

**Massenspektrometrische und bildgebende Verfahren zur
Untersuchung von Sekundärmetaboliten der Genera
Maytenus und *Putterlickia* und assoziierten Endophyten**

DISSERTATION

Zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften

eingereicht bei der

Technischen Universität Dortmund

Fakultät für Chemie und Chemische Biologie

vorgelegt von

Dennis Eckelmann

geboren am 07.01.1988 in Leverkusen

Dortmund, Mai 2018

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Dezember 2014 bis März 2018 unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. Michael Spiteller an der Fakultät Chemie und Chemische Biologie der Technischen Universität Dortmund erstellt.

1. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Dr. h. c. Michael Spiteller
2. Gutachter: Priv.-Doz. Dr. Souvik Kusari

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht oder sind zur Veröffentlichung vorgesehen:

Artikel

Eckelmann, D., Spiteller, M. & Kusari, S. Spatial-temporal profiling of prodiginines and serratamolides produced by endophytic *Serratia marcescens* harbored in *Maytenus serrata*. *Scientific Reports* **8:5283** (2018).

Eckelmann, D., Kusari, S. & Spiteller, M. Spatial profiling of maytansine during the germination process of *Maytenus senegalensis* seeds *Fitoterapia* **119**, 51-56 (2017).

Eckelmann, D., Kusari, S. & Spiteller, M. Occurrence and spatial distribution of maytansinoids in *Putterlickia pyracantha*, an unexplored resource of anticancer compounds. *Fitoterapia* **113**, 175-181 (2016).

Kusari, P., Kusari, S., Eckelmann, D., Zühlke, S., Kayser, O. & Spiteller, M. Cross-species biosynthesis of maytansine in *Maytenus serrata*. *RSC Advances* **6**, 10011-10016 (2016).

Poster

Kusari, S., Eckelmann, D., Spiteller, M. (2017): Ecological role of maytansine is revealed by *in situ* MALDI-HRMS-imaging of *Maytenus senegalensis* during the germination process. Auf dem internationalen Symposium Microbe-assisted crop production – opportunities, challenges & needs (MICROPE), Wien, Österreich; 4.-7. Dezember 2017.

Veröffentlicht in: *Planta Medica* 2017; 4(S 01): S1-S202. doi: 10.1055/s-0037-1608245.

Eckelmann, D., Kusari, S., Spiteller, M. (2017): Ecological role of the important anticancer compound maytansine revealed by MALDI-imaging-HRMS of *Maytenus senegalensis* during the germination process. Auf dem 8. Jungchemiker Symposium Ruhr; Mülheim a. d. Ruhr, Deutschland; 12. Oktober 2017.

Kusari, S., Eckelmann, D., Spiteller, M. (2017): *In situ* MALDI-HRMS-imaging of *Maytenus senegalensis* during the germination process reveals the ecological role of the important anticancer compound maytansine. Auf dem 65. internationalen Kongress und Jahresmeeting der Gesellschaft für Arzneipflanzen- und Naturstoff-Forschung (GA); Basel, Schweiz; 3.-7. September 2017.

Eckelmann, D., Kusari, S., Spiteller, M. (2017): Spatial chemo-profiling of antineoplastic maytansinoids in *Putterlickia pyracantha* by MALDI-imaging-HRMS. Auf dem 10. Tag der Chemie; Fachbereich Chemie und chemische Biologie, TU Dortmund, Deutschland; 24. Februar 2017.

Eckelmann, D., Kusari, S., Kusari, P., Zühlke, S., Kayser, O., Spiteller, M. (2016): Investigation of maytansine biosynthesis in *Maytenus serrata* and identification of precursors by HPLC-HRMSⁿ. Auf dem 9. Tag der Chemie; Fachbereich Chemie und chemische Biologie, TU Dortmund, Deutschland; 19. Februar 2016.

Kusari, S., Kusari, P., Eckelmann, D., Zühlke, S., Kayser, O., Spiteller, M. (2016): Cross-species biosynthesis of maytansine in *Maytenus serrata* plants. Auf den 28. Irseer Naturstofftage; Schwäbisches Tagungs- und Bildungszentrum Kloster Irsee; 24.-26. Februar 2016.

Kusari, S., Kusari, P., Eckelmann, D., Zühlke, S., Kayser, O., Spiteller, M. (2016): New insights in plant-endophyte communication: maytansine as an example. Auf der Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM) 2016; Jena, Deutschland; 13.-16. März 2016.

Veröffentlicht in: *Planta Medica* 2016; 82(S 01): S1-S381. doi: 10.1055/s-0036-1596123

Vorträge

Kusari, S., Eckelmann, D., Spiteller, M. (2017): Ecological role of maytansine is revealed by *in situ* MALDI-HRMS-imaging of *Maytenus senegalensis* during the germination process. Auf dem internationalen Symposium Microbe-assisted crop production – opportunities, challenges & needs (MICROPE), Wien, Österreich; 4.-7. Dezember 2017.

Kusari, S., Eckelmann, D., Spiteller, M. (2017): *In situ* MALDI-HRMS-imaging of *Maytenus senegalensis* during the germination process reveals the ecological role of the important anticancer compound maytansine. Auf dem 65. internationalen Kongress und Jahresmeeting der Gesellschaft für Arzneipflanzen- und Naturstoff-Forschung (GA); Basel, Schweiz; 3.-7. September 2017.

Danksagung

An erster Stelle danke ich Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. Michael Spiteller für die Ermöglichung der Promotion in seinem Arbeitskreis und die Bearbeitung eines interessanten Forschungsthemas. Dabei hat die hervorragende technische Ausstattung der Labore, jedwede finanzielle Unterstützung der Forschungsaspekte, die Gewährung wissenschaftlicher Freiheiten sowie diverse Diskussionen und Impulse die Arbeit erst ermöglicht. Ausserdem danke ich für den unermüdlichen Einsatz zur Beschaffung der verschiedenen Pflanzenproben während der gesamten Promotionszeit.

Herrn Priv.-Doz. Dr. Souvik Kusari danke ich nicht nur für die Übernahme des Zweitgutachtens, sondern auch für den unentwegten wissenschaftlichen Austausch, die intensive Betreuung aller Forschungsansätze und jedwede Unterstützung.

Außerdem bedanke ich mich bei Herrn Dr. Zühlke für die geleistete Unterstützung und anregende Diskussionen. Zudem danke ich Herrn Kubicki und Herrn Sezgin für den intensiven wissenschaftlichen Austausch, jeden eingeholten Ratschlag und den kameradschaftlichen Beistand.

Ich danke allen beteiligten Personen, Wissenschaftlern und Botanikern, die bei den diversen Pflanzenbeprobungen geholfen haben. Hierbei sei vor allem Frau Dr. Evelyn Mireku, Herrn Dr. James Oppong Kyekyeku, Herrn Victor Nana und Herrn Dr. Kibrom Bedane gedankt.

Ebenso danke ich allen anderen Mitgliedern des INFU-Arbeitskreises für die angenehme Arbeitsatmosphäre und dass sie stets ein offenes Ohr für Fragen und Hilfestellungen hatten.

Zuletzt möchte ich mich ganz herzlich bei meiner Frau, Familie und Freunden für ihre Unterstützung während meines gesamten Studiums bedanken.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
Abstract	3
1. Einleitung	5
1.1 Maytansinoide	5
1.1.1 Wirkung und Eigenschaften	6
1.1.2 Biosynthese.....	6
1.2. Endophyten	8
1.3. <i>Serratia marcescens</i>	10
1.3.1 Prodiginine	10
1.3.2 Serratamolide.....	12
1.4. MALDI-imaging-HRMS	14
1.4.1 Probenvorbereitung und Messablauf	14
1.4.2 Theoretische Hintergründe zur Ionisierungstechnik	16
1.4.3 MALDI-imaging-HRMS von biologischen Proben.....	16
2. Ziel der Arbeit	18
3. Material und Methoden	20
3.1 Geräte	20
3.2 Software	21
3.3 Chemikalien.....	22
3.4 HPLC–Laufmittel	24
3.5 Mikroorganismen.....	24
3.6 Methoden	25
3.6.1 HPLC-HRMS Messungen	25
3.6.2 Präparative HPLC	25
3.6.3 Pflanzenbeprobung	26
3.6.4 Pflanzenextraktion und Maytansinoid-Quantifizierung	27
3.6.5 Probenvorbereitung für MALDI-imaging-HRMS von Pflanzenproben	27
3.6.6 MALDI-imaging-HRMS von Pflanzenproben	28
3.6.7 Phloroglucinol/HCl-Färbung von Pflanzengeweben	28
3.6.8 Keimung von <i>P. verrucosa</i> und <i>M. senegalensis</i> Samen	29
3.6.9 Isolierung von endophytischen Mikroorganismen	29
3.6.10 Maytansine-Biosynthese in <i>M. serrata</i> : DNS-Extraktion, PCR-Amplifikation und Sequenzierung	30
3.6.11 Identifizierung von endophytischen Mikroorganismen.....	31

3.6.12 Fermentation der endophytischen Gemeinschaft.....	32
3.6.13 <i>Hamigera avellanea</i> -Bioassay der endophytischen Gemeinschaften	32
3.6.14 Co-Kultivierung von <i>S. marcescens</i> MSRBB2 mit endophytischen Pilzen und Rasterelektronenmikroskopie.....	33
3.6.15 Probenvorbereitung für MALDI-imaging-HRMS von Mikroorganismen ...	33
3.6.16 MALDI-imaging-HRMS von Mikroorganismen.....	34
3.6.17 Markierungsstudien mit <i>S. marcescens</i> MSRBB2 in flüssigem Nährmedium	34
3.6.18 Markierungsstudien mit <i>S. marcescens</i> MSRBB2 auf Agar	35
3.6.19 NMR	35
3.6.20 Blattpunktionstest.....	35
3.6.21 Chitinase-Nachweismedium.....	36
3.6.22 Prodigiosin-Disc-Assay	36
4. Ergebnisse und Diskussion.....	37
4.1 Untersuchung verschiedener <i>Maytenus</i> und <i>Putterlickia</i> Spezies auf Maytansinoide	37
4.1.1 Quantifizierung der Matyansinoid-Gehalte verschiedener <i>Maytenus</i> Spezies	37
4.1.2 Untersuchung der Maytansine-Biosynthese in <i>Maytenus serrata</i>	42
4.1.3 MALDI-imaging-HRMS verschiedener <i>Maytenus</i> Pflanzen	61
4.1.4 Untersuchung von <i>Putterlickia pyracantha</i> auf Maytansinoide	63
4.1.5 Untersuchung der örtlichen Verteilung von Maytansine während des Keimungsprozesses von <i>Maytenus senegalensis</i> Samen	69
4.1.6 Monitoring der örtlichen Verteilung von Maytansinoiden während des Lebenszyklus von <i>Putterlickia verrucosa</i>	75
4.2. Bakterieller Endophyt <i>Serratia marcescens</i> MSRBB2.....	88
4.2.1 Aufklärung des Sekundärmetaboliten-Spektrums von <i>S. marcescens</i> MSRBB2	88
4.2.2 Markierungsstudien mit stabilen isotoopenmarkierten Vorläufer-Molekülen zur Untersuchung der Biosynthese von Prodigininen und Serratamoliden	92
4.2.3 Interaktion von <i>S. marcescens</i> MSRBB2 mit assoziierten endophytischen Pilzen derselben Wirtspflanze	97
4.2.4 Visualisierung der chemischen Interaktion von <i>S. marcescens</i> MSRBB2 mit koexistierenden Pilzendophyten mittels MALDI-imaging-HRMS.....	101
4.2.5 Einfluss von <i>S. marcescens</i> MSRBB2 auf die Wirtspflanze <i>M. serrata</i> ...	108
4.2.6 Stabile Isotopenmarkierung von Sekundärmetaboliten auf Agar und Visualisierung mittels MALDI-imaging-HRMS	109
5. Schlussfolgerung und Ausblick.....	119

6. Literaturverzeichnis.....	121
7. Anhang	139
7.1 Untersuchung verschiedener <i>Maytenus</i> und <i>Putterlickia</i> Spezies auf Maytansinoide	139
7.2 Bakterieller Endophyt <i>Serratia marcescens</i> MSRBB2.....	185
7.3 Abkürzungsverzeichnis	414
7.4 Eidesstattliche Versicherung	416

Zusammenfassung

In der Maytansinoid-Forschung gab es bei Beginn der Forschungsarbeit einige offene Fragestellungen. Diese betrafen die Variabilität der Detektierbarkeit von Maytansinoiden in den Wirtspflanzen, die Maytansine-Biosynthese in verschiedenen Pflanzenspezies sowie die ökologische Rolle dieser Sekundärmetaboliten für die Wirtspflanzen. Für diese Aspekte konnten in dieser Thesis Erklärungen und Fortschritte erzielt werden.

Zunächst wurde ein Screening von verschiedenen *Maytenus* Spezies durchgeführt, die Gehalte bekannter Maytansinoide quantifiziert sowie Maytansinoide detektiert, die für mehrere Spezies bisher nicht berichtet waren. Als Schwerpunkt wurden Studien zur Strukturaufklärung und Identifizierung der Maytansinoide und Vorläufer-Moleküle mittels HPLC-HRMSⁿ durchgeführt. Des Weiteren wurde der Biosyntheseweg von Maytansine in *Maytenus serrata* untersucht. Durch die Kombination von analytischen und genetischen Methoden konnte gezeigt werden, dass die Biosynthese von Maytansine zwischen der bakteriellen endophytischen Gemeinschaft der Rinde und der Wirtspflanze zusammen mit ihren kryptischen Endophyten geteilt ist. Innerhalb der Wirtspflanzen-DNA konnten die Gene für die AHBA-Synthase identifiziert werden, die das Maytansine-Vorläufer-Molekül AHBA synthetisiert. In der endophytischen Gemeinschaft der Rinde dagegen wurden die Halogenase-Gene detektiert, welche die Chlorierung der Moleküle durchführen. Da in dieser Pflanze weder die Wirtspflanze noch die Endophyten allein in der Lage zur Maytansine-Produktion sind, könnte damit die Variabilität der Detektierbarkeit in dieser Spezies erklärt werden.

Außerdem wurde die Maytansinoid-Verteilung in verschiedenen Pflanzengeweben mittels MALDI-imaging-HRMS visualisiert. Zum einen zeigte die Akkumulierung von Maytansinoiden im Mark/Parenchym von Zweigen, dass die Zielmoleküle zwischengespeichert werden können. Vom Mark aus könnten die Stoffe zu einem späteren Zeitpunkt in das Xylem/Phloem abgegeben und in der Pflanze verteilt werden. Zum anderen wurden in verschiedenen Wurzelproben ausgereifter Pflanzen Maytansinoide in den Leitbündeln, den für den Stofftransport verantwortlichen Geweben, detektiert. Dadurch wurde der Transport von Maytansinoiden innerhalb der Pflanzen visuell bestätigt, was bereits aus dem hohen Verteilungsgrad im Screening (Detektion von Maytansinoiden in Wurzel sowie Stamm und Zweig) abgeleitet werden konnte.

Zusätzlich wurde die örtliche Verteilung von Maytansinoiden in verschiedenen Abschnitten des Wachstumszyklus, vor allem während des Keimungsprozesses und der Samenphase, sowohl von *Maytenus senegalensis* als auch von *Putterlickia verrucosa* im Hinblick auf die ökologische Rolle von Maytansinoiden dokumentiert. Hier zeigte sich bei beiden Pflanzen, dass Maytansine mit hohen Intensitäten im Samen detektiert wird und zum Randbereich der Keimlinge im Cortex von Hypokotyl und Keimwurzel akkumuliert vorliegt. Aufgrund der Zytotoxizität und diverser biologischer Wirkungen von Maytansinoiden kann in Verbindung mit der typischen örtlichen Verteilung die physiologische Rolle als chemische Abwehrsubstanz für die Wirtspflanze abgeleitet werden. Dabei sticht heraus, dass gerade die empfindlichen Entwicklungsstadien für das Fortbestehen der Spezies (Samen, Keimling) geschützt werden. Des Weiteren wurde für zwei *M. senegalensis* Pflanzen gezeigt, dass die

Maytansine-Produktion ausschließlich in der Samen- und Keimungsphase stattfindet und nicht in den Mutterpflanzen. Die festgestellte Abhängigkeit der Maytansine-Biosynthese auf bestimmte Lebensabschnitte ist eine weitere Erklärung für die Variabilität der Detektierbarkeit in *Maytenus* Pflanzen.

Als weiteres Themengebiet wurde die Interaktion von endophytischen Mikroorganismen untersucht. Aus einer *M. serrata* Pflanze konnte der bakterielle Endophyt *Serratia marcescens* sowie weitere koexistierende Pilzendophyten (*Pestalotiopsis virgatula*, *Aspergillus caesiellus*, *Pichia* spp.) isoliert werden. Mittels HPLC-HRMS sowie MSⁿ-Experimenten wurde das Sekundärmetaboliten-Spektrum von *S. marcescens* aufgeklärt und neben dem Hauptmetaboliten Prodigiosin, sechs weitere Prodiginine, die für diese Spezies bisher unbekannt waren, sowie 26 Serratamolide, darunter der Hauptmetabolit Serrawettin W1, Serratamsäure und bisher unbekannte Derivate, strukturell identifiziert. Durch Markierungsstudien mit stabilen Isotopenmarkierten Vorläufer-Molekülen konnte ein gemeinsamer Biosyntheseweg sowohl für die Prodiginine als auch für die Serratamolide gezeigt und neue Einblicke in die Substratspezifität der Enzyme erhalten werden.

Um die physiologische Bedeutung der produzierten Prodiginine und Serratamolide für *S. marcescens* zu untersuchen, wurde *S. marcescens* mit den koexistierenden Pilzendophyten und unbekannten Kontroll-Pilzen co-kultiviert. Es zeigte sich, dass *S. marcescens* nur die koexistierenden Pilzendophyten selektiv erkennt, die Prodiginin-Synthese aktiviert und das Pilzwachstum dadurch stark reduziert wird. Dosis- und zeitabhängige Disc-Assays mit Prodigiosin zeigten, dass die Inhibierung der Pilze auf die Prodiginine zurückzuführen ist. Zusätzlich konnte durch agarbasierte Biotests ausgeschlossen werden, dass die Inhibierung auf die Expression von Chitinasen zurückzuführen ist. Die gesteigerte Biosynthese sowohl von Prodigininen als auch von Serratamoliden wurde durch die Visualisierung der örtlichen Verteilung der Stoffe während der chemischen Interaktion in verschiedenen Interaktionsdauern mittels MALDI-imaging-HRMS bestätigt. Es zeigte sich eine verstärkte Produktion sowie Akkumulierung in Richtung der Pilze, die nur in der Präsenz der Pilze und nicht in Monokultivierungen von *S. marcescens* festgestellt werden konnte. Durch die selektive Erkennung kombiniert mit der Wachstumsinhibierung zeigt sich die ökologische Rolle der Prodiginine als chemische Abwehrsubstanzen bzw. Allelochemikalien im Antagonismus von *S. marcescens* mit den koexistierenden Pilzendophyten. Interessanterweise zeigten Rasterelektronenmikroskopie Aufnahmen der Pilze, dass trotz Inhibierung keine strukturellen Deformationen und Zerstörungen der Pilzstrukturen wie dem Myzel oder der Konidien entstanden sind. Die Pilze werden demnach durch die Prodiginine inhibiert, jedoch nicht getötet. Dies lässt eine mögliche Anpassung der Pilze an die Sekundärmetaboliten von *S. marcescens* durch die Besiedelung derselben ökologischen Nische bzw. Wirtspflanze vermuten.

Abschließend wurde eine ressourcengünstige Isotopenmarkierungsmethode erarbeitet und an *S. marcescens* evaluiert, welche die stabile Isotopenmarkierung von Sekundärmetaboliten auf Agar mit MALDI-imaging-HRMS verbindet. Dadurch kann die Inkorporation der Markierungen und die resultierende Massenverschiebung *in situ* mit der örtlichen Verteilung der Stoffe kombiniert werden. Zur Untersuchung von Biosynthesewegen kann diese Methode auf alle Mikroorganismen, die fähig sind auf Agar zu wachsen, übertragen werden.

Abstract

Maytansinoid research has the following unclear issues: the variability in the detectability of maytansinoids in the host plants, the maytansine biosynthesis in different plant species, and the ecological role of these secondary metabolites for the host plants. In this thesis, further insights to these topics could be given and unsolved questions addressed.

First, a screening of various *Maytenus* species was performed, the amount of maytansinoids was quantified, and maytansinoids detected, which were previously unreported from several species. Emphasis was placed on structure elucidation and identification of maytansinoids and precursors using HPLC-HRMSⁿ. Furthermore, the biosynthetic pathway of maytansine in *Maytenus serrata* was studied. By combining analytical and genetic methods, it has been shown that the biosynthesis of maytansine is shared between the bacterial endophytic community of the bark and the host plant along with their cryptic endophytes. Within the host plant DNA, the genes for the AHBA synthase, which synthesizes the maytansine precursor AHBA, could be identified. In contrast to that, the halogenase genes that are responsible for the chlorination of the molecules, were only detected in the endophytic community of the bark. Since neither the host plant nor the endophytes alone are capable of maytansine-biosynthesis in this plant, the variability of the detectability in this species can be speculated.

In addition, the maytansinoid distribution was visualized in various plant tissues using MALDI-imaging-HRMS. On the one hand, the accumulation of maytansinoids in the pith of twigs showed that these secondary metabolites can be temporarily stored. From the pith, the substances could later be released into the xylem/phloem and distributed in the plant. On the other hand, maytansinoids were detected in different root samples of mature plants in the vascular bundles. This confirmed visually the transport of maytansinoids within the plants, which could already be deduced from the high degree of distribution in the screening (detection of maytansinoids in root and twig/stem).

In addition, the local distribution of maytansinoids at different stages of life, especially during the germination and seeding phase, of *Maytenus senegalensis* and *Putterlickia verrucosa*, has been monitored in terms of the ecological role of maytansinoids. Both plants showed that maytansine is detected in the seeds with high ion intensities and accumulated in the cortex of hypocotyl and radicle of the offspring. Due to the cytotoxicity and various biological activities of maytansinoids, the physiological role as a chemical defense substance for the host plant can be deduced in connection with the typical local distribution. Interestingly, especially the vulnerable stages of development for the survival of the species (seed, offspring) are protected. Furthermore, it has been shown for two *M. senegalensis* plants that maytansine production takes place exclusively in the seeding and germination phase and not in the mother plants. The observed dependence of maytansine biosynthesis on specific life stages is another explanation for the variability of maytansinoids in *Maytenus* plants.

Another investigated topic was the interaction of endophytic microorganisms. From a *M. serrata* plant, the bacterial endophyte *Serratia marcescens* as well as other coexisting fungal endophytes (*Pestalotiopsis virgatula*, *Aspergillus caesiellus*, *Pichia*

spp.), could be isolated. HPLC-HRMS and MSⁿ experiments elucidated the secondary metabolite spectrum of *S. marcescens* and structurally identified the main metabolite prodigiosin, six other prodiginines formerly unknown for this species and 26 serratamolides, including the main metabolite serrawettin W1, serratamic acid and previously unknown derivatives. Labeling studies with stable isotope labeled precursors revealed a common biosynthetic pathway of both prodiginines and serratamolides, and enabled new insights into the substrate specificity of the enzymes.

To investigate the physiological role of prodiginines and serratamolides produced by *S. marcescens*, the bacterial endophyte was co-cultured with the coexisting fungal endophytes as well as unknown fungi. Interestingly, *S. marcescens* selectively recognizes only the coexisting fungal endophytes, encompassed by activated prodiginine biosynthesis, and inhibited fungal growth. Dose- and time-dependent disc assays with prodigiosin showed that the inhibition of the fungi is due to the produced prodiginines. In addition, it could be excluded by agar based bioassays that the inhibition is due to the expression of chitinases. The increased biosynthesis of both prodiginines and serratamolides was confirmed by visualizing the local distribution of the compounds during the chemical interaction in different incubation times using MALDI-imaging-HRMS. Only in the presence of the coexisting fungi an increased production and accumulation of prodiginines in the direction of the fungi was detected. The selective recognition combined with the growth inhibition shows the ecological role of prodiginines as chemical defense substances/allelochemicals in the antagonism of *S. marcescens* with the coexisting fungal endophytes. Interestingly, scanning electron microscopy of the fungi showed that despite inhibition, no structural deformations and destruction of the fungal structures such as the mycelium or conidia were formed. Thus, the fungi are inhibited by the prodiginines but not killed. This suggests a possible adaptation of the fungi to the secondary metabolites of *S. marcescens* by the colonization of the same ecological niche and host plant, respectively.

Finally, a resource-efficient method was developed and evaluated with *S. marcescens*, which combines stable isotope labeling of secondary metabolites on agar with MALDI-imaging-HRMS. As a result, the incorporation of the labeling and the corresponding mass shifts can be directly detected and the local distribution of the compounds visualized. To study biosynthetic pathways, this method can be applied to all microorganisms capable of growing on agar.

1. Einleitung

1.1 Maytansinoide

Die bekannteste Verbindung der Naturstoffgruppe der Maytansinoide ist das im Jahr 1972 von der Arbeitsgruppe von S. M. Kupchan in *M. serrata* durch Bioaktivitätstests von Pflanzenextrakt-Fractionen entdeckte Maytansine (Kupchan *et al.*, 1972a). Maytansine ist ein 19-gliedriges makrocyclisches Lactam mit einem chlorierten Benzolring und einer Esterseitenkette. Neben Maytansine wurden weitere Strukturanaloga identifiziert die sich zumeist nur geringfügig durch funktionelle Gruppen oder die Länge und Struktur der Seitenkette unterscheiden (Abb. 1.1), wie Maytanprine, Maytanbutine und Maytanvaline (Kupchan *et al.*, 1972a, 1972b, 1974).

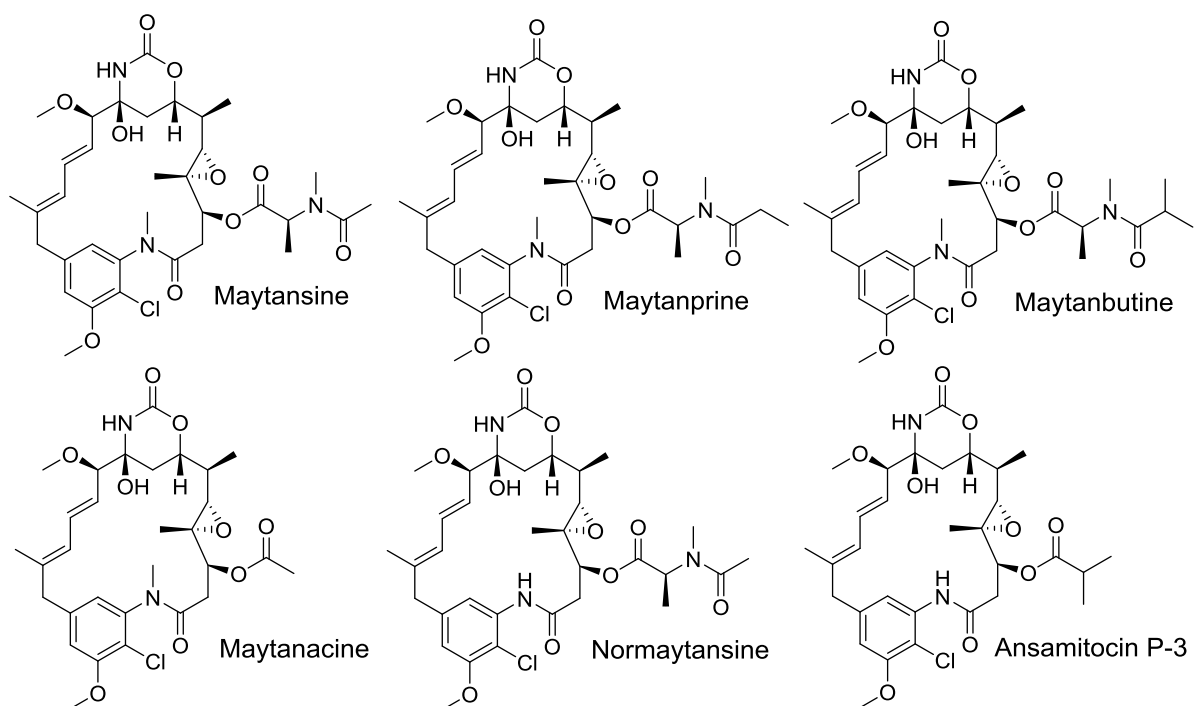


Abb. 1.1: Chemische Struktur verschiedener Maytansinoide und Ansamitocin P-3.

Aufgrund der hohen Antitumorwirkung entwickelte sich ein pharmazeutisches Interesse an diesen Stoffen. Daher wurden intensive phytochemische Untersuchungen anderer Pflanzenspezies der Familie Celastraceae aus den Genera *Putterlickia* und *Maytenus* initiiert und durchgeführt (Kupchan *et al.*, 1977; Sneden & Beemsterboer 1980; Ahmed *et al.*, 1981; Chaoming *et al.*, 1983; Larson *et al.*, 1999; Brossi 1985; Nakao *et al.*, 2004; Cassady *et al.*, 2004). Zum anderen wurden die biologischen Aktivitäten der Maytansinoide erforscht.

1.1.1 Wirkung und Eigenschaften

Maytansine zeigte eine hohe zytotoxische *in-vitro* Aktivität gegen humane KB-Zellen (ED₅₀ 10⁻⁴ - 10⁻⁵ µg/mL) und eine starke Inhibierung von fünf tierischen Tumorsystemen (Kupchan *et al.*, 1972a). Des Weiteren kann eine inhibierende Wirkung gegen das Lewis Lungenkarzinom, das murine B16-Melanom (Kupchan *et al.*, 1974) und Aktivität gegen P388 lymphatische Leukämie (Boyd und Paull 1995) festgestellt werden. Maytanprine und Maytanbutine zeigen ein vergleichbares Potential (Kupchan *et al.*, 1974; Nakao *et al.*, 2004). Die Maytansinoide binden an die β -Untereinheit von Tubulin (Hamel 1992). Durch diese Bindung, wird die Bildung der Mikrotubuli verhindert und der Zelltod herbeigeführt (Wolpert-DeFilippes *et al.*, 1975; Mandelbaum-Shavit *et al.*, 1976; Issel und Crooke 1978; Venghateri *et al.*, 2013).

Maytansine wurde als Antitumormittel getestet, scheiterte jedoch in der Phase II der klinischen Studien aufgrund der allgemeinen hohen Zytotoxizität (Blum *et al.*, 1978; Rosenthal *et al.*, 1980). Dieser Umstand konnte überwunden werden, indem Maytansine als „warhead“ mit einem Antikörper verbunden wurde der den Wirkstoff aufgrund des pH-Wert-Unterschiedes in Tumorzellen selektiv freigibt. Einige Maytansinoid-Antikörper-Konjugate werden momentan zum Einsatz gegen Tumore entwickelt wobei Trastuzumab Emtansin (Kadcyla®) bereits gegen Mammakarzinomzellen eingesetzt wird (Perez *et al.*, 2014; Parakh *et al.*, 2017; Lambert und Morris 2017). Neben der Antitumoraktivität sind Maytansinoide effektiv gegen Eukaryonten wie Protozoen, Hefen, Pilze, Insekten und Pflanzen (Tanida *et al.*, 1981; Cassady *et al.*, 2004).

1.1.2 Biosynthese

Während der fortschreitenden Suche nach Derivaten und neuen Naturstoffen, wurden weitere Maytansinoide in unterschiedlichen Pflanzen wie *Colubrina texensis* (Wani *et al.*, 1973) und in Moosen entdeckt (Saka *et al.*, 1988; Suwanborirux *et al.*, 1990), wobei angenommen wurde, dass ein pathogener Mikroorganismus innerhalb der Moose für die Produktion verantwortlich sein könnte. Außerdem wurden weitere Strukturanaloga, sogenannte Ansamitocine in einem *Nocardia* Strang (später *Actinosynnema pretiosum*) entdeckt (Higashide *et al.*, 1977; Tanida *et al.*, 1981; Hasegawa *et al.*, 1983). Dabei unterscheidet sich Maytansine von Ansamitocin P-3 nur durch die Esterseitenkette (Abb. 1.1). Die Biosynthese vom Maytansinoid Ansamitocin P-3 konnte intensiv am Bakterium *A. pretiosum* untersucht und aufgeklärt werden. Aufgrund der Strukturähnlichkeit wurde für Maytansine eine analoge Biosynthese zu Ansamitocin P-3 vermutet, welche im Folgenden erläutert wird. Zunächst wird 3-Amino-5-Hydroxybenzoesäure (AHBA) über den amino-Shikimisäureweg mittels mehrerer Enzyme über mehrere Zwischenstufen synthetisiert (aminoDAHP, aminoDHQ, aminoDHS) (Kim *et al.*, 1992, 1996). AHBA ist die allgemeine Starteinheit für diese Verbindungen und wird auch als mC₇N Einheit bezeichnet (Floss 2006; Kang *et al.*, 2012). Die AHBA Synthase-Gene sind ein hochkonserviertes Gencluster und somit charakteristisch für die Biosynthese von Ansamycinen und können zur Identifizierung von potentiellen Produzenten verwendet werden (Huitu *et al.*, 2009; Wings *et al.*, 2013; Kusari *et al.*, 2014a). Ausgehend von der AHBA-Starteinheit findet eine Kettenerweiterung durch Typ I Polyketid-Synthetasen (PKS) und schließlich die

Zyklisierung zum Proansamitocin statt (Kubota *et al.*, 2006). Dabei werden drei Propionat-, drei Acetat- und eine Glycolat-Einheit verwendet (Kibby *et al.*, 1980; Carroll *et al.*, 2002). Einer der ersten Schritte der Post-PKS-Modifikationen ist die Inkorporation von Chlor durch die Halogenase Asm12 (Yu *et al.*, 2002; Spiteller *et al.*, 2003; Cassady *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2011). Weitere Modifikationen zum finalen Ansamitocin P-3 sind O- und N-Methylierung, Epoxid-Bildung, Carbamatbildung und Acylierung.

Aufgrund der Tatsache, dass Maytansinoide in verschiedenen Pflanzen, Moosen und sogar Mikroorganismen gefunden werden, entwickelte sich bereits früh die Hypothese, dass Pflanzen-assoziierten Mikroorganismen, sogenannte Endophyten, für die Produktion verantwortlich sein könnten. Zusätzlich werden strukturähnliche Stoffe wie Rifamycin B (Calvori *et al.*, 1965; Kim *et al.*, 1998), Geldamycin (Lancini und Grandi 1981) und Naphthomycin (Balerna *et al.*, 1969; Wu *et al.*, 2011) ebenfalls von Mikroorganismen produziert. Außerdem konnte innerhalb der gleichen Pflanzenart eine Variation des Vorhandenseins von Maytansinoiden für unterschiedliche Beprobungspunkte, Standorte und damit unterschiedliche Umweltbedingungen gezeigt werden (Pullen *et al.*, 2003). Dies unterstützt die Vermutung, dass die Pflanzen nicht allein verantwortlich für die Maytansine-Produktion sein können. Im Jahr 2014 wurde gezeigt, dass bei *Putterlickia verrucosa* und *Putterlickia retrospinosa* Endophyten im Wurzelsystem für die Biosynthese von Maytansine verantwortlich sind. Die Produktion von Maytansine konnte durch Fermentation der isolierten endophytische Gemeinschaft außerhalb der Wirtspflanze nachgewiesen werden. Zusätzlich werden die AHBA-Synthase-Gene mittels PCR, Sequenzierung und Datenbankabgleich in den Endophyten gefunden (Kusari *et al.*, 2014a).

1.2. Endophyten

Im Jahr 1866 wird der Begriff Endophyt (griechisch: *endo* = innen, *phyton* = Pflanze) zum ersten Mal von De Barry verwendet (De Bary 1866). Damit werden alle Organismen bezeichnet, die in Pflanzen inter-oder intrazellulär leben. Dabei ist die Besiedelung aller Pflanzenkompartimente möglich, wie z.B. Blätter, Zweige, Wurzeln, Blüten oder Samen und bisher wurden keine Pflanzen gefunden, die keine Endophyten besaßen (Partida-Martínez und Heil 2011). Die Assoziation von Mikroorganismen und Pflanzen geht jedoch weit in der Entstehungsgeschichte zurück, vermutlich seit dem Anbeginn der Evolution höherer Pflanzen (Strobel und Daisy, 2003). So wurden z.B. Hinweise auf Mikroorganismen in versteinerten Pflanzenkompartimenten wie dem Stamm und Blättern in Hornstein (Rhynie Chert) aus dem Devon Zeitalter entdeckt (Taylor und Taylor 2000; Taylor *et al.*, 2004; Krings *et al.*, 2018).

Gegenwärtig wird für Endophyten häufig die Definition von Petrini verwendet, die alle Organismen die während ihres Lebens zumindest zeitweise inneres Pflanzengewebe besiedeln können ohne der Wirtspflanze Schaden zuzufügen, als Endophyten bezeichnet (Petrini 1991). Damit rücken die Wechselwirkung und die Beziehung zwischen Pflanze und Endophyt in den Fokus. Dabei reicht die Spannweite der möglichen Wechselwirkungen von Mutualismus bis hin zu Parasitismus. Eine weitere Hypothese ist der ausgeglichene Antagonismus (balanced antagonism; Schulz *et al.*, 1999; Schulz und Boyle 2006). Dabei wird davon ausgegangen, dass die Verteidigungsstrategien von Pflanze und Endophyt zwar ausgeführt werden, jedoch im Einklang stehen und daher keine Symptome der Kolonisierung der Pflanze zu erkennen sind. Diese Theorie sieht die Beziehung zwischen Wirt und Endophyt nur zweiseitig. In Wirklichkeit muss die Wechselwirkung jedoch weitaus komplexer sein. So müssen zusätzlich Umwelteinflüsse, weitere endophytische Organismen, Pflanzen-Pathogene, Insekten und Fraßfeinde berücksichtigt werden (Kusari *et al.*, 2012). Daraus ergeben sich verschiedene Forschungsbereiche wie z.B. die biotechnologische Produktion von Verbindungen durch Endophyten, die Wechselwirkung von Endophyten auf deren Wirtspflanzen bzw. auf andere Pflanzen oder die Interaktion von endophytischen Mikroorganismen (z.B. Bakterium-Bakterium, Bakterium-Pilz, Pilz-Pilz) untereinander (Kusari *et al.*, 2012; Kusari und Spiteller 2011, 2012; Maggini *et al.*, 2017). In den letzten Jahren rückt gerade die Interaktion von Endophyten stärker in den Fokus der Forschung (Wang *et al.*, 2015; Ebrahim *et al.*, 2016). So wurde z.B. die chemische Interaktion zwischen dem Pflanzenpathogen *M. royeri* und dem „Biokontrollagenten“ *T. harzianum* untersucht und die produzierten Sekundärmetaboliten visualisiert (Tata *et al.*, 2015). Weitere Studien zeigen, dass endophytische Pilze Sekundärmetaboliten produzieren, die Aktivität gegen andere Pilze zeigen, darunter Pflanzenpathogene wie *Botrytis cinerea*, *Alternaria* sp. und *Fusarium* sp. (Li *et al.*, 2012; Xiao *et al.*, 2014), und damit zum Schutz der Wirtspflanze beitragen können.

Häufig sind Endophyten für die Biosynthese von bioaktiven Verbindungen verantwortlich (Abb. 1.2), die z.T. zuvor als Pflanzenstoffe galten, wie z.B. Hypericin und Emodin (Kusari *et al.*, 2008), Piperine (Chithra *et al.*, 2014), Silybin A und B (El-Elmaghrabi *et al.*, 2014) und Camptothecin (Kusari *et al.*, 2009; Pu *et al.*, 2013). Durch die Präsenz der Endophyten in der Wirtspflanze bzw. der Synthese von Sekundärmetaboliten, kann die Resistenz der Wirtspflanze gegenüber Stress und

Pathogenen oder das Wachstum positiv beeinflusst werden (Strobel und Daisy 2003). Ein bekanntes Beispiel für die Produktion von Naturstoffen durch Endophyten ist die von Taxol (Abb. 1.2 Paclitaxel). Dieser Antikrebswirkstoff wurde zunächst im Jahr 1971 aus der Rinde von *Taxus brevifolia* isoliert (Wani *et al.*, 1971). In 1993 konnte jedoch gezeigt werden, dass ein aus der Rinde isolierter Endophyt, *Taxomyces andreanae* eigenständig Taxol produzieren kann (Stierle *et al.*, 1993). Die Idee, Paclitaxel biotechnologisch mittels endophytischer Mikroorganismen zu produzieren konnte jedoch nicht realisiert werden (Kusari *et al.*, 2014c). An diesem Beispiel zeigt sich auch die Problematik der biotechnologischen Verwendung von Endophyten für die Produktion von Naturstoffen im großen Maßstab (Kusari *et al.*, 2011, 2014b). Die Gründe werden zurückgeführt auf mögliche fehlende Auslöser, wie z.B. biotischen Stress durch Pathogene, andere konkurrierende Mikroorganismen, Fraßfeinde, Insekten, allgemeiner Selektionsdruck oder abiotische Parameter wie Lichteinwirkung, Salzgehalt oder Wassermangel. Außerdem könnten chemische Auslöser wie Kommunikationsmoleküle, Pflanzenstoffe oder Vorläufer-Moleküle (evtl. produziert von anderen Organismen) die die Biosynthese von Sekundärmetaboliten erst aktivieren bzw. die Edukte dazu liefern, in der industriellen Fermentation fehlen.

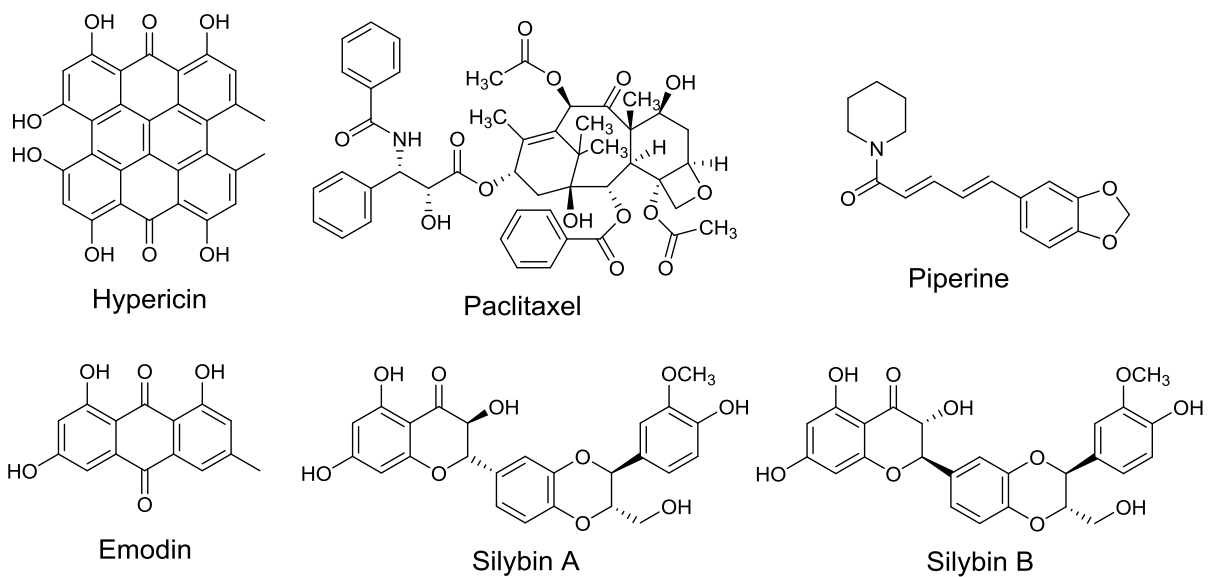


Abb. 1.2: Chemische Struktur verschiedener Naturstoffe produziert von endophytischen Mikroorganismen

1.3. *Serratia marcescens*

Serratia marcescens ist ein Gram-negatives Bakterium das der Familie der Enterobacteriaceae angehört. Andere Spezies dieses Genus sind *S. liquefaciens* und *S. rubidaea*. *S. marcescens* ist ein ubiquitäres Bakterium, dass sowohl im Wasser und Boden als auch in Pflanzen, Insekten, Tieren und Menschen anzutreffen ist (Williams und Quadri 1980; Singleton und Sainsbury 2001). Beim Menschen, insbesondere in Kliniken, verursacht *S. marcescens* durch die Besiedelung der Atemwege und Harnwege nosokomiale Infektionen und kann Auslöser von Meningitis sein (Ding *et al.*, 1983; Carbonell *et al.*, 2000; Mahlen 2011). Interessanterweise sind klinische Isolate häufiger nicht pigmentiert, wogegen Isolate aus der Umwelt häufiger eine rote Pigmentierung aufweisen. *S. marcescens* und das bekannteste Pigment dieser Stoffgruppe - Prodigiosin (2-Methyl-3-pentyl-6-methoxyprodiginine) weisen eine weit zurückreichende Historie auf. So wurde z.B. von makedonischen Sehern durch „blutiges“ Brot die Eroberung von Tyros durch Alexander dem Großen vorhergesagt oder rotes Brot als Blut von Jesus Christus interpretiert (Gerber 1975; Yu 1979; Fürstner 2003; Williamson *et al.*, 2006). Neben den roten Pigmenten, den Prodigininen (auch Prodigiosine genannt), produziert dieses Bakterium verschiedene Biotenside, die Serratamolide.

1.3.1 Prodiginine

Prodiginine zeichnen sich durch eine lineare Tripyrrol-Struktur und charakteristische rote Pigmentierung aus. Diese Naturstoffgruppe wird sowohl von Gram-positiven als auch Gram-negativen Bakterien produziert. Abb. 1.3 zeigt eine Auswahl der Prodiginine, produziert von *Serratia* spp. (Williams 1973; Williams und Quadri 1980), marinen Bakterien wie *Pseudoalteromonas* spp. (Kawauchi *et al.*, 1997; Fehér *et al.*, 2008), *Hahella chejuensis* (Kim *et al.*, 2007 & 2008) und *Zooshikella rubidus* (Lee *et al.*, 2011), und Actinomyceten (Gerber 1969; Bentley *et al.*, 2002; Borodina *et al.*, 2005).

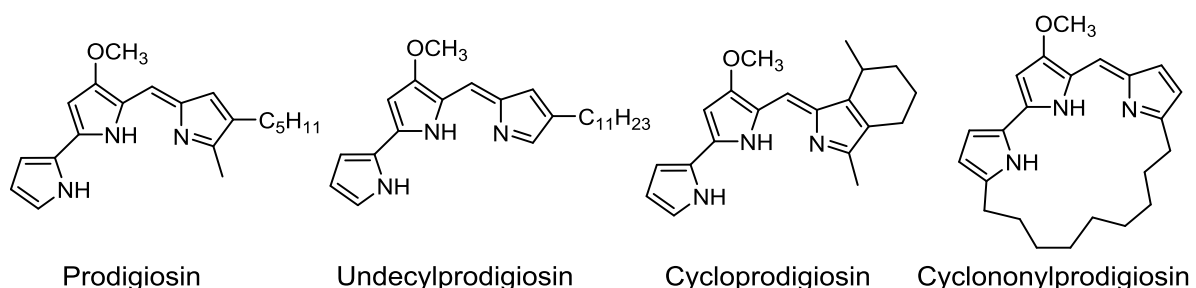


Abb. 1.3: Chemische Struktur verschiedener Prodiginine.

Das Interesse an dieser Stoffgruppe ist bedingt durch ihre mannigfaltige biologische Aktivität (Williamson *et al.*, 2006; Stankovic *et al.*, 2014; Darshan und Manonmani 2015). So zeigen Prodiginine z.B. antibakterielle Wirkung gegen verschiedene Mikroorganismen wie *E. coli*, *Pseudomonas* sp., *S. aureus*, *Alteromonas* sp., *Gallionella* sp. und *Bacillus* sp. (Samrot *et al.*, 2011; Priya *et al.*, 2013; Stankovic *et al.*,

2014; Darshan und Manonmani 2016). Ebenso sind diese Sekundärmetaboliten wirksam gegen verschiedene Pilze und inhibieren das Wachstum (Someya *et al.*, 2001 & 2005; Xu *et al.*, 2007; Su *et al.*, 2017; Jimtha *et al.*, 2017). Gegen den Parasiten *Plasmodium falciparum*, der beim Menschen zu Malaria tropica führen kann, zeigen Prodiginine ebenfalls hohe *in-vitro* Aktivität und IC₅₀ Konzentrationen im nanomol-Bereich (Papireddy *et al.*, 2011 & 2015; Mahajan *et al.*, 2012 & 2013; Singh *et al.*, 2013; Stankovic *et al.*, 2014). Des Weiteren sind Prodiginine aktiv gegen zahlreiche Krebszelllinien und zeigen nur eine geringe oder keine Zytotoxizität gegen normale Zelllinien (Pérez-Tomás *et al.*, 2003). Daher befinden sich zurzeit z.B. synthetische Derivate in klinischen Phase-I und -II Studien zur Behandlung verschiedener Krebsarten (Williamson *et al.*, 2006 & 2007; Parikh *et al.*, 2010; Basit *et al.*, 2013).

Trotz, oder gerade aufgrund der diversen biologischen Aktivität, ist die ökologische Bedeutung der Prodiginine für den produzierenden Mikroorganismus immer noch Gegenstand aktueller Forschung (Williamson *et al.*, 2006). Ein Erklärungsansatz war, dass die Prodigiosin-Biosynthese als metabolische Senke für Prolin dient, ein Vorläufer-Molekül von Prodigininen, oder überschüssiges NAD(P)H verbraucht (Williams 1973; Trutko und Akimenko 1989; Hood *et al.*, 1992). Im Hinblick auf die antimykotischen und antibakteriellen Eigenschaften zusammen mit der Tatsache, dass in der Umwelt vermehrt pigmentierte *S. marcescens* Stränge gefunden werden, liegt die Vermutung nahe, dass die Prodiginine dem Produzenten einen Vorteil bei der Besiedelung neuer Oberflächen und der Ausbreitung in der Natur gegenüber anderen konkurrierenden Mikroorganismen durch deren Inhibierung verschaffen (Ding & Williams 1983; Aucken & Pitt 1998; Williamson *et al.*, 2006).

Abb. 1.4 zeigt den Biosyntheseweg von Prodigiosin in *Serratia* sp. (Williamson *et al.*, 2005, 2006; Kim *et al.*, 2007). Die Synthese von Prodigiosin beruht auf der Kondensationsreaktion zweier Intermediate, des Monopyrrols MAP (2-Methyl-3-ampylpyrrol) und des Bipyrrrols MBC (4-Methoxy-2,2'-bipyrrrol-5-carbaldehyd), durch das Kondensationsenzym PigC. Die Biosynthese und verantwortlichen Enzyme für die Bildung von MBC wurden durch LC-MS Studien von *Serratia*-Mutanten bei denen einzelne Gencluster ausgeschaltet wurden, nachgewiesen (Williamson *et al.*, 2005). Die Synthese beginnt mit der Aminosäure L-Prolin, welche mittels ATP aktiviert wird und in einen Pyrrol-Ring umgewandelt wird, gefolgt von einer Kettenverlängerung (Polyketide) durch den Transfer einer Malonyl-Gruppe von Malonyl-CoA unter Abspaltung von CO₂. Der entstandene enzymgebundene Pyrrolyl-β-ketothioester wird durch den Einbau von Serin freigegeben und bildet das Intermediat HBM (4-Hydroxy-2,2'-bipyrrrol-5-methylalkohol). Bis zu diesem Schritt wird angenommen, dass alle Schritte enzymgebunden sind, da keines der Intermediate mittels LC-MS detektiert werden konnte (Williamson *et al.*, 2005). HMB wird durch Oxidation der Alkohol-Gruppe zu HBC (4-Hydroxy-2,2'-bipyrrrol-5-carboxylaldehyd). Der letzte Schritt zur Bildung von MBC ist die Methylierung der freien OH-Gruppe durch eine S-Adenosylmethionin abhängige (AdoMet) Methyltransferase. Die Synthese des Monopyrrols MAP wird in *Serratia* sp. von drei Enzymen (PigB, PigD, PigE) durchgeführt. Der Ausgangsstoff 2-Octenal wird unter CO₂ Abspaltung und den Einbau eines Pyruvat-Fragmentes (zwei Kohlenstoffatome, Decarboxylierung von Pyruvat) durch eine Pyrophosphatase (PigD) zu 3-Acetyloctanal umgesetzt. Es wird angenommen, dass das 2-Octenal aus der Fettsäurebiosynthese oder aus der

Autooxidation von ungesättigten Fettsäuren stammt (Williamson *et al.*, 2006). Im nächsten Schritt wird die Aldehyd-Gruppe von 3-Acetyloctanal durch eine Aminotransferase (PigE) zu einem Aminoketon umgesetzt, der spontan zum zyklischen Imin H₂MAP reagiert. Die von der Aminotransferase verwendete Aminosäure ist bisher nicht abschließend aufgeklärt (Williamson *et al.*, 2005). Es wird jedoch angenommen, dass Glycin bzw. Serin, das zuvor zu Glycin umgewandelt wurde, eingesetzt werden könnte (Wasserman *et al.*, 1973). Zuletzt katalysiert das Enzym PigB eine „Zwei-Elektronen-Oxidation“ von H₂MAP zu MAP (Williamson *et al.*, 2006).

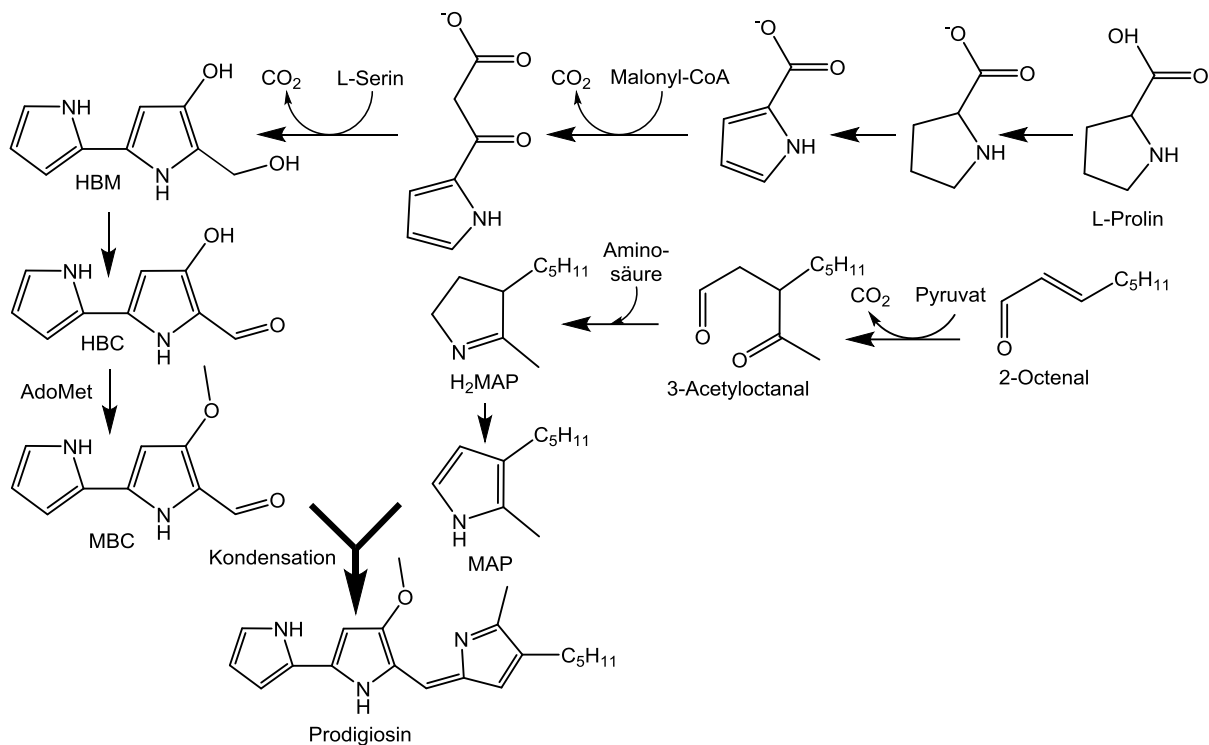


Abb. 1.4: Biosyntheseweg von Prodigiosin, produziert von *Serratia* sp. (Williamson *et al.*, 2005, 2006; Kim *et al.*, 2007). AdoMet: S-Adenosylmethionin; HBM: 4-Hydroxy-2,2'-bipyrrrol-5-methylalkohol; MAP: 2-Methyl-3-amylopyrrol; MBC: 4-Methoxy-2,2'-bipyrrrol-5-carboxyaldehyd; HBC: 4-Hydroxy-2,2'-bipyrrrol-5-carboxyaldehyd.

1.3.2 Serratamolide

Eine weitere wichtige Naturstoffgruppe, die von *S. marcescens* Strängen produziert wird, sind die Serratamolide. Diese Biotenside vereinfachen aufgrund der Verringerung der Oberflächenspannung die Besiedelung neuer Oberflächen durch den Produzenten. Neben der allgemeinen erhöhten Translokation bzw. Motilität steigert die Serratamid-Produktion auch das Schwärmen von *S. marcescens* (Matsuyama *et al.*, 1985, 1986, 1992, 1995, 1996; Thies *et al.*, 2014). Durch die Erhöhung der Ausbreitung geben diese Stoffe dem Produzenten einen Wettbewerbsvorteil gegenüber anderen Nahrungskonkurrenten. Zusätzlich konnte für einen der Hauptmetaboliten dieser Biotenside, Serrawettin W1, eine antibakterielle Wirkung gezeigt werden (Wasserman *et al.*, 1962).

Serrawettin W1 ist ein zyklisches Lipopeptid (Cyclo(D-3-Hydroxydecanoyl-L-seryl)₂) das durch eine unimodulare nichtribosomale Peptidsynthetase synthetisiert wird, die

ausschließlich L-Serin verwendet (Sunaga *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2005). Abb. 1.5 zeigt den postulierten Biosyntheseweg von Serrawettin W1 nach Li *et al.* (2005).

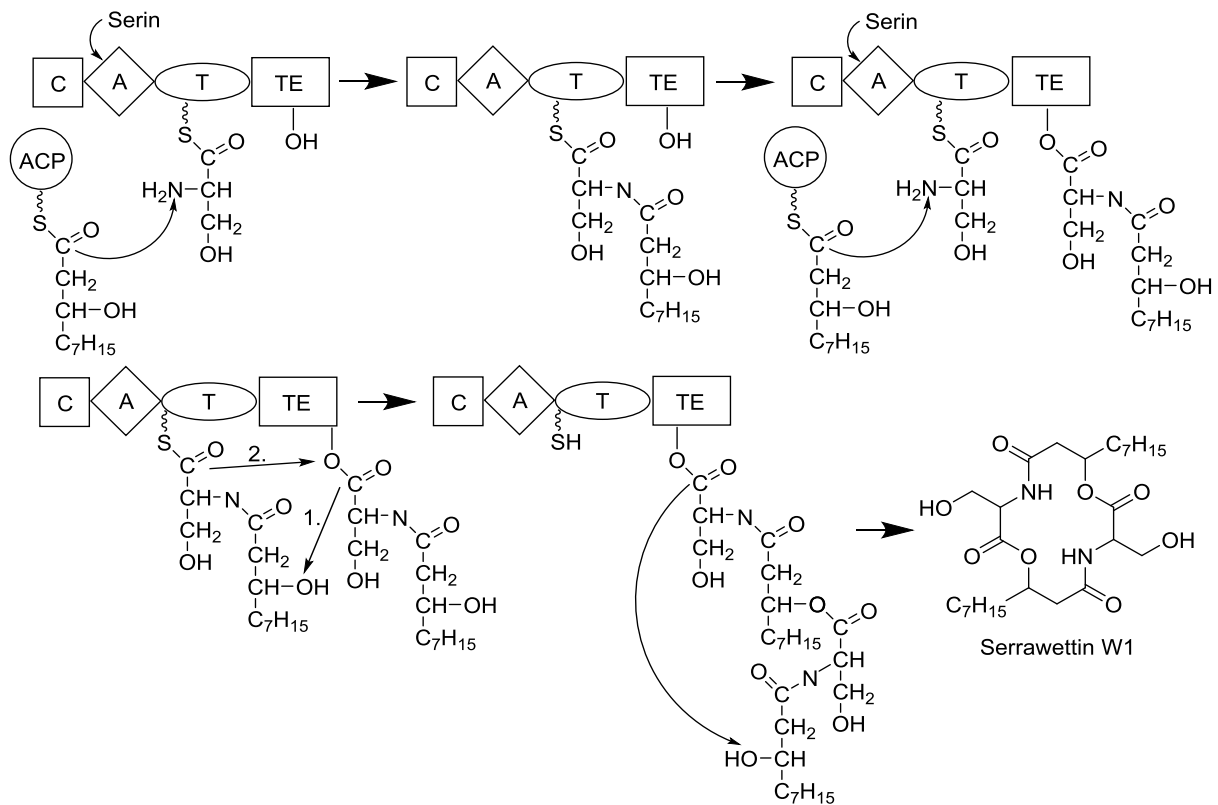


Abb. 1.5: Biosynthese von Serrawettin W1 nach Li *et al.* (2005) durch die unimodulare nichtribosomale Peptidsynthetase (SwrW) mit vier Domänen (C: Kondensationsdomäne, A: Adenylierungsdomäne, T: Thiolationsdomäne, TE: Thioesterasedomäne) und einem Acyl-Carrier-Protein (ACP) zur Bereitstellung der aktivierten 3-Hydroxydecanssäure.

Das Enzym SwrW (150 kDa) besitzt die vier Domänen Adenylierung, Kondensation, Thioesterhydrolyse und Aminosäurebindung. Die Synthese beginnt mit der Aktivierung von Serin durch die Adenylierungsdomäne (A), gefolgt von dem Transfer zur Thiolations-Domäne (T) durch den Phosphopantetheinylrest der Peptidyl-Carrier-Protein-Domäne (PCP), wo Serin über eine Thiolgruppe an die Enzymdomäne gebunden wird. Das zweite Vorläufer-Molekül, die 3-Hydroxydecanssäure, wird mittels Acyl-Carrier-Proteinen (ACP) zur Aminosäure transportiert. Die Kondensationsdomäne (C) katalysiert die Reaktion der beiden Vorstufen. Danach wird der Thioester des Intermediats von der PCP-Domäne durch die Thioesterase (TE) gespalten. Zu diesem Zeitpunkt ist an der TE-Domäne das Zwischenprodukt Serratamsäure (N-(3-Hydroxydecanoyl)-Serin) gebunden. Das Intermediat verbleibt zur späteren Zyklisierung an der TE-Domäne und eine weitere Einheit Serratamsäure wird gebildet. Die zweite Einheit an der PCP-Domäne reagiert mit der ersten Einheit an der TE-Domäne. Zuletzt zyklisiert das Zwischenprodukt nach der Abspaltung von der TE-Domäne zu Serrawettin W1 (Li *et al.*, 2005).

1.4. MALDI-imaging-HRMS

Seit der Entwicklung der MALDI (matrix assisted laser desorption/ionization) Ionisierungstechnik für die Massenspektrometrie im Jahr 1984 durch Karas und Hillenkamp (Karas *et al.*, 1985; Hillenkamp und Karas 2014), ist diese Technik ein stetig wachsendes analytisches Werkzeug, speziell durch die Weiterentwicklung als bildgebendes Verfahren für die Aufklärung der örtlichen Verteilung von Stoffen. Dabei muss zwischen der reinen Ionisierungstechnik (MALDI) und der Kopplung an ein bildgebendes Verfahren (MALDI-imaging-MS (MS: mass spectrometry) unterschieden werden. Zusätzlich definiert das angeschlossene Massenspektrometer das Einsatzgebiet des Instrumentes. Hochauflösende Massenspektrometer wie z.B. Orbitrap-Systeme, werden im Massenbereich der „small molecules“ von ca. 50-4000 Da betrieben. Flugzeitmassenspektrometer (time-of-flight) können dagegen auch Makromoleküle wie Proteine größer als 4000 Da messen (Boughton *et al.*, 2016). Aufgrund der sanften Ionisierung können dabei für Proteine auch intakte Quasi-Moleküle detektiert werden. Durch die Kopplung an hochauflösende Massenspektrometer wird die Technik als MALDI-imaging-HRMS (HRMS: high resolution mass spectrometry) bezeichnet.

1.4.1 Probenvorbereitung und Messablauf

Für die Untersuchung von Proben mittels MALDI-imaging-HRMS muss eine spezielle Probenvorbereitung durchgeführt werden (Zaima *et al.*, 2010; Boughton *et al.*, 2016; Dong *et al.*, 2016), die im Folgenden für Pflanzenproben erklärt wird (Abb. 1.6).

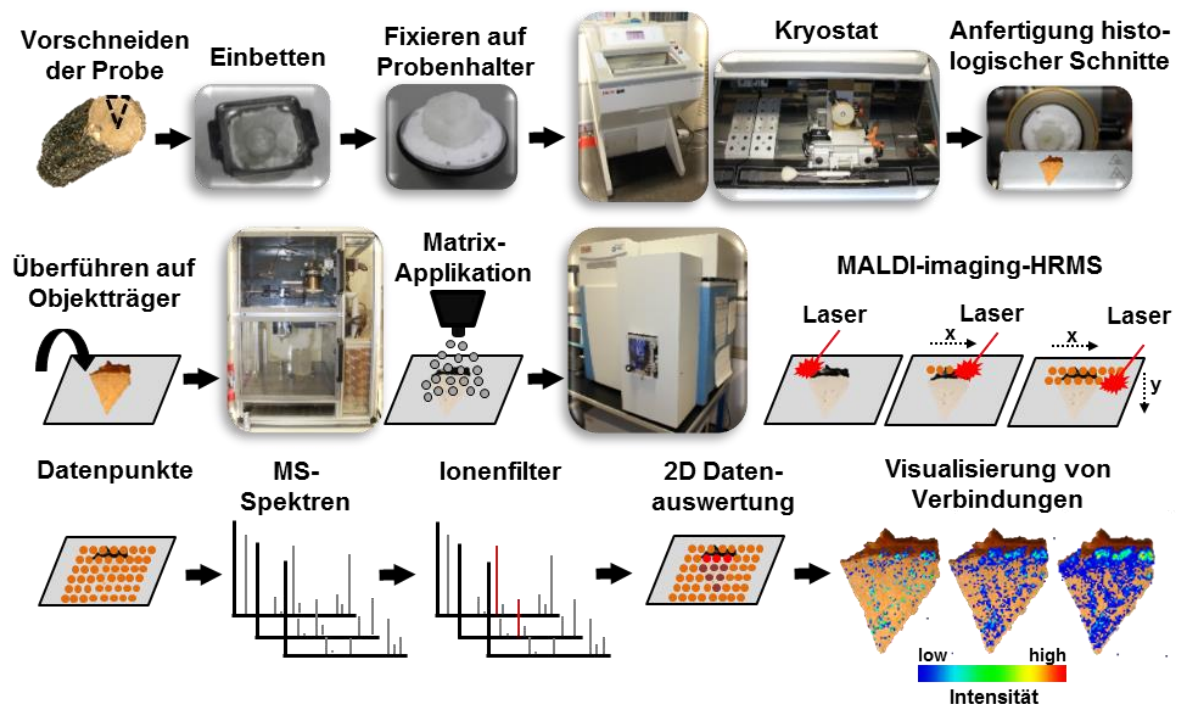


Abb. 1.6: Schematischer Ablauf der Probenvorbereitung für Pflanzenproben und der MALDI-imaging-HRMS Auswertung.

Im Allgemeinen werden Pflanzenproben als histologische Längs- oder Querschnitte gemessen. Dazu müssen dünne Schnitte (25-50 μm) der Pflanzenproben wie z.B. Wurzeln, Zweige oder Rinde mit Hilfe eines Mikrotoms angefertigt werden. Dazu werden die Proben mit Skalpell oder Zweigscheren in kleine Stücke vorgeschnitten (max. 1 cm Länge), welche wiederum in einem Medium eingebettet werden (z.B. 2-5% Carboxymethylcellulose), dass bei niedrigen Temperaturen (ca. $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$) gefriert und damit die Probe fest einbettet (Zaima *et al.*, 2010). Die eingebettete Probe im Medienblock wird mit Hilfe eines Polymers, welches ebenfalls gefriert, auf einem Probenhalter fixiert, welcher wiederum im Mikrotom bzw. Kryostaten (gekühlt auf unter $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$) eingespannt wird. Die Probe bzw. der Probenhalter wird dann in definierten Abständen an einer Rasierklinge vorbeibewegt werden, wobei dünne histologische Schnitte (ca. 25-50 μm) erzeugt werden. Die Schnitte werden auf einen Glasobjektträger überführt und mittels dünnen doppelseitigem Klebeband fixiert. Zur Dokumentation und späteren Auswertung werden die Quer- oder Längsschnitte mit einem Mikroskop als Bilder aufgezeichnet. Für dünne und ebene Proben wie z.B. Blattoberflächen müssen keine Schnitte angefertigt werden. Die fotografierten Proben bzw. Querschnitte werden anschließend mit einer Matrix besprüht. Als Matrixsubstanzen werden kleine organische Säuren oder Basen verwendet, die je nach Ionisierungstyp (positiv/negativ) und Analytmolekülen angepasst werden (Fukuyama 2011) und die Ionisierungsenergie des verwendeten Lasers (in dieser Arbeit: N_2 -Laser, 337,1 nm Wellenlänge) aufnehmen können. Gängige Matrices (Abb. 1.7) sind α -Cyano-4-hydroxyzimtsäure (HCCA), 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB) und Sinapinsäure (SA). Für die Matrix-Applikation gibt es unterschiedliche Verfahren. In dieser Arbeit wurde die Matrixlösung mit einem pneumatischen Sprayer im Stickstoffgegenstrom (ca. 3-4 L/min N_2) auf einen rotierenden Probenhalter (ca. 100-150 rpm) mit dem Objektträger und der fixierten Probe gesprüht (Abb. 1.6). Dabei co-kristallisiert die Matrix mit den Analytmolekülen auf der Probe und erzeugt eine homogene Matrixkristallschicht. Nach der Matrix-Applikation ist die Probe messbereit und kann in der MALDI-Quelle mit angeschlossenem Massenspektrometer gemessen werden.

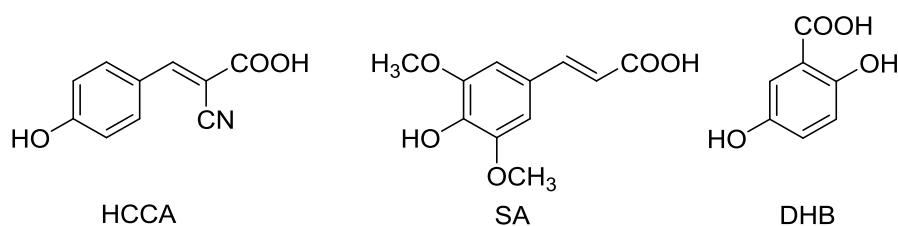


Abb. 1.7: Chemische Strukturen gängiger MALDI-Matrices für die Ionisierung mit einem 337,1 nm UV-Laser (Hillenkamp und Karas 2014). HCCA: α -Cyano-4-hydroxyzimtsäure; SA: Sinapinsäure (4-Hydroxy-3,5-dimethoxy-zimtsäure); DHB: 2,5-Dihydroxybenzoesäure.

Die MALDI Ionisierungstechnik, eingesetzt als bildgebendes Verfahren, beruht auf der software-gestützten Darstellung mehrerer Messpunkte (Abb. 1.6). Hierbei wird ein rechteckiger Messbereich festgelegt. Der Laser erzeugt durch einen Laserimpuls die Ionisierung der Matrix sowie der Probenmoleküle und das Massenspektrometer misst daraus ein Massenspektrum das einen Messpunkt darstellt. Der Laser bzw. die Probe

bewegt sich nach der ersten Messung um einen definierten Wert in der X-Richtung (horizontal) und ein weiterer Messpunkt wird erzeugt. Dies wird zunächst in X-Richtung und anschließend in Y-Richtung (vertikal) wiederholt bis das rechteckige Messraster gemessen wurde. Da für jeden Messpunkt ein Massenspektrum erzeugt wurde, kann das entstandene Messraster im Anschluss mittels Software massenspektrometrisch ausgewertet werden. Hier können nun selektiv einzelne monoisotopische Massen mit definierten Massen/Ionenfiltern oder Massenbereiche angezeigt werden, sodass einzelne Substanzen (Massen) in ihrer örtlichen Verteilung im Messraster der Probe visualisiert werden können. Von den einzelnen Messpunkten werden die Massen als Massenpixel (Vierecke) mit einer „Falschfarbe“ dargestellt, wobei die Farben mit einer Farbskala korrelieren die die Ionenintensitäten anzeigen (Abb. 1.6). Die Weiterentwicklung der MALDI Ionisierungstechnik als bildgebendes Verfahren wird als „MALDI-imaging“ bezeichnet.

1.4.2 Theoretische Hintergründe zur Ionisierungstechnik

Die Ionisierungstechnik der MALDI-Technik ist bisher nicht abschließend geklärt. Es gibt zwei diskutierte Mechanismen die zur Ionisierung der Analytmoleküle führen, das „Pooling“ und das „lucky survivor“ Modell (Hillenkamp und Karas 2014). Die Analytmoleküle liegen im Verhältnis von ca. 0,1-1% zu den Matrixmolekülen vor. Durch den Laserpuls entsteht eine sogenannte „Plume“, eine Wolke aus Analyt- und Matrix-Molekülen die aus der Probe in die Gasphase freigegeben werden. Das „Pooling“ Modell geht davon aus, dass zunächst die Matrixmoleküle durch Photoionisierung angeregt werden (Karas *et al.*, 1987; Ehring *et al.*, 1992). Zur Ionisierung eines Matrixmoleküls werden zwei Photonen (bei 337,1 nm Lasern) benötigt (Lüdemann *et al.*, 2002). Anschließend führt ein Energieaustausch/Ladungstransfer von mehreren Matrixmolekülen auf ein Analytmolekül zur Ionisierung.

Beim „lucky survivor“ Modell wird angenommen, dass die Analyten als geladene Moleküle (protoniert und deprotoniert) in gelöster Form in der Matrix eingebettet werden (Karas *et al.*, 2000; Krueger *et al.*, 2001). Bei organischen Säuren als Matrix liegen die meisten Analytmoleküle in der protonierten Form vor. Durch den Laserimpuls bricht das Kristallgitter auf und einzelne geladene Analytmoleküle werden in einem Matrix-Cluster in die MALDI-Wolke desorbiert. Dabei kommt es zu einer Neutralisation der geladenen Moleküle und ungeladene Lösungsmittel und Matrixmoleküle verlassen die Cluster. Statistisch bleiben dabei einzelne „lucky survivor“ als geladene Analyten zurück (Hillenkamp und Karas 2014), werden in das Massenspektrometer überführt und pro Laserimpuls ein Massenspektrum aufgezeichnet.

1.4.3 MALDI-imaging-HRMS von biologischen Proben

Einsatzgebiete der MALDI-imaging-HRMS Technik sind im allgemeinen die Naturstoff- und Arzneimittelforschung. Dabei wird die räumliche Verteilung von Zuckern, Wirkstoffen, Stoffwechselprodukten, Metallen, Sekundärmetaboliten und Proteinen in verschiedenen Geweben von Tieren, Insekten, Menschen und Pflanzen visualisiert (Chaurand *et al.*, 2002; Robinson *et al.*, 2007; Anderson *et al.*, 2009; van Remoortere

et al., 2010; Prideaux, *et al.*, 2011 & 2015; Ha *et al.*, 2012; Trede *et al.*, 2012; Norris & Caprioli 2013; Bjarnholt *et al.*, 2014; Moree *et al.*, 2014; Bhandari *et al.*, 2015; Yalcin & de la Monte 2015; Spengler 2015). Aufgrund der Informationen der örtlichen Verteilung der Stoffe können Rückschlüsse auf verschiedene Aspekte wie z.B. den Ort von Biosynthesen und Stoffwechselvorgängen, den Metabolismus von Arzneistoffen oder die physiologische Rolle von Sekundärmetaboliten getroffen werden. In der Naturstoffforschung hat sich MALDI-imaging-MS speziell für die Visualisierung von Sekundärmetaboliten in verschiedenen Pflanzenteilen wie Wurzeln oder Samen etabliert (Dalisay *et al.*, 2015; Boughton *et al.*, 2016; Dong *et al.*, 2016; Eckelmann *et al.*, 2016; Eckelmann *et al.*, 2017; Enomoto *et al.*, 2017; Lee *et al.*, 2017).

In den letzten Jahren wurde MALDI-imaging-MS vermehrt zur Untersuchung von Mikroorganismen (Fang & Dorrestein 2014), der Wechselwirkung von Mikroorganismen mit (Wirts)-Pflanzen und der Interaktion von Mikroorganismen (Bakterium-Bakterium, Bakterium-Pilz, Pilz-Pilz) eingesetzt (Lay 2001; Liu *et al.*, 2010; Traxler *et al.*, 2013; Watrous *et al.*, 2013; Moore *et al.*, 2013; Vallet *et al.* 2017). So konnte z.B. gezeigt werden, dass das Bakterium *B. subtilis* den Stoff Surfactin als chemische Abwehrverbindung im Antagonismus mit dem Pilz *Paraconiothyrium variable* eingesetzt wird. Als Verteidigungsmechanismus ist *P. variable* wiederum in der Lage Enzyme zu synthetisieren, die Surfactin hydrolysieren (Vallet *et al.* 2017).

2. Ziel der Arbeit

Das allgemeine Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung von Sekundärmetaboliten von Celastraceae-Pflanzen der Genera *Maytenus* und *Putterlickia* sowie assoziierter endophytischer Mikroorganismen mittels massenspektrometrischer und bildgebender Verfahren. Als übergeordnete Fragestellung wurde versucht, die physiologische bzw. ökologische Bedeutung der Sekundärmetaboliten für die Wirtspflanzen bzw. den Produzenten aufzuklären.

Die Arbeit wurde in zwei Kapitel aufgeteilt:

1. Untersuchung verschiedener *Maytenus* und *Putterlickia* Spezies auf Maytansinoide:
 - ❖ Screening verschiedener *Maytenus* Spezies auf Maytansinoide sowie Quantifizierung der Gehalte.
 - ❖ Untersuchung der Maytansinoid-Biosynthese in *Maytenus serrata* mit assoziierten endophytischen Gemeinschaften. Dabei stand die massenspektrometrische Strukturaufklärung und Identifikation der Maytansinoide sowie der Vorläufer-Moleküle (Intermediate der Biosynthese) mittels MSⁿ-Experimenten und Analyse der charakteristischen Fragmentierung im Fokus.
 - ❖ Visualisierung der Lokalisierung von Maytansinoiden in unterschiedlichen *Maytenus* Pflanzen mittels MALDI-imaging-HRMS.
 - ❖ Untersuchung von *Putterlickia pyracantha* auf Maytansinoide und Identifizierung der Verbindungen mittels HPLC-HRMSⁿ sowie Visualisierung der örtlichen Verteilung in verschiedenen Pflanzengewebe mittels MALDI-imaging-HRMS.
 - ❖ Monitoring der örtlichen Verteilung von Maytansinoiden in unterschiedlichen Lebensabschnitten, speziell während der Samenphase und des Keimungsprozesses, von *Maytenus senegalensis* und *Putterlickia verrucosa* Pflanzen mittels MALDI-imaging-HRMS. Neue Einblicke und Erkenntnisse der ökologischen Bedeutung von Maytansinoiden für die Wirtspflanzen aufgrund charakteristischer Verteilungen innerhalb verschiedener Pflanzengewebe.
2. Untersuchung des bakteriellen Endophyten *Serratia marcescens* MSRBB2 aus *Maytenus serrata*:
 - ❖ Aufklärung des Sekundärmetaboliten-Spektrums von *S. marcescens* MSRBB2 mittels HPLC-HRMSⁿ. Strukturaufklärung und Identifikation diverser Prodiginine und Serratamolide durch charakteristische Fragmentierungen der Derivate.

- ❖ Untersuchung der Biosynthese von Prodigininen und Serratamoliden mittels stabiler Isotopenmarkierung durch Fütterungsstudien mit isotopenmarkierten Vorläufer-Molekülen.
- ❖ Interaktion von *S. marcescens* MSRBB2 und koexistierenden Pilzendophyten derselben ökologischen Nische sowie unbekannter Pilze und Visualisierung der örtlichen Verteilung der Sekundärmetaboliten *in situ* mittels MALDI-imaging-HRMS. Neue Einblicke in die chemische Interaktion von *S. marcescens* MSRBB2 mit Pilzen sowie in die physiologische Bedeutung der Sekundärmetaboliten für den Produzenten.
- ❖ Methodenentwicklung: Kombination von Isotopenmarkierung und MALDI-imaging-HRMS führt zu einer kostengünstigen Methode, bei der der Einbau von stabilen Vorläufer-Molekülen in Sekundärmetaboliten aus dotiertem Agar direkt mittels MALDI-imaging-HRMS visualisiert werden kann.

3. Material und Methoden

3.1 Geräte

- HPLC-System der Agilent 1200-Serie bestehend aus: Autosampler (G1367B HiP-ALS), Pumpe (G1312B Binary Pump SL), Säulenofen (G1316B TCC SL), PDA (G1315C DAD SL) und Entgaser (G1379B), von Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland.
- HPLC-System UltiMate 3000 bestehend aus: Pumpe, Variablem Wellenlängen-Detektor, Flow Manager und Autosampler, von Dionex Softron GmbH, Germering, Deutschland.
- Massenspektrometer: LTQ-Orbitrap von Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA.
- Massenspektrometer: LTQ-Orbitrap XL von Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA.
- AP-SMALDI Q-Exactive: MALDI Quelle „imagine10“ (TransMIT GmbH, Giessen, Deutschland) gekoppelt mit einem hochauflösenden Q-Exactive Massenspektrometer (Thermo Scientific GmbH, Bremen, Deutschland).
- Matrixapplikationsgerät/pneumatischer Spray bzw. Nebulizer: Sprayer Giessen, (TransMIT GmbH, Giessen, Deutschland).
- Kryostat Microm HM550 (Thermo Scientific GmbH, Bremen, Deutschland).
- GC-MS: Thermo Scientific Trace GC Ultra gekoppelt an ein Thermo Scientific ISQ Massenspektrometer und einem PVT-Injektor (TriPlus RSH).
- Optisches Lichtmikroskop S8AP0 mit EC3 Digital Kamera (Leica Mikrosysteme GmbH, Wetzlar, Deutschland).
- Digitales Mikroskop VHX-5000 (Keyence Deutschland GMBH, Neu-Isenburg, Deutschland)
- Feinwaage: XS205 von Mettler Toledo, Columbus, USA.
- Rotationsverdampfer: Laborota 4001 Efficient von Heidolph, Schwabach, Deutschland.
- Lyophilisator: Beta 1-8 LDplus, Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz, Deutschland.
- Lyophilisator: Vaco5, ZIRBUS technology GmbH, Bad Grund, Deutschland.
- Vakuumzentrifuge: Savant SPD1010 von Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA.
- Vortex, VF2 (IKA-Werke GmbH, Staufen, Deutschland).
- Clean Bench: Thermo Scientific MSC-Advantage, Waltham, USA.
- Rotationsinkubator: INFORS HT Multitron 2, Einsbach, Deutschland.
- Inkubator: Memmert, Schwabach, Deutschland; Binder, Tuttlingen, Deutschland.

- Autoklav: SHP Laboklav 25-V, Detzel, Deutschland; Systec VB-55, Wetztenberg, Deutschland.
- Gefrierschrank: (-80 °C): Sanyo Ultra low MDF-U3086S, Sanyo Electric Co., Japan
- Zentrifuge: Allegra 2IR, Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland.
- Zentrifuge: Avanti J-25, Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland.
- Pflanzenkammer: Percival, CLF PlantClimatics GmbH, Wertingen, Deutschland.
- Rotormühle: ZM 200, Retsch GmbH, Haan, Deutschland.

3.2 Software

- Auswertung der LC-MS-Messungen: Software Xcalibur, Version 2.2, Service Pack 1.48 von Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA.
- Steuerung der LC-HRMS-Messungen: Software Xcalibur, Version 2.0.7, Service Pack 1.0 von Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA.
- Steuerung der präparativen HPLC: Gilson Unipoint System Software 5.11.
- Kalibrierung, Tuning und Einstellung aller relevanten massenspektrometrischen Messparameter der MALDI-Imaging-MS: Thermo Q-Exactive Tune Software Version 2.3 von Thermo Scientific GmbH, Bremen, Deutschland.
- Aufnahme optischer Bilder der Proben, Bildskalierung und Bildbearbeitung: ImageA & LAS EZ Software (Leica Mikrosysteme GmbH, Wetzlar, Deutschland).
- Steuerung des Matrixapplikationsgerätes, Auswahl der Matrix, Spray- und Spülfunktionen und Einstellung der Sprayparameter: Matrix Sprayer Control [v. 1.9.2890] (TransMIT GmbH, Giessen, Deutschland).
- Massenextraktion aus den aufgenommenen Spektren eines bildgebenden massenspektrometrischen Experimentes, Zuweisung der Massen zu Pixeln und weitere Bildbearbeitungen: ImageQuest [v. 1.0.3-β] (Thermo Scientific GmbH, Bremen, Deutschland).
- Steuerung der GC-MS-Messungen: Software Xcalibur, Version 2.2, Service Pack 1.0, von Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA.

3.3 Chemikalien

- Agar (granuliert): Difco™, Becton, Dickinson and Company, New Jersey, USA
- AHBA: als Hydrochlorid, 97,0%, Sigma-Aldrich, Steinheim (DE), CAS: 14206-69-0
- Atrazin 99%, Riedel-de Haen, Seelze (DE), CAS: 1912-24-9
- Bromocresol violett: Sigma-Aldrich, Steinheim (DE), CAS: 115-40-2
- Chitin: Sigma-Aldrich, Steinheim (DE), CAS: 1398-61-4
- Citronensäuremonohydrat: AppliChem GmbH, Darmstadt (DE), CAS: 5949-29-1
- Chloroform: p. A., AppliChem GmbH, Darmstadt (DE), CAS: 67-66-3
- deuteriertem Chloroform $\geq 99,8$ % Deuterium, Deutero GmbH, Kastellaun (DE), CAS: 865-49-6
- deuteriertem Methanol $\geq 99,8$ % Deuterium, VWR Chemicals, Fontenay - sous-Bois, Frankreich, CAS: 811-98-3
- DHS: 97,0%, Sigma-Aldrich, Steinheim (DE), CAS: 2922-42-1
- DHQ: als Kaliumsalz, 97,0%, Sigma-Aldrich, Steinheim (DE), CAS: 49211-79-9
- Dichlormethan: p. A., AppliChem GmbH, Darmstadt (DE), CAS: 75-09-2
- D(+)-Glukose Monohydrat: 99,5%, Fluka, Sigma-Aldrich, Steinheim (DE)
- Ethylacetat: techn., Fakultätseigene Aufreinigung
- Ethanol: AnalaR Normapur, VWR Chemicals, Fontenay-sous-Bois, Frankreich
- Glycerol: AppliChem GmbH, Darmstadt (DE), CAS: 56-81-5
- HCl: konz., AppliChem GmbH, Darmstadt (DE), CAS: 7647-01-0
- Hefeextrakt: Sigma-Aldrich, Steinheim (DE), CAS: 8013-01-2
- Kartoffelextrakt-Glucose-Agar: Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe (DE)
- Kartoffelextrakt-Glucose-Bouillon: Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe (DE)
- Malzextrakt: AppliChem GmbH, Darmstadt (DE), CAS: 8002-48-0

- Maytansinoid-DM1: ($\geq 95,0\%$) BOC Sciences, Creative Dynamics Inc., NY, USA
- MSTFA: synthesis grade, Sigma-Aldrich, Steinheim (DE), CAS: 24589-78-4
- Natriumhypochloritlösung: (6-14% aktives Chlor) EMPLURA, Merck KGaA, Darmstadt (DE)
- Nähragar: Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe (DE)
- Nährbouillon Nr.1: Fluka, Sigma-Aldrich, Steinheim (DE)
- Phosphorpentoxid: 97%, Sigma-Aldrich, Steinheim (DE), CAS: 1314-56-3
- Pyridin: 99,8% wasserfrei, Sigma-Aldrich, Steinheim (DE), CAS: 110-86-1
- Sabouraud Dextrose Bouillon: Fluka, Sigma-Aldrich, Steinheim (DE)
- Sabouraud-4%-Glukose-Agar: Fluka, Sigma-Aldrich, Steinheim (DE)
- Shikimisäure: $\geq 99\%$, Sigma-Aldrich, Steinheim (DE), CAS: 138-59-0
- Silica: EcoChrom, MP Silica 63-200, MP Biomedicals Germany GmbH, Eschwege (DE)
- Streptomyces Medium: Fluka, Sigma-Aldrich, Steinheim (DE)
- Streptomycin (Sulfat-Salz): Sigma-Aldrich, Steinheim (DE), CAS: 3810-74-0
- Salze Merck KGaA, Darmstadt (DE),
 - KH_2PO_4 CAS: 7778-77-0
 - K_2HPO_4 CAS: 7758-11-4
 - $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ CAS: 10034-99-8
 - MgSO_4 CAS: 7487-88-9
 - NaCl CAS: 7647-14-5
 - $\text{NaNH}_4\text{HPO}_4$ CAS: 7783-13-3
 - Natriumcitrat-dihydrat CAS: 6132-04-3
 - $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ CAS: 7782-85-6
 - NH_4Cl CAS: 12125-02-9
 - $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ CAS: 7722-76-1
 - $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ CAS: 7783-20-2
- 1,3,5 Trihydroxybenzol (dihydrat) Sigma-Aldrich, Steinheim (DE), CAS: 6099-90-7

- **Isotopenmarkierte Verbindungen** Cambridge Isotope Laboratories, Inc., Tewksbury, USA
 - $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ (98% ^{15}N)
 - $[1\text{-}^{13}\text{C}]\text{-L-Prolin}$ (99% ^{13}C)
 - $[\text{Methyl-D}_3]\text{-L-Methionin}$ (98% D)
 - $[1,2\text{-}^{13}\text{C}_2]$ Natriumacetat (99% ^{13}C)
 - $[^{15}\text{N}]\text{-L-Serin}$ (98% ^{15}N)

3.4 HPLC–Laufmittel

- Methanol, Acetonitril: Ultra Gradient HPLC-grade, J.T. Baker, Deventer, Niederlande
- Ameisensäure: 98%, Fluka, Sigma-Aldrich, Steinheim (DE)
- Bidest. Wasser: VE-Wasser, erneut destilliert
- Methanol (präpHPLC): techn., erneut destilliert

3.5 Mikroorganismen

Leibniz-Institut DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Deutschland

- *Staphylococcus aureus* (DSM 799)
- *Escherichia coli* (DSM 682)
- *Aspergillus fumigatus* (DSM 21023)
- *Pichia membranifaciens* (DSM 70366)
- *Pestalotiopsis versicolor* (DSM 62887)
- *Hamigera avellanea* (DSM 2208, syn. *Penicillium avellaneum*)
- *Actinosynnema pretiosum* subsp. *auranticum* (DSM 44131)

3.6 Methoden

3.6.1 HPLC-HRMS Messungen

Die HPLC-HRMS-Messungen wurden an einem LTQ Orbitrap bzw. Orbitrap XL Massenspektrometer durchgeführt. Zur Probentrennung wird eine HPLC-Säule mit C-18 Umkehrphase (Luna C18 (2), 50 x 3 mm, Partikelgröße 3 µm; Phenomenex, Torrance, USA) mit einer entsprechenden Vorsäule verwendet. Das Spektrometer wird im positiven Modus mit einem Nominalmassenauflösungsvermögen von 60000 bei m/z 400 mit einer Scanrate von 1 Hz unter folgenden Parametern betrieben: Spanspannung 5 kV, Kapillartemperatur 300 °C, Tubuslinse 100 V. Stickstoff wird als „sheath gas“ (55 arbitrary units) und „auxiliary gas“ (8 arbitrary units) verwendet. N-Butylbenzolsulfonamid wird als Lockmasse ($[M+H]^+$ m/z 214.0896) verwendet. Alle MS^n -Messungen werden mit einer Stoßfragmentierung von 35 eV mit Argon als Stoßgas durchgeführt. Die angelegten Parameter können bei einzelnen Messungen aus Optimierungsgründen abweichen. Der Säulenofen ist auf 30 °C temperiert. Das eingespritzte Probenvolumen beträgt im Normalfall 5 µL. Die Trennung erfolgt mit einem Lösungsmittelgradienten bei einer Flussrate von 300 µL/min.

Tab. 1: HPLC-Gradient für die Matansine-Analytik, lineare Änderung.

Zeit [min]	H2O + 0.1 % FA	ACN + 0.1 % FA
0	70	30
2	70	30
10,5	20	80
11	0	100
14	0	100
14,5	70	30
21	70	30

Abweichend zu den oben genannten Chromatographie-Einstellungen werden die Extrakte von *S. marcescens* MSRBB2 mit einer Flussrate von 350 µL/min gemessen.

Tab. 2: HPLC-Gradient für die Extrakt-Analytik von *S. marcescens* MSRBB2, lineare Änderung.

Zeit [min]	H2O + 0.1 % FA	ACN + 0.1 % FA
0	95	5
28	0	100
30	0	100
30,5	95	5
35	95	5

3.6.2 Präparative HPLC

Die Anreicherung und Fraktionierung der Vorläufer Moleküle von Maytansine aus *M. serrata* wurde an einer präparativen HPLC von Gilson, bestehend aus einer Pumpe (322) und einem UV/VIS-152 Detektor, auf einer Nucleodur C18 Isis Säule (5 µm

Partikelgröße, 250 x 16 mm, Macherey-Nagel) durchgeführt. Es wurde ein Gradientensystem verwendet mit einer Flussrate von 4 mL/min. Das Injektionsvolumen betrug 100 µL.

Tab. 3: Gradient der präparativen HPLC-Trennung von *M. serrata* Extrakten, lineare Änderung.

Zeit [min]	H ₂ O + 0.1 % FA	MeOH + 0.1 % FA
0	70	30
2	70	30
13	0	100
18	0	100
18,5	70	30
25	70	30

Für die Aufreinigung der Sekundärmetaboliten von *S. marcescens* werden 10 Erlenmeyerkolben mit 300 mL Nährmedium beimpft und unter statischen Bedingungen 14 Tage bei 30 °C fermentiert. Die vereinigten Fermentationen werden gefriergetrocknet, in Dichlormethan aufgenommen und über eine kurze Silica-Säule vorgereinigt. Das Extrakt wird einrotiert und in Methanol zur präparativen Trennung aufgenommen. Es wird ein Gradientensystem verwendet mit einer Flussrate von 3 mL/min. Das Injektionsvolumen beträgt 200 µL.

Tab. 4: Gradient der präparativen HPLC-Trennung von *S. marcescens* MSRBB2 Fermentations-Extrakten, lineare Änderung.

Zeit [min]	H ₂ O + 0.1 % FA	ACN + 0.1 % FA
0	70	30
3	70	30
47	0	100
57	0	100
57,5	70	30
60	70	30

3.6.3 Pflanzenbeprobung

Die Probenahmen und die behördliche Abwicklung der Beprobung wurden im Allgemeinen von Herrn Prof. Spiteller oder den Botanikern bzw. Wissenschaftlern die die Probenahme durchgeführt haben, organisiert.

Die Probenahme in Ghana wurde von Frau Dr. Evelyn Mireku und Herrn Dr. James Oppong Kyekyeku (Kwame Nkrumah University of Science and Technology, Kumasi, Ghana) und die Authentifizierung der Pflanzen am Herbarium der Universität durchgeführt (Department of Herbal Medicine). In Kamerun wurde die Pflanzenbeprobung von Herrn Wilfried Chimeze, Herrn Dr. Ferdinand Talontsi, Herrn Prof. Dr. Simeon Kouam (Universität Yaoundé I, Yaoundé, Kamerun) bzw. Herrn Prof. Spiteller organisiert und durchgeführt. Die Authentifizierung der Pflanzen geschah durch den Botaniker Herrn Victor Nana (National Herbarium of Yaoundé, Yaoundé, Kamerun), der zum Teil auch bei der Probenahme zugegen war. Die *Maytenus senegalensis* Wurzel aus Molepolole, Botswana (März 2015), wurde von Herrn Daniel

(Botswana National Herbarium, Gaborone, Botswana) gesammelt und authentifiziert und von Herrn Dr. Kibrom Bedane zur Analyse nach Deutschland gebracht. Die Beprobung in Südafrika wurde von Herrn Prof. Spiteller persönlich mit der Hilfe von Herrn Roy Gowar (Gowar Enterprises & Aloe Ferox, Grahamstown, Südafrika), Herrn Kersten Paulsen (K Paulsen Botanicals CC, Grootkloof Farm Stormsvlei, Bonnievale, Südafrika) und Ulrich Feiter (Gründer und Leiter Parceval Ltd. Pharmaceuticals, Wellington, Südafrika) durchgeführt. Die Pflanzen wurden von Tony Dold (Department of Botany, Rhodes University, Grahamstown, Südafrika), Kurator des Selmar Schonland Herbariums Grahamstown, authentifiziert.

In Deutschland wurden verschiedene Pflanzenproben aus zwei Botanischen Gärten (Ökologisch-Botanischer Garten der Universität Bayreuth; Botanischer Garten und Botanisches Museum Berlin) erhalten. Die Pflanzen wurden von den Mitarbeitern/Botanikern der Institutionen beprobt, an Herrn Prof. Spiteller ausgehändigt und anschließend analysiert. Dabei wurden vom Botanischen Garten Berlin zwei lebende *M. senegalensis* Pflanzen zur Untersuchung übergeben.

3.6.4 Pflanzenextraktion und Maytansinoid-Quantifizierung

Das getrocknete Pflanzenmaterial von *Maytenus* und *Putterlickia* Pflanzen wurde in Stücke zerkleinert und mit flüssigem Stickstoff gemörstert bzw. mit Hilfe einer Rotormühle zerkleinert. Das Material wird anschließend mit einem angepassten Volumen von Ethanol:Trichlormethan (80:20 v:v) bedeckt. Unter gekühlten Bedingungen wurden die Proben für 15 Minuten mit Ultraschall behandelt. Nach dem Filtrieren (Whatman Filterpapier) wird das Extrakt aufbewahrt und der Rückstand erneut mit Lösungsmittel bedeckt. Es wird eine erneute 15-minütige Ultraschallbehandlung durchgeführt, gefolgt von Filtration. Das Lösungsmittel der vereinigten Extrakte wird mit einem Rotationsverdampfer (Laborota 4001 Heidolph, Schwabach, Deutschland) bei 40 °C im Wasserbad mit 100 U/min eingedampft. Für HPLC-ESI-HRMSⁿ Messungen wird das Extrakt erneut in Methanol zu einem Rohextrakt gelöst. Die Maytansinoide werden mittels externen Kalibrierung mit Maytansinoid-DM1 [C₃₅H₄₈O₁₀N₃ClS] quantifiziert. Die Bestimmungsgrenze wird als 50 ng und die Nachweisgrenze als 10 ng ermittelt. Die Wiederfindung wird durch die Zugabe von 1 µg Maytansinoid DM1 zu *M. senegalensis* Pflanzenmaterial und anschließender Extraktion als 80% ermittelt. Der relative Response-Faktor ist unbekannt und wird mit 1 berücksichtigt.

3.6.5 Probenvorbereitung für MALDI-imaging-HRMS von Pflanzenproben

Frisches Pflanzenmaterial wird mit einer Zweigschere auf ein ca. 1 cm großes Stück vorgeschnitten. Die vorgeschnittene Probe wird mit einem OCT-Gefriermedium auf einen Probenteller fixiert und in ca. 30-50 µm dünne Schnitte in einem Thermo Scientific HM550 Kryostaten bei -25 °C Boxen-Temperatur und -15 °C Probenhaltertemperatur geschnitten. Je nach Probe werden die Temperaturen geringfügig variiert. Eine andere verwendete Technik ist, die Probe vollständig in Gelatine (25-100 mg/mL) oder Zellulose (5%) einzubetten und anschließend auf dem Probenteller zu fixieren und zu schneiden. Im Laufe der Arbeit hat sich das Einbetten

der Proben als geeignetste Methode erwiesen. Die Schnitte werden auf einen Glasobjektträger überführt und mit einem beidseitigen Klebeband (25 µm adhesive tape) fixiert. Die Matrixapplikation geschieht mit einer SMALDI Prep Sprühhvorrichtung (TransMIT GmbH, Deutschland). Die verwendete Matrixlösung ist DHB (30 mg/mL) in Aceton:Wasser 1:1 (v:v) mit zusätzlich 0.1% FA.

Das Aufsprühen der Matrix wird unter den folgenden Parametern durchgeführt: 15 µL/min Matrixfluss, 4 L/min Stickstoffstrom, 20 min Sprühzyklus mit zusätzlichen 10 min Sprühzyklus und einer Drehzahl der Probenplatte von 100 U/min. Vor dem Besprühen der Probe werden Bilder mit dem optischen Mikroskop Leica S8AP0 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland) bzw. mit dem digitalen Mikroskop VHX-5000 (Keyence Deutschland GMBH, Neu-Isenburg, Deutschland) aufgenommen und die Region von Interesse (Scanbereich) markiert.

3.6.6 MALDI-imaging-HRMS von Pflanzenproben

Die MALDI-imaging-HRMS Experimente werden mit einer Atmosphärendruck scanning microprobe matrix-assisted laser desorption/ionization Quelle (AP-SMALDI10; TransMIT GmbH, Deutschland), gekoppelt an ein Q Exactive hochauflösendes Massenspektrometer (Thermo Scientific Inc., Bremen, Deutschland), durchgeführt. Ein 60 Hz gepulster Stickstoff Laser der MNL 100 Serie (LTB Lasertechnik GmbH, Deutschland) wird für die UV-Strahlenerzeugung bei 337.1 nm verwendet. Die Scanauflösung variiert bei unterschiedlichen Proben (25-60 µm). Im positiven Modus wird ein Scanbereich von 200-800 m/z (oder 100-1000) mit einer internen Lockmasse von m/z 273.0394 [2DHB-2H₂O+H]⁺ eingestellt.

Die Messungen werden mit einer Massenauflösung von 140000 bei m/z 200, S-Objektivebene 65, einer Sprayspannung von 2.0 kV und einer Einlasszeit von 200 bzw. 300 ms aufgezeichnet. Attenuator-Wert der AP-Ionenquelle wird auf 20° eingestellt. Das Softwarepaket ImageQuest (v. 1.1.0; Thermo Fisher Scientific, Deutschland) wird für die Datenverarbeitung und Zuordnung der ausgewählten Massen verwendet. Die Bilderzeugung der Ionen wird mit einer Fehlerbreite von ± 2 ppm durchgeführt. Die Massenpixel werden mit Falschfarben dargestellt.

3.6.7 Phloroglucinol/HCl-Färbung von Pflanzengewebe

Zur Visualisierung und Bestimmung der verschiedenen Pflanzengewebe wurden Phloroglucinol/HCl-Färbungen der Quer- und Längsschnitte durchgeführt. 2% Phloroglucinol (1,3,5-Trihydroxybenzol; Sigma-Aldrich) wurden in Ethanol (95%) gelöst und zu gleichen Volumenverhältnissen mit konzentrierter HCl (1:1) gemischt. Nach 5-minütiger Inkubation wurden die Querschnitte kurz mit Ethanol und Wasser gewaschen und luftgetrocknet. Die ligninhaltigen Kompartimente färbten sich rot/violett. Anschließend wurden zur Dokumentation mikroskopische Aufnahmen angefertigt.

3.6.8 Keimung von *P. verrucosa* und *M. senegalensis* Samen

Es wurde mit verschiedenen Ansätzen probiert eine Keimung der *Putterlickia verrucosa* Samen zu erzeugen. Die höchste Keimrate wurde erzielt, indem die Samen in Wasseragar (1,7% Agar pro Liter Wasser) gedrückt und bei 30 °C mehrere Tage inkubiert wurden. Nach erfolgter Keimung wuchsen die Keimlinge in Perlit weiter. Einige Samen keimten auch direkt in Perlit mit regelmäßiger Bewässerung. Bei den *M. senegalensis* Samen wurde die beste Keimung erzielt, indem die Samen in Erde regelmäßig bewässert wurden. Gekeimte Pflanzen wurden in einer Pflanzenkammer kultiviert.

3.6.9 Isolierung von endophytischen Mikroorganismen

Die Endophyten wurden nach bestehenden Methoden isoliert (Kusari *et al.*, 2014a). Das Pflanzenmaterial wurde mit fließendem Leitungswasser von anhaftender Erde befreit und anschließend mit bidestilliertem Wasser gespült. Danach wurde das Material kurz getrocknet und in kleine Stücke von etwa 1 cm Länge geschnitten. Als negative Kontrolle wurden einige Stücke im Autoklaven (121 °C, 15 bar, 15 min) autoklaviert. Die restlichen Pflanzenstücke werden oberflächensterilisiert. Innerhalb einer Sterilwerkbank (clean bench) wurden die Stücke für 30 Sekunden in 70% Ethanol eingetaucht, dann für 3 Minuten in 1.3 M Natriumhypochlorit (4% verfügbares Chlor) und zuletzt für 30 Sekunden in 70% Ethanol. Die oberflächensterilisierten Pflanzenstücke wurden mit sterilem, bidest. Wasser gespült um die Sterilisationsmittel von der Oberfläche zu entfernen und anschließend auf sterilem Filterpapier getrocknet.

Um die endophytischen Bakterien, Pilze und die Gemeinschaft zu isolieren, wurden drei verschiedene Verfahren für die Kultivierung eingesetzt. Abb. 3.1 zeigt exemplarisch den isolationsprozess von *S. marcescens* aus *M. serrata*.



Abb. 3.1: Isolierung von endophytiischem *S. marcescens* aus dem Stamm von *M. serrata*. Primäre Isolierung (A) mit Vergrößerung (B) und Reinkultur (C).

Um die Bakterien zu erhalten, wurden die Pflanzenstücke in Nähragar (NA) gedrückt, für 1 bis 2 Tage bei 28 ± 2 °C kultiviert und anschließend wieder auf Nähragar ausgestrichen. Zur Isolierung der Pilze wurden die Stücke in Wasseragar (1.7% Agar pro Liter Wasser) mit 100 mg/L Streptomycin gegeben und für ca. eine Woche inkubiert. Anschließend wurden die Pilze auf Kartoffel-Dextrose-Agar (PDA)

ausgestrichen. Nach geeigneter Inkubation wurden Gefrierkulturen angelegt, indem das gewachsene Pilz- und Bakterienmaterial ausgestochen bzw. abgekratzt und in 500 µL 20%-ige Glycerin-Lösung bei -80 °C in einem Eppendorf Tube gelagert wurde.

Die endophytische Gemeinschaft wurde isoliert, indem die oberflächensterilisierten Stücke für 24 h bei 28 ± 2 °C unter Schütteln bei 150 U/min in 50 mL *Streptomyces* Nährmedium (SM, Sigma-Aldrich) in einem Rotationsschüttelapparat (INFORS HT Multitron 2, Einsbach, Deutschland) inkubiert wurden. Anschließend wurden 500 µL der gewachsenen endophytischen Gemeinschaft zu 500 µL 50%-iger Glycerin-Lösung gegeben und bei -80 °C in einem Eppendorf Tube gelagert.

Diese Verfahren werden auch mit den autoklavierten Negativkontrollen durchgeführt. Zum Zeitpunkt der Erstellung der Gefrierkulturen wird optisch beurteilt, dass kein Wachstum stattgefunden hat.

3.6.10 Maytansine-Biosynthese in *M. serrata*: DNS-Extraktion, PCR-Amplifikation und Sequenzierung

Sowohl die Extraktion der genomischen DNS als auch die PCR-Amplifikation (polymerase chain reaction), Aufreinigung und Sequenzierung der 16S rRNA und AHBA-Synthase Gene der verschiedenen Proben (*Maytenus serrata* Gewebe (Blatt, Wurzel und Rinde), bakterielle endophytische Gemeinschaften, positive Kontrolle *Actinosynnema pretiosum* subsp. *auranticum*) wurden nach bereits veröffentlichten Methoden durchgeführt (Kusari *et al.*, 2014a). Für die Analyse des Halogenase-Gens wurden bereits verwendete Primer in zwei aufeinanderfolgenden PCR-Amplifikationen verwendet (Wu *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2013). Die PCR-Vervielfachungen wurden mit in 50 µL durchgeführt bestehend aus 45 µL Red Taq DNS Polymerase Master Mix (1.1x), 0.5 µL "forward" Primer (100 µM), 0.5 µL "reverse" Primer (100 µM), 3 µL Matrizen-DNS und 1 µL steriles bidest. Wasser (Tab. 5). Die erste PCR-Amplifikation mit Primern P1 bestand aus den folgenden Arbeitsschritten: Denaturierung bei 95 °C für 2 min (30 Zyklen), Annealing und Elongation bei 95 °C für 30 s, 63 °C für 40 s und 72 °C für 30 s und einem abschließenden Elongationsschritt bei 72 °C für 5 Min. Die genomische DNS der endophytischen Gemeinschaften und der Pflanzengewebe wurde mittels PCR vervielfacht. Als positiv Kontrolle wurde *A. pretiosum* subsp. *Auranticum* verwendet und als negativ Kontrolle die Matrizen-DNS durch steriles bidest. Wasser ersetzt. Die zweite PCR-Amplifikation wurde mit den Primern P2 (entwickelt aus den konservierten Regionen FADH₂-abhängiger Halogenasen) mit folgenden Arbeitsschritten durchgeführt: Denaturierung bei 95 °C für 2 min (30 Zyklen), Annealing und Elongation bei 95 °C für 30 s, 62 °C für 40 s und 72 °C für 30 s. und einem abschließenden Elongationsschritt bei 72 °C für 5 Minuten. Die genomische DNS der endophytischen Gemeinschaften und der Pflanzengewebe wurde mittels PCR vervielfacht. Zur positiv Kontrolle wurde das asm12-Gen; ca. 1300 Basenpaare) von *A. pretiosum* subsp. *auranticum* verwendet. Das PCR-aufgereinigte 1300 Basenpaare-Fragment der endophytischen Gemeinschaft der Rinde (*M. serrata*) wurde als Matrice für die zweite PCR-Amplifikation verwendet. Als negativ Kontrolle diente bidest. Wasser. Die amplifizierten Fragmente (1300 und 550 Basenpaare) wurden mittels Agarosegelelektrophorese bestätigt. Anschließend wurden die Fragmente mittels „GFX™ PCR DANN“ und „Gel Band Purification Kit“ (GE

Healthcare Life Sciences, Deutschland) gereinigt und die Produkte von Seqlab Sequence Laboratories (Göttingen, Deutschland) sequenziert.

Tab. 5: Verwendete Primer zur genetischen Analyse der Maytansine-Biosynthese in *M. serrata*.

Primer Paare	Sequenz
P1 (forward)	5'-AAAGGATCCTCATATGCTCGACGCGATCGTGAT-3'
P1 (reverse)	5'-AAAGAATTCACCGGCCGACCGTGCCCG-3'
P2 (forward)	5'-TTCCSCGSTACCASATCGGSGAG-3'
P2 (reverse)	5'- GSGGGATSWMCCAGWACCASCC-3'
P3 (forward)	5'-AGAGGATCCTTCGAGCRSGAGTTTCGC-3'
P3 (reverse)	5'-GCAGGATCCGGAMCATSGCCATGTAG-3'
27F (16S rRNA forward)	5'- AGAGTTTGATCMTGGCTCAG -3'
1492R (16S rRNA reverse)	5'- TACGGYTACCTTGTACGACTT -3'

3.6.11 Identifizierung von endophytischen Mikroorganismen

Die im Dezember 2014 beprobte *Maytenus serrata* Pflanze wurde vom Botaniker Herr V. Nana (Natinales Herbarium von Kamerun) identifiziert und im Vergleich mit einer zuvor gesammelten *Maytenus serrata* Probe (Belegnummer: 26298 HNC; September 2014 (Kusari *et al.*, 2016) authentifiziert. Aus dieser Pflanze wurde ein Bakterium und zwei Pilze aus der Rinde sowie ein weiterer Pilz aus der Wurzel isoliert. Die Pilzendophyten wurden mittels ITS-Sequenzierung mit bereits berichteten Methoden (Li *et al.*, 2016) als *Pestalotiopsis virgatula* (Code: MSRBF1), *Aspergillus caesiellus* (Code: MSRBF2) und *Pichia* spp. (neue Spezies, Code: MSRRF1) identifiziert (Sequenzen eingereicht beim European Molecular Biology Laboratory (EMBL)). Abb. 3.2 zeigt die isolierten endophytischen Pilze als Reinkulturen auf PDA.

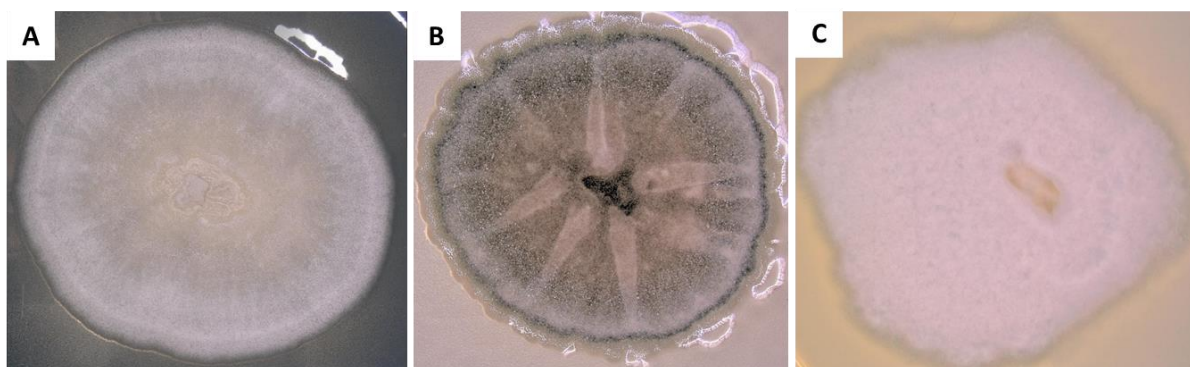


Abb. 3.2: Mikroskop-Aufnahmen der isolierten endophytischen Pilze als Reinkulturen auf PDA (*Pichia* spp. (A), *A. caesiellus* (B) und *P. virgatula* (C)) isoliert aus *M. serrata*.

Das Bakterium wurde zuerst mit Hilfe von Bruker Daltonik GmbH (Daniela Boulay, Bremen, Deutschland) mit dem MALDI-Biotyper (MALDI-TOF-Massenspektrometer Microflex) mit zugehörigem Datenbankabgleich als *Serratia marcescens* mit einem Scorewert von 2,34 (Spezieskonsistenz) identifiziert (Code: MSRBB2). Zusätzlich

wurde das endophytische Bakterium MSRBB2 durch 16s rDNS-Sequenzierung (Primer 27f (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3') und 1492r (5'-ACG GYT ACC TTG TTA CGA CTT-3')) als *S. marcescens* bestätigt (Sequenzen eingereicht beim European Molecular Biology Laboratory (EMBL)).

3.6.12 Fermentation der endophytischen Gemeinschaft

5 µL der Gefrierkultur der endophytischen Gemeinschaft der unterschiedlichen Pflanzenproben wurden mit je 300 mL GYM *Streptomyces*-Nährlösung (4 g Glukose, 4 g Hefeextrakt, 10 g Malzextrakt, 1 L bidestilliertes Wasser, auf pH 7.2 eingestellt) 24 h lang bei 28 ± 2 °C unter Schütteln (150 U/min) auf einem Rotationsschüttler (Infors HT Multitron 2, Einsbach, Deutschland) inkubiert.

Die Fermentationskultur wurde 3 mal mit 100 mL Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten Extrakte wurden am Rotationsverdampfer (Laborota 4001 Heidolph, Schwabach, Deutschland) bei 40 °C im Wasserbad mit 100 U/min einrotiert und für die HPLC-HRMS Messungen in Ethanol gelöst. Der wässrige Rückstand wurde gefriergetrocknet, in Ethanol gelöst und mittels HPLC-HRMS gemessen.

Bei einem Hemmhof beim *Hamigera avellanea*-Bioassay wurden die endophytischen Gemeinschaften mit drei verschiedenen Flüssigmedien unter identischen Bedingungen kultiviert, extrahiert und analysiert (Nährlösung (nutrient broth); Kartoffel-Dextrose-Medium (potato dextrose broth); Sabouraud-Dextrose-Bouillon (Sabouraud-Dextrose Broth)).

3.6.13 *Hamigera avellanea*-Bioassay der endophytischen Gemeinschaften

Das *Hamigera avellanea*-Bioassay wurde nach bestehenden Methoden durchgeführt (Kusari *et al.*, 2014a). 100 mL Kartoffeldextrosemedium werden mit 5 µL der aufgetauten Gefrierkultur des Maytansine-sensitiven Pilzes *Hamigera avellanea* (Hanka & Barnett 1974; Kusari *et al.*, 2014a) beimpft (DSM 2208 syn. *Penicillium avellaneum*) und 72 h bei 28 ± 2 °C unter Schütteln inkubiert. Von den endophytischen Gemeinschaften werden Kulturen (5 µL Gefrierkultur mit 6 mL Streptomyces-Medium) unter gleichen Bedingungen hergestellt (24 h). Die gebildete *Hamigera*-Biomasse wird dekantiert, in einen sterilen Mörser überführt und mit ca. 3 mL sterilen doppelt destilliertem Wasser und einem sterilen Pistill zu einer Suspension gemischt. 200 µL der Suspension werden auf die verschiedenen Agar-Platten mit einem sterilen Wattestab ausgestrichen.

15 µL der endophytischen Gemeinschaften werden auf sterile 6 mm-Papierscheiben überführt, getrocknet und mit einer Pinzette auf den Agarplatten platziert (dreifache Ausfertigung). Unbeimpfte 6 mm-Papierscheiben werden als Blank verwendet. Die hergestellten Platten werden verschlossen, bei 28 ± 2 °C inkubiert und nach 24 h ausgewertet.

3.6.14 Co-Kultivierung von *S. marcescens* MSRBB2 mit endophytischen Pilzen und Rasterelektronenmikroskopie

Für die Co-Kultivierungen (Restriktions- bzw. Konfrontationsassay) von *S. marcescens* MSRBB2 mit verschiedenen Pilzen (*P. virgatula*, *A. caesiellus*, *Pichia* spp., *Aspergillus fumigatus* (DSM 21023), *Pichia membranifaciens* (DSM 70366), *Pestalotiopsis versicolor* (DSM 62887)) wurden die Mikroorganismen zunächst auf PDA (Pilze) und NA (Bakterien) bei 30 °C kultiviert (*P. membranifaciens* bei 23 °C). Von den Mikroorganismen wurden Zellsuspension hergestellt indem Biomasse mit der Impföse in 1 mL steriles bidest. Wasser überführt und durch Schütteln homogenisiert wurde. Die Zellsuspension der Pilze wurde mit einem sterilen Wattestäbchen als Linie auf PDA ausgestrichen. *S. marcescens* MSRBB2 sowie als Vergleich/Kontrolle weitere pathogene Bakterien (*S. aureus* (DSM 799) und *E. coli* (DSM 682)) wurden in einem Abstand von ca. 1 cm parallel zum Pilzstrich auf beiden Seiten ausgestrichen. Von allen Proben wurden mindestens drei Replikate angefertigt, 14 Tage bei 30 °C kultiviert und photographisch dokumentiert (*P. membranifaciens* bei 23 °C). Zusätzlich wurden Rasterelektronenmikroskopie Aufnahmen der Co-Kultivierungen und als Vergleich von Monokultivierungen angefertigt. Dazu wurden ca. 1 cm² Proben des Agars ausgeschnitten, mit flüssigem Stickstoff gefroren und lyophilisiert. Die Proben wurden mit einem leitenden Kleber auf dem Probenhalter fixiert und Bilder mit einem Rasterelektronenmikroskop S-4500 (Hitachi High-Technologies, Krefeld, Deutschland) im Niederspannungsmodus (1 kV) unter zuvor beschriebenen Methoden aufgezeichnet (Drathen *et al.*, 2016).

Um die Interaktion mit den isolierten endophytischen Pilzen weitergehend zu untersuchen, wurden Co-Kultivierungen auf PDA für MALDI-imaging-HRMS Messungen angesetzt. Dazu wurde Biomasse der Mikroorganismen mit der Impföse von zuvor kultivierten Agarplatten in steriles bidest. Wasser überführt und eine Zellsuspension hergestellt. Diese wurde als Punkt oder kleiner Strich auf dem Agar mit einem sterilen Wattestäbchen ausgestrichen. 15 µL der *S. marcescens* MSRBB2 Zellsuspension wurden im Abstand von ca. 1 cm vor den Pilzen als Linie ausgestrichen. Es wurden mindestens 10 Replikate angesetzt und bei 30 °C inkubiert. Als Kontrolle wurde *S. marcescens* MSRBB2 ohne Pilze ausgestrichen. Das Wachstum und die Prodigiosin-Produktion wurden überwacht und zwischen 3 bis 7 Tagen photographisch dokumentiert. Zu unterschiedlichen Kultivierungszeiten wurden MALDI-imaging-HRMS Messungen durchgeführt.

3.6.15 Probenvorbereitung für MALDI-imaging-HRMS von Mikroorganismen

Die zu messenden Bereiche der auf Agar (PDA oder NA) kultivierten Bakterien bzw. Pilze werden mit einer Rasierklinge zu quadratischen Proben (ca. 8 x 8 mm) zurechtgeschnitten, auf einen Glasobjektträger überführt und mit einem beidseitigen Kleband (adhesive tape) fixiert. Anschließend wurde die Probe mit einem Stickstoffstrom getrocknet. Die Matrixapplikation geschieht mit einer SMALDI Prep Sprühvorrichtung (TransMIT GmbH, Deutschland). Die verwendete Matrixlösung ist HCCA (HCCA (α-Cyano-4-Hydroxycimtsäure, 7 mg/mL) in Aceton:Wasser 1:1 (v:v) mit zusätzlich 0.1% FA.

Das Auftragen der Matrix wird unter den folgenden Parametern durchgeführt: 20 µL/min Matrixfluss, 3 L/min Stickstoffstrom, 30 min Sprühzyklus und einer Drehzahl der Probenplatte von 100 U/min. Vor dem Besprühen der Probe werden Bilder mit dem digitalen Mikroskop VHX-5000 (Keyence Deutschland GMBH, Neu-Isenburg, Deutschland) aufgenommen.

3.6.16 MALDI-imaging-HRMS von Mikroorganismen

Die MALDI-imaging-HRMS Experimente von *S. marcescens* MSRBB2 und endophytischen Pilzen wurden mit dem bereits genannten Gerät durchgeführt. Folgende Anpassungen wurden vorgenommen: Die Scanauflösung aller Proben wurde einheitlich auf 40 µm festgelegt. Im positiven Modus wird ein Scanbereich von 100-1000 m/z für Fullscan-Messungen mit einer internen Lockmasse von m/z 228.00575 [HCCA+K]⁺ eingestellt. Die MS²-Messungen von Prodigiosin [M+H]⁺ wurden durchgeführt von m/z 324.2 ± 0.5 Da mit einem Scan-Bereich von m/z 100-340, „higher-energy collisional dissociation“ (HCD) mit 45 eV und einer Auflösung von 35000 @ m/z 200.

Die Bilderzeugung der Ionen wird mit einer Fehlerbreite von ± 2 ppm für Fullscan-Messungen und ± 3 ppm für MS²-Messungen durchgeführt.

3.6.17 Markierungsstudien mit *S. marcescens* MSRBB2 in flüssigem Nährmedium

Zunächst wurde untersucht, ob *S. marcescens* MSRBB2 in Minimalmedien (300 mL in 500 mL Erlenmeyer-Kolben, statisch bei 30 °C) eine Pigmentproduktion zeigt. Die verwendeten Medien waren, M6-(20 g Glukose, 0.5 g Hefeextrakt, 0.2 g (NH₄)₂SO₄, 0.2 g KH₂PO₄, 0.1 g MgSO₄·7H₂O), M9-(12.8 g Na₂HPO₄·7H₂O, 3 g KH₂PO₄, 0.5 g NaCl, 1 g NH₄Cl, 0.2% Glukose), Koser-Citrat- (3 g Natriumcitrat, 1 g KH₂PO₄, 1.5 g NaNH₄HPO₄, 0.2 g MgSO₄) und Simmons-Citrat-(5 g NaCl, 2 g Natriumcitrat-dihydrat, 1 g NH₄H₂PO₄, 1 g K₂HPO₄, 0.2 g MgSO₄) Medium. Da keine Pigmentproduktion festzustellen war, wurde die Untersuchung der Biosynthese der produzierten Prodiginine und Serratamolide mit *S. marcescens* MSRBB2 mit stabilen isotoopenmarkierten Vorläufern (Cambridge Isotope Laboratories, Inc., Tewksbury, USA) in verdünnter Nährlösung (NB; 1/2 und 1/4 der vorgegebenen Zusammensetzung) durchgeführt. 50 mL NB wurden mit *S. marcescens* MSRBB2 beimpft und stationär bei 30°C für 2-3 Tage inkubiert bis die erste Pigmentproduktion sichtbar war. Dann wurden 50 mg ¹⁵NH₄Cl (98% ¹⁵N), 50 mg [1-¹³C] -L-Prolin (99% ¹³C), 75 mg [Methyl-D₃] -L-Methionin (98% D), 100 mg ¹⁵N-L-Serin (98% ¹⁵N), und 50 bzw. 100 mg [1,2-¹³C₂] -Natriumacetat (99% ¹³C) als wässrige Lösung durch Sterilfiltration (Spritzenfilter, Porengröße 0.2 µm, CA, Roth, Karlsruhe, Deutschland) zugegeben und weitere 7 Tage inkubiert. Die Fermentationen wurden gestoppt, das Wasser unter Verwendung eines Rotationsverdampfers (Laborota 4001, Heidolph, Schwabach, Deutschland) in einem 40 °C-Wasserbad bei 150 U/min verdampft, die getrockneten Extrakte in Methanol gelöst, transferiert und auf 0.5 ml Probenvolumen für HPLC-HRMS-Messungen reduziert.

3.6.18 Markierungsstudien mit *S. marcescens* MSRBB2 auf Agar

Nähragar und Kartoffel-Dextrose-Agar wurden nach Herstellerangaben in kleinen Petrischalen (60 x 15 mm) mit einer Dicke von ca. 4 mm gegossen. Nachdem sich der Agar verfestigt hatte, wurde eine weitere dünne Schicht (ca. 1-2 mm, 2-3 ml pro Petrischale) des jeweiligen Agars mit einem Zusatz der stabilen isotoopenmarkierten Vorläufer darüber gegossen. $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ (98% ^{15}N), $[1\text{-}^{13}\text{C}]$ -L-Prolin (99% ^{13}C), [Methyl- D_3]-L-Methionin (98% D) und ^{15}N -L-Serin (98% ^{15}N) wurden mit einer Konzentration von 1 mg/ml zugesetzt. Die markierten Verbindungen wurden dem Medium vor dem Autoklavieren gegeben. Zusätzlich wurden Experimente mit [Methyl- D_3] -L-Methionin in Konzentrationen von 0.5 und 2 mg/ml durchgeführt um die Auswirkungen der Konzentration auf den Markierungsgrad zu testen. Der Agar wurde mit *S. marcescens* MSRBB2 beimpft und 3 Tage (NA) oder 7 (PDA) bei 30°C inkubiert. Für MALDI-imaging-Versuche wurden die Proben mit dem digitalen Mikroskop VHX-5000 fotografiert, eine quadratische Probe von ca. 8 x 8 mm mit einer Rasierklinge ausgeschnitten, auf einen Glasträger übertragen, mit einem dünnen 25 μm -Klebeband fixiert und unter einem Stickstoffstrom getrocknet. Die Matrixapplikation und die MALDI-Bildgebung wurde analog Kapitel 3.6.16 durchgeführt. Zusätzlich wurden 1 oder 2 inkubierte Platten nach 3 (NA) bzw. 7 (PDA) Tagen mit Methanol (dreimal mit 15 min Ultraschall) extrahiert, konzentriert und mittels HPLC-HRMS gemessen.

3.6.19 NMR

1D und 2D NMR Spektren wurden mit einem Bruker AV 600 und/oder 700 Avance III HD (CryoProbe) mit deuteriertem Chloroform (Prodigiosin, Serrawettin W1) oder deuteriertem Methanol (Serratamsäure) aufgenommen. Für die Kalibrierung wurden die Restprotonen der Lösungsmittel verwendet und die Auswertung der Spektren erfolgte mit MestReNova (Version 9.0.1). Die Messungen von Prodigiosin wurden durch Mithilfe von Andreas Lagojda realisiert.

3.6.20 Blattpunktionstest

Der Blattpunktionstest (Pflanzen-Zytotoxizitäts-Assay) wurde basierend auf veröffentlichten Methoden (Masi *et al.*, 2017) durchgeführt und angepasst. Frische Blätter von lebenden Pflanzen wurden aus dem INFU Gewächshaus gesammelt (*M. heterophylla* und *M. canariensis* ursprünglich aus Südafrika; *M. senegalensis* aus dem Botanischen Garten Berlin). Von *M. heterophylla* und *M. senegalensis* Blättern wurden mit einer Rasierklinge vier Replikate von jeweils 5 Sektionen mit einer Größe von 2-3 cm geschnitten. Aufgrund der geringen Größe der *M. canariensis* Blätter wurden 40 intakte Blätter verwendet. Insgesamt wurde jede Spezies 40 mal mit einer Injektionsnadel punktiert. Prodigiosin und Serrawettin W1 wurden in Methanol gelöst und mit bidest. Wasser auf eine Konzentration von 5×10^{-3} M verdünnt. Als Negativ-Kontrolle wurde eine der Verdünnung vergleichbare Lösung verwendet ($\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$ 4:1, v:v). Ein Tropfen (1 μL) der Lösungen wurde auf die punktierte Stelle der Blätter gegeben. Die Blätter wurden in mit einem befeuchteten Filterpapier ausgelegten Petri-Schalen gelegt, mit Parafilm verschlossen und bei 25 °C mit einem Tag/Nacht-Wechsel von 12 Stunden gelagert. Das Assay wurde täglich visuell überprüft und nach

3 bzw. 6 Tagen mit einem Mikroskop dokumentiert. Als Positiv-Kontrolle wurde Atrazin (1 mg/mL) verwendet.

3.6.21 Chitinase-Nachweismedium

Das Chitinase-Nachweismedium wurde in zwei Varianten angesetzt. Einmal mit veröffentlichter Zusammensetzung (15 g Agar, 1 g Citronensäuremonohydrat, 2 g KH_2PO_4 , 0.3 g MgSO_4 -Heptahydrat, 3 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 4.5 g kolloidales Chitin und 0.15 g Bromcresolpurpur (pro Liter), auf pH 4.7 eingestellt) (Agrawal & Kotasthane 2012) und einmal mit zusätzlichen 20 g/L Glukose. 15 μL einer Zellsuspension von *S. marcescens* MSRBB2 (Biomasse in 1ml steriles bidest. Wasser überführt und homogenisiert) wurde auf sterile 6 mm Papierscheiben überführt und trocknen gelassen. Die beimpften Scheiben wurden auf die zwei Chitinase-Nachweismedien überführt, 14 Tage bei 30 °C inkubiert und dokumentiert.

3.6.22 Prodigiosin-Disc-Assay

Für das Prodigiosin-Disc-Assay wurden erneut Zellsuspensionen der endophytischen Pilze hergestellt (*P. virgatula*, *A. caesiellus*, *Pichia* spp.) Die Pilze wurden als Linie bzw. in Y-form mit sterilen Wattestäbchen auf PDA ausgestrichen. 20 μL (Y-form) und 10 μL (Linie) unterschiedlicher Konzentrationen von aufgereinigtem Prodigiosin (1, 0.1, 0.01 und 0.001 mg/mL, gelöst in MeOH) wurden auf sterile 6 mm Papierscheiben gegeben und trocknen gelassen. Anschließend wurden die Papierscheiben auf die Pilz-Linien bzw. in dreiecksform um das Pilz-Y mit einer Pinzette überführt. Kontrollen mit Methanol wurden ebenfalls angefertigt. Die Platten wurden 7 Tage bei 30 °C inkubiert und dokumentiert.

4. Ergebnisse und Diskussion

4.1 Untersuchung verschiedener *Maytenus* und *Putterlickia* Spezies auf Maytansinoide

4.1.1 Quantifizierung der Maytansinoid-Gehalte verschiedener *Maytenus* Spezies

In der bisherigen Maytansine-Forschung wurden zunächst einzelne Spezies der Gattungen *Maytenus* und *Putterlickia* mit dem Schwerpunkt der Strukturaufklärung verschiedener Maytansinoide untersucht. Im Jahr 2003 wurde eine Screening Studie von drei *Putterlickia* und zwei *Maytenus* Spezies veröffentlicht (Pullen *et al.*, 2003). Dabei wurde in den untersuchten *Putterlickia* Pflanzen eine Variabilität der Anwesenheit von Maytansinoiden festgestellt und in keiner der untersuchten *Maytenus*-Pflanzen Maytansinoide detektiert.

Da jedoch verschiedene *Maytenus* Spezies bekannt sind für die Präsenz von Maytansinoiden (Kupchan *et al.*, 1972a, 1972b, 1974, 1977, Sneden & Beemsterboer 1980; Ahmed *et al.*, 1981; Chaoming *et al.*, 1983; Larson *et al.*, 1999; Brossi 1985; Nakao *et al.*, 2004; Cassady *et al.*, 2004), wurde ein erweitertes Screening von 19 verschiedenen *Maytenus* Spezies, gesammelt in fünf afrikanischen Ländern und zwei botanischen Gärten in Deutschland, durchgeführt. Dabei wurden verschiedene Spezies von gleichen Standorten, gleiche Spezies von verschiedenen Standorten und verschiedenen Probenahmezeitpunkten für gleiche Standorte analysiert. Um eine Aussage über die Lokalisierung bzw. die Verteilung der Zielverbindungen innerhalb der Pflanze treffen zu können, wurden die verschiedenen Kompartimente (z.B. Blatt, Rinde, Wurzel) separat analysiert. Die Pflanzenrohextrakte wurden mittels HPLC-¹H/MS auf alle bekannten Maytansinoide über die monoisotopische Masse mittels Massensfilter mit einer Massenabweichung von ± 2 ppm untersucht um für jede Probe ein Maytansinoid-Profil zu erstellen (Substanz-Liste im Anhang, Tab. 14). Bei positivem Befund und passendem Isotopenmuster einfach-chlorierter Verbindungen wurden MS²-Messungen zur definitiven Bestätigung durchgeführt und die Maytansinoid-Gehalte quantifiziert. In den folgenden Kapiteln (4.1.2) wird die massenspektrometrische Analyse ausführlich erläutert. Tab. 6 zeigt die Ergebnisse des Screenings. Allgemein können neben der Hauptkomponente Maytansine weitere Derivate wie Maytanprine und Maytanbutine detektiert werden. Da diese Komponenten häufig gemeinsam gefunden werden, zeigen ebenfalls frühere Studien, z.B. zu *M. ilicifolia* (Ahmed *et al.*, 1981).

Innerhalb einer Pflanze werden Maytansinoide häufig in mehreren Geweben detektiert was zeigt, dass die Stoffe einem Transport innerhalb der Pflanze unterliegen könnten und nicht lokal begrenzt sind. Dabei werden die Zielverbindungen meistens sowohl in der Wurzel als auch in der Rinde bzw. den Zweigen detektiert. Die Blätter weisen nur in zwei Fällen Maytansinoide auf (Nr. 3, 86).

Für *M. undata* kann zum ersten Mal Maytansine und für *M. heterophylla* Maytanprine und Maytanbutine detektiert und mittels MS² eindeutig bestätigt werden. In *M. senegalensis* und *M. serrata* können in früheren Studien bereits diese drei Maytansinoide nachgewiesen werden (Kupchan *et al.*, 1977; Chaoming *et al.*, 1983).

4. Ergebnisse und Diskussion

Für *M. linearis* dagegen wird erstmalig die Anwesenheit von Maytansine, Maytanprine und Maytanbutine gezeigt.

Tab. 6: Maytansinoid-Gehalte verschiedener *Maytenus* Pflanzenproben mit Beprobungsort und Zeitpunkt.

Nr.	Spezies	Ort	Monat /Jahr	Gewebe	µg/kg Pflanze (Trockengewicht)		
					Maytansine	Maytanprine	Maytanbutine
1	<i>M. serrata</i>	Bafoussam (Lac Baleng), CM	09/14	W	577	154	29
2				R	977	173	33
3				B	<LOQ	<LOQ	-
4	<i>M. serrata</i>	Bambui (Bamenda), CM	12/14	W	14	12	11
5				R	18	2	-
6				Z, B	-	-	-
7	<i>M. serrata</i>	Kwahu Asakraka, GH	01/15	W, R	-	-	-
8	<i>M. serrata</i>	Ejura Mampong, GH	06/15	W	<LOQ	<LOQ	30
9				Z, B	-	-	-
10	<i>M. serrata</i>	Kwahu Asakraka GH	04/16	Z	989	473	564
11	<i>M. serrata</i>	Kwahu Asakraka GH, S1	10/16	B, Z, R, W	-	-	-
12	<i>M. serrata</i>	Kwahu Asakraka GH, S2	10/16	B, Z	-	-	-
13	<i>M. serrata</i>	Kwahu Asakraka GH, S3	10/16	B, Z	-	-	-
14	<i>M. serrata</i>	Bambui (Bamenda), CM	12/16	W	83	52	76
15				R	148	64	46
16				Z, B	-	-	-
17	<i>M. linearis</i>	Grahamstown, ZA	10/15	W, B	-	-	-
18				Z	19	<LOQ	28
19	<i>M. heterophylla</i>	Bonnievale, ZA	04/15	W	2	2	<LOQ
20				Z	54	16	-
21				B	-	-	-
22	<i>M. heterophylla</i>	Bonnievale, ZA	10/15	W	112	35	<LOQ
23				Z	1167	602	72
24				B	-	-	-
25	<i>M. heterophylla</i>	Tchouta moussa (Bangangte), CM	12/16	W	119	117	341
26				R	97	33	100
27				Z, B	-	-	-
28	<i>M. heterophylla</i>	Kirstenbosch, ZA	02/17	Z, B	-	-	-
29	<i>M. heterophylla</i>	Kogmannskloof, ZA	02/17	Z, B	-	-	-
30	<i>M. heterophylla</i>	Barrydale, ZA	02/17	W	137	124	39
31				Z	512	248	36
32				S	54	49	16
33				B	-	-	-
34	<i>M. heterophylla</i>	Seweweekspoort, ZA	02/17	W	410	451	215
35				Z	-	<LOQ	-
36				B	-	-	-
37	<i>M. heterophylla</i>	Addo Park, ZA	02/17	Z, B	-	-	-
38	<i>M. heterophylla</i>	Grahamstown, ZA	02/17	Z	846	452	48
39				S	247	333	69
40				B	-	-	-

4. Ergebnisse und Diskussion

Nr.	Spezies	Ort	Monat /Jahr	Gewebe	µg/kg Pflanze (Trockengewicht)		
					Maytansine	Maytanprine	Maytanbutine
41	<i>M. heterophylla</i>	Kogmannskloof, ZA	11/17	W	7	6	4
42				Z	27	24	12
43				B	-	-	-
44	<i>M. heterophylla</i>	Barrydale (left), ZA	11/17	W	57	81	61
45				Z	127	127	17
46				B, BI	-	-	-
47	<i>M. heterophylla</i>	Barrydale (right), ZA	11/17	Z	546	508	146
48				B, FI	-	-	-
49	<i>M. heterophylla</i>	Seweweekspoort, ZA	11/17	W, Z, B, BI	-	-	-
50	<i>M. senegalensis</i>	Tonga, CM	09/14	W	<LOQ	-	4
51				B	-	-	-
52	<i>M. senegalensis</i>	Mouda, CM	09/14	W	<LOQ	<LOQ	<LOQ
53	<i>M. senegalensis</i>	Bénoué National park P3, CM	11/14	W	13	10	77
54	<i>M. senegalensis</i>	Tonga, CM	12/14	W, B	-	-	-
55				R	<LOQ	<LOQ	1
56				Z	<LOQ	<LOQ	<LOQ
57	<i>M. senegalensis</i>	Kwahu Asakraka, GH	01/15	W, R	-	-	-
58	<i>M. senegalensis</i>	Molepolole, BW	04/15	W	22	11	-
59	<i>M. senegalensis</i>	Ejura Mampong, GH	06/15	W	<LOQ	<LOQ	5
60				Z	-	<LOQ	27
61				B	-	-	-
62	<i>M. senegalensis</i>	BG Berlin, DE	07/15	W, R, B, BI	-	-	-
63	<i>M. senegalensis</i>	Ejura Mampong, GH	11/15	W	<LOQ	<LOQ	14
64				Z	26	10	56
65				B	-	-	-
66	<i>M. senegalensis</i>	Ejura Mampong, GH, I	04/16	B, Z	20	9	29
67	<i>M. senegalensis</i>	Ejura Mampong, GH, II	04/16	W	24	29	114
68				B, Z	-	-	-
69	<i>M. senegalensis</i>	Kwahu Asakraka, GH, I	04/16	R	-	-	-
70	<i>M. senegalensis</i>	Kwahu Asakraka GH, II	04/16	R	49	19	27
71				W	85	49	295
72	<i>M. senegalensis</i>	Kwahu Asakraka GH, III	04/16	B, Z	18	9	25
73	<i>M. senegalensis</i>	Nigeria	06/16	W	135	142	413
74				R	16	10	27
75				Z	31	12	12
76				B	-	-	-
77	<i>M. senegalensis</i>	Tonga, CM	12/16	W	112	71	279
78				R, Z, B	-	-	-
79	<i>M. undata</i>	Bakong Centre, CM	09/14	W, R	<LOQ	-	-
80				F	-	-	-
81	<i>M. undata</i>	Bakong Plateau, CM	09/14	R	-	-	-
				W	<LOQ	-	-
82	<i>M. undata</i>	Bakong-Bangante, CM	12/16	W, R, Z,	-	-	-
				B, S	-	-	-

4. Ergebnisse und Diskussion

Nr.	Spezies	Ort	Monat /Jahr	Gewebe	µg/kg Pflanze (Trockengewicht)		
					Maytansine	Maytanprine	Maytanbutine
83	<i>M. ovatus</i>	Kwahu Asakraka, GH	01/15	R	-	-	-
84				W	100	131	349
85	<i>M. ovatus</i>	Nigeria	06/16	Z	32	31	55
86				B	64	54	55
87	<i>M. ovalifolia</i>	Kwahu Asakraka, GH	01/15	R	-	-	-
88	<i>M. acuminata</i>	Kirstenbosch, ZA	04/15	R, Z, B	-	-	-
89	<i>M. oleoides</i>			R, Z, B	-	-	-
90	<i>M. bachmannii</i>	BG Kirstenbosch, ZA	04/15	W, R, B	-	-	-
91	<i>M. procumbens</i>			W, R, B	-	-	-
92	<i>M. canariensis</i>			Z, B	-	-	-
93	<i>M. boaria</i>			Z, B	-	-	-
94	<i>M. cymosa</i>	BG Bayreuth, DE	05/15	Z, B	-	-	-
95	<i>M. arbutifolius</i>			Z, B	-	-	-
96	<i>M. ilicifolia</i>			Z, B	-	-	-
97	<i>M. boaria</i>			W, Z, B	-	-	-
98	<i>M. emarginata</i>	BG Berlin, DE	07/15	W, Z, B	-	-	-
99	<i>M. riedeliana</i>			W, Z, B	-	-	-

Abkürzungen: BG = Botanischer Garten; BW = Botswana, CM = Kamerun, DE= Deutschland, GH = Ghana, ZA = Südafrika; R = Stammrinde, F = Frucht, B = Blatt, W = Wurzel, Z = Zweig, S = Samen, Bl = Blüte (Bestimmungsgrenze: 50 ng; Nachweisgrenze: 10 ng).

Für die verschiedenen Spezies kann grundsätzlich ein artspezifisches Maytansinoidprofil festgestellt werden wobei einzelne Pflanzenproben das Muster durchbrechen. Für *M. serrata* und *M. heterophylla* ist Maytansine die Hauptverbindung, während für *M. linearis*, *M. ovatus* und *M. senegalensis* Maytanbutine mit dem höchsten Gehalt gefunden wird. Jedoch konnte in einer *M. senegalensis* Wurzelprobe aus Botswana (Nr. 58) Maytanbutine nicht nachgewiesen werden. Außerdem zeigte die *M. serrata* Wurzel aus Ghana vom Juni 2015 (Nr. 8) nur eine geringe Menge an Maytansine und Maytanbutine als Hauptmetabolit. Darüber hinaus zeigte eine *M. ovatus* Pflanze aus Nigeria (Nr. 84-86) das Vorhandensein der drei Maytansinoide und eine Pflanze aus Ghana (Nr. 83) nicht. Die wiederholte Beprobung von *M. heterophylla* Pflanzen von unterschiedlichen Standorten in Südafrika zeigt, dass die Gehalte bzw. die Anwesenheit von Maytansinoiden innerhalb der gleichen Pflanzen variieren. So wurden im Februar 2017 in Pflanzen von Koogmanskloof keine Maytansinoide detektiert, jedoch im November (Nr. 29 bzw. Nr. 41-43). Dagegen zeigten Pflanzen im Februar von Seweweekspoort die Anwesenheit der Zielmoleküle und im November nicht (Nr. 34-36 bzw. Nr. 49). Diese Variation wird ebenfalls bei unterschiedlichen Probenahmezeitpunkten für *M. serrata* Pflanzen aus Ghana festgestellt (Nr. 7, 10-13). Gleiche Spezies beprobt von unterschiedlichen Standorten zur gleichen Zeit zeigten ebenfalls eine starke Variation in der Anwesenheit von Maytansinoiden (*M. serrata* Nr. 7-9; *M. senegalensis* Nr. 66-72; *M. heterophylla* Nr. 28-40 und 41-49).

Zusammenfassend deutet das Screening darauf hin, dass die Maytansinoid-Biosynthese für jede einzelne Pflanze, selbst in der gleichen Spezies, aufgrund unterschiedlicher Habitate und klimatischen Bedingungen mit Auswirkungen auf die Wirtspflanze und die endophytischen Gemeinschaften individuell sein kann. Inwieweit

saisonale (Trockenzeit/Regenzeit) und/ oder standortspezifische und damit abiotische klimatische Bedingungen Einfluss auf die Biosynthese haben, kann durch das Screening nicht abschließend geklärt werden. Die allgemeine Variabilität in der Anwesenheit von Maytansinoiden deutet darauf hin, dass nicht die Pflanze, sondern assoziierte Endophyten die Biosynthese durchführen oder dazu beitragen. Nur bei Anwesenheit der entsprechenden Endophyten kann die Synthese von Maytansinoiden stattfinden. Mit welchem Pflanzengewebe diese Endophyten assoziiert sind, könnte bei den Pflanzenspezies bzw. sogar innerhalb der gleichen Spezies variieren. Eine weitere Möglichkeit die in den folgenden Kapiteln (4.1.5 und 4.1.6) näher untersucht wird ist, dass die Biosynthese nur in gewissen Entwicklungsstadien bzw. Phasen im Lebenszyklus stattfindet und daher variiert.

Aus den verschiedenen Pflanzengeweben wurden die bakteriellen endophytischen Gemeinschaften isoliert und fermentiert. Jedoch konnten in den Extrakten der Fermentationen keine Maytansinoide gefunden werden. Auch ein anfänglich durchgeführtes Bioassay mit dem Maytansine-sensitiven Strang *Hamigera avellanea* (Hanka & Barnett 1974; Kusari *et al.*, 2014a) war nicht zielführend und korrelierte nicht mit den Ergebnissen des Pflanzenscreenings. Die im folgenden Kapitel ausführlich erklärte Untersuchung der Maytansine-Biosynthese in *M. serrata* zeigt, dass die endophytische Gemeinschaft dieser Pflanze nicht allein in der Lage ist Maytansine zu produzieren und liefert damit eine Erklärung der Ergebnisse der Fermentationen (keine Maytansinoid-Detektion).

Auffällig ist, dass Maytansinoide nur in Pflanzen aus der Natur detektiert wurden und nicht in den Proben aus botanischen Gärten. Dies korreliert mit früheren Studien der Gattung *Putterlickia*, bei denen in Gewächshauspflanzen ebenfalls keine Maytansinoide detektiert werden konnten (Pullen *et al.*, 2003). Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese der ökologischen Rolle von Maytansinoiden als chemische Abwehrstoffe zum Schutz der Wirtspflanzen. Ein äußerer biotischer Auslöser wie ein Angriff von Pflanzenpathogenen wie Bakterien, Pilze, Insekten und/oder Schädlinge bzw. Frassfeinde für die Maytansinoid-Produktion scheinen möglich. Da die Maytansinoid-Biosynthese in der Pflanze nur mit assoziierten Endophyten möglich ist (Kapitel 4.1.2), wäre eine andere Erklärung, dass sich ohne einen Selektionsdruck oder die Bedrohung durch Pflanzenpathogene und/oder Insekten unter kontrollierten sterilen Bedingungen die ursprünglichen endophytischen Gemeinschaften im Laufe der Zeit verändern oder vollständig verloren gegangen sein könnten durch die Schaffung neuer Generationen von Pflanzen durch Samen.

Die Proben mit den höchsten Gehalten an Maytansinoiden waren *M. heterophylla* (Nr. 22-24) und *M. serrata* Pflanzen (Nr. 1-3, 10). *M. serrata* (Nr. 1-3) wurde daher ausgewählt um die Biosynthese von Maytansine und eine mögliche Beteiligung der assoziierten endophytischen Gemeinschaft in dieser Pflanze zu untersuchen (Kapitel 4.1.2).

4.1.2 Untersuchung der Maytansine-Biosynthese in *Maytenus serrata*

Seit der Aufklärung des Biosyntheseweges von Ansamitocin P-3, produziert durch das Bakterium *A. pretiosum*, wurde für Maytansine aufgrund der Strukturähnlichkeit ein analoger Syntheseweg vermutet (Spiteller *et al.*, 2003; Cassady *et al.*, 2004), bisher jedoch nicht überprüft.

Aufgrund der hohen Gehalte an Maytansinoiden, wurde die *Maytenus serrata* Probe vom September 2014 aus Bafoussam, Kamerun, zur Untersuchung der Maytansine-Biosynthese verwendet. Zum Beginn der Studie wurde ein möglicher Biosyntheseweg für Maytansine postuliert, der mittels chemisch-analytischer und molekular-genetischer Methoden untersucht und überprüft wurde (Abb. 4.1.1). Dabei wurden sowohl die Pflanzenkompartimente als auch die endophytischen Gemeinschaften untersucht.

Der Fokus dieser Forschungsarbeit lag auf der massenspektrometrischen Untersuchung von Maytansine, weiteren Maytansinoiden und den postulierten Intermediaten (Metaboliten 1-6). Die Ergebnisse werden in den folgenden Kapiteln detailliert geschildert. Außerdem wurden genetische Untersuchungen der für die Biosynthese wichtigen Schritte, die Synthese der Starteinheit 3-Amino-5-Hydroxybenzoessäure (AHBA) durch AHBA Synthase-Gene (Floss 2006; Kang *et al.*, 2012) und die Inkorporation von Chlor durch die Halogenase Asm12 (Yu *et al.*, 2002; Spiteller *et al.*, 2003; Cassady *et al.*, 2004) durchgeführt.

Abschließend werden alle Ergebnisse der Untersuchung der Maytansine-Biosynthese im Kapitel 4.1.2.5 zusammengefasst.

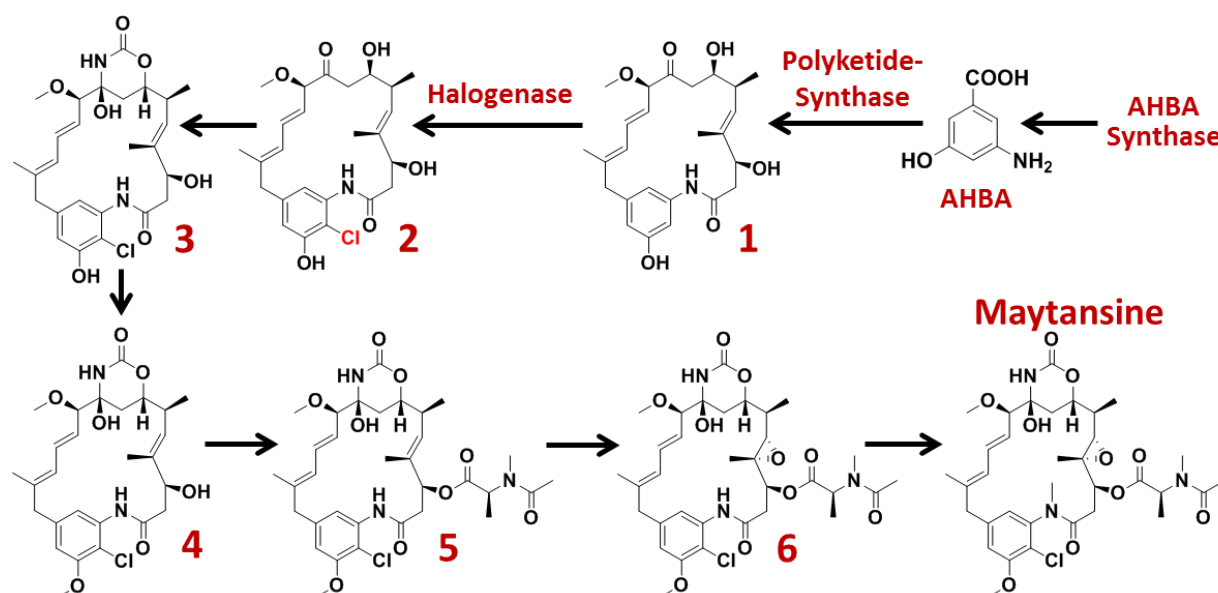


Abb. 4.1.1: Postulierter Biosyntheseweg von Maytansine.

4.1.2.1 MSⁿ Untersuchung von Maytansine

Seit der Entdeckung von Maytansine und anderen Maytansinoiden wurden häufig massenspektrometrische Methoden für die Bestimmung dieser Verbindungen eingesetzt, insbesondere aufgrund ihrer geringen Produktionsmengen *in planta* (Suwanborirux *et al.*, 1990; Izawa *et al.*, 1981; Suchocki *et al.*, 1987; Plattner *et al.*, 1986). Im Jahr 2005 liefert Liu *et al.* einen Vorschlag für den Fragmentierungsweg von Ansamitocin P-3 im positiven ESI (Elektrospray-Ionisation) Modus (Liu *et al.*, 2005). Intensive Massenspektrometrische Untersuchungen und Analysen der Fragmentierungswege die entscheidend zur Strukturaufklärung und Identifizierung sowie zur Unterscheidung der Maytansinoide beitragen fehlten.

Während der Untersuchung der Biosynthese von Maytansine in *M. serrata* wurden daher detaillierte HPLC-ESI-HRMSⁿ-Untersuchungen der drei detektierten Maytansinoide Maytansine, Maytanprine und Maytanbutine durchgeführt, welche zu einem klaren Verständnis für die Unterscheidung dieser Derivate durch die charakteristischen Fragmentierungsmuster führten.

Aufgrund der Tatsache, dass keine authentischen Standards zur Verfügung standen, wurden die Maytansinoide mittels exakter monoisotopischer Massen in Fullscans identifiziert und die Strukturen mit MSⁿ-Messungen bestätigt. In den verschiedenen Pflanzenarten und Beprobungszeiten wurden vor allem die Maytansinoide Maytansine, Maytanprine und Maytanbutine gefunden (Tab. 6 zeigt die Übersicht mit quantifizierten Werten). Im Folgenden wird exemplarisch intensiv auf die Proben von *M. serrata* vom September 2014 aus Bafoussam, Kamerun und deren massenspektrometrische Analyse eingegangen.

Im Fullscan konnte zunächst im Pflanzenextrakt von Rinde und Wurzel Maytansine ($[M+H]^+$ m/z 692.2944; $[M+Na]^+$ m/z 714.2763), Maytanprine ($[M+H]^+$ m/z 706.3101; $[M+Na]^+$ m/z 728.2920) und Maytanbutine ($[M+H]^+$ m/z 720.3257; $[M+Na]^+$ m/z 742.3077) mit einer geringen Massenabweichung und den charakteristischen Isotopenmustern chlorierter Moleküle gefunden werden (Spektren im Anhang, Abb. M1-M3). Abb. 4.1.2 zeigt beispielhaft die chromatographisch getrennten Maytansinoide im Pflanzenrohextrakt. Mittels Massenfilter (± 2 ppm) werden die drei Zielmoleküle als extrahierte Ionenchromatogramme aus dem Fullscan dargestellt. Hierbei korrelieren die Retentionszeiten mit den Polaritäten der Maytansinoiden und der Seitenkettelänge (Polarität: Maytansine > Maytanprine > Maytanbutine).

Die höchsten Intensitäten wurden für Maytansine gefolgt von Maytanprine und schließlich Maytanbutine gefunden. Für das Blatt konnte nur Maytansine und Maytanprine als $[M+H]^+$ und $[M+Na]^+$ nachgewiesen werden, wohingegen Maytanbutine nicht gefunden wurde (<LOD). Die Wurzel-Probe wurde für die tiefergehende MSⁿ-Untersuchung der Maytansinoide ausgewählt und im Folgenden erläutert.

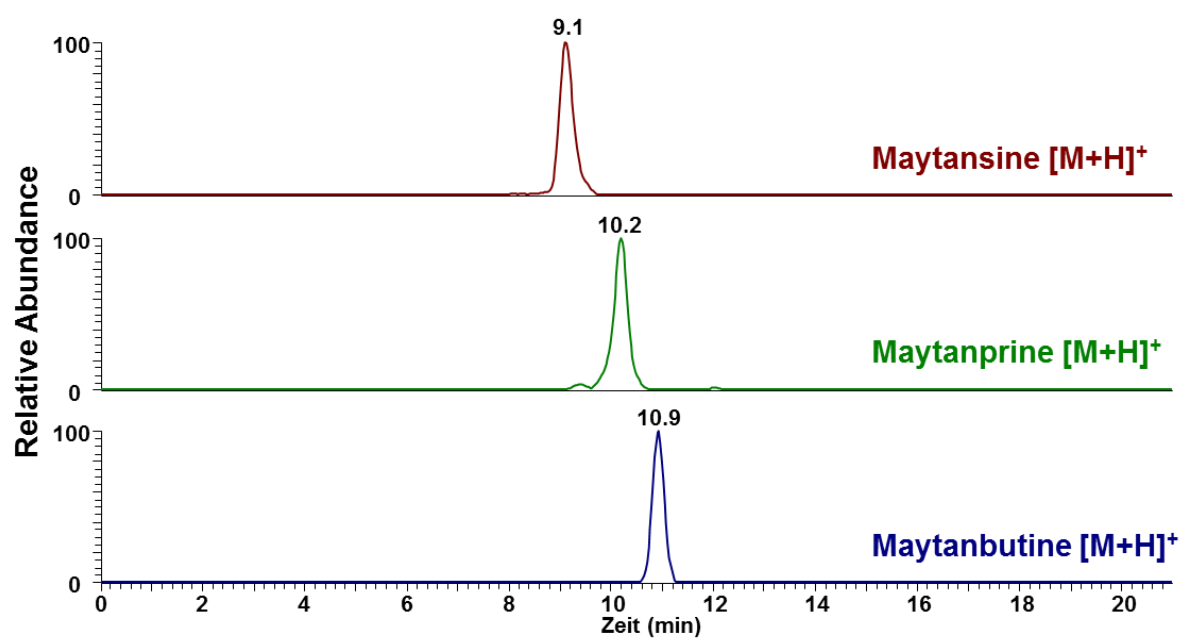


Abb. 4.1.2: Extrahierte Ionenchromatogramme (± 2 ppm) der detektierten Maytansinoide aus dem Fullscan des Pflanzenextraktes.

Abb. 4.1.3 zeigt das MS²-Spektrum von Maytansine (m/z 692, (A)) und das MS³-Spektrum des intensivsten Fragmentes (m/z 692→547, (B)). Weitere MS³-Spektren sind im Anhang hinterlegt (Abb. M4-M5; m/z 692→485; m/z 692→453). Den Basispeak m/z 547 bei der Fragmentierung des Muttermoleküls Maytansine (m/z 692, $[M+H]^+$) bildet die Abspaltung der Esterseitenkette $-C_6H_{11}O_3N$. Zurück bleibt die Makrolid-Kernstruktur. Ein weiteres Fragment (m/z 565) wird ebenfalls durch den Verlust der Seitenkette generiert, jedoch verbleibt eine Hydroxyl-Gruppe am Makrolactam-Ring.

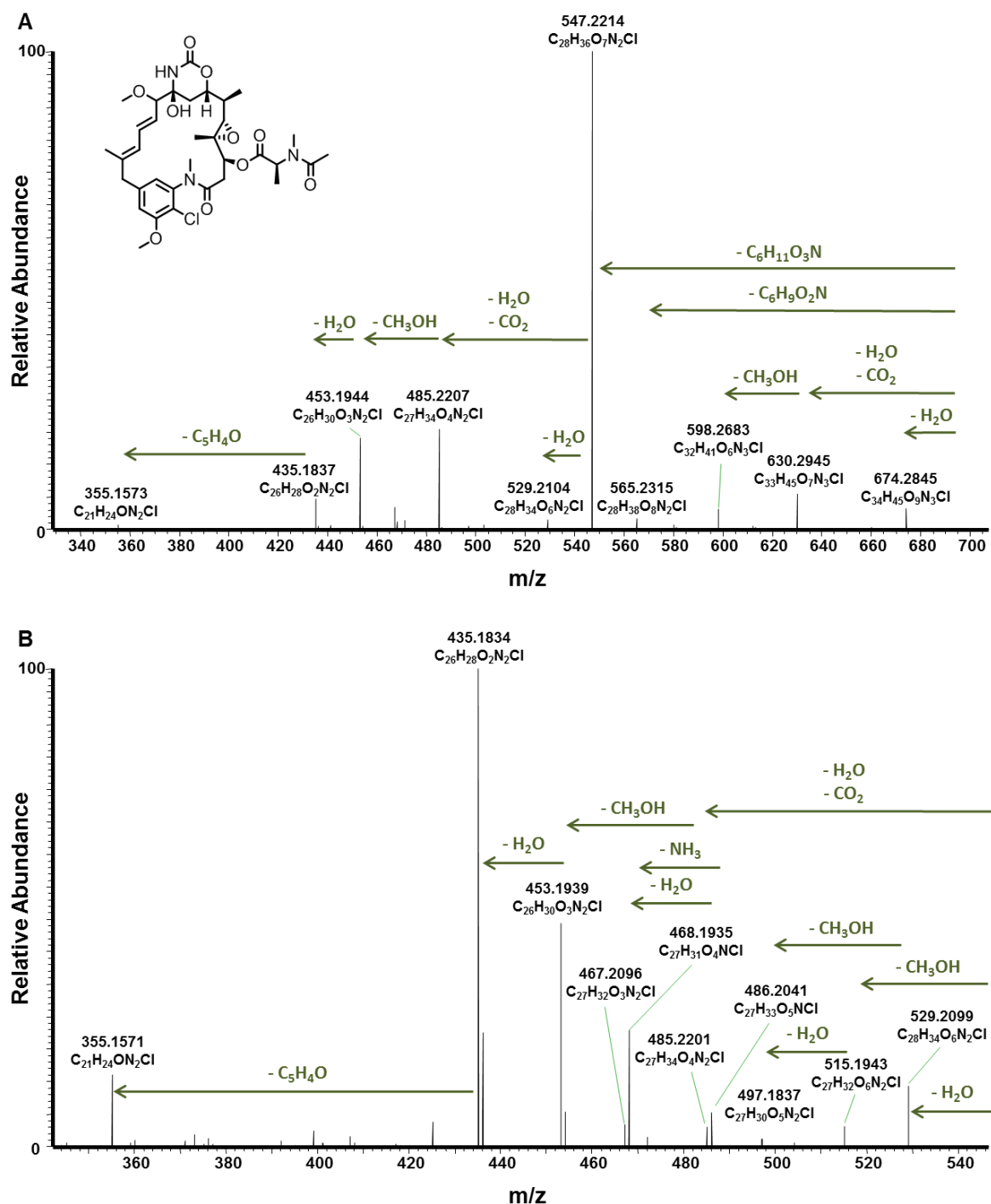


Abb. 4.1.3: MS²-Spektrum (m/z 692; (A)) und MS³-Spektrum (m/z 692→547; (B)) von Maytansine.

Die Fragmentionen m/z 674, 630 und 598 sind ebenfalls vom Mutterion und werden durch die Abspaltung von Wasser, Kohlenstoffdioxid und Methanol gebildet. Zudem sind die meisten Ionen der weiteren Fragmentierung des Ions m/z 547 bereits vorhanden. MS³ dieses Ions (m/z 692→547) bestätigt den allgemeinen Fragmentierungsweg und bildet als Hauption m/z 435 und weitere Ionen mit geringerer Intensität bei m/z 529, 515, 497, 486, 485, 468, 467, 453, 435, 355.

Die meisten dieser Ionen werden durch Abspaltung aus Methanol, Wasser, Kohlenstoffdioxid, Ammoniak und der Carbamatgruppe gebildet. Das Ion m/z 453 wird wahrscheinlich durch eine Umlagerung gebildet, die auch in anderen Untersuchungen von Ansamitocin P-3 postuliert wurde (Cassady *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2005). Allgemein werden einige gleiche Ionen und Fragmentstrukturen wie von Ansamitocin P-3 auch bei Maytansine gefunden. Dies ist damit zu erklären, dass sich die beiden Maytansinoide nur aufgrund der Esterkette unterscheiden. Ein weiterer Verlust an $-C_5H_4O$ resultiert im Fragment m/z 355 bei dem der Makrolid-Ring aufgebrochen ist. Abb. 4.1.4 zeigt den vorgeschlagenen Fragmentierungsweg für Maytansine. Die durchgezogenen Pfeile zeigen Fragmentierungswege die direkt über MS/MS-Versuche zugeordnet werden können. Die gestrichelten Pfeile zeigen weitere mögliche Fragmentierungen der detektierten Ionen. Der Hauptfragmentierungsweg geht über den Verlust der Esterseitenkette (m/z 547) mit anschließendem Verlust von Neutralteilchen wie Wasser, Kohlenstoffdioxid und Methanol (m/z 485 und 453).

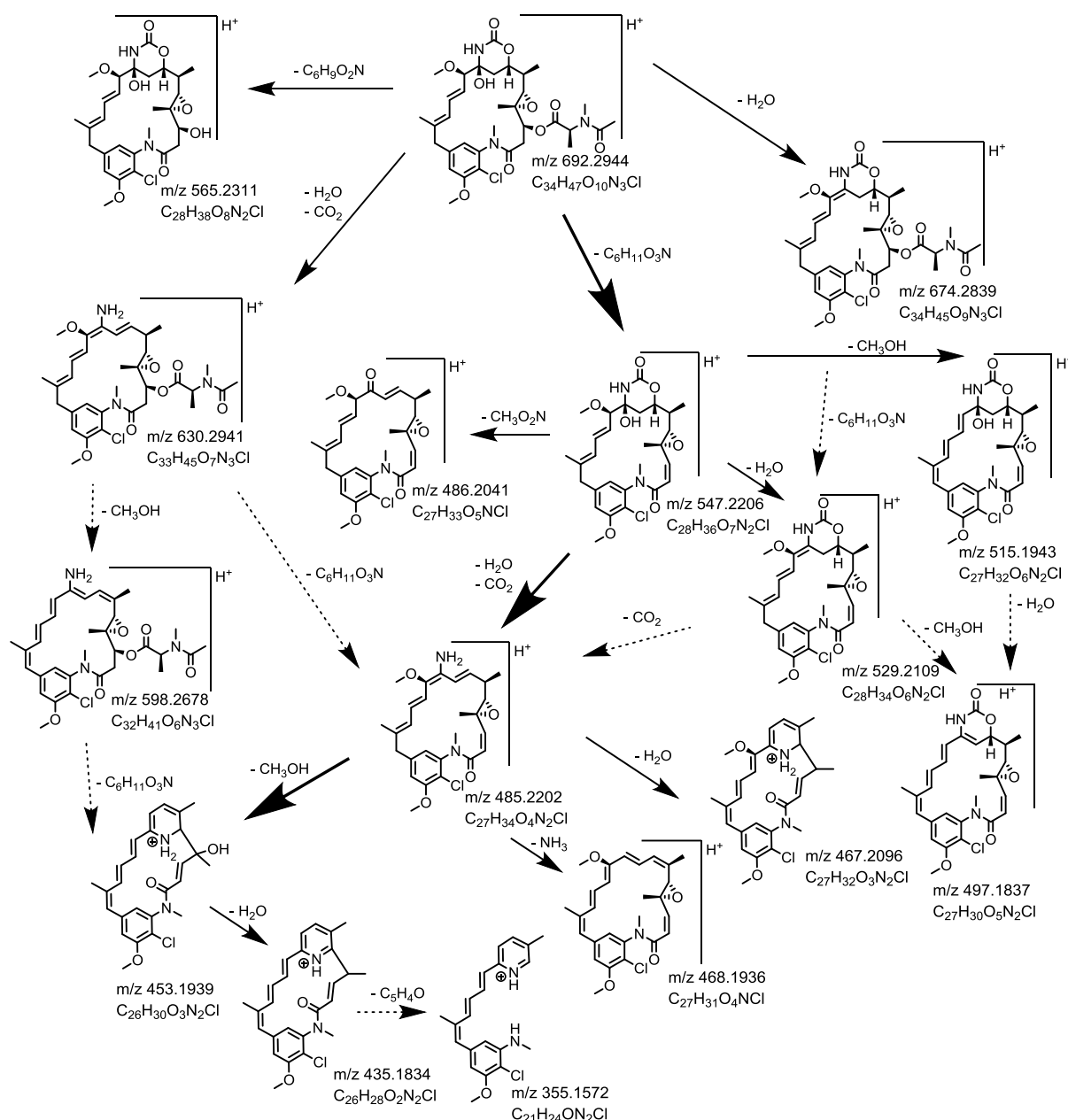


Abb. 4.1.4: Fragmentierungsweg von Maytansine.

4.1.2.2 MSⁿ Untersuchung von Maytanprine und Maytanbutine

Zunächst wurden die beiden Maytansinoide Maytanprine und Maytanbutine in Fullscan-Messungen über ihre exakte Masse und das Isotopenmuster eines chlorierten Moleküls (M zu M+2-Verhältnis ca. 3:1) identifiziert. Abb. 4.1.5 zeigt die MS²-Spektren von Maytanprine (A) und Maytanbutine (B). Die MS³-Spektren und die Fragmentierungswege sind im Anhang hinterlegt (Abb. M6-M9: *m/z* 706→547, 720→547). Der Hauptweg der Fragmentierung ist analog zu Maytansine mit dem Verlust der Esterseitenkette und weiteren Abspaltungen von Wasser, Kohlenstoffdioxid und Methanol (*m/z* 547→485→453→435). Zwölf der fünfzehn gezeigten Fragmente sind aufgrund der einheitlichen Makrolactam-Kernstruktur für alle drei Maytansinoide identisch. Die Identifizierung und der strukturelle Unterschied zwischen diesen Verbindungen erfolgen auf der Grundlage der drei verbleibenden

4. Ergebnisse und Diskussion

Fragmente. Die drei Fragmente mit intakter Esterseitenkette zeigen eine Verschiebung für Maytanprine (m/z 688, 644, 612) um 14 Da und für Maytanbutine (m/z 702, 658, 626) um 28 Da im Vergleich mit Maytansine (m/z 674, 630, 598).

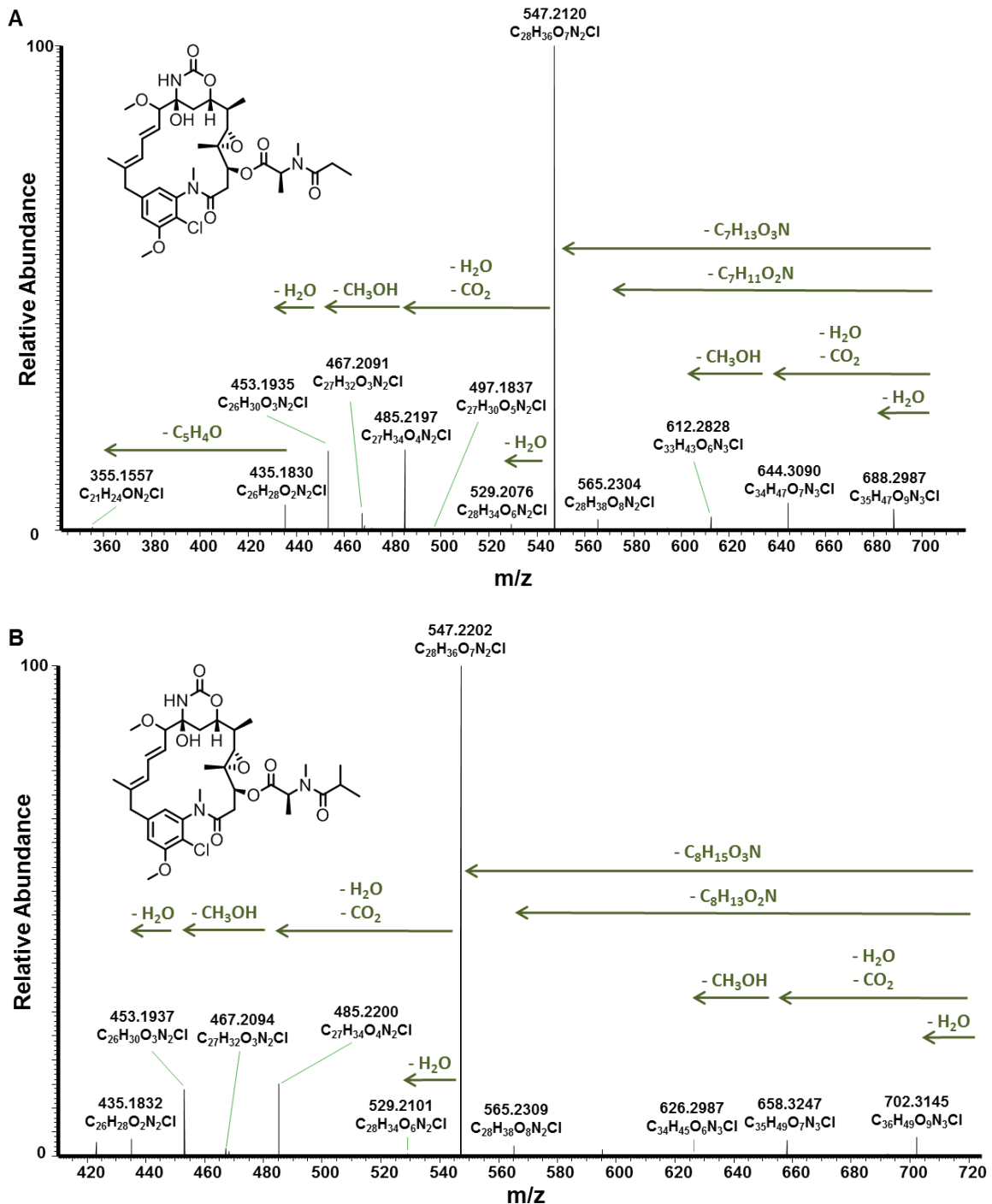


Abb. 4.1.5: MS²-Spektrum von Maytanprine (m/z 706; (A)) und Maytanbutine (m/z 720; (B)).

4.1.2.3 Identifizierung von Maytansine-Vorstufen in *M. serrata*

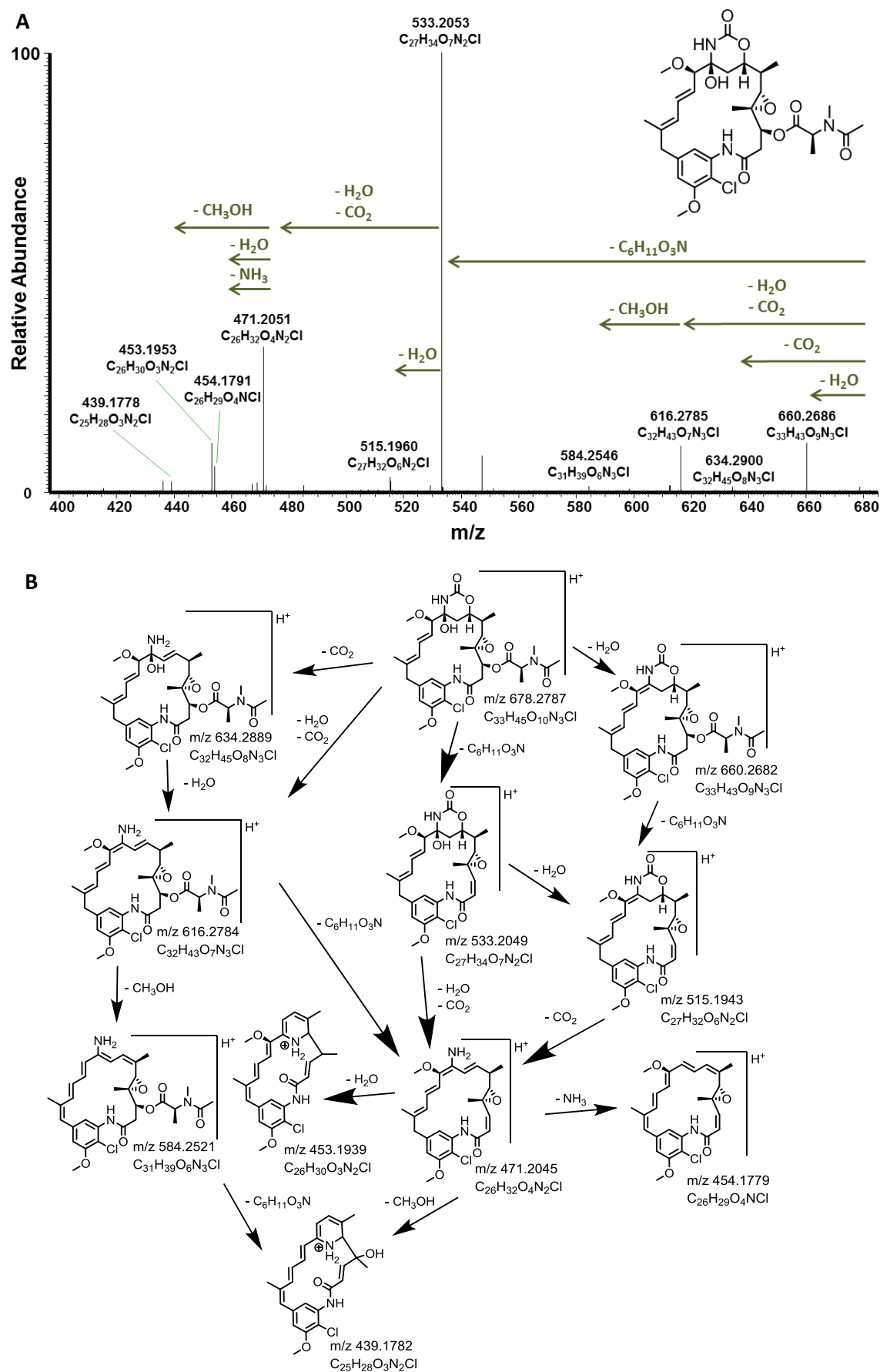
Im Pflanzenrohextrakt konnten die postulierten Maytansine-Vorstufen (Abb. 4.1.1, Metabolit 1-6) bei *M. serrata* (Bafoussam, September 2014) über HRMS-Spektren ihrer monoisotopischen Massen identifiziert werden. Tab. 7 zeigt die gefundenen Vorstufen in den unterschiedlichen Kompartimenten der Pflanze. Die Spektren sind im Anhang hinterlegt (Abb. M10-M18). Im Extrakt der Rinde werden die höchsten Intensitäten und die meisten Vorstufen gefunden. Dies steht im Einklang mit der These, dass die endophytische Gemeinschaft der Rinde gemeinsam mit der Pflanze für die Maytansine-Produktion verantwortlich ist. Nur in den Endophyten der Rinde werden die Gene der zur Substitution von Wasserstoff durch Chlor notwendigen Halogenase gefunden. Sowohl Maytansine als auch die Vorläufer-Moleküle werden in mehreren Geweben der Pflanze gefunden, was eine starke Verteilung und einen möglichen Transport der Stoffe zeigt. Dies lässt die Vermutung zu, dass die Pflanze Maytansinoide zur Abwehr von pathogenen Mikroorganismen oder Insekten einsetzt.

Tab. 7: Detektierte Maytansine-Vorstufen bei *M. serrata* (Bafoussam, September 2014).

Metabolit	Rinde	Wurzel	Blatt
Vorstufe 1	✓	✗	✗
Vorstufe 2	✗	✗	✗
Vorstufe 3	✓	✗	✗
Vorstufe 4	✓	✓	✓
Vorstufe 5	✓	✓	✗
Vorstufe 6	✓	✓	✗
Maytansine	✓	✓	✓

Durch Fraktionierung und Aufreinigung mittels präparativer HPLC konnten die Vorstufen 4, 5 und 6 aufkonzentriert werden, sodass MS²-Spektren ausreichender Intensität generiert und die Strukturen bestätigt werden konnten.

Abb. 4.1.6 zeigt das MS²-Spektrum (A) und das Fragmentierungsschema (B) der Maytansine-Vorstufe 6. Neben Abspaltungen wie Methanol, Wasser und Kohlenstoffdioxid, ist vor allem das Hauptfragment (m/z 533) charakteristisch. Die Abspaltung der Ester-Seitenkette führt nicht wie bei Maytansine zum Fragment m/z 547, sondern zu dem um die Massendifferenz der Methylgruppe von 15 Da verschobenen Fragment m/z 533. Allgemein sind die gefundenen Fragmente um 15 Da im Vergleich zu Maytansine durch den demethylierten Stickstoff verschoben und bestätigen dadurch die Struktur der Vorstufe. Vom Hauptfragment wiederum spalten sich ebenfalls Neutralteilchen wie Wasser, Methanol und Kohlenstoffdioxid ab. Bei der in dieser Arbeit vorgeschlagenen Biosynthese von Maytansine ist die Maytansine-Vorstufe 6 die letzte Vorstufe, welche am Stickstoff methyliert wird, vor dem finalen Produkt Maytansine. Diese Vorstufe wurde bereits als das Maytansinoid Normaytansine identifiziert (Snedden *et al.*, 1980), konnte jedoch bisher nicht als Vorläufer-Molekül eingeordnet werden.



Die Maytansine-Vorstufe 5 weist einen demethylierten Stickstoff und statt der Epoxid-Gruppe eine Doppelbindung auf. Abb. 4.1.7 zeigt das MS²-Spektrum (A) und das Fragmentierungsschema (B) der Maytansine-Vorstufe 5. Der Basispeak wird durch Abspaltung der Esterseitenkette, Wasser und Kohlenstoffdioxid gebildet. Eine weitere Abspaltung von Methanol führt zum Ion m/z 423. Der Basispeak m/z 455 und das Ion m/z 423 sind aufgrund der Abwesenheit der Epoxid-Gruppe im Vergleich zur Vorstufe 6 mit den Ionen m/z 471 und 439 um 16 Da (Sauerstoff) verschoben und bestätigen die Struktur der Vorstufe 5. Wegen geringer Ausgangsintensität des Mutterions konnten im MS²-Experiment keine weiteren Massen detektiert werden.

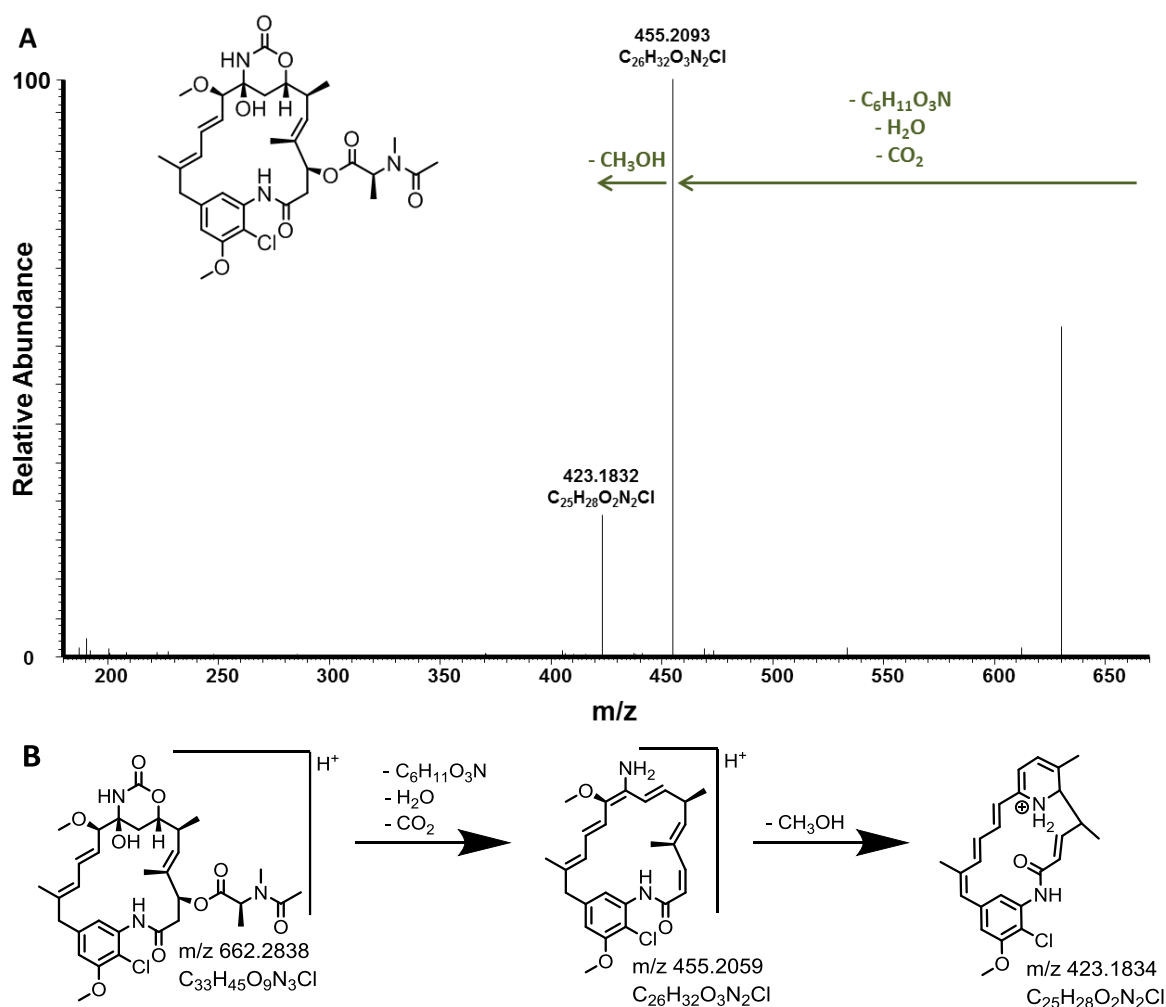


Abb. 4.1.7: MS²-Spektrum (A) und Fragmentierungsweg (B) der Maytansine-Vorstufe 5 (m/z 662).

Der Vorstufe 4 fehlen im Vergleich zu Maytansine die Esterseitenkette, der methylierte Stickstoff und die Epoxidgruppe. Abb. 4.1.8 zeigt das MS²-Spektrum (A) und das Fragmentierungsschema (B) der Vorstufe 4. Die gebildeten Fragmente sind Neutralteilchen-Verluste von Wasser, Methanol und Kohlenstoffdioxid und deren Kombination durch mehrfache Abspaltungen. Für das Basision m/z 473 sind zwei Struktur-Varianten der Wasserabspaltung gezeigt. Grundsätzlich ist die Wasser-Abspaltung ebenso bei den anderen Fragmenten stets an beiden Hydroxyl-Gruppen vorstellbar. Aus Gründen der Anschaulichkeit wird jedoch auf die doppelte Darstellung

verzichtet. Die charakteristischen Fragmentierungen bestätigen die Struktur der Verbindung.

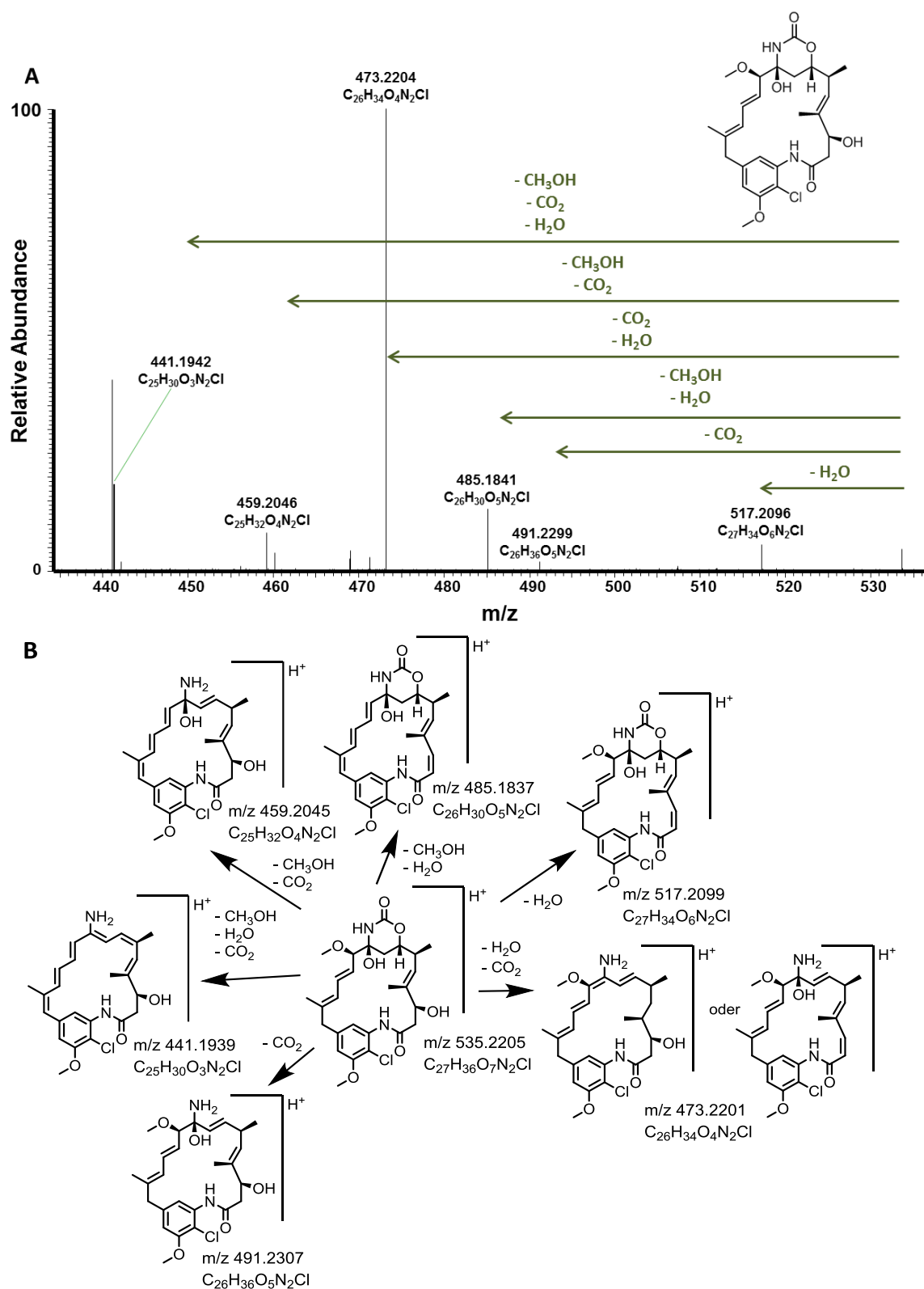


Abb. 4.1.8: MS²-Spektrum (A) und Fragmentierungsweg (B) der Maytansine-Vorstufe 4 (m/z 535).

Neben der Hauptbiosynthese-Route von Maytansine wurden die Extrakte auf alternative Maytansine-Vorläufer mit unterschiedlichen Anordnungen der Post-PKS-Modifikationen mittels Ionenfiltern der monoisotopischen Massen hin untersucht.

Im *M. serrata* Rindenextrakt (Rinde = Ort der Biosynthese) konnten drei weitere Maytansine-Vorstufen mittels MS²-Experimenten identifiziert werden (Abb. 4.1.9, Fragmentierungswege im Anhang, Abb. M19-M21). Vorstufe A besitzt bereits die Esterseitenkette, jedoch fehlen sowohl die Epoxid- als auch die Carbamatgruppe. Bei Vorstufe B ist die Epoxidgruppe ausgebildet jedoch fehlen die Seitenkette sowie die N-Methylierung und Vorstufe C ist Maytansine ohne Chlor (19-Deschlor-Maytansine).

Erneut wurden bei den Vorläufer-Molekülen Neutralteilchen-Verluste von Wasser, Methanol und Kohlenstoffdioxid sowie deren Kombination analog zu den vorherigen MS²-Experimenten der anderen Maytansinoiden bzw. Vorstufen registriert. Zusätzlich wurden die charakteristischen Massendifferenzen durch den Verlust der Esterseitenkette (-C₆H₁₁O₃N) detektiert. Dies verifiziert die detektierten Stoffe als Vorläufer-Moleküle von Maytansine.

Diese Varianten zeigen, dass obwohl es in der Biosynthese von Maytansine eine Hauptroute gibt, grundsätzlich keine strikten Synthese-Reihenfolgen eingehalten werden müssen und die beteiligte Enzyme daher eine geringe Substratspezifität besitzen. Grundsätzlich sind weitere Vorstufen-Varianten denkbar, jedoch in nicht nachweisbaren Konzentrationen vorhanden.

Diese Ergebnisse stimmen mit früheren Untersuchungen zur Biosynthese von Ansamitocin P-3 mit Mutanten von *A. pretiosum* überein (Spiteller *et al.*, 2003), bei denen nicht ein einziger, sondern „multiple parallel pathways“ und eine „relaxed substrate specificity“ für die Post-PKS-Enzyme gezeigt werden konnte. Zusätzlich wurde der Einbau von Chlor als möglicher letzter Schritt der Biosynthese gezeigt (Spiteller *et al.*, 2003), wie es für den nachgewiesenen Vorläufer 19-Deschlor-Maytansine der Fall ist (Abb. 4.1.9C).

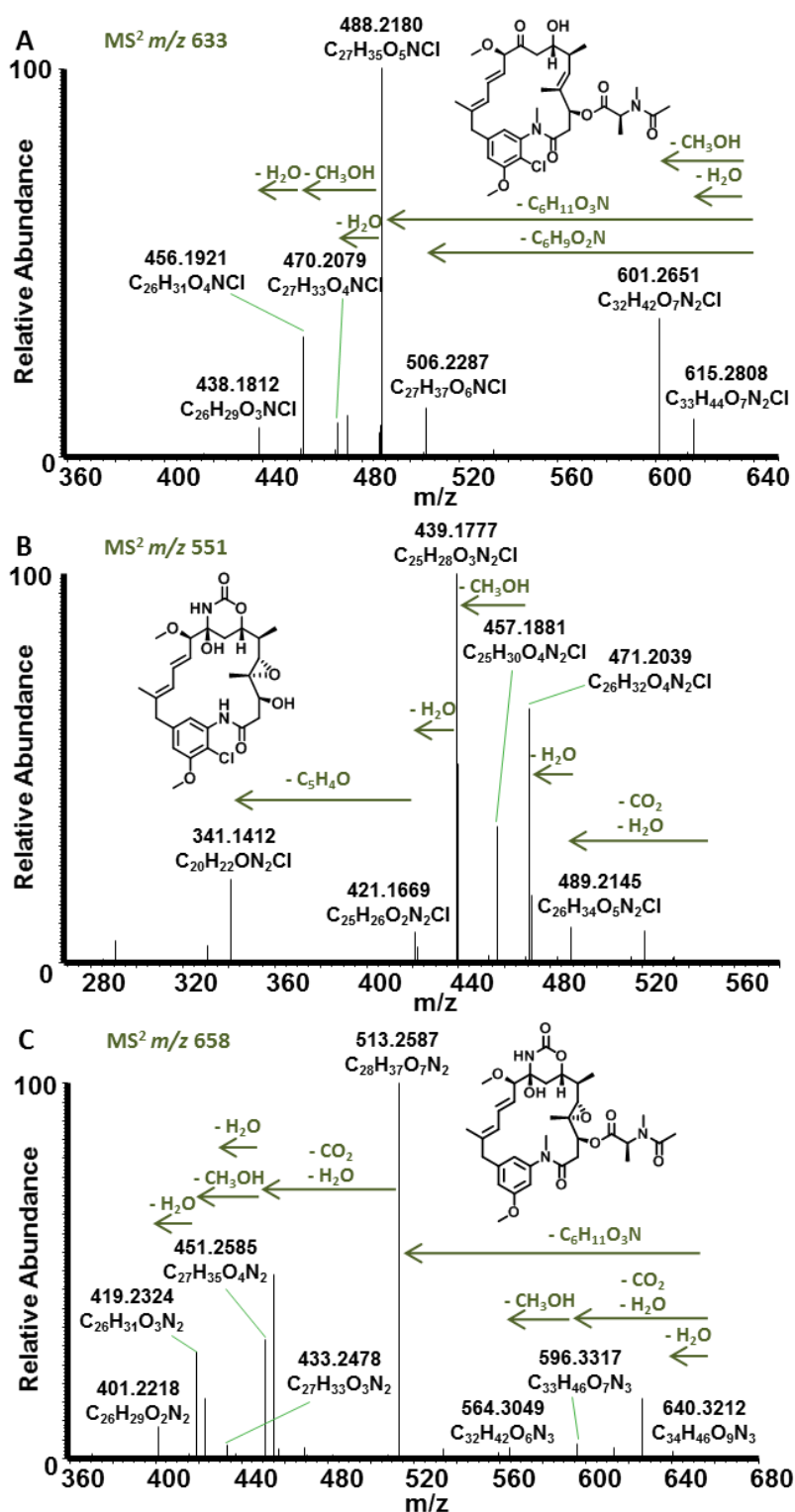


Abb. 4.1.9: Identifizierung weiterer Maytansine-Vorstufen mittels HRMS² aus *M. serrata* Rindenextrakt (Kamerun, Bafoussam September 2014). A: Maytansine ohne Carbamat- und Epoxidgruppe; B: Maytansine ohne N-Methylierung und Esterseitenkette; C: Maytansine ohne Chlor (19-Deschlor-Maytansine).

4.1.2.4 Identifizierung von Maytanprine- und Maytanbutine-Vorläufer-Molekülen in *M. serrata*

Während der phytochemischen Untersuchung verschiedener *Maytenus* Pflanzen wurde neben alternativen Maytansine-Vorstufen nach analogen Vorläufern anderer Maytansinoide gesucht. Die Methylierung des Makrolactamring-Stickstoffs war der letzte postulierte Biosyntheseschritt der zu Maytansine führt. Im Pflanzenextrakt der *M. serrata* Stammrinde (Ghana, April 2016) konnte der Maytansine-Vorläufer 6 sowie analoge Vorläufer für Maytanprine und Maytanbutine mittels HPLC-HRMS² identifiziert werden. Hierbei ist darauf hinzuweisen, dass aufgrund identischer Summenformeln der Maytanprine- ($C_{34}H_{46}O_{10}N_3Cl$) und Maytanbutine-Vorstufe ($C_{35}H_{48}O_{10}N_3Cl$) mit den Maytansinoiden Maytansine ($C_{34}H_{46}O_{10}N_3Cl$) und Maytanprine ($C_{35}H_{48}O_{10}N_3Cl$), die Detektion der monoisotopischen Massen allein nicht zur Identifizierung und Unterscheidung ausreichen. Nur aufgrund unterschiedlicher MS²-Spektren können die Verbindungen voneinander unterschieden werden, was die Bedeutung von MSⁿ-Experimenten sowie die intensive Auswertung der charakteristischen Fragmentierungen zur Strukturaufklärung veranschaulicht.

Abb. 4.1.10 zeigt die kollisionsinduzierten (CID; 35 eV) MS²-Spektren der Vorstufen von Maytansine (A), Maytanprine (B) und Maytanbutine (C) (Fragmentierungswege im Anhang, Abb. M22, M23). Alle drei Verbindungen zeigen Abspaltungen von Wasser, Methanol und Kohlenstoffdioxid. Der Verlust der verschiedenen Esterseitenketten führt zur Makrolactam-Kernstruktur. Dieses Hauptfragment m/z 533 zeigt im Vergleich zum entsprechenden finalen Maytansinoid (Maytansine, Maytanprine und Maytanbutine) deutlich die fehlende Methylgruppe am Stickstoff im Makrolactamring (um 14 Da von m/z 547 verschoben). Zusätzlich kann durch dieses Fragmentierungsschema ausgeschlossen werden, dass es sich bei Maytanbutine-Vorläufer m/z 706 um Maytanprine bzw. 2'-N-Demethylmaytanbutine handelt (Larson *et al.*, 1999). Diese Maytansinoide sollten nach Abspaltung der Esterseitenkette als Hauptfragment m/z 547 (+14 Da) liefern. Weitere Fragmentierungen sind Neutralteilchen-Verluste von Wasser, Kohlenstoffdioxid und Ammoniak und sind für diese drei Vorläufer aufgrund der gleichen Kernstruktur identisch. Die Anwesenheit dieser analogen demethylierten Vorläufer zeigt eine gemeinsame und parallele Biosynthese von Maytansinoiden durch Veresterung verschiedener Seitenketten an Position C-3 während der post-PKS-Modifikationen.

Interessanterweise zeigten Untersuchungen der Acyltransferase, welche für die Veresterung der Seitenketten verantwortlich ist, eine geringe Substratspezifität und die Fähigkeit, verschiedene Substrate wie Acetyl-CoA, Propionyl-CoA, Isobutyryl-CoA, N-Butyryl-CoA und Isovaleryl-CoA zu verwenden und die entsprechenden Ansamitocine zu bilden (Hatano *et al.*, 1984; Gokhale *et al.*, 1999). Es kann angenommen werden, dass die geringe Substratspezifität der Acyltransferase der Grund für die Diversität von Maytansinoiden mit verschiedenen Seitenketten wie z.B. Maytanprine, Maytanbutine oder Maytanvaline ist.

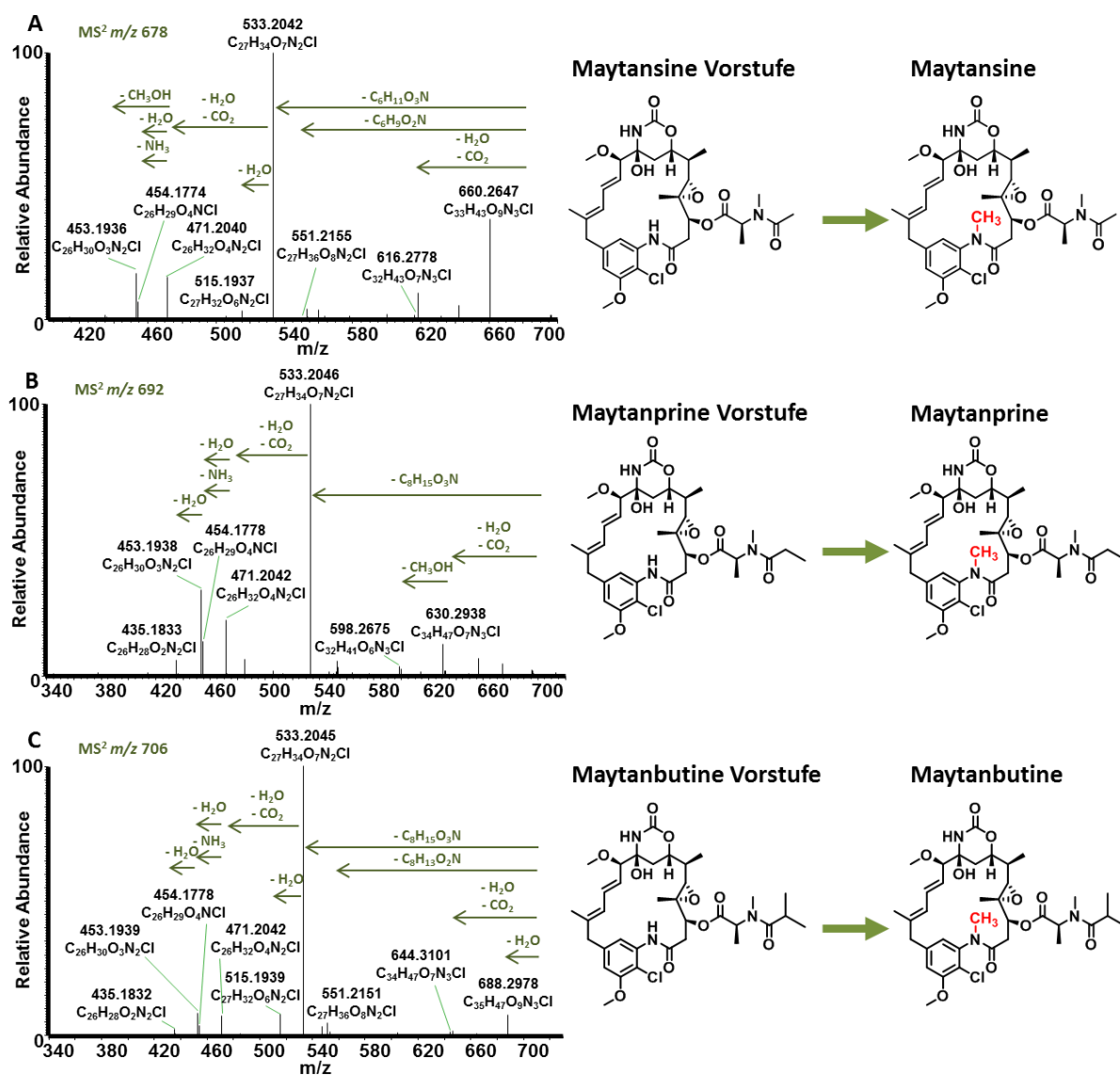


Abb. 4.1.10: Identifizierung von Maytansine- (m/z 678 (A)), Maytanprine- (m/z 692 (B)) und Maytanbutine- (m/z 706 (C)) Vorstufen (6) mittels HRMS² aus *M. serrata* Stammextrakt (Ghana, Kwahu Asakraka, April 2016).

4.1.2.5 Zusammenfassung der Untersuchung der Maytansine-Biosynthese in *M. serrata*

Die Untersuchung der Biosynthese von Maytansine in *M. serrata* war eine Kombination aus chemisch-analytischen und molekular-genetischen Methoden. Der Fokus dieser Forschungsarbeit lag auf den zuvor geschilderten analytischen Untersuchungen. Die genetischen Versuche wurden in Zusammenarbeit mit Parijat Kusari unter der Betreuung von Prof. Dr. Oliver Kayser (Fakultät Bio- und Chemieingenieurwesen, Technische Biochemie, TU Dortmund, Emil-Figge-Str. 66, 44227 Dortmund) durchgeführt. Im Folgenden werden die gewonnen analytischen und molekular-genetischen Ergebnisse, die zur Aufklärung der Biosynthese beigetragen haben, zusammenfassend geschildert.

Sowohl die unterschiedlichen Kompartimente der Pflanzen als auch die isolierten endophytischen Gemeinschaften von Wurzel, Rinde und Blatt wurden unabhängig voneinander auf die Anwesenheit der AHBA-Synthase Gene und der Halogenase Gene hin untersucht. Die besondere Vorstufe AHBA (3-Amino-5-hydroxbenzoesäure; auch mC₇N-Einheit genannt) ist der Ausgangsstoff für unterschiedliche Ansamycine (Kang *et al.*, 2012). Dazu wurden degenerierte Primer zur Amplifizierung mittels PCR (polymerase chain reaction) der konservierten Aminosäure-Regionen fünf verschiedener Gene (asnF, asm24, mitA, napF und rifK) des Genclusters des Starterenzym angefertigt. Als Positiv-Kontrolle wurde die DNS von *Actinosynnema pretiosum* subsp. *auranticum* (DSM 44131) verwendet und lieferte ein Fragment mit einer Länge von 755 Basenpaaren (bp). Dieses Bakterium produziert Ansamitochin P-3, das strukturell eng verwandt mit den Maytansinoiden ist und ebenfalls AHBA als Vorläufer-Molekül benötigt. Die Biosynthese dieses Stoffes wurde intensiv untersucht und aufgeklärt und diente als Basis zur Untersuchung der Maytansine-Biosynthese (Spiteller *et al.*, 2003).

In allen drei Pflanzengeweben konnte durch die Amplifizierung mittels optimierter PCR die AHBA-Synthase Gene gefunden werden (Abb. 4.1.11A; Wurzel 765 bp; Rinde 731 bp; Blatt 770 bp). Im Gegensatz dazu konnten keine entsprechenden Fragmente für die endophytischen Gemeinschaften von Wurzel, Rinde und Blatt amplifiziert werden. Die Basenpaar-Sequenzen wurden mit dem Programm Basic Local Alignment Search Tool (BLASTn) der öffentlichen Nukleotid-Datenbank des US National Centre for Biotechnology Information (NCBI) abgeglichen und identifiziert. Die Ähnlichkeiten der Sequenzen wurden auf Gen-Ebene mittels EMBL-European Nucleotide Archive (ENA) und auf Aminosäure-Ebene mittels UniProt Knowledgebase (UniProtKB) ermittelt. Um auf Protein-Ebene Vergleiche anstellen zu können, wurden die Sequenzen zuvor mittels BLASTx aus der Gensequenz übersetzt. Tab. 8 zeigt die Ergebnisse für den Abgleich der Pflanzen-Proben. Die höchste Homologie der Sequenz unter den Pflanzenproben zeigt das Blatt mit je 99% für beide Ebenen gefolgt von Wurzel und Rinde. Damit wurde gezeigt, dass die Pflanze, zusammen mit unkultivierbaren kryptischen Endophyten, die Genausstattung zur Synthese der Starteinheit AHBA für die Maytansine-Biosynthese besitzen.

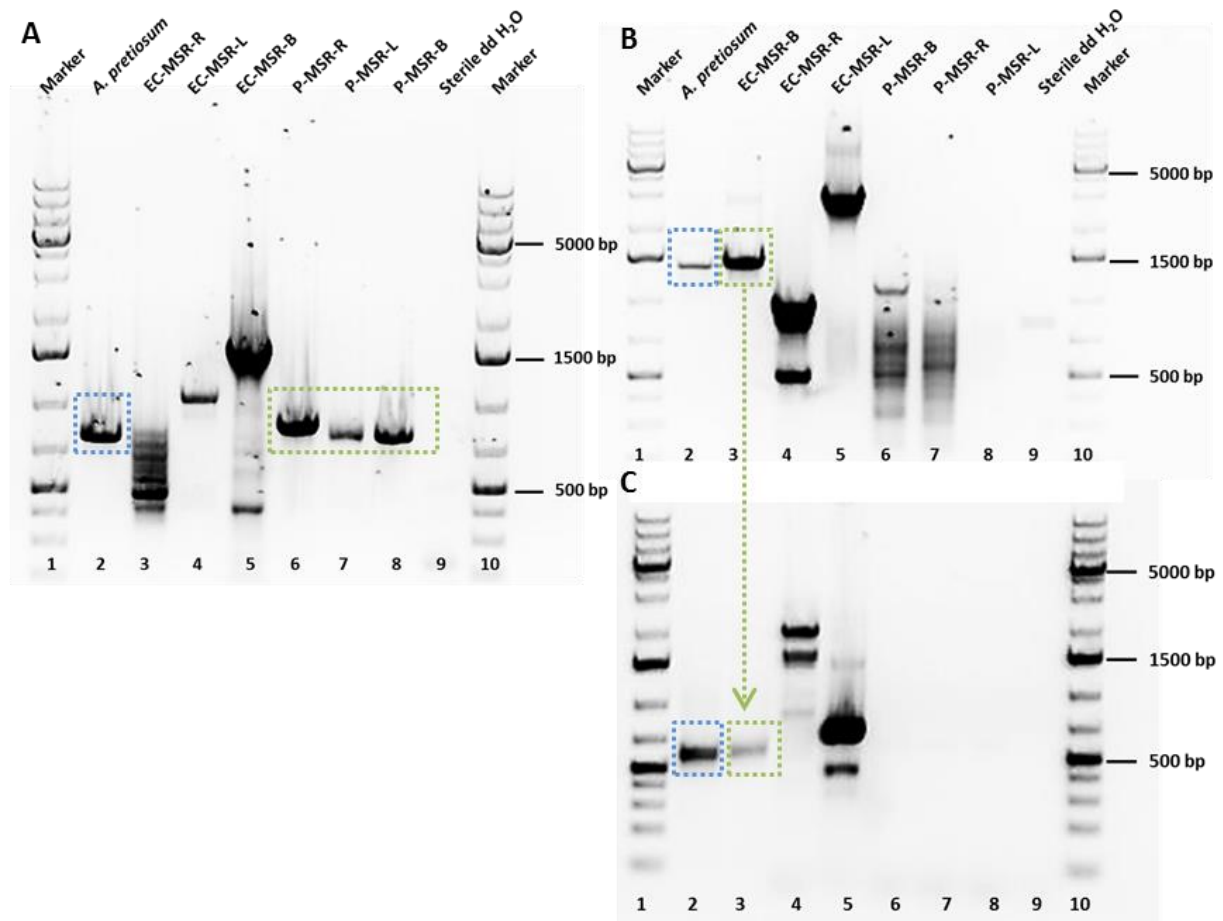


Abb. 4.1.11: Angefärbte Agarosegele aufgereinigter PCR-amplifizierter Gene. (A) AHBA-Synthase-Gene nur in Wurzel-, Blatt- und Rindengewebe von *M. serrata* (grüner Kasten). (B) Halogenase-Gen (*asm12*) nur in bakterieller endophytischer Gemeinschaft des Rindengewebes von *M. serrata* (Grüner Kasten). (C) Erneute PCR der Halogenase-Gene der bakteriellen endophytischen Gemeinschaft des Rindengewebes mit 1300 bp Fragment als verwendete Matriz (Grüner Kasten). *A. pretiosum* diente als Positivkontrolle (blaue Kästen) und steriles doppelt destilliertes Wasser als Negativkontrolle (Kusari *et al.*, 2016).

Tab. 8: Basenpaar-Länge der Fragmente und Homologie der Sequenzen der PCR der AHBA-Synthase Gene (Kusari *et al.*, 2016).

<i>M. serrata</i> Pflanzenprobe	AHBA Synthase Gene [bp]	Homologie	
		DNS-Ebene (EMBL Nummer)	Protein-Ebene (UniProt identifier)
Wurzel	765	81% - LN681221.1	78% - F4NAR6
Rinde	731	79% - LN831790.1	74% - F4NAR6
Blatt	770	99% - AAC13997.1	99% - Q44131
Positiv-Kontrolle	765	100% AAC13997.1	100% Q44131

Eine weitere wichtige und erste Modifikation in der Biosynthese von Ansamitocinen ist, nach den Polyketide-Synthetase (PKS) Schritten die das Macrolactam-Grundgerüst ausbilden, die Substitution eines Protons durch Chlor. Bei *Actinosynnema pretiosum* subsp. *auranticum* wird die Umwandlung von Proansamitocin in 19-Chlorproansamitocin durch die FADH₂-abhängige Halogenase Asm12 erreicht (Wu *et al.*, 2011). Dieses Gen diente als Positiv-Kontrolle und lieferte durch PCR-

Vervielfältigung mittels passender Primer ein Fragment mit einer Länge von 1300 Basenpaaren (Abb. 4.1.11B). Die Pflanzenproben und die isolierten endophytischen Gemeinschaften wurden unter gleichen Bedingungen amplifiziert. Keine der Pflanzenproben lieferte positive Ergebnisse. Ebenfalls konnte für die Endophyten aus Blatt und Wurzel keine entsprechende Sequenz gefunden werden. Nur für die endophytische Gemeinschaft der Rinde konnte dagegen ein entsprechendes Produkt detektiert werden. Erneut wurden die amplifizierten Sequenzen auf DNS- und Protein-Ebene abgeglichen. Die Positiv-Kontrolle zeigte eine Ähnlichkeit von 99% zum Asm12 Halogenase Gen (EMBL AAM54090.1) und 100% auf Protein-Ebene (UniProt Identifier Q8KUG0). Für das Fragment der Endophyten der Rinde war die Homologie zur Asm12 Halogenase jedoch relativ gering. Daher wurde eine erneute PCR-Analyse mit angepasstem Primer (P2) für hochkonservierte Aminosäure-Regionen von fünf weiteren FADH₂-abhängigen Halogenasen durchgeführt (Abb. 4.1.11C). Die ausgewählten Halogenasen besitzen unterschiedliche Enzym-Spezifitäten und metabolisieren unterschiedliche Produkte (Hornung *et al.* 2007). Für die Positiv-Kontrolle wurde das bereits amplifizierte PCR-Produkt mit 1300 bp vom Asm12 Gen von *A. pretiosum* als Vorlage für "primer walking" mit P2 verwendet. Wie erwartet lieferten sowohl die Pflanzenproben als auch die endophytischen Gemeinschaften von Wurzel und Blatt keine Sequenzen. Jedoch wurde für die Positiv-Kontrolle und die Endophyten der Rinde ein Fragment mit ca. 550 Basenpaaren gefunden. Der Abgleich mit den Datenbanken zeigte, dass die endophytische Gemeinschaft der Rinde eine Homologie von 100% zur Halogenase auf Gen-(EMBL CP001630.1) und Proteinebene (UniProt Identifier C6W874) besitzt (Tryptophan Halogenase). Die Positiv-Kontrolle zeigte eine Ähnlichkeit von 99% (EMBL AF453501.1) bzw. 97.2% (UniProt Identifier Q8KUG0).

Diese genetischen Untersuchungen wurden ebenfalls mit *M. serrata* Proben (Wurzel und Rinde) aus Ghana vom Januar 2015 durchgeführt. Bemerkenswert ist, dass hier keines der untersuchten Gene gefunden wurde. Diese Pflanze besitzt nicht die notwendigen genetischen Voraussetzungen zur Produktion der Maytansine-Vorläufer-Moleküle. Dies steht jedoch im Einklang mit den Ergebnissen der Pflanzenextraktion und der Fermentationen. In den Extrakten konnten durch HPLC-HRMS-Messungen keine Maytansinoide identifiziert werden.

Die chemisch-analytischen Untersuchungen lieferten zusammenfassend folgende Ergebnisse. In den *M. serrata* Pflanzenproben aus Kamerun (September 2014, Bafoussam) wurden die Maytansinoide Maytansine, Maytanprine und Maytanbutine identifiziert. Vor allem in der Rinde wurden die postulierten Vorstufen 1, 3, 4, 5, und 6 detektiert und die Strukturen mittels MS²-Fragmentierung bestätigt (Vorstufe 4, 5, 6). In den Fermentationsextrakten der endophytischen Gemeinschaft konnte keine Maytansine-Produktion nachgewiesen werden, was die genetischen Ergebnisse bestätigt. Die Vorstufe 2 wurde weder in den Fermentationsextrakten noch in den Pflanzenextrakten gefunden, was die Vermutung zulässt, dass es sich bei diesem Metaboliten um eine reaktive Zwischenstufe handelt. Werden alle Ergebnisse berücksichtigt, kann die in Abb. 4.1.12 dargestellte Biosynthese postuliert werden.

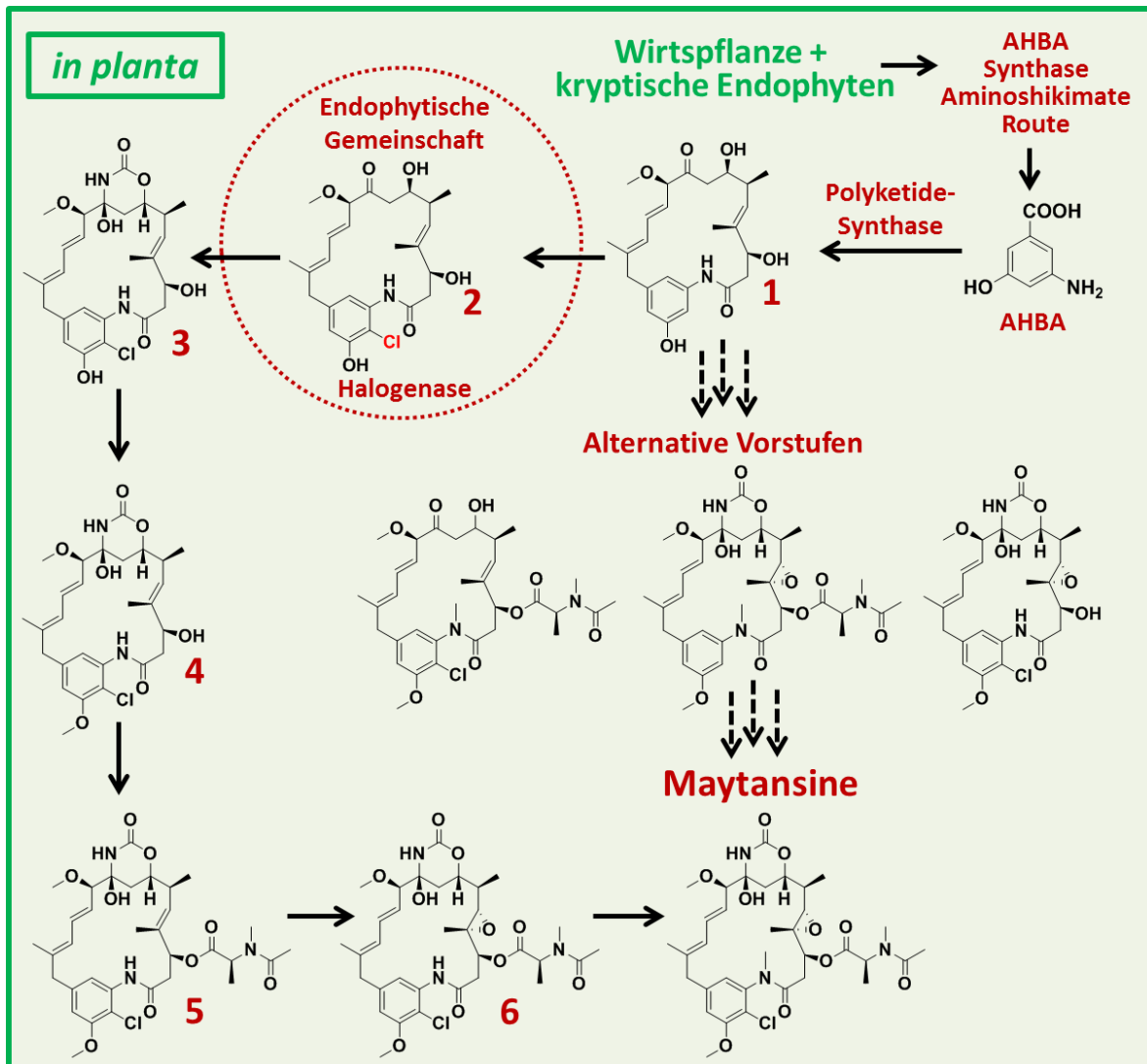


Abb. 4.1.12: Geteilte Biosynthese von Maytansine zwischen Wirtspflanze *M. serrata* und bakterieller endophytischer Gemeinschaft der Rinde (erweitert basierend auf Kusari *et al.*, 2016).

Nur die Wirtspflanze bzw. die kryptischen Endophyten besitzen die nötigen genetischen Voraussetzungen zur Produktion des Vorläufer-Moleküls AHBA und damit die Fähigkeit zur Steuerung der Maytansine-Produktion. Jedoch ist die Pflanze auf die Endophyten der Rinde angewiesen um die Substitution eines Protons durch Chlor vorzunehmen. Ob die Endophyten die Vorstufen aufnehmen oder das Halogenase-Enzym an die Pflanze abgeben, konnte nicht geklärt werden. Schlussfolgernd kann die Produktion von Maytansine in *M. serrata* als geteilte Biosynthese zwischen kultivierbarer endophytischer Gemeinschaft und der Wirtspflanze samt den nicht-kultivierbaren Endophyten bezeichnet werden. Neben dem Maytansine-Hauptweg der analog zur Biosynthese-Route von Ansamitochin P-3 verläuft (Spiteller *et al.*, 2003) werden drei weitere alternative Maytansine-Vorstufen detektiert und mittels MS²-Experimenten verifiziert. Dies zeigt, dass die beteiligten Post-PKS-Enzyme eine geringe Substratspezifität aufweisen und neben der Hauptroute (1→6) alternative Synthesewege vorhanden sind.

4.1.3 MALDI-imaging-HRMS verschiedener *Maytenus* Pflanzen

Während des Screenings der verschiedenen *Maytenus* Pflanzenproben auf Maytansinoide mittels Extraktion und HPLC-HRMS, wurde bei positivem Befund versucht, Einblicke in die örtliche Verteilung der Verbindungen mittels MALDI-imaging-HRMS zu erlangen. Dabei zeigte sich, dass nicht für alle Proben aussagekräftige Ionenbilder generiert werden konnten (<LOD). Bereits die Detektion von Maytansinoiden in verschiedenen Geweben (Wurzel, Zweig, Rinde) einer Pflanze zeigte einen hohen Verteilungsgrad der Stoffe innerhalb der Pflanze.

In Abb. 4.1.13 sind ausgewählte Messungen und Ionenbilder dargestellt sowie Phloroglucinol/HCL-Färbungen von Querschnitten zur Identifizierung anatomischer Strukturen, die zwei gewebespezifische Muster zeigen. Das Kalium-Addukt der Maytansinoiden zeigt bei alle untersuchten Pflanzenproben die höchsten Ionenintensitäten und wurde daher in dieser Forschungsarbeit hauptsächlich zur Darstellung verwendet.

Zum einen konnte eine Akkumulierung im Mark/Parenchym von *M. heterophylla* (A) und *M. senegalensis* (B) Zweigen gezeigt werden. Dies spricht für die Zwischenspeicherung von Maytansinoiden im Mark (Evert 2006; Braune *et al.*, 2009; Kadereit *et al.*, 2014). Zu einem späteren Zeitpunkt könnten die Verbindungen zunächst horizontal zum Xylem/Phloem und anschließend vertikal innerhalb der Pflanze transportiert werden. Zum anderen wurden die Zielmoleküle in verschiedenen Wurzeln (C, D, E) akkumuliert in den Leitbündeln (Xylem/Phloem) detektiert, dem für den Stofftransport verantwortlichen Geweben (Van den Honert 1948; Zimmermann & Milburn 1975; Karam 2005; Windt *et al.*, 2006; Knoblauch & Oparka 2012; Lucas *et al.*, 2013; Heldt und Piechulla 2015; Julius *et al.*, 2017). Daher kann davon ausgegangen werden, dass Maytansinoide grundsätzlich einem Transport innerhalb der Pflanze unterliegen und vermutlich passiv zwischen den Wurzeln und den oberirdischen Trieben mit dem Wasser bzw. Nährstoffstrom befördert werden. Ob Maytansinoide von den Wurzeln in die Triebe oder anders herum transportiert werden, konnte nicht geklärt werden und könnte jahreszeitlichen Unterschieden unterliegen bzw. speziesspezifisch sein und vom Ort der Biosynthese abhängen.

Weitere MALDI-imaging-HRMS Messungen sind im Anhang hinterlegt (Abb. M24-M43). Dabei wurden je nach Probe und Gewebe auch breite Verteilungen im gesamten Gewebe bzw. Akkumulationen im Cortex-Bereich detektiert. Ein allgemeingültiges Schema aller Proben zeichnete sich nicht ab. Dies liegt vermutlich an der allgemeinen Variabilität der Maytansinoid Detektion bzw. Biosynthese, der Beprobung verschiedener Pflanzenspezies in unterschiedlichen Lebensphasen und Sammelzeitpunkten. Dennoch konnte für einige Proben (Abb. 4.1.13) der mögliche Transport der Maytansinoide innerhalb von *Maytenus* Wurzeln in den Leitbündeln sowie die Zwischenspeicherung im Mark von Zweigen visualisiert werden.

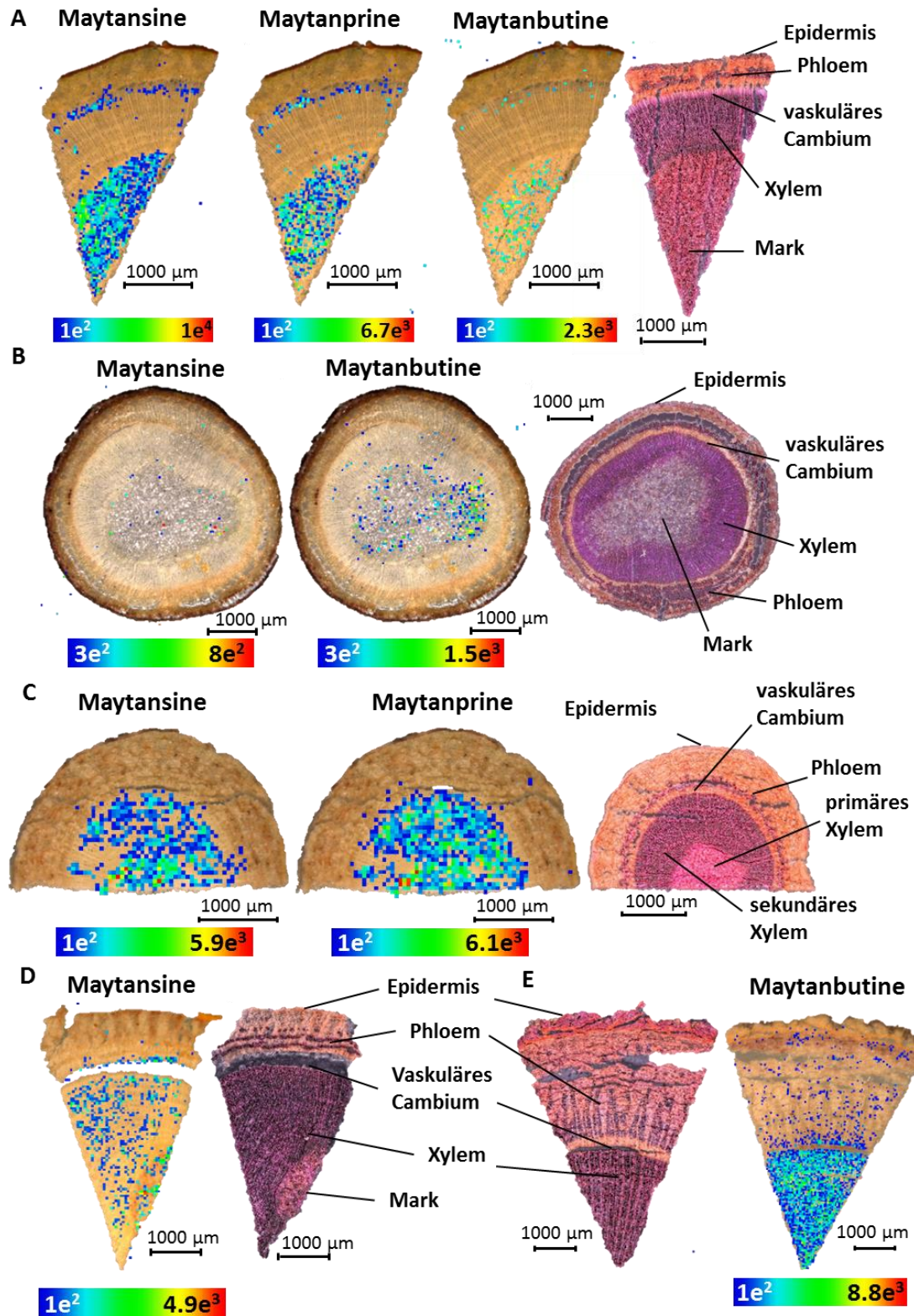


Abb. 4.1.13: MALDI-imaging-HRMS Ergebnisse unterschiedlicher *Maytenus* Pflanzenproben (A): *M. heterophylla* Zweig; (B): *M. senegalensis* Zweig; (C): *M. senegalensis* Wurzel; (D): *M. heterophylla* Wurzel; (E): *M. senegalensis* Wurzel. Ionenbilder (± 2 ppm) zeigen die Lokalisierung von Maytansine ($[\text{M}+\text{K}]^+$ m/z 730.2503), Maytanprine ($[\text{M}+\text{K}]^+$ m/z 744.2659) und Maytanbutine ($[\text{M}+\text{K}]^+$ m/z 758.2816). Zur Visualisierung anatomischer Strukturen wurden Querschnitte gefärbt (Phloroglucinol/HCl-Färbung; ligninhaltige Gewebe violett).

4.1.4 Untersuchung von *Putterlickia pyracantha* auf Maytansinoide

4.1.4.1 HPLC-HRMS Analyse

Während des Screenings verschiedener *Maytenus* Spezies konnte eine weitere Pflanze aus der Familie der Celastraceae, *Putterlickia pyracantha*, gesammelt und phytochemisch untersucht werden. Bei der Extraktion verschiedener Pflanzengewebe und der Quantifizierung der Maytansinoide mittels HPLC-HRMS zeigte sich eine hohe Anzahl an Maytansinoiden mit hohen Gehalten im Vergleich zu den *Maytenus* Pflanzenproben (Tab. 9). Daher wurde *P. pyracantha* eingehender untersucht. Zunächst wurde in Fullscans der Pflanzenextrakte nach den literaturbekannten Maytansinoiden mittels monoisotopischer Massen der Addukt-Ionen ($[M+H]^+$, $[M+Na]^+$) und der charakteristischen Isotopenmuster chlorierter Moleküle gesucht. Bisherige Untersuchungen von *P. pyracantha* haben nur die Anwesenheit von Maytansine in dieser Pflanze berichtet (Pullen *et al.*, 2003; Brossi 1985). Neben Maytansine wurden fünf weitere Maytansinoide, nämlich Maytanprine, Maytanbutine, Maytanvaline, Normaytancyprine und die Maytansine-Vorstufe 6 detektiert und mittels MS/MS-Experimenten eindeutig identifiziert, was deutlich zeigt, dass *P. pyracantha* eine wichtige, bisher unterschätzte Spezies im Hinblick auf die Maytansinoid-Forschung ist.

Interessanterweise konnte wie beim *Maytenus* Screening in *P. pyracantha* Pflanzenproben (Zweig und Blatt, Juli 2015) aus dem Botanischen Garten Berlin keine Maytansinoide detektiert werden. Diese konnten nur in der aus natürlichen Lebensbedingungen stammenden Probe nachgewiesen werden.

Tab. 9: Maytansinoid-Gehalte in *P. pyracantha* Geweben aus Bonnievale, Südafrika, April 2015.

Gewebe	µg/kg Pflanze (Trockengewicht)					
	Maytansine	Maytanprine	Maytanbutine	Maytanvaline	Maytansine-Vorstufe 6	Normaytancyprine
Wurzel	169	60	25	-	-	-
Stamm	1423	270	95	63	119	45
Blatt	-	-	-	-	-	-

Bestimmungsgrenze: 50 ng; Nachweisgrenze: 10 ng

Die massenspektrometrische Analyse von Maytansine, Maytanprine, Maytanbutine und Maytansine-Vorstufe 6 wurde bereits in den vorherigen Kapiteln ausführlich behandelt. Die MSⁿ-Spektren dieser Verbindungen sind im Anhang hinterlegt (Abb. M44, M45). Im Folgenden wird daher nur die Identifizierung von Maytanvaline und Normaytancyprine mittels HPLC-HRMS² ausführlicher erläutert.

Abb. 4.1.14 zeigt die kollisionsinduzierten (CID; 35 eV) MS²-Spektren von Maytanvaline (A) und Normaytancyprine (B) im *P. pyracantha* Stammextrakt (Fragmentierungswege sind im Anhang hinterlegt, Abb. M46, M47). Maytanvaline unterscheidet sich von Maytansine, Maytanprine und Maytanbutine durch eine längere Seitenkette. Durch den Verlust der Esterseitenkette ($-C_9H_{17}O_3N$) wird das bekannte Makrolidrest-Hauptfragment (m/z 547) gebildet. Analog wird durch den Verlust der Seitenkette ebenfalls das Fragment m/z 565 gebildet, wobei der Makrolidrest eine

4. Ergebnisse und Diskussion

Hydroxylgruppe behält. Weitere Fragmentierungen des Basispeaks sind Neutralteilchen-Verluste von Methanol, Wasser und Kohlenstoffdioxid, die für diese vier Maytansinoide aufgrund ihrer gleichen Kernstruktur identisch sind.

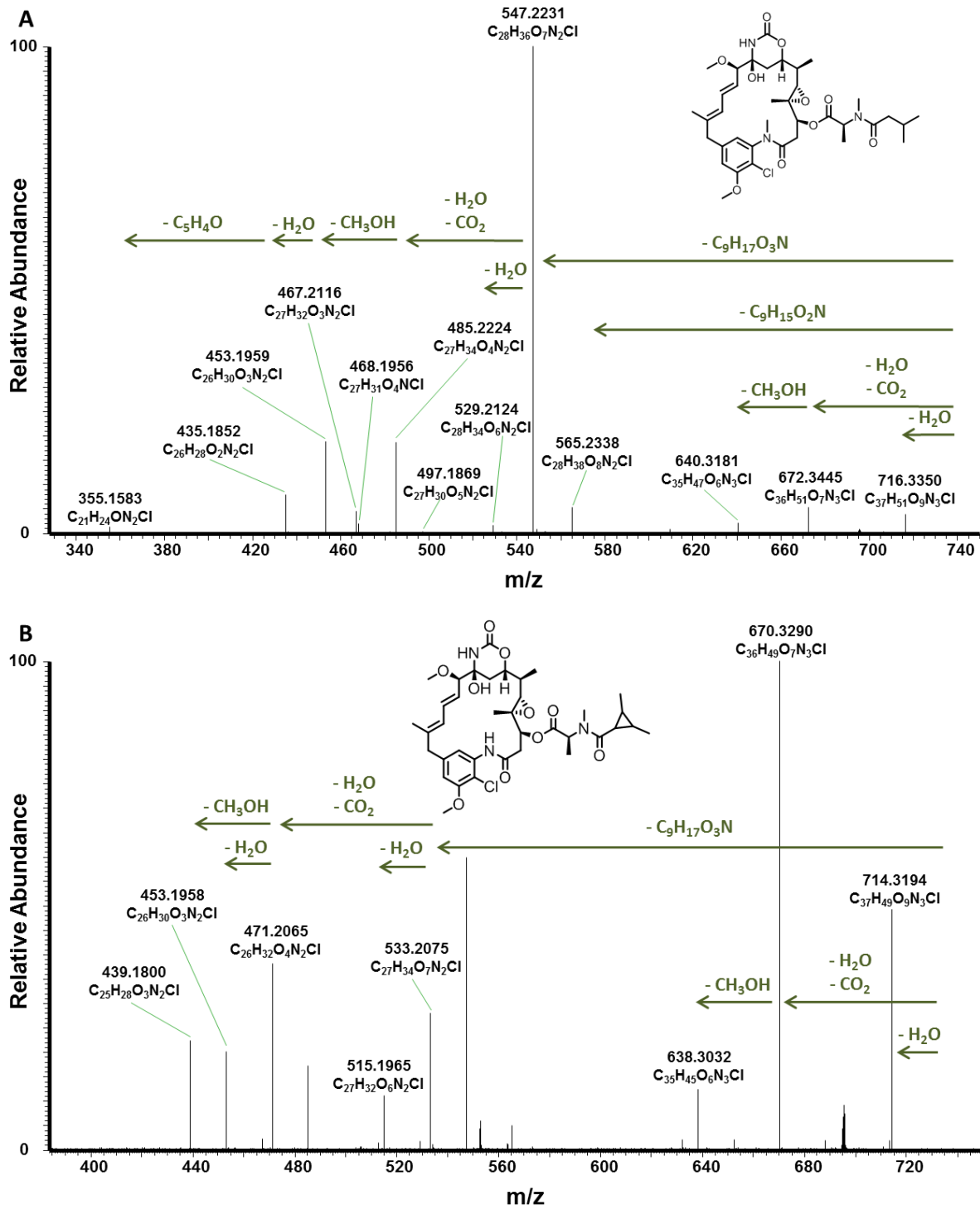


Abb. 4.1.14: MS²-Spektrum von Maytanvaline (m/z 734 (A)) und Normaytancyprine (m/z 732 (B)) aus dem Stammextrakt von *P. pyracantha*.

Das Ion bei m/z 453 wird wahrscheinlich durch einen Umlagerungsprozess gebildet, der auch für Ansamitocin P-3 berichtet wurde (Cassady *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2005). Der weitere Verlust von $-C_5H_4O$ führt zu dem Fragment m/z 355. Die unterschiedliche Länge der Esterseitenkette der vier Maytansinoide zeigt sich bei den Fragmenten, bei denen die Esterseitenkette an der Makrolidstruktur verbleibt. So sind die drei Fragmente für Maytanvaline (m/z 716, 672 und 640) im Vergleich zu Maytansine (m/z 674, 630 und 598) um 42 Da verschoben. Die Fragmente werden durch Verluste von Methanol, Kohlendioxid bzw. Wasser gebildet.

Neben Maytanvaline konnte Normaytancyprine (Abb. 4.1.14B) nachgewiesen und über HRMS² strukturell bestätigt werden. Diese Verbindung wurde ursprünglich im Jahr 1982 aus dem Stamm von *P. verrucosa* in geringen Mengen (0,00001%; 6 mg/60 kg) isoliert (Sneden *et al.*, 1982). Das MS²-Spektrum zeigt neben Neutralteilchen-Verlusten von Wasser, Methanol und Kohlenstoffdioxid die Abspaltung der Seitenkette, was zu dem charakteristischen Fragment m/z 533 führt. Dieses Fragment zeigt wie bei Normaytansine (Maytansine-Vorstufe 6) an, dass der Stickstoff des Makrolactam-Restes nicht methyliert ist. Zusätzlich kann die Seitenkette durch die Abspaltung verifiziert werden ($-C_9H_{17}O_3N$).

Neben den literaturbekannten Maytansinoiden zeigte die HPLC-HRMS-Analyse des Stammextrakts zwei weitere Peaks mit dem charakteristischen Muster chlorierter Moleküle: m/z 708 mit einer Summenformel von $C_{34}H_{47}O_{11}N_3Cl$ und m/z 722 mit einer Summenformel von $C_{35}H_{49}O_{11}N_3Cl$. Im Vergleich zu den bekannten Maytansinoiden wurden diese Verbindungen aus zwei Gründen als hydroxyliertes Maytansine bzw. hydroxyliertes Maxtanprine bezeichnet. Zum einen bestätigt die charakteristische Fragmentierung der Moleküle im HRMS²-Experiment die Struktur von hydroxyliertem Maytansine (Abb. 4.1.15A) und hydroxyliertem Maytanprine (Abb. 4.1.15B) (Fragmentierungswege sind im Anhang hinterlegt, Abb. M48, M49). Im Vergleich zu Maytansine bzw. Maytanprine ist das Hauptfragment (m/z 563) für beide Verbindungen um 16 Da verschoben. Neutralteilchen-Verluste von Kohlenstoffdioxid, Wasser und Methanol (m/z 501, 469 und 451) von der Lactameinheit zeigen ebenfalls die Massenverschiebung um 16 Da. Insgesamt zeigten die Massenspektren deutlich, dass die Esterseitenketten mit ihren nicht hydroxylierten Maytansinoiden identisch sind, wobei ein zusätzlicher Sauerstoff am Makrolactamring lokalisiert ist. Desweiteren wurde bereits aus der Pflanze *Colubrina texensis* hydroxyliertes Maytanbutine als Verbindung Colubrinol neben Maytanbutine isoliert und identifiziert (Wani *et al.*, 1973). Es ist daher anzunehmen, dass die Hydroxygruppe wie bei Colubrinol an der Position C-15 lokalisiert ist. Grundsätzlich kann jedoch aus den MS²-Daten nur eine Zuordnung der Hydroxylgruppe an der Makrolideinheit bestätigt werden. Aufgrund der niedrigen Gehalte sowie des geringen Ausgangsmaterials, konnte keine Aufreinigung und NMR-Analyse durchgeführt werden. Neben den hier gezeigten Verbindungen und Colubrinol, (Wani *et al.*, 1973) könnten weitere hydroxylierte Maytansinoid-Analoga in anderen Celastraceae Pflanzen vorkommen. Diese Annahme wird durch die patentierte Produktion von hydroxylierten Ansamitocinen mit genetisch modifizierten (Ansamitocin-Polyketid-Synthetase-Gene) Mikroorganismen weiter bekräftigt (Patent Santi *et al.*, 2003).

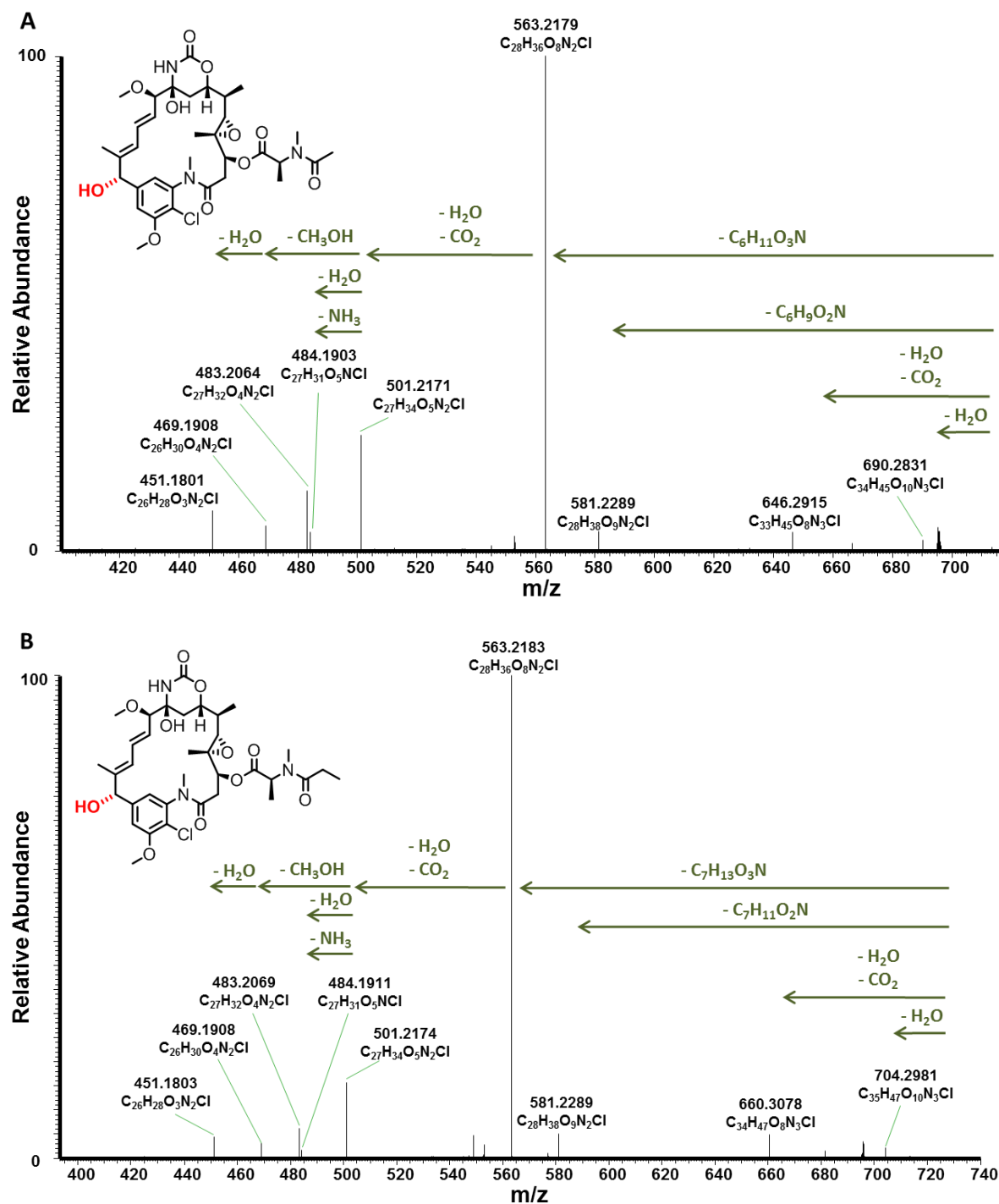


Abb. 4.1.15: MS²-Spektrum von hydroxiliertem Maytansine (m/z 708 (A)) und hydroxiliertem Maytanprine (m/z 722 (B)) aus dem Stammextrakt von *P. pyracantha*.

4.1.4.2 Visualisierung der örtlichen Verteilung von Maytansinoiden mittels MALDI-imaging-HRMS

Die Extraktion und HPLC-HRMS-Analysen der verschiedenen Gewebe (Blatt, Stamm und Wurzel) von *P. pyracantha* zeigten die höchste Anzahl und Gehalte an Maytansinoiden im Stamm an. Keine der Zielverbindungen konnte dagegen in den Blättern nachgewiesen werden, und die Wurzeln enthielten nur Maytansine, Maytanprine und Maytanbutine. Um die Lokalisation und räumliche Verteilung der Maytansinoide im Pflanzengewebe zu untersuchen, wurde MALDI-imaging-HRMS von Stamm und Wurzel durchgeführt.

Abb. 4.1.16 zeigt zwei unterschiedliche Querschnitte des Stammes mit den Ionenbildern der Maytansinoide ($[M+K]^+ \pm 2$ ppm (B, C)). Außerdem wurde eine Phloroglucinol/HCl Färbung des Querschnittes durchgeführt um die verschiedenen Gewebe besser zu unterscheiden (Ligninhaltige Gewebe = rot (A)).

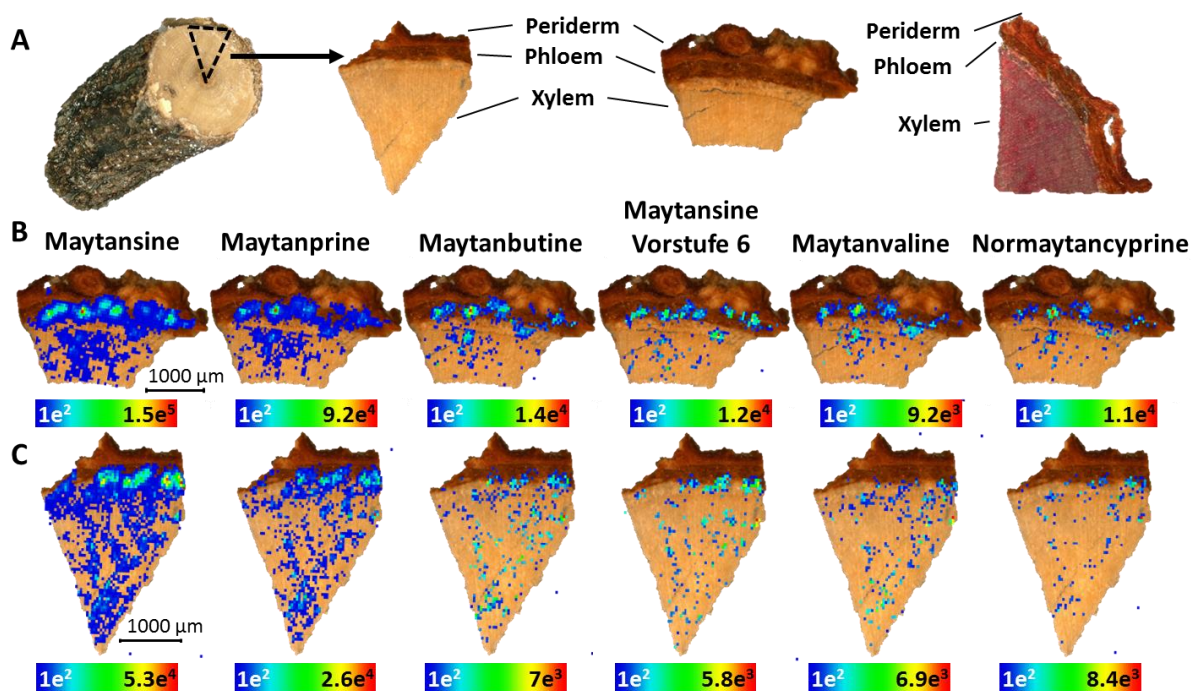


Abb. 4.1.16: Querschnitte von *P. pyracantha* Stamm sowie Querschnitte mit Phloroglucinol/HCl-Färbung zur Visualisierung anatomischer Strukturen (A). MALDI-imaging-HRMS von *P. pyracantha* Stamm-Querschnitten (Scanbereich: B: 3720x2600 μm ; C: 3520x4120 μm ; Ortsauflösung: 40 μm . Lokalisierung von Maytansine ($[M+K]^+ m/z$ 730.2503), Maytanprine ($[M+K]^+ m/z$ 744.2659), Maytanbutine ($[M+K]^+ m/z$ 758.2816), Maytansine-Vorstufe 6 ($[M+K]^+ m/z$ 716.2347), Maytanvaline ($[M+K]^+ m/z$ 772.2973) und Normaytancyprine ($[M+K]^+ m/z$ 770.2816) (± 2 ppm).

Die verschiedenen Maytansinoide zeigten identische Verteilungsmuster im Gewebe, was auf eine gemeinsame bzw. parallele Biosynthese und Expression der beteiligten Gene und Enzyme schließen lässt. Die Verbindungen zeigten punktuell erhöhte Intensitäten in der vaskulären Kambiumregion und eine breite Verteilung mit geringeren Intensitäten im Xylem, während die äußere Rinde (Periderm) frei von Maytansinoiden ist. Die bisher unbekannten hydroxylierten Derivate von Maytansine

und Maytanprine zeigten eine identische Verteilung mit den anderen Maytansinoiden innerhalb der Stammquerschnitte mit geringeren Intensitäten (Abb. M50 im Anhang). Die Tatsache, dass die Verbindungen im Zentralzylinder (Xylem und Phloem) akkumuliert sind, lässt den Schluss zu, dass diese bioaktiven Sekundärmetaboliten einem Stofftransport innerhalb der Pflanze unterliegen. Dies wird durch die Detektion von Maytansine, Maytanprine und Maytanbutine im Wurzelgewebe bekräftigt. MALDI-imaging-HRMS von Wurzelquerschnitten zeigt ebenfalls eine breite Verteilung im Zentralzylinder (Anhang Abb. M51). Aufgrund der Akkumulierung im Randbereich des Stammes und der bekannten Bioaktivitäten (antibakteriell, antimykotisch, insektizide Wirkung (Cassady *et al.*, 2004) kann zudem die ökologische Bedeutung von Maytansinoiden als chemische Abwehrverbindungen gegen biotische Umweltfaktoren in der Wirtspflanze vermutet werden.

MALDI-imaging-HRMS Messungen einer *P. pyracantha* Zweig-Probe (Südafrika, Februar 2017) zeigen die Einlagerung von Maytansinoiden in das Mark (Abb. 4.1.17). Die identischen Ionenbilder von Maytansine, Maytanprine, Maytanbutine, Maytanvaline und Normaytancyprine zeigten eine starke Akkumulierung im Mark des Zweiges, dem für die Stoffspeicherung verantwortlichen Gewebe. Die Akkumulierung von Maytansinoiden im Mark von Zweigen konnte ebenfalls in *Maytenus* Pflanzen gezeigt werden (Abb. 4.1.13) und deutet auf ein allgemeingültiges Konzept in beiden Genera hin. Im Mark/Parenchym werden im Allgemeinen (Nähr-)Stoffe zwischengelagert (Evert 2006; Braune *et al.*, 2009; Kadereit *et al.*, 2014). Zu gegebener Zeit, wenn die Stoffe benötigt werden, werden diese zunächst horizontal zum Xylem und/oder Phloem und anschließend vertikal innerhalb der Pflanze transportiert. Die spätere Translokation der Maytansinoide in dieser Pflanzenprobe scheint daher ebenfalls möglich.

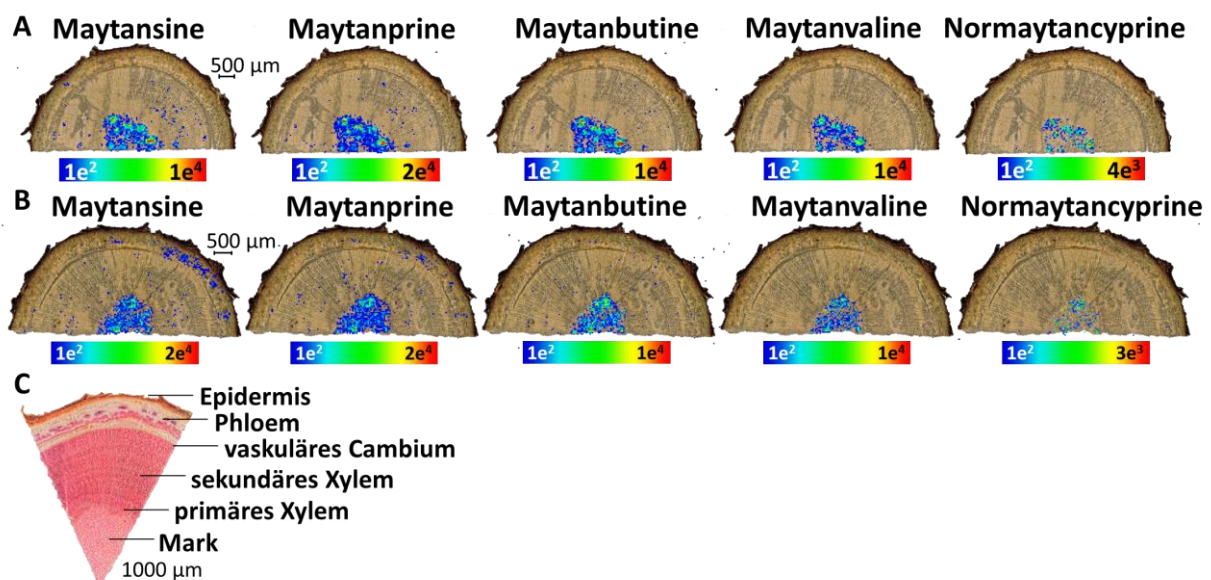


Abb. 4.1.17: MALDI-imaging-HRMS von *P. pyracantha* Zweig-Querschnitten (Scanbereich: A: 7600x4400 μm ; B: 7360x4000 μm ; Ortsauflösung: 40 μm) aus Grahamstown, Südafrika, Februar 2017. Lokalisierung von Maytansine ($[M+K]^+$ m/z 730.2503), Maytanprine ($[M+K]^+$ m/z 744.2659), Maytanbutine ($[M+K]^+$ m/z 758.2816), Maytanvaline ($[M+K]^+$ m/z 772.2973) und Normaytancyprine ($[M+K]^+$ m/z 770.2816) (± 2 ppm) sowie Phloroglucinol-Färbung eines Zweig-Querschnittes (C).

4.1.5 Untersuchung der örtlichen Verteilung von Maytansine während des Keimungsprozesses von *Maytenus senegalensis* Samen

Davon ausgehend, dass jeder endogene Sekundärmetabolit aufgrund der Substrate und Energie die zur Synthese benötigt werden, dem Produzenten einen Nutzen oder Vorteil verschaffen sollten, stellt sich die bisher ungeklärte Frage des Nutzens bzw. der ökologischen Rolle von Maytansinoiden *in planta*. Im Folgenden Kapitel werden neue Erkenntnisse auf diese Fragestellung anhand der Untersuchung des Lebenszyklus einer *Maytenus senegalensis* Pflanze (Mutterpflanze) sowie der gebildeten Samen und Keimlinge (Tochterpflanzen) gegeben. Bisher wurden in der Maytansinoid-Forschung nur einzelne Pflanzenproben untersucht. Das Monitoring dieser Sekundärmetaboliten über verschiedene Lebensphasen ist daher ein neuer Ansatz. Dabei wird der Keimungsprozess mittels *in situ*-Detektion durch MALDI-imaging-HRMS analysiert, eine etablierte Technik zur Untersuchung von Samen (Seyer *et al.*, 2010; Yoshimura *et al.*, 2012; Horn *et al.*, 2013; Gorzolka *et al.*, 2014).

Während des Screenings verschiedener *Maytenus* Spezies wurde eine *Maytenus senegalensis* Pflanze aus dem Botanischen Garten und Museum in Berlin auf Maytansinoide mittels HPLC-HRMS untersucht. In keinem der Pflanzenkompartimente (Wurzel, Stamm/Zweig, Blatt und Blüten) konnten die Zielverbindungen detektiert werden (Tab. 6, Nr. 62). Die Pflanze befand sich nach der Blütephase und besaß reife Samen. Da bereits die Anwesenheit von Maytansinoiden in Samen von *Maytenus rothiana* und *Trewia nudiflora* (Nettleton *et al.*, 1981; Freedman *et al.*, 1982) berichtet wurde, wurden die Samen von *M. senegalensