zu den getesteten Verbindungen erwarten: Coeligiosin E (**37**) > Coeligiosin B (**34**) > Coeligiosin A (**33**) > Streptorubin B (**14**) > Undecylprodigiosin (**13**) > Coeligiosin D (**36**) > Coeligiosin C (**35**).



**Abbildung 3.18: ABTS-Entfärbungsassay zum Nachweis von Antioxidantien nach Re et al.** **A:** Vergleich der UV/VIS-Absorptionsspektren von Undecylprodigiosin (**13**), Streptorubin B (**14**), Coeligiosin B (**34**), Coeligiosin C (**35**) und des ABTS-Radikalkations (**41**). **B:** Bildung des 2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)-Radikalkations (ABTS<sup>•+</sup>) (**41**) mit Hilfe von Kaliumpersulfat; **C:** Vergleich der inhibierenden Wirkung der Prodigiosine und Coeligiosine auf die Absorption des ABTS-Radikalkations bei 734 nm.

Außerdem wurde das Vitamin E-Derivat Trolox (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carbonsäure) (**42**) als Referenzverbindung eingesetzt. Dabei musste für Trolox eine zehnfach geringere Konzentration als für die Coeligiosine und Prodigiosine verwendet werden, um einen ähnlichen Wert der Aktivität zu erhalten. In Tab. 3.7 sind die Aktivitäten der getesteten Verbindungen in Abhängigkeit der Trolox-Aktivität als Trolox-Äquivalente (*Trolox Equivalent Antioxidative Capacity*, TEAC) angegeben [94].

**Tabelle 3.7:** Trolox-Äquivalente der getesteten Verbindungen (Trolox = 1) im ABTS-Entfärbungsassay zum Nachweis von Antioxidantien nach Re *et al.*

Zeit [min]	Streptorubin B (14)	Undecyl- prodigiosin (13)	Coeligiosin B (34)	Coeligiosin C (35)
1	0,21	0,15	0,24	0,08
5	0,25	0,19	0,30	0,10

## 3.2 Untersuchungen zur Biosynthese der Coeligiosine

Der Aufbau der Coeligiosine ähnelt sehr dem der Prodigiosine: sie sind aus denselben Untereinheiten wie Undecylprodigiosin (**13**) und Streptorubin B (**14**) aufgebaut, wie durch MS und NMR gezeigt werden konnte. Undecylpyrrol (UP) (**27**) findet sich in allen Coeligiosinen wieder, 4-Methoxy-2,2'-bipyrrol-5-carboxyaldehyd (MBC) (**26**) in den Coeligiosinen A, B und E (Kap. 3.1.2, S. 25). Ob ein gemeinsamer Biosyntheseweg der Coeligiosine und Prodigiosine vorliegt sollte durch Verfütterungsexperimenten untersucht werden. Dabei sollten die gemeinsamen Vorstufen Undecylpyrrol und 4-Methoxy-2,2'-bipyrrol-5-carboxyaldehyd bestätigt und im Anschluss untersucht werden, ob die Biosynthese der Coeligiosine direkt aus den Vorstufen erfolgt oder zunächst Undecylprodigiosin (**13**) und Streptorubin B (**14**) gebildet werden und die Verknüpfung weiterer Undecylpyrrol- oder 4-Methoxy-2,2'-bipyrrol-5-carboxyaldehyd-Einheiten anschließend erfolgt. Außerdem stellte sich für Coeligiosin C (**35**) und Coeligiosin D (**36**) die Frage nach der Herkunft des zentralen Kohlenstoffatoms, über das die drei Undecylpyrrol-Einheiten verknüpft sind.

### 3.2.1 Fütterungsstudien zur Biosynthese der Coeligiosine

Zunächst sollte der Einbau von Undecylpyrrol (**27**) in die Coeligiosine gezeigt werden. Dazu wurde unmarkiertes Undecylpyrrol (**27**) und später auch zweifach Deuterium-markiertes Undecylpyrrol (UP-d<sub>2</sub>) (**46**) synthetisiert (Kap. 6.6.5, S. 109). Die Synthese erfolgte in zwei Schritten aus Undekansäure (**43**) und Pyrrol (**44**) (Kap. 6.6.1, S. 105; Kap. 6.6.2, S. 106; Kap. 6.6.5, S. 109) [69]. Dabei war es im zweiten Schritt durch Reduktion von Undecanoyl-

pyrrol (**45**) mit Natriumbordeuterid möglich, quantitativ eine stabile Deuterium-Markierung in das Molekül (**46**) einzuführen (Abb. 3.19).

[1',1'-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-Undecylpyrrol (UP-d<sub>2</sub>) (**46**) wurde anschließend sowohl an den roten Phänotyp von *S. coelicolor* in Kobaltsulfat-haltigem SFM-Medium als auch an den Wildtyp in Glycerolmedium gefüttert. In Glycerolmedium produziert der Wildtyp im Gegensatz zum SFM-Medium bereits ohne Kobaltionen-Zusatz die bekannten Prodigiosine, jedoch keine Coeligiosine. Durch Fütterung von Undecylpyrrol (**27**) bzw. [1',1'-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-Undecylpyrrol (**46**) wurde jedoch in Glycerolmedium eine deutliche Induktion der Coeligiosine B (**34**) und C (**35**) beobachtet (Abb. 3.20). Die Coeligiosine A (**33**) und D (**36**) wurden nach der Fütterung nur in Spuren gebildet, Coeligiosin E (**37**) konnte nicht nachgewiesen werden.

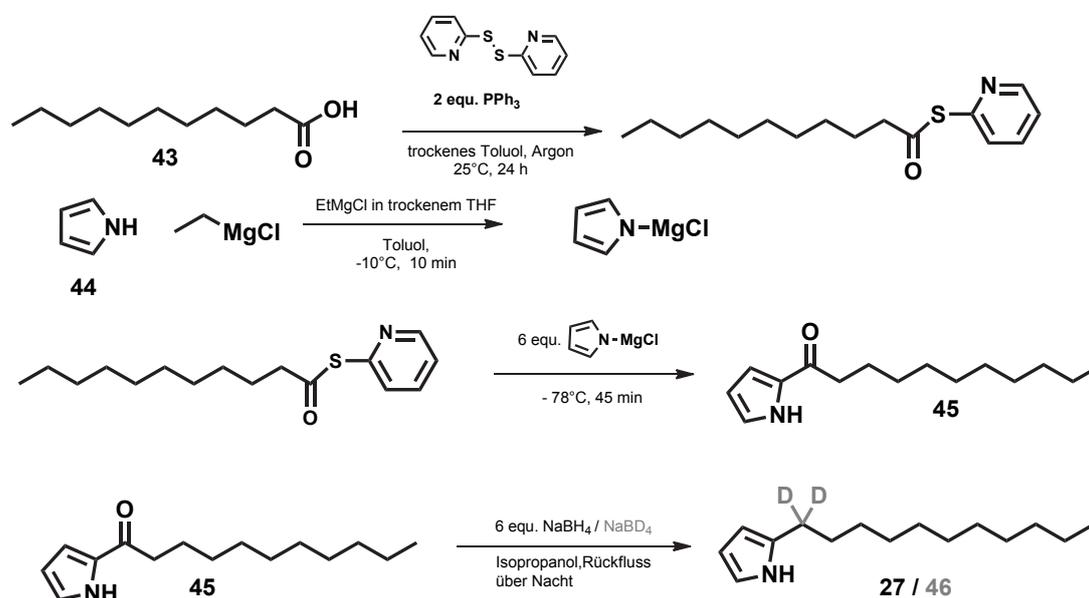
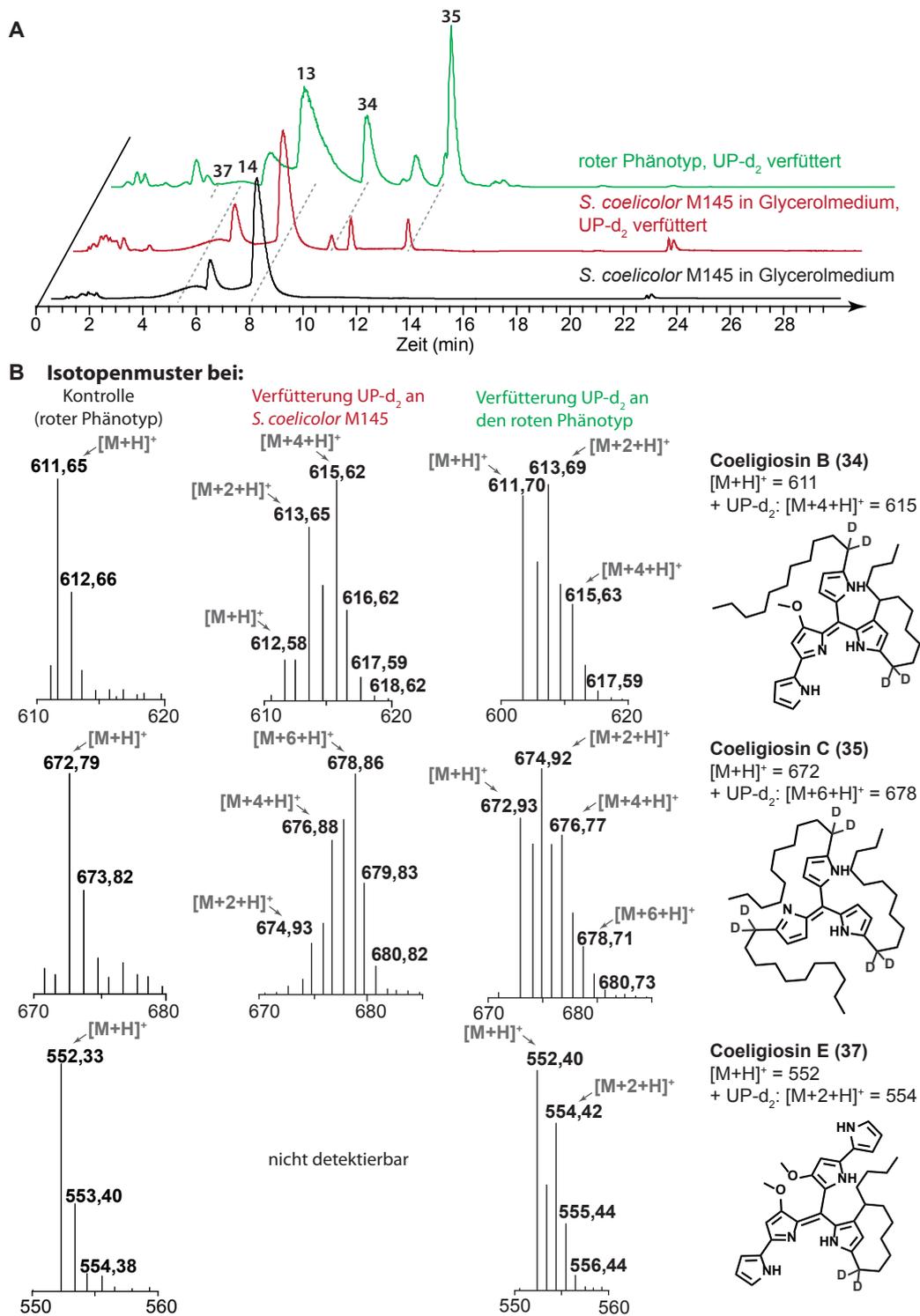


Abbildung 3.19: Syntheschema zur Herstellung von [1',1'-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-Undecylpyrrol.

Anhand des Isotopenmusters ließ sich der Einbau von [1',1'-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-Undecylpyrrol (UP-d<sub>2</sub>) (**46**) verfolgen. Es konnte zwar kein 100 %iger Einbau von [1',1'-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-Undecylpyrrol (**46**) erreicht werden, dennoch zeigten Streptorubin B (**14**) und Undecylprodigiosin (**13**) im Vergleich zur Kontrolle deutlich erhöhte Isotopenpeaks bei [M+2+H]<sup>+</sup> (Abb. 3.20). Für Coeligiosin B (**34**) ließen sich erhöhte Isotopenpeaks für [M+2+H]<sup>+</sup> sowie [M+4+H]<sup>+</sup> nachweisen, was für den Einbau von bis zu zwei Undecylpyrrolen spricht. In Coeligiosin C (**35**) konnte der Einbau von bis zu drei Undecylpyrrolen identifiziert werden, da [M+6+H]<sup>+</sup> als intensivster Massenpeak auftrat.

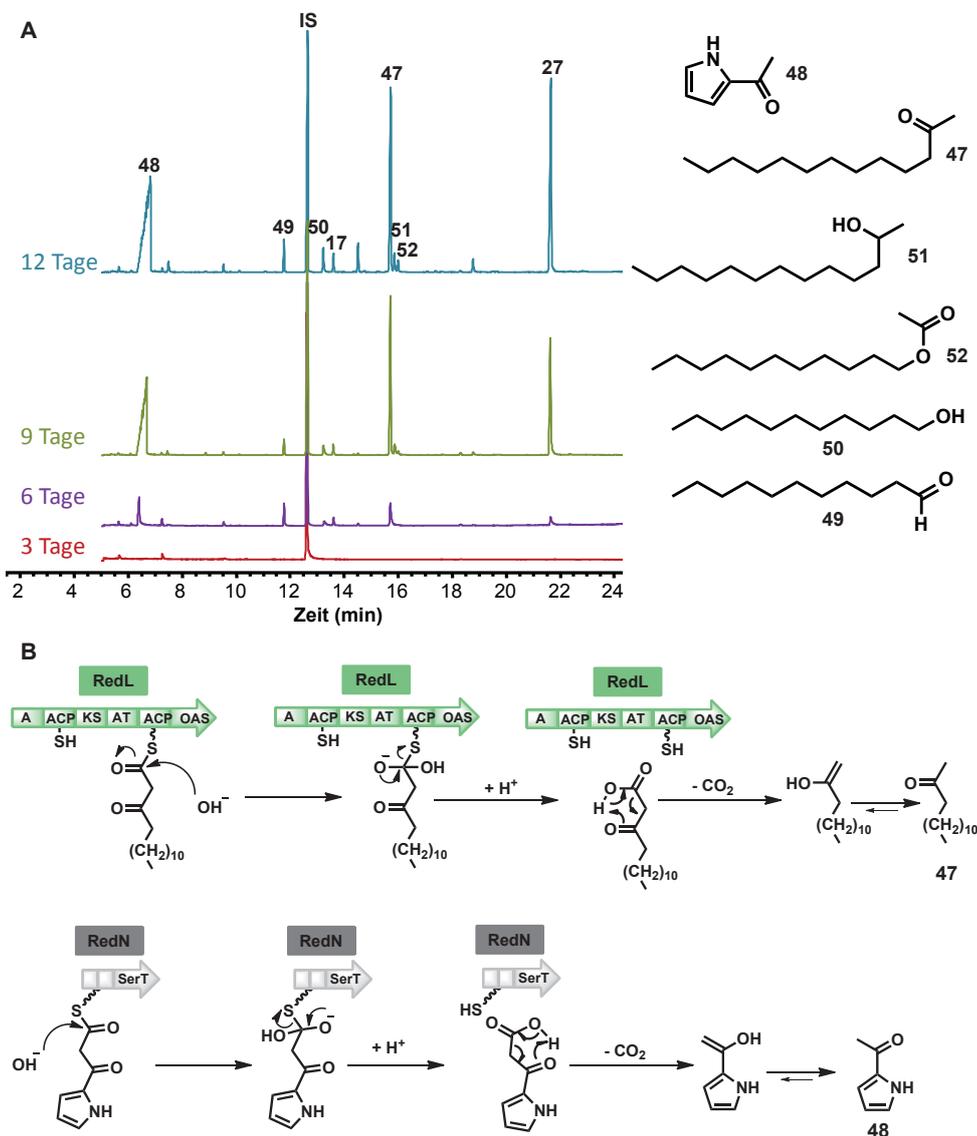


**Abbildung 3.20:** Fütterung von [1',1'-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-Undecylpyrrol (UP-d<sub>2</sub>) (46) an *S. coelicolor* M145 in Glycerolmedium und an den roten Phänotyp. **A:** LC-ESI-MS (pos. Modus) von Zellextrakten nach Fütterung von UP-d<sub>2</sub> (46) an *S. coelicolor* M145 in Glycerolmedium (rot) und den roten Phänotyp (grün), sowie *S. coelicolor* M145 in Glycerolmedium ohne Fütterung (schwarz). **B:** Vergleich des Isotopenmusters von Coeligiosin B (34), Coeligiosin C (35) und Coeligiosin E (37) der Fütterungsversuche unter Angabe des erwarteten Strukturen und Quasimolekülmassen bei vollständiger Markierung. Die Markierung im roten Phänotyp war für alle Coeligiosine nur teilweise zu beobachten, die entsprechenden Quasimolekülonen sind im Isotopenmuster markiert.

Somit konnte mit diesem Fütterungsexperiment zum einen der gemeinsame biosynthetische Ursprung der Undecylpyrroluntereinheit bewiesen werden und zum anderen eine Induktion der Coeligiosin-Biosynthese (A-D) unter erhöhten Undecylpyrrol-Konzentrationen beobachtet werden. Überträgt man dieses Ergebnis auf den roten Phänotyp unter Kobaltionen-Stress wäre eine verstärkte Undecylpyrrol-Biosynthese unter Stress denkbar, die schließlich zur Bildung der Coeligiosine führt.

Durch Fütterung von  $[1',1'^{-2}\text{H}_2]$ -Undecylpyrrol direkt an den roten Phänotyp in SFM-Medium unter Kobaltionenstress konnte der biosynthetische Ursprung der Undecylpyrrol-Einheit in den Coeligiosinen im roten Phänotyp verifiziert und nun auch für Coeligiosin E (**37**) analysiert werden. Coeligiosin E (**37**) zeigt deutlich einen erhöhten  $[M+2+H]^+$ -Peak, was auf den Einbau eines markierten Undecylpyrrols schließen lässt (Abb. 3.20). Der Einbau von einem Undecylpyrrol in Coeligiosin E, zwei Undecylpyrrolen in Coeligiosin A und B bzw. drei Undecylpyrrolen in Coeligiosin C und D steht damit in Einklang mit den aufgeklärten Strukturen der Coeligiosine.

Allerdings waren die Einbauraten von  $[1',1'^{-2}\text{H}_2]$ -Undecylpyrrol (**46**) im roten Phänotyp deutlich schlechter als bei der Fütterung an den Wildtyp in Glycerolmedium. Dies kann durch zwei Effekte bedingt sein: Zum einen lässt sich der ideale Fütterungszeitpunkt beim roten Phänotyp nicht bestimmen, da der Biomassezuwachs aufgrund des trüben SFM-Mediums (Kap. 6.1.1.2, S. 88) nicht direkt beobachtet werden kann. So wurde  $[1',1'^{-2}\text{H}_2]$ -Undecylpyrrol (**46**) erst gefüttert, als bereits eine schwache Rosafärbung der Kultur zu erkennen war, um eine Vergleichbarkeit der Fütterungsversuche gewährleisten zu können. Zu diesem Zeitpunkt ist die Prodigiosinproduktion jedoch bereits angelaufen und es wird das von den Zellen selbst hergestellte, unmarkierte Undecylpyrrol (**27**) für die Biosynthese eingesetzt. Zum anderen kann es sein, dass der rote Phänotyp deutlich größere Mengen an Undecylpyrrol herstellt als *S. coelicolor* M145 in Glycerolmedium. So zeigte sich in *headspace*-Analysen (Kap. 6.2.1, S. 93) des roten Phänotyps mittels GC-EI-MS, dass die Undecylpyrrol-Produktion über einen Zeitraum von 12 Tagen stetig zunimmt (Abb. 3.21, **A**). Neben Undecylpyrrol (**27**) selbst nahm auch die Konzentration an Tridecan-2-on (**47**) im Duftspektrum deutlich zu. Dabei handelt es sich um ein Abbauprodukt der Undecylpyrrol-Biosynthese, welches durch Hydrolyse des RedL-Enzymkomplexes entsteht (Abb. 3.21, **B**). Analog kam es zur Bildung von 2-Acetylpyrrol (**48**) durch Hydrolyse des RedN-Enzymkomplexes (Abb. 3.21, **B**). Außerdem fanden sich im Duft Spuren von Undecanal (**49**), Undecanol (**50**) und Geosmin (**17**). Ab Tag 9 konnten außerdem Tridecan-2-ol (**51**) und Undecylacetat (**52**) detektiert werden.



**Abbildung 3.21:** Analyse der flüchtigen Verbindungen des roten Phänotyps. **A:** *headspace*-Analyse (Kap. 6.2.1, S. 93) des roten Phänotyps mittels GC-EI-MS über 12 Tage; 2-Acetylpyrrol (**48**), Undecanal (**49**), Undecanol (**50**), Geosmin (**17**), Tridecan-2-on (**47**), Tridecan-2-ol (**51**), Undecylacetat (**52**), Undecylpyrrol (**27**), IS = Interner Standard (1-Bromdecan). **B:** Vorschlag zur Entstehung von Tridecanon (**47**) und 2-Acetylpyrrol (**48**)

Da durch die Fütterung größerer Mengen Undecylpyrrol (**27**) an *S. coelicolor* M145 in Glycerolmedium (Kap. 6.1.1.2, S. 88) die Bildung der Coeligiosine A (**33**), B (**34**), C (**35**) und D (**36**) induziert werden konnte, sollte 4-Methoxy-2,2'-bipyrrrol-5-carboxyaldehyd (**26**) ebenfalls gefüttert werden um eine Induktion von Coeligiosin E (**37**) zu bewirken. Dazu wurde der Bipyrrrolaldehyd (**26**) zunächst nach Dairi *et al.* in zwei Schritten synthetisiert [95]. Im ersten Schritt erfolgte die Umsetzung von 4-Methoxypyrrrolinon (**53**) mit dem *in situ* generierten

Vilsmeier-Reagenz zu einem bromierten Enamin (**54**) (Kap. 6.6.3, S. 107). Im zweiten Schritt wurde das Enamin (**54**) in einer Suzuki-Kupplung mit Pyrrolborsäure (**55**) unter gleichzeitiger Hydrolyse des Enamins zum gewünschten 4-Methoxy-2,2'-bipyrrrol-5-carboxyaldehyd (**26**) umgesetzt (Abb. 3.22, Kap. 6.6.4, S. 108). Der so hergestellte 4-Methoxy-2,2'-bipyrrrol-5-carboxyaldehyd (**26**) wurde anschließend an *S. coelicolor* M145 in Glycerolmedium gefüttert (Kap. 6.7.2, S. 116), jedoch zeigte sich nicht die erwartete Induktion der Coeligiosin E (**37**) Biosynthese (siehe Anhang).

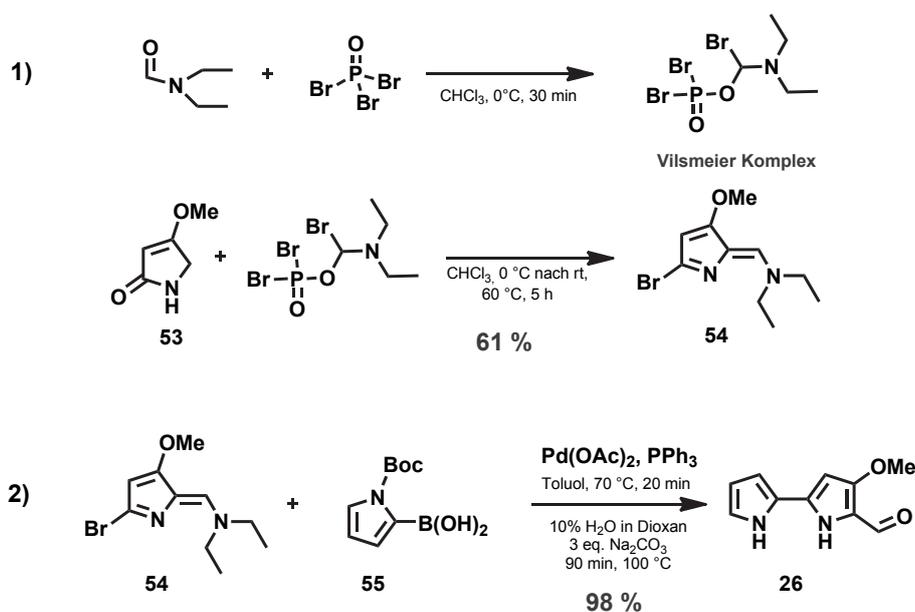


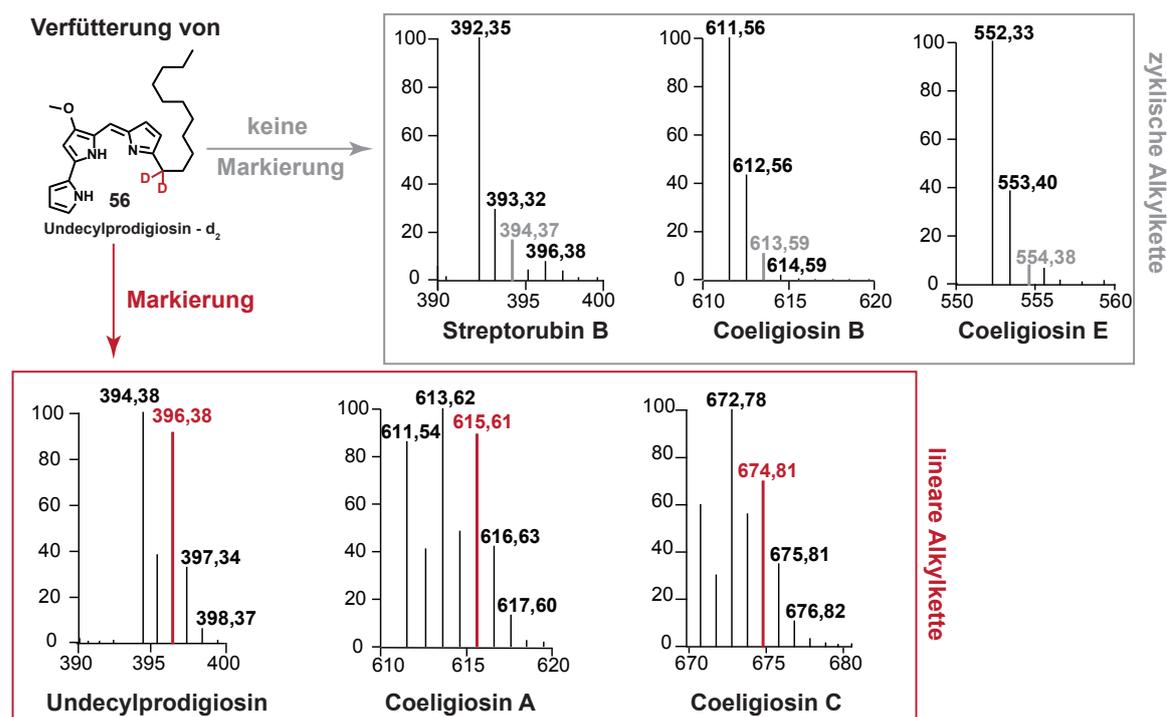
Abbildung 3.22: Syntheschema für die Herstellung von 4-Methoxy-2,2'-bipyrrrol-5-carboxyaldehyd (**26**) über 2 Stufen.

Die Coeligiosine A (**33**), B (**34**) und E (**37**) weisen in ihrer Struktur das Rückgrat von Undecylprodigiosin (**13**) bzw. Streptorubin B (**14**) auf. Deshalb stellte sich die Frage, ob zunächst die bekannten Prodigosine gebildet werden und im Anschluss die Verknüpfung zu weiteren Undecylpyrrrol- oder Bipyrrroleinheiten erfolgt, oder ob die Coeligiosine direkt aus den Vorstufen Undecylpyrrrol (**27**) und 4-Methoxy-2,2'-bipyrrrol-5-carboxyaldehyd (**26**) gebildet werden.

Die direkte Synthese aus den Vorstufen ist jedoch aufgrund von Coeligiosin B (**34**) und Coeligiosin E (**37**) eher unwahrscheinlich, da diese Verbindungen eine zyklisierte Alkylkette analog zu Streptorubin B (**14**) besitzen. Stuart Haynes konnte in seiner Dissertation zeigen, dass das Enzym RedG, welches für die Zyklisierung verantwortlich ist, eine relativ hohe Substratspezifität aufweist [75]. So ist zur Umsetzung von Undecylprodigiosin (**13**) zu Streptorubin B (**14**)

der Stickstoff des A-Ringes ebenso wie die Methoxygruppe des B-Ringes essentiell.

Um der Frage nachzugehen, ob die Coeligiosine ausgehend von den Prodigiosinen gebildet werden, wurde zweifach Deuterium-markiertes  $[1',1'-^2\text{H}_2]$ -Undecylprodigiosin (**56**) aus 4-Methoxy-2,2'-bipyrrol-5-carboxyaldehyd (**26**) und  $[1',1'-^2\text{H}_2]$ -Undecylpyrrol (**46**) hergestellt (Kap. 6.6.9, S. 112). Dieses wurde anschließend an den roten Phänotyp gefüttert und das Metabolitenprofil per LC-MS analysiert (Kap. 6.7.4, S. 117). Dabei sollte  $[1',1'-^2\text{H}_2]$ -Undecylprodigiosin (**56**) von den Bakterien zunächst in markiertes Streptorubin B (**14**) umgewandelt werden und somit eine Markierung aller Coeligiosine erlauben. Doch bereits dieser Schritt konnte nicht beobachtet werden. Es ließ sich zwar  $[1',1'-^2\text{H}_2]$ -Undecylprodigiosin (**56**) im Zellpellet nachweisen, deuteriertes Streptorubin B (**14**) aber nicht (Abb. 3.23). Ebenso verhielt es sich mit den Coeligiosinen. Die Coeligiosine A (**33**) und C (**35**) mit ausschließlich linearen Alkylketten konnten markiert nachgewiesen werden, während die Coeligiosine B (**34**), D (**36**) und E (**37**) mit zyklisierter Seitenkette keine Markierung zeigten (Abb. 3.23).



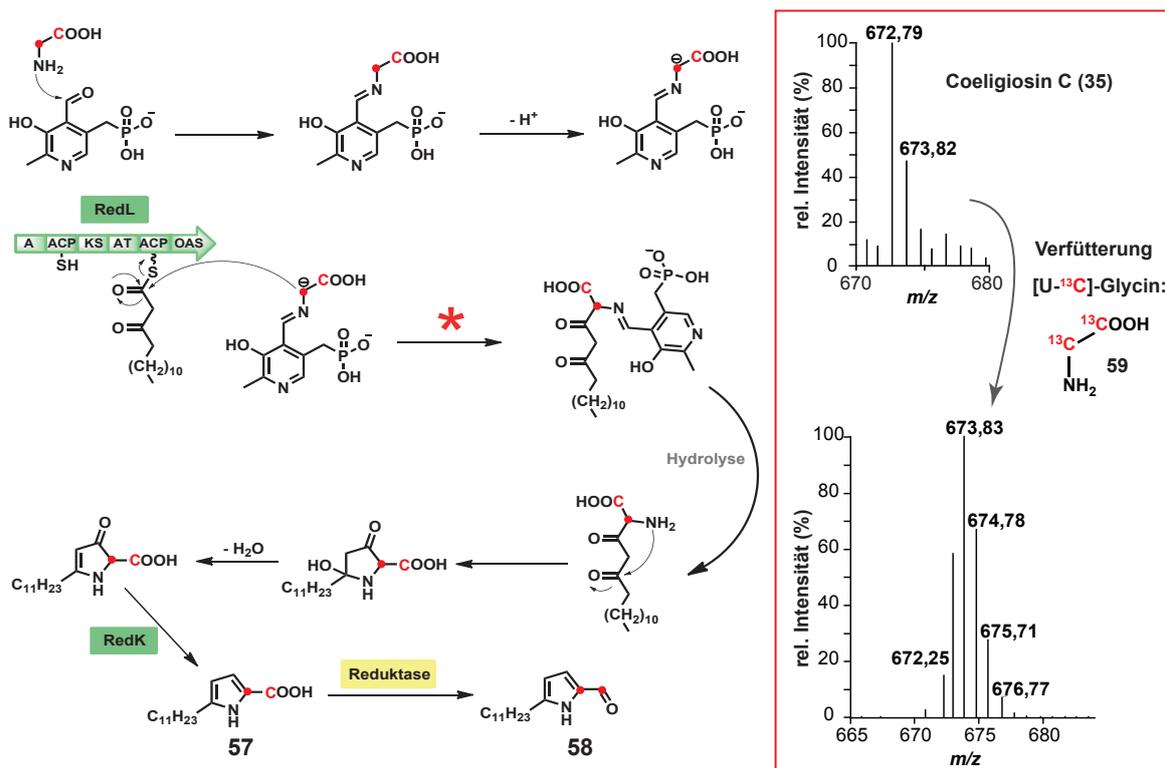
**Abbildung 3.23:** Fütterung von  $[1',1'-^2\text{H}_2]$ -Undecylprodigiosin (**56**) an den roten Phänotyp. Dargestellt sind die Isotopenmuster von Streptorubin B (**14**), Coeligiosin B (**34**), Coeligiosin E (**37**), Undecylprodigiosin (**13**), Coeligiosin A (**33**) und Coeligiosin (**35**) nach Fütterung von  $[1',1'-^2\text{H}_2]$ -Undecylprodigiosin (**56**).

Zwei Erklärungen für das beobachtete Verhalten sind denkbar: Zunächst ist es möglich, dass die Umwandlung von Undecylprodigiosin (**13**) in die Coeligiosine A (**33**) und C (**35**)

enzymunabhängig innerhalb der Bakterien erfolgt (eine Reaktion im Medium kann ausgeschlossen werden, da das Zellpellet untersucht wurde). Eine andere Möglichkeit wäre ein Enzymkomplex aus RedH und RedG, in dem das produzierte Undecylprodigiosin (**13**) direkt an RedG weitergegeben und dort zyklisiert wird. Von außen zugefüttertes Undecylprodigiosin hätte dabei keine Möglichkeit in den Enzymkomplex zu gelangen und es könnte folglich nicht zur Zyklisierung zu Streptorubin B (**14**) kommen. Bereits Haynes *et al.* und Sydor *et al.* diskutieren solch einen Komplex, da nur eine gemeinsame Expression von RedH und RedG einen Effekt auf das Verhältnis von Undecylprodigiosin (**13**) zu Streptorubin B (**14**) hat, nicht aber eine Erhöhung von *redG*-Kopien allein [71, 86].

Die Markierung von Coeligiosin C (**35**) bei der Fütterung von deuteriertem Undecylprodigiosin (**56**) war auf den ersten Blick erstaunlich, da bei Coeligiosin C (**35**) die Bipyrrroleinheit fehlt. Jedoch ergab sich aus dieser Fütterung eine Vermutung über die Herkunft des zentralen Kohlenstoffs in Coeligiosin C (**35**), auf den in Kap. 3.2.1, S. 60 noch einmal genauer eingegangen werden soll.

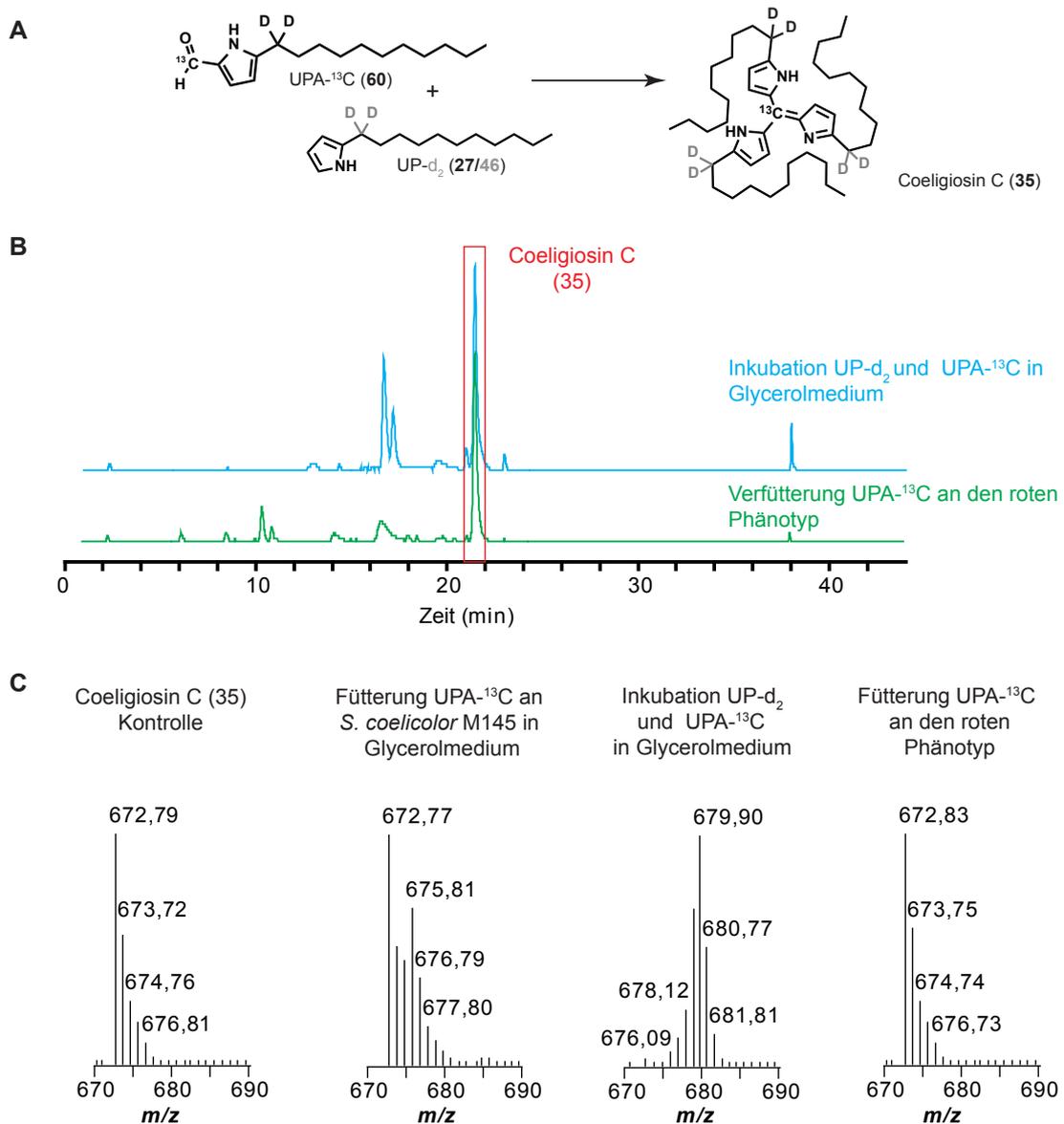
Bereits vor der Fütterung von deuteriertem Undecylprodigiosin (**56**) wurden verschiedene Fütterungsversuche durchgeführt, welche die Herkunft des zentralen Kohlenstoffatoms in Coeligiosin C (**35**) und D (**36**) aufklären sollten. Zunächst wurde eine leicht veränderte Biosynthese von Undecylpyrrol (**27**) in Betracht gezogen, bei der es nach der Reaktion mit Glycin nicht zu einer Decarboxylierung kommt (Abb. 3.24). Dadurch würde die Carboxylgruppe erhalten bleiben und 5-Undecyl-2-carboxysäure (**57**) könnte im Anschluss durch eine Reduktase zu 5-Undecylpyrrol-2-carboxyaldehyd (**58**) reduziert werden. Damit stünde ein Aldehydkohlenstoff zu Verfügung, aus dem der zentrale Kohlenstoff in Coeligiosin C (**35**) und D (**36**) hervorgehen könnte. Um diese Hypothese zu überprüfen wurde vollständig markiertes [U-<sup>13</sup>C]-Glycin (**59**) an den roten Phänotyp gefüttert und der Einbau per LC-MS analysiert (Kap. 6.7.6, S. 117). Zwar ließ sich der Einbau des Glycins in alle Coeligiosine und Prodigosine anhand erhöhter Isotopenpeaks nachweisen, doch war eine eindeutige Aussage bezüglich Coeligiosin C (**35**) und D (**36**) nicht möglich. Bei der bisher angenommenen Biosynthese wäre ein stark erhöhter Isotopenpeak bei  $[M+3+H]^+$  zu erwarten gewesen (jeweils eine Markierung je Undecylpyrrol), bei Bildung des Aldehyds bei  $[M+4+H]^+$ . Jedoch war selbst der erwartete Einbau von drei <sup>13</sup>C-Markierungen nicht eindeutig im Isotopenmuster nachweisbar (Abb. 3.24). Vermutlich wird die Aminosäure Glycin auch in großen Mengen von *S. coelicolor* selbst gebildet und zudem in andere Aminosäuren umgewandelt, was zu schlechten Einbauraten führte.



**Abbildung 3.24: Mechanismusvorschlag für die Biosynthese von 2-Undecylpyrrol-5-carboxyaldehyd.** Durch ausbleibende Decarboxylierung (\*) würde zunächst eine 2-Undecylpyrrol-5-carboxysäure (57) entstehen, die im Anschluss durch eine unbekannte Reduktase zu 2-Undecylpyrrol-5-carboxyaldehyd reduziert wird. Die Markierung der entsprechenden Kohlenstoffe bei Einbau von [U-<sup>13</sup>C]-Glycin ist rot markiert; rechts: Veränderung im Isotopenmuster von Coeligiosin C (35) durch Fütterung von [U-<sup>13</sup>C]-Glycin (59).

Um dennoch zu klären, ob das zentrale Kohlenstoffatom in Coeligiosin C (35) von einem möglichen 5-Undecylpyrrol-2-carboxyaldehyd-Intermediat (58) stammt, sollte 58 synthetisch hergestellt werden. Dazu wurde Undecylpyrrol (27) durch eine Vilsmeier-Formylierung in den entsprechen Aldehyd 58 umgewandelt (Kap. 6.6.6, S. 109). Durch Verwendung von <sup>13</sup>C-markiertem Dimethylformamid war es außerdem möglich, eine <sup>13</sup>C-Markierung an der Position des Aldehydkohlenstoffs einzuführen. Außerdem wurde das zweifach Deuterium-markierte [1',1'-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-Undecylpyrrol (46) verwendet, um markierte und unmarkierte Verbindungen durch einen Massenunterschied von 3 amu besser identifizieren zu können. Zunächst wurde [1',1'-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-5-Undecylpyrrol-2-carboxyaldehyd (58) und später auch [Formyl-<sup>13</sup>C, 1',1'-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-5-Undecylpyrrol-2-carboxyaldehyd (UPA-<sup>13</sup>C) (60) an *S. coelicolor* M145 in Glycerolmedium gefüttert. Dabei zeigte sich die erwartete Markierung von Coeligiosin C (35) durch Erhöhung des [M+3+H]<sup>+</sup>-Peaks von 675 (Abb. 3.25, B: linkes Isotopenmuster). Jedoch

war die Menge an gebildeten Coeligiosinen in Glycerolmedium ohne Zugabe von zusätzlichem Undecylpyrrol (**27**) nur sehr gering. Außerdem wurde der  $^{13}\text{C}$ -markierte Undecylpyrrolaldehyd (**60**) auch an den roten Phänotyp gefüttert. Dieser produzierte zwar Coeligiosin C (**35**) in großen Mengen, zeigte jedoch keinerlei Markierung der Verbindung (Abb. 3.25, **B**: rechtes Isotopenmuster).



**Abbildung 3.25: Fütterung von [Formyl- $^{13}\text{C}$ , 1',1'- $^2\text{H}_2$ ]-5-Undecylpyrrol-2-carboxyaldehyd (UPA- $^{13}\text{C}$ ) (**60**). **A**: LC-ESI-MS-Chromatogramme nach: 1. Inkubation von [1',1'- $^2\text{H}_2$ ]-Undecylpyrrol (UP-d $_2$ ) (**46**) und [Formyl- $^{13}\text{C}$ , 1',1'- $^2\text{H}_2$ ]-5-Undecylpyrrol-2-carboxyaldehyd (UPA- $^{13}\text{C}$ ) (**60**) in Glycerolmedium ohne Bakterium (blau). 2. Fütterung von [Formyl- $^{13}\text{C}$ , 1',1'- $^2\text{H}_2$ ]-5-Undecylpyrrol-2-carboxyaldehyd (UPA- $^{13}\text{C}$ ) (**60**) an den roten Phänotyp (grün). **B**: Vergleich der Isotopenmuster von Coeligiosin C (**35**) nach den jeweils angegebenen Fütterungen.**

Eine Inkubation von  $[1',1'-^2\text{H}_2]$ -Undecylpyrrol (UP-d<sub>2</sub>) (**46**) und  $[\text{Formyl-}^{13}\text{C}, 1',1'-^2\text{H}_2]$ -5-Undecylpyrrol-2-carboxyaldehyd (UPA-<sup>13</sup>C) (**60**) in Glycerolmedium ohne das Bakterium brachte schließlich den Beweis, dass Coeligiosin C (**35**) auch ohne Hilfe des Bakteriums auf einem biomimetischen Weg entstehen kann (Abb. 3.25, **A**: Vergleich der Retentionszeiten im LC-ESI-MS; **B**: mittleres Isotopenmuster). Im Bakterium selbst scheint die Biosynthese jedoch über einen anderen Biosyntheseweg zu laufen, da  $[\text{Formyl-}^{13}\text{C}, 1',1'-^2\text{H}_2]$ -5-Undecylpyrrol-2-carboxyaldehyd (**60**) eindeutig nicht in Coeligiosin C (**35**) eingebaut wurde.

Des Weiteren wurde getestet, ob Methanol als C1-Körper am Aufbau von Coeligiosin C (**35**) beteiligt sein könnte. Dazu wurde <sup>13</sup>C-markiertes Methanol an den roten Phänotypen gefüttert und die Coeligiosine C (**35**) und D (**36**) mittels LC-MS auf einen möglichen Einbau untersucht. Es zeigten sich jedoch, im Vergleich zu den biomimetischen Reaktionen (Kap. 3.2.2.1, S. 65) keine Veränderungen im Isotopenmuster der entsprechenden Verbindungen.

Durch die Fütterung von deuteriertem Undecylprodigiosin (**56**) (Kap. 3.2.1, S. 55, Abb. 3.23) stellte sich heraus, dass auch Coeligiosin C (**35**) ausgehend von Undecylprodigiosin (**13**) entstehen muss. Daher bestand die Möglichkeit, dass der zentrale Kohlenstoff in Coeligiosin C (**35**) auch hier aus dem Aldehydkohlenstoff der Bipyrrroleinheit (**26**) stammt. Um diese Hypothese zu testen, wurde deshalb <sup>13</sup>C-markiertes Serin (**61**) gefüttert, was während der Biosynthese zu einer <sup>13</sup>C-Markierung am Aldehyd-Kohlenstoff des Bipyrrrols (**26**) führen sollte (Abb. 3.26, **A**). Der Einbau in Coeligiosin C (**35**) war nicht quantitativ, doch es konnte eindeutig ein erhöhter  $[\text{M}+1+\text{H}]^+$ -Isotopenpeak nachgewiesen werden (Abb. 3.26).

Um einen besseren Einbau der Markierung in Coeligiosin C (**35**) zu erreichen und somit eindeutig den biosynthetischen Ursprung des zentralen Kohlenstoffs in Coeligiosin C (**35**) zu klären, sollte im Anschluss <sup>13</sup>C-markiertes 4-Methoxy-2,2'-bipyrrrol-5-carboxyaldehyd (**62**) hergestellt und an den roten Phänotyp gefüttert werden. Dazu musste die Synthese von 4-Methoxy-2,2'-bipyrrrol-5-carboxyaldehyd (**26**) leicht variiert werden, da <sup>13</sup>C-markiertes Diethylformamid nicht kommerziell erhältlich ist. Für die Synthese wurde stattdessen <sup>13</sup>C-markiertes Dimethylformamid verwendet. Diese Veränderung führte zwar zu starken Ausbeuteverlusten bei der ersten Synthesestufe zum entsprechenden  $[\text{8-}^{13}\text{C}]\text{-N-}((5\text{-Bromo-3-methoxy-2H-pyrrol-2-ylidene)methyl)\text{-N-methylmethanamin}$  (**63**) (Kap. 6.6.7, S. 111), jedoch war es auf diesem Weg möglich, schnell das gewünschte, markierte  $[\text{Formyl-}^{13}\text{C}]\text{-4-Methoxy-2,2'-bipyrrrol-5-carboxyaldehyd}$  (**62**) zu erhalten (Kap. 6.6.8, S. 111). **62** wurde im Anschluss an den roten Phänotyp gefüttert (Abb. 3.26). Zwar war auch hier der Einbau nicht quantitativ, doch konnte wie bei der Fütterung von <sup>13</sup>C-markiertem Serin (**61**) ein deutlich

erhöhter Isotopenpeak bei  $[M+1+H]^+$  nachgewiesen werden. Da ein Abbau des markierten Bipyrrolaldehyds (**62**) in eine relevante Spezies, die dann in Coeligiosin C (**35**) eingebaut wird, unwahrscheinlich ist, kann davon ausgegangen werden, dass der Aldehydkohlenstoff aus 4-Methoxy-2,2'-bipyrrol-5-carboxyaldehyd (**26**) die Quelle des zentralen Kohlenstoffs in Coeligiosin C (**35**) ist. Wie schließlich die Umwandlung von Undecylprodigiosin (**13**) zu Coeligiosin C (**35**) erfolgt, soll in Kap. 3.2.3, S. 68 diskutiert werden.

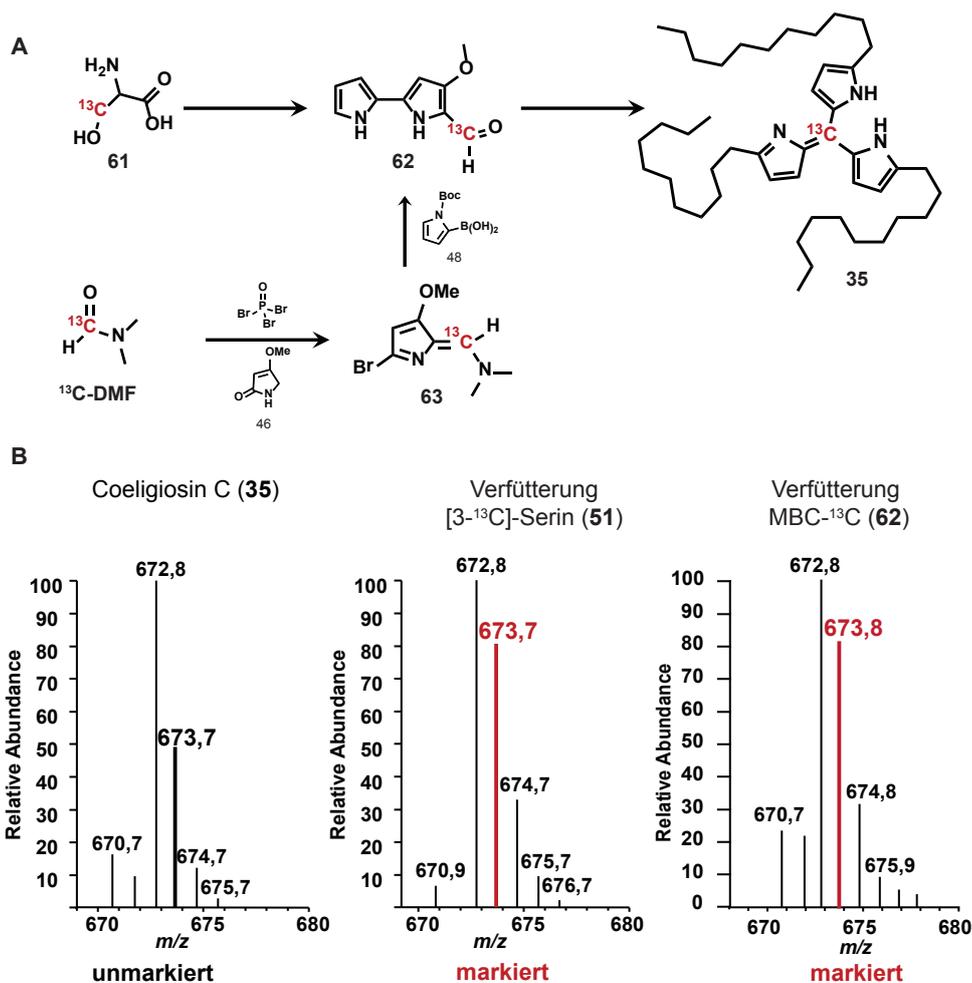
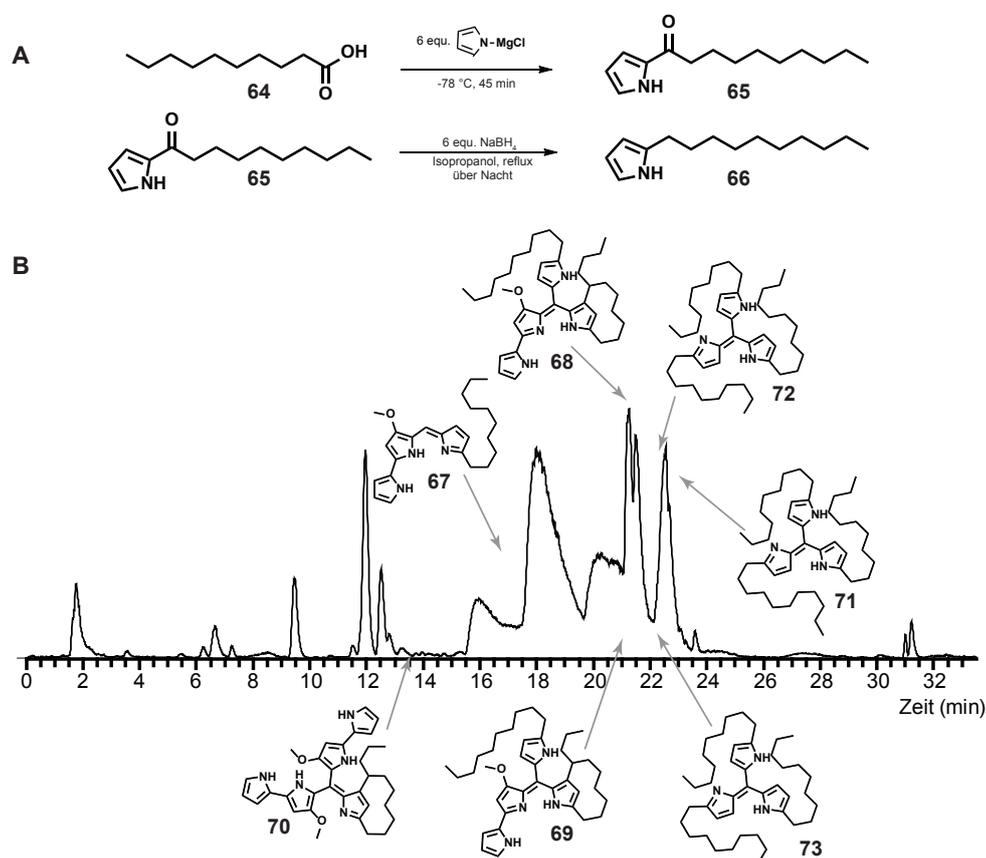


Abbildung 3.26: Fütterung von [3-<sup>13</sup>C]-Serin (**61**) und [Formyl-<sup>13</sup>C]-4-Methoxy-2,2'-bipyrrol-5-carboxyaldehyd (MBC-<sup>13</sup>C) (**62**) an den roten Phänotyp. A: Einbauweg des markierten Serins (**61**) in Coeligiosin C (**35**) über <sup>13</sup>C-markiertes 4-Methoxy-2,2'-bipyrrol-5-carboxyaldehyd (**62**), sowie direkte Synthese von [Formyl-<sup>13</sup>C]-4-Methoxy-2,2'-bipyrrol-5-carboxyaldehyd (**62**); B: Unterschiede im Isotopenmuster von Coeligiosin C (**35**) von Kontrolle (links) und nach Fütterung von [3-<sup>13</sup>C]-Serin (mitte) und [Formyl-<sup>13</sup>C]-4-Methoxy-2,2'-bipyrrol-5-carboxyaldehyd (rechts).

Um die Substratflexibilität der Coeligiosinproduktion zu testen, wurde analog zu Mo *et al.* aus Caprinsäure (**64**) und Pyrrol (**44**) über die Zwischenstufe von 2-Decanoylpyrrol (**65**)

2-Decylpyrrol (**66**) hergestellt (Kap. 6.6.10, S. 113, Kap. 6.6.11, S. 114) und an den roten Phänotyp gefüttert (Kap. 6.7.5, S. 117) [69]. Im methanolischen Zellextrakt waren anschließend sowohl die bekannten Coeligiosine, als auch die entsprechend kurzkettigen Analoga nachweisbar. Ebenso konnten Coeligiosine mit gemischten Alkylketten nachgewiesen werden. Als Beispiele sind in Abb. 3.27 Decylprodigiosin (**67**), die Coeligiosin B-Analoga mit zwei verschiedenen langen Alkylketten **68** oder zwei verkürzten Alkylketten **69**, das C-10-Coeligiosin E-Derivat **70** sowie die drei Coeligiosin C-Derivate **71** (eine C-10-Kette), **72** (zwei C-10-Ketten) und **73** (drei C-10-Ketten) aufgeführt. Weiterhin konnten auch entsprechende Analoga von Streptorubin B (**14**), Coeligiosin A (**33**) und Coeligiosin D (**36**) nachgewiesen werden (siehe Anhang).



**Abbildung 3.27: Synthese und Fütterung von Decylpyrrol 66 an den roten Phänotyp.** A: Syntheschema zur Darstellung von Decylpyrrol **66**; B: LC-ESI-MS-Chromatogramm nach Fütterung von Decylpyrrol **66** an den roten Phänotyp. Nachgewiesen wurden Decylprodigiosin **67**, Coeligiosin B-Analoga mit zwei verschiedenen langen Alkylketten **68** oder zwei verkürzten Alkylketten **69**, das C-10-Coeligiosin E-Derivat **70** sowie die drei Coeligiosin C-Derivate **71**, **72** und **73**. Weiterhin konnten auch entsprechende Analoga von Streptorubin B (**14**), Coeligiosin A (**33**) und Coeligiosin D (**36**) nachgewiesen werden, die nicht gezeigt sind.

Wie schon Haynes *et al.* zeigen konnten, sind RedH und RedG in der Lage, das kürzere Decylpyrrol zu verwerten und damit Decylprodigiosin (**67**), sowie dessen zyklisierte Form zu bilden [67, 75]. Mit dem Versuch konnte aber außerdem gezeigt werden, dass auch die Coeligiosin-Biosynthese flexibel genug ist, kurzkettigere Alkylpyrrole zu verwerten und die entsprechenden Coeligiosin-Analoga zu bilden.

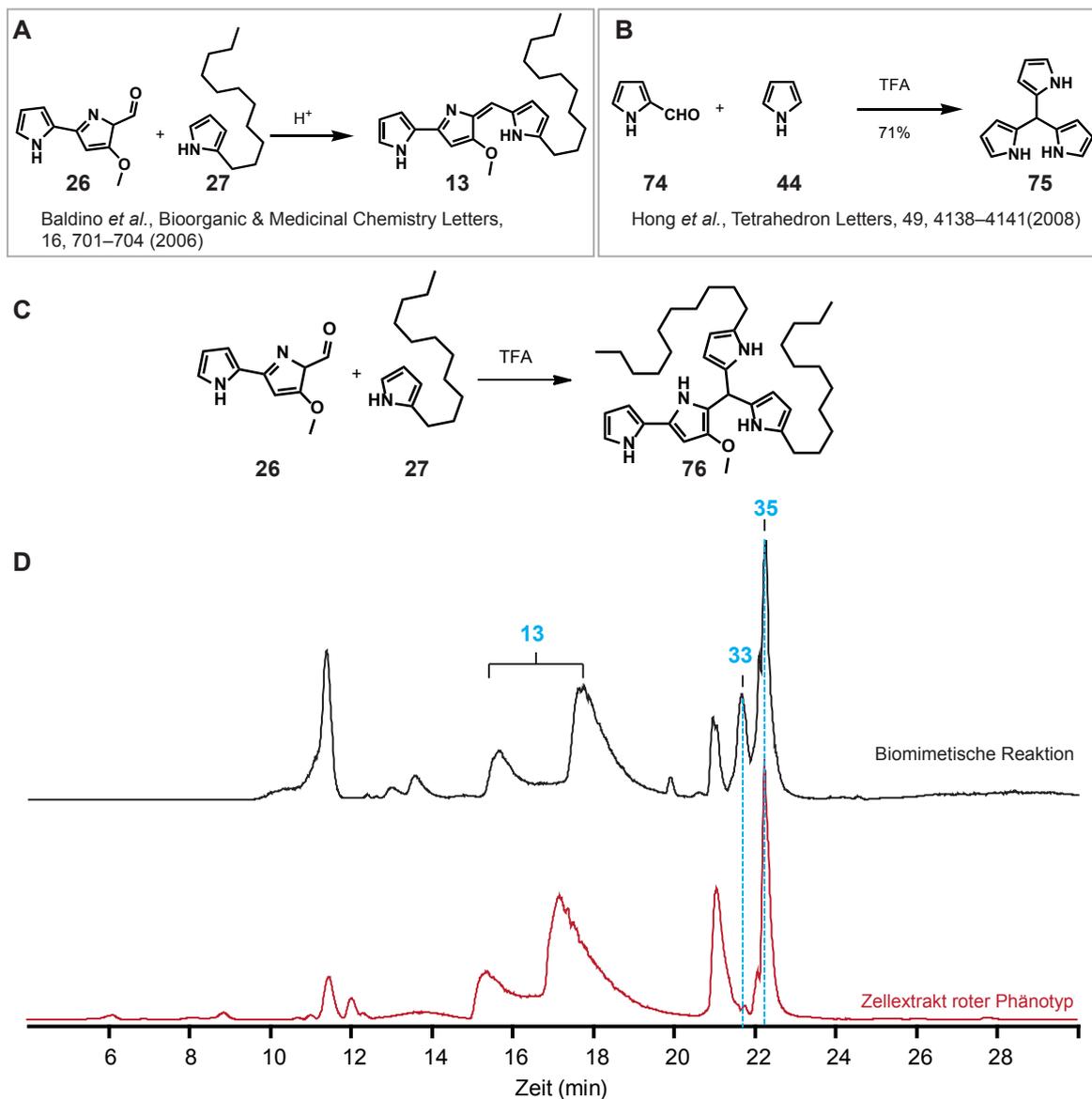
### 3.2.2 Biomimetische Studien zur Bildung der Coeligiosine

#### 3.2.2.1 Trifluoressigsäure-vermittelte Kupplung von Undecylpyrrol (**27**) und 4-Methoxy-2,2'-bipyrrol-5-carboxyaldehyd (**26**)

Eine wertvolle Unterstützung zur Aufklärung von Struktur und Biosynthese der Coeligiosine sollten biomimetische Studien liefern. Dabei werden die natürlichen Vorstufen der Biosynthese, Undecylpyrrol (**27**) und 4-Methoxy-2,2'-bipyrrol-5-carboxyaldehyd (**26**), nicht-enzymatisch untereinander gekoppelt. Eine Säure-katalysierte Kupplung (Abb. 3.28, **A**) wird seit 2006 genutzt und bietet eine Möglichkeit zur Darstellung natürlicher und synthetischer Prodigiosine [75, 96]. 2008 wurde von Hong *et al.* die Reaktion von Pyrrol (**44**) mit Pyrrol-2-carboxyaldehyd (**74**) unter katalytischen Mengen Trifluoressigsäure (TFA) zu zentral verknüpften Tripyrrolen (**75**) in guten Ausbeuten veröffentlicht (Abb. 3.28, **B**) [97].

Diese Reaktion sollte genutzt werden um Coeligiosin-Analoga aufzubauen, denen eine Doppelbindung am zentralen Kohlenstoff fehlt (Abb. 3.28, **B** am Beispiel von Dihydrocoeligiosin A (**76**)). Da dann ein Proton am zentralen Kohlenstoff vorhanden wäre, würde das die Strukturaufklärung der verknüpften Pyrrolringe in den Coeligiosinen durch heteronukleare 2D-NMR Spektroskopie stark erleichtern.

In dem Reaktionsansatz wurden Undecylpyrrol (**27**) und 4-Methoxy-2,2'-bipyrrol-5-carboxyaldehyd (**26**) in Methanol und einer katalytischen Menge TFA für drei Tage inkubiert und anschließend das Reaktionsgemisch per LC-ESI-MS analysiert. Neben der Bildung von Undecylprodigiosin (**13**) konnten auch Verbindungen nachgewiesen werden, die im  $[M+H]^+$ -Ion und Retentionszeit mit den natürlichen Coeligiosinen A (**33**) und C (**35**) übereinstimmten (Abb. 3.28, **D**).

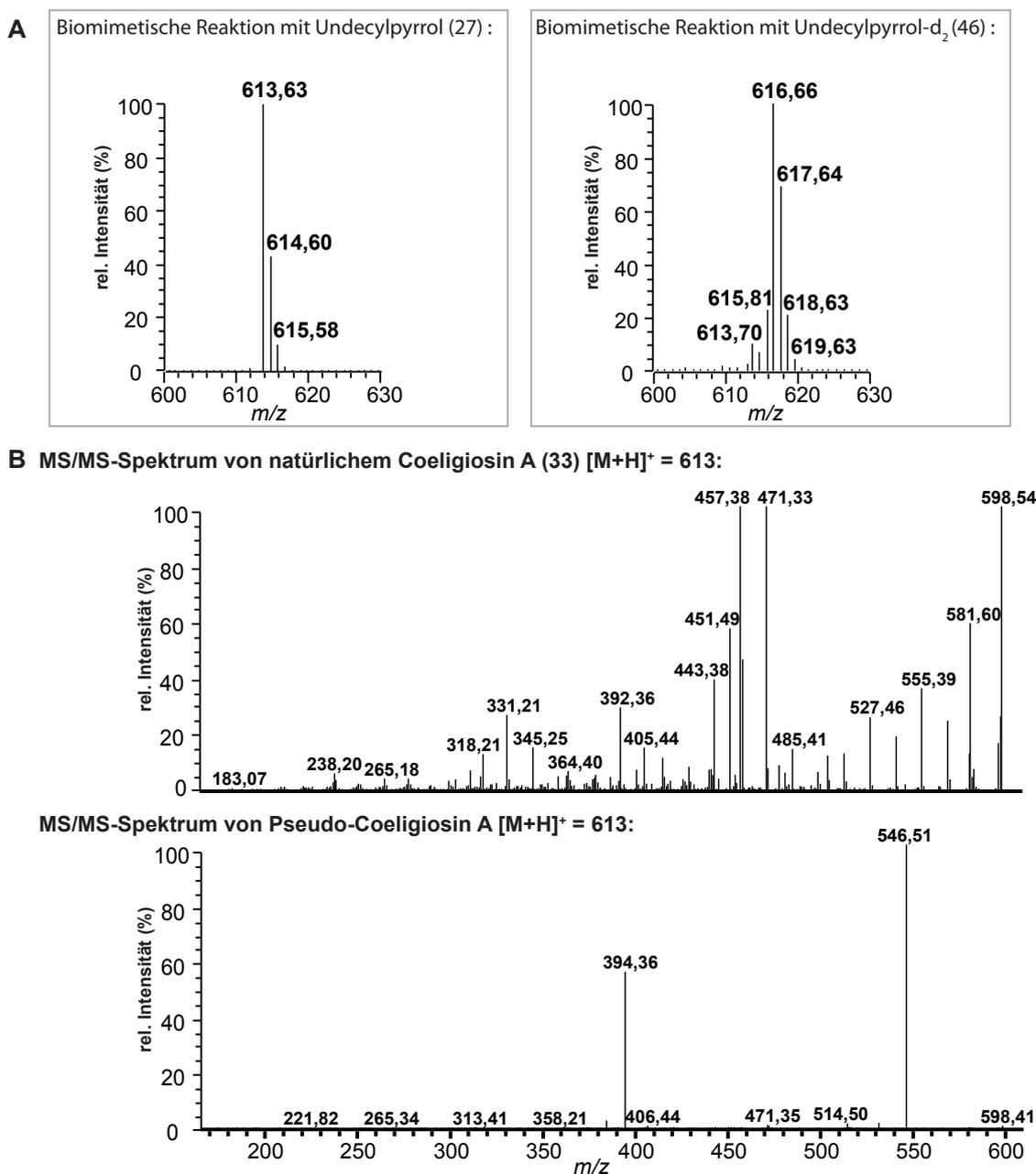


**Abbildung 3.28: Biomimetische Reaktion zwischen Undecylpyrrol (27) und 4-Methoxy-2,2'-bipyrrol-5-carboxyaldehyd (26).** **A:** Säure-katalysierte Verknüpfung nach Baldino *et al.*; **B:** TFA-katalysierte Verknüpfung von Pyrrol (44) und Pyrrolaldehyd (74) nach Hong *et al.*; **C:** erwartete Verbindung 76 nach TFA-katalysierter Verknüpfung von Undecylpyrrol (27) und 4-Methoxy-2,2'-bipyrrol-5-carboxyaldehyd (26); **D:** Vergleich der LC-ESI-MS-Chromatogramme der biomimetischen Reaktion von Undecylpyrrol (27) und 4-Methoxy-2,2'-bipyrrol-5-carboxyaldehyd (26) unter TFA-Katalyse (schwarz) und des Zellextrakts des roten Phänotyps (rot); Undecylprodigiosin (13), Coeligiosin A (33), Coeligiosin C (35).

Genauere Untersuchungen zeigten jedoch, dass es sich im Fall der Coeligiosin A - ähnlichen Verbindung der biomimetischen Reaktion nicht um den im roten Phänotyp nachgewiesenen Naturstoff handelt. Einen deutlichen Beweis lieferte der Vergleich der MS/MS-Spektren von Coeligiosin A (33) aus dem roten Phänotyp und Pseudo-Coeligiosin A aus der biomimetischen

Reaktion (Abb. 3.29, **B**). Im Fall des Naturstoffes (**33**) lassen sich die typischen Fragmente mit einer Massendifferenz von 14 amu beobachten, während Pseudo-Coeligiosin A nur zwei große Fragmente zeigt. Außerdem zeigten sich bei der Wiederholung der biomimetischen Reaktion unter Verwendung von  $[1',1'-^2\text{H}_2]$ -Undecylpyrrol (UP-d<sub>2</sub>) (**46**) Abweichungen vom erwarteten Ergebnis. Im Fall von Coeligiosin A (**33**) wäre ein Masseanstieg von vier aufgrund der Deuterium-Markierung im Vergleich zum unmarkierten Naturstoff zu erwarten gewesen. Es zeigte sich jedoch nur eine Massendifferenz von 3, was mit dem Verlust eines Deuterium-Atoms einhergehen muss (Abb. 3.29, **A**). Wie ein Verlust eines Deuterium-Atoms aus der stabilen Markierung möglich ist und wie Pseudo-Coeligiosin A aufgebaut ist, konnte nicht geklärt werden.

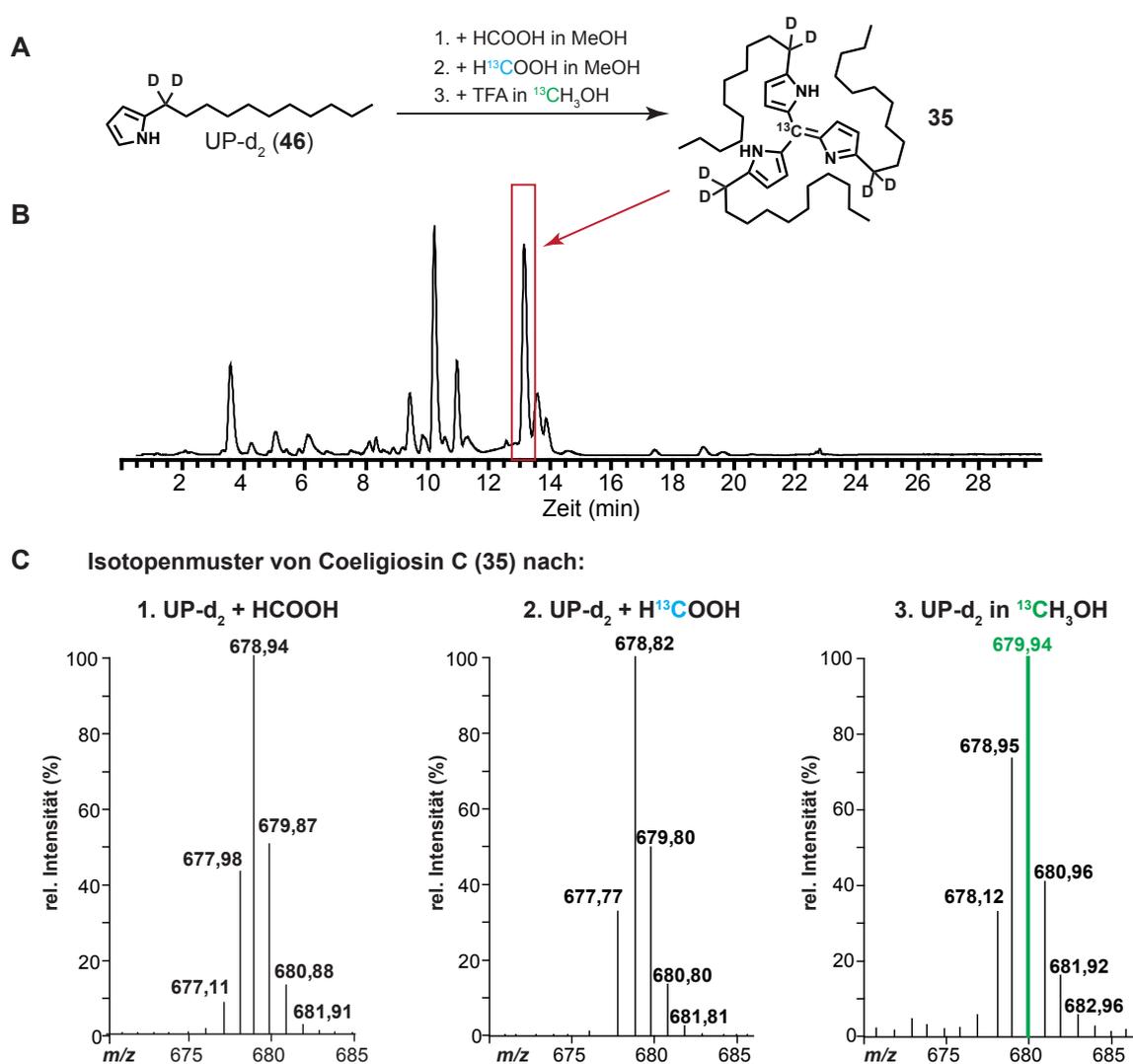
Bei Coeligiosin C (**35**) traten diese Unterschiede nicht auf. Das MS/MS-Spektrum von Naturstoff und biomimetisch erzeugtem Coeligiosin C war identisch und auch bei Verwendung von deuteriertem Undecylpyrrol (**46**) in der biomimetischen Reaktion zeigte sich die erwartete Masse von  $[M+6+H]^+ = 678$  (Abb. 3.30, **A**). Da zu diesem Zeitpunkt die Herkunft des zentralen Kohlenstoffs in Coeligiosin C (**35**) noch ungeklärt war, sollten mit Hilfe der biomimetischen Reaktion verschiedene C<sub>1</sub>-Körper auf ihren Einbau in Coeligiosin C (**35**) getestet werden. Dazu wurde Undecylpyrrol (**27**) oder deuteriertes Undecylpyrrol (**46**) mit den C<sub>1</sub>-Körpern Formaldehyd und Ameisensäure 3 Tage in Methanol inkubiert und anschließend auf die Bildung von Coeligiosin C (**35**) per LC-ESI-MS untersucht. Coeligiosin C (**35**) konnte nur in Ansätzen mit Ameisensäure nachgewiesen werden, nicht aber in den Ansätzen mit Formaldehyd. Nach Durchführung dieser biomimetischen Versuche sah es zunächst so aus, als wäre Ameisensäure der gesuchte C<sub>1</sub>-Körper. Um einen eindeutigen Beweis dafür zu liefern, wurde der Versuch mit <sup>13</sup>C-markierter Ameisensäure und  $[1',1'-^2\text{H}_2]$ -Undecylpyrrol (UP-d<sub>2</sub>) (**46**) wiederholt. Dabei zeigte sich jedoch keine Insertion der Kohlenstoffmarkierung in Coeligiosin C (**35**) sondern nur die Markierung durch die Deuteriumatome  $[M+6+H]^+ = 678$  (Abb. 3.30, **B** links). Als nächstes wurde UP-d<sub>2</sub> (**46**) mit Zusatz einer katalytischen Menge TFA in Methanol inkubiert und tatsächlich lies sich Deuterium-markiertes Coeligiosin C (**35**) nachweisen (Abb. 3.30, **A**). Da die Bildung von Coeligiosin C (**35**) in Acetonitril oder Toluol als Lösungsmittel unter TFA-Zusatz nicht nachweisbar war, wurde schließlich die biomimetische Reaktion in <sup>13</sup>C-markiertem Methanol durchgeführt. Die Analyse des gebildeten Coeligiosin C (**35**) mittels LC-ESI-MS zeigte deutlich den Einbau der <sup>13</sup>C-Markierung  $[M+6+1+H]^+$  (Abb. 3.30), **B** rechts). Demnach katalysieren TFA oder Ameisensäure die Umsetzung von Methanol und Undecylpyrrol (**27**), wobei der genaue Mechanismus jedoch



**Abbildung 3.29: Vergleich Coeligiosin A (**33**) und Pseudo-Coeligiosin A.** **A:** Vergleich der Isotopenmuster von Pseudo-Coeligiosin A bei Verwendung von Undecylpyrrol (**27**) (links) oder  $[1',1'-^2H_2]$ -Undecylpyrrol (**46**) (rechts) für die biomimetische Reaktion; **B:** Vergleich der MS/MS-Spektren von Coeligiosin A (**33**) und Pseudo-Coeligiosin A.

unklar blieb.

Des Weiteren wurden 2-Ethylpyrrol (**77**) und Pyrrol-2-carboxyaldehyd (**74**) als alternativer Kupplungspartner für biomimetische Reaktionen eingesetzt (Kap. 6.8, S. 118). Damit sollte überprüft werden, ob dieser Weg einen einfachen Zugang zu kurzkettigen Coeligiosin-Derivaten bietet. Dabei konnte jedoch lediglich eine Kupplungsreaktionen zwischen Ethyl-

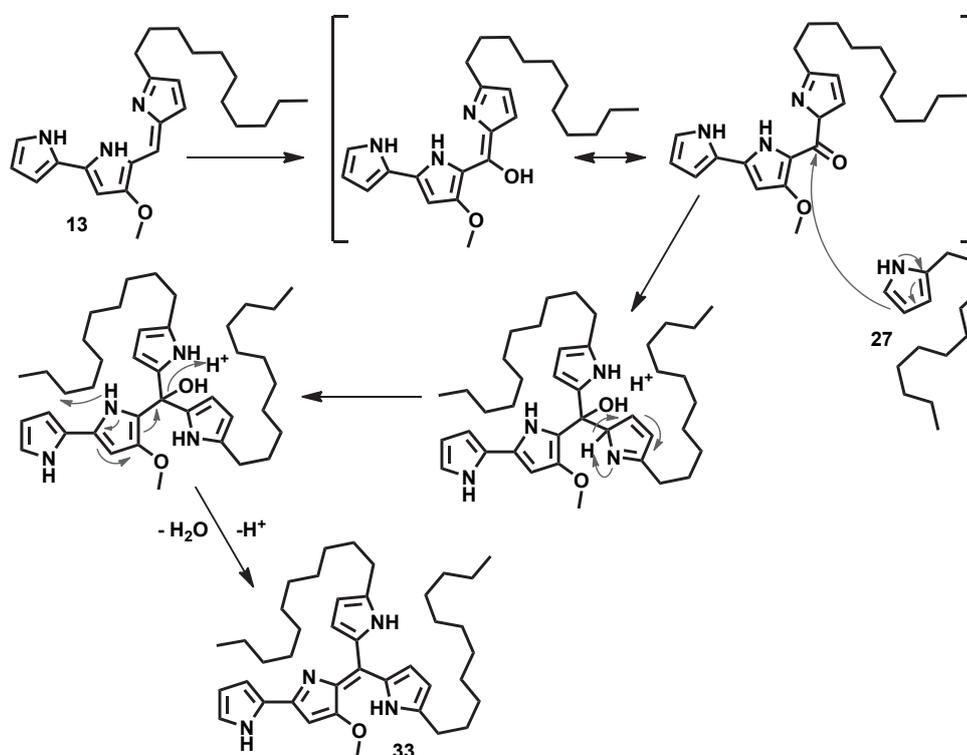


**Abbildung 3.30: Herkunft des Zentralkohlenstoffatoms in Coeligiosin C (**35**).** **A:** LC-ESI-MS-Chromatogramm der biomimetischen Reaktion von deuteriertem Undecylpyrrol (**46**) in Methanol und TFA; **B:** Vergleich der Isotopenmuster von Coeligiosin C (**35**) nach biomimetischen Reaktionen mit <sup>13</sup>C-markierter Ameisensäure (Mitte) oder Methanol (rechts).

pyrrol (**77**) und 4-Methoxy-2,2'-bipyrrol-5-carboxyaldehyd (**26**) zu Ethylprodigiosin (**78**) nachgewiesen werden (siehe Anhang). Kupplungsprodukte mit Pyrrol-2-carboxyaldehyd (**74**) anstelle von 4-Methoxy-2,2'-bipyrrol-5-carboxyaldehyd (**26**) ließen sich nicht nachweisen. Ebenso war es nicht möglich, mit diesen Substraten neue Coeligiosin-Derivate herzustellen.

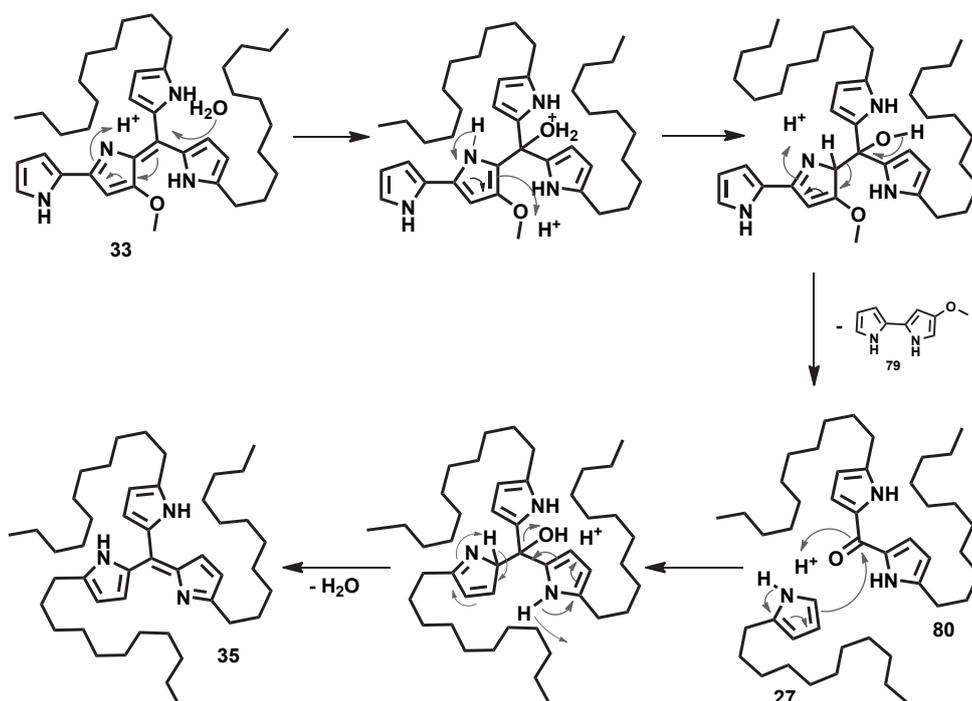
### 3.2.3 Die Biosynthese der Coeligiosine

Mit den gewonnenen Erkenntnissen aus Fütterungsversuchen und biomimetischen Reaktionen lässt sich eine hypothetische Biosynthese der Coeligiosine formulieren. Durch die Fütterung von markiertem  $[1',1'-^2\text{H}_2]$ -Undecylprodigiosin (**56**) konnte gezeigt werden, dass die Biosynthese aller Coeligiosine von Undecylprodigiosin (**13**) ausgeht. In einem ersten Schritt muss eine Oxidation des Brücken-Kohlenstoffatoms erfolgen, wodurch eine positive Partialladung an diesem Kohlenstoff entsteht und ihn für den Angriff eines weiteren Undecylpyrrols (**27**) zugänglich macht. Durch Abspaltung von Wasser entstehen so zunächst Coeligiosin A (**33**) und Coeligiosin B (**34**) (Abb. 3.31)



**Abbildung 3.31: Vorschlag der Biosynthese von Coeligiosin A (33).** Zunächst erfolgt die Oxidation des verbrückenden Kohlenstoffs in Undecylprodigiosin (**13**), wodurch der Angriff eines weiteren Undecylpyrrols (**27**) möglich wird.

Anschließend kann eine erneute Oxidation des zentralen Kohlenstoffs stattfinden, wodurch 4-Methoxy-2,2'-bipyrrol (**79**) abgespalten wird. Das resultierende Diundecylpyrrolyl-methanon (**80**) kann nun von einem weiteren Undecylpyrrol (**27**) am Carbonylkohlenstoff angegriffen werden, wodurch nach Wasserabspaltung die Coeligiosine C (**35**) und D (**36**) entstehen (Abb. 3.32).



**Abbildung 3.32: Vorschlag der Biosynthese von Coeligiosin C (35).** Ausgehend von Coeligiosin A (33) erfolgt die erneute Oxidation des zentralen Kohlenstoffs, was zur Abspaltung von 4-Methoxy-2,2'-bipyrrol (79) führt. Das entstehende Diundecylpyrrolylmethanon (80) ist anschließend für den Angriff eines weiteren Undecylpyrrols (27) zugänglich.

Das abgespaltene 4-Methoxy-2,2'-bipyrrol (79) kann wiederum anstelle des Undecylpyrrols (27) am oxidierten Undecylprodigiosin angreifen, wodurch im Anschluss unter Wasserabspaltung Coeligiosin E (37) entsteht.

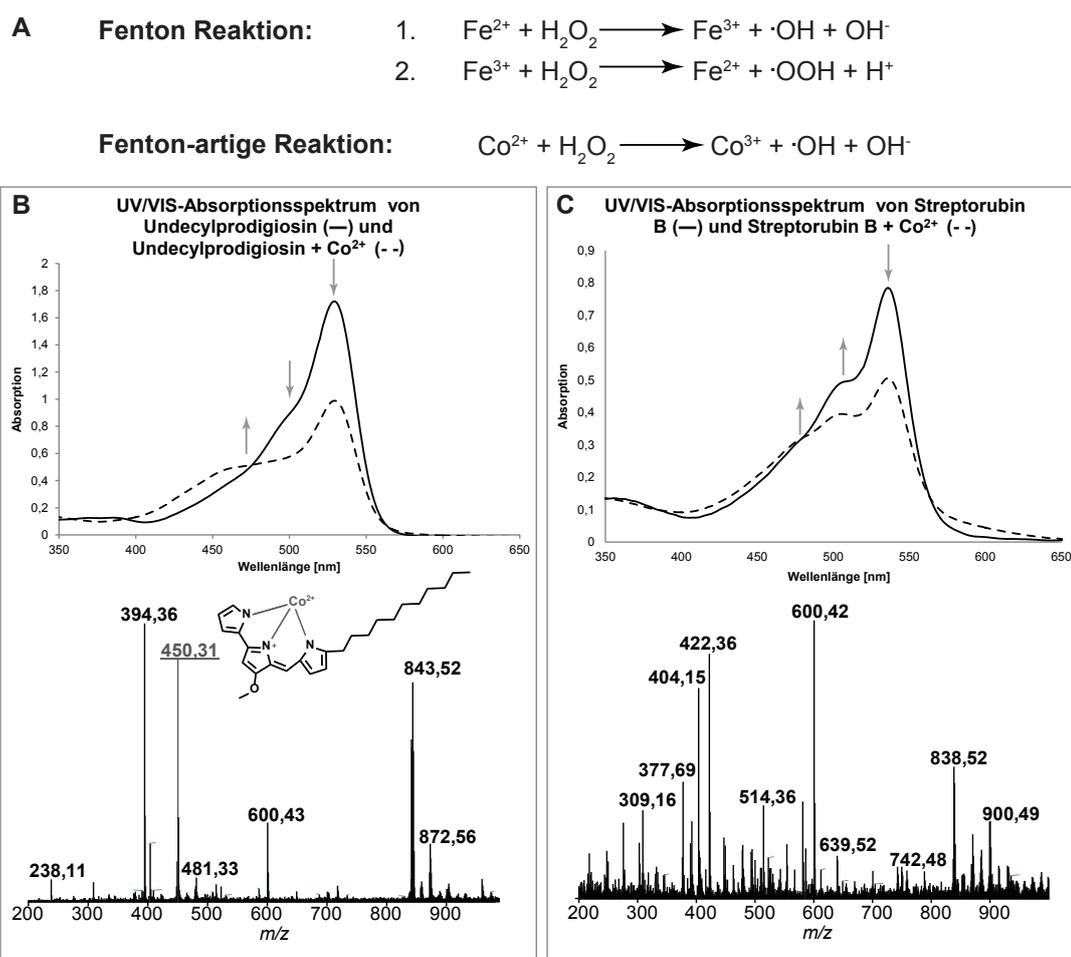
Der Oxidationsschritt in beiden Reaktionen ist dabei durch verschiedene Mechanismen denkbar. Zunächst könnten ein oder mehrere Enzyme diese Reaktion katalysieren. Durch die langen, hydrophoben Alkylketten und die polaren Pyrrolringe muss die Bindetasche des Enzyms entsprechend geformt sein um das Substrat im aktiven Zentrum richtig positionieren zu können. Deshalb würde man keine unspezifischen Oxidasen für die Katalyse dieser Reaktion erwarten, sondern eher eine substratspezifische Oxidase. Aufgrund der Clusterung der benötigten Gene für die Prodigiosinbiosynthese, könnte man ein entsprechendes Gen für eine Oxidase ebenfalls in unmittelbarer Umgebung des *red*-Genclusters erwarten, geht die vorgeschlagene Biosynthese der Coeligiosine doch von den Prodigiosinen aus. Das einzige Gen, das für eine Oxidase kodiert, ist jedoch *redG*, dessen Enzym die Zyklisierung von Undecylprodigiosin (13) zu Streptorubin B (14) katalysiert. Auch wenn in unmittelbarer Umgebung

des *red*-Clusters keine passende Oxidase gefunden werden konnte, kann dennoch nicht ausgeschlossen werden, dass die Oxidation von Undecylprodigiosin (**13**) und Streptorubin B (**14**) enzymatisch erfolgt.

Eine andere Möglichkeit wäre eine Oxidation über einen Enzym-unabhängigen Weg durch Peroxide, UV-Licht oder Metallionen in Kombination mit Wasserstoffperoxid. Da bereits gezeigt werden konnte, dass die Prodigiosine und Coeligiosine radikalfangende Eigenschaften besitzen (Kap. 3.1.3.3, S. 48), wäre eine radikalischer Mechanismus für die Oxidation denkbar. Bereits seit Ende des 19. Jahrhunderts ist die Fenton-Reaktion bekannt. In dieser nach dem britischen Chemiker Henry John Horstman Fenton benannten Reaktion kommt es in Gegenwart von Eisen(II)-Ionen zur Bildung von Hydroxyl-Radikalen und Hydroxylionen aus Wasserstoffperoxid [98, 99]. In einem zweiten Schritt erfolgt dann die Regeneration der katalytischen Eisen(II)-Ionen durch Reaktion von Eisen(III) mit einem weiteren Molekül Wasserstoffperoxid (Abb. 3.33). Seit Mitte der 1980er Jahre ist bekannt, dass auch Kobaltionen in einer Fenton-artigen Reaktion mit Wasserstoffperoxid Hydroxylradikale bilden können (Abb. 3.33), die auch zur Hydroxylierung von Aromaten führen können [100–102]. Diese Reaktion wird besonders begünstigt, wenn das Kobaltion dabei chelatisiert wird, da dann eine direkte Umsetzung des erzeugten Hydroxylradikals mit dem Chelator erfolgt [100]. Dass Kobaltionen sowohl von Undecylprodigiosin (**13**), als auch von Streptorubin B (**14**) chelatisiert werden können, konnte anhand des veränderten UV/VIS-Spektrums der Prodigiosine nach Zugabe von Kobalt(II)acetatlösung, sowie durch massenspektrometrischer Analyse des Reaktionsgemisches nachgewiesen werden (Abb. 3.33).

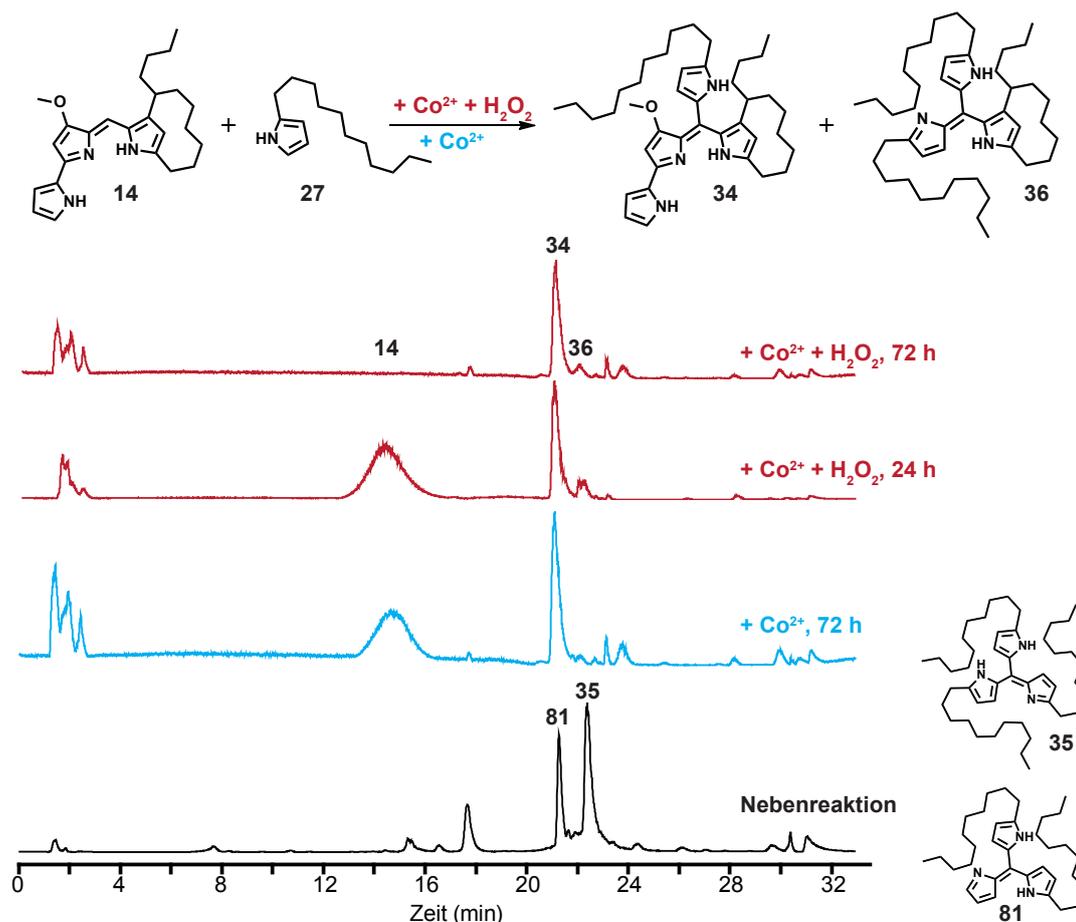
Um die Hypothese einer nicht-enzymatischen Oxidation zu testen, wurde Streptorubin B (**14**) in einer Fenton-artigen Lösung aus Kobaltsulfat und Wasserstoffperoxid gemeinsam mit Undecylpyrrol (**27**) inkubiert. Bereits nach 24 Stunden konnte eine teilweise Umsetzung zu Coeligiosin B (**34**) beobachtet werden, die nach 72 Stunden vollständig war (Abb. 3.34, rote Chromatogramme). Coeligiosin D (**36**) konnte ebenfalls nachgewiesen werden, wurde jedoch deutlich weniger gebildet. Auch nach 72 Stunden konnte die Ausbeute im Vergleich zu Coeligiosin B (**34**) nicht deutlich erhöht werden.

Es trat allerdings auch ohne Zusatz von Wasserstoffperoxid eine teilweise Umsetzung von Streptorubin B (**14**) zu Coeligiosin B (**34**) auf. Demnach scheint allein der Prodigiosin-Kobaltion-Komplex ausreichend für eine Oxidation des verbrückenden Kohlenstoffs in Streptorubin B (**14**) zu sein, wobei die Reaktion deutlich langsamer abläuft als mit Wasserstoffperoxid (Abb. 3.34, blaues Chromatogramm).



**Abbildung 3.33: Komplexierung von Cobalt durch Undecylprodigiosin (13) und Streptorubin B (14).** A: Fenton-Reaktion von  $\text{Co}^{2+}$  und  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; B+C: UV/VIS-Spektren von Undecylprodigiosin (B) und Streptorubin B (C) mit und ohne Zugabe von  $\text{Co}(\text{OAc})_2$ , sowie die Massenspektren der Prodigiosin-Cobalt-Gemische.

Sowohl in Ansätzen mit als auch ohne Wasserstoffperoxid traten unregelmäßig Nebenreaktionen auf, die wahrscheinlich allein von Undecylpyrrol (**27**) ausgehen. Dabei kam es zu Bildung von Coeligiosin C (**35**) sowie einer Spezies (**81**) mit einer Masse von  $[\text{M}+\text{H}]^+ = 518$ , bei der es sich um ein Coeligiosin-C-Derivat handeln könnte, dem eine Undecyl-Seitenkette fehlt. **81** konnte schon in biomimetischen Reaktionen in Methanol unter TFA-Katalyse nachgewiesen werden und entsteht wahrscheinlich wie Coeligiosin C (**35**) auf einem anderen Weg als innerhalb der Zellen des roten Phänotyps, da diese Verbindung nicht in den Zellextrakten des roten Phänotyps nachgewiesen werden konnte. **81** ist somit ein Artefakt der biomimetischen Reaktion, dass bei Überschuss von Undecylpyrrol zu entstehen scheint. Wie genau die Bildung abläuft und wie es zur Abspaltung einer Seitenkette kommt, blieb jedoch unklar.



**Abbildung 3.34: Reaktion von Streptorubin B (14) und Undecylpyrrol (27) unter Einfluss von  $\text{Co}^{2+}$ .** Die Umsetzung von Streptorubin B (14) zu Coeligiosin B (34) und Coeligiosin D (36) wurde mittels LC-ESI-MS nach 24 und 72 Stunden überprüft. rot: Reaktion in Fenton-artiger Reaktionslösung (Kobaltsulfatlösung und 30 %igem Wasserstoffperoxid); blau: Reaktion in kobalthaltiger Lösung; schwarz: Unregelmäßig auftretende Nebenprodukte Coeligiosin C (35) und 81 nach Reaktion in Fenton-artiger Reaktionslösung (Kobaltsulfatlösung und 30 %igem Wasserstoffperoxid).

Die biomimetische Reaktion gab Hinweise darauf, dass die Oxidation von Undecylprodigiosin (13) bzw. Streptorubin B (14) wahrscheinlich Enzym-unabhängig in einer Fenton-artigen Reaktion abläuft. Die Existenz einer Oxidase für die Oxidation von Undecylprodigiosin (13) und Streptorubin B (14) kann dennoch nicht vollständig ausgeschlossen werden. Vor allem dass 81 in den Zellextrakten des roten Phänotyps nicht nachgewiesen wurde, könnte für die Beteiligung eines Enzyms sprechen.

Des Weiteren konnte durch die biomimetische Reaktion eindeutig geklärt werden, dass Coeligiosin B (34) aus Streptorubin B (14) entsteht. Demnach muss Coeligiosin B (34) einen identischen *meta*-verbrückten 10-Ring wie Streptorubin B (14) aufweisen, auch wenn dieser mittels NMR-Spektroskopie nicht zweifelsfrei nachweisbar war. Da in der gleichen Reaktion

auch Coeligiosin D (**36**) entstand, muss auch in dieser Verbindung ein *meta*-verbrückter 10-Ring der Seitenkette vorliegen.

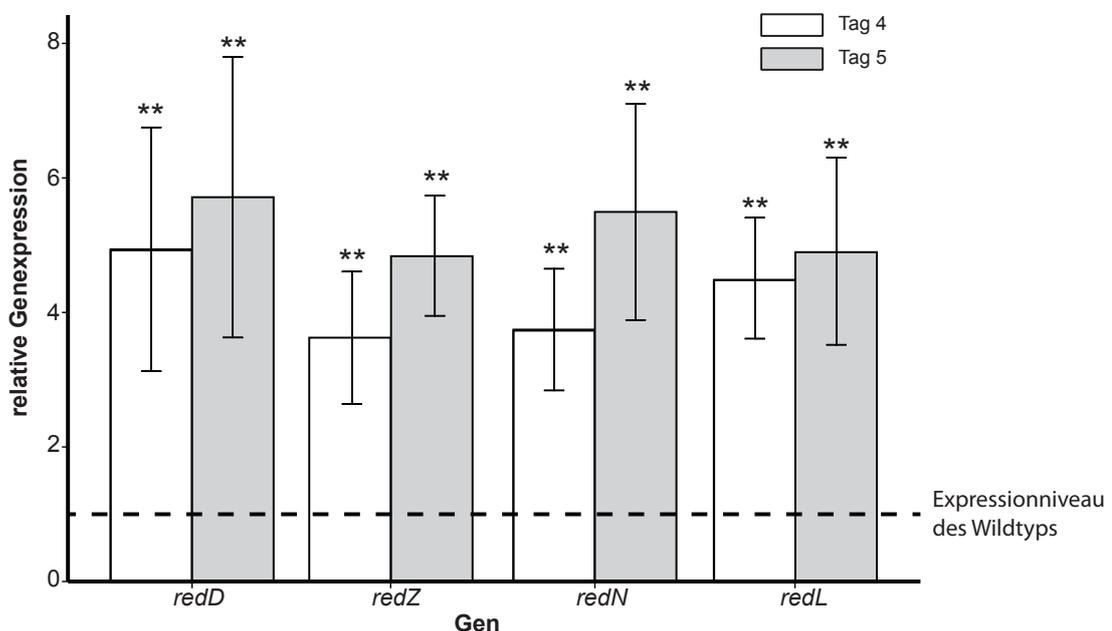
### 3.2.4 Untersuchungen zur Genregulation im roten Phänotyp von *S. coelicolor*

Im roten Phänotyp werden vor allem die Coeligiosine B (**34**) und C (**35**) gebildet, die aus zwei oder drei Undecylpyrrolen (**27**) aufgebaut sind. Coeligiosin E (**37**), welches aus zwei Bipyrrroleinheiten besteht, wird dagegen nur in sehr geringen Mengen gebildet. Demnach sollte die Menge an gebildetem Undecylpyrrol (**27**) größer sein, als die Menge an 4-Methoxy-2,2'-bipyrrrol-5-carboxyaldehyd (**26**), was sich auch in der Expression der entsprechenden Biosynthesegene widerspiegeln könnte. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde die Genexpression mittels quantitativer *real time* PCR untersucht (Kap. 6.10.3, S. 124). Die relative Genexpression sollte anhand der  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode ermittelt werden, wobei die DNA Gyrase Untereinheit B (*gyrB*, *sco3874*), sowie der Elongationsfaktor TU (*eftu*, *sco1321*) aus *S. coelicolor* als Referenzgene genutzt wurden. Diese beiden Gene werden über die gesamte Zeit der Kultivierung auf einem konstanten Level exprimiert (sogenannte *housekeeping genes*), wodurch eine Referenzierung auf diese Gene und damit ein Vergleich verschiedener Proben möglich wird. Aus der Prodigiosinbiosynthese wurden die spezifischen Transkriptionsregulatoren *redD* und *redZ* für die Analyse der gesamten Prodigiosinbiosynthese gewählt. Für den Vergleich der beiden Biosynthesewege zu Undecylpyrrol (**27**) und 4-Methoxy-2,2'-bipyrrrol-5-carboxyaldehyd (**26**) wurden die Polyketidsynthasen *redL* (Undecylpyrrolsynthese, Abb. 1.8) und *redN* (4-Methoxy-2,2'-bipyrrrol-5-carboxyaldehyd-Synthese, Abb. 1.7) gewählt.

Zunächst wurde die Genexpression über 10 Tage anhand von 3 Replikaten vom Wildtyp (*S. coelicolor* M145 in SFM-Medium) und rotem Phänotyp ermittelt, um für genauere Analysen den idealen Probennahmezeitpunkt zu ermitteln. Dabei zeigte sich, dass die Expression aller untersuchten Gene von Tag 3 zu Tag 5 deutlich ansteigt und ein signifikanter Unterschied zum Wildtyp vorliegt (Mann-Whitney-U-Test,  $P \leq 0,01$ ) (siehe Anhang). Ab Tag 6 wurden die Abweichungen zwischen den einzelnen Replikaten so groß, dass sich kaum noch eine Aussage bezüglich der Genregulation treffen lässt und auch das Signifikanzniveau nur noch maximal bei  $P \leq 0,05$  lag (siehe Anhang). Der Wildtyp zeigte dagegen kaum Schwankungen der Expression der untersuchten Gene über den gesamten Zeitraum. Die extremen Schwankungen in der Genexpression des roten Phänotyps könnten auch die Ursache für die wenig aussagekräftigen Ergebnisse des Microarrays sein, der von A. Behrend während ihrer

Dissertation durchgeführt wurde [82]. Sie ermittelte die Daten auf Grundlage einer sieben Tage alten Kultur und konnte nur minimale Unterschiede in der Genregulation von Wildtyp und rotem Phänotyp nachweisen. Diese könnten auf eine Probe zurückzuführen sein, in der die Expression der Prodigiosinbiosynthesegene an Tag 7 bereits wieder stark reduziert war. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden im Folgenden 9 Replikate des roten Phänotyps und 3 Replikate des Wildtyps zur Bestimmung der Genexpression an Tag 4 und Tag 5 genutzt. Im Vergleich zeigten alle untersuchten Gene des roten Phänotyps eine durchschnittlich fünffach höhere Genexpression als im Wildtyp (Abb. 3.35). Die erwartete höhere Expression von *redL* gegenüber *redN* zeigte sich jedoch nicht.

Durch qPCR wird jedoch nur die Menge an vorliegender mRNA quantifiziert. Wie oft diese jedoch für die Translation in das entsprechende Protein abgelesen wird, lässt sich nicht sagen. Es kann also sein, dass trotz gleicher Mengen an RNA die Menge der entsprechenden Proteine variiert. Außerdem ist auch die Geschwindigkeit, in der die Enzyme ihre Substrate umsetzen, unbekannt. So könnte auch eine geringe Proteinmenge für große Produktmengen verantwortlich sein.



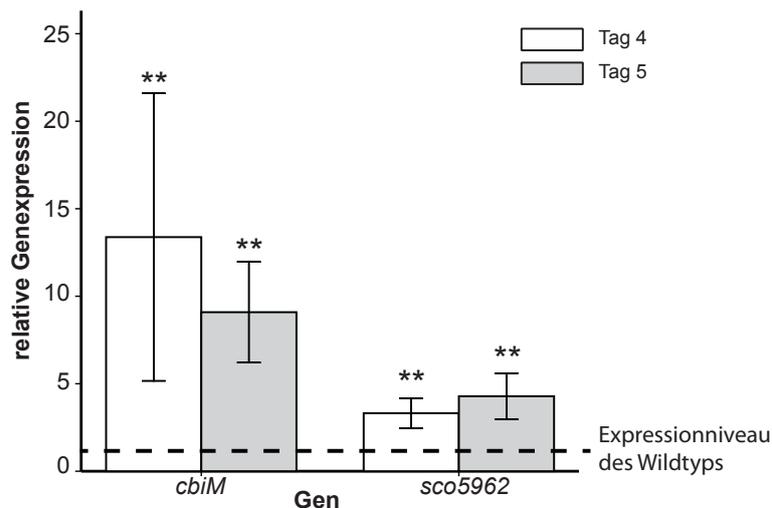
**Abbildung 3.35: Relative Genexpression einiger Gene der Prodigiosinbiosynthese im roten Phänotyp.** Gezeigt ist die relative Genexpression von *redD*, *redZ*, *redL* und *redN* des roten Phänotyps ( $n = 9$ ) im Vergleich zum Wildtyp ( $n = 3$ ) von *S. coelicolor* M145 in SFM-Medium. Die Genexpression im Wildtyp wurde auf eins normiert (waagerechte Linie). Die Fehlerbalken geben das 95 % Konfidenzintervall an. \*\* symbolisieren einen Signifikanzunterschied von  $P \leq 0,01$  (Mann-Whitney-U-Test) zwischen Wildtyp und rotem Phänotyp.

Dass der Transkriptionsfaktor *redD* für die Aktivierung der Prodigiosinbiosynthese unter Kobaltionenstress verantwortlich ist, konnte nicht nur anhand der ermittelten erhöhten Expression durch qPCR gezeigt werden (Abb. 3.35), sondern auch mittels der *S. coelicolor* Mutante M510, bei der genau dieser Transkriptionsregulator deletiert ist. Diese Mutante war unter Kobaltionenstress nicht in der Lage einen roten Phänotyp zu bilden (siehe Anhang).

Des Weiteren wurde mittels qPCR die Expression der Gene *sco5962* und *cbiM* im roten Phänotyp untersucht, da Kobaltstress einen Einfluss auf diese Gene haben könnte. *Sco5962* kodiert für einen putativen Transkriptionsregulator aus der MerR-Superfamilie mit einer N-terminalen Helix-Turn-Helix Domäne. Diese speziellen Transkriptionsregulatoren sind dafür bekannt, dass sie auf Schwermetallionen und oxidativen Stress reagieren, indem sie an die -10 und -35-Regionen von Promotoren binden, welche schließlich die Expression spezifischer Stress-Gene bewirken [103]. In unmittelbarer Nachbarschaft von *sco5962* finden sich die Gene *cbiM*, *cbiN*, *cbiQ* und *cbiO*, die für Proteine kodieren, die beim Transport von Kobalt involviert sind und somit von *sco5962* reguliert werden könnten [33].

Die Analyse der untersuchten Gene zeigte eine verstärkte Expression im Vergleich zum Wildtyp: *cbiM* konnte bis zu 38-fach stärker exprimiert als im Wildtyp nachgewiesen werden, *sco5962* achtfach stärker (Abb. 3.36). Vor allem die starke Expression von *cbiM* war jedoch erstaunlich, ist der CbiMNQO-Komplex doch als selektiver, ATP-abhängiger Influx-Transporter für Kobalt bekannt [104–106]. Eine verstärkte Bildung solch eines Transporters würde man unter Kobaltionen-limitierenden Kultivierungsbedingungen erwarten, jedoch nicht bei stark erhöhten Kobaltionenkonzentrationen im Medium. Den Transporterkomplexes zu lokalisieren und dessen tatsächlicher Transportrichtung zu bestimmen sollte Ausgangspunkt für weitere Studien sein.

Sowohl *sco5962* als auch *cbiM* sind somit an der Stressantwort des roten Phänotyps beteiligt und können als Ausgangspunkt für weitere Studien genutzt werden. So könnte beispielsweise zunächst durch eine *knock-out* Mutante des Transkriptionsregulators überprüft werden, ob eine solche  $\Delta$ *sco5962*-Mutante noch in der Lage ist, farbige Phänotypen unter Kobaltstress zu bilden. Sollte dies nicht der Fall sein, könnten durch weitere Studien Interaktionspartner von SCO5962 und somit der Ablauf der Stressantwort des Bakteriums identifiziert werden.



**Abbildung 3.36: Relative Genexpression von *sco5962* und *cbiM* im roten Phänotyp.** Gezeigt ist die relative Genexpression des möglichen Transkriptionsregulators *sco5962* sowie von *cbiM*, welches für ein Kobaltontransportprotein kodiert, im Vergleich zum Wildtyp von *S. coelicolor* M145 in SFM-Medium. Die Genexpression im Wildtyp wurde auf eins normiert (waagerechte Linie). Die Fehlerbalken geben das 95 % Konfidenzintervall an. \*\* symbolisieren einen Signifikanzunterschied von  $P \leq 0,01$  (Mann-Whitney-U-Test) zwischen Wildtyp und rotem Phänotyp.

### 3.3 Die Bildung von Coeligosinen unter Stress - ein generelles oder spezifisches Phänomen?

Im Verlaufe der Dissertation stellte sich die Frage, ob die Coeligosin-Bildung auf den roten Phänotyp unter Kobaltonstress limitiert ist. Dazu sollte zunächst *S. coelicolor* M145 auf das Auftreten des roten Phänotyps unter dem Einfluss verschiedener Schwermetallionen untersucht werden. Zum anderen sollten die Prodigiosin-Produzenten *Pseudoalteromonas rubra* und *Vibrio gazogenes* unter Kobalton-Stress kultiviert und auf die Bildung von Coeligosin-Derivaten geprüft werden.

#### 3.3.1 Kultivierung von *S. coelicolor* unter Einwirkung verschiedener Schwermetallionen

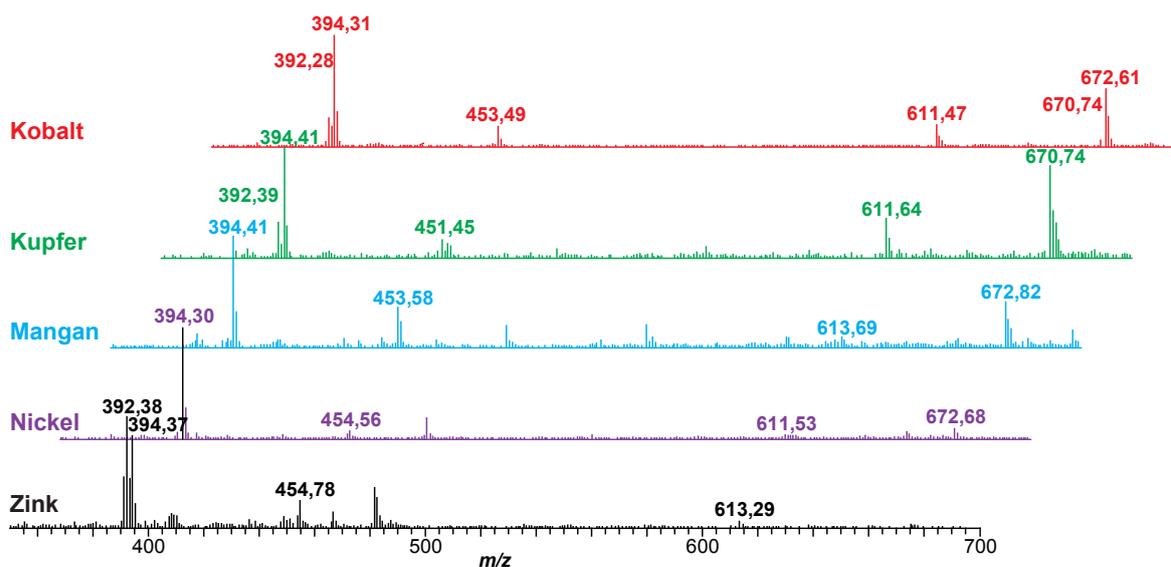
Um die Reaktion von *S. coelicolor* M145 unter dem Einfluss von Schwermetallionen zu testen, wurde der Stamm auf SFM-Agarplatten ausgestrichen, die mit verschiedenen Konzentrationen unterschiedlicher Schwermetallsalze versetzt waren (Kap. 6.1.4, S. 90). Getestet wurden die zweiwertigen Ionen von Kupfer, Nickel, Chrom, Zink, Mangan und Eisen, wobei die Bildung farbiger Phänotypen, mit Ausnahme von Eisen, für alle getesteten Schwermetallionen beobachtet werden konnte. Der Konzentrationsbereich für das Auftreten farbiger

Phänotypen war dabei vom Metall abhängig - für Kupferionen wurden die geringsten Konzentrationen benötigt, von Manganionen mit der etwa zehnfachen bis zwanzigfachen Konzentration die höchsten (Tab. 3.8).

**Tabelle 3.8: Verhalten von *S. coelicolor* unter verschiedenen Schwermetallsalzen.**

Salz	Endkonzentration [mmol/l]							
	A	B	C	D	E	F	G	H
CoSO <sub>4</sub>	0,071	0,142	0,356	0,711	1,42	3,56	7,11	14,20
CuSO <sub>4</sub>	0,008	0,016	0,032	0,080	0,16	0,32	0,80	1,60
CrCl <sub>2</sub>	0,163	0,325	0,814	1,630	3,25	4,07	8,14	16,30
ZnCl <sub>2</sub>	0,147	0,293	0,734	1,470	2,93	7,34	14,70	29,30
FeSO <sub>4</sub>	0,072	0,144	0,360	0,719	1,44	3,60	7,19	14,40
NiSO <sub>4</sub>	0,076	0,152	0,380	0,761	1,52	3,80	7,61	15,20
MnSO <sub>4</sub>	0,118	0,237	0,592	1,180	2,37	5,92	11,80	23,70
unverändertes	Wachstum		Auftreten	farbiger	Phänotypen		kein	Wachstum

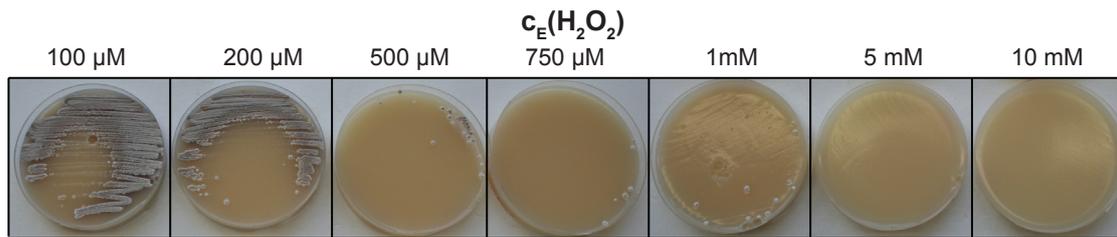
Rote Phänotypen, die unter dem Einfluss verschiedener Metallsalzen auftraten, wurden im Anschluss direkt per MALDI-MS auf die Produktion von Coeligiosinen untersucht. Dazu wurde eine rote Kolonie vorsichtig mit einem Skalpell von der Agaroberfläche gelöst und auf dem MALDI-Träger positioniert. Zur besseren Ionisierung wurde die Kolonie für ca. 5 Minuten mit  $\alpha$ -Matrix inkubiert, bevor sie per MALDI-MS analysiert wurde (Kap. 6.3.2, S. 96). Streptorubin B (**14**) und Undecylprodigiosin (**13**) konnten in allen roten Phänotypen nachgewiesen werden. Ebenso war es möglich verschiedene Coeligiosine zu identifizieren, wobei diese jedoch in unterschiedlichen Mengen produziert wurden. Coeligiosin A (**33**) oder Coeligiosin B (**34**) konnten in allen Phänotypen nachgewiesen werden, wobei die Produktion unter Kobalt- und Kupferionenstress am höchsten war (Abb. 3.37). Coeligiosin C (**35**) oder D (**36**) konnten einzig unter Zinkionen-Stress nicht nachgewiesen werden und wurde in Gegenwart von Nickelionen nur in geringen Konzentrationen gebildet. Kobalt- und Manganionen führten dagegen zu einer starken Coeligiosin C Produktion. Als einzige Schwermetallionen bewirkten Kupferionen eine stark erhöhte Produktion von Coeligiosin D (**36**). Außerdem konnten in den roten Phänotypen aller getesteten Schwermetallsalze unbekannte Verbindungen mit einem Masse-Ladungsverhältnis von  $m/z = 451$ ,  $m/z = 453$  oder  $m/z = 454$  nachgewiesen werden (Abb. 3.37).



**Abbildung 3.37: Vergleich der Prodigiosin- und Coeligiosinproduktion unter verschiedenen Schwermetallen.** Gezeigt sind die durch MALDI-MS ermittelten Massenspektren der roten Phänotypen unter Kobalt- (rot), Kupfer- (grün), Mangan- (blau), Nickel- (violett) und Zinkionen-Stress (schwarz).  $m/z = 392,3$ : Streptorubin B (**14**);  $m/z = 394,3$ : Undecylprodigiosin (**13**);  $m/z = 611,5$ : Coeligiosin B (**34**);  $m/z = 613,5$ : Coeligiosin A (**33**);  $m/z = 670,6$ : Coeligiosin D (**36**);  $m/z = 672,6$ : Coeligiosin C (**35**).

Somit konnte gezeigt werden, dass rote Phänotypen und damit die Bildung der Coeligiosine nicht durch Kobaltionen allein bewirkt wird, sondern unter verschiedenen Schwermetallionen auftreten kann. Allerdings ist die Gesamtmenge an gebildeten Coeligiosinen und das Mengenverhältnis innerhalb der Coeligiosine stark vom verwendeten Schwermetallion abhängig. Da in den biomimetischen Reaktionen gezeigt werden konnte, dass die Coeligiosinbildung wahrscheinlich auf eine Fenton-artige Oxidation der Prodigiosine, katalysiert durch Kobaltionen zurückgeht (Kap. 3.2.3, S. 70), sind wahrscheinlich die Komplexierungsfähigkeiten von Undecylprodigiosin (**13**) und Streptorubin B (**14**) gegenüber den verschiedenen Schwermetallionen maßgeblich für das auftretende Produktspektrum verantwortlich.

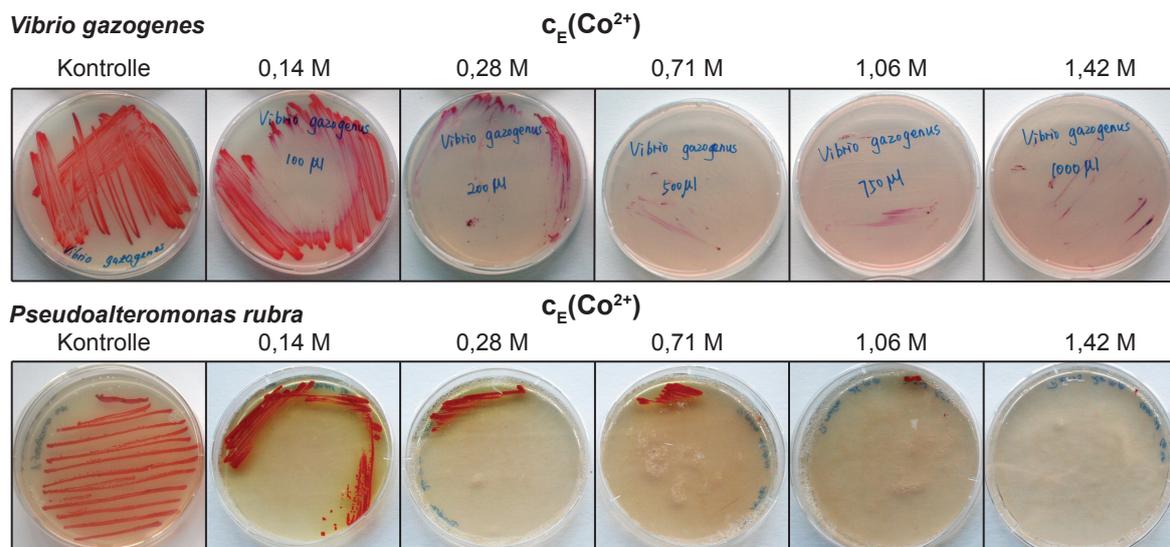
Dass oxidativer Stress durch erhöhte Mengen an Wasserstoffperoxid zur Induktion der Prodigiosin-Biosynthese allein nicht ausreicht, konnte gezeigt werden, indem *S. coelicolor* auf SFM-Agarplatten, versetzt mit Wasserstoffperoxid, angezogen wurde. Dies führt zu vermindertem bis ausbleibendem Wachstum ohne Auftreten von farbigen Phänotypen (Abb. 3.38).



**Abbildung 3.38: *S. coelicolor* unter oxidativem Stress durch Wasserstoffperoxid.** Gezeigt sind Platten von *S. coelicolor* nach viertägiger Inkubation auf SFM-Agarplatten, versetzt mit den angegebenen Wasserstoffperoxidkonzentrationen.

### 3.3.2 Andere Prodigiosin-Produzenten unter Kobaltionenstress

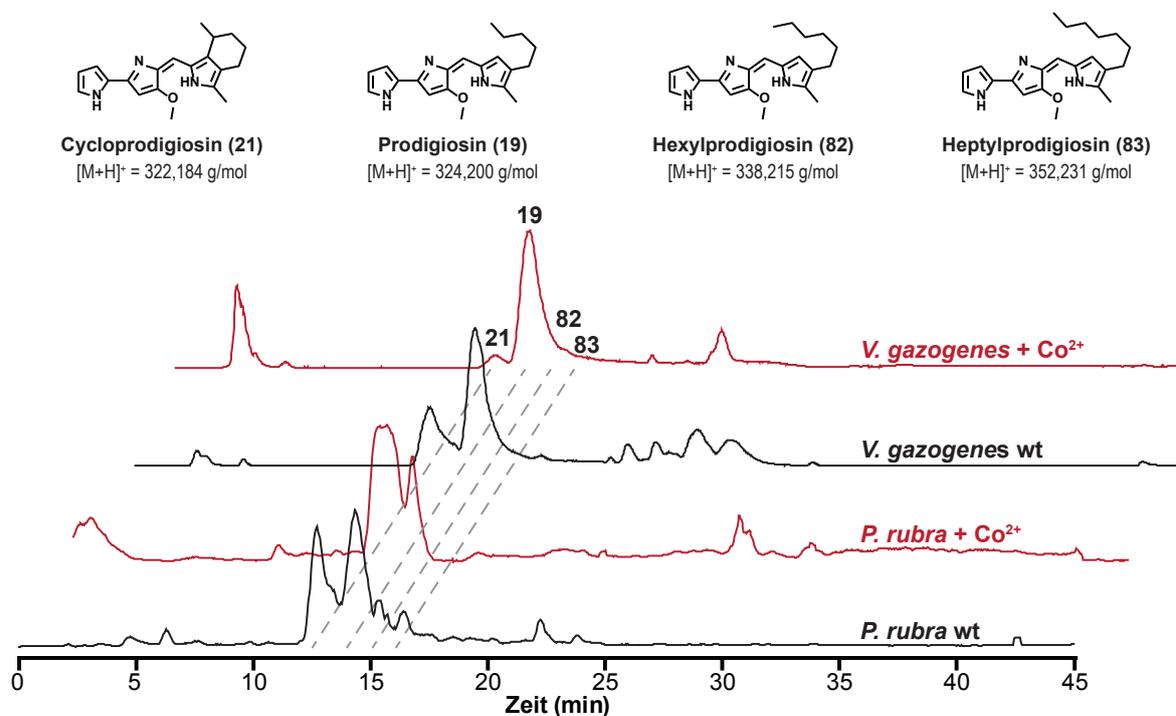
Um die mögliche Produktion von Coeligiosin-Derivaten durch andere Prodigiosin-Produzenten als *S. coelicolor* zu testen, wurden die marinen Bakterien *Vibrio gazogenes* und *Pseudoalteromonas rubra* ausgewählt. Zunächst wurden die beiden Organismen auf MB-Medium (Kap. 6.1.7, S. 92) mit und ohne Kobaltionen kultiviert. Wie auch bei *S. coelicolor* war das Wachstum bei höheren Kobaltionenkonzentrationen stark vermindert (Abb. 3.39).



**Abbildung 3.39: *V. gazogenes* und *P. rubra* unter Kobaltionenstress.** *V. gazogenes* und *P. rubra* wurden 2 Tage auf MB-Festmedium kultiviert, die mit den angegebenen Kobaltionenkonzentrationen versetzt waren.

Da beide Organismen in MB-Medium bereits Prodigiosine produzieren und demnach Kolonien auf den Platten auch ohne Kobaltionen rot waren, konnte im Gegensatz zu *S. coelicolor* rein optisch kein roter Phänotyp unter Kobaltionenstress isoliert werden. Es wurden deshalb mehrere Kolonien, die unter Kobaltionenstress gewachsen waren, in Kobaltionen-haltigem

Flüssigmedium für zwei Tage kultiviert und die entsprechenden Zellextrakte per LC-ESI-MS auf die Produktion von Coeligiosin-Derivaten untersucht. Beide Organismen produzierten neben Prodigiosin (**19**) und Cycloprodigiosin (**21**) auch die längerkettigen Varianten Hexylprodigiosin (**82**) und Heptylprodigiosin (**83**) (Abb. 3.40) [107, 108]. Dabei zeigte sich jedoch sowohl für *P. rubra* als auch für *V. gazogenes* in den untersuchten Kulturen unter Kobaltionenstress kaum ein Unterschied im Produktspektrum (Abb. 3.40). In *P. rubra* konnte unter Kobaltionenstress eine verstärkte Cycloprodigiosin-Produktion beobachtet werden, während Hexylprodigiosin (**82**) und Heptylprodigiosin (**83**) weniger produziert wurden. In *V. gazogenes* wurde dagegen unter Kobaltionenstress mehr Prodigiosin (**19**) gebildet und die Cycloprodigiosinproduktion deutlich heruntergefahren. Coeligiosin-Derivate konnten aber weder bei *P. rubra* noch bei *V. gazogenes* unter Kobaltionenstress nachgewiesen werden.



**Abbildung 3.40: Metabolitenprofile von *V. gazogenes* und *P. rubra* mit und ohne Kobaltstress.** Methanolische Zellextrakte von *P. rubra* und *V. gazogenes*, kultiviert mit (rot) oder ohne (schwarz) Kobalt, wurden mittels LC-ESI-MS analysiert. In allen Proben konnten Cycloprodigiosin (**21**), Prodigiosin (**19**), Hexylprodigiosin (**82**) und Heptylprodigiosin (**83**) nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass es in den marinen Bakterien *P. rubra* und *V. gazogenes* nicht zur Bildung von Coeligiosin-Derivaten kommt. Jedoch muss dabei bedacht werden, dass der rote Phänotyp von *S. coelicolor* unter Kobaltstress nur mit geringer Wahrscheinlichkeit auftritt. So finden sich bei der Differenzierung verschiedener Phänotypen von

*S. coelicolor* selten mehr als 1-2 % deutlich rote Kolonien auf einer Platte. Da die marinen Bakterien jedoch bereits ohne Kobaltionen Prodigiosine produzieren und damit intensiv rot gefärbt sind, ist eine optische Identifizierung neuer Phänotypen nicht möglich. Es wurde zwar eine große Menge an Kolonien untersucht, jedoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass ein Phänotyp, der Coeligiosin-Derivate produziert, übersehen wurde.

Möglicherweise spielt auch die Länge der Alkylkette eine entscheidende Rolle für die Bildung der Coeligiosine. Hinweise darauf lassen sich aus den biomimetischen Versuchen mit kurz-kettigeren Alkylpyrrolen ableiten, bei denen auch keine Coeligiosin-Bildung nachweisbar war (Kap. 3.2.2.1, S. 66). Um diese Hypothese zu überprüfen können andere Undecylprodigiosin-Produzenten auf die Bildung von Coeligiosin-Derivaten untersucht werden. Erste Versuche wurden mit *Streptoverticillium rubireticulli* durchgeführt, jedoch konnte für diese Art selbst unter in der Literatur beschriebenen Kultivierungsbedingungen nie eine Produktion von Undecylprodigiosin beobachtet werden [109]. Weitere Undecylprodigiosin produzierende Organismen sind *Streptomyces longisporus ruber*, *Actinomadura madurae* sowie *Saccharopolyspora* sp. nov. [49, 77, 110, 111]. Diese könnten in Zukunft ebenfalls auf die Produktion von Coeligiosinen unter Kobaltionenstress untersucht werden.

## 4 Zusammenfassung

Streptomyceten sind für die Produktion diverser Sekundärmetabolite bekannt [6]. Sie besitzen oft eine Vielzahl an Biosyntheseclustern für verschiedene Sekundärmetabolite, deren Transkription stark reguliert ist [15, 19, 21]. Besonders unter ungewöhnlichen Kultivierungsbedingungen kann die Expression „schlafender“ Gencluster erreicht werden, die zur Isolation unbekannter Verbindungen führt und damit großes Potential für die Identifizierung neuer Antibiotika bietet [15, 22, 23, 25].

Dass selbst unter identischen Kultivierungsbedingungen verschiedene Sekundärmetabolite gebildet werden können, wurde von A. Behrend während ihrer Dissertation gezeigt [82]. Bei Kultivierung von *S. coelicolor* unter Kobaltionen-Stress traten intensiv pigmentierte Phänotypen auf, die verschiedene Sekundärmetabolitenprofile untereinander, aber auch gegenüber dem Wildtyp aufwiesen. Einer dieser Phänotypen war intensiv rot gefärbt und produzierte neben den schon bekannten Verbindungen Undecylprodigiosin (**13**) und Streptorubin B (**14**) eine Reihe unbekannter Metabolite. Die Isolierung und Charakterisierung dieser Verbindungen war das Hauptziel dieser Arbeit.

Durch Kombination von Extraktion, Größenausschluss-, Normal- und Umkehrphasenchromatographie war es möglich zwei durch Kobaltionen-Stress neu entstandenen Verbindungen des roten Phänotyps vollständig zu reinigen und ihre Struktur mittels 1D- und 2D-NMR-Spektroskopie zu identifizieren (Coeligiosin B (**34**) und Coeligiosin C (**35**)). Außerdem konnten zwei nahe verwandte Derivate, die vom roten Phänotyp nur in sehr geringen Mengen gebildet und damit nicht isoliert werden konnten, anhand von Tandemmassenspektrometrie identifiziert werden (Coeligiosin A (**33**) und Coeligiosin D (**36**)). Die Strukturen konnten anschließend anhand von Fütterungsstudien und durch biomimetische Reaktionen verifiziert werden. Eine fünfte Verbindung konnte soweit gereinigt werden, dass ebenfalls ein Strukturvorschlag gemacht werden konnte (Coeligiosin E (**37**)).

Bei allen isolierten Verbindungen handelt es sich um bisher unbekannte Derivate von Undecylprodigiosin (**13**) und Streptorubin B (**14**), die zusätzliche Undecylpyrrol- oder 4-Methoxy-2,2'-

bipyrrol-Einheiten aufweisen. Die Verknüpfung dieser Struktureinheiten erfolgt dabei ausschließlich am Kohlenstoffatom der Methenbrücke der bekannten Prodigiosine, weshalb die neuen Verbindungen in der neuen Strukturklasse der Coeligiosine zusammengefasst werden. Durch Synthese und Fütterung von Vor- und Zwischenstufen der Prodigiosinbiosynthese konnte gezeigt werden, dass die Coeligiosine über den gleichen Biosyntheseweg wie die Prodigiosine entstehen. Dabei entstehen zunächst Undecylprodigiosin (**13**) und Streptorubin B (**14**) über den bekannten proteinabhängigen Biosyntheseweg aus Undecylpyrrol (**27**) und 4-Methoxy-2,2'-bipyrrol-5-carboxyaldehyd (**26**).

Es konnte durch biomimetische Reaktionen gezeigt werden, dass die anschließende Bildung der Coeligiosine wahrscheinlich durch einen Protein-unabhängigen Mechanismus in einer Fenton-artigen Reaktion erfolgt. So wäre eine Kobalt- (und Wasserstoffperoxid) vermittelte Oxidation des Brückenkohlenstoffs der Prodigiosine denkbar. Durch Angriff eines weiteren Undecylpyrrols (**27**) würde es zunächst zur Bildung von Coeligiosin A (**33**) und Coeligiosin B (**34**) kommen. Durch erneute Oxidation und den Angriff eines weiteren Undecylpyrrols (**27**) entstehen schließlich Coeligiosin C (**35**) und Coeligiosin D (**36**). Dabei kommt es zu Abspaltung von 4-Methoxy-2,2'-bipyrrol (**79**), das durch Angriff am oxidierten Streptorubin B zur Bildung von Coeligiosin E (**37**) führt (Abb. 4.1).

Die Bildung von Coeligiosinen scheint auf *S. coelicolor* unter Stress von Kobalt- oder anderen zweiwertigen Schwermetallionen, wie Kupfer, Zink, Mangan, Nickel oder Chrom beschränkt zu sein. So waren entsprechende Coeligiosin-Derivate in den Prodigiosin-Produzenten *Vibrio gazogenes* und *Pseudoalteromonas rubra* nicht nachweisbar.

Die verstärkte bzw. induzierte Prodigiosinbiosynthese im roten Phänotyp konnte auch auf Transkriptebene durch quantitative *real time* PCR nachgewiesen werden. Im Vergleich zum Wildtyp, der unter den gewählten Kultivierungsbedingungen keine Prodigiosine produzierte, zeigte sich eine etwa fünffach höhere Expression sowohl der Transkriptionsregulatoren *redD* und *redZ*, als auch der biosynthetischen Gene *redN* und *redL*. Außerdem konnte der Einfluss auf das *cbimnoq*-Cluster, der für einen Kobalt-Influx-Transporter kodiert, sowie den in unmittelbarer Nachbarschaft liegenden putativen Metall-abhängigen Transkriptionsregulator *sco5962* aus der MerR-Familie nachgewiesen werden. Unerwarteterweise war die Expression der *cbimnoq*-Gene ebenfalls um das 10- bis 15-fache und des Transkriptionsregulators um das vier- bis fünffache erhöht, was weitere Untersuchungen unabdingbar macht.

Die Auswirkungen von Kobaltionen auf die Prodigiosinbiosynthese des roten Phänotyps, die in dieser Arbeit nachgewiesen werden konnten, sind in Abb. 4.1 zusammengefasst.

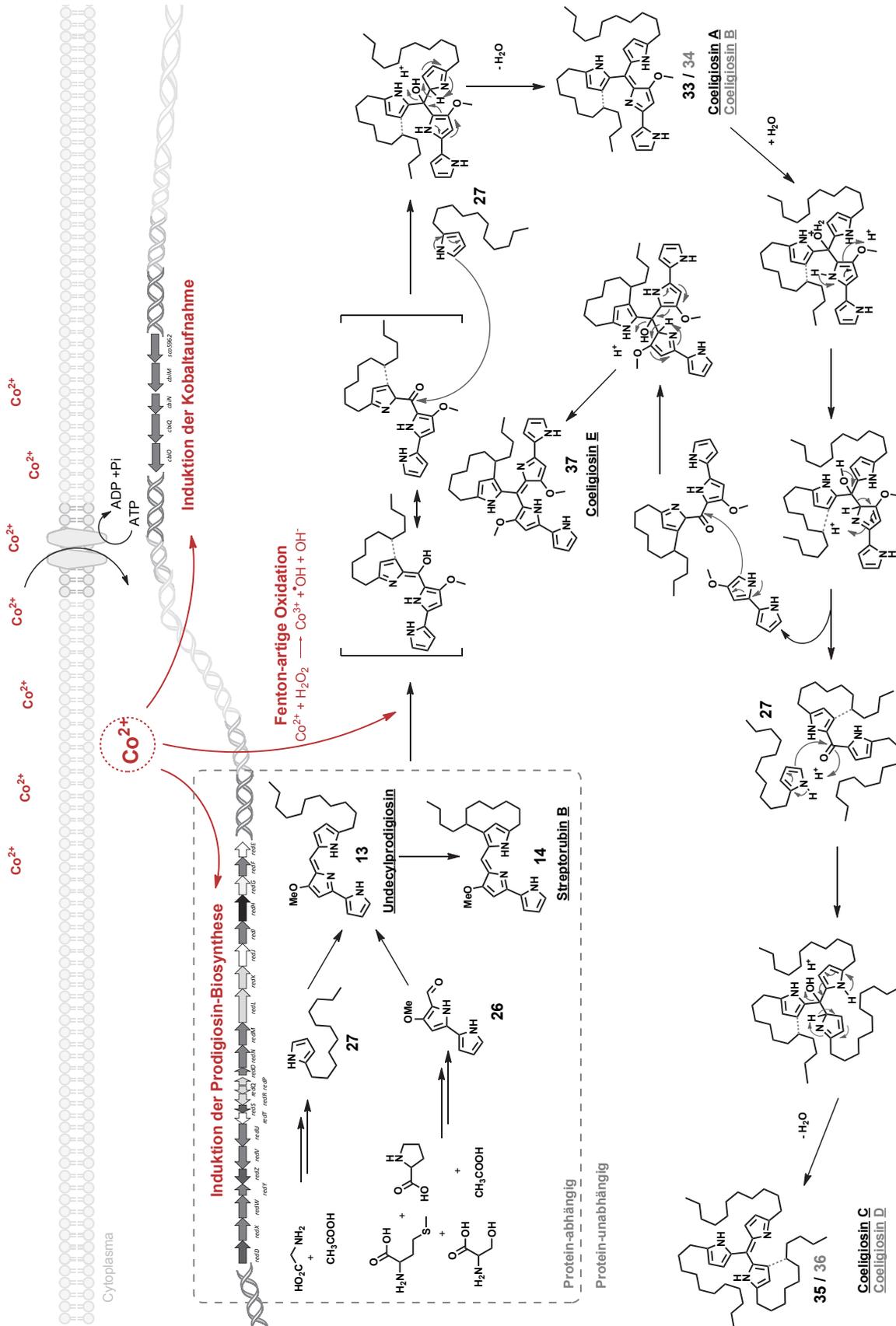


Abbildung 4.1: Auswirkung von  $\text{Co}^{2+}$  auf den roten Phänotyp von *S. coelicolor*.

## 5 Summary

Members of the genus *Streptomyces* are well known for their ability to produce a wide range of secondary metabolites [6]. Although up to 30 gene clusters for different compounds are located in their genomes, they usually only produce several of them depending on environmental conditions [15, 19, 21]. Therefore, identification of the natural products from activation of so called silent gene clusters is one of the major topics discussed during the last years [15, 22, 23, 25]. The cultivation of *Streptomyces* under non-standard conditions can lead to the production of such unknown natural products which may also serve as drug leads in the future.

The regulation of secondary metabolism is still poorly understood, and even cultivation under identical growth conditions can result in different metabolic profiles of the same strain, which was shown in the PhD thesis of A. Behrend [82]. The addition of cobalt ions to the culture broth resulted in several strongly colored phenotypes of *S. coelicolor* leading to a difference in the production of secondary metabolites, respectively. Especially a bright red phenotype produced large amounts of undecylprodigiosin (**13**) and streptorubin B (**14**) and several unknown compounds. Isolation and characterization of these so far unknown secondary metabolites was the main objective of this work.

By combination of extraction, size exclusion, normal phase and reverse phase chromatography it was possible to purify two of the compounds for extensive structure elucidation by 1D- and 2D-NMR spectroscopy (coeligiosin B (**34**) and coeligiosin C (**35**)). Furthermore it was possible to determine the structures of two closely related derivatives by tandem mass spectrometry, which were produced only in minor amounts by the red phenotype (coeligiosin A (**33**) and coeligiosin D (**36**)). An additional compound was purified to an extend, that enabled structural prediction (coeligiosin E (**37**)).

All isolated compounds are novel derivatives of undecylprodigiosin (**13**) and streptorubin B (**14**) with an additional undecylpyrrole or 4-methoxy-2,2'-bipyrrole moiety connected to the carbon atom of the methene bridge. Therefore, all new compounds were assigned to a

new structural class of natural products from *S. coelicolor* named coeligiosins.

By synthesis and feeding of stable isotope labelled precursors and intermediates of the prodigiosin pathway it was demonstrated that the coeligiosins are derived from the same pathway as the prodigiosins. First, there is the already known enzymatic formation of undecylprodigiosin (**13**) and streptorubin B (**14**) with undecylpyrrole (**27**) and 4-methoxy-2,2'-bipyrrole-5-carboxyaldehyde (**26**) as intermediates.

However, further formation towards the coeligiosins seems to be protein independent. In biomimetic studies it was shown that streptorubin B is converted to coeligiosin B in a Fenton-like reaction. A possible mechanism would be a cobalt ion (and hydrogen peroxide) mediated oxidation of the carbon atom at the methene bridge of undecylprodigiosin (**13**) or streptorubin B (**14**) followed by attack of undecylpyrrole (**27**) leading to coeligiosin A (**33**) or coeligiosin B (**34**), respectively. Another oxidation step and attack of undecylpyrrole would lead to the formation of coeligiosin C (**35**) and coeligiosin D (**36**). The 4-methoxy-2,2'-bipyrrole (**79**) released during the second oxidation could attack an oxidized streptorubin B itself and would lead to coeligiosin E (**37**) (Figure 5.1).

The formation of coeligiosins seems to be exclusive for *S. coelicolor* under cobalt ion stress or other bivalent heavy metal ions such as copper, zinc, manganese, nickel or chromium ions. A formation of coeligiosin-derivatives by prodigiosin-producers such as *Vibrio gazogenes* and *Pseudoalteromonas rubra* was not observed.

The strong induction of the prodigiosin biosynthesis under cobalt ion stress was also proven by quantitative real time PCR. There was an approximately five fold increase in the expression of the pathway specific transcriptional regulators *redD* and *redZ* as well as the biosynthetic genes *redL* and *redN* in comparison to the wild type, which did not produce any prodigiosins under the used cultivation conditions. Additionally, there was a high up-regulation of genes of the *cbimnoq* cluster encoding for a cobalt ion uptake transporter, as well as a neighboring putative transcriptional regulator (*sco5962*) showing sequence similarities to the metal sensing merR family. The up-regulation of these transporter genes was unexpected and further investigations are necessary.

The influence of cobalt ions on the prodigiosin biosynthesis of the red phenotype of *S. coelicolor*, which is summarized in Figure 5.1.

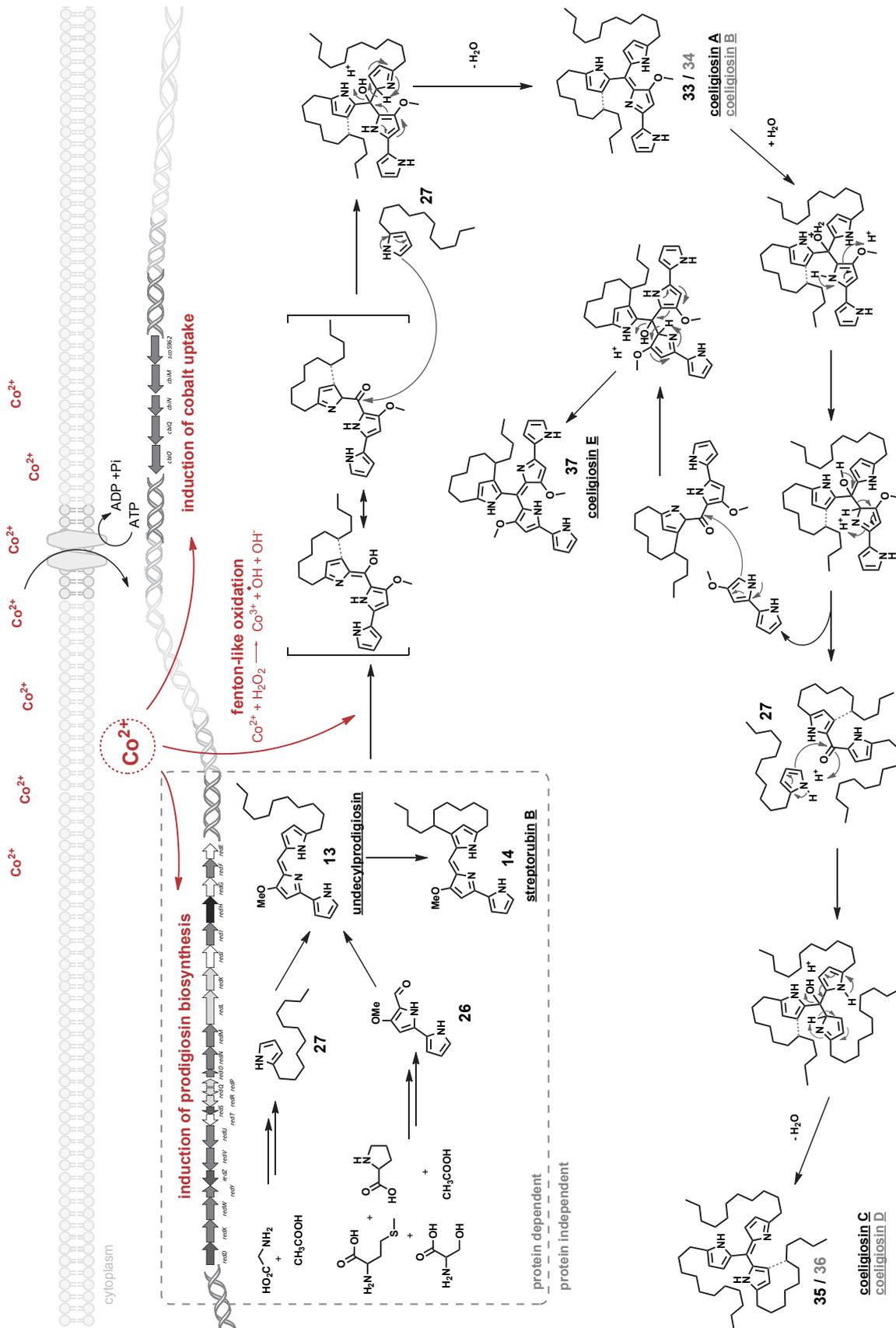


Figure 5.1: influence of  $\text{Co}^{2+}$  on the red phenotype of *S. coelicolor*.

## 6 Material und Methoden

### 6.1 Kultivierung von Mikroorganismen

Die verwendeten Wachstumsmedien und Bedingungen für die Kultivierung von *Streptomyces* sp., *Pseudoalteromonas rubra* und *Vibrio gazogenes* werden im Folgenden beschrieben. Alle aufgeführten Medien wurden mit deionisiertem Wasser hergestellt und anschließend für 20 Minuten bei 121°C und 2,1 bar in gesättigter Wasserdampfatmosphäre autoklaviert. Thermoinstabile Lösungen, die z. B. Antibiotika enthielten, wurden sterilfiltriert. Für die entsprechenden Festmedien wurden den angegebenen Rezepturen 1,5 % (w/v) Agar vor dem Autoklavieren zugegeben.

#### 6.1.1 Kultivierung von *Streptomyces* sp.

##### 6.1.1.1 Anzucht von *Streptomyces* sp.

Zur Kultivierung von *Streptomyces* sp. wurde der jeweilige Stamm zunächst auf einer SFM- oder Glycerol-Agarplatte (Kap. 6.1.1.2, S. 88) mit einer Impföse ausgestrichen. Nach etwa drei Tagen wurde mit Sporen oder einer Einzelkolonie das entsprechende Flüssigmedium beimpft und für sieben Tage bei 28 °C und 220 rpm inkubiert. Die Kultivierung erfolgte dabei in Erlenmeyerkolben, die mit einer Edelstahlspirale versehen waren und maximal 1/3 des Kolbenvolumens an Medium enthielten, um eine ausreichende Versorgung der Kultur mit Sauerstoff zu gewährleisten.

##### 6.1.1.2 Medien zur Anzucht von Streptomyceten

**Mannit-Soja-Medium (*soy flour mannitol medium*, SFM-Medium) [112]**

Hensel Vollsoja	20	g/l
Mannit	20	g/l

Das Medium wurde allgemein zur Anzucht von Streptomyceten verwendet (Kap. 6.1.1.1, S. 88).

#### **Glycerol-Medium [109]**

Glycerol	30	ml/l
Pepton	2,5	g/l
NaCl	1	g/l
Fleischextrakt	1,5	g/l

Glycerol-Medium wurde als Produktionsmedium für Undecylprodigiosin (**13**) und Streptorubin B (**14**) aus *S. coelicolor* M145 verwendet (Kap. 6.5.2, S. 98). Außerdem wurde es für Fütterungsstudien verwendet (Kap. 6.7, S. 115).

#### **6.1.1.3 Kryokulturen von *Streptomyces* sp.**

Für die dauerhafte Lagerung von *Streptomyces*-Stämmen, wurde der jeweilige Stamm in SFM-Medium angezogen (Kap. 6.1.1.1, S. 88). 1,5 ml der Kultur wurden entnommen und mit 500  $\mu$ l einer 80 %igen Glycerol-Lösung versetzt. Die Kryokultur wurde sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

#### **6.1.1.4 Sporensuspension von *Streptomyces* sp.**

Der jeweilige *Streptomyces* Stamm wurde auf SFM-Agar ausgestrichen und für mehrere Tage bei 28 °C inkubiert. Auf die dicht bewachsene Platte wurden dann 9 ml steriles Wasser gegeben und das oberflächliche Myzel vorsichtig mit einer Impföse vom Agar gelöst. Die Flüssigkeit wurde in ein Falcontube überführt und 1 min kräftig gevortext um die Sporen vom Myzel zu lösen. Anschließend wurde die Lösung durch eine mit Watte gestopfte Spritze filtriert und der Durchfluss 5 min bei 1000 x g abzentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf einen kleinen Rest verworfen und die Sporen in der verbliebenen Flüssigkeit resuspendiert. Nach Zugabe von 1,5 ml 20 %iger (v/v) Glycerol-Lösung wurde die Sporensuspension bei -20 °C gelagert.

### 6.1.2 Differenzierung verschiedener Phänotypen von *Streptomyces coelicolor*

Eine 50 ml SFM-Agarplatte (Kap. 6.1.1.2, S. 88) wurde mit 500  $\mu\text{l}$  einer 0,71 M Kobalt(II)-sulfatlösung überschichtet und nach dem vollständigen Einziehen der Lösung mit einer verdünnten Sporenlösung von *S. coelicolor* M145 inokuliert. Die Platte wurde 4-5 Tage bei 28 °C inkubiert und anschließend auf farbige Kolonien geprüft. Rote oder blaue Kolonien wurden zur Vereinzelung auf neue SFM-Platten mit Kobalt(II)sulfatlösung überimpft, bis die Isolierung eines klar einfarbigen Phänotyps möglich war. Eine Lagerung der Phänotypen war in Form von Kryokulturen möglich (Kap. 6.1.1.3, S. 89)

Die Differenzierung verschiedener Phänotypen von *S. coelicolor* M510, M511 und M512 erfolgte analog.

### 6.1.3 Anzucht des roten Phänotyps

Zunächst wurde der rote Phänotyp auf SFM-Agarplatten mit Kobalt(II)sulfatlösung ausgestrichen und 4 bis 5 Tage bei 28 °C inkubiert. Es wurden 200 ml SFM-Medium in einem 500 ml Erlenmeyerkolben mit Edelstahlspirale mit 2 ml einer 0,71 M Kobalt(II)sulfatlösung versetzt und mit einer intensiv rot gefärbten, nicht sporulierenden Einzelkolonie angeimpft. Die Kultivierung erfolgte für 7 Tage bei 28 °C und 220 rpm.

### 6.1.4 Differenzierung der Phänotypen von *S. coelicolor* unter Einwirkung anderer Schwermetallionen

Zunächst wurden Lösungen von Kobalt(II)sulfat, Kupfer(II)sulfat, Chrom(II)chlorid, Eisen(II)sulfat, Zink(II)chlorid, Nickel(II)sulfat und Mangan(II)sulfat in Wasser hergestellt. SFM-Agarplatten wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen der verschiedenen Salzlösungen (Tab. 6.1) überschichtet und anschließend mit je 10  $\mu\text{l}$  einer 1:100 verdünnten Sporenlösung (Kap. 6.1.1.4, S. 89) von *S. coelicolor* M145 beimpft. Die Platten wurden bei 28°C 5 bis 7 Tage inkubiert und auf das Auftreten farbiger Kolonien untersucht.

Tabelle 6.1: Eingesetzte Endkonzentrationen bivalenter Schwermetallionen.

	Endkonzentration [mmol/l]							
	A	B	C	D	E	F	G	H
<b>CrCl<sub>2</sub></b>	0,16	0,32	0,81	1,63	3,25	4,07	8,14	16,30
<b>MnSO<sub>4</sub></b>	0,12	0,24	0,59	1,18	2,37	5,92	11,8	23,70
<b>NiSO<sub>4</sub></b>	0,08	0,15	0,38	0,76	1,52	3,80	7,61	15,2
<b>ZnCl<sub>2</sub></b>	0,15	0,29	0,73	1,47	2,93	7,34	14,70	29,30
<b>CoSO<sub>4</sub></b>	0,07	0,14	0,36	0,71	1,42	3,56	7,11	14,20
<b>CuSO<sub>4</sub></b>	0,01	0,02	0,03	0,08	0,16	0,32	0,81	1,60

### 6.1.5 Differenzierung der Phänotypen von *S. coelicolor* M145 unter oxidativem Stress durch Wasserstoffperoxid

SFM-Agarplatten wurden mit folgenden Konzentrationen Wasserstoffperoxid überschichtet: 100  $\mu$ M, 200  $\mu$ M, 500  $\mu$ M, 750  $\mu$ M, 1 mM, 5mM, 10 mM. Anschließend wurde *S. coelicolor* M145 auf den präparierten Platten ausgestrichen und 4 Tage bei 28 °C inkubiert.

### 6.1.6 Kultivierung von *Vibrio gazogenes* und *Pseudoalteromonas rubra*

Die Anzucht mariner Bakterien erfolgte in MB-Medium (Kap. 6.1.6.1, S. 91). Zunächst wurden die Stämme auf Agar-Platten vereinzelt und dann mit einer Einzelkolonie flüssiges MB-Medium beimpft. Die Kultivierung von *Vibrio gazogenes* erfolgte für 3 Tage bei 28 °C und 220 rpm, die von *Pseudoalteromonas rubra* für 3 Tage bei Raumtemperatur ohne Schütteln.

#### 6.1.6.1 Medien zur Kultivierung von marinen Bakterien

##### Marine Broth (MB) [113]

Pepton	5	g/l
Hefeextrakt	1	g/l
Eisen(III)citrat	0,1	g/l
NaCl	19,45	g/l

---

MgCl <sub>2</sub>	5,9	g/l
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	3,24	g/l
CaCl <sub>2</sub>	1,8	g/l
KCl	0,55	g/l
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0,16	g/l
KBr	0,08	g/l
SrCl <sub>2</sub>	34	mg/l
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	22	mg/l
Na <sub>4</sub> SiO <sub>4</sub>	4	mg/l
NaF	2,4	mg/l
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1,6	mg/l
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8	mg/l

Der pH-Wert sollte bei 25°C etwa bei  $7,6 \pm 0,2$  liegen.

Das Medium wurde zur Anzucht mariner Bakterien verwendet (Kap. 6.1.6, S. 91).

### 6.1.7 Kultivierung mariner Bakterien unter Kobaltionenstress

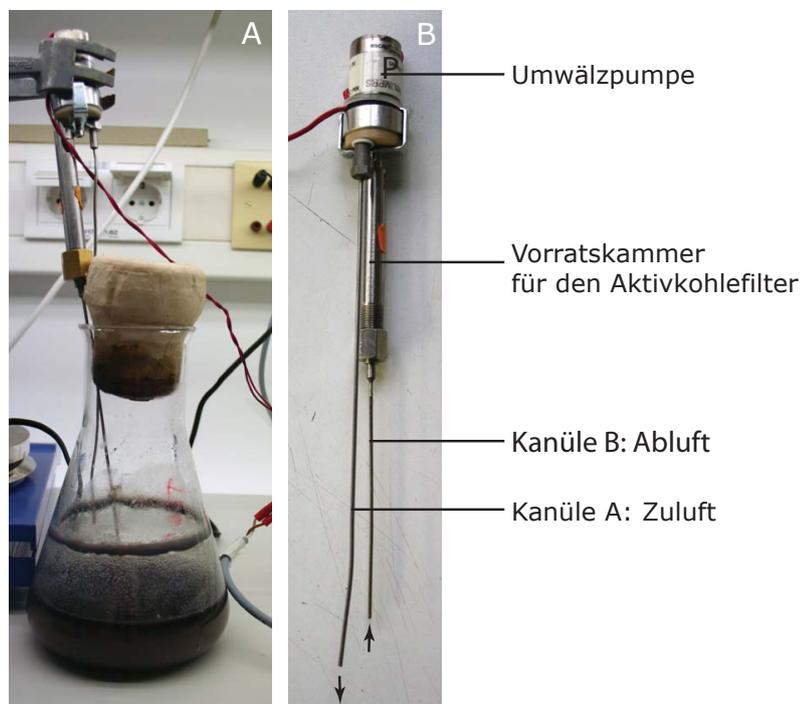
Zunächst wurden für eine Konzentrationsreihe MB-Agarplatten (50 ml) (Kap. 6.1.6.1, S. 91) mit 0,71 M Kobalt(II)sulfatlösung (0,1 ml, 0,3 ml, 0,5 ml, 0,75 ml oder 1 ml) überschichtet und nach dem Trocknen mit *Pseudoalteromonas rubra* oder *Vibrio gazogenes* beimpft. Die Platten wurden für 2 Tage bei 28 °C (*V. gazogenes*) oder Raumtemperatur (*P. rubra*) inkubiert.

Für Flüssigkulturen wurden 30 ml MB-Medium mit 0,3 ml einer 0,71 M Kobalt(II)sulfatlösung versetzt und mit einer Einzelkolonie einer Kobalt(II)sulfat-haltigen Platte inokuliert. Die Kultivierung erfolgte 3 Tage bei 28 °C und 220 rpm für *Vibrio gazogenes* oder 3 Tage bei Raumtemperatur ohne Schütteln für *Pseudoalteromonas rubra*.

## 6.2 Analyse flüchtiger Verbindungen von *S. coelicolor* M145 und des roten Phänotyps per Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS)

### 6.2.1 Sammeln flüchtiger Verbindungen von *S. coelicolor*-Flüssigkulturen

Zunächst wurden Kulturen von *S. coelicolor* M145 (Kap. 6.1.1.1, S. 88) und des roten Phänotyps (Kap. 6.1.3, S. 90) angezogen. Nach 3, 6, 9, 12 und 15 Tagen wurden jeweils 10 ml Kultur entnommen und in 50 ml Erlenmeyerkolben überführt. Die flüchtigen Verbindungen wurden über 24 Stunden durch *closed loop stripping* (CLS) gesammelt [114]. Dabei wird Luft mittels einer Umwälzpumpe durch eine Stahlkanüle A in den Kolben eingeleitet und durch eine zweite Kanüle B, die mit flüchtigen Verbindungen angereicherte Luft wieder abgesaugt (Abb. 6.1). Oberhalb von Kanüle B befindet sich ein Vorratsbehälter, in dem ein Glasröhrchen mit einem Aktivkohlefilter platziert ist. An dem Filter wurden flüchtige Verbindungen adsorbiert und konnten später mit 3 x 20  $\mu\text{l}$  Pentan, welches 200 ng/ $\mu\text{l}$  1-Bromdecan als internen Standard enthielt, vom Filter eluiert werden.



**Abbildung 6.1: Aufbau der CLS-Apparatur.** In Bild A (links) ist der generelle Versuchsaufbau mit Kolben und CLS-Pumpe dargestellt. Bild B (rechts) zeigt eine detaillierter Darstellung der CLS-Pumpe

### 6.2.2 Gaschromatographie-Massenspektrometrie flüchtiger Verbindungen

Die Analyse der Verbindungen erfolgte mit folgendem GC-MS-System:

Finnigan Trace MS 2000 Series; GC-Säule Zebron ZB-5 Säule (15 m x 0.25 mm x 0.25  $\mu\text{m}$ )

Injektortemperatur: 220 °C; Splitless-Modus

Temperaturprogramm: 50°C für 2 min; 50°C-200°C mit einem Temperaturgradienten von 6°C/min, dann 200°C-280°C mit einem Temperaturgradienten von 15°C/min, 280 °C für 3 min.

Trägergas: Helium; Trägergasfluss: 1,5 ml/min

Die Ionisierung im Massenspektrometer erfolgte durch Elektronenstoßionisation bei 70 eV (*electron impact* - EI positiv).

### 6.3 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (*high performance liquid chromatography* - HPLC)

Die Trennung komplexer Stoffgemische im analytischen Maßstab erfolgte durch HPLC, wobei sowohl ein variabler Wellenlängendetektor (VWD) als auch ein Massenspektrometer zur Analyse der Verbindungen dienten. Es wurden ausschließlich Wasser und Acetonitril in HPLC-Qualität als Laufmittel verwendet. Als HPLC-Anlage wurde die UltiMate 3000 Nano HPLC der Firma Dionex, ausgestattet mit binärer Pumpe (0,1 - 2 ml/min Flussrate), kühlbarem Autosampler, Entgaser und VWD, verwendet. Diese wurde mit einem Massenspektrometer der Firma Thermo Fisher (LTQ) gekoppelt wobei die Ionisierung der Probe mittels Elektrosprayionisation (ESI) im positiven Modus erfolgte.

Die verwendeten HPLC-Methoden A und B sind in Tab. 6.2 aufgeführt. Es wurde jeweils Wasser + 0,1 % Ameisensäure als Laufmittel A und Acetonitril + 0,1 % Ameisensäure als Laufmittel B bei einem Fluss von 350  $\mu\text{l}$  pro Minute verwendet. Die Trennung erfolgte auf einer Gemini C18 Säule [2.0 x 250 mm] der Firma Phenomenex.

**Tabelle 6.2: HPLC-Methoden** Angegeben ist jeweils die Lösungsmittelzusammensetzung durch Angabe des prozentualen Anteils an Laufmittel A und B während der Gradientenelution.

<b>% A</b> (H <sub>2</sub> O + 0,1 % HCOOH)	<b>% B</b> (ACN + 0,1 % HCOOH)	<b>Zeit</b> [min]		<b>Flussrate</b> [ $\mu$ l/min]
<b>Methode A:</b> Phenomenex Gemini C18 (2.0 x 250 mm)				
70	30	0 - 2	isokratisch	350
30	70	2 - 18	Gradient	350
0	100	18 - 20	Gradient	350
0	100	20 - 28	isokratisch	350
70	30	28 - 29	Gradient	350
70	30	29 - 34	isokratisch	350
<b>Methode B:</b> Phenomenex Gemini C18 (2.0 x 250 mm)				
70	30	0 - 2	isokratisch	350
15	85	2 - 18	Gradient	350
0	100	18 - 20	Gradient	350
0	100	20 - 35	isokratisch	350
70	30	35 - 36	Gradient	350
70	30	36 - 44	isokratisch	350
<b>% A</b> (H <sub>2</sub> O + 0,5 % AcOH)	<b>% B</b> (MeOH + 0,5 % AcOH)	<b>Zeit</b> [min]		<b>Flussrate</b> [ml/min]
<b>Methode C:</b> Waters XTerra MS C18 (10 x 50 mm, 5 $\mu$ m)				
35	65	0 - 2	isokratisch	2
0	100	2 - 20	Gradient	2
0	100	20 - 35	isokratisch	2
35	65	35 - 36	Gradient	2
35	65	36 - 45	isokratisch	2

Für die semipräparative HPLC zur quantitativen Trennung von Zellextrakten wurde das HP1100 System der Firma Agilent verwendet. Die HPLC war mit einer binären Pumpe (0,2 - 5 ml/min Flussrate), Entgaser und Autosampler ausgestattet und mit einem Fraktionssammler (Gilson 206) verbunden. Die Trennung erfolgte auf einer XTerra MS C18 Säule [10 x 50 mm, 5  $\mu$ m] (Waters) mit einem Fluss von 2 ml/min und Wasser + 0,5 % Essig-

säure als Laufmittel A und Methanol + 0,5 % Essigsäure als Laufmittel B. Der verwendete Gradient (Methode C) ist in Tab. 6.2 angegeben.

### 6.3.1 Herstellung von Zellextrakten

Zur Analyse gebildeter Metabolite von *S. coelicolor*, seiner Phänotypen, sowie mariner Bakterien, wurde 1 ml aus der jeweiligen Kultur entnommen und für 1 min bei 16000 x g abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 1 ml Methanol resuspendiert und für mindestens 1 Stunde extrahiert. Anschließend wurde der methanolische Überstand von Zellresten durch Zentrifugation (2 min, 16000 x g) befreit und 5  $\mu$ l des Extraktes mittels LC-MS (Kap. 6.3, S. 94) vermessen.

### 6.3.2 Direkter Nachweis von Prodigiosinen mittels *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization* (MALDI)

Zunächst wurde der rote Phänotyp von *S. coelicolor* 7 Tage auf SFM-Agarplatten angezogen (Kap. 6.1.2, S. 90). Eine deutlich rote Kolonie wurde vorsichtig mit Hilfe eines Skalpell von der Agaroberfläche gelöst und auf doppelseitigem Klebeband fixiert. Dieses wurde anschließend auf der Trägerplatte für das MALDI-Imaging aufgeklebt und die Kolonie mit 2  $\mu$ l einer  $\alpha$ -Matrix-Lösung inkubiert, bis das Lösungsmittel verdampft war. Anschließend wurde die Trägerplatte in die MALDI-Quelle eingesetzt, ionisiert und per Massenspektrometer der Firma Thermo Fisher (LTQ) analysiert.

#### $\alpha$ -Cyano-4-hydroxymizimtsäure-Matrix ( $\alpha$ -Matrix-Lösung)

$\alpha$ -Cyano-4-hydroxymizimtsäure	7 mg
80:20 ACN/Wasser (v/v)	1 ml
Trifluoressigsäure (0,2 %)	2 $\mu$ l

### 6.3.3 Messung hochaufgelöster Massenspektren

Messungen für hochaufgelöste Massenspektren zur Bestimmung der chemischen Zusammensetzung einzelner Verbindungen wurden im Labor von Prof. Michael Spittler an der TU Dortmund durchgeführt. Dazu wurde eine Dionex UltiMate 3000 HPLC und ein LTQ Orbitrap XL Massenspektrometer der Firma Thermo Fisher verwendet.

## 6.4 Kernresonanzspektroskopie (*nuclear magnetic resonance spectroscopy, NMR*)

NMR-Spektren von Syntheseprodukten wurden an einem Avance DRX 500 oder Bruker AV 400 aufgenommen und auf das jeweilige Lösungsmittel referenziert. NMR-Spektren der Prodigiosine und Coeligiosine wurden an einem Bruker Avance AV-500 aufgenommen. Die chemische Verschiebung  $\delta$  wird in ppm, die Kopplungskonstante  $J$  in Hz angegeben.

### Chemische Verschiebung verwendeter Lösungsmittel

	$\delta$ $^1\text{H}$	$\delta$ $^{13}\text{C}$
$\text{CDCl}_3$	7.26 ppm	77.0 ppm
$\text{CD}_3\text{OD}$	3.31 ppm	49.0 ppm
$\text{DMSO-d}_6$	2.49 ppm	39.5 ppm
$\text{C}_6\text{D}_6$	7.16 ppm	128.0 ppm

## 6.5 Isolierung von Prodigiosinen und Coeligiosinen aus *Streptomyces coelicolor*

### 6.5.1 Allgemein verwendete Trennmethode

#### 6.5.1.1 Größenausschlusschromatographie mittels Sephadex LH-20

Sephadex LH-20 wurde zunächst für mindestens 24 Stunden in Methanol gequell und dann luftblasen-frei in eine entsprechende Säule gefüllt. Nach vollständiger Sedimentation wurde die methanolische Probe vorsichtig auf die Sephadex-Oberfläche aufgetragen. Nachdem die Probe vollständig in die Säule eingezogen war, wurden alle farbigen Verbindungen mit Methanol eluiert.

#### 6.5.1.2 Reinigung mittels Festphasenextraktion

Für die Festphasenextraktion (*solid phase extraction, SPE*) wurden Chromabond HR-X-SPE-Säulen von Macherey & Nagel verwendet. Die Säulen wurden zunächst mit Methanol und dann mit Wasser nach Herstellerangaben equilibriert. Anschließend wurde die Probe in

1 ml Methanol-Wasser (v/v, 80:20) aufgetragen und zunächst mit 3 ml Methanol und anschließend mit 3 ml Methanol + 5 % Essigsäure gewaschen. Die Elution erfolgte mit 1 ml Acetonitril + 5 % Essigsäure.

### 6.5.2 Isolierung von Undecylprodigiosin (13) und Streptorubin B (14)

Zur Isolierung der schon bekannten Prodigiosine, Undecylprodigiosin (13) und Streptorubin B (14), wurde *S. coelicolor* M145 in Glycerol-Medium (Kap. 6.1.1.2, S. 88) über 7 Tage kultiviert. Das Zellpellet wurde durch Zentrifugation (4000 x g, 30 min) abgetrennt und über Nacht mit angesäuertem Methanol extrahiert. Nach dem Zentrifugieren (4000 x g, 15 min) wurde der methanolische Überstand filtriert, um letzte Zellreste zu entfernen, und anschließend mit Chloroform gegen 1 M Salzsäure extrahiert. Die organische Phase wurde abgetrennt, über Natriumsulfat getrocknet und schließlich das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer vollständig entfernt. Die Reinigung der beiden Prodigiosine erfolgte mittels semipräparativer HPLC (Methode C, Kap. 6.3, S. 94).

#### Undecylprodigiosin (13)

**HR-ESI-MS**  $m/z$  gemessen:  $[M+H]^+ = 394,28524$ , berechnet:  $[M+H]^+ = 394,28529$

**Summenformel:**  $C_{25}H_{36}ON_3$

**ESI-MS/MS** vom  $[M+H]^+ = 394,5$ ; rel. Kollisionsenergie 25 %;  $m/z$  (%)

394 (100), 379 (75), 362 (8), 350 (3), 336 (4), 322 (3), 308 (4), 294 (3), 280 (3), 266 (2), 252 (25), 238 (43), 232 (5), 222 (3), 175 (3), 161 (4), 148 (1), 134 (2), 120 (3)

**$^1H$ -NMR (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz)**  $\delta$  (ppm): 0.89 (t,  $J = 7.0$  Hz, 3H, H-11'),  $\sim 1.28$  (m, 16H, H-3', H-4', H-5', H-6', H-7', H-8', H-9', H-10'), 1.72 (m, H-2'), 2.77 (t,  $J = 7.6$  Hz, 2H, H-1'), 4.07 (s, 3H, H-13), 6.33 (d,  $J = 4.0$  Hz, 1H, H-3), 6.43 (dd,  $J = 3.8$  Hz,  $J = 1.2$ , 1H, H-16), 6.53 (s, 1H, H-9), 7.15 (s, 1H, H-6), 7.23 (m, 1H, H-4), 7.29 (m, 2H, H-17, H-15)

**$^{13}C$ -NMR (CD<sub>3</sub>OD, 125 MHz)**  $\delta$  (ppm): 14.5 (C-11'), 23.8 (C-10'), 29.2 (C-1'), 30.3 (C-2'), 30.4 (C-3'),  $\sim 30.6 - 30.7$  (C-4', C-5', C-6', C-7', C-8', C-9'), 60.0 (C-13), 95.1 (C-9), 113.7 (C-16), 114.8 (C-3), 117.7 (C-6), 119.3 (C-15), 123.2 (C-14), 124.1 (C-10), 127.7 (C-4, C-5), 128.9 (C-17), 151.5 (C-2, C-7), 168.9 (C-8)

**Streptorubin B (14)**

**HR-ESI-MS**  $m/z$  gemessen:  $[M+H]^+ = 392,26932$ , berechnet:  $[M+H]^+ = 392,26964$

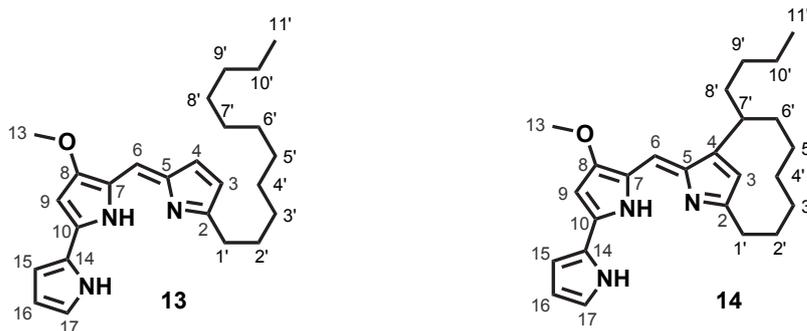
**Summenformel:**  $C_{25}H_{34}ON_3$

**ESI-MS/MS** von  $[M+H]^+ = 392,5$ ; rel. Kollisionsenergie 25 %;  $m/z$  (%)

392 (100), 377 (75), 360 (16), 348 (9), 334 (14), 320 (14), 306 (13), 295 (27), 278 (9), 252 (54), 238 (29), 230 (13), 222 (3), 175 (15), 161 (9), 148 (4), 132 (3), 120 (2)

**$^1H$ -NMR** ( $C_6D_6$ , 500 MHz)  $\delta$  (ppm): -1.44 (m, 1H,  $H_{a-4'}$ ), 0.53 (m, 1H,  $H_{a-3'}$ ), 0.73 (m, 1H,  $H_{a-5'}$ ), 0.93 (t,  $J = 7.0$  Hz, 3H, H-11'), 1.05 (m, 1H,  $H_{a-6'}$ ), 1.07 (m, 1H,  $H_b-4'$ ), 1.3 (m, 4H, H-9', H-10'), 1.38 (m, 1H,  $H_b-5'$ ), 1.39 (m, 1H,  $H_a-8'$ ), 1.47 (m, 1H,  $H_b-6'$ ), 1.57 (m, 1H,  $H_b-3'$ ), 1.60 (m, 1H,  $H_a-2'$ ), 1.66 (m, 1H,  $H_b-8'$ ), 1.72 (m, 1H,  $H_b-2'$ ), 2.24 (m, 1H,  $H_a-1'$ ), 2.86 (m, 1H, H-7'), 3.16 (s, 3H, H-13), 3.63 (m, 1H,  $H_b-1'$ ), 5.53 (s, 1H, H-9), 6.14 (m, 1H, H-16), 6.16 (s, 1H, H-3), 6.72 (m, 1H, H-15), 6.80 (m, 1H, H-17), 7.12 (s, 1H, H-6), 13.74 (NH), 13.57 (NH)

**$^{13}C$ -NMR** ( $C_6D_6$ , 125 MHz)  $\delta$  (ppm): 14.8 (C-11'), 23.7 (C-10'), 26.1 (C-5'), 28.4 (C-4'), 29.6 (C-3'), 30.4 (C-1'), 31.0 (C-9'), 31.6 (C-8'), 32.4 (C-2'), 38.0 (C-7'), 39.5 (C-6'), 58.3 (C-13), 93.4 (C-9), 112.2 (C-16), 112.7 (C-6), 117.2 (C-3), 117.4 (C-15), 121.3 (C-10), 123.3 (C-14), 125.8 (C-4), 127.5 (C-17), 148.0 (C-7), 150.0 (C-5), 154.9 (C-2), 165.7 (C-8)



**Abbildung 6.2:** Struktur der schon bekannten Prodigiosine Undecylprodigiosin (13) (links) und Streptorubin B (14) (rechts). Die Atome wurden für die Zuordnung der NMR-Daten nummeriert.

### 6.5.3 Isolierung der Coeligiosine

Zwanzig Liter des roten Phänotyps von *S. coelicolor* wurde in Kobalt(II)sulfat-haltigem SFM-Medium (Kap. 6.1.1.2, S. 88) angezogen. Nach 7 Tagen wurde das Zellpellet durch Zentrifugation (5000 x g, 15 min) vom Medienüberstand getrennt und zweimal über Nacht mit angesäuertem Methanol extrahiert. Die vereinigten Methanol-Extrakte wurden mit Chloroform gegen 1 M Salzsäure extrahiert, die organische Phase über Natriumsulfat getrocknet und anschließend das Chloroform vollständig am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rohextrakt wurde in Methanol aufgenommen und die Metabolite anhand ihrer Größe auf einer Sephadex LH-20 Säule (Kap. 6.5.1.1, S. 97) getrennt. Die Fraktionen wurden durch HPLC-MS (Methode A, Kap. 6.3, S. 94) analysiert und entsprechend der darin enthaltenen Verbindungen vereinigt.

#### 6.5.3.1 Reinigung von Coeligiosin B (34)

Die weitere Reinigung von Coeligiosin B nach der Größenausschlusschromatographie erfolgte mittels semipräparativer HPLC (Methode C, Kap. 6.3, S. 94). Das angereicherte Coeligiosin B konnte schließlich durch Säulenchromatographie über Silicagel (Chloroform/Methanol/Ammoniak: 95/5/1, v/v) und einem abschließenden Reinigungsschritt mittels SPE (Kap. 6.5.1.2, S. 97) gereinigt werden. Insgesamt konnten 2,4 mg der tief violetten Verbindung erhalten werden.

**HR-ESI-MS**  $m/z$  gemessen:  $[M+H]^+ = 611,46857$ , berechnet:  $[M+H]^+ = 611,46834$

**Summenformel:**  $C_{40}H_{59}ON_4$

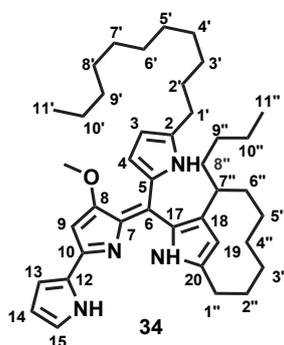
**ESI-MS/MS** von  $[M+H]^+ = 611,5$ ; rel. Kollisionsenergie 25 %;  $m/z$  (%):

612 (7), 596 (75), 579 (47), 567 (31), 553 (45), 539 (53), 525 (20), 511 (12), 497 (10), 485 (9), 471 (100), 469 (43), 455 (28), 449 (26), 441 (14), 392 (11), 390 (12), 345 (7), 331 (9), 318 (5)

**$^1H$ -NMR (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz)**  $\delta$  (ppm): -1.21 (b, 1H, H<sub>b</sub>-4''), 0.76 - 1.47 (m, ovlp., 36H, H-3', H-4', H-5', H-6', H-7', H-8', H-9', H-10', H-11', H<sub>b</sub>-2'', H-3'', H<sub>a</sub>-4'', H-5'', H-6'', H-7'', H-8'', H-9'', H-10'', H-11''), 1.72 (m, 2H, H-2'), 1.84 (m, 2H, H-X''), 1.95 (m, 1H, H<sub>a</sub>-2''), 2.61 (m, 1H, H<sub>b</sub>-1''), 2.75 (t,  $J = 7,5$  Hz, 2H, H-1'), 2.88 (m, 1H, H<sub>a</sub>-1''), 3.92 (s, 3H, OMe), 6.30 (m, 1H, H-14), 6.37 (b, 1H, H-3), 6.62 (s, 1H, H-9), 6.78 (b, 2H, H-4, H-19), 6.90 (dd,  $J = 3.7$  Hz,  $J = 1.3$  Hz, 1H, H-13), 7.06 (m, 1H, H-15)

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 125 MHz)  $\delta$  (ppm): 14.5 (C-11'), 25.9 (C-X''), 29.2 (C-1'), 30.3 (C-1'', C-X''),  $\sim 30.5$  (C-2', C-3', C-4', C-5', C-6', C-7', C-8', C-9', C-10'), 31.9 (C-X''), 33.2 (C-2''), 39.24 (C-X''), 59.2 (OMe), 95.6 (C-9), 112.0 (C-14), 113.3 (C-13), 113.6 (C-3), 118.9 (C-19), 120.1 (C-7), 124.1 (C-12), 124.6 (C-15), 125.1 (C-4), 127.7 (C-5), 128.1 (C-17), 130.7 (C-6), 143.3 (C-10), 146.9 (C-18 ?), 148.3 (C-20), 148.9 (C-2), 163.3 (C-8)

Da eine genaue Positionszuordnung aller Protonen und Kohlenstoffe in der zyklisierten Alkylkette nicht möglich war, sind diese Protonen durch H-X'' und die Kohlenstoffe als C-X'' kenntlich gemacht.



**Abbildung 6.3: Struktur von Coeligiosin B (34).** Die Atome wurden für die Zuordnung der NMR-Daten nummeriert.

### 6.5.3.2 Reinigung von Coeligiosin C (35)

Die weitere Reinigung von Coeligiosin C nach der Größenausschlusschromatographie erfolgte durch Säulenchromatographie über Silicagel (5 % Ethylacetat in Hexan). Abschließend wurde mittels einer SPE-Säule (Kap. 6.5.1.2, S. 97) gereinigt, wobei eine Gesamtmenge von 6 mg der orange-gelben Verbindung isoliert werden konnten.

**HR-ESI-MS**  $m/z$  gemessen:  $[\text{M}+\text{H}]^+ = 672,61938$ , berechnet:  $[\text{M}+\text{H}]^+ = 672,61903$

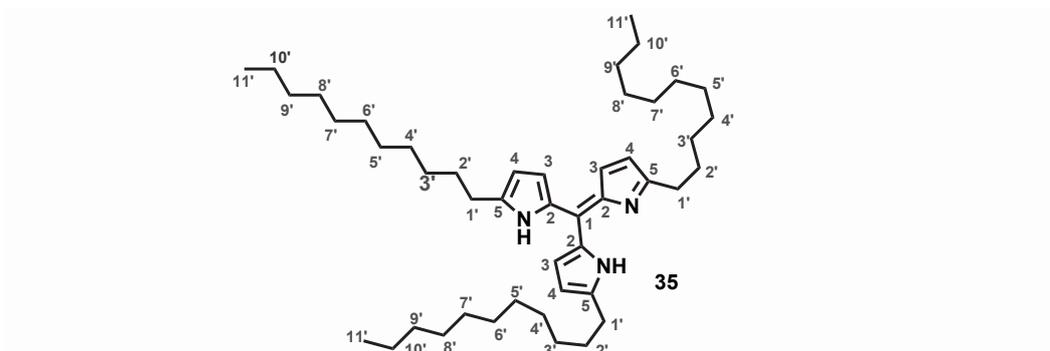
**Summenformel:**  $\text{C}_{46}\text{H}_{78}\text{N}_3$

**ESI-MS/MS** von  $[\text{M}+\text{H}]^+ = 672,5$ ; rel. Kollisionsenergie 35 %;  $m/z$  (%)

673 (20), 656 (4), 544 (5), 530 (6), 516 (12), 502 (18), 488 (18), 474 (13), 460 (13), 451 (43), 446 (10), 432(5), 418 (13), 404 (100), 390 (12), 376 (23), 362 (5), 348 (4), 334 (5), 311 (8), 278 (5), 264 (7), 251 (4)

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz)  $\delta$  (ppm): 0.90 (t,  $J = 6.9$  Hz, 9H, H-11'), 1.29 (m, 2H, H-10'),  $\sim 1.30$  (m, ovlp., 36H, H-4', H-5', H-6', H-7', H-8', H-9'), 1.41 (m, 6H, H-3'), 1.75 (m, 6H, H-2'), 2.80 (t,  $J = 7.5$  Hz, 6H, H-1'), 6.49 (d,  $J = 4.0$  Hz, 3H, H-4), 7.00 (d,  $J = 4.0$  Hz, 3H, H-3)

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 125 MHz)  $\delta$  (ppm): 14.5 (C-11'), 23.8 (C-10'), 29.4 (C-1'), 30.3 (C-2'), 30.5 (C-3'),  $\sim 30.8$  (C-4', C-5', C-6', C-7', C-8', C-9'), 115.4 (C-4), 129.4 (C-2), 130.8 (C-3), 137.1 (C-1), 153.3 (C-5)



**Abbildung 6.4: Struktur von Coeligiosin C (35).** Die Atome wurden für die Zuordnung der NMR-Daten nummeriert.

### 6.5.3.3 Reinigung von Coeligiosin E (37)

Coeligiosin E wurde ebenfalls mittels Säulenchromatographie über Silicagel weiter gereinigt. Dabei wurde 2 % Methanol in Chloroform mit einem Zusatz von 0,5 % Ammoniak als Laufmittel gewählt. Abschließend wurde Coeligiosin E ebenfalls mittels SPE (Kap. 6.5.1.2, S. 97) gereinigt. Da die Verbindung nur in äußerst geringen Mengen von *S. coelicolor* unter Kobaltionen-Stress produziert wird, konnten insgesamt nur 410  $\mu\text{g}$  isoliert werden, die noch leichte Verunreinigungen aufwiesen.

**HR-ESI-MS**  $m/z$  gemessen:  $[\text{M}+\text{H}]^+ = 552,33301$ , berechnet:  $[\text{M}+\text{H}]^+ = 552,33330$

**Summenformel:**  $\text{C}_{34}\text{H}_{42}\text{O}_2\text{N}_5$

**ESI-MS/MS** von  $[\text{M}+\text{H}]^+ = 552,5$ ; rel. Kollisionsenergie 30 %;  $m/z$  (%)

553 (1), 537 (45), 520 (30), 506 (100), 494 (2), 480 (1), 428 (3), 412 (2), 390 (9), 315 (4)

$^1\text{H-NMR}$  (MeOD, 500 MHz) unvollständig,  $\delta$  (ppm): -0.95 (m, 1H,  $\text{H}_b\text{-4}'$ ), 0.91 (ovlp., 3H, H-11'), 1.19 (m, ovlp., 1H,  $\text{H}_a\text{-4}'$ ), 1.28 (m, ovlp., 1H,  $\text{H}_b\text{-2}'$ ), 1.93 (m 1H,  $\text{H}_a\text{-2}'$ ), 2.58 (m, 1H,  $\text{H}_b\text{-1}'$ ), 2.86 (m, 1H,  $\text{H}_a\text{-1}'$ ), 6.25 (b, 2H, H-13, H-23 oder H-14, H-24), 6.50 (b, 2H, H-9, H-19), 6.68 (s, 1H, H-3), 6.78 (b, 2H, H-14, H-24 oder H-13, H-23), 6.96 (b, 2H, H-15, H-25)

$^{13}\text{C-NMR}$  (MeOD, 125 MHz) unvollständig,  $\delta$  (ppm): 12.9 (C-11'), 26.8 (C-4'), 28.9 (C-1'), 32.1 (C-2'), 92.9 (C-9, C-19), 109.6 (C-14, C-24 oder C-13, C-23), 109.9 (C-13, C-23 oder C-14, C-24), 116.2 (C-3), 121.5 (C-15, C-25)

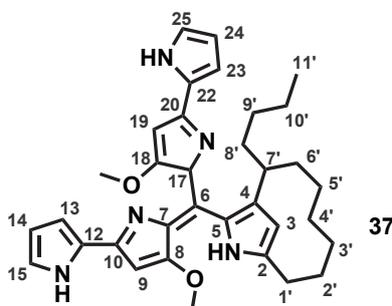


Abbildung 6.5: Struktur von Coeligiosin E (37). Die Atome wurden für die Zuordnung der NMR-Daten nummeriert.

#### 6.5.3.4 Massenspektrometrische Daten von Coeligiosin A und D

##### Coeligiosin A (33)

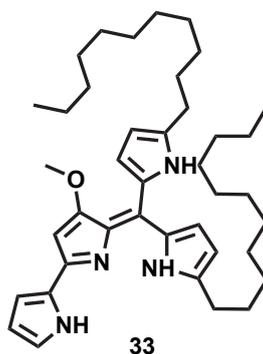


Abbildung 6.6: Struktur von Coeligiosin A (33).

HR-ESI-MS  $m/z$  gemessen:  $[\text{M}+\text{H}]^+ = 613,48407$ , berechnet:  $[\text{M}+\text{H}]^+ = 613,48399$

Summenformel:  $\text{C}_{40}\text{H}_{61}\text{ON}_4$

**ESI-MS/MS** von  $[M+H]^+ = 613,5$ ; rel. Kollisionsenergie 35 %;  $m/z$  (%)

613 (1), 598 (78), 582 (29), 569 (12), 555 (16), 541 (9), 527 (12), 513 (9), 505 (4), 499 (4), 486 (7), 471 (100), 457 (69), 451 (23), 443 (21), 429 (3), 415 (3), 405 (7), 392 (15), 345 (8), 331 (16), 318 (6), 311 (5)

### Coeligiosin D (36)

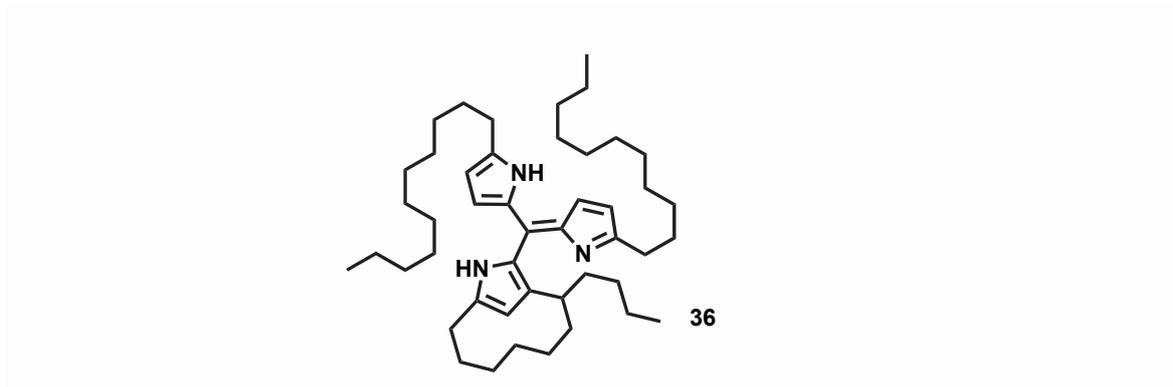


Abbildung 6.7: Struktur von Coeligiosin D (36).

**HR-ESI-MS**  $m/z$  gemessen:  $[M+H]^+ = 670,60338$ , berechnet:  $[M+H]^+ = 670,60345$

**Summenformel:**  $C_{46}H_{76}N_3$

**ESI-MS/MS** von  $[M+H]^+ = 670,5$ ; rel. Kollisionsenergie 35 %;  $m/z$  (%)

671 (14), 654 (12), 643 (4), 629 (6), 614 (4), 585 (7), 572 (14), 559 (6), 545 (65), 531 (14), 515 (13), 500 (33), 486 (27), 472 (19), 458 (18), 450 (42), 451 (29), 444 (14), 433 (12), 418 (30), 404 (100), 402 (46), 390 (9), 376 (18), 360 (5), 278 (7), 264 (8)

## 6.6 Synthese

### Gaschromatographie-Massenspektroskopie (GC-MS)

GC-MS-Spektren zur Reaktionskontrolle wurden mit einem Hewlett Packard Series II aufgenommen. GC-Säule: Phenomenex Zebron ZB-5ms (30 m x 0,25 mm, 0,25  $\mu$ m)

### Säulenchromatographie

Für die Säulenchromatographie wurde Kieselgel von ICN (Silica 32-60, 60 Å) verwendet. Laufmittel sind bei den entsprechenden Synthesevorschriften aufgeführt.

### Analytische Dünnschichtchromatographie (DC)

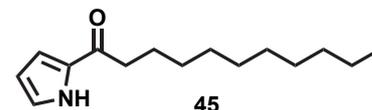
Für die Dünnschichtchromatographie wurden DC-Aluminiumfolien (Kieselgel 60 F<sub>254</sub>) der Firma Merck verwendet. Analyten wurden mittels UV-Licht bei 254 nm oder durch Anfärben mit Kaliumpermanganat-Färbereagenz detektiert.

#### Kaliumpermanganat-Färbereagenz

KMnO <sub>4</sub>	3	g
K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	20	g
NaOH (5 %, m/v)	5	ml
H <sub>2</sub> O	300	ml

### 6.6.1 Synthese von 2-Undecanoylpyrrol (45) [69]

1,5 g (8,05 mmol, 1 eq.) Undekansäure, 3,5 g (16,1 mmol, 2 eq.) 2,2-Dipyridyldisulfid und 4,23 g (16,1 mmol, 2 eq.) Triphenylphosphin wurden in trockenem Toluol gelöst und unter Argon gerührt. Nach 24 h wurde zunächst Pyrrolmagnesiumchlorid hergestellt. Dazu wurden bei -10 °C 5,5 ml (80 mmol, 10 eq.) Pyrrol langsam zu 40,3 ml einer 2 M Ethylmagnesiumchlorid-Lösung in trockenem Toluol zugeotropft. Das Pyrrolmagnesiumchlorid wurde anschließend tropfenweise zu der auf -78 °C gekühlten aktivierten Undekansäure vom Vortag geben. Nach 2 h wurden 20 ml einer gesättigten Ammoniumchloridlösung zugegeben und die Lösung 3 mal mit 20 ml Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurde je 3 mal mit 20 ml 5 %iger (m/v) Kaliumcarbonatlösung, Wasser und gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie über Silicagel mit 15 % Ethylacetat in Hexan als Laufmittel gereinigt. Es wurden 1,73 g (92 %) Undecanoylpyrrol (**45**) als weißer Feststoff erhalten.



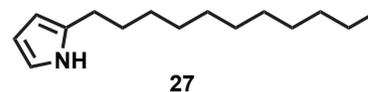
**EI-MS** *m/z* (%): 235 (10), 178 (1), 122 (16), 109 (100), 94 (45), 66 (11)

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz)  $\delta$  (ppm): 0.88 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H), 1.21-1.40 (m, 14H), 1.72 (m, 2H), 2.76 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 6.27 (m, 1H), 6.91 (m, 1H), 7.03 (m, 1H), 9.63 (b, 1H)

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz)  $\delta$  (ppm): 14.1, 22.7, 25.3, 29.3, 29.5, 29.5, 29.6, 31.9, 38.0, 110.5, 116.1, 124.4, 132.1, 191.2

### 6.6.2 Synthese von 2-Undecylpyrrol (**27**) [69]

Zu 0,91 g (24,2 mmol, 6 eq.) Natriumborhydrid in siedendem Isopropanol (40 ml) wurden 0,95 g (4,02 mmol, 1 eq.) 2-Undecoylpyrrol (**45**) gegeben. Nach 12 Stunden unter Rückfluss wurde die Lösung auf Raumtemperatur abgekühlt und vorsichtig Wasser zugegeben, bis sich das verbliebene Natriumborhydrid vollständig gelöst hatte. Der Großteil an Isopropanol wurde am Rotationsverdampfer entfernt und die restliche Lösung dreimal mit 20 ml Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Rohprodukt anschließend mittels Säulenchromatographie über Silicagel gereinigt (10 % Ethylacetat in Hexan). Es wurden 0,7 g (78 %) 2-Undecylpyrrol (**27**) als weißer Feststoff erhalten.



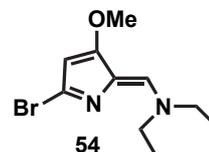
**EI-MS**  $m/z$  (%): 221 (19), 178 (4), 106 (2), 94 (20), 80 (100), 67 (6), 53(4)

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)  $\delta$  (ppm): 0.88 (t,  $J = 7.0$  Hz, 3H), 1.26 - 1.34 (m, 20H), 1.62 (m, 2H), 2.59 (t,  $J = 7.7$  Hz, 2H), 5.91 (m, 1H), 6.13 (m, 1H), 6.66 (s, 1H), 7.90 (b, 1H)

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz)  $\delta$  (ppm): 14.1, 22.7, 27.7, 29.3, 29.4, 29.4, 29.6, 29.6, 31.9, 104.8, 108.2, 115.9, 132.9

### 6.6.3 Synthese von *N*-((5-bromo-3-methoxy-2*H*-pyrrol-2-ylidene)methyl)-*N*-ethylethanamin (**54**) [95]

1,5 ml (13,5 mmol, 3 eq.) Diethylformamid wurden in 5 ml Chloroform gelöst und bei 0 °C tropfenweise mit 3,3 g (11,5 mg, 2,5 eq.) Phosphoroxobromid, welches in 15 ml Chloroform gelöst wurde, versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde für 30 min bei 0 °C gerührt, dann das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und der entstandene Vilsmeier Komplex für 15 Minuten im Vakuum getrocknet. Der Feststoff wurde anschließend in 10 ml Chloroform gelöst und erneut auf 0 °C gekühlt. 0,5 g (4,4 mmol, 1 eq.) 4-Methoxy-3-pyrrolin-2-on, gelöst in 15 ml Chloroform, wurden langsam zugetropft, das Reaktionsgemisch zunächst langsam auf Raumtemperatur und schließlich auf 60 °C erwärmt. Nach 5 Stunden wurde die Reaktionsmischung auf Eis gegeben, der pH-Wert mit 1 N Natronlauge auf 7 eingestellt und 50 ml Ethylacetat hinzu gefügt. Die Suspension wurde über Celite filtriert und die wässrige Phase anschließend dreimal mit 20 ml Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurde mit 20 ml gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen, anschließend über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie über Silicagel gereinigt (10 % Ethylacetat in Hexan), wobei das zunächst erhaltene Öl (**54**) mit der Zeit zu einem bräunlichen Feststoff kristallisierte (0,7 g, 61 %).

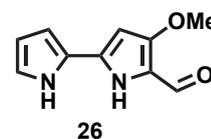


<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) δ (ppm): 1.28 (m, 6H), 3.39 (d, *J* = 7.2, 2H), 3.75 (s, 3H), 4.11 (d, *J* = 7.1 Hz, 2H), 5.59 (s, 1H), 7.00 (s, 1H)

<sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz) δ (ppm): 12.4, 14.5, 44.5, 51.1, 57.9, 96.4, 120.6, 133.5, 138.6, 165.3

#### 6.6.4 Synthese von 4-Methoxy-2,2'-bipyrrol-5-carboxyaldehyd (**26**) [95]

Unter Argon-Schutzatmosphäre wurden zu 23 mg (0,1 mmol, 0,1 eq.) Palladiumacetat in 1,5 ml trockenem Toluol 114 mg (0,4 mmol, 0,4 eq.) Triphenylphosphin hinzugefügt. Die Mischung wurde für 20 Minuten bei 70° C gerührt und zeigte bereits nach wenigen Minuten eine leuchtend gelbe Farbe.



Währenddessen wurden 250 mg (1 mmol, 1 eq.) *N*-((5-bromo-3-methoxy-2*H*-pyrrol-2-ylidene)methyl)-*N*-ethylethanamine (**54**) gemeinsam mit 305 mg (1,4 mmol, 1,4 eq.) *N*-Boc-pyrrolborsäure in 15 ml einer entgasten Lösung aus 10 % Wasser in Dioxan gelöst. Diese wurde anschließend zum leuchtend gelben Katalysator zugetropft, mit 307 mg (3 mmol, 3 eq.) Natriumcarbonat versetzt und bei 100 °C gerührt. Nach 3,5 Stunden und zusätzlich nach weiteren 15 Minuten wurden 200  $\mu$ l Natriummethanolat (30 % in Methanol) zugegeben. Nach weiteren 30 Minuten wurde die Reaktionsmischung in 100 ml Wasser gegeben und der pH-Wert mit 1M HCl auf 7 eingestellt. Der Niederschlag wurde abfiltriert, mit kaltem Wasser und Aceton gewaschen und das hellgelbe Produkt (**26**) (184 mg, 97 %) schließlich im Vakuum getrocknet.

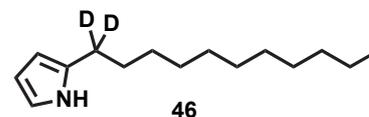
**EI-MS**  $m/z$  (%): 190 (100), 171 (10), 159 (8), 147 (11), 119 (18), 94 (12), 92 (25), 76 (11), 64 (25)

**<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz)**  $\delta$  (ppm): 3.82 (s, 3H), 6.11 (s, 1H), 6.26 (s, 1H), 6.74 (s, 1H), 6.89 (s, 1H), 9.29 (s, 1H), 11.22 (s, 1H), 11.39 (s, 1H)

**<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 125 MHz)**  $\delta$  (ppm): 57.8, 90.9, 108.3, 109.3, 117.3, 120.3, 123.4, 133.2, 158.6, 171.6

### 6.6.5 Synthese von [1',1'-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-2-Undecylpyrrol (UP-d<sub>2</sub>) (46)

Für die Herstellung von deuteriertem Undecylpyrrol (46) wurden zu 0,45 g (12,3 mmol, 6 eq.) Natriumbordeuterid in 20 ml siedendem Isopropanol 0,4 g (2,05 mmol, 1 eq.) 2-Undecanoylpyrrol (45) gegeben und die Reaktionsmischung über Nacht unter Rückfluss gekocht. Nach Abkühlen der Lösung wurde so viel Wasser zugeben, bis sich das restliche Natriumbordeuterid vollständig gelöst hatte. Der Großteil des Isopropanols wurde am Rotationsverdampfer entfernt, der Rückstand dreimal mit 20 ml Ethylacetat extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über Natriumsulfat getrocknet, das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und das Rohprodukt durch Säulenchromatographie über Silicagel gereinigt (10 % Ethylacetat in Hexan). [1',1'-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-2-Undecylpyrrol (46) wurde als weißer Feststoff erhalten (0,31 g, 82%).



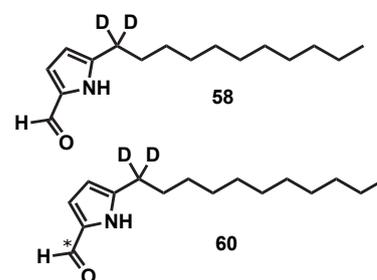
**EI-MS** *m/z* (%): 223 (16), 152 (2), 124 (2), 95 (15), 82 (100), 55(6)

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) δ (ppm): 0.89 (t, *J* = 6.9 Hz, 3H, H-11'), 1.22-1.38 (m, 20H, H-3', H-4', H-5', H-6', H-7', H-8', H-9', H-10'), 1.61 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H, H-2'), 5.92 (s, 1H, H-2), 6.14 (s, 1H, H-3), 6.66 (s, 1H, H-4)

<sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz) δ (ppm): 14.1 (C-11'), 22.7 (C-10'), ~ 29.5 (C-2', C-3', C-4', C-5', C-6', C-7', C-8'), 31.9 (C-9'), 104.8 (C-2), 108.2 (C-3), 115.9 (C-4), 132.9 (C-1)

### 6.6.6 Synthese von [1',1'-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-5-Undecylpyrrol-2-carboxyaldehyd (58)

Zu 100 μl (95 mg, 1,3 mmol, 6eq.) Dimethylformamid wurden 150 μl (252 mg, 1,6 mmol, 7 eq.) Phosphor(V)oxychlorid langsam bei 0 °C zugetropft. Das Reaktionsgemisch wurde 1 Stunde bei Raumtemperatur gerührt und anschließend erneut auf 0 °C gekühlt. 50 mg (0,22 mmol, 1 eq.) [1',1'-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-2-Undecylpyrrol (46), gelöst in 2 ml Dichlormethan, wurden langsam zugegeben, der Ansatz dann zunächst für 30 Minuten unter Rückfluss gekocht und schließlich nach Zugabe von 10 ml 10 %iger (w/v) Natriumhydrogencarbonatlösung weitere 20 Minuten bei 80 °C gerührt. Die Suspension wurde



dreimal mit 10 ml Dichlormethan extrahiert, mit 10 ml gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie über Silicagel (10 % Ethylacetat in Hexan) gereinigt. Es wurden 57 mg (quant.) eines schwach orangen Feststoffes (**58**) erhalten.

**EI-MS**  $m/z$  (%): 251 (45), 234 (20), 222 (30), 220 (37), 206 (10), 194 (12), 180 (15), 165 (10), 151 (25), 136 (7), 122 (18), 110 (47), 95 (10), 82 (100), 55 (8)

**$^1\text{H-NMR}$**  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)  $\delta$  (ppm): 0.91 (t,  $J = 6.9$  Hz, 3H, H-11'),  $\sim 1.20 - 1.45$  (m, 16H, H-3', H-4', H-5', H-6', H-7', H-8', H-9', H-10'), 1.67 (t,  $J = 6.9$  Hz, 2H, H-2'), 6.12 (m, 1H, H-3), 6.95 (m, 1H, H-4), 9.34 (d,  $J_{\text{CH}} = 174.5$  Hz, 1H, CHO), 9.85 (b, NH)

**$^{13}\text{C-NMR}$**  ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz)  $\delta$  (ppm): 14.1 (C-11'), 22.7 (C-10'),  $\sim 29.3 - 29.6$  (C-2', C-3', C-4', C-5', C-6', C-7', C-8'), 31.9 (C-9'), 109.6 (C-3), 122.8 (C-4), 131.7 (C-5), 143.4 (C-2), 177.8 (CHO)

$^{13}\text{C}$ -markierter [*Formyl*- $^{13}\text{C}$ ,  $1',1'-^2\text{H}_2$ ]-5-Undecylpyrrol-2-carboxyaldehyd (**60**) wurde analog mit  $^{13}\text{C}$ -markiertem Dimethylformamid hergestellt (58 mg, quant.).

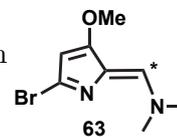
**EI-MS** des  $^{13}\text{C}$ -markierten Aldehyds (**60**)  $m/z$  (%): 252 (45), 235 (25), 222 (25), 220 (37), 208 (10), 195 (10), 181 (12), 166 (10), 152 (25), 137 (7), 123 (18), 111 (45), 95 (10), 82 (100), 55 (10)

**$^1\text{H-NMR}$**  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)  $\delta$  (ppm): analog zu [ $1',1'-^2\text{H}_2$ ]-5-Undecylpyrrol-2-carboxyaldehyd (**58**)

**$^{13}\text{C-NMR}$**  ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz)  $\delta$  (ppm): analog zu [ $1',1'-^2\text{H}_2$ ]-5-Undecylpyrrol-2-carboxyaldehyd (**58**)

### 6.6.7 Synthese von [8-<sup>13</sup>C]-*N*-((5-Bromo-3-methoxy-2*H*-pyrrol-2-ylidene)methyl)-*N*-methylmethanamin (**63**)

Die Synthese wurde analog zu der Synthese von [8-<sup>13</sup>C]-*N*-((5-Bromo-3-methoxy-2*H*-pyrrol-2-ylidene)methyl)-*N*-ethylethanamin (**54**) mit <sup>13</sup>C-markiertem Dimethylformamid anstelle von Dimethylformamid durchgeführt (Kap. 6.6.3, S. 107). Es wurden 1 g (13,68 mmol, 3 eq.) <sup>13</sup>C-markiertes DMF, 3,27 g (11,4 mmol, 2,5 eq.) Phosphoroxobromid und 0,5 g (4,4 mmol, 1 eq.) 4-Methoxy-3-pyrrolin-2-on für die Synthese eingesetzt. Es wurden 140 mg (14 %) des gewünschten Enamins (**63**) erhalten.



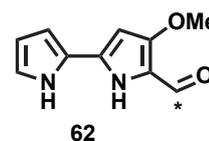
**EI-MS** *m/z* (%) 233 (100), 231 (82), 216 (40), 204 (88), 202 (60), 189 (27), 187 (20), 175 (18), 160 (12), 150 (13), 148 (15), 136 (23), 108 (23), 84 (17)

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz)  $\delta$  (ppm): 3.29 (s, 3H), 3.67 (s, 3H), 3.81 (s, 3H), 5.70 (s, 1H), 6.94 (s, 1H)

**<sup>13</sup>C-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz)  $\delta$  (ppm): 45.9, 59.1, 93.7, 120.6, 133.5, 140.8, 165.3

### 6.6.8 Synthese von [Formyl-<sup>13</sup>C]-4-Methoxy-2,2'-bipyrrol-5-carboxyaldehyd (**62**)

<sup>13</sup>C-markiertes 4-Methoxy-2,2'-bipyrrol-5-carboxyaldehyd (**62**) wurde analog zu der Synthese von 4-Methoxy-2,2'-bipyrrol-5-carboxyaldehyd (**26**) hergestellt (Kap. 6.6.4, S. 108). Für die Reaktion wurden 140 mg (0,61 mmol, 1 eq) Enamin (**63**) und 203 mg (0,96 mmol, 1, 5 eq) Pyrrolborsäure eingesetzt. Es wurden 58,2 mg (50 %) [Formyl-<sup>13</sup>C]-4-Methoxy-2,2'-bipyrrol-5-carboxyaldehyd (**62**) erhalten.



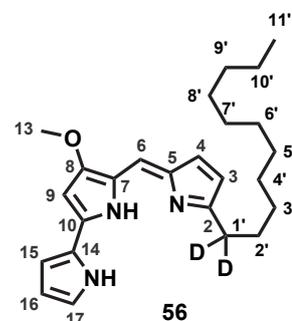
**<sup>1</sup>H-NMR** (DMSO-d<sub>6</sub>, 500 MHz)  $\delta$  (ppm): 3.82 (s, 3H), 6.11 (s, 1H), 6.26 (s, 1H), 6.74 (s, 1H), 6.89 (s, 1H), 9.29 (d,  $J_{C,H} = 170.5$  Hz, 1H), 11.23 (s, 1H), 11.41 (s, 1H)

**<sup>13</sup>C-NMR** (DMSO-d<sub>6</sub>, 125 MHz)  $\delta$  (ppm): 57.8, 90.9, 108.3, 109.3, 117.3, 120.3, 123.4,

133.2, 158.6, 171.6

### 6.6.9 Synthese von [1',1'-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-Undecylprodigiosin (**56**)

Zu 20 mg (0,13 mmol, 1eq.) 4-Methoxy-2,2'-bipyrrol-5-carboxaldehyd (**26**) und 30 mg (0,16 mmol, 1,125 eq.) [1',1'-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-2-Undecylpyrrol (**46**) in 10 ml trockenem Methanol wurden unter Argonatmosphäre 2 Tropfen konzentrierte Salzsäure gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 36 Stunden bei Raumtemperatur gerührt, das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und das Rohprodukt über Silicagel (2 % MeOH in Chloroform) gereinigt. [1',1'-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-Undecylprodigiosin (**56**) wurde in Chloroform gelöst und mehrfach gegen 1 M Salzsäure ausgeschüttelt. Es wurden 41,8 mg (75 %) des entsprechenden Hydrochlorids erhalten.



**ESI-MS/MS**,  $[M+H]^+ = 396,5$ ; rel. Kollisionsenergie 30 %;  $m/z$  (%)

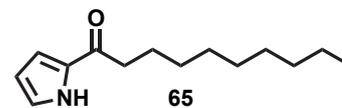
396 (1), 381 (100), 364 (10), 352 (4), 338 (4), 324 (3), 310 (5), 296 (3), 282 (3), 268 (2), 255 (12), 253 (24), 252 (10), 241 (25), 240 (72), 234 (6), 224 (7), 176 (2), 161 (7), 148 (2), 136 (3), 122 (3)

**<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz)**  $\delta$  (ppm): 0.88 (t,  $J = 6.8$  Hz, 3H, H-11'),  $\sim 1.26 - 1.43$  (m, 16H, H-3', H-4', H-5', H-6', H-7', H-8', H-9', H-10'), 1.77 (t,  $J = 7.3$  Hz, 2H, H-2'), 3.99 (s, 3H, H-13), 6.08 (s, 1H, H-9), 6.12 (t,  $J = 1.9$  Hz, 1H, H-16), 6.34 (s, 1H, H-3), 6.83 (s, 1H, H-4), 6.94 (s, 1H, H-15), 6.97 (m, 1H, H-6), 7.23 (s, 1H, H-17)

**<sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz)**  $\delta$  (ppm): 14.0 (C-11'), 22.6 (C-10'), 27.8 (C-1'), 29.0 (C-2'),  $\sim 29.3-31.8$  (C-2', C-3', C-4', C-5', C-6', C-7', C-8', C-9', C-10'), 58.8 (C-13), 93.0 (C-9), 111.9 (C-3), 112.4 (C-16), 116.2 (C-6), 117.8 (C-15), 121.3 (C-14), 122.0 (C-10), 125.9 (C-5), 127.3 (C-17), 129.1 (C-4), 148.7 (C-7), 152.83 (C-2), 166.1 (C-8)

### 6.6.10 Synthese von 2-Decanoylpyrrol (**65**)

Die Synthese von Decanoylpyrrol (**65**) erfolgte analog der Darstellung von Verbindung (**45**) mit Decansäure als Ausgangsstoff. Es wurden 460 mg (2,67 mmol, 1 eq.) Decansäure, 1,18 g (5,37 mmol, 2 eq.) 2,2-Dipyridyldisulfid, 1,4 g (5,37 mmol, 2 eq.) Triphenylphosphin in Toluol für 24 h unter Argonatmosphäre bei Raumtemperatur gerührt, bevor bei -78 °C langsam eine Pyrrolmagnesiumchlorid-Lösung zugetropft wurde, die aus 13,3 ml 2 M Ethylmagnesiumchlorid-Lösung (in THF) durch langsames Versetzen mit 1,86 ml (26,7 mmol, 10 eq.) Pyrrol dargestellt wurde. Nach 2 Stunden wurde die Reaktion durch Zugabe von 15 ml gesättigter Ammoniumchloridlösung aufgearbeitet. Es wurde dreimal mit 20 ml Diethylether extrahiert, die vereinigten organischen Phasen mit 10 ml 5 %iger (w/v) Kaliumcarbonatlösung, 10 ml Wasser und 10 ml gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen, anschließend über Natriumsulfat getrocknet und dann zur Trockne eingeeengt. Die Reinigung erfolgte durch Säulenchromatographie an Silicagel (10 % Ethylacetat in Hexan). 2-Decanoylpyrrol (**65**) wurde als weißer Feststoff erhalten (584 mg, 99 %).



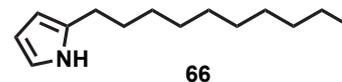
**EI-MS**  $m/z$  (%): 221 (16), 211 (1), 193 (1), 178 (2), 148 (2), 136 (1), 122 (20), 109 (100), 94 (55), 80 (3), 66 (12)

**<sup>1</sup>H-NMR** ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)  $\delta$  (ppm): 0.91 (t,  $J = 7.0$  Hz, 3H, H-10'),  $\sim 1.28 - 1.41$  (m, 12H, H-4', H-5', H-6', H-7', H-8', H-9'), 1.75 (m, 2H, H-3'), 2.79 (t,  $J = 7.6$  Hz, 2H, H-2'), 6.32 (m, 1H, H-3), 6.97 (m, 1H, H-2), 7.08 (m, 1H, H-4), 9.60 (b, NH)

**<sup>13</sup>C-NMR** ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz)  $\delta$  (ppm): 14.1 (C-10'), 22.7 (C-9'), 25.4 (C-3'), 29.3 (C-4'),  $\sim 29.5$  (C-5', C-6', C-7'), 31.9 (C-8'), 37.9 (C-2'), 110.8 (C-3), 116.5 (C-2), 124.8 (C-4), 132.6 (C-1), 191.0 (C-1')

### 6.6.11 Synthese von 2-Decylpyrrol (**66**)

Zu 115 mg (3 mmol, 6 eq.) Natriumborhydrid in 10 ml Isopropanol wurden unter Rückfluss 111 mg (0,5 mmol, 1eq.) Decoylpyrrol (**65**) gegeben und die Reaktionsmischung unter Rückfluss über Nacht gekocht. Anschließend wurde so viel Wasser zugegeben, bis sich das überschüssige Natriumborhydrid vollständig gelöst hatte. Es wurde mit je 20 ml Ethylacetat dreimal extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über Natriumsulfat gewaschen und zur Trockne eingengt. 54,6 mg, (53 %) 2-Decylpyrrol (**66**) wurden nach Säulenchromatographie an Silicagel (10 % Ethylacetat in Hexan) als weißer Feststoff erhalten.



**EI-MS**  $m/z$  (%): 207 (28), 192 (1), 178 (3), 164 (6), 150 (4), 136 (3), 122 (8), 106 (2), 94 (26), 80 (100)

**$^1\text{H-NMR}$**  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)  $\delta$  (ppm): 0.91 (t,  $J = 7.0$  Hz, 3H, H-10'),  $\sim 1.28 - 1.41$  (m, 12H, H-4', H-5', H-6', H-7', H-8', H-9'), 1.65 (m, 2H, H-3'), 2.62 (t,  $J = 7.6$  Hz, 2H, H-2'), 5.94 (m, 1H, H-3), 6.15 (m, 1H, H-2), 6.69 (m, 1H, H-4)

**$^{13}\text{C-NMR}$**  ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz)  $\delta$  (ppm): 14.1 (C-10'), 22.7 (C-9'), 27.7 (C-1'),  $\sim 29.3 - 29.7$  (C-2', C-3', C-4', C-5', C-6', C-7'), 31.9 (C-8'), 104.8 (C-3), 108.2 (C-4), 115.9 (C-5), 132.9 (C-2)

## 6.7 Fütterungsexperimente

Tabelle 6.3 gibt eine Übersicht über alle durchgeführten Fütterungsversuche. Die genauen Versuchsbedingungen sind in den folgenden Abschnitten beschrieben.

**Tabelle 6.3: Gefütterte Verbindungen**

Verbindung	Lösungs- mittel	gefüttert an	erfolgreicher Einbau
2-Undecylpyrrol (UP) ( <b>27</b> )	MeOH	<i>S. coelicolor</i> M145	x
[1',1'- <sup>2</sup> H <sub>2</sub> ]-Undecylpyrrol ( <b>46</b> )	MeOH	<i>S. coelicolor</i> M145 roter Phänotyp	x x
4-Methoxy-2,2'-bipyrrol-5-carboxyaldehyd ( <b>26</b> )	MeOH	<i>S. coelicolor</i> M145	
[ <i>Formyl</i> - <sup>13</sup> C]-4-Methoxy-2,2'-bipyrrol-5-carboxyaldehyd ( <b>62</b> )	MeOH	roter Phänotyp	x
2-Decylpyrrol ( <b>66</b> )	MeOH	roter Phänotyp	x
[1',1'- <sup>2</sup> H <sub>2</sub> ]-Undecylprodigiosin ( <b>56</b> )	MeOH	roter Phänotyp	x
[U- <sup>13</sup> C]-Glycin ( <b>59</b> )	H <sub>2</sub> O	roter Phänotyp	x
[ <i>Formyl</i> - <sup>13</sup> C, 1',1'- <sup>2</sup> H <sub>2</sub> ]-5-Undecylpyrrol-2-carboxyaldehyd ( <b>60</b> )	MeOH	<i>S. coelicolor</i> M145 roter Phänotyp	x
[ <sup>13</sup> C]-Methanol	-	roter Phänotyp	
[3- <sup>13</sup> C]-Serin ( <b>61</b> )	H <sub>2</sub> O	roter Phänotyp	x

### 6.7.1 Fütterung von 2-Undecylpyrrol (27) und [1',1'-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-2-Undecylpyrrol (46)

Zunächst wurde *S. coelicolor* M145 in 25 ml Glycerol-Medium (Kap. 6.1.1.2, S. 88) angeimpft und für einen Tag bei 28 °C und 220 rpm kultiviert. Anschließend wurden 1, 2 oder 5 mg in Methanol gelöstes 2-Undecylpyrrol (27) oder [1',1'-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-Undecylpyrrol (46), bzw. reines Methanol als Kontrolle steril zugegeben. Die weitere Kultivierung erfolgte für fünf Tage bei 28 °C und 220 rpm. Anschließend wurden Zellextrakte der Kulturen hergestellt (Kap. 6.3.1, S. 96) und per LC-MS vermessen (Methode A, Kap. 6.3, S. 94).

[1',1'-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-Undecylpyrrol (46) wurde ebenfalls an den roten Phänotyp gefüttert. Dazu wurde dieser angeimpft (Kap. 6.1.3, S. 90) und für ein bis zwei Tage kultiviert. Sofern eine schwache Rosafärbung der Kultur zu erkennen war oder aber spätestens nach zwei Tagen wurden 1, 2 oder 5 mg (UP-d<sub>2</sub>) (46) der Kultur steril zugesetzt. Reines Methanol diente wiederum als Kontrolle. Die weitere Kultivierung erfolgte bis zu einem Gesamtzeitraum von sieben Tagen. Die Zellextrakte (Kap. 6.3.1, S. 96) der Kulturen wurden per LC-ESI-MS (Methode A, Kap. 6.3, S. 94) vermessen.

### 6.7.2 Fütterung von 4-Methoxy-2,2'-bipyrrol-5-carboxyaldehyd (26)

4-Methoxy-2,2'-bipyrrol-5-carboxyaldehyd (26) wurde ebenfalls an *S. coelicolor* M145 in Glycerol-Medium (Kap. 6.1.1.2, S. 88) gefüttert. Zu 25 ml Kultur wurden nach einem Tag 1, 2 oder 5 mg 4-Methoxy-2,2'-bipyrrol-5-carboxyaldehyd (26) gegeben und die Kultivierung für sechs weitere Tage fortgesetzt. Die Analyse der Zellextrakte Kap. 6.3.1, S. 96 erfolgte per LC-ESI-MS (Methode A, Kap. 6.3, S. 94).

### 6.7.3 Fütterung von [Formyl-<sup>13</sup>C, 1',1'-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-5-Undecylpyrrol-2-carboxyaldehyd (60)

[Formyl-<sup>13</sup>C, 1',1'-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-5-Undecylpyrrol-3-carboxyaldehyd (60) wurde zunächst an *S. coelicolor* M145 in Glycerol-Medium (Kap. 6.1.1.2, S. 88) gefüttert. Dazu wurden zu einer einen Tag alten 25 ml Kultur 1, 2 oder 5 mg 2-Undecylpyrrol-4-carboxyaldehyd-<sup>13</sup>C (60) gegeben und die Kultivierung für sechs weitere Tage bei 28 °C und 220 rpm fortgesetzt. Anschließend wurden Zellextrakte (Kap. 6.3.1, S. 96) der Kulturen per LC-ESI-MS analysiert (Methode A, Kap. 6.3, S. 94).

[*Formyl*- $^{13}\text{C}$ ,  $1',1'-^2\text{H}_2$ ]-5-Undecylpyrrol-2-carboxyaldehyd (**60**) wurde außerdem an den roten Phänotyp gefüttert. Spätestens zwei Tage nach der Anzucht (Kap. 6.1.3, S. 90) wurden 1, 2 oder 5 mg des  $^{13}\text{C}$ -markierten Aldehyds (**60**) gefüttert. Nach insgesamt sieben Tagen wurden die Zellen mit Methanol extrahiert (Kap. 6.3.1, S. 96) und per LC-ESI-MS vermessen (Methode A, Kap. 6.3, S. 94).

#### 6.7.4 Fütterung von [ $1',1'-^2\text{H}_2$ ]-Undecylprodigiosin (**56**)

[ $1',1'-^2\text{H}_2$ ]-Undecylprodigiosin (**56**) wurde an den roten Phänotyp gefüttert. Dieser wurde dazu bei 28 °C und 220 rpm kultiviert (Kap. 6.1.3, S. 90). Nach 2 Tagen wurden 2 oder 5 mg ( $1',1'$ -Dideutero)undecylprodigiosin (**56**) zu 30 ml schwach rot gefärbter Kultur gegeben und die Kultivierung fortgesetzt. An Tag 3, 4, 5 und 7 wurde jeweils 500  $\mu\text{l}$  Kultur steril entnommen und der Zellextrakt (Kap. 6.3.1, S. 96) per LC-ESI-MS (Methode A, Kap. 6.3, S. 94) analysiert.

#### 6.7.5 Fütterung von 2-Decylpyrrol (**66**)

Die Fütterung von 5 oder 10 mg Decylpyrrol (**66**) erfolgte an eine zwei Tage alte Kultur des roten Phänotyps (Kap. 6.1.3, S. 90). Am Tag 3, 4 und 5 wurde steril 1 ml Kultur entnommen und der Zellextrakt (Kap. 6.3.1, S. 96) per LC-ESI-MS (Methode A, Kap. 6.3, S. 94) analysiert.

#### 6.7.6 Fütterung $^{13}\text{C}$ -markierter Aminosäuren

[U- $^{13}\text{C}_2$ ]-Glycin (**59**) und [ $3-^{13}\text{C}$ ]-Serin (**61**) wurden zunächst in Wasser gelöst und anschließend sterilfiltriert. 10 mg der markierten Aminosäure wurden zu einer zwei Tage alten Kultur des roten Phänotyps (Kap. 6.1.3, S. 90) gegeben. An den folgenden Tagen (3, 4 und 5) wurde jeweils 1 ml Kultur entnommen und per LC-ESI-MS (Methode A, Kap. 6.3, S. 94) analysiert.

### 6.7.7 Fütterung von $^{13}\text{C}$ -markiertem Methanol

Zu einer 30 ml Kultur des roten Phänotyps (Kap. 6.1.3, S. 90) wurden nach zwei Tagen 50, 100 oder 200  $\mu\text{l}$   $^{13}\text{C}$ -markiertes Methanol gegeben. An Tag 3, 4 und 5 wurde jeweils 1 ml Kultur entnommen und der Zellextrakt (Kap. 6.3.1, S. 96) per LC-ESI-MS (Methode A, Kap. 6.3, S. 94) analysiert.

### 6.7.8 Fütterung von [*Formyl*- $^{13}\text{C}$ ]-4-Methoxy-2,2'-bipyrrol-5-carboxyaldehyd (62)

$^{13}\text{C}$ -markiertes MBC (**62**) wurde an den roten Phänotyp gefüttert, sobald dieser eine schwache Rosafärbung der Kultur zeigte. Es wurden 5 und 10 mg der Verbindung (**62**) gelöst in Methanol gefüttert und der Einbau anhand von LC-ESI-MS (Methode A, Kap. 6.3, S. 94) in den Folgetagen analysiert.

## 6.8 Biomimetische Studien

### 6.8.1 Biomimetische Kupplungsversuche mit Hilfe von Trifluoressigsäure

Die Durchführung biomimetischer Reaktionen wird im Folgenden an einem Beispiel beschrieben. Alle Versuche sind im Anschluss in Tab. 6.4 angegeben. Verwendete Kupplungspartner waren: 2-Undecylpyrrol (**27**) und [ $1',1' \text{-}^2\text{H}_2$ ]-Undecylpyrrol (**46**) als Kupplungspartner A, sowie 5-Undecylpyrrol-2-carboxyaldehyd (UPA) (**58**) oder 4-Methoxy-2,2'-bipyrrol-5-carboxyaldehyd (**26**) als Kupplungspartner B.

Zusätzlich wurde 2-Ethylpyrrol (**77**) anstelle von 2-Undecylpyrrol (**27**) eingesetzt und Pyrrol-2-carboxyaldehyd (**74**) anstelle von 2-Undecylpyrrol-5-carboxyaldehyd (**58**) verwendet (siehe Tab. 6.4, unten).

Typischer Ansatz: Zu 15  $\mu\text{mol}$  Kupplungspartner A wurden 10  $\mu\text{mol}$  Kupplungspartner B gegeben und in 1 ml Methanol gelöst. Es wurde 1 Tropfen Trifluoressigsäure zugegeben und die Reaktionsmischung drei Tage bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend erfolgte die Analyse der Reaktionsprodukte durch LC-ESI-MS (Methode B, Kap. 6.3, S. 94).

**Tabelle 6.4: Biomimetische Reaktionen mit zwei Kupplungspartnern**

<b>Kupplungspartner A</b>	<b>Kupplungspartner B</b>
2-Undecylpyrrol ( <b>27</b> )	4-Methoxy-2,2'-bipyrrol-5-carboxyaldehyd ( <b>26</b> )
[1',1'- <sup>2</sup> H <sub>2</sub> ]-Undecylpyrrol ( <b>46</b> )	4-Methoxy-2,2'-bipyrrol-5-carboxyaldehyd ( <b>26</b> )
2-Undecylpyrrol ( <b>27</b> )	5-Undecylpyrrol-2-carboxyaldehyd ( <b>58</b> )
2-Undecylpyrrol ( <b>27</b> )	Pyrrol-2-carboxyaldehyd ( <b>74</b> )
2-Ethylpyrrol ( <b>77</b> )	Pyrrol-2-carboxyaldehyd ( <b>74</b> )
2-Ethylpyrrol ( <b>77</b> )	4-Methoxy-2,2'-bipyrrol-5-carboxyaldehyd ( <b>26</b> )
2-Ethylpyrrol ( <b>77</b> ) & 2-Undecylpyrrol ( <b>27</b> )	4-Methoxy-2,2'-bipyrrol-5-carboxyaldehyd ( <b>26</b> ) & Pyrrol-2-carboxyaldehyd ( <b>74</b> )

**6.8.1.1 Weitere Biomimetische Kupplungen mit [1',1'-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-Undecylpyrrol (**46**)**

Weitere biomimetische Kupplungen wurden mit [1',1'-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-Undecylpyrrol (**46**) als einzigem Kupplungspartner durchgeführt. Dazu wurden 10  $\mu$ mol [1',1'-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-Undecylpyrrol (**46**) unter den in Tabelle Tab. 6.5 angegebenen Bedingungen in verschiedenen Lösungsmitteln (1 ml) und mit verschiedenen Zusätzen (60  $\mu$ l) für drei Tage bei Raumtemperatur gerührt.

**Tabelle 6.5: Biomimetische Reaktionen mit Undecylpyrrol (**27**) als einzigem Kupplungspartner**

<b>Lösungsmittel</b> <b>(1 ml)</b>	<b>Zusatz (60 <math>\mu</math>l)</b>
Methanol	HCHO
Methanol	HCOOH
Methanol	H <sup>13</sup> COOH
Acetonitril	TFA
Toluol	TFA
<sup>13</sup> C-Methanol	TFA

### 6.8.2 Biomimetische Studien unter Radikalstress

Zunächst wurden die folgenden Ansätze für 24 Stunden bei Raumtemperatur in dreifacher Ausführung inkubiert: 10  $\mu\text{g}$  Prodigiosin oder Coeligiosin wurden dabei in 200  $\mu\text{l}$  Methanol/Wasser (v/v, 1:10) gelöst und mit  $[1',1'-^2\text{H}_2]$ -Undecylpyrrol (**46**) (10  $\mu\text{mol}$  in 10  $\mu\text{l}$  MeOH) und 2  $\mu\text{l}$  einer 0,71 M  $\text{CoSO}_4$ -Lösung versetzt. Ansatz A wurde 10  $\mu\text{l}$  Wasser, Ansatz B 10  $\mu\text{l}$  1 M HCl und Ansatz C 10  $\mu\text{l}$  1 M NaOH zugesetzt.

Im Anschluss wurden alle Ansätze per LC-ESI-MS (Methode A, Kap. 6.3, S. 94) analysiert. Anschließende Versuche wurden mit Streptorubin B (**14**) ( $c = 50 \mu\text{g}/\text{ml}$  in Methanol/Wasser (v/v, 1:10)) und 2-Undecylpyrrol (**27**) ( $c = 1 \text{ mg}/\text{ml}$  in MeOH) durchgeführt. Versuchsbedingungen sind in Tab. 6.6 angegeben.

Tabelle 6.6: Biomimetische Studien unter Radikalstress

Streptorubin B	Undecylpyrrol	Kobalt(II)sulfat [0,71 M]	$\text{H}_2\text{O}_2$ [30 %]
200 $\mu\text{l}$	10 $\mu\text{l}$	-	-
200 $\mu\text{l}$	10 $\mu\text{l}$	2 $\mu\text{l}$	-
200 $\mu\text{l}$	10 $\mu\text{l}$	2 $\mu\text{l}$	2 $\mu\text{l}$

## 6.9 Bestimmung der Eigenschaften einiger Prodigiosine und Coeligiosine

### 6.9.1 UV/VIS-Spektroskopie

UV/VIS-Spektren der in Methanol gelösten Prodigiosine und Coeligiosine wurden an einem Jasco V550 Spektrometer aufgenommen. Die verwendeten Konzentrationen sind direkt bei den abgebildeten UV/VIS-Spektren angegeben.

### 6.9.2 Zirkulardichroismus-Spektroskopie (*circular dichroism*, CD)

CD-Spektren der in Methanol gelösten Verbindungen wurden an einem Jasco J810 aufgenommen. Die verwendeten Konzentrationen sind direkt bei den abgebildeten CD-Spektren angegeben.

### 6.9.3 Komplexierung von Kobalt- und Kupfer-Ionen

Es wurden 1 ml Undecylprodigiosin (**13**), Streptorubin B (**14**) und Coeligiosin B (**34**) ( $10 \mu\text{M}$  in MeOH) in einer UV-Küvette mit  $10 \mu\text{l}$  einer 1 M Kobalt(II)- oder Kupfer(II)acetat-Lösung versetzt und das Absorptionsspektrum nach fünfminütiger Inkubation gemessen. Im Anschluss wurde die Lösung direkt in das LTQ-Massenspektrometer (Thermo Fisher) injiziert, durch Elektrosprayionisation (ESI) im positiven Modus ionisiert und das entsprechende Massenspektrum aufgenommen.

### 6.9.4 Radikalfänger-Test nach Re *et al.* [94]

Zunächst wurde das ABTS-Radikal aus 2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzothiazolin)-6-sulfonsäure (ABTS) hergestellt. Dazu wurden zu 38,4 mg ( $70 \mu\text{mol}$ ) ABTS in 10 ml Wasser 66,23 mg ( $245 \mu\text{mol}$ ) Kaliumpersulfat geben. Die entstandene dunkelgrüne Lösung wurde über Nacht unter Lichtausschluss aufbewahrt. Am nächsten Tag wurde die ABTS-Radikal-Lösung so verdünnt, dass  $\lambda_{734} = 0,7 \pm 0,02$  betrug.

Zu je 1 ml verdünnter ABTS-Lösung wurden  $10 \mu\text{l}$  einer 2,5 mM Prodigiosin-Lösung gegeben, die Probe zügig gemischt und die Absorption über 5 Minuten detektiert. Als Referenz wurden  $10 \mu\text{l}$  einer  $250 \mu\text{M}$  Trolox-Lösung (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carbonsäure (**42**)) eingesetzt.

Alle Messungen wurden am Jasco V550 Spektrometer durchgeführt.

### 6.9.5 DNA-cleavage Assay nach Melvin *et al.* [91]

Für den Test wurden die Lösungen wie in Tab. 6.7 vereinigt (Angabe jeweils in  $\mu\text{l}$ ). Die Ansätze **1** - **3** wurden als Kontrollen gewählt und enthielten nur Plasmid-DNA (**Ansatz 1**), nur Plasmid-DNA und Undecylprodigiosin (**13**) oder Coeligiosin B (**34**) (**Ansatz 2**) oder nur Plasmid-DNA und Kupfer(II)acetat (**Ansatz 3**). Die Kontrollansätze wurden für 300 Minuten bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Die Ansätze **4** - **12** enthielten Plasmid-DNA, Undecylprodigiosin oder Coeligiosin B und Kupfer(II)acetat. Sie wurden für 0, 10, 20, 30, 40, 60, 90, 180 oder 300 Minuten (**4** - **12**) bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Die Reaktionen wurde nach gegebener Zeit durch Zugabe von  $4 \mu\text{l}$  6x Loading Dye abgestoppt und alle Ansätze im Anschluss auf einem 0,7 %igem Agarosegel analysiert (Kap. 6.9.5.1, S. 122).



0,7 g Agarose wurden in 100 ml 1x TAE-Puffer durch Erhitzen in der Mikrowelle (800 W) gelöst. Nach Abkühlen der Lösung auf etwa 50 °C wurde 1 µl Ethidiumbromid zugeben und die Lösung in eine Gelform gegossen. Nach vollständiger Polymerisierung wurde das Gel in eine mit 1x TAE-Puffer gefüllte Gelelektrophorese-Kammer gelegt und die Taschen mit den Ansätzen des Assays befüllt. Die Trennung der DNA erfolgte für 45 min bei 120 V und 300 mA. Anschließend wurde das Gel unter UV-C-Licht analysiert und dokumentiert.

### **6.9.6 Testung auf antiproliferative und zytotoxische Eigenschaften von Coeligiosin B**

Der Test auf antiproliferative und zytotoxische Eigenschaften von Undecylprodigiosin (**13**), Streptorubin B StreptorubinB und Coeligiosin B wurde freundlicherweise am Hans-Knöll-Institut durch Dr. Hans-Martin Dahse durchgeführt. Der Test auf antiproliferative Eigenschaften wurde an humanen Endothelzellen (HUVEC - *human umbilical vein endothelial cells*), sowie der humanen Leukämiezelllinie K-562 durchgeführt. Die Zytotoxizität wurde an Zervixkarzinom-Zellen (Gebärmutterhalskrebs, HeLa - *Henrietta Lacks*) bestimmt.

## **6.10 Untersuchungen zur Genregulation im roten Phänotyp**

### **6.10.1 RNA-Isolation**

Zur RNA Isolation wurden drei Kolben *S. coelicolor* M145 und neun Kolben des roten Phänotyps standardmäßig angezogen (Kap. 6.1.1.1, S. 88, Kap. 6.1.2, S. 90). Über einen Zeitraum von 10 Tagen wurden täglich 2 ml jeder Kultur steril entnommen, abzentrifugiert und das Zellpellet mit dem Precellys Homogenisator (5000 x g, 3 x 20 sec, 15 sec Pause) bei -20 °C homogenisiert und anschließend in 300 µl *Tissue and Cell Lysis Solution* des MasterPure™ Complete DNA and RNA Purification Kit (Epicentre) resuspendiert. Die weitere RNA-Präparation erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die RNA wurde in 50 µl RNase freiem TE-Puffer gelöst und bei -80 °C gelagert. Die Kontrolle von Qualität und Reinheit erfolgte am Nanodrop durch Bestimmung der Absorptionswerte bei 260 und 280 nm.

**TE-Puffer**

Tris	10	mM
EDTA	1	mM
pH 8,0 mit HCl		
in ent. Wasser		

**6.10.2 cDNA-Synthese**

Die Synthese von cDNA erfolgte mit dem Omniscript Reverse Transcription Kit der Firma Qiagen gemäß dem Protokoll des Herstellers und random Primern. Es wurden dabei für die reverse Transkription von jeder Probe 2  $\mu\text{g}$  RNA für die Synthese eingesetzt.

**6.10.3 Quantitative real time PCR (qPCR)**

Die erzeugte cDNA (Kap. 6.10.2, S. 124) wurde um den Faktor 5 verdünnt und 1  $\mu\text{l}$  gemeinsam mit dem Brilliant II SYBR<sup>TM</sup> Green QPCR Master Mix (Agilent) nach Herstellerangaben, sowie für die zu untersuchenden Gene spezifischen Primern (Tab. 6.8) für die qPCR eingesetzt:

SYBR <sup>TM</sup> Green	12,5	$\mu\text{l}$
Wasser	10,525	$\mu\text{l}$
vorwärts Primer	0,3	$\mu\text{l}$
rückwärts Primer	0,3	$\mu\text{l}$
ROX <sup>TM</sup> (1:500)	0,375	$\mu\text{l}$

Es wurde der Mx3005P der Firma Stratagene zur Durchführung der qPCR genutzt. Reaktionen wurden in zweifacher Ausführung in 96-well Platten durchgeführt und entsprechende Kontrollen, wie Ansätze ohne cDNA (Ausschluss von Verunreinigungen durch genomische DNA in den eingesetzten Reagenzien) oder ohne Primer (Ausschluss von Dimer-Bildung der Primerpaare), eingeschlossen. Das verwendete Temperaturprogramm bestand zunächst aus vollständiger Denaturierung der DNA für 10 Minuten bei 95 °C, danach folgten 40 Zyklen bestehend aus Aufschmelzen der DNA bei 95 °C (30 sec), Primer-Hybridisierung bei 60 °C (30 sec) und Amplifikation der DNA-Fragmente bei 72 °C (60 sec). Abschließend erfolgte das langsame Aufschmelzen der DNA von 60 °C auf 95°C zur Schmelzpunktanalyse. Fluoreszenz-Messungen wurden am Ende jeder Annealing- und Amplifikations-Phase in jedem Zyklus

durchgeföhrt, sowie während der gesamten Schmelzpunktanalyse.

Die Auswertung der Daten erfolgte über die  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode mit *sco3874*, der DNA Gyrase Untereinheit B (*gyrB*) von *S. coelicolor* und *sco1321*, dem Elongationsfaktor TU (*eftu*) von *S. coelicolor* als Referenzgene (*housekeeping genes*). Dadurch wurde für jede Probe eine relative Genregulation in Bezug auf die stabilen Referenzgene erhalten, wodurch ein Vergleich zwischen verschiedenen Proben möglich wurde. Für den Vergleich zwischen der Genexpression von Wildtyp und rotem Phänotyp von *S. coelicolor* wurde die Expression der verschiedenen Gene im Wildtyp jeweils auf einen Wert von 1 normalisiert. Für die statistische Auswertung wurden die normierten Werte aller Replikate gebildet und anschließend ein Signifikanztest zwischen Wildtyp und rotem Phänotyp nach Mann-Whitney-U durchgeföhrt.

**Tabelle 6.8: Für die real time PCR verwendete Primer.** Angegeben sind die jeweils spezifischen vorwärts und rückwärts Primer der einzelnen Gene für die qPCR

Gen	vorwärts Primer	rückwärts Primer
<i>gyrB</i>	TCGCTGATCAACAAGTACGC	GCTCGTAGACGACCTTCTGG
<i>sco1321</i>	AGCACCACCCAGTACGTTTC	CCGGTGACCATGTTCTTGAC
<i>redD</i>	GCTACCTGCTGGAGATCGAC	GAACATCGCGCTGATGAGAT
<i>redZ</i>	AAACGTCGGTCGAAGAAGT	GTCTTGCCCTGGGTCAGTAA
<i>redN</i>	ACATGCTGCACAAGGAAGT	ACGATGCTCATGTGGTTGAG
<i>redL</i>	TGGAGCACGTGTACGACTTC	CATCTGGAGATCGGCGTAGT
<i>sco5962</i>	ACGTGATCGAGGAGATGACC	AGATCTCCGCACGCCTGT
<i>cbiM</i>	CACCATCACGCTGCTCTTC	GTGACGCAGTACGTGGACAG

## 7 Literaturverzeichnis

- [1] W. H. Stewart. *The office of the Public Health Service Historian. Frequently Asked Questions. US Public Health Service. Office of the librarian 2006.*
- [2] J. Lederberg. *Senate Hatch Provision Speech, May 7th, 2007, 2007.*
- [3] A. Fleming. On the antibacterial action of cultures of a *Penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. *British Journal of Experimental Pathology*, 10:226–236, 1929.
- [4] R. J. White. *The Early History of Antibiotic Discovery: Empiricism Ruled. Antibiotic Discovery and Development, Vols 1 and 2.* Springer, New York, 2012.
- [5] S. A. Waksman. What is an antibiotic substance. *Mycologia*, 39:565–569, 1947.
- [6] Kieser T., Bibb M. J., Buttner M. J., Chater K. F., and Hopwood D. A. *Practical Streptomyces Genetics.* John Innes Foundation, 2000.
- [7] M. G. Watve, R. Tickoo, M. M. Jog, and B. D. Bhole. How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*? *Archives of Microbiology*, 176:386–390, 2001.
- [8] A. J. McCarthy and S. T. Williams. Actinomycetes as agents of biodegradation in the environment - a review. *Gene*, 115:189–192, 1992.
- [9] D. A. Hopwood. *Streptomyces in Nature and Medicine: The Antibiotic Makers.* Oxford Univ. Pr., 2007.
- [10] A. M. Glauert and D. A. Hopwood. Fine structure of *Streptomyces violaceoruber* (*S. coelicolor*) 3. walls of mycelium and spores. *Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*, 10:505–516, 1961.
- [11] K. F. Chater and M. J. Merrick. *STREPTOMYCETES.* Parish, J. H. 1979.
- [12] K. F. Chater and D. A. Hopwood. *Streptomyces. Bacillus subtilis and other gram-positive bacteria: Biochemistry, physiology and molecular genetics.* American Society for Microbiology (ASM) a, Books Division, 1325 Massachusetts Ave. NW, Washington, DC 20005-4171, USA, 1993.
- [13] J. N. Volff and J. Altenbuchner. A new beginning with new ends: linearisation of circular chromosomes during bacterial evolution. *Fems Microbiology Letters*, 186:143–150, 2000.
- [14] F. R. Blattner, G. Plunkett, C. A. Bloch, N. T. Perna, V. Burland, M. Riley, J. ColladoVides, 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, and Y. Shao. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science*, 277:1453–1462, 1997.
- [15] M. Nett, H. Ikeda, and B. S. Moore. Genomic basis for natural product biosynthetic diversity in the actinomycetes. *Natural Product Reports*, 26:1362–1384, 2009.

- 
- [16] P. Leblond and B. Decaris. New insights into the genetic stability of *Streptomyces*. *Fems Microbiology Letters*, 123:225–232, 1994.
- [17] E. Grohmann, G. Muth, and M. Espinosa. Conjugative plasmid transfer in gram-positive bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67:277–301, 2003.
- [18] M. J. Bibb, J. M. Ward, T. Kieser, S. N. Cohen, and D. A. Hopwood. Excision of chromosomal DNA-Sequences from *Streptomyces coelicolor* forms a novel family of plasmids detectable in *Streptomyces lividans*. *Molecular & General Genetics*, 184:230–240, 1981.
- [19] M. J. Bibb. Regulation of secondary metabolism in streptomycetes. *Current Opinion in Microbiology*, 8:208–215, 2005.
- [20] R. Chakraborty and M. Bibb. The ppGpp synthetase gene (*relA*) of *Streptomyces coelicolor* A3(2) play's a conditional role in antibiotic production and morphological differentiation. *Journal of Bacteriology*, 179:5854–5861, 1997.
- [21] J. F. Martin. Phosphate control of the biosynthesis of antibiotics and other secondary metabolites is mediated by the PhoR-PhoP system: an unfinished story. *Journal of Bacteriology*, 186:5197–5201, 2004.
- [22] X. Lin, R. Hopson, and D. E. Cane. Genome mining in *Streptomyces coelicolor*: Molecular cloning and characterization of a new sesquiterpene synthase. *Journal of the American Chemical Society*, 128:6022–6023, 2006.
- [23] C. Corre, L. J. Song, S. O'Rourke, K. F. Chater, and G. L. Challis. 2-Alkyl-4-hydroxymethylfuran-3-carboxylic acids, antibiotic production inducers discovered by *Streptomyces coelicolor* genome mining. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105:17510–17515, 2008.
- [24] T. Lincke, S. Behnken, K. Ishida, M. Roth, and C. Hertweck. Closthioamide: An Unprecedented Polythioamide Antibiotic from the Strictly Anaerobic Bacterium *Clostridium cellulolyticum*. *Angewandte Chemie-International Edition*, 49:2011–2013, 2010.
- [25] G. Haferburg, I. Groth, U. Mollmann, E. Kothe, and I. Sattler. Arousing sleeping genes: shifts in secondary metabolism of metal tolerant actinobacteria under conditions of heavy metal stress. *Biomaterials*, 22:225–234, 2009.
- [26] G. Haferburg and E. Kothe. Microbes and metals: interactions in the environment. *Journal of Basic Microbiology*, 47:453–467, 2007.
- [27] Y. Tanaka, T. Hosaka, and K. Ochi. Rare earth elements activate the secondary metabolite-biosynthetic gene clusters in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Journal of Antibiotics*, 63:477–481, 2010.
- [28] J. E. Conn. The pigment production of *Actinomyces coelicolor* and *A. violaceus-ruber*. *Journal of Bacteriology*, 46:133–149, 1943.
- [29] L. F. Wright and D. A. Hopwood. Actinorhodin is a chromosomally-determined antibiotic in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Journal of General Microbiology*, 96:289–297, 1976.
- [30] B. A. M. Rudd and D. A. Hopwood. A pigmented mycelial antibiotic in *Streptomyces coelicolor* - control by a chromosomal gene cluster. *Journal of General Microbiology*, 119:333–340, 1980.

- [31] J. S. Feitelson, F. Malpartida, and D. A. Hopwood. Genetic and biochemical characterization of the red gene cluster of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Journal of General Microbiology*, 131:2431–2441, 1985.
- [32] D. A. Hopwood. The Leeuwenhoeck Lecture, 1987 - Towards an understanding of gene switching in *Streptomyces*, the basis of sporulation and antibiotic production. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, 235:121–138, 1988.
- [33] 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, and D. A. Hopwood. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature*, 417:141–147, 2002.
- [34] S. D. Bentley, S. Brown, L. D. Murphy, D. E. Harris, M. A. Quail, J. Parkhill, B. G. Barrell, J. R. McCormick, R. I. Santamaria, R. Losick, M. Yamasaki, H. Kinashi, C. W. Chen, G. Chandra, D. Jakimowicz, H. M. Kieser, T. Kieser, and K. F. Chater. SCP1, a 356 023 bp linear plasmid adapted to the ecology and developmental biology of its host, *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Molecular Microbiology*, 51:1615–1628, 2004.
- [35] I. Haug, A. Weissenborn, D. Brolle, S. Bentley, T. Kieser, and J. Altenbuchner. *Streptomyces coelicolor* A3(2) plasmid SCP2\*: deductions from the complete sequence. *Microbiology-Sgm*, 149:505–513, 2003.
- [36] H. Brockmann and E. Hieronymus. Ueber Actinomycetenfarbstoffe 5. Zur Konstitution des Actinorhodins. *Chemische Berichte-Recueil*, 88:1379–1390, 1955.
- [37] L. V. Bystrykh, M. A. FernandezMoreno, J. K. Herrema, F. Malpartida, D. A. Hopwood, and L. Dijkhuizen. Production of actinorhodin-related "blue pigments" by *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Journal of Bacteriology*, 178:2238–2244, 1996.
- [38] S. W. Tsao, B. A. M. Rudd, X. G. He, C. J. Chang, and H. G. Floss. Identification of a red pigment from *Streptomyces coelicolor* A3(2) as a mixture of prodigiosin derivatives. *Journal of Antibiotics*, 38:128–131, 1985.
- [39] C. Kempter, D. Kaiser, S. Haag, G. Nicholson, V. Gnau, T. Walk, K. H. Gierling, H. Decker, H. Zahner, G. Jung, and J. W. Metzger. CDA: Calcium-dependent peptide antibiotics from *Streptomyces coelicolor* A3(2) containing unusual residues. *Angewandte Chemie-International Edition in English*, 36:498–501, 1997.
- [40] J. H. Lakey, E. J. A. Lea, B. A. M. Rudd, H. M. Wright, and D. A. Hopwood. A new channel-forming antibiotic from *Streptomyces coelicolor* A3(2) which requires calcium for its activity. *Journal of General Microbiology*, 129:3565–3573, 1983.
- [41] J. Y. Jiang, X. F. He, and D. E. Cane. Geosmin biosynthesis. *Streptomyces coelicolor* germacradienol/germacrene D synthase converts farnesyl diphosphate to geosmin. *Journal of the American Chemical Society*, 128:8128–8129, 2006.

- [42] C. Wang and D. E. Cane. Biochemistry and molecular genetics of the biosynthesis of the earthy odorant methylisoborneol in *Streptomyces coelicolor*. *Journal of the American Chemical Society*, 130:8908–8909, 2008.
- [43] G. Hobbs, C. M. Frazer, D. C. J. Gardner, F. Flett, and S. G. Oliver. Pigmented antibiotic production by *Streptomyces coelicolor* A3(2) - Kinetics and the influence of nutrients. *Journal of General Microbiology*, 136:2291–2296, 1990.
- [44] M. Bibb. The regulation of antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Microbiology-Uk*, 142:1335–1344, 1996.
- [45] K. Kawai, G. Wang, S. Okamoto, and K. Ochi. The rare earth, scandium, causes antibiotic overproduction in *Streptomyces* spp. *Fems Microbiology Letters*, 274:311–315, 2007.
- [46] B. Sevcikova and J. Kormanec. Differential production of two antibiotics of *Streptomyces coelicolor* A3(2), actinorhodin and undecylprodigiosin, upon salt stress conditions. *Archives of Microbiology*, 181:384–389, 2004.
- [47] J. W. Bennett and R. Bentley. Seeing red: The story of prodigiosin. *Advances in Applied Microbiology*, Vol 47, 47:1–32, 2000.
- [48] N. R. Williamson, P. C. Fineran, T. Gristwood, S. R. Chawrai, F. J. Leeper, and G. P. C. Salmond. Anticancer and immunosuppressive properties of bacterial prodiginines. *Future Microbiology*, 2:605–618, 2007.
- [49] N. N. Gerber. Prodigiosin-like pigments. *Critical Reviews in Microbiology*, 3:469–486, 1975.
- [50] N. N. Gerber. Prodigiosin-like pigments from *Actionomadura (Nocardia) pelletieri*. *Journal of Antibiotics*, 24:636–641, 1971.
- [51] G. Park, J. T. Tomlinson, M. S. Melvin, M. W. Wright, C. S. Day, and R. A. Manderville. Zinc and copper complexes of prodigiosin: Implications for copper-mediated double-strand DNA cleavage. *Organic Letters*, 5:113–116, 2003.
- [52] J. Magae, M. W. Miller, K. Nagai, and G. M. Shearer. Effect of metacycloprodigiosin, an inhibitor of killer T cells, on murine skin and heart transplants. *Journal of Antibiotics*, 49:86–90, 1996.
- [53] T. Azuma, N. Watanabe, H. Yagisawa, K. Hirata, M. Iwamura, and Y. Kobayashi. Induction of apoptosis of activated murine splenic T cells by cycloprodigiosin hydrochloride, a novel immunosuppressant. *Immunopharmacology*, 46:29–37, 2000.
- [54] M. H. Lee, T. Kataoka, N. Honjo, J. Magae, and K. Nagai. In vivo rapid reduction of alloantigen-activated CD8(+) mature cytotoxic T cells by inhibitors of acidification of intracellular organelles, prodigiosin 25-C and concanamycin B. *Immunology*, 99:243–248, 2000.
- [55] A. Nakamura, J. Magae, R. F. Tsuji, M. Yamasaki, and K. Nagai. Suppression of cyto-toxic T-cell induction invivo by prodigiosin 25-C. *Transplantation*, 47:1013–1016, 1989.

- [56] R. F. Tsuji, J. Magae, M. Yamashita, K. Nagai, and M. Yamasaki. Immunomodulating properties of prodigiosin 25-C, an antibiotic which preferentially suppresses induction of cytotoxic T-cells. *Journal of Antibiotics*, 45:1295–1302, 1992.
- [57] M. Isaka, A. Jaturapat, J. Kramyu, M. Tanticharoen, and Y. Thebtaranonth. Potent in vitro antimalarial activity of metacycloprodigiosin isolated from *Streptomyces spectabilis* BCC 4785. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46:1112–1113, 2002.
- [58] S. Trudel, Z. H. Li, J. Rauw, R. E. Tiedemann, X. Y. Wen, and A. K. Stewart. Pre-clinical studies of the pan-Bcl inhibitor obatoclax (GX015-070) in multiple myeloma. *Blood*, 109:5430–5438, 2007.
- [59] H. Laatsch, M. Kellner, and H. Weyland. Butyl-meta-cycloheptylprodiginine - a revision of the structure of the former ortho-isomer. *Journal of Antibiotics*, 44:187–191, 1991.
- [60] A. Furstner, H. Szillat, B. Gabor, and R. Mynott. Platinum- and acid-catalyzed enyne metathesis reactions: Mechanistic studies and applications to the syntheses of streptorubin B and metacycloprodigiosin. *Journal of the American Chemical Society*, 120:8305–8314, 1998.
- [61] H. H. Wasserman, R. J. Sykes, P. Peverada, and C. K. Shaw. Biosynthesis of prodigiosin - incorporation of C-13 labeled alanine, proline, glycine and serine elucidated by fourier transform nuclear magnetic resonance. *Journal of the American Chemical Society*, 95:6874–6875, 1973.
- [62] H. H. Wasserman, C. K. Shaw, R. J. Sykes, and R. J. Cushley. Biosynthesis of prodigiosin 3. C-13 fourier transform NMR 20. biosynthesis of metacycloprodigiosin and undecylprodigiosin. *Tetrahedron Letters*, pages 2787–2790, 1974.
- [63] N. N. Gerber, A. G. McInnes, D. G. Smith, J. A. Walter, J. L. C. Wright, and L. C. Vining. Biosynthesis of prodiginines carbon-13 resonance assignments and enrichment patterns in nonyl prodiginine cyclo nonyl prodiginine methylcyclodecyl prodiginine and butylcycloheptyl prodiginine produced by actinomycete cultures supplemented with carbon-13 labeled acetate and nitrogen-15 labeled nitrate. *Canadian Journal of Chemistry*, 56:1155–1163, 1978.
- [64] J. S. Feitelson and D. A. Hopwood. Cloning of a *Streptomyces* gene for an O-methyltransferase involved in antibiotic biosynthesis. *Molecular & General Genetics*, 190:394–398, 1983.
- [65] F. Malpartida, J. Niemi, R. Navarrete, and D. A. Hopwood. Cloning and expression in a heterologous host of the complete set of genes for biosynthesis of the *Streptomyces coelicolor* antibiotic undecylprodigiosin. *Gene*, 93:91–99, 1990.
- [66] A. M. Cerdano, M. J. Bibb, and G. L. Challis. Analysis of the prodiginine biosynthesis gene cluster of *Streptomyces coelicolor* A3(2): new mechanisms for chain initiation and termination in modular multienzymes. *Chemistry & Biology*, 8:817–829, 2001.
- [67] S. W. Haynes, P. K. Sydor, A. E. Stanley, L. J. Song, and G. L. Challis. Role and substrate specificity of the *Streptomyces coelicolor* RedH enzyme in undecylprodiginine biosynthesis. *Chemical Communications*, pages 1865–1867, 2008.

- [68] A. E. Stanley, L. J. Walton, M. K. Zerikly, C. Corre, and G. L. Challis. Elucidation of the *Streptomyces coelicolor* pathway to 4-methoxy-2,2'-bipyrrrole-5-carboxaldehyde, an intermediate in prodiginine biosynthesis. *Chemical Communications*, pages 3981–3983, 2006.
- [69] S. Mo, P. K. Sydor, C. Corre, M. M. Alhamadsheh, A. E. Stanley, S. W. Haynes, L. Song, K. A. Reynolds, and G. L. Challis. Elucidation of the *Streptomyces coelicolor* pathway to 2-undecylpyrrole, a key intermediate in undecylprodiginine and streptorubin B biosynthesis. *Chemistry & Biology*, 15:137–148, 2008.
- [70] J. R. Whicher, G. Florova, P. K. Sydor, R. Singh, M. Alhamadsheh, G. L. Challis, K. A. Reynolds, and J. L. Smith. Structure and Function of the RedJ Protein, a Thioesterase from the Prodiginine Biosynthetic Pathway in *Streptomyces coelicolor*. *Journal of Biological Chemistry*, 286:22558–22569, 2011.
- [71] P. K. Sydor, S. M. Barry, O. M. Odulate, F. Barona-Gomez, S. W. Haynes, C. Corre, L. J. Song, and G. L. Challis. Regio- and stereodivergent antibiotic oxidative carbocyclizations catalysed by Rieske oxygenase-like enzymes. *Nature Chemistry*, 3:388–392, 2011.
- [72] K. E. Narva and J. S. Feitelson. Nucleotide sequence and transcriptional analysis of the redD locus of *Streptomyces coelicolor* A3(2)N. *Journal of Bacteriology*, 172:326–333, 1990.
- [73] E. Takano, H. C. Gramajo, E. Strauch, N. Andres, J. White, and M. J. Bibb. Transcriptional regulation of the redD transcriptional activator gene accounts for growth phase dependent production of the antibiotic undecylprodigiosin in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Molecular Microbiology*, 6:2797–2804, 1992.
- [74] J. White and M. Bibb. bldA dependence of undecylprodigiosin production in *Streptomyces coelicolor* A3(2) involves a pathway-specific regulatory cascade. *Journal of Bacteriology*, 179:627–633, 1997.
- [75] S. W. Haynes. *Mutasynthesis approaches to the preparation of streptorubin B analogues*. PhD Thesis, 2010.
- [76] N. R. Williamson, H. T. Simonsen, R. A. A. Ahmed, G. Goldet, H. Slater, L. Woodley, F. J. Leeper, and G. P. C. Salmond. Biosynthesis of the red antibiotic, prodigiosin, in *Serratia*: identification of a novel 2-methyl-3-n-amylopyrrole (MAP) assembly pathway, definition of the terminal condensing enzyme, and implications for undecylprodigiosin biosynthesis in *Streptomyces*. *Molecular Microbiology*, 56:971–989, 2005.
- [77] N. R. Williamson, P. C. Fineran, F. J. Leeper, and G. P. C. Salmond. The biosynthesis and regulation of bacterial prodiginines. *Nature Reviews Microbiology*, 4:887–899, 2006.
- [78] M. G. Thomas, M. D. Burkart, and C. T. Walsh. Conversion of L-proline to pyrrolyl-2-carboxyl-S-PCP during undecylprodigiosin and pyoluteorin biosynthesis. *Chemistry & Biology*, 9:171–184, 2002.
- [79] S. Mo, B. S. Kim, and K. A. Reynolds. Production of branched-chain alkylprodiginines in *S. coelicolor* by replacement of the 3-ketoacyl ACP synthase III initiation enzyme, RedP. *Chemistry & Biology*, 12:191–200, 2005.

- [80] W. P. Reville, M. J. Bibb, A. K. Scheu, H. J. Kieser, and D. A. Hopwood. beta-ketoacyl acyl carrier protein synthase III (FabH) is essential for fatty acid biosynthesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Journal of Bacteriology*, 183:3526–3530, 2001.
- [81] B. Kauppi, K. Lee, E. Carredano, R. E. Parales, D. T. Gibson, H. Eklund, and S. Ramaswamy. Structure of an aromatic-ring-hydroxylating dioxygenase-naphthalene 1,2-dioxygenase. *Structure with Folding & Design*, 6:571–586, 1998.
- [82] A. Behrend. *Induktion von veraenderten Metabolitenprofilen in Streptomycceten durch Umweltfaktoren: Kokultivierung von Streptomyces avermitilis und Pseudomonas fluorescens und von Streptomyces coelicolor unter Schwermetallionenstress*. Doktorarbeit, 2010.
- [83] A. Abbas and C. Edwards. Effects of metals on a range of *Streptomyces* species. *Applied and Environmental Microbiology*, 55:2030–2035, 1989.
- [84] 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, and E. Vanotti. Synthesis and immunosuppressive activity of novel prodigiosin derivatives. *Journal of Medicinal Chemistry*, 43:2557–2565, 2000.
- [85] B. Jolicoeur and W. D. Lubell. Prodigiosin synthesis with electron rich 2,2'-bipyrroles. *Canadian Journal of Chemistry-Revue Canadienne De Chimie*, 86:213–218, 2008.
- [86] S. W. Haynes, P. K. Sydor, C. Corre, L. J. Song, and G. L. Challis. Stereochemical Elucidation of Streptorubin B. *Journal of the American Chemical Society*, 133:1793–1798, 2011.
- [87] K. Chen, N. S. Rannulu, Y. Cai, P. Lane, A. L. Liebl, B. B. Rees, C. Corre, G. L. Challis, and R. B. Cole. Unusual Odd-Electron Fragments from Even-Electron Protonated Prodiginine Precursors Using Positive-Ion Electrospray Tandem Mass Spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 19:1856–1866, 2008.
- [88] H. Kessler, H. Oschkinat, and C. Griesinger. Transformation of homonuclear two-dimensional NMR techniques into one-dimensional techniques using gaussian pulses. *Journal of Magnetic Resonance*, 70:106–133, 1986.
- [89] R. T. Williamson, B. L. Marquez, W. H. Gerwick, and K. E. Kover. One- and two-dimensional gradient-selected HSQMBC NMR experiments for the efficient analysis of long-range heteronuclear coupling constants. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 38:265–273, 2000.
- [90] H. H. Wasserman, D. J. Friedland, and D. A. Morrison. A novel dipyrrolyldipyrromethene prodigiosin analog from *Serratia marcescens*. *Tetrahedron Letters*, pages 641–644, 1968.
- [91] M. S. Melvin, J. T. Tomlinson, G. R. Saluta, G. L. Kucera, N. Lindquist, and R. A. Manderville. Double-strand DNA cleavage by copper prodigiosin. *Journal of the American Chemical Society*, 122:6333–6334, 2000.
- [92] N. A. Porter. Mechanisms for the autoxidation of polyunsaturated lipids. *Accounts of Chemical Research*, 19:262–268, 1986.

- [93] G. W. Burton and K. U. Ingold. Vitamine E as an *invitro* and *invivo* antioxidant. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 570:7–22, 1989.
- [94] R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, and C. Rice-Evans. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26:1231–1237, 1999.
- [95] K. Dairi, S. Tripathy, G. Attardo, and J. F. Lavalley. Two-step synthesis of the bipyrrrole precursor of prodigiosins. *Tetrahedron Letters*, 47:2605–2606, 2006.
- [96] C. M. Baldino, J. Parr, C. J. Wilson, S. C. Ng, D. Yohannes, and H. H. Wasserman. Indoloprodigiosins from the C-10 bipyrrolic precursor: New antiproliferative prodigiosin analogs. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 16:701–704, 2006.
- [97] S. J. Hong, S. D. Jeong, J. Yoo, J. S. Kim, J. Yoon, and C. H. Lee. Direct alkylation of pyrrole with vinyl substituted aromatics: versatile precursors for the synthesis of porphyrinoid macrocycles. *Tetrahedron Letters*, 49:4138–4141, 2008.
- [98] H. J. H. Fenton. LXXIII.-Oxidation of tartaric acid in presence of iron. *Journal of the Chemical Society, Transactions*, 65:899–910, 1894.
- [99] F. Haber and J. Weiss. Ueber die Katalyse des Hydroperoxydes. *Naturwissenschaften*, 20:948–950, 1932.
- [100] C. P. Moorhouse, B. Halliwell, M. Grootveld, and J. M. C. Gutteridge. Cobalt(II) ion as a promotor of hydroxyl radical and possible crypto-hydroxyl radical formation under physiological conditions - differential effects of hydroxyl radical scavengers. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 843:261–268, 1985.
- [101] M. K. Eberhardt, C. Santos, and M. A. Soto. Formation of hydroxyl radicals and  $\text{Co}^{3+}$  in the reaction of  $\text{Co}^{2+}$  - EDTA with hydrogen peroxide - catalytic effect of  $\text{Fe}^{3+}$ . *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1157:102–106, 1993.
- [102] H. J. Bromme, W. Morke, and E. Peschke. Transformation of barbituric acid into alloxan by hydroxyl radicals: interaction with melatonin and with other hydroxyl radical scavengers. *J Pineal Res*, 33:239–47, 2002.
- [103] N. L. Brown, J. V. Stoyanov, S. P. Kidd, and J. L. Hobman. The MerR family of transcriptional regulators. *Fems Microbiology Reviews*, 27:145–163, 2003.
- [104] D. A. Rodionov, P. Hebbeln, M. S. Gelfand, and T. Eitinger. Comparative and functional genomic analysis of prokaryotic nickel and cobalt uptake transporters: Evidence for a novel group of ATP-binding cassette transporters. *Journal of Bacteriology*, 188:317–327, 2006.
- [105] T. Eitinger, D. A. Rodionov, M. Grote, and E. Schneider. Canonical and ECF-type ATP-binding cassette importers in prokaryotes: diversity in modular organization and cellular functions. *Fems Microbiology Reviews*, 35:3–67, 2011.
- [106] S. Okamoto and L. D. Eltis. The biological occurrence and trafficking of cobalt. *Metallomics*, 3:963–970, 2011.
- [107] N. N. Gerber and M. J. Gauthier. New prodigiosin-like pigment from *Alteromonas rubra*. *Applied and Environmental Microbiology*, 37:1176–1179, 1979.

- 
- [108] N. N. Gerber. Cycloprodigiosin from *Beneckeia gazogenes*. *Tetrahedron Letters*, 24: 2797–2798, 1983.
- [109] N. N. Gerber and D. P. Stahly. Prodiginine (prodigiosin-like) pigments from *Streptovorticillium rubireticuli*, an organism that causes pink staining of polyvinyl-chloride. *Applied Microbiology*, 30:807–810, 1975.
- [110] R. Liu, C. B. Cui, L. Duan, Q. Q. Gu, and W. M. Zhu. Potent in vitro anticancer activity of metacycloprodigiosin and undecylprodigiosin from a sponge-derived actinomycete *Saccharopolyspora* sp nov. *Archives of Pharmacal Research*, 28:1341–1344, 2005.
- [111] N. N. Gerber. Prodigiosin-like pigments from *Actinomadura (Nocardia) pelletieri* and *Actinomadura madurae*. *Applied Microbiology*, 18:1–3, 1969.
- [112] G. Hobbs, C. M. Frazer, D. C. J. Gardner, J. A. Cullum, and S. G. Oliver. Dispersed growth of *Streptomyces* in liquid culture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 31: 272–277, 1989.
- [113] C. E. Zobell. Studies on marine bacteria I The cultural requirements of heterotrophic aerobes. *Journal of Marine Research*, 4:42–75, 1941.
- [114] J. Donath and W. Boland. Biosynthesis of acyclic homoterpenes - enzyme selectivity and absolute configuration of the nerolidol precursor. *Phytochemistry*, 39:785–790, 1995.

## A Anhang

### A.1 NMR-Spektren synthetisierter Verbindungen

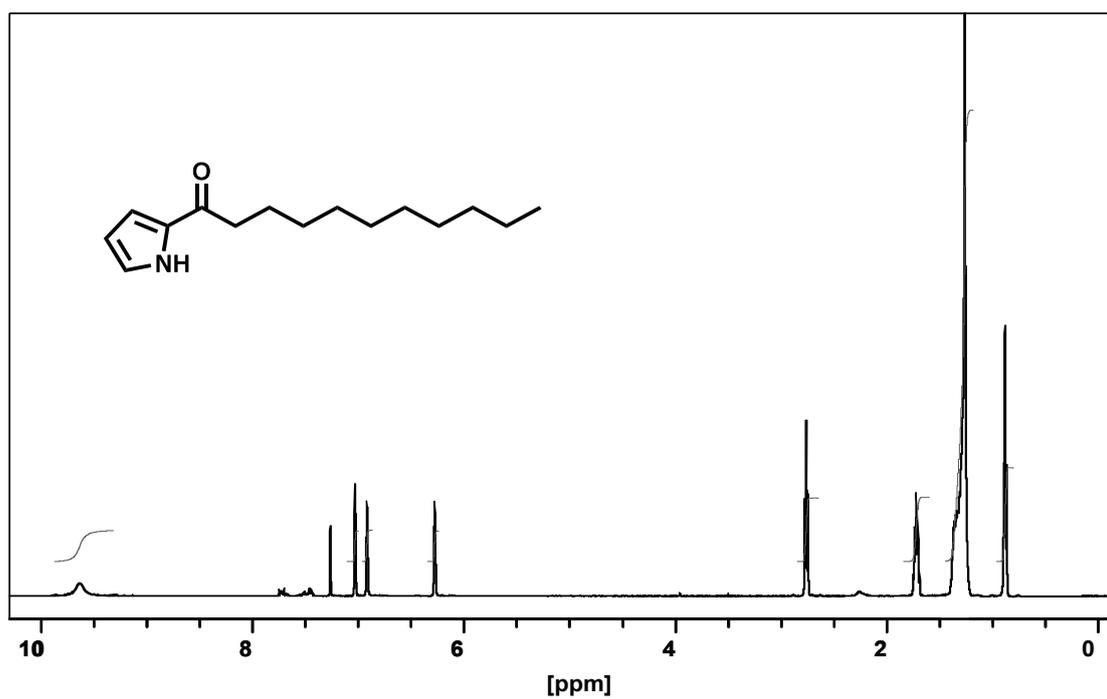
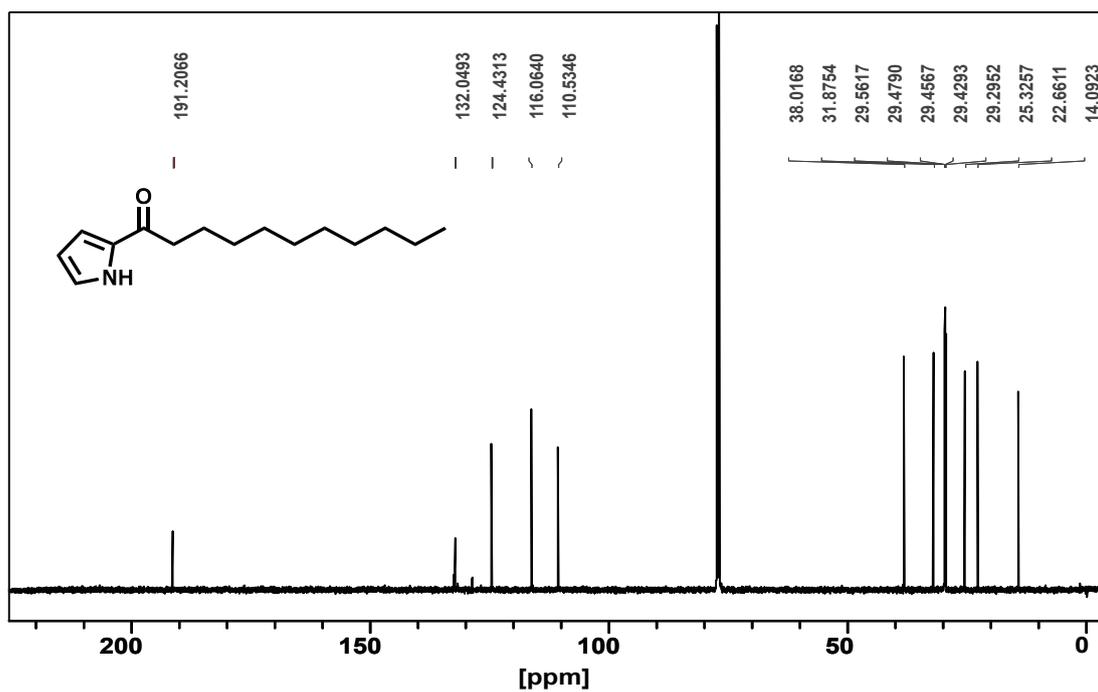
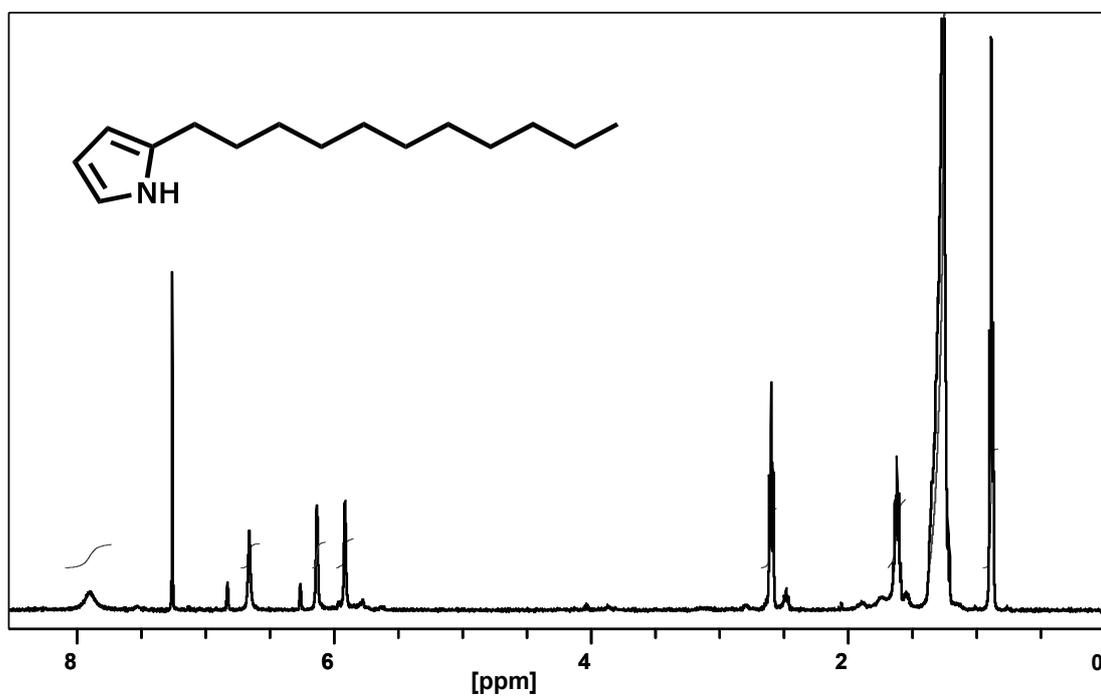
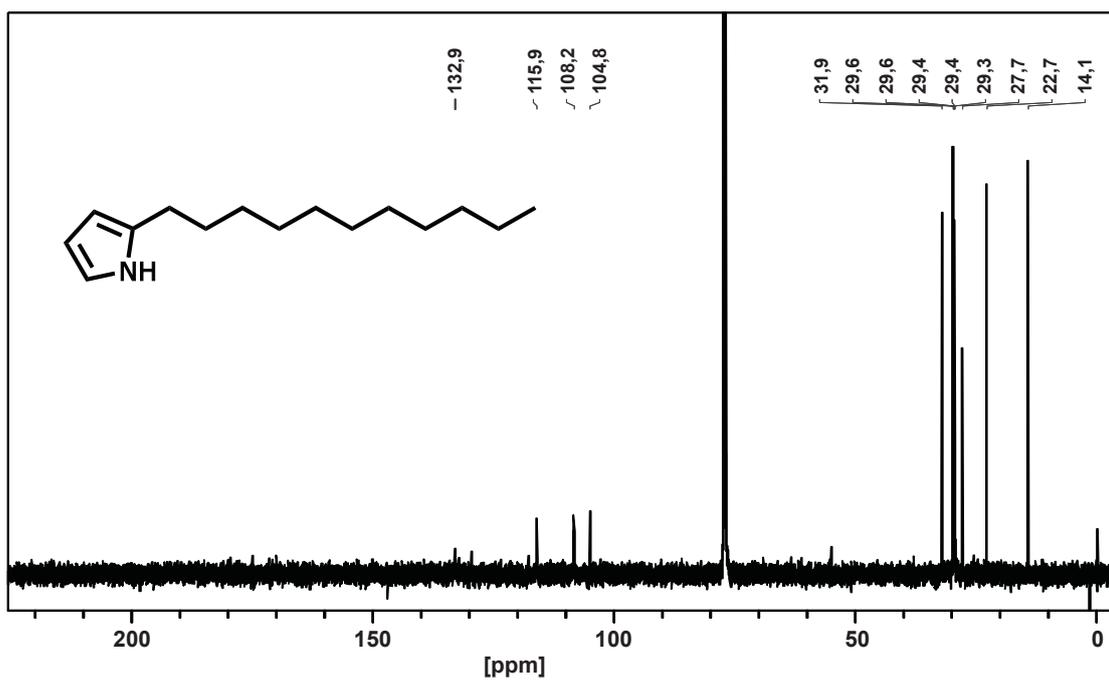
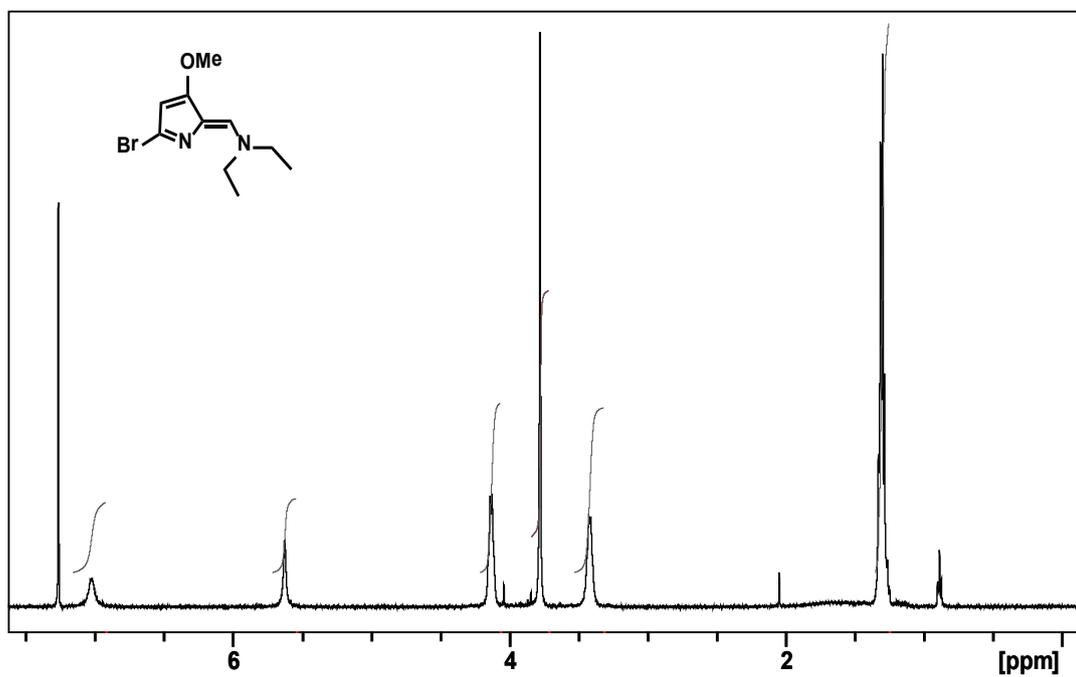


Abbildung A.1:  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) von 2-Undecanoylpyrrol (45)

Abbildung A.2:  $^{13}\text{C-NMR}$  (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz) von 2-Undecanoylpyrrol (45)Abbildung A.3:  $^1\text{H-NMR}$  (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) von 2-Undecylpyrrol (27)

Abbildung A.4:  $^{13}\text{C}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz) von 2-Undecylpyrrol (27)Abbildung A.5:  $^1\text{H}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) von *N*-((5-Bromo-3-methoxy-2*H*-pyrrol-2-ylidene)methyl)-*N*-ethylethanamin (54)

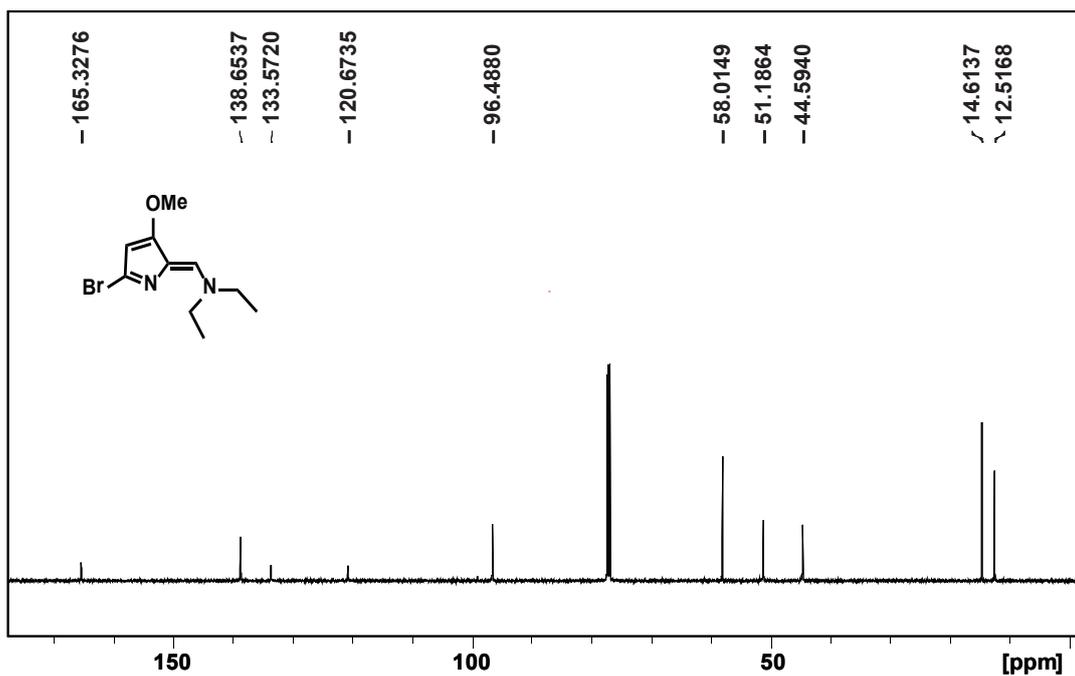


Abbildung A.6:  $^{13}\text{C}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz) von *N*-((5-Bromo-3-methoxy-2*H*-pyrrol-2-ylidene)methyl)-*N*-ethylethanamin (54)

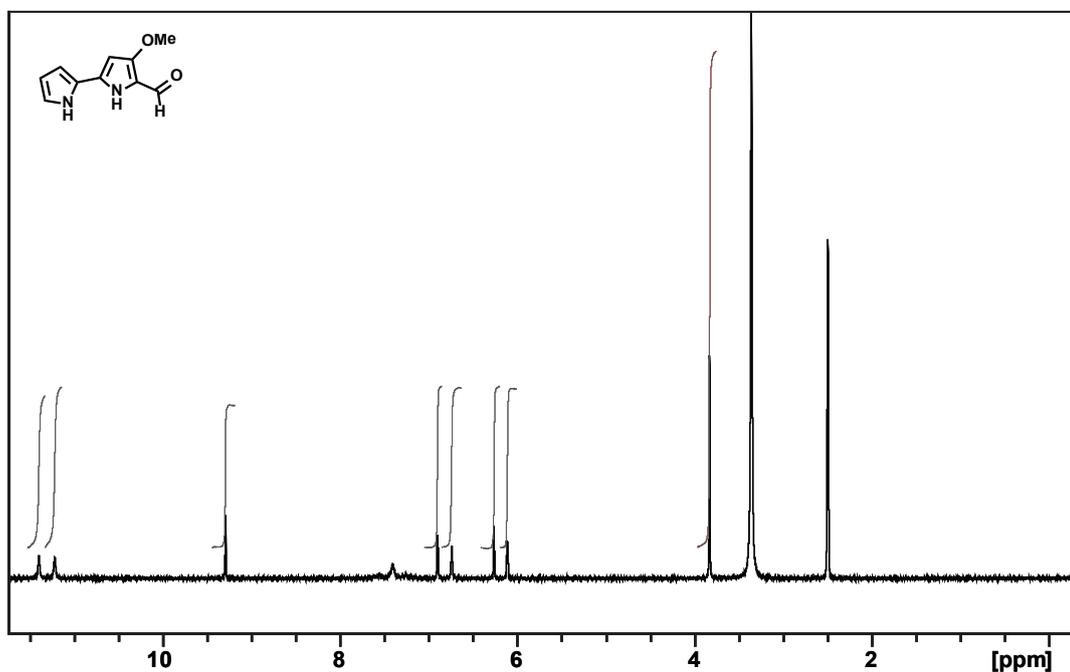


Abbildung A.7:  $^1\text{H}$ -NMR ( $\text{DMSO-d}_6$ , 500 MHz) von 4-Methoxy-2,2'-bipyrrol-5-carboxaldehyd (26)

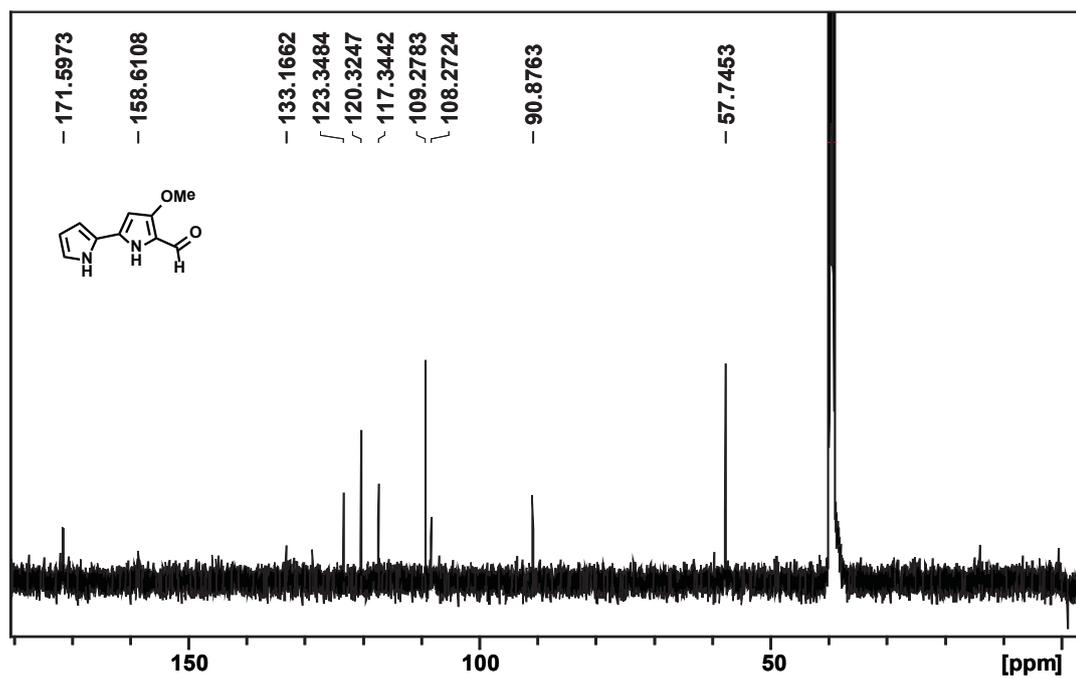


Abbildung A.8:  $^{13}\text{C}$ -NMR (DMSO- $d_6$ , 125 MHz) von 4-Methoxy-2,2'-bipyrrol-5-carboxyaldehyd (26)

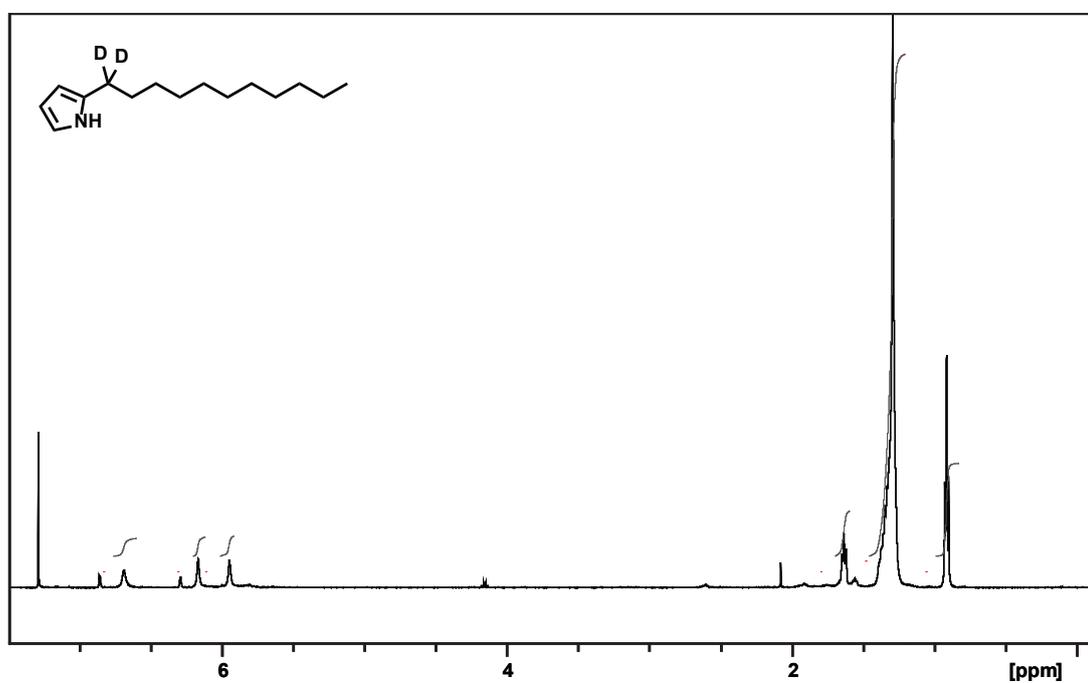
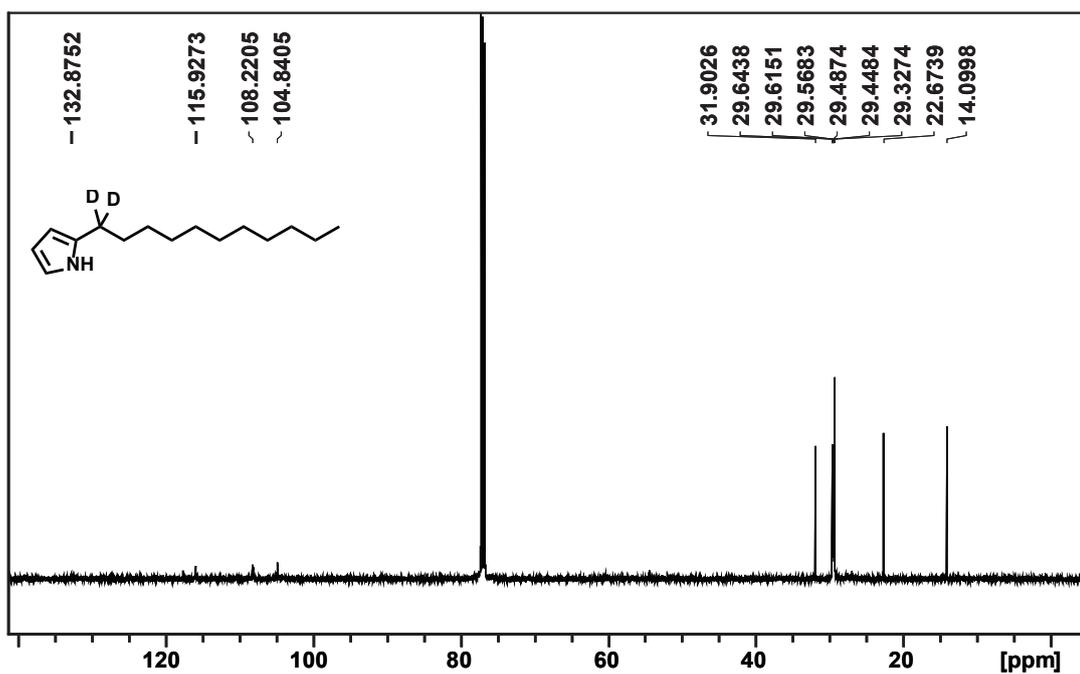
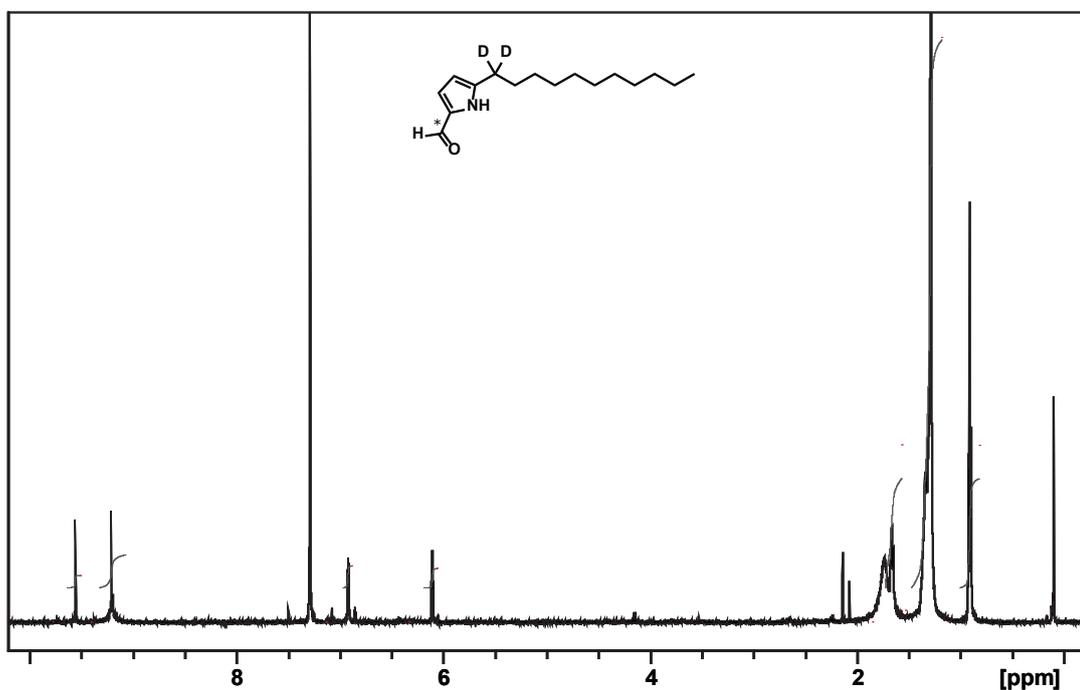


Abbildung A.9:  $^1\text{H}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) von [1',1'- $^2\text{H}_2$ ]-2-Undecylpyrrol (46)

Abbildung A.10:  $^{13}\text{C}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz) von [1',1'- $^2\text{H}_2$ ]-2-Undecylpyrrol (46)Abbildung A.11:  $^1\text{H}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) von [Formyl- $^{13}\text{C}$ , 1',1'- $^2\text{H}_2$ ]-5-Undecylpyrrol-2-carboxyaldehyd (58)

