

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

Andreas Sebastian Klein



Forschungszentrum Jülich GmbH
Institut für Bio- und Geowissenschaften
IBOC – Bioorganische Chemie

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

Andreas Sebastian Klein

Bioorganische Chemie an der Heinrich-Heine-Universität
im Forschungszentrum Jülich

Band 34

ISBN 978-3-95806-343-3

Inhaltsverzeichnis

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

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

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

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

Bioorganische Chemie an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf im Forschungszentrum Jülich

Herausgegeben von Jörg Pietruszka

Naturstoffe, als ubiquitäre Biomoleküle lebender Organismen, bilden zu Teilen den Grundstein der heutigen medizinischen Wirkstoffe. Die zentralen Naturstoffe dieser Arbeit bilden die Prodiginine aus der Stoffklasse der Pyrrolalkaloide, welche zahlreiche bioaktive Eigenschaften besitzen. Für die Adressierung natürlicher Prodiginine und deren Derivate standen – unter bioökonomischen Gesichtspunkten – nachhaltige Produktionsstrategien und die Evaluation ihrer biologischen Aktivität im Vordergrund. Grundlage dieser Strategien bildete die Synergie zwischen der organischen Chemie und der Biotechnologie.

Nach der Entwicklung einer biomimetischen Totalsynthese für Prodiginine gelang eine nachhaltige, heterologe Produktion im GRAS-zertifizierten Stamm *Pseudomonas putida* KT2440. Durch die Etablierung eines auf Polyurethanschaum-basierten Extraktionssystems konnte die Produktionsmenge erhöht und eine kostengünstige und effiziente Bereitstellung der Naturstoffe ermöglicht werden. Insgesamt wurden durch den Einsatz von Mutasynthese- und Semisynthese-Strategien 20 Derivate hergestellt. Unterstützt durch biokatalytische Umsetzungen und enzymkinetische Charakterisierungen gelang mit Hilfe der Mutasynthese ebenfalls die Aufklärung des Substratspektrums des finalen Kondensationsenzym der Biosynthese von Prodigiosin.

Untersuchungen zur Bioaktivität verschiedener Prodigininderivate konnten, neben einer ausgeprägten antibakteriellen Wirkung gegenüber Bakterien, die Inhibierung der Autophagie und die Apoptose bei Brustkrebszellen zeigen.

Der letzte Themenabschnitt der Arbeit beschäftigte sich mit der enzymatischen Zyklisierung von Alkylprodigininen, der Etablierung der Analytik und der heterologen Produktion der entsprechenden Zyklastase und deren putativen Elektronentransportkette.

Band 34
ISBN 978-3-95806-343-3