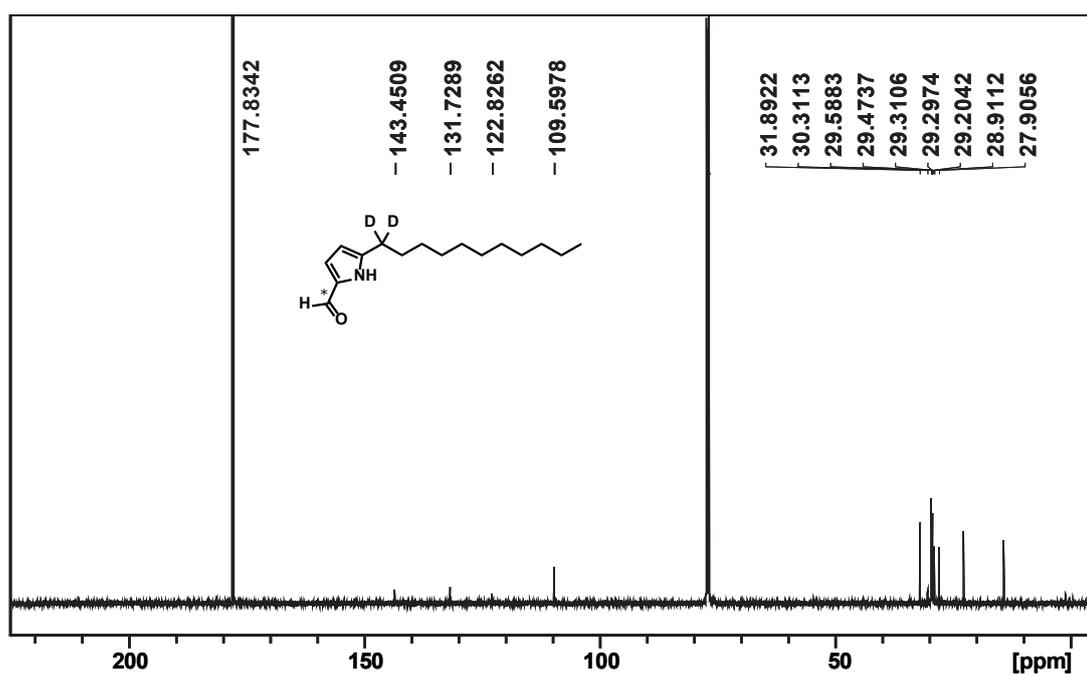


Abbildung A.12:  $^{13}\text{C}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz) von Synthese von [Formyl- $^{13}\text{C}$ ,  $1',1'-2\text{H}_2$ ]-5-Undecylpyrrol-2-carboxyaldehyd (58)

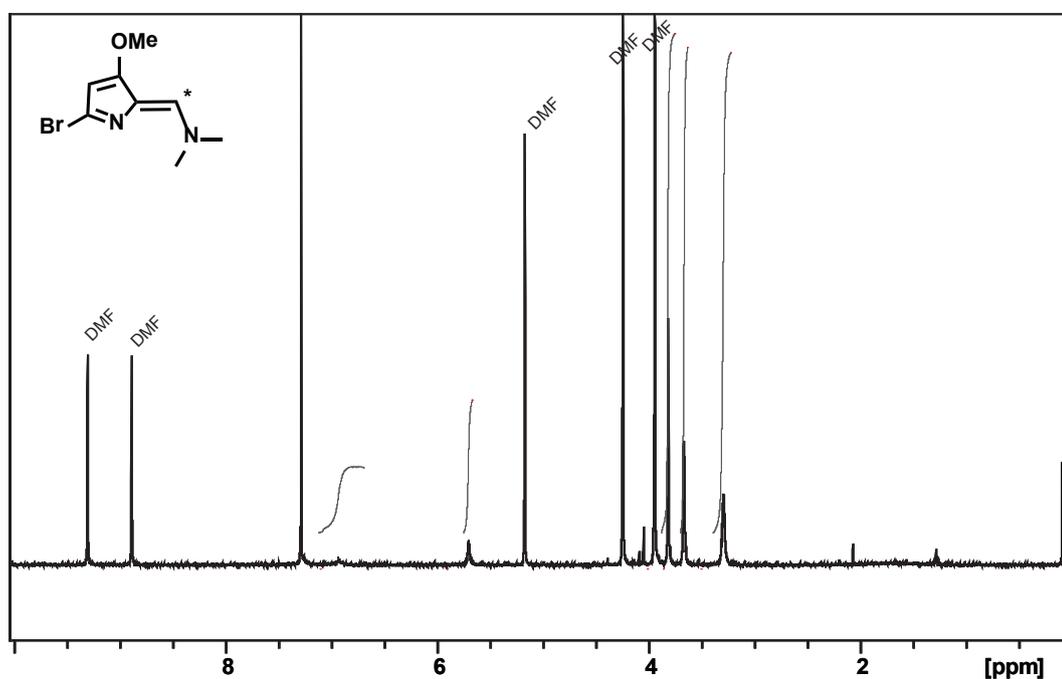


Abbildung A.13:  $^1\text{H}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) von [8- $^{13}\text{C}$ ]-N-((5-Bromo-3-methoxy-2H-pyrrol-2-ylidene)methyl)-N-methylmethanamin (63)

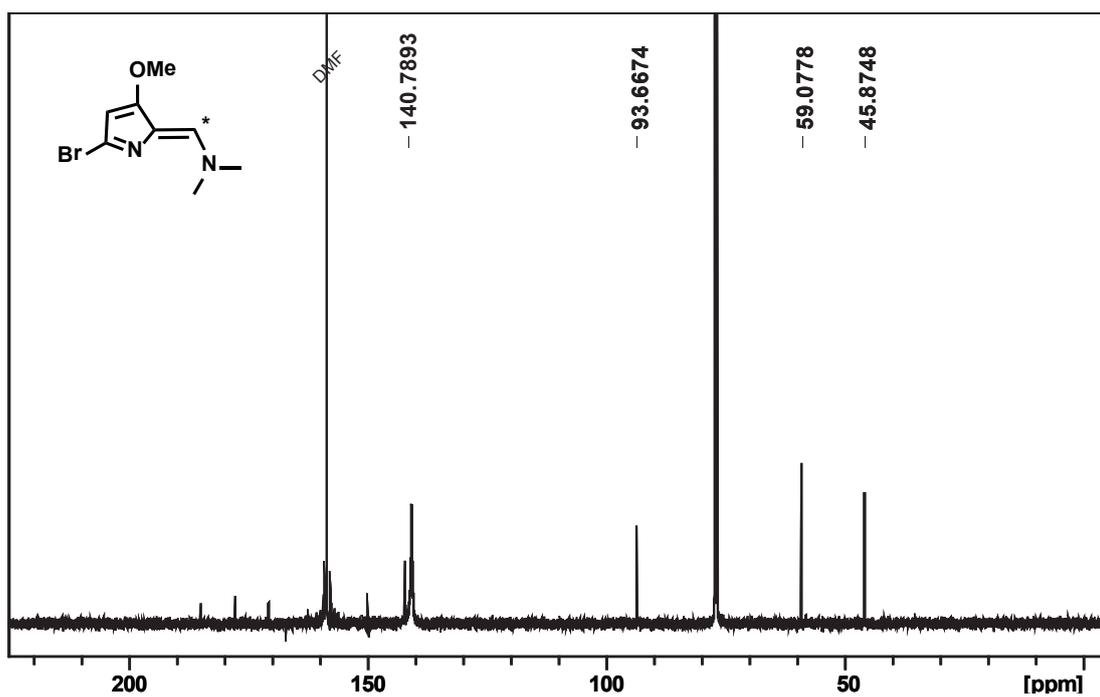


Abbildung A.14:  $^{13}\text{C}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz) von  $[8\text{-}^{13}\text{C}]$ - $N$ -((5-Bromo-3-methoxy-2H-pyrrol-2-ylidene)methyl)- $N$ -methylmethanamin (63)

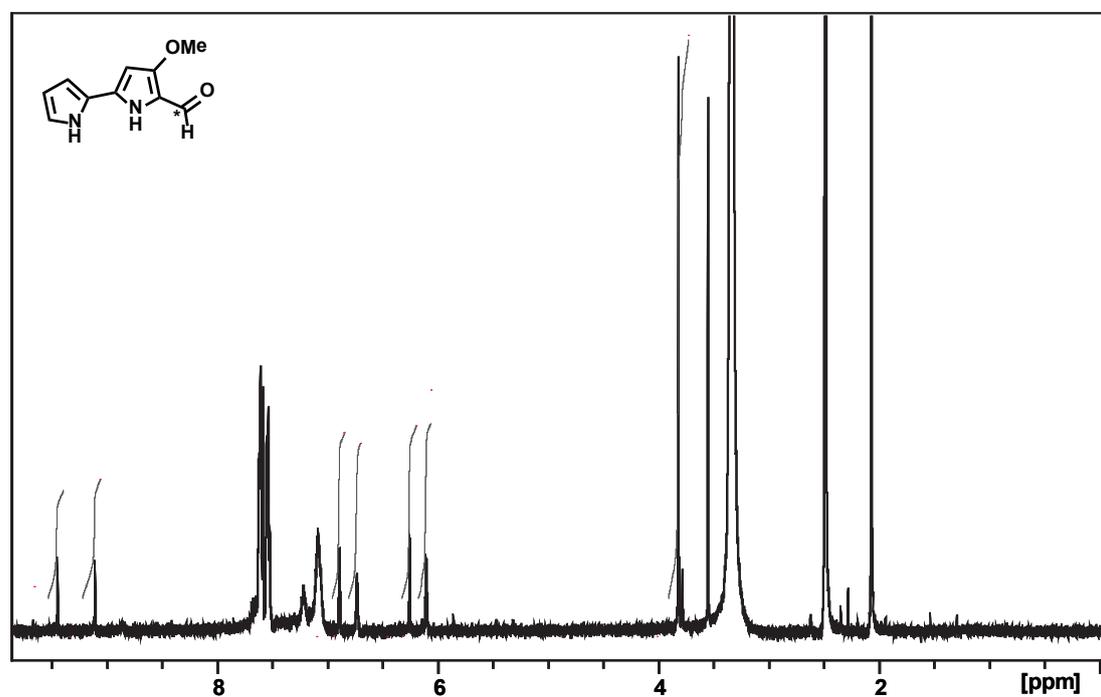


Abbildung A.15:  $^1\text{H}$ -NMR ( $\text{DMSO-d}_6$ , 500 MHz) von  $[Formyl\text{-}^{13}\text{C}]$ -4-Methoxy-2,2'-bipyrrrol-5-carboxaldehyd (62)

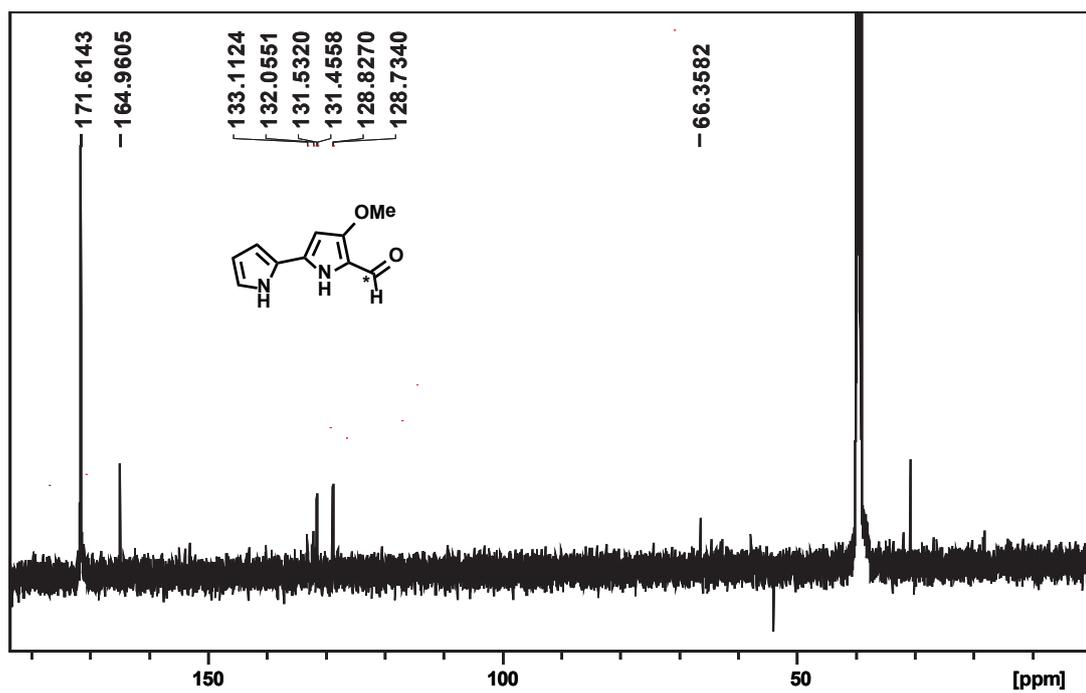


Abbildung A.16:  $^{13}\text{C}$ -NMR ( $\text{DMSO-d}_6$ , 125 MHz) von [Formyl- $^{13}\text{C}$ ]-4-Methoxy-2,2'-bipyrrol-5-carboxyaldehyd (62)

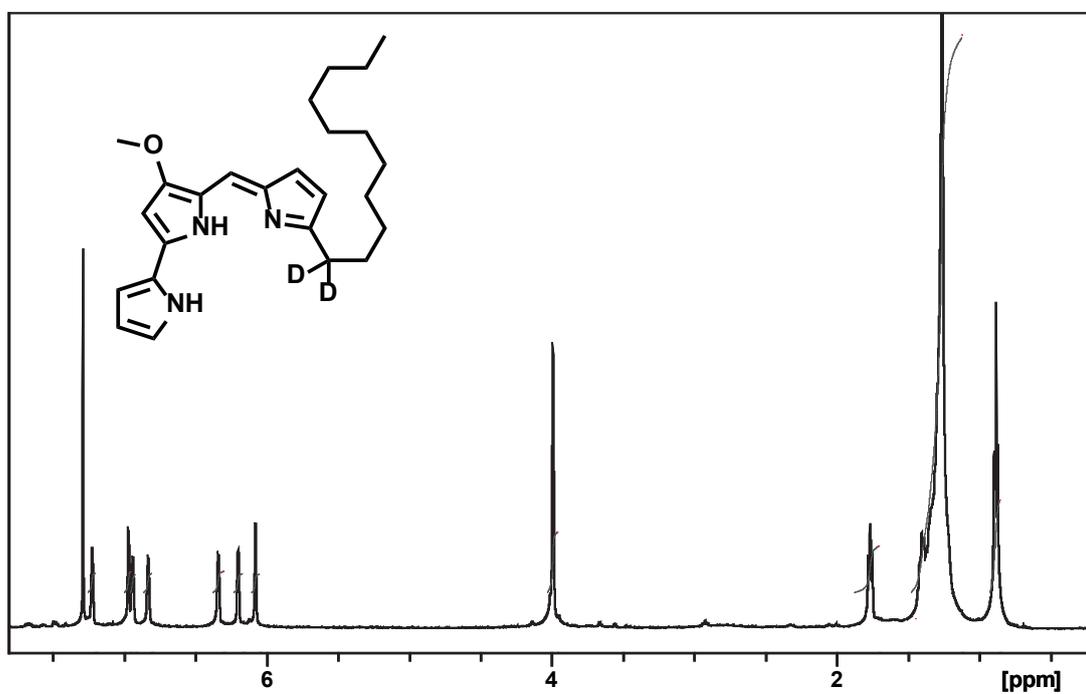


Abbildung A.17:  $^1\text{H}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) von [1',1'- $^2\text{H}_2$ ]-Undecylprodigiosin (56)

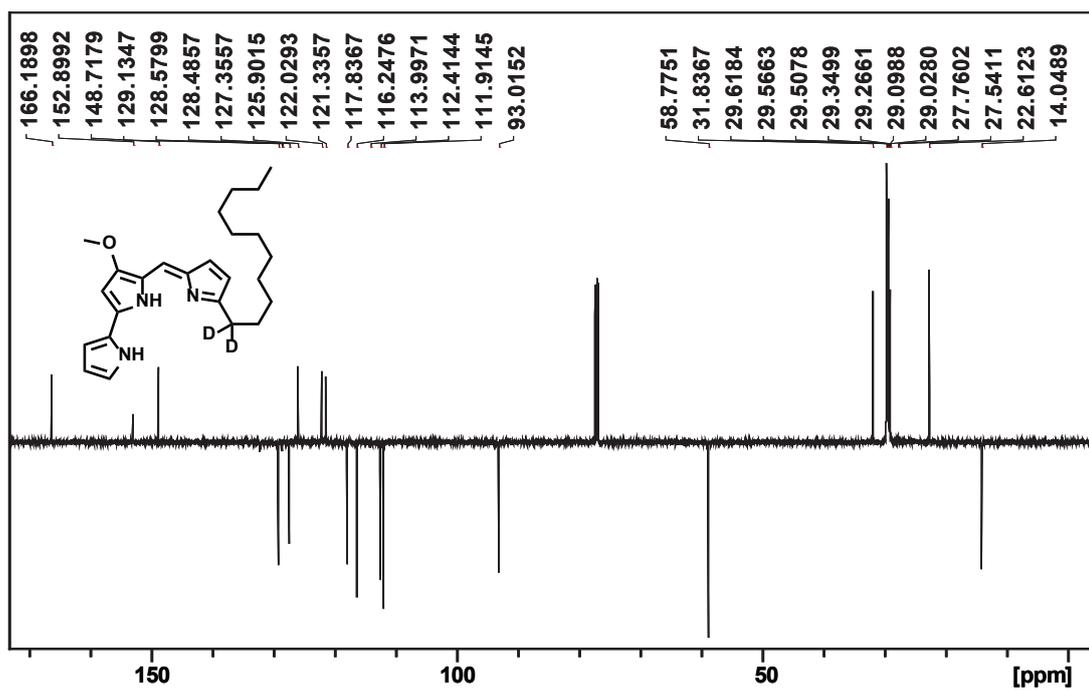


Abbildung A.18: <sup>13</sup>C-APT-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz) von [1',1'-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-Undecylprodigiosin (56)

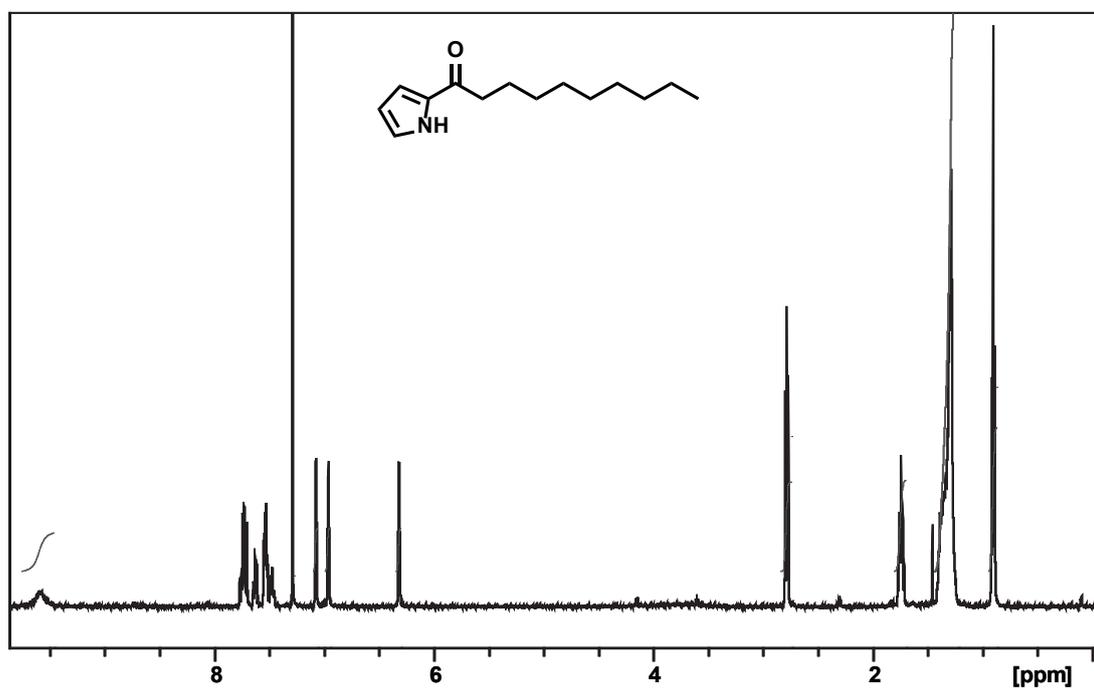
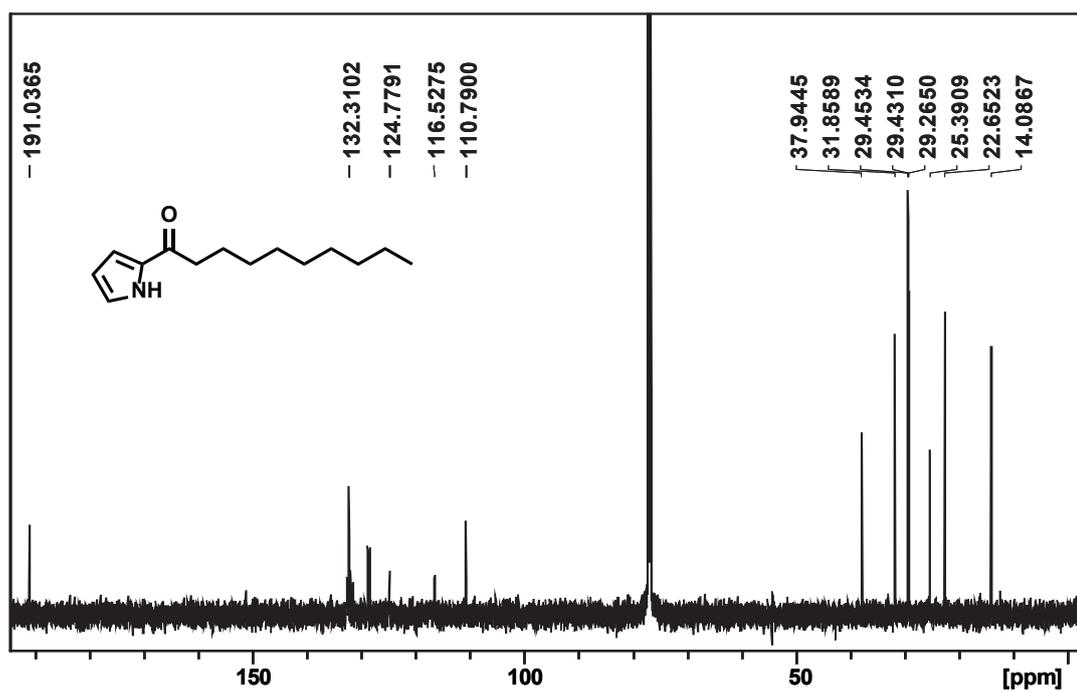
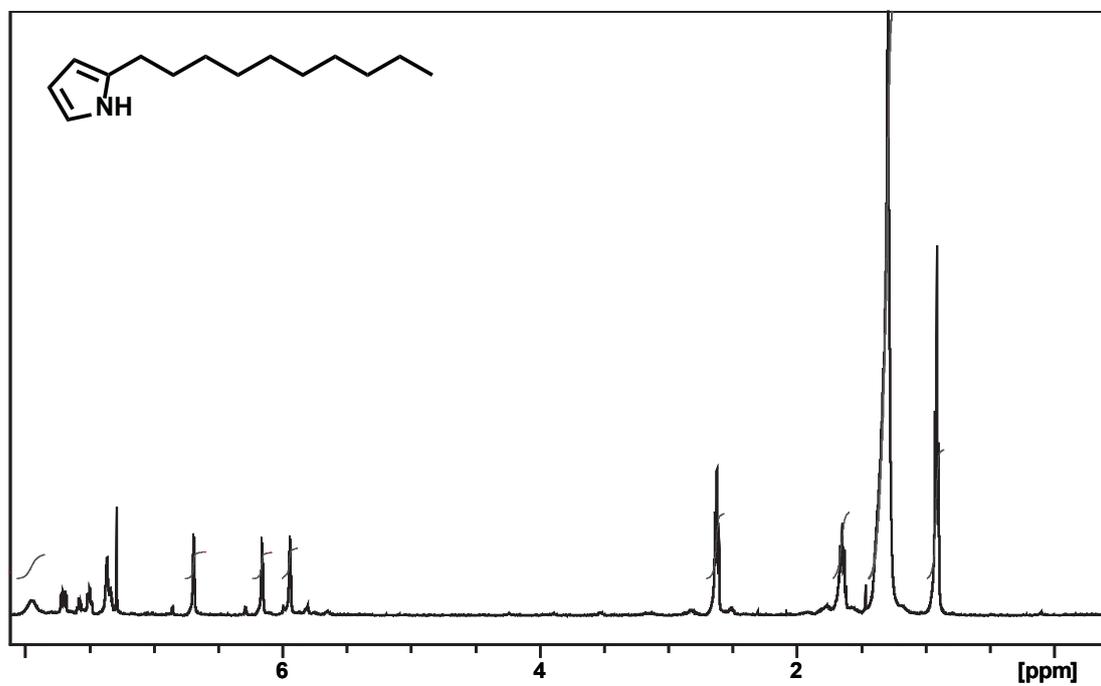
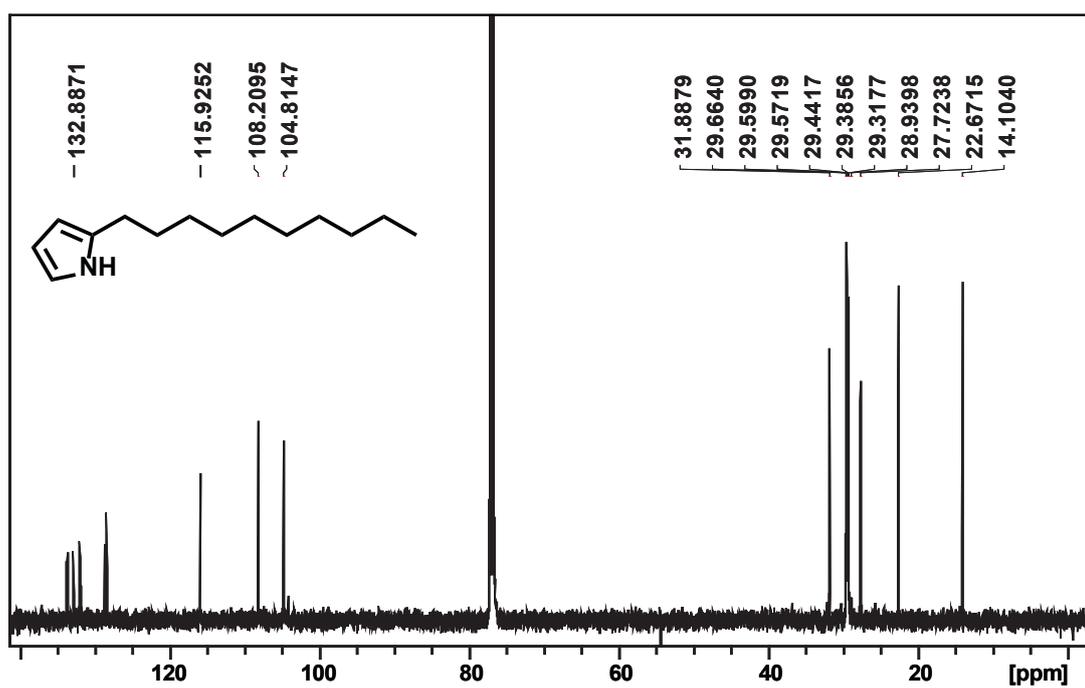
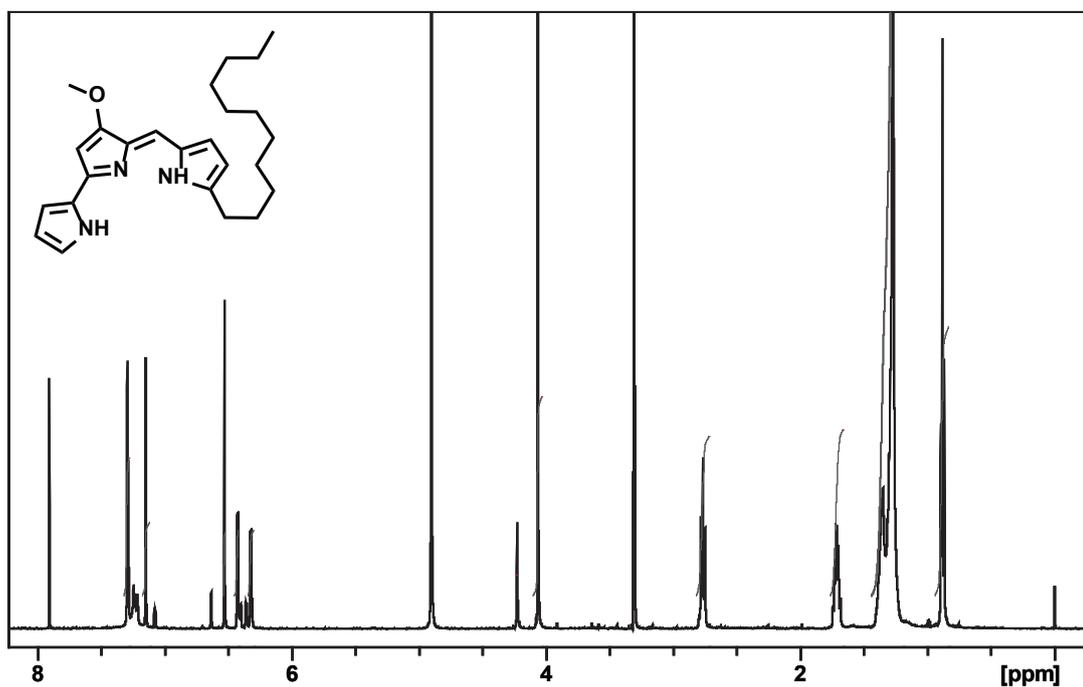
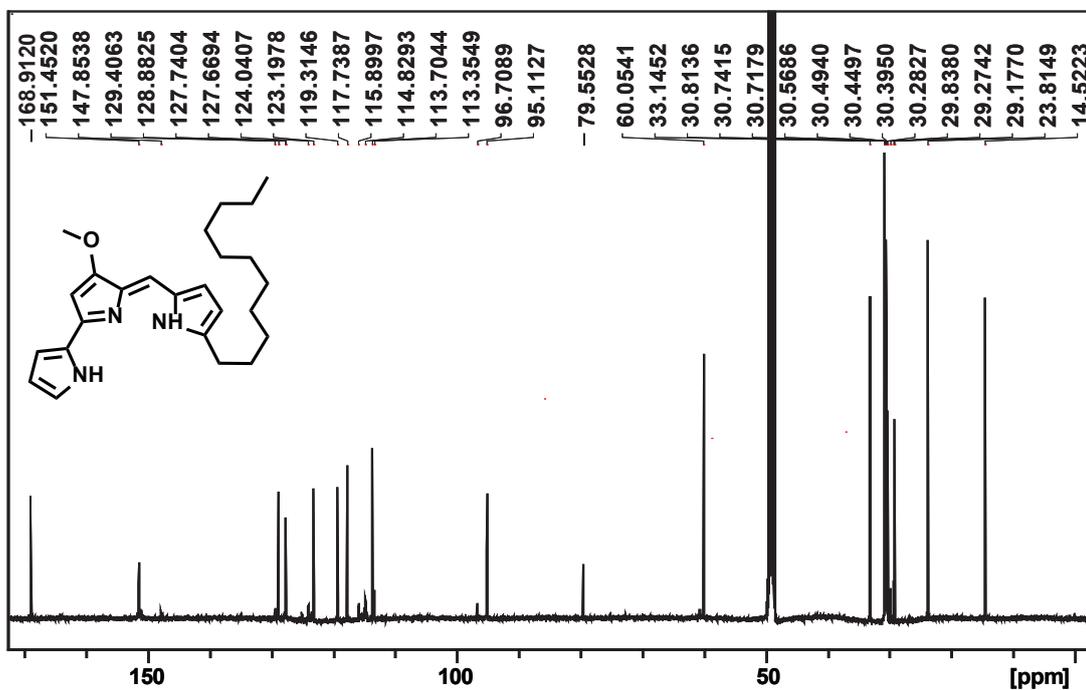


Abbildung A.19: <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) von 2-Decanoylpyrrol (65)

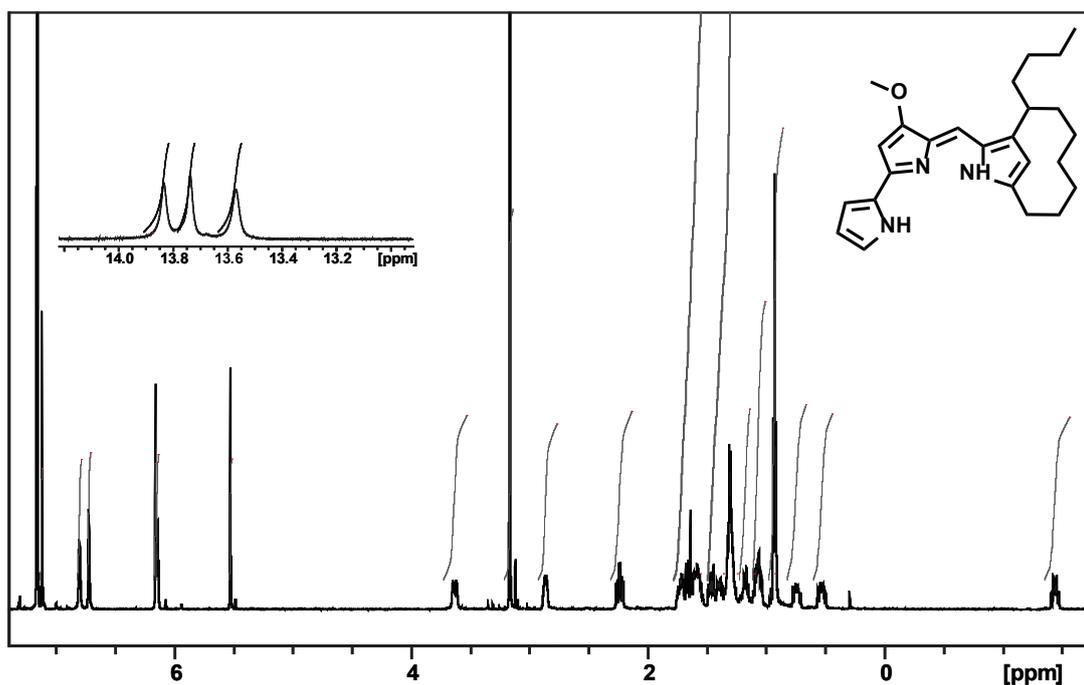
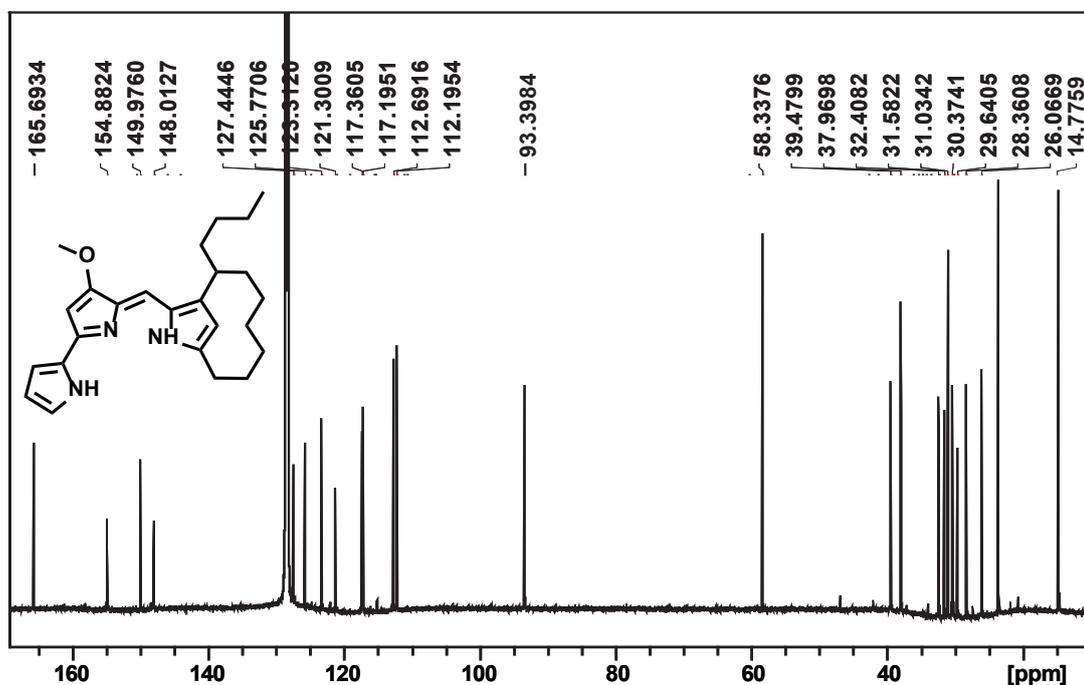
Abbildung A.20:  $^{13}\text{C}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz) von 3-Decanoylpyrrol (65)Abbildung A.21:  $^1\text{H}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) von 2-Decylpyrrol (66)

Abbildung A.22:  $^{13}\text{C}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz) von 2-Decylpyrrol (66)

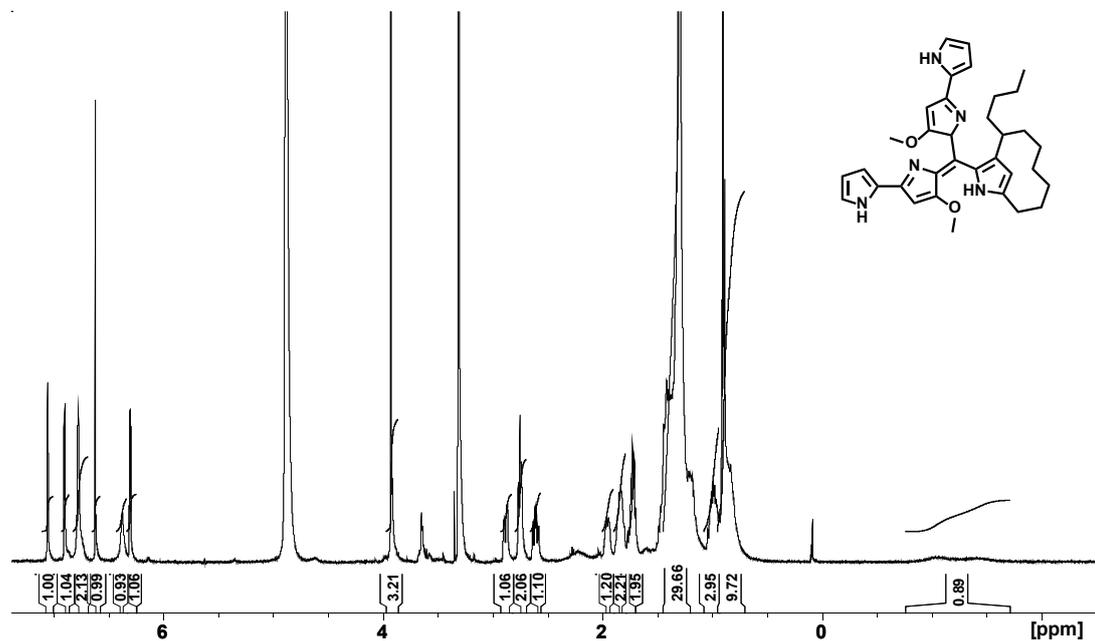
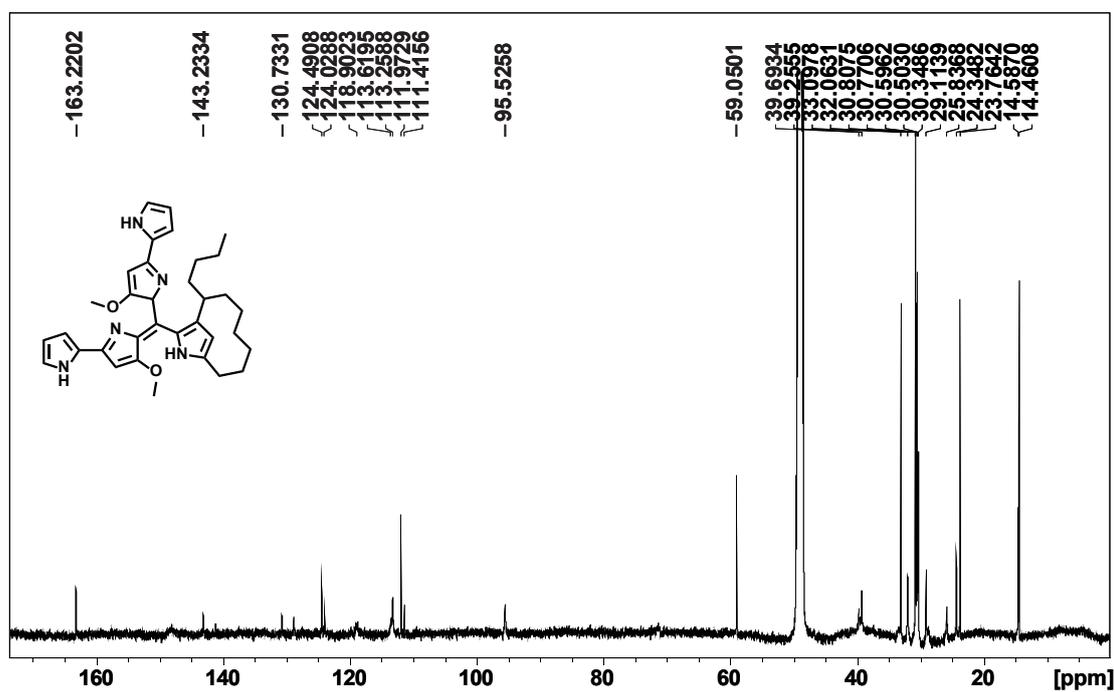
## A.2 NMR-Spektren von Undecylprodigiosin

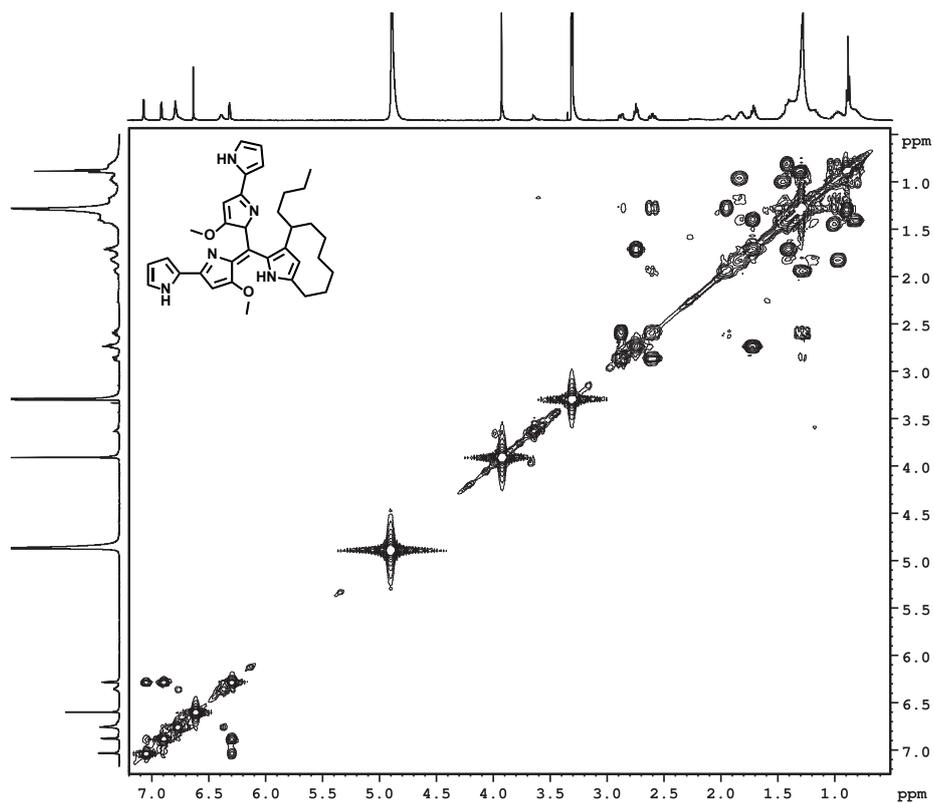
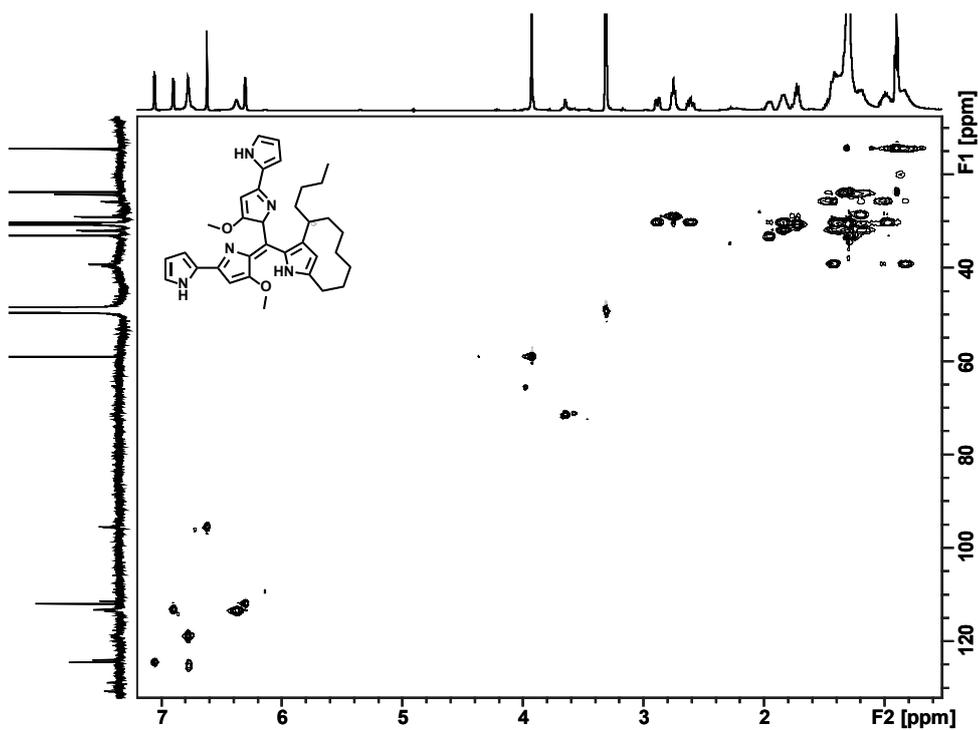
Abbildung A.23:  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz) von Undecylprodigiosin (13)Abbildung A.24:  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 125 MHz) von Undecylprodigiosin (13)

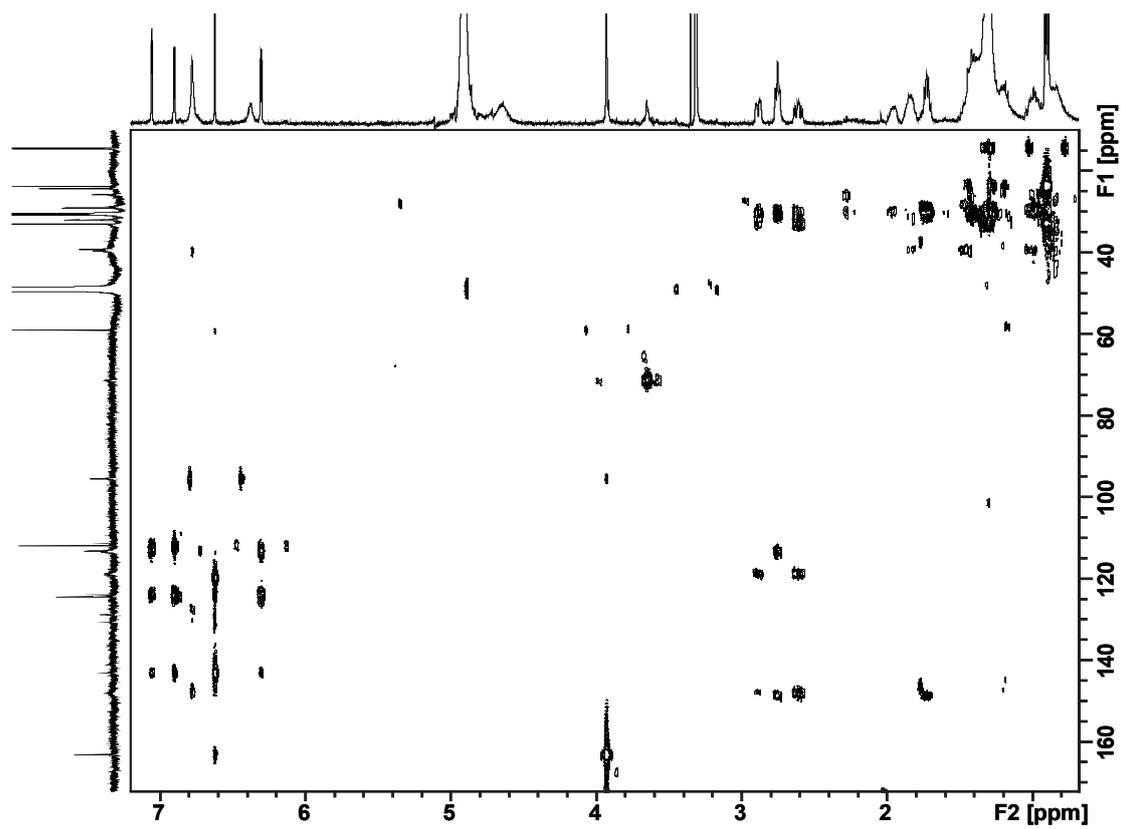
## A.3 NMR-Spektren von Streptorubin B

Abbildung A.25:  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz) von Streptorubin B (14)Abbildung A.26:  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 125 MHz) von Streptorubin B (14)

## A.4 NMR-Spektren von Coeligiosin B

Abbildung A.27:  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz) von Coeligiosin B (34)Abbildung A.28:  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 125 MHz) von Coeligiosin B (34)

Abbildung A.29: COSY-Spektrum ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) von Coeligosin B (34)Abbildung A.30: HSQC-NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) von Coeligosin B (34)

Abbildung A.31: HMBC-NMR (CD<sub>3</sub>OD) von Coeligosin B (34)

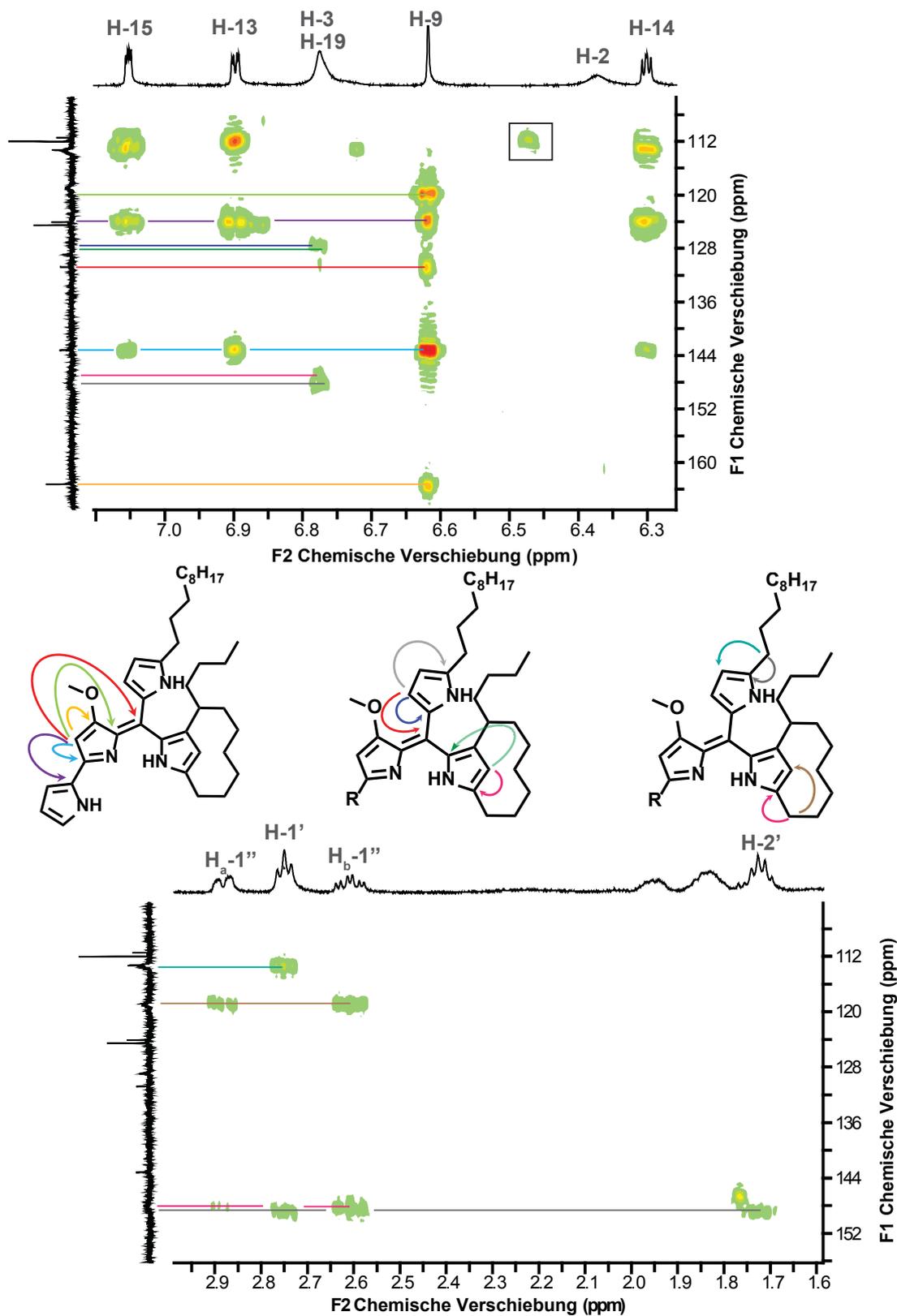


Abbildung A.32: Zur Strukturaufklärung relevante Ausschnitte des HMBC-Spektrums (CD<sub>3</sub>OD) von Coeligosin B im aromatisch (oben) und Alkylprotonen-Bereich (unten). Korrelationen sind in der Struktur durch farbige Pfeile kenntlich gemacht. Jede Farbe steht für ein Kohlenstoffatom. Die Kopplung ist im HMBC mit einer Linie in Farbe des Pfeils kenntlich gemacht. Satellitensignale, sind durch schwarze Umrandung markiert.

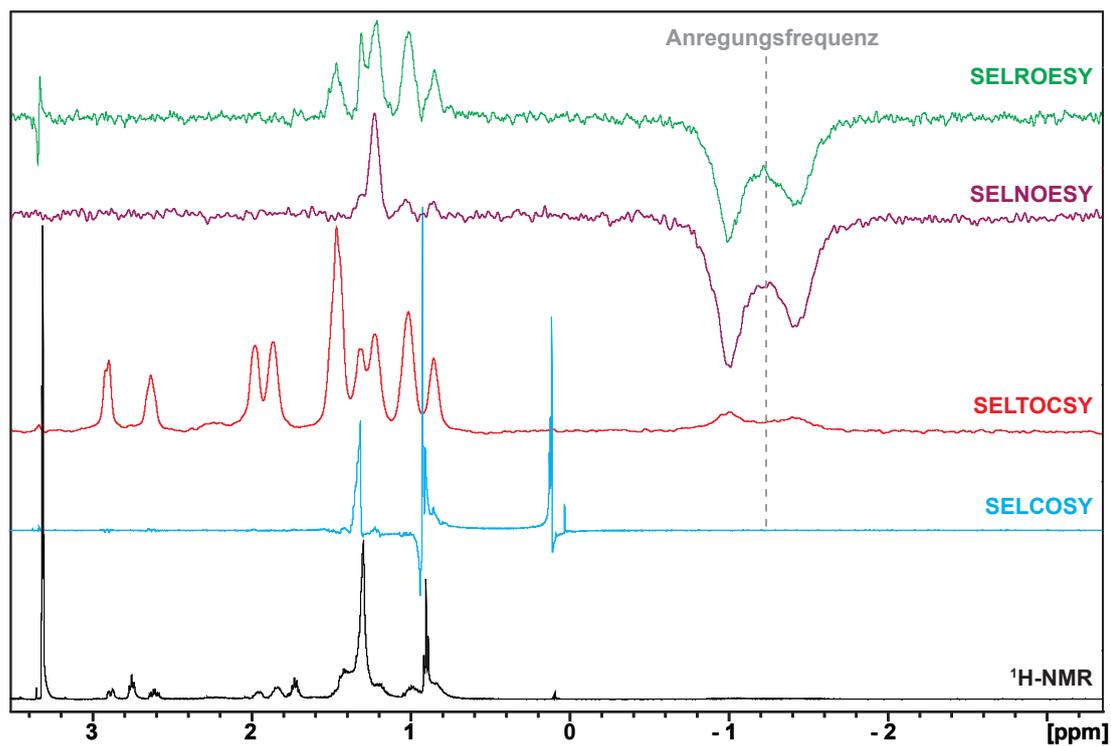
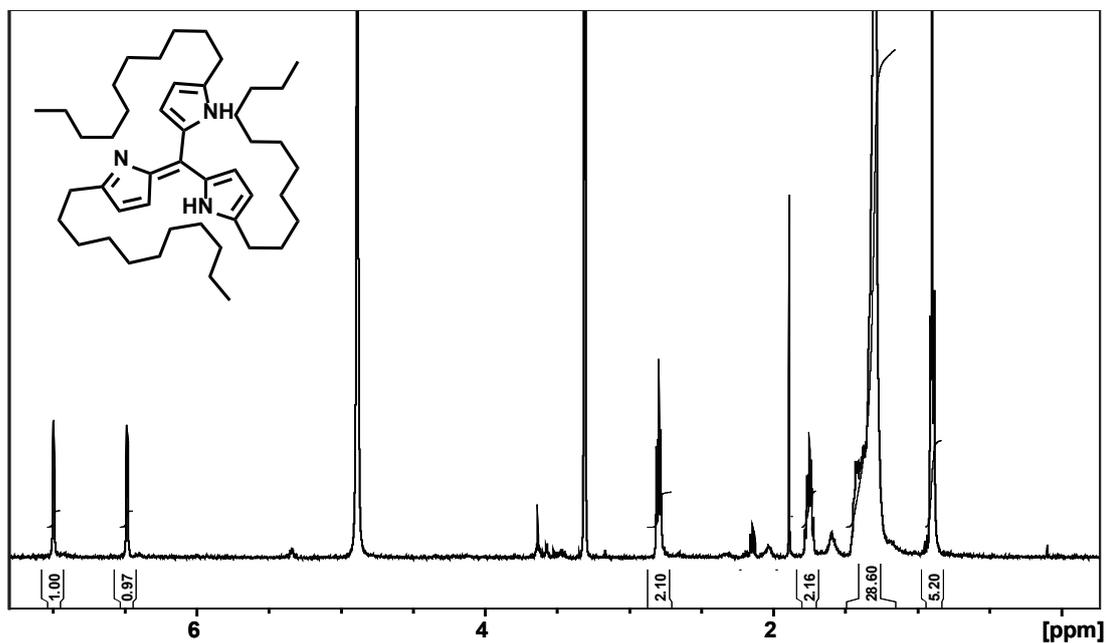
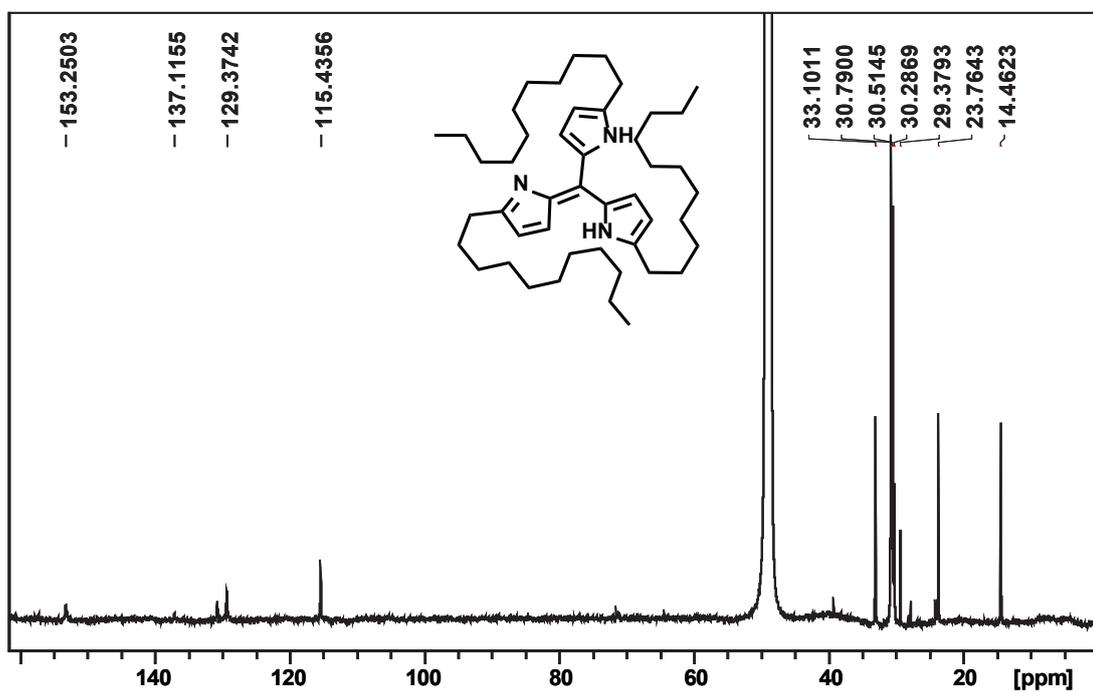
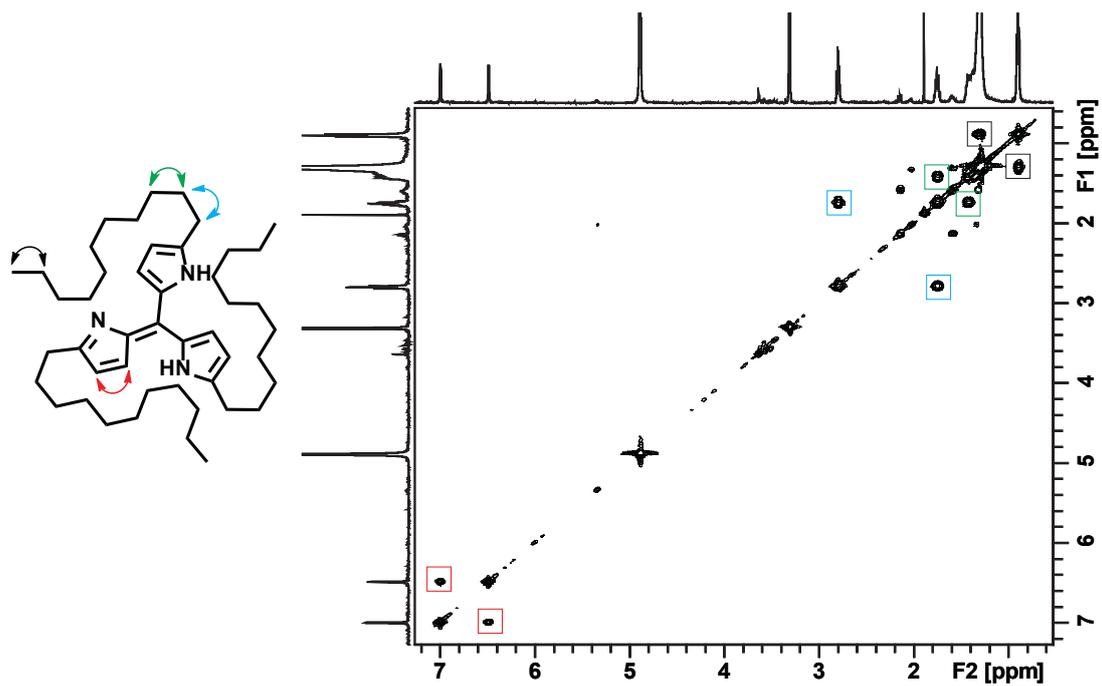
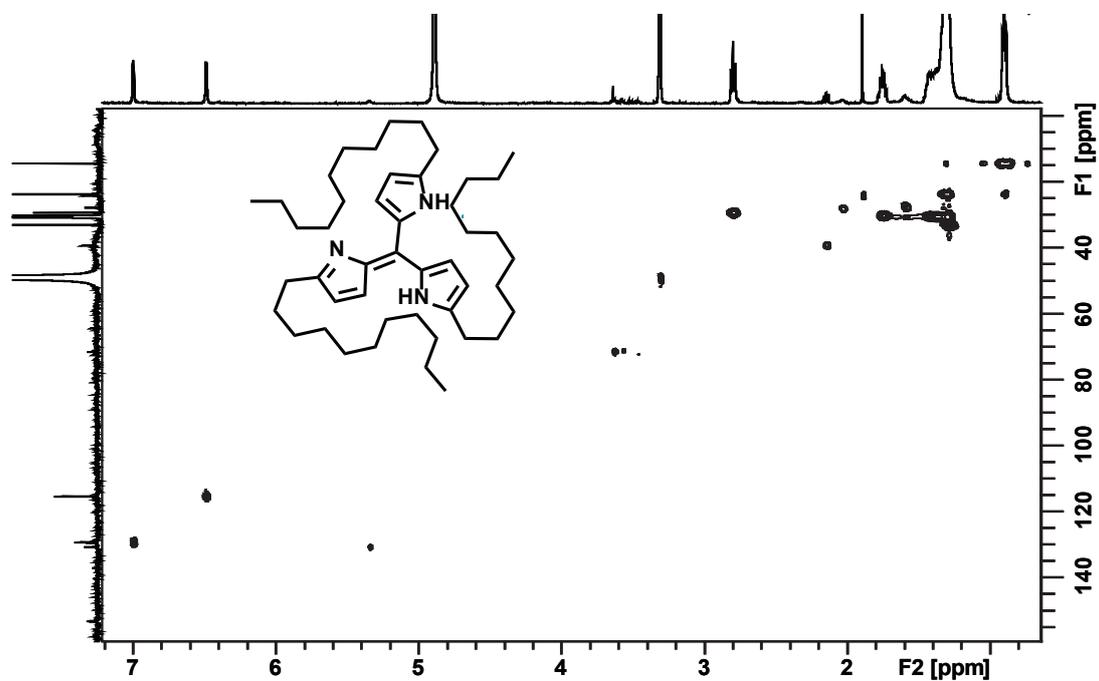
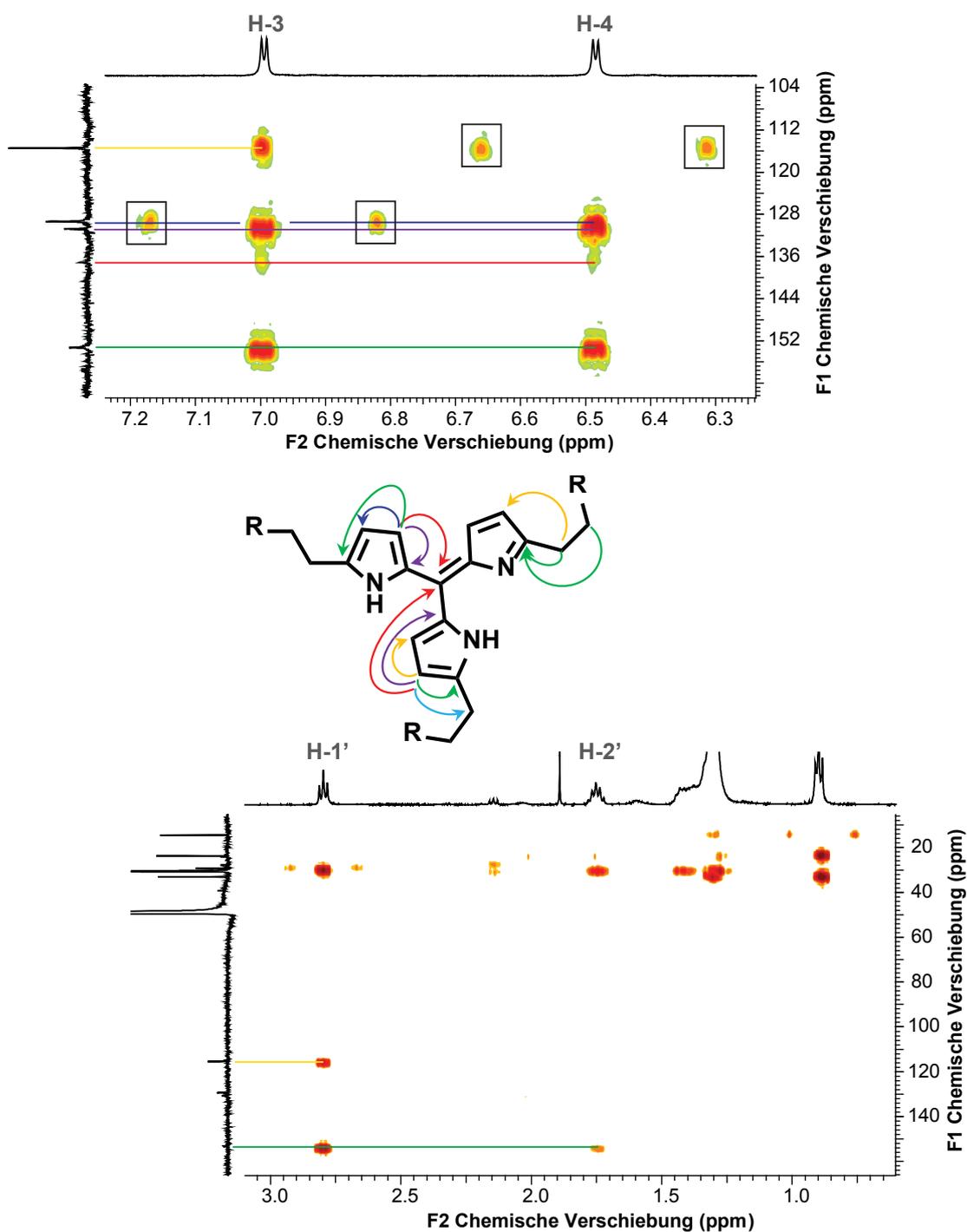


Abbildung A.33: Zugehörigkeit des Signals im negativen ppm-Bereich (-1,23 ppm) zum Spinsystem des Alkytringes in Coeligiosin B (**34**). schwarz: <sup>1</sup>H-NMR (CD<sub>3</sub>OD) von Coeligiosin B (**34**), blau: selektives COSY, rot: selectives TOCSY, violett: selektives NOESY, grün: selectives ROESY. Für alle selektiven Experimente wurde eine Anregungsfrequenz von -614 Hz verwendet.

## A.5 NMR-Spektren von Coeligiosin C

Abbildung A.34:  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz) von Coeligiosin C (35)Abbildung A.35:  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 125 MHz) von Coeligiosin C (35)

Abbildung A.36: COSY-Spektrum (CD<sub>3</sub>OD) von Coeligosin C (35)Abbildung A.37: HSQC-Spektrum (CD<sub>3</sub>OD) von Coeligosin C (35)

Abbildung A.38: Ausschnitte des HMBC-Spektrums (CD<sub>3</sub>OD) von Coeligosin C (35)

## A.6 NMR-Spektren von Coeligiosin E

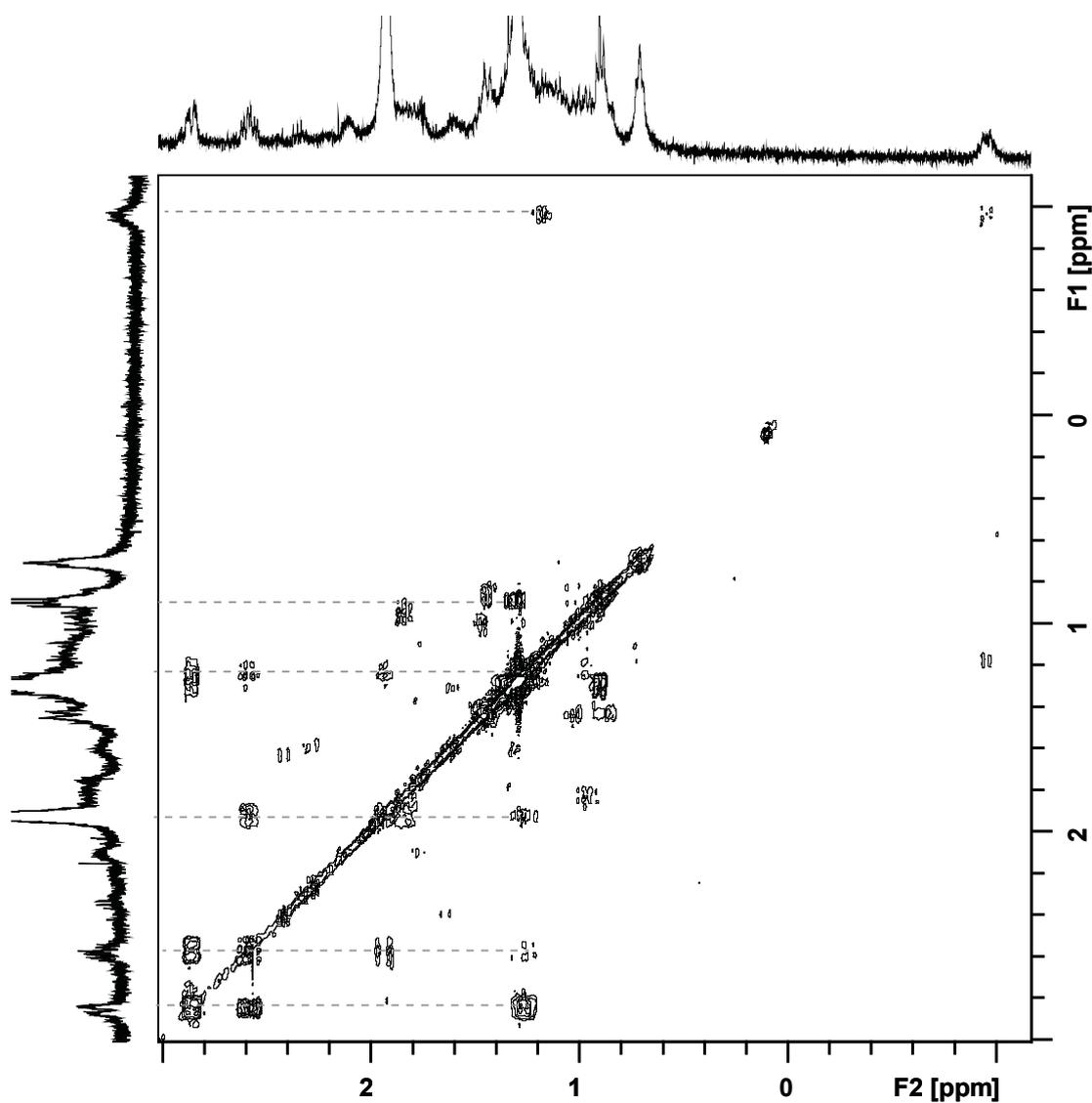


Abbildung A.39: Ausschnitt des COSY-Spektrums ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) von Coeligiosin E (37) im Alkylbereich. Im aromatischen Bereich zeigten sich keine Kopplungen.

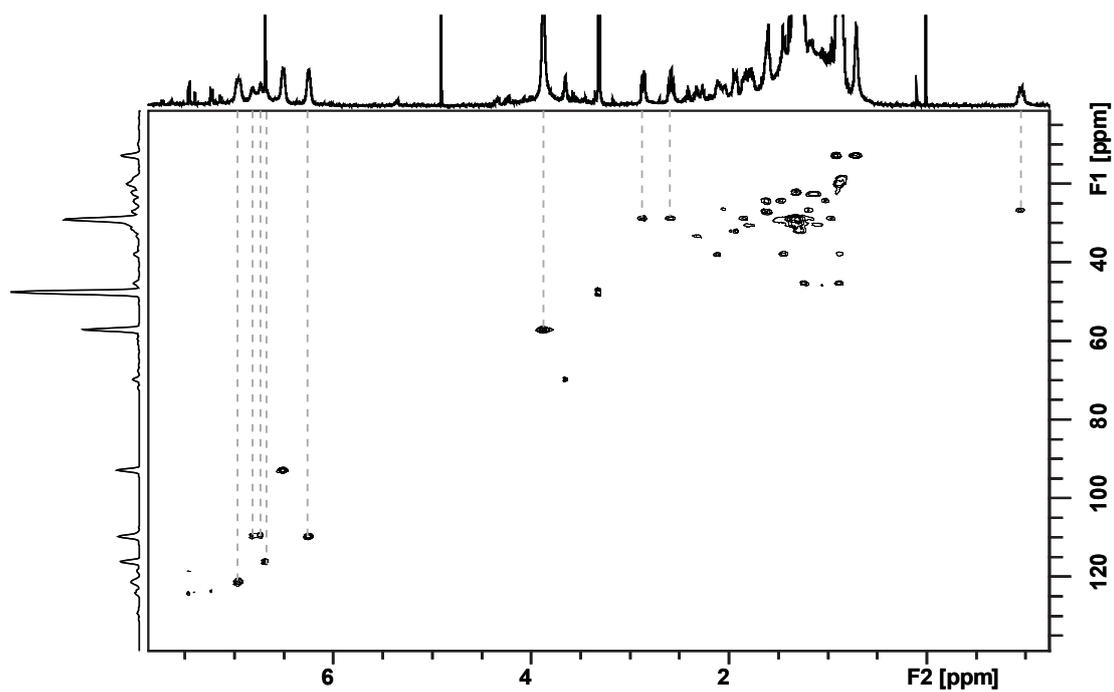


Abbildung A.40: HSQC-Spektrum ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) von Coeligosin E (37)

## A.7 Massenspektren der Prodigiosine

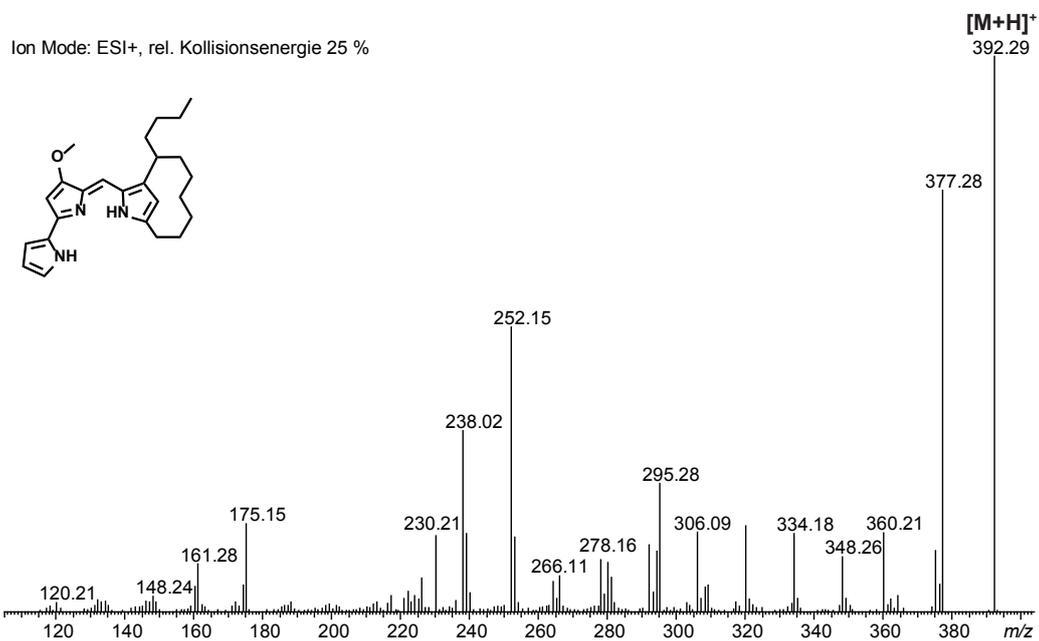


Abbildung A.41: ESI-MS<sup>2</sup>-Massenspektrum des Quasimoleküls  $[M+H]^+ = 392$  von Streptorubin B (14)

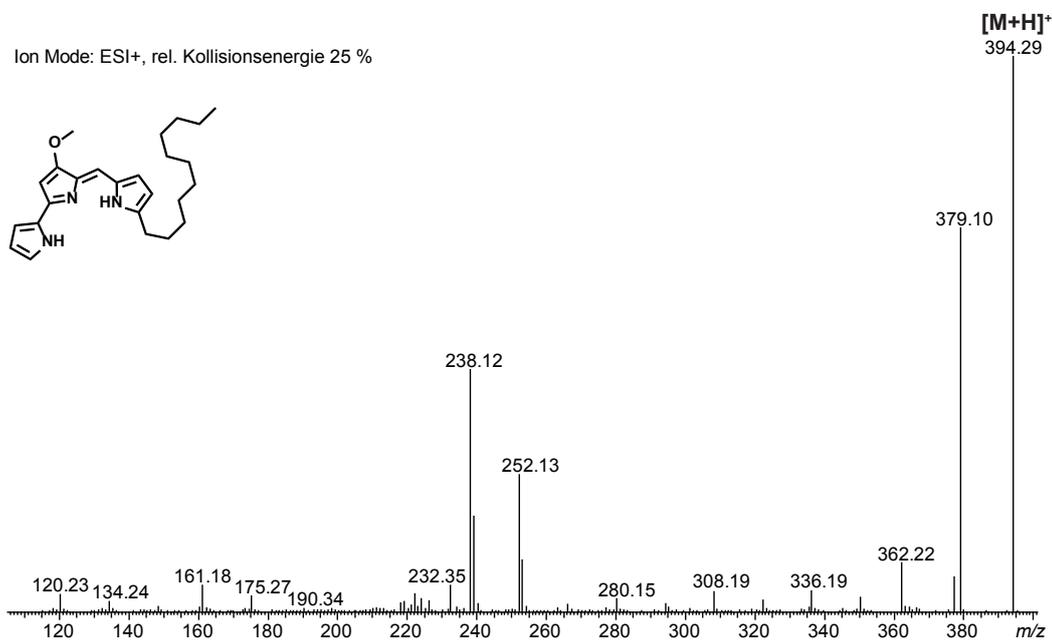


Abbildung A.42: ESI-MS<sup>2</sup>-Massenspektrum des Quasimoleküls  $[M+H]^+ = 394$  von Undecylprodigiosin (13)

## A.8 Massenspektren der Coeligiosine

Ion Mode: ESI+, rel. Kollisionsenergie 35 %

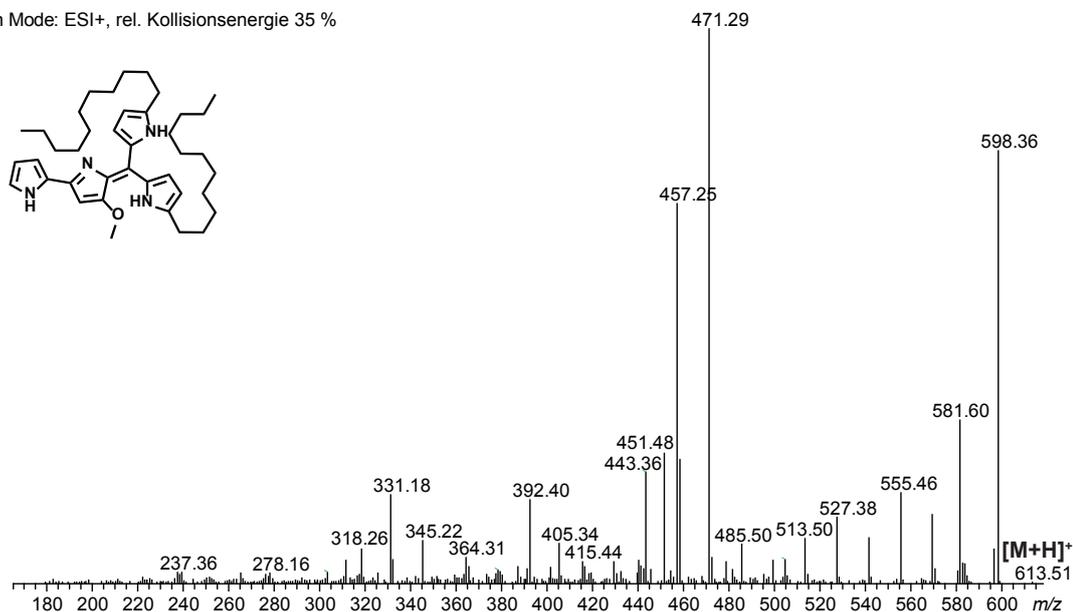


Abbildung A.43: ESI-MS<sup>2</sup>-Massenspektrum des Quasimoleküls  $[M+H]^+ = 613$  von Coeligiosin A (33)

Ion Mode: ESI+, rel. Kollisionsenergie 25 %

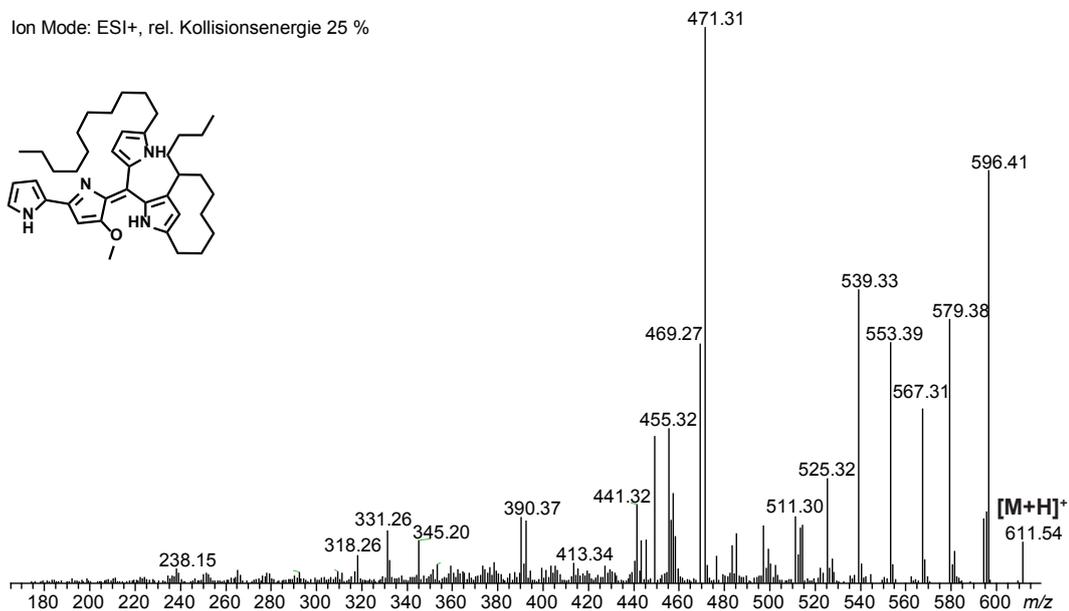


Abbildung A.44: ESI-MS<sup>2</sup>-Massenspektrum des Quasimoleküls  $[M+H]^+ = 611$  von Coeligiosin B (34)

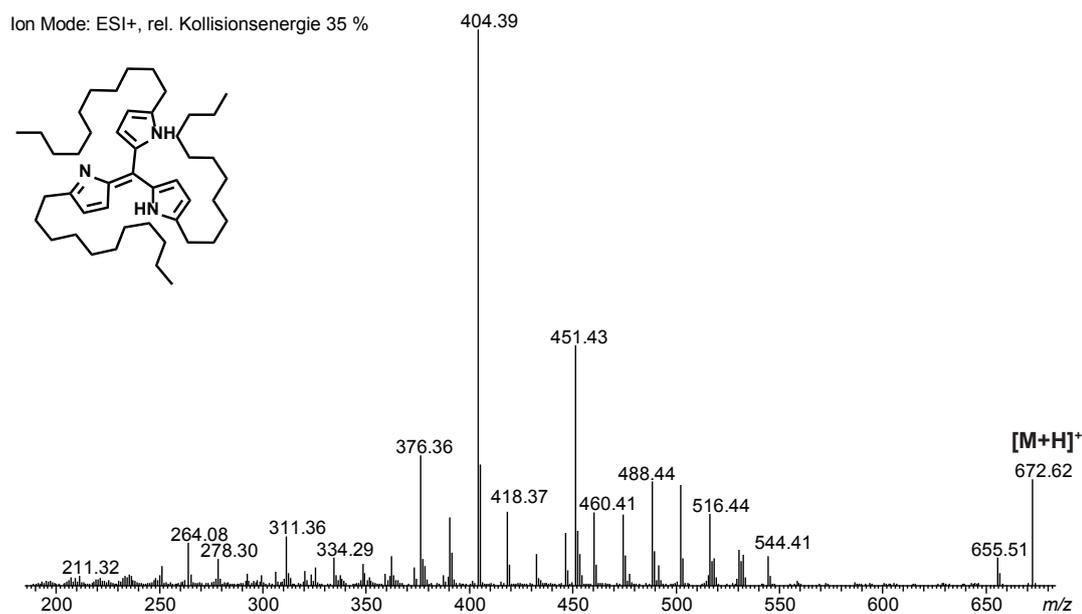


Abbildung A.45: ESI-MS<sup>2</sup>-Massenspektrum des Quasimoleküls  $[M+H]^+ = 672$  von Coeligosin C (35)

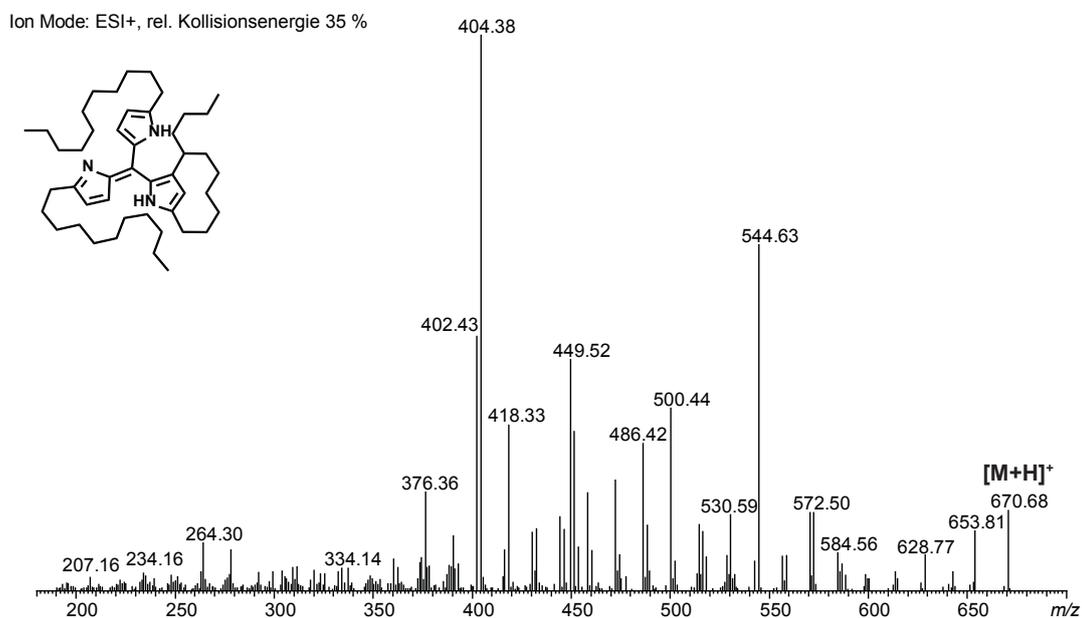


Abbildung A.46: ESI-MS<sup>2</sup>-Massenspektrum des Quasimoleküls  $[M+H]^+ = 670$  von Coeligosin D (36)

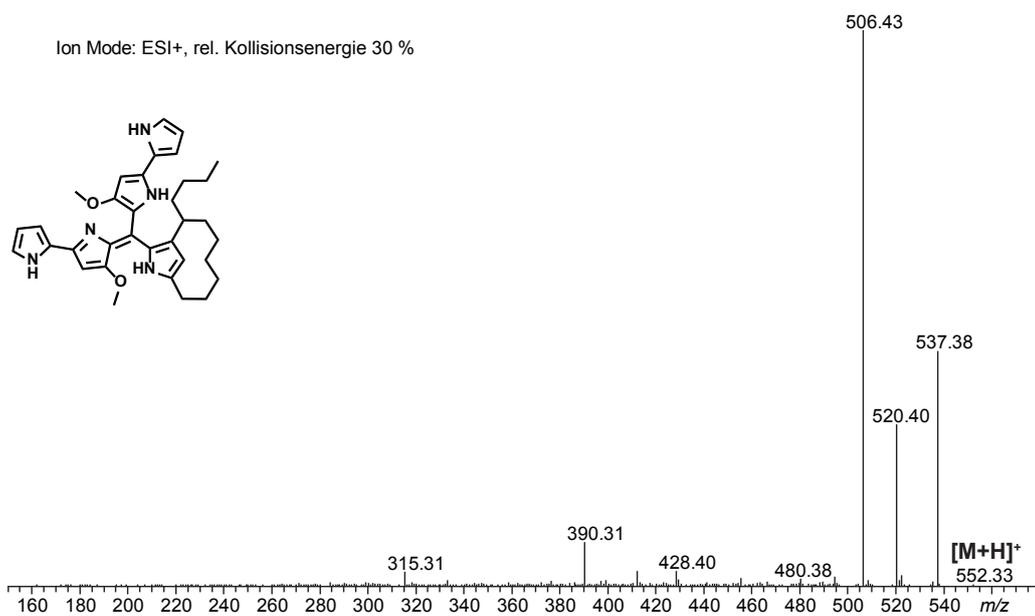


Abbildung A.47: ESI-MS<sup>2</sup>-Massenspektrum des Quasimoleküls  $[M+H]^+ = 552$  von Coeligosin E (37)

## A.9 Massenspektren von Syntheseprodukten

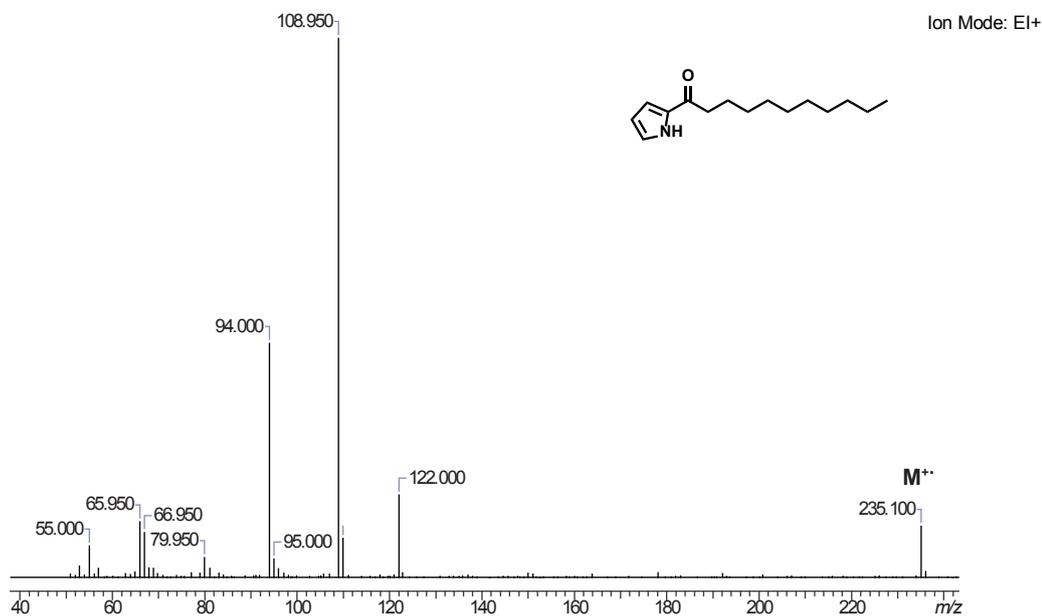


Abbildung A.48: EI-Massenspektrum von 2-Undecanoylpyrrol (45)

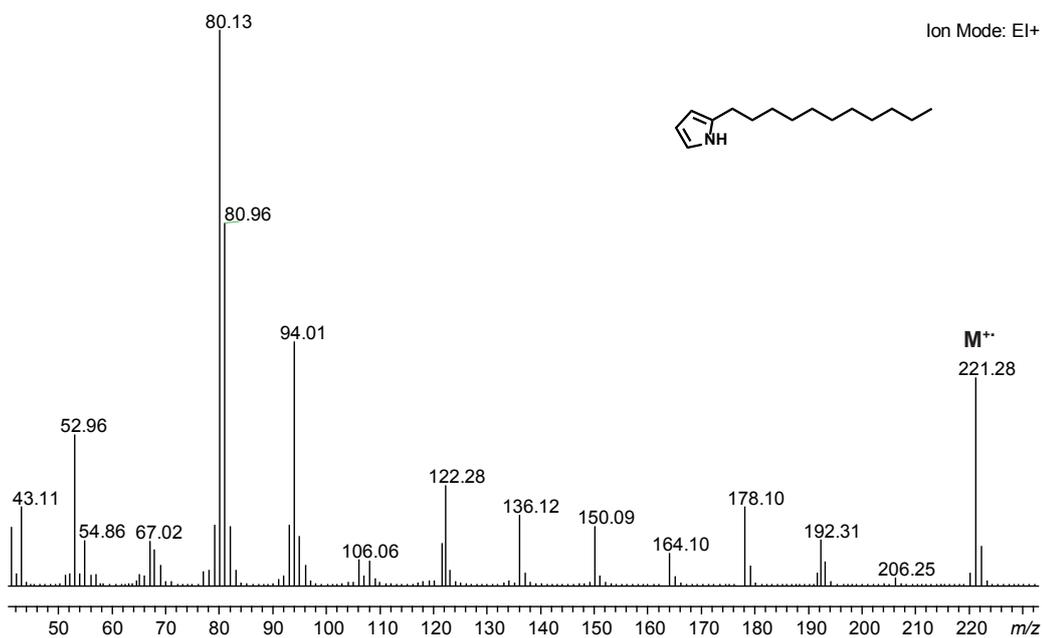


Abbildung A.49: EI-Massenspektrum von 2-Undecylpyrrol (27)

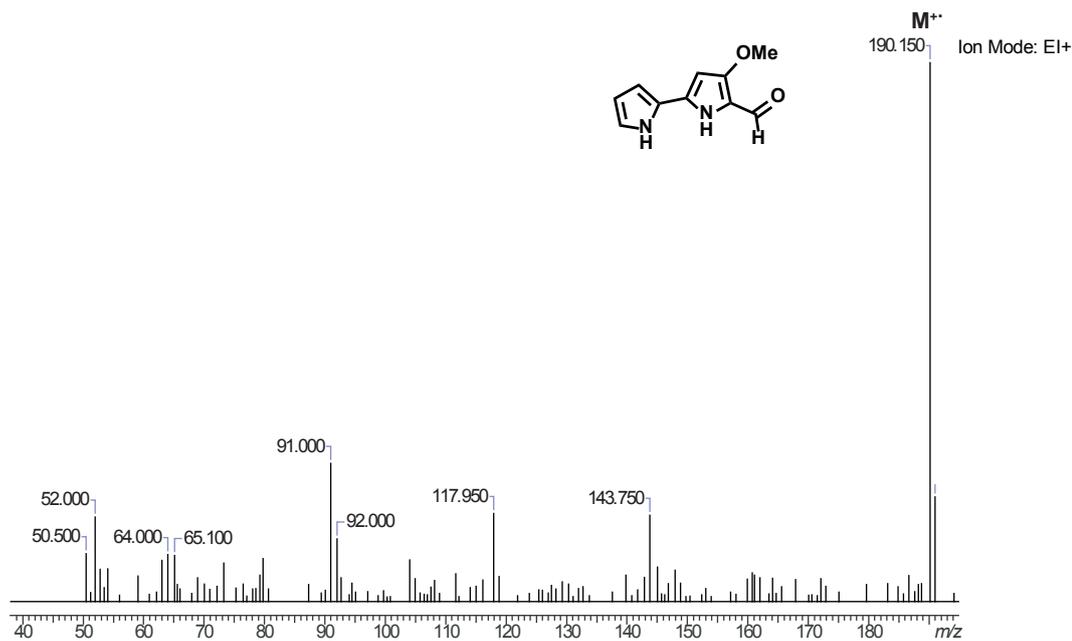


Abbildung A.50: EI-Massenspektrum von 4-Methoxy-2,2'-bipyrrrol-5-carboxyaldehyd (26)

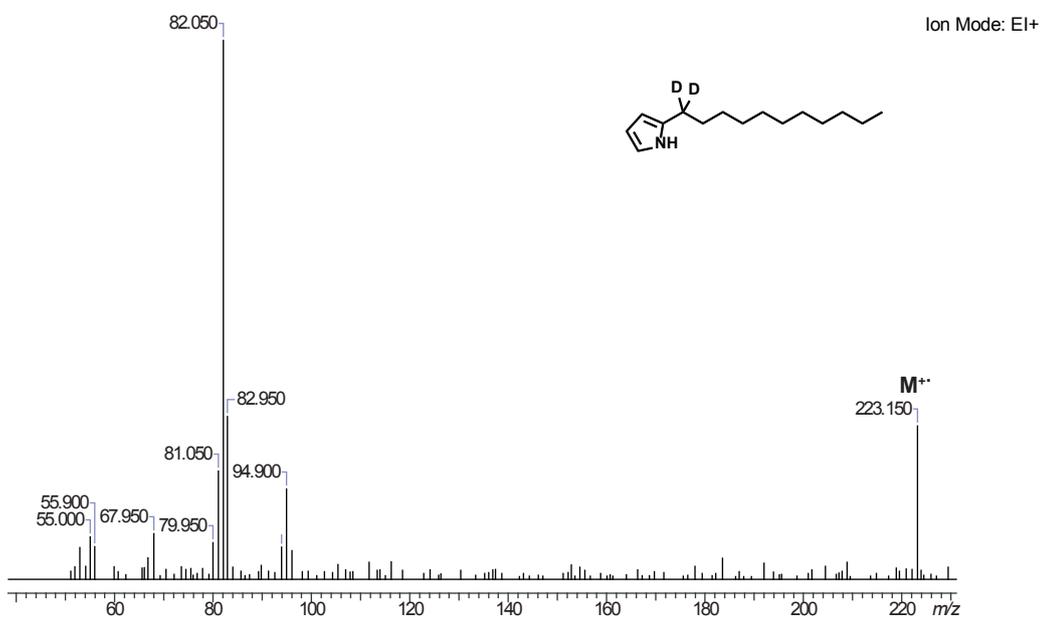


Abbildung A.51: EI-Massenspektrum von [1',1'-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-2-Undecylpyrrol (46)

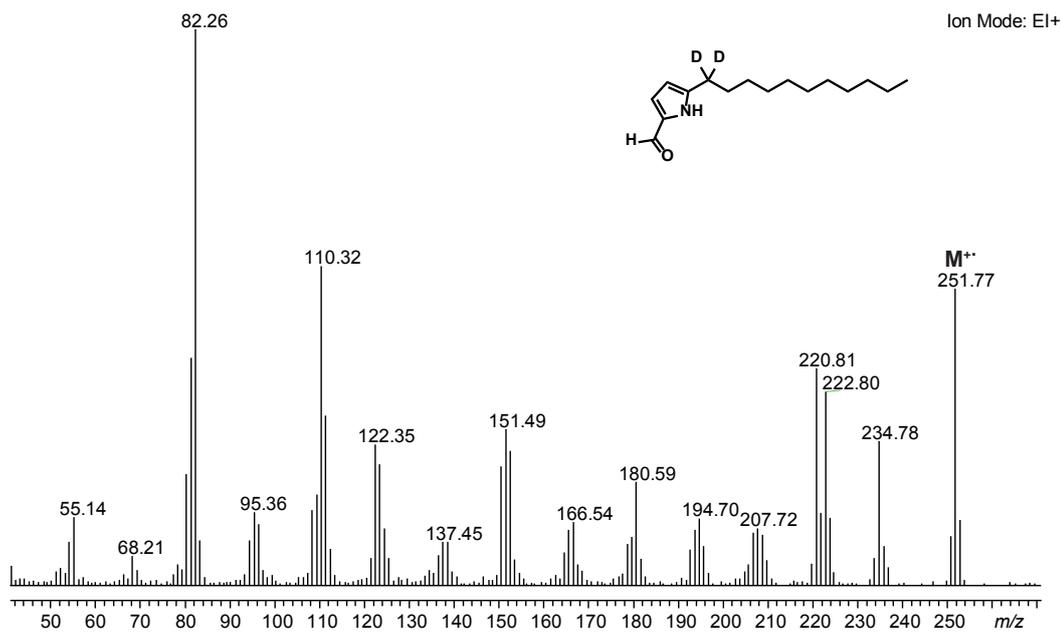


Abbildung A.52: EI-Massenspektrum von [1',1'-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]5-Undecylpyrrol-2-carboxyaldehyd (58)

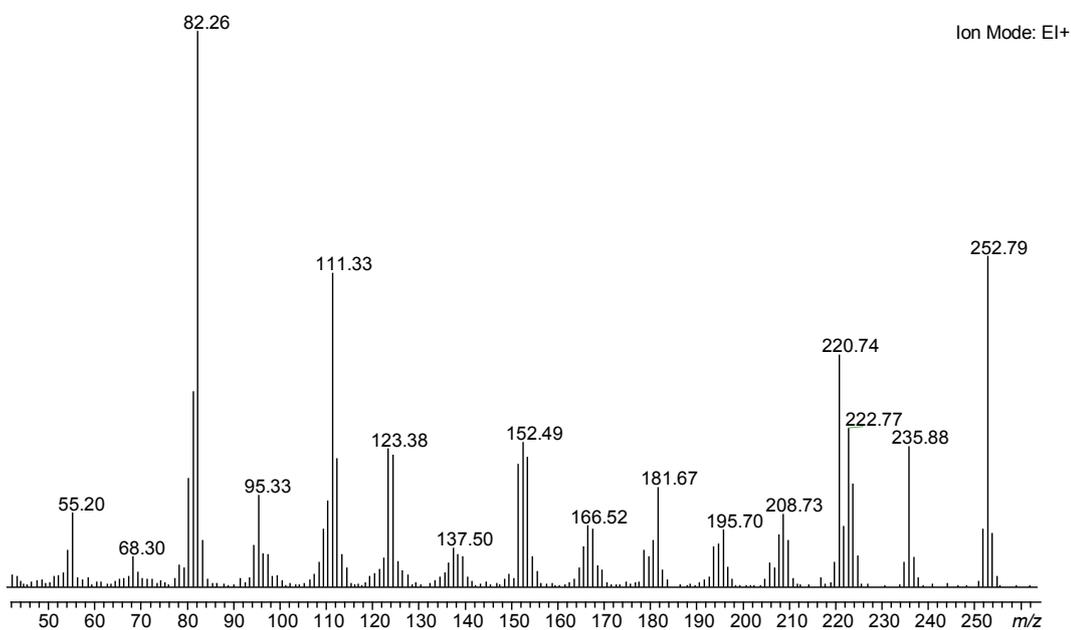


Abbildung A.53: EI-Massenspektrum von [Formyl-<sup>13</sup>C, 1',1'-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]5-Undecylpyrrol-2-carboxyaldehyd (60)

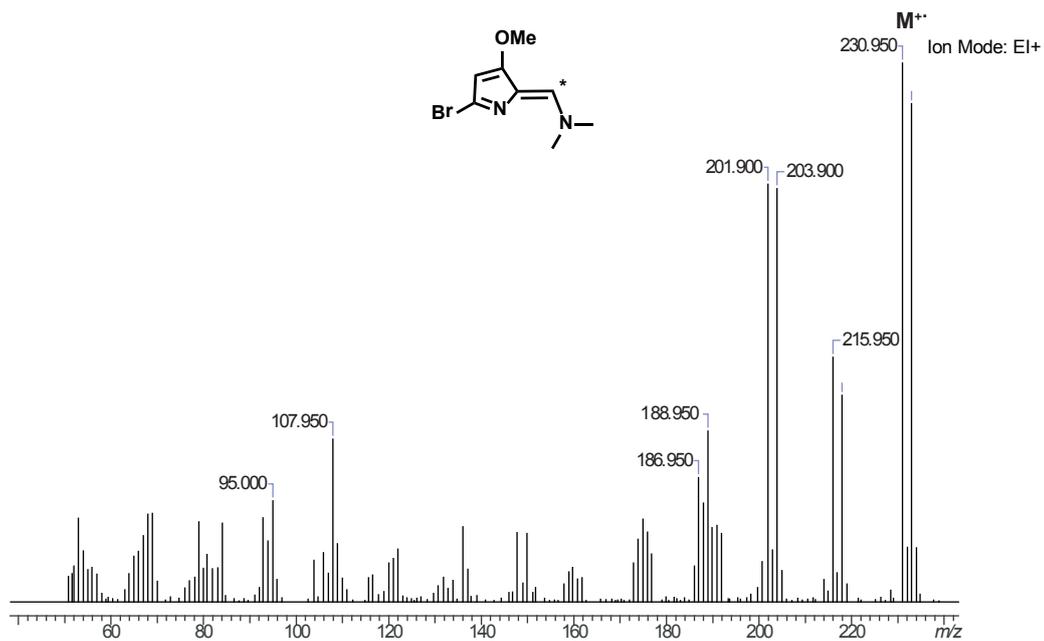


Abbildung A.54: EI-Massenspektrum von [8-<sup>13</sup>C]-N-((5-Bromo-3-methoxy-2H-pyrrol-2-ylidene)methyl)-N-methylmethanamin (63)

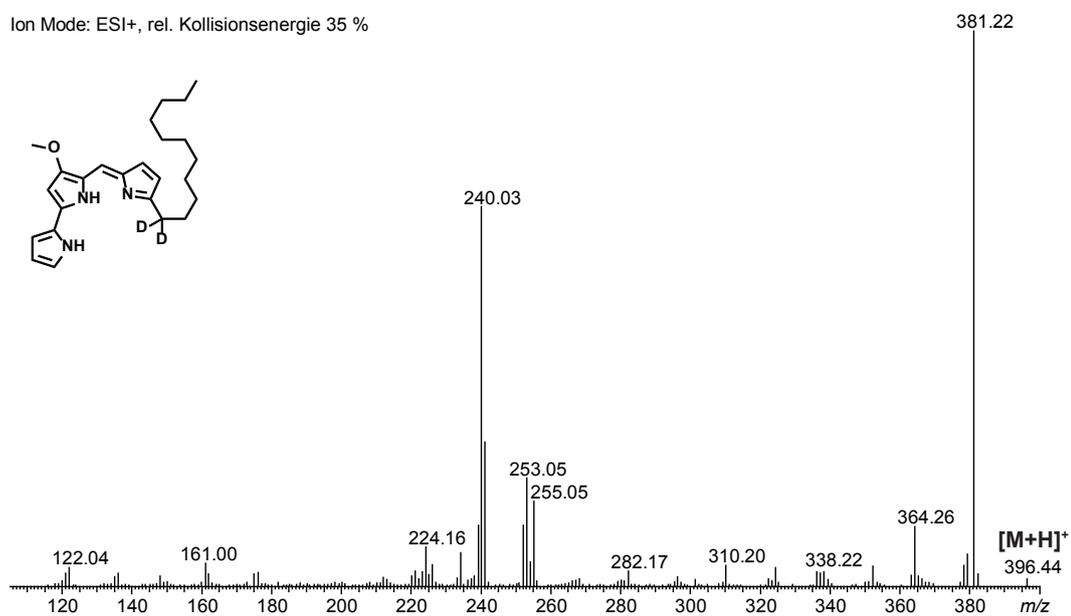


Abbildung A.55: ESI-MS<sup>2</sup>-Massenspektrum des Quasimoleküls [M+H]<sup>+</sup> = 396 von [1',1'-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-Undecylprodigiosin (56)

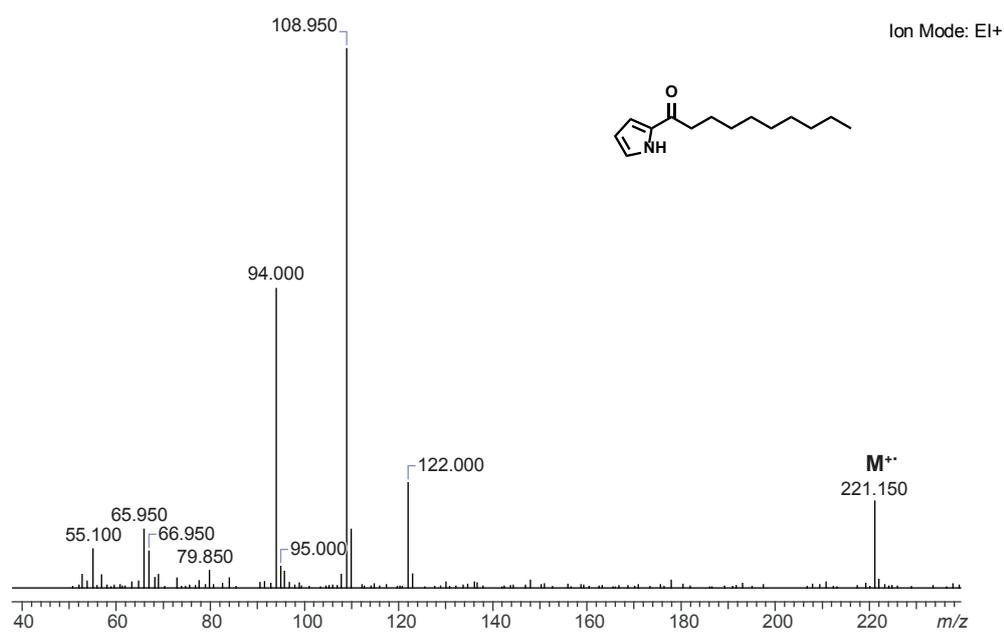


Abbildung A.56: EI-Massenspektrum von 2-Decanoylpyrrol (65)

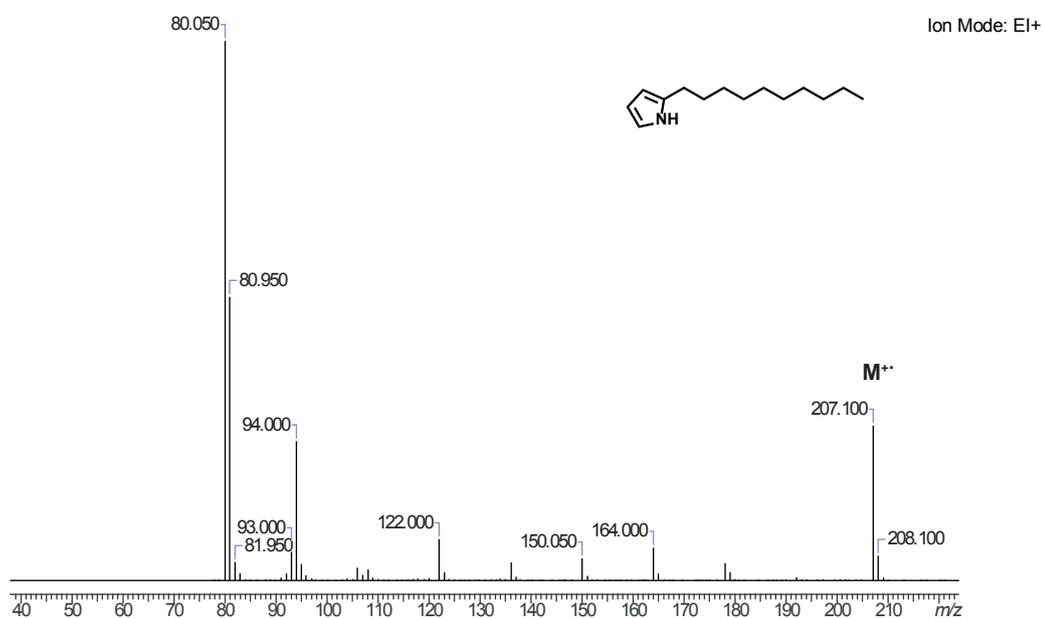


Abbildung A.57: EI-Massenspektrum von 2-Decylpyrrol (66)

## A.10 Massenspektren der flüchtigen Verbindungen des roten Phänotyps

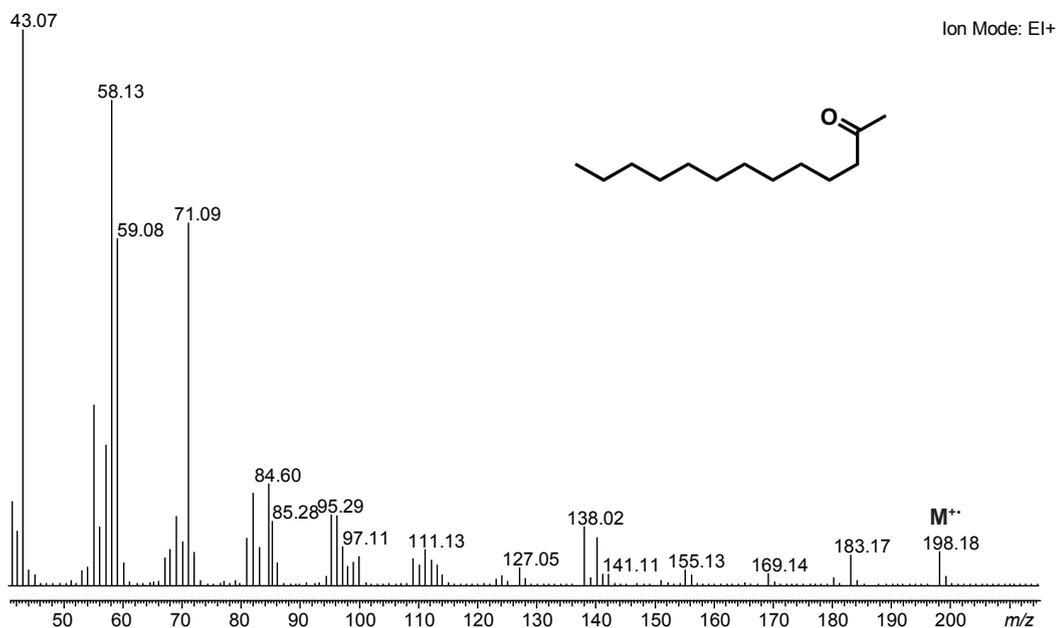


Abbildung A.58: EI-Massenspektrum von Tridecan-2-on (47)

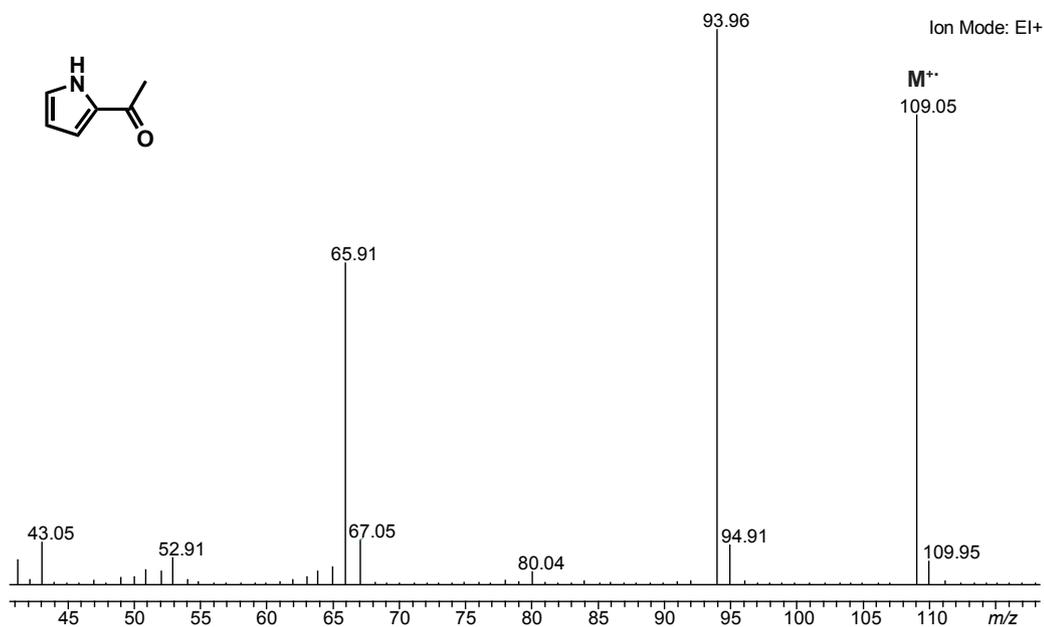


Abbildung A.59: EI-Massenspektrum von 2-Acetylpyrrol (48)

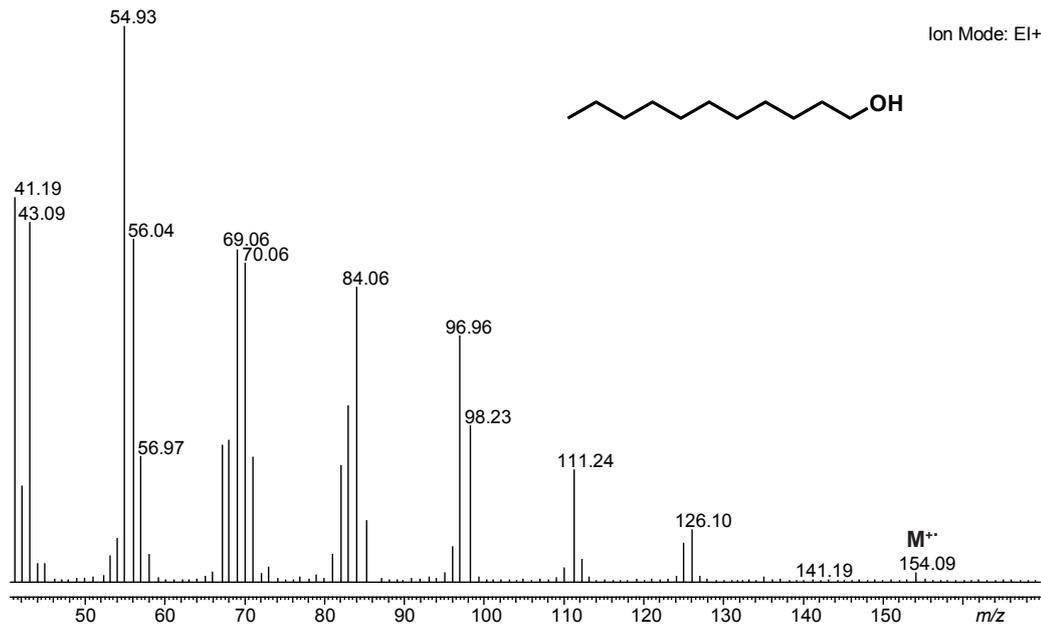


Abbildung A.60: EI-Massenspektrum von Undecanol (50)

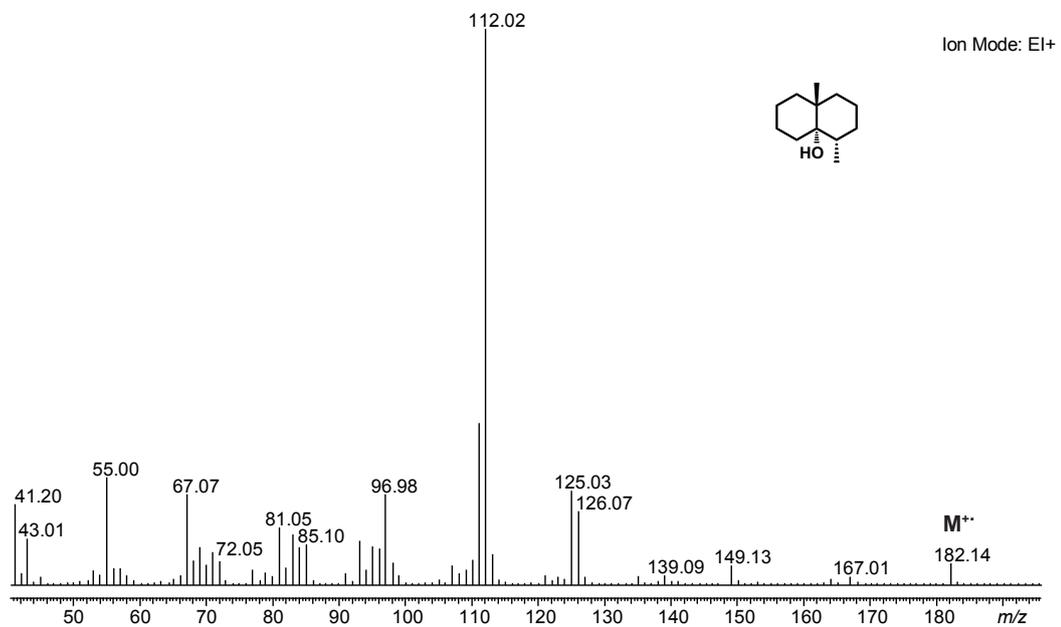
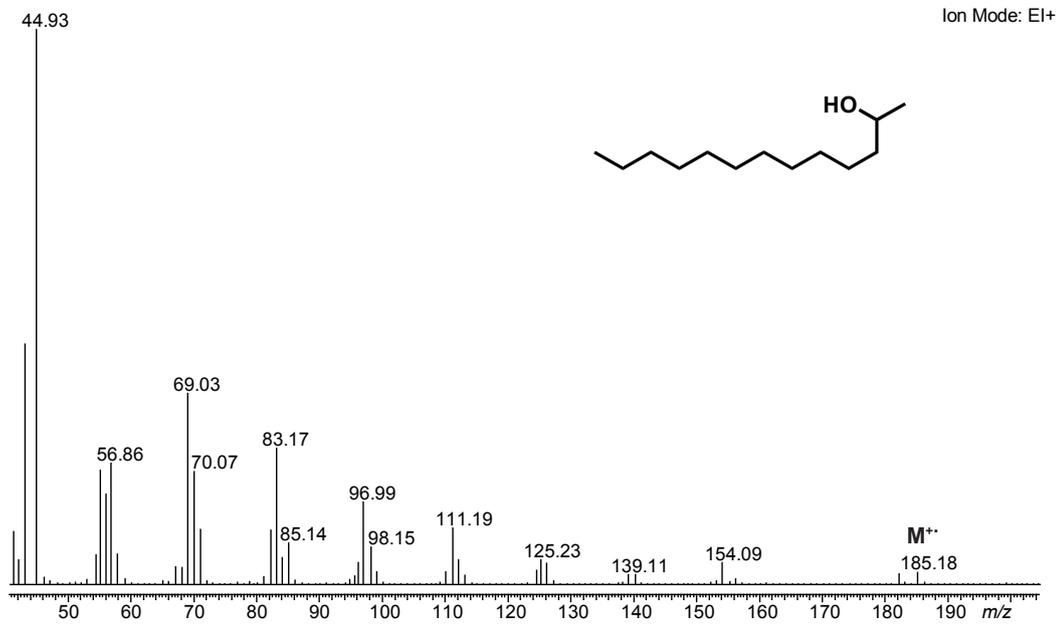
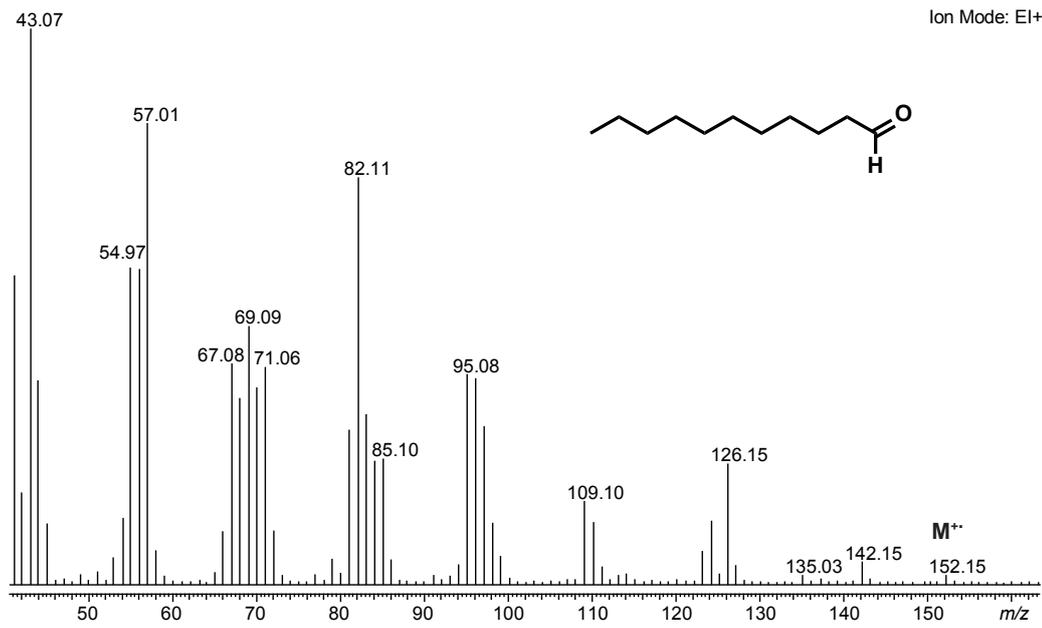


Abbildung A.61: EI-Massenspektrum von Geosmin (17)



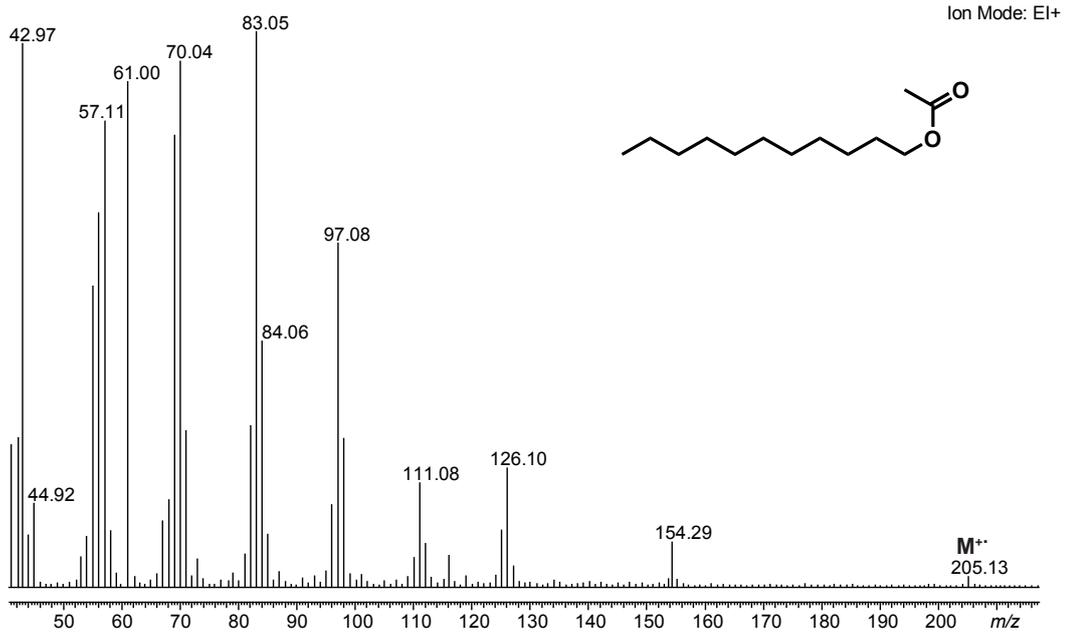


Abbildung A.64: EI-Massenspektrum von Undecylacetat (52)

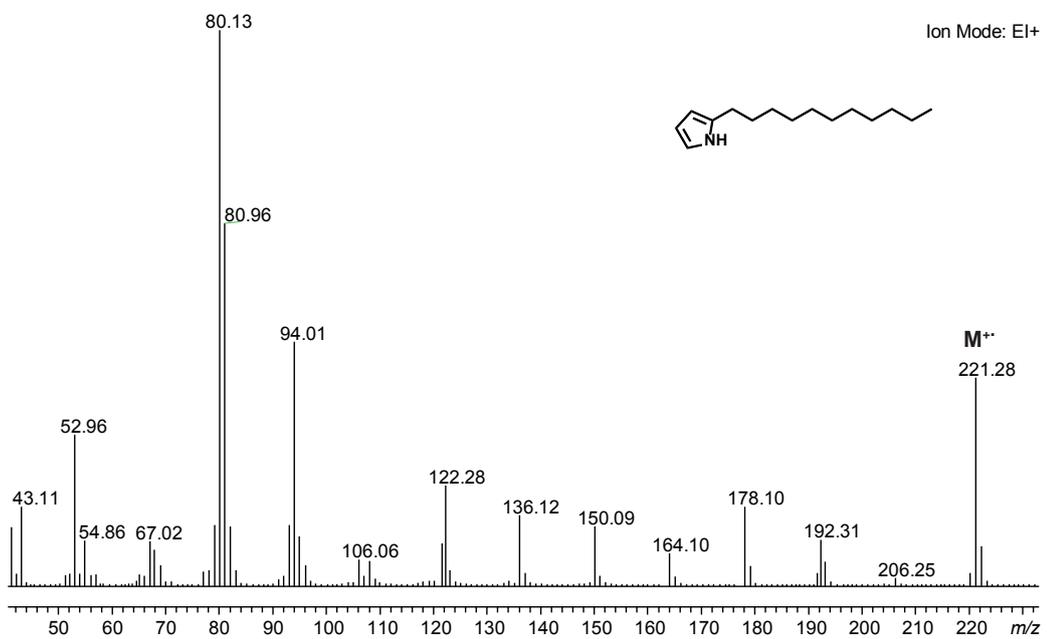


Abbildung A.65: EI-Massenspektrum von 2-Undecylpyrrol (27)

## A.11 UV-VIS und CD-Spektren

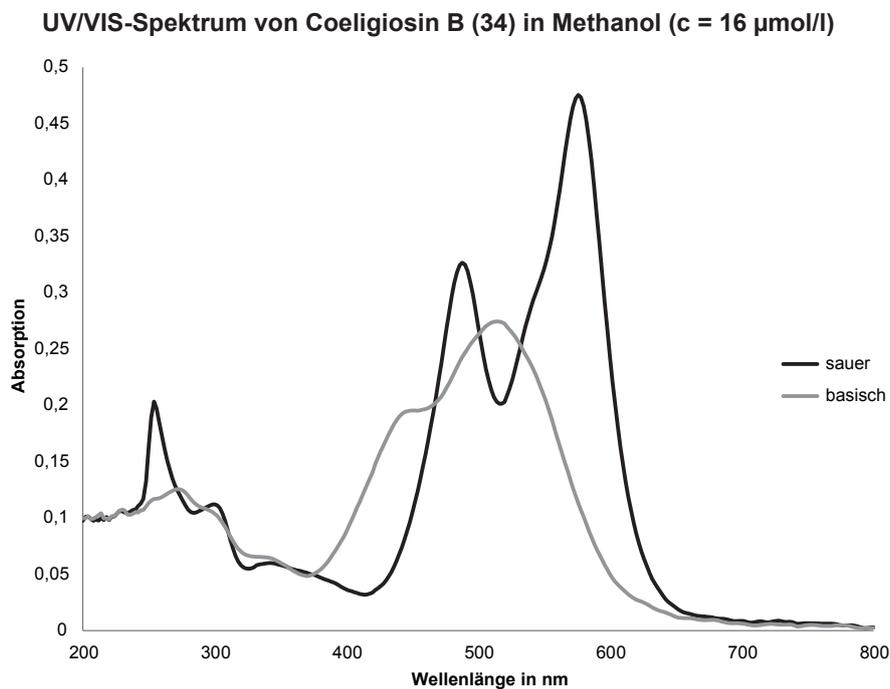


Abbildung A.66: UV/VIS - Spektrum von Coeligiosin B (34) in Methanol unter sauren und neutralen (schwarz) oder basischen (grau) Bedingungen

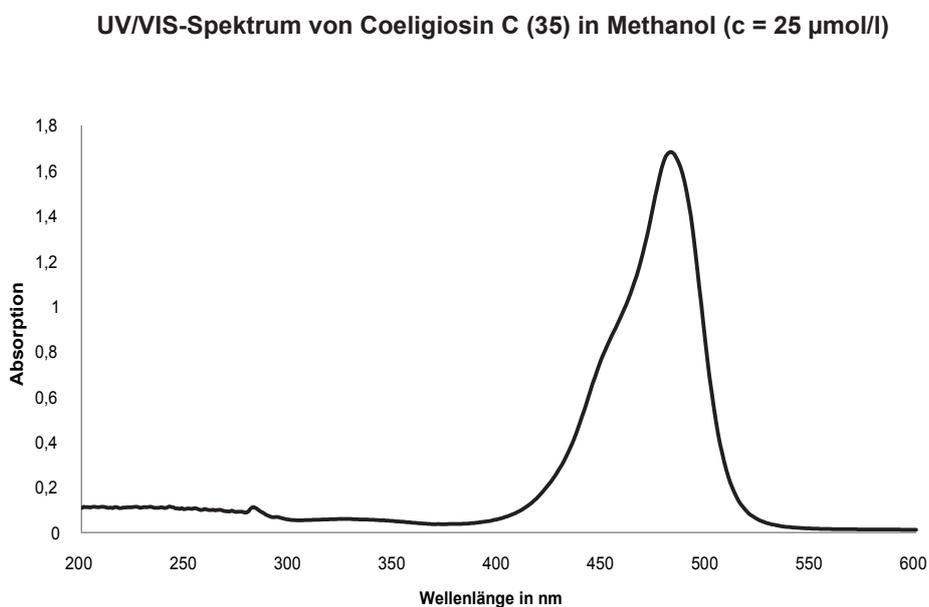


Abbildung A.67: UV/VIS - Spektrum von Coeligiosin C (34) in Methanol

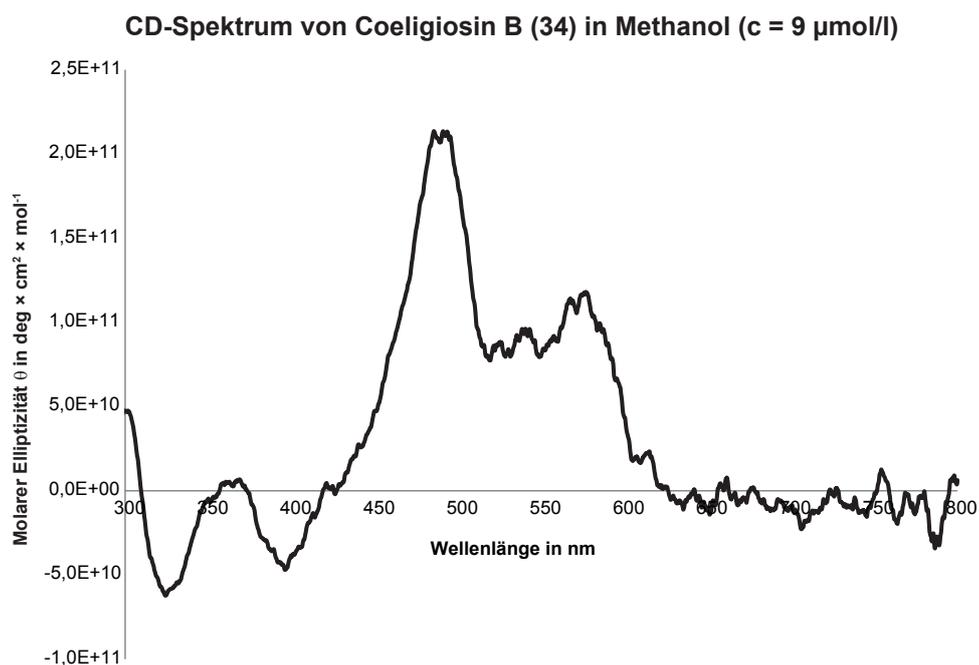


Abbildung A.68: CD - Spektrum von Coeligiosin B (34) in Methanol

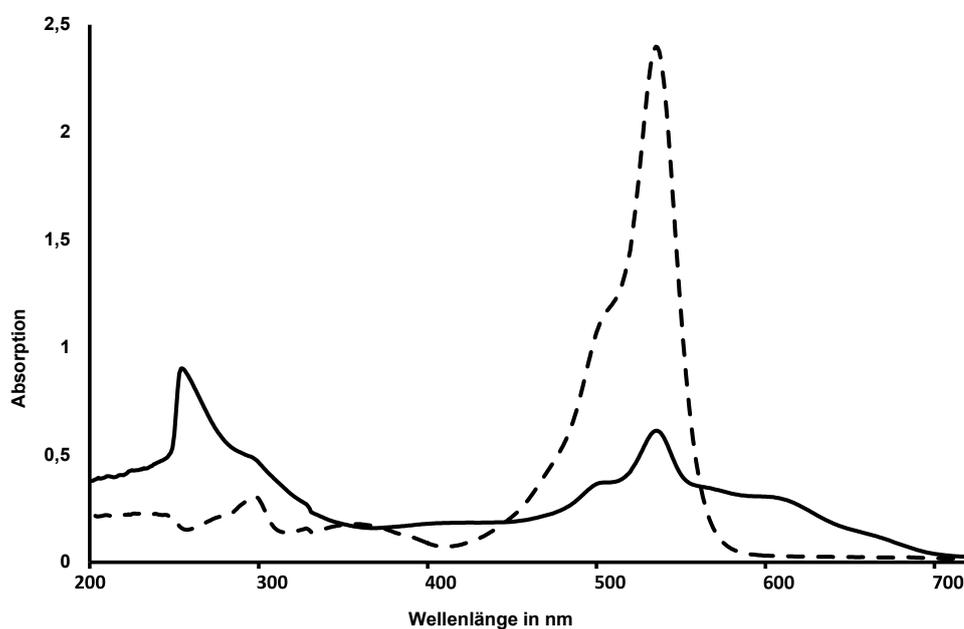


Abbildung A.69: UV/VIS-Spektrum von Streptorubin B (14) mit (schwarze Linie) und ohne (gestrichelte Linie) Zugabe von Kupferacetat.

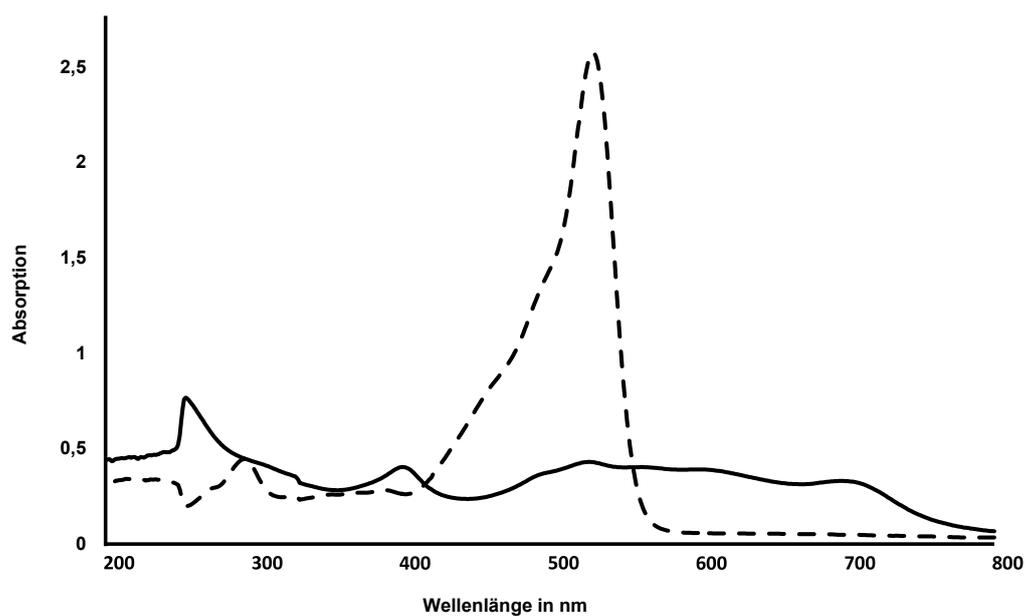
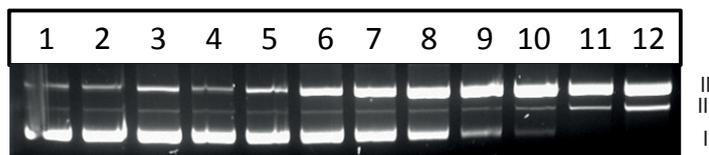
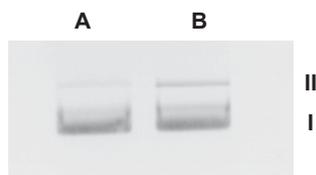


Abbildung A.70: UV/VIS-Spektrum von Undecylprodigiosin (13) mit (schwarze Linie) und ohne (gestrichelte Linie) Zugabe von Kupferacetat.

## A.12 DNA cleavage Assay

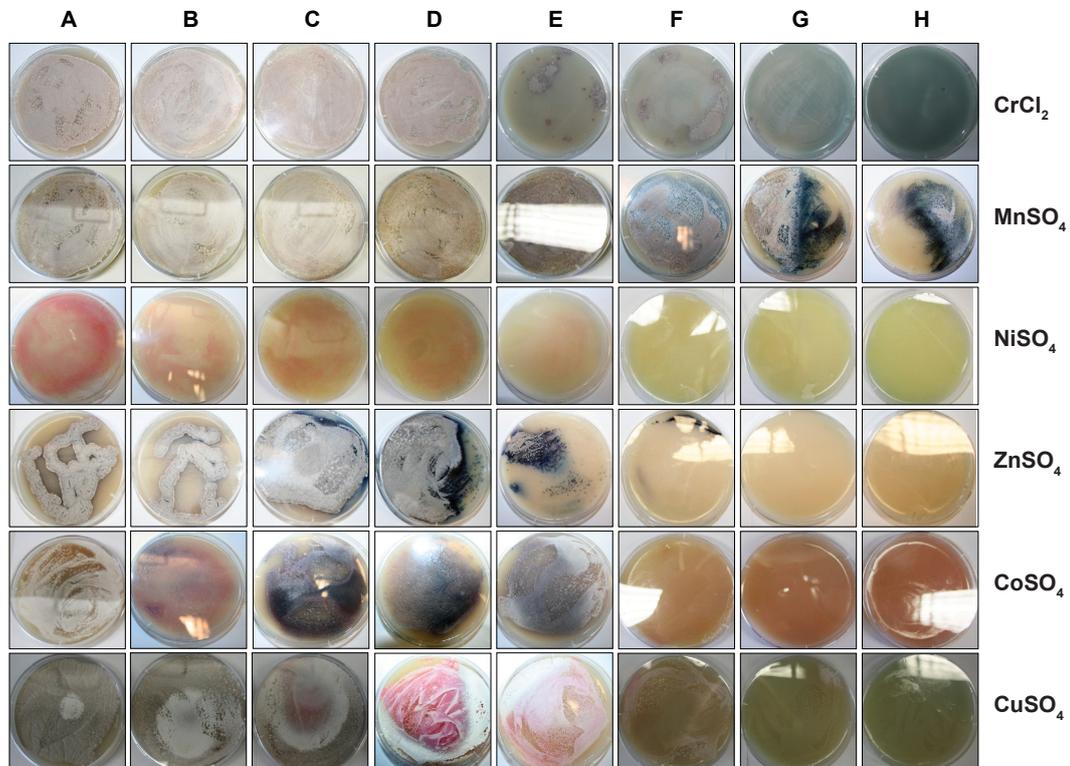


**Abbildung A.71: Restriktion doppelsträngiger Plasmid-DNA durch *in vitro* erzeugte Undecylprodigiosin-Kupferionen-Komplexe.** Dabei wurde die Reaktion anhand der Umsetzung von verdrillter Plasmid-DNA (I) zu Plasmid-DNA mit Einzelstangbrüchen (II) zu linearisierter Plasmid-DNA (III) auf einem Agarosegel analysiert. Ansätze aus Plasmid-DNA, Undecylprodigiosin (**13**) und Kupfer(II)acetat wurden in MOPS Puffer und 10 % Acetonitril für 0, 10, 20, 30, 40, 60, 90, 180 und 300 Minuten (4-12) bei 37 °C inkubiert. Die Ansätze 1-3 wurden für 300 Minuten bei 37 °C inkubiert und enthielten nur Plasmid-DNA (1), keine Kupfer(II)-Ionen (2) oder kein Undecylprodigiosin (**13**) (3)

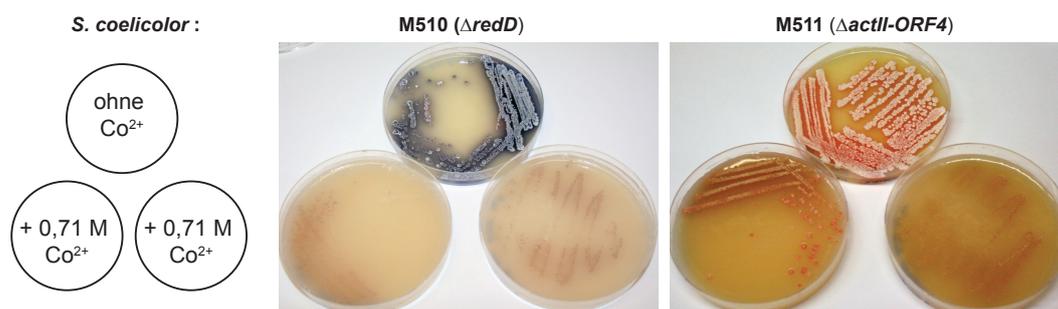


**Abbildung A.72: Restriktion doppelsträngiger Plasmid-DNA durch *in vitro* erzeugte Coeligosin C-Kupferionen-Komplexe nach 5 h.** Dabei wurde die Reaktion anhand der Umsetzung von verdrillter Plasmid-DNA (I) zu Plasmid-DNA mit Einzelstangbrüchen (II) hin zu linearisierter Plasmid-DNA (III) auf einem Agarosegel analysiert. Ansätze aus Plasmid-DNA, Coeligosin C (**35**) und Kupfer(II)acetat wurden in MOPS Puffer und 10 % Acetonitril für 300 Minuten (B) bei 37 °C inkubiert. Ansatz A wurde für 300 Minuten bei 37 °C inkubiert und enthielten nur Plasmid-DNA.

### A.13 *S. coelicolor* unter dem Einfluss verschiedener Schwermetallionen



**Abbildung A.73:** *S. coelicolor* unter dem Einfluss verschiedener Schwermetallionen. 50 ml SFM-Agarplatten wurden mit den in Tab. 6.1 angegebenen Konzentrationen verschiedener Schwermetallionen versetzt und anschließend mit *S. coelicolor* M145 inokuliert. Die Platten wurden bei 28°C für 5 bis 7 Tage inkubiert und auf das Auftreten farbiger Kolonien untersucht.



**Abbildung A.74:** *S. coelicolor* M510 und M511 unter dem Einfluss von 7,1 mM  $\text{CoSO}_4$ . 50 ml SFM-Agarplatten wurden mit 500  $\mu\text{l}$  0,71 M  $\text{CoSO}_4$ -Lösung versetzt und anschließend mit *S. coelicolor* M510 (mitte) oder M511 (rechts) inokuliert. Die Platten wurden bei 28°C für 5 bis 7 Tage inkubiert und auf das Auftreten farbiger Kolonien untersucht. *S. coelicolor* M510 ( $\Delta\text{redD}$ ) zeigte nur blaue Phänotypen, *S. coelicolor* M511 ( $\Delta\text{actII-ORF4}$ ) zeigte nur rote Phänotypen unter Kobaltionenstress.

## A.14 Genexpression im roten Phänotyp über 10 Tage

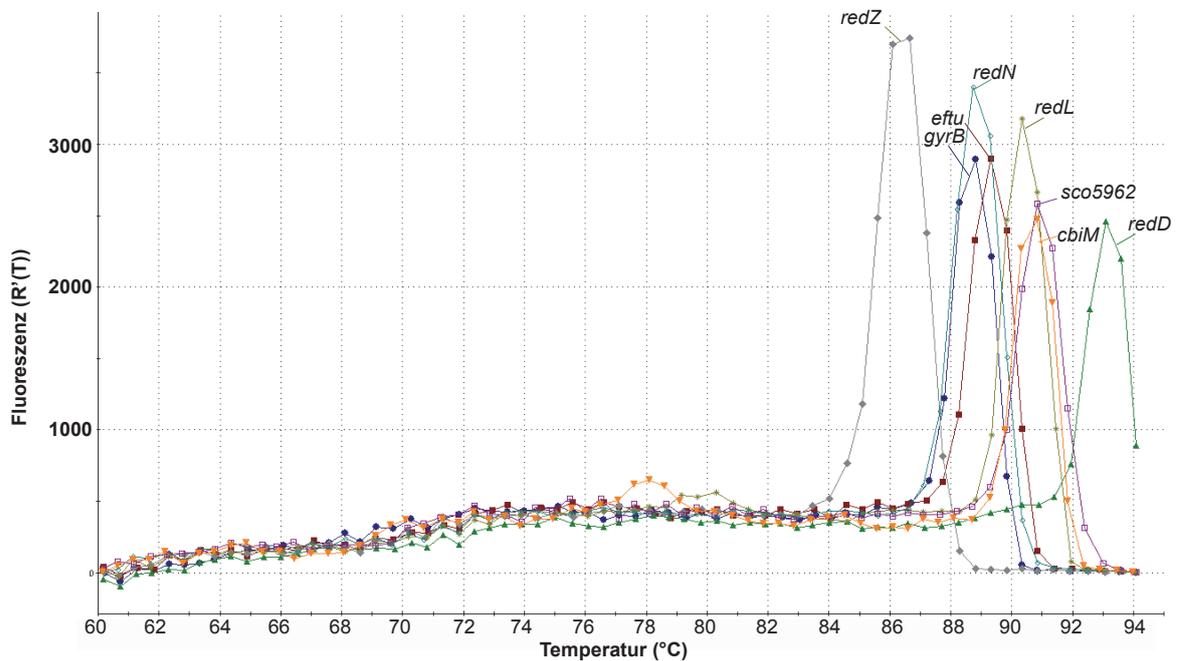


Abbildung A.75: Schmelzpunktanalyse. Schmelzkurven der amplifizierten Genfragmente aus *redD*, *redZ*, *redL*, *redN*, *sco5962* und *cbiM* aus *S. coelicolor*

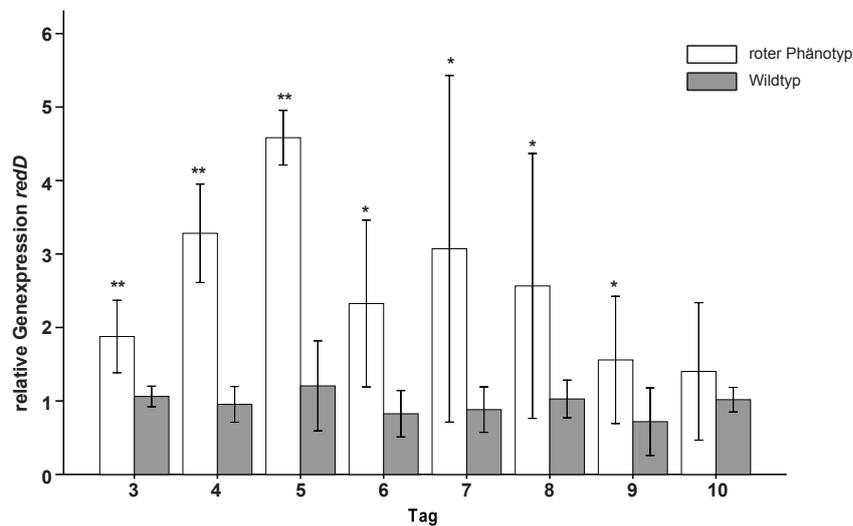
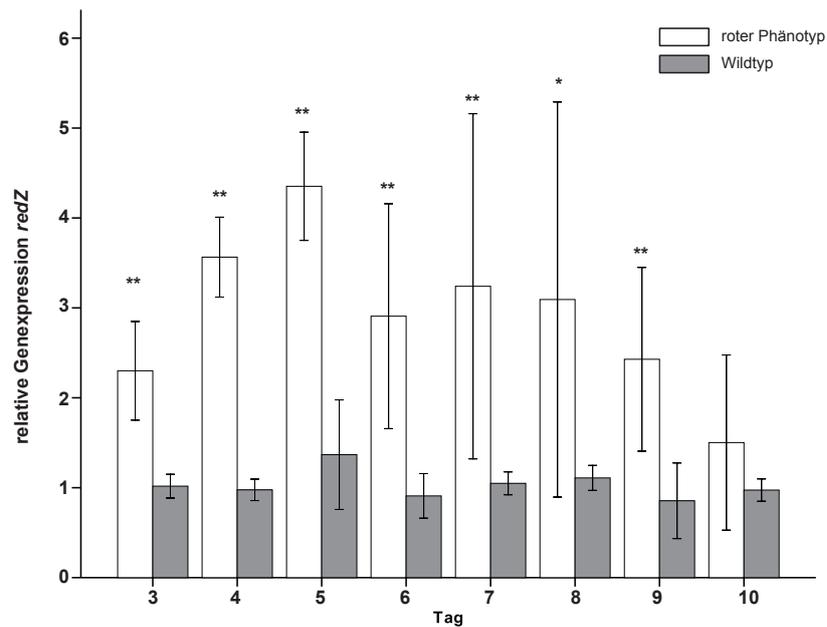
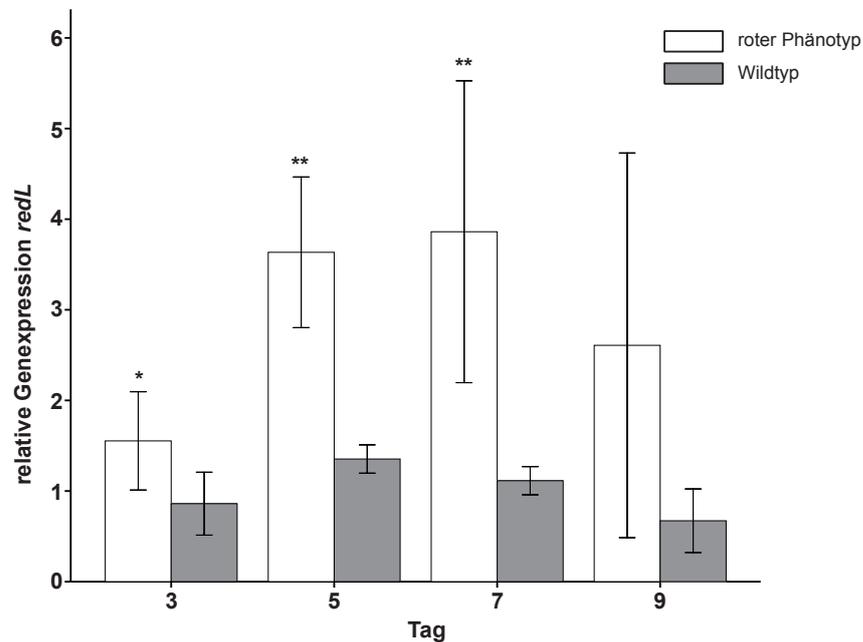


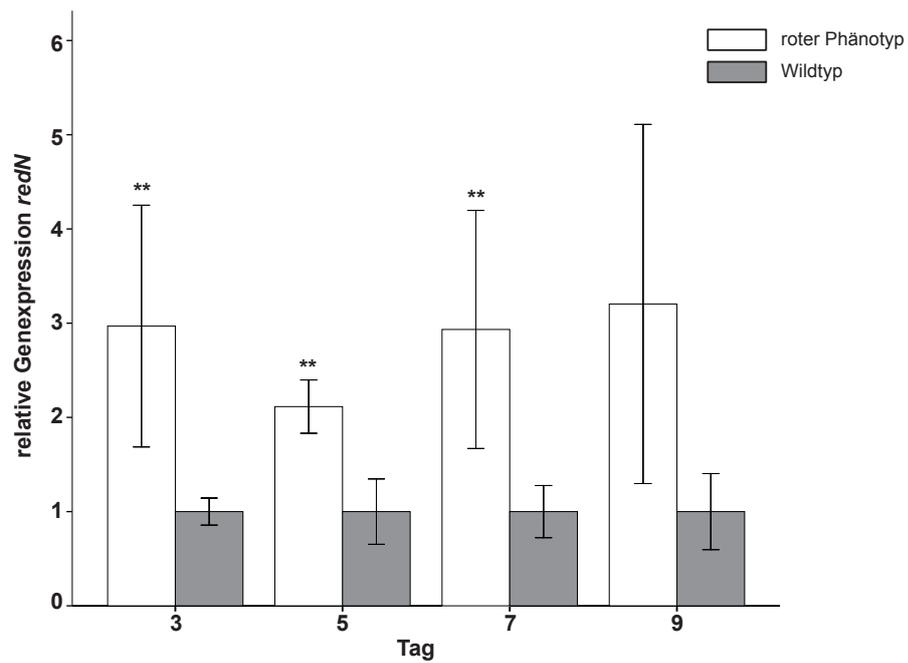
Abbildung A.76: Regulation von *redD* im roten Phänotyp und im Wildtyp über 10 Tage. Jeweils 3 Replikate vom roten Phänotyp und Wildtyp wurden hinsichtlich des Expressionslevels von *redD* über 10 Tage mit qPCR untersucht. Signifikanzlevel gegenüber dem Wildtyp: \*  $P \leq 0,05$ , \*\*  $P \leq 0,01$



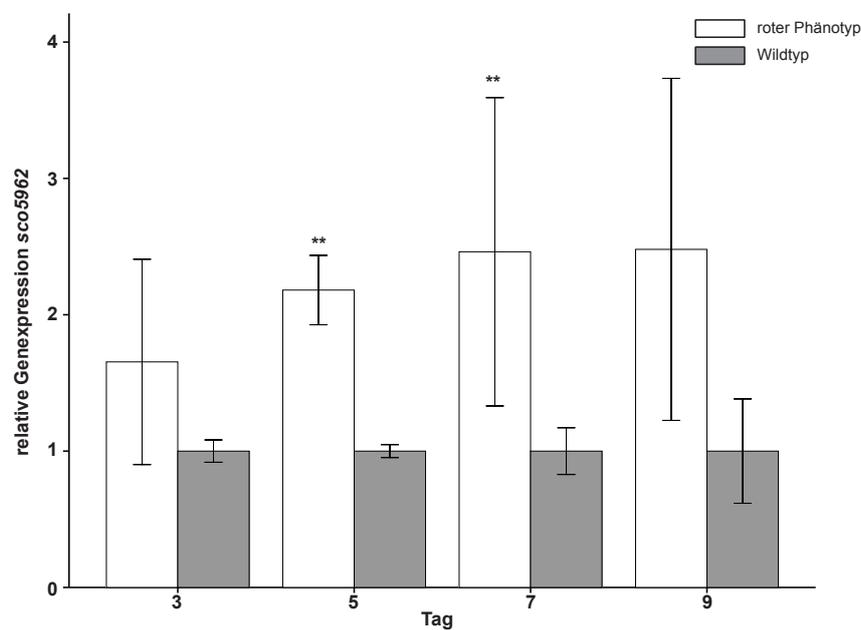
**Abbildung A.77: Regulation von *redZ* im roten Phänotyp und im Wildtyp über 10 Tage.** Jeweils 3 Replikate vom roten Phänotyp und Wildtyp wurden hinsichtlich des Expressionslevels von *redZ* über 10 Tage mit qPCR untersucht. Signifikanzlevel gegenüber dem Wildtyp: \*  $P \leq 0,05$ , \*\*  $P \leq 0,01$



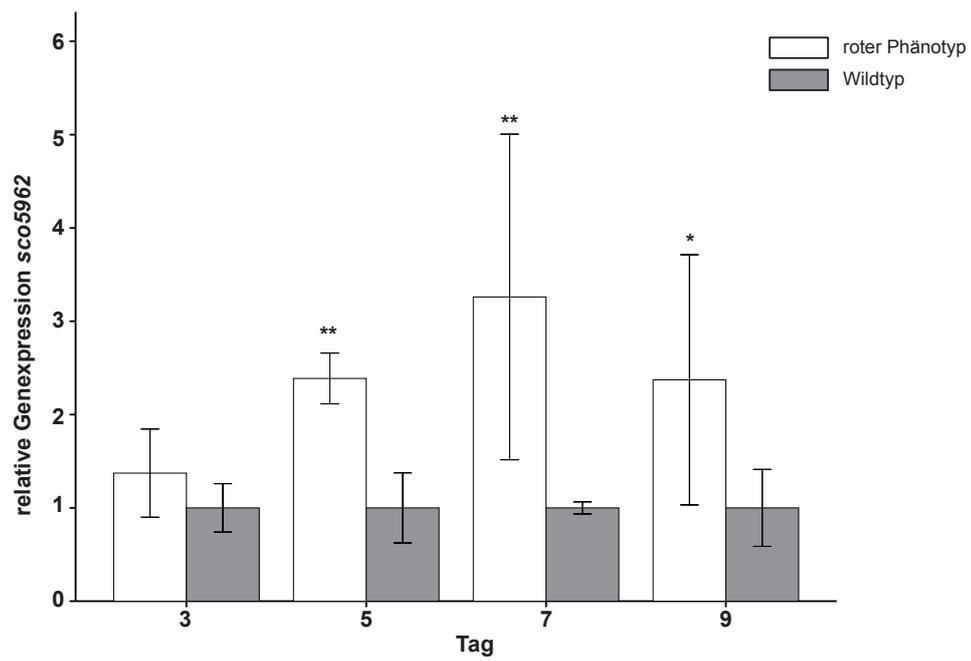
**Abbildung A.78: Regulation von *redL* im roten Phänotyp und im Wildtyp über 10 Tage.** Jeweils 3 Replikate vom roten Phänotyp und Wildtyp wurden hinsichtlich des Expressionslevels von *redL* über 10 Tage (stichprobenartig an den Tage 3, 5, 7 und 9) mit qPCR untersucht. Signifikanzlevel gegenüber dem Wildtyp: \*  $P \leq 0,05$ , \*\*  $P \leq 0,01$



**Abbildung A.79: Regulation von *redN* im roten Phänotyp und im Wildtyp über 10 Tage.** Jeweils 3 Replikate vom roten Phänotyp und Wildtyp wurden hinsichtlich des Expressionslevels von *redN* über 10 Tage (stichprobenartig an den Tage 3, 5, 7 und 9) mit qPCR untersucht. Signifikanzlevel gegenüber dem Wildtyp: \*  $P \leq 0,05$ , \*\*  $P \leq 0,01$



**Abbildung A.80: Regulation von *sco5962* im roten Phänotyp und im Wildtyp über 10 Tage.** Jeweils 3 Replikate von roten Phänotyp und Wildtyp wurden hinsichtlich des Expressionslevels von *sco5962* über 10 Tage (stichprobenartig an den Tage 3, 5, 7 und 9) mit qPCR untersucht. Signifikanzlevel gegenüber dem Wildtyp: \*  $P \leq 0,05$ , \*\*  $P \leq 0,01$



**Abbildung A.81: Regulation von *cbiM* im roten Phänotyp und im Wildtyp über 10 Tage.** Jeweils 3 Replikate vom roten Phänotyp und Wildtyp wurden hinsichtlich des Expressionslevels von *cbiM* über 10 Tage (stichprobenartig an den Tage 3, 5, 7 und 9) mit qPCR untersucht. Signifikanzlevel gegenüber dem Wildtyp: \*  $P \leq 0,05$ , \*\*  $P \leq 0,01$

## A.15 Prodigiosin- und Coeligiosin-Derivate nach Verfütterung von Decylpyrrol

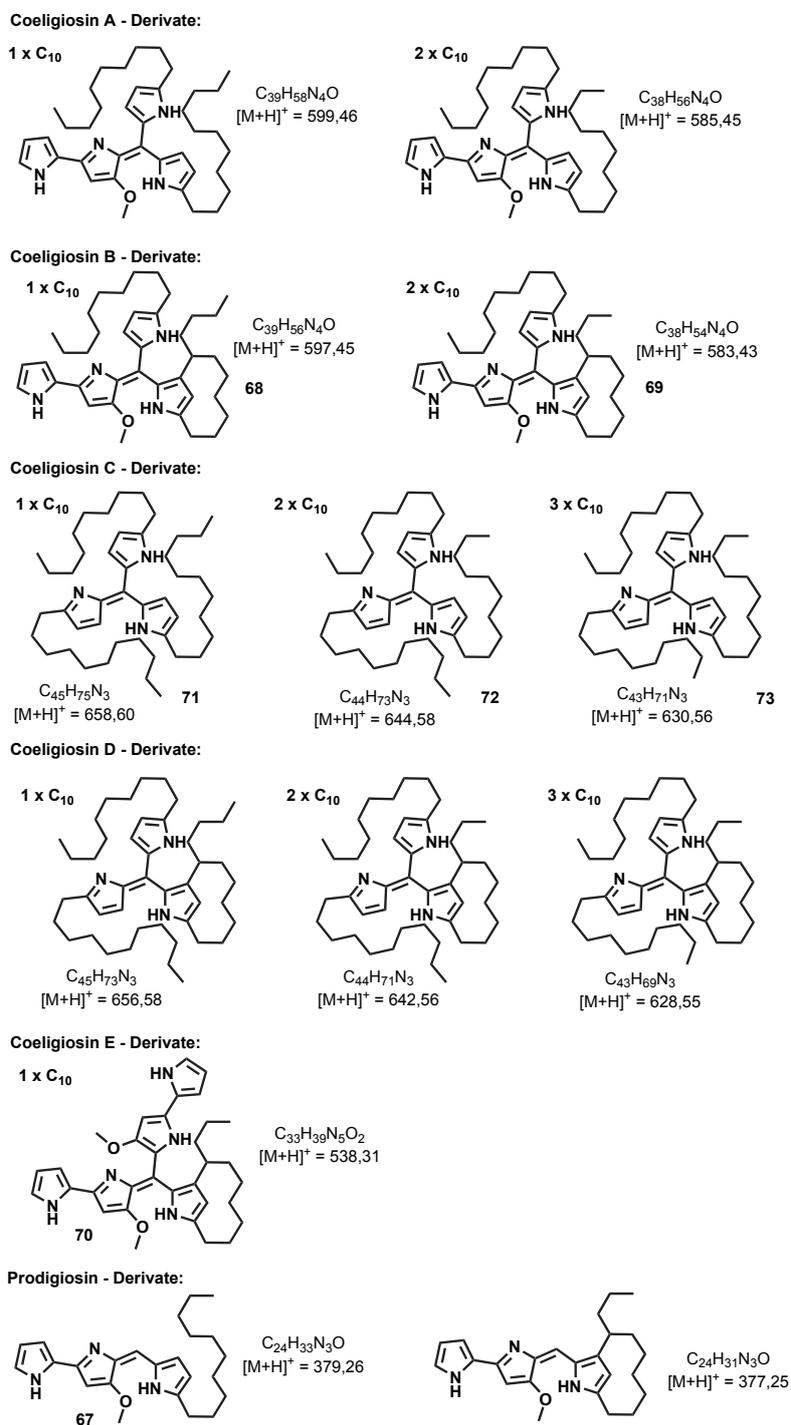


Abbildung A.82: Gefundene C<sub>10</sub>-Derivate nach Fütterung von 2-Decylpyrrol 66 an den roten Phänotyp. Es konnten sowohl rein aus 2-Decylpyrrol aufgebaute Coeligiosin-Derivate nachgewiesen werden, als auch 2-Undecyl- und 2-Decylpyrrol gemischte Coeligiosine.

## A.16 TFA-katalysierte biomimetische Reaktion von Ethylpyrrol (77) und 4-Methoxy-2,2'-bipyrrol-5-carboxyaldehyd (26)

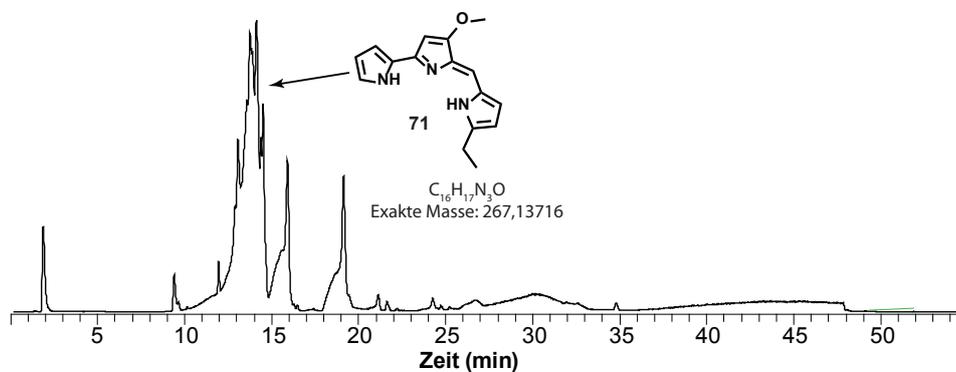


Abbildung A.83: Biomimetische Reaktion zwischen Ethylpyrrol (77) und 4-Methoxy-2,2'-bipyrrol-5-carboxyaldehyd (26) unter TFA-Katalyse. Es konnte Ethylprodigosin (78) als Reaktionsprodukt nachgewiesen werden, jedoch keine Coeligiosin-Derivate.

## B Lebenslauf

### Persönliche Daten

---

Name: Anne Morgenstern

E-Mail: amorgenstern@ice.mpg.de

Geburtsdatum: 06.05.1986

### Ausbildung

---

**1996-2004 Gymnasium Olbernhau**

**10/2004-09/2009 Studium der Chemie**

**Hochschule:** Technische Universität Dresden

**Diplomarbeit** am Institut für Biochemie der TU Dresden: „Molekulargenetische Untersuchungen zur Pyrroindomycin-Biosynthese in *Streptomyces rugosporus*“

**Abschluss:** Diplom-Chemikerin

**11/2009-10/2013 Promotion im Fachbereich Chemie**

am Max-Planck-Institut für Chemische Ökologie, Jena

## Wissenschaftliche Fachbeiträge

---

### Vorträge:

Morgenstern A., Behrend A., Spiteller D.

**Seeing more than red - Unexpected prodigiosin pigments in *Streptomyces coelicolor***

Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM) zusammen mit der Koninklijke Nederlandse Vereniging voor Microbiologie (KNVM), Bremen, Deutschland, März 2013

### Poster:

Morgenstern A., Spiteller D.

**Heavy metal ion stress induces secondary metabolism in *Streptomyces coelicolor***

SAB Meeting 2010, MPI for Chemical Ecology, Jena, Deutschland, Oktober 2010

Morgenstern A., Behrend A., Spiteller D.

**Changes in the metabolic profile of *Streptomyces coelicolor* under heavy metal ion stress**

14<sup>th</sup> International Symposium on Microbial Ecology (ISME), Kopenhagen, Dänemark, August 2012

## C Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Wilhelm Boland für die Möglichkeit, dass ich meine Dissertation in seiner Arbeitsgruppe anfertigen konnte, die stets vorhandene Diskussionsbereitschaft und fachliche Hilfe.

Prof. Dr. Dieter Spiteller danke ich vor allem für die Betreuung meiner Arbeit, die vielen hilfreichen Diskussionen und jede Menge nützlicher Tipps und Tricks. Für das Erlernen vieler neuer Methoden und Techniken und die Möglichkeit, die Arbeit nach meinen Interessen und Ideen voranzutreiben bin ich sehr dankbar.

Bei Herrn Prof. Dr. Georg Pohnert möchte ich mich ebenfalls für die Betreuung meiner Arbeit von Seiten der Friedrich-Schiller-Universität Jena und die vielen Anregungen in Bezug auf meine Arbeit bedanken.

Als Mitglied der *Jena School for Microbial Communication* (JSMC) danke ich Carsten Thoms, Ulrike Schleier und Katja Präfcke für alle administrativen Aufgaben, sowie allen Mitgliedern der JSMC für den Erfahrungs- und Wissensaustausch.

Prof. Michael Spiteller von der TU Dortmund möchte ich für die Messung der hochaufgelösten Massenspektren in seinem Labor danken. Außerdem danke ich Dr. Hans-Martin Dahse von Hans-Knöll-Institut für die Durchführung der zytotoxischen und antiproliferativen Testungen. Dem John Innes Centre danke ich für die Bereitstellung der *S. coelicolor*-Mutanten. Dr. Christian Paetz möchte ich herzlich für die Unterstützung bei den vielen NMR-Experimenten danken, vor allem für das Aufsetzen neuer Experimente und seine stetige Diskussionsbereitschaft in Bezug auf die gemessenen Spektren.

Ich möchte allen Kollegen aus der Abteilung für Bioorganische Chemie für ihre freundliche Zusammenarbeit, Hilfsbereitschaft und den Spaß während meiner gesamten Doktorarbeit danken. Besonders allen jetzigen und ehemaligen Kollegen aus D1.008 möchte ich für die schöne Zeit, die vielen lustigen Unterhaltungen, aber auch fachliche Diskussionen im Büro danken. Ebenso gilt mein Dank allen Kollegen aus dem Labor D1.007, allen voran Dr. Ilka Schoenian und Abith Vattekkatte, die mich im Labor jederzeit unterstützt und vor allem

mein ständig vorherrschendes Chaos ertragen haben.

Tristan Nicke, Gerhard Pauls, Dr. Stephan von Reuß, Nadja Nagel und Holger Merker danke ich sehr für das Korrekturlesen meiner Arbeit. Vor allem bei Tristan und Gerhard möchte ich mich auf diesem Weg auch für die grauenhafte Erstversion entschuldigen, die ihr ertragen musstet.

Dr. Stephan von Reuß und Dr. Andreas Habel möchte ich für die vielen wertvollen Tipps und Ratschläge in Bezug auf Synthesen danken, wenn ich mal wieder kurz vorm verzweifeln war, weil es einfach nicht funktionieren wollte.

Für den technischen Support in Sachen GC- und LC-MS danke ich Kerstin Ploß und Dr. Maritta Kunert. Außerdem gilt mein großer Dank Gerhard Pauls für die vielen Stunden, in denen wir zusammen an der LTQ gebastelt haben.

Allen Leuten vom Mittagessen, sei es in der Teeküche oder in der Mensa möchte ich recht herzlich für die schönen Stunden danken, in denen man wenigsten mal kurz die Arbeit hinter sich lassen konnte. Besonders Anja Strauß und Holger Merker danke ich für die vielen lustigen Momente, die angeregten Gespräche zu den verschiedensten Themen während der Mittags- und Kaffeepausen. Ohne euch wär meine Zeit hier nur halb so reizvoll gewesen - ich nehme durch euch viele interessante Denkanstöße für die Zukunft mit.

Danken möchte ich auch Marcel Beckmann für den allmorgendlichen gemeinsamen Kaffee, ohne den ein Arbeiten wohl kaum möglich gewesen wäre, vor allem aber für seine Geduld mit meinem Rechner - ich weiß er hat dich manchmal zur Weißglut getrieben, aber du hast ihn am Ende immer wieder zum Laufen bekommen. Ich danke außerdem Grit Winnefeld für alle administrativen Aufgaben, sowie allen Servicegruppen - ohne eure Arbeit im Hintergrund wäre ein erfolgreiches Arbeiten nicht möglich.

Von ganzem Herzen danke ich meiner Familie und meine Freunde. Ohne euch wäre mein Leben ganz anders verlaufen. Ich danke Theo, Lena, Tristan, Julia und Markus für die wunderschöne Zeit während der letzten Jahre - auch wenn wir uns im Moment nicht sehr oft sehen, seid ihr nach wie vor eine große Stütze. Tristan und Holger möchte ich ganz besonders dafür danken, dass ihr jederzeit für mich da wart und mich immer unterstützt habt. Meiner Familie, allen voran meiner Mutter, möchte ich an dieser Stelle recht herzlich für ihre tolle Unterstützung danken, ohne die vieles unmöglich gewesen wäre.

## D Selbständigkeitserklärung

Ich erkläre, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen angefertigt habe.

Jena, 14.10.2013

### Erklärung:

Ich erkläre,

dass mir die geltende Promotionsordnung der Fakultät bekannt ist;

dass ich die Dissertation selbst angefertigt und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben habe;

dass mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: siehe Danksagung;

dass die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen;

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfungen eingereicht habe;

dass ich nicht die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, 14.10.2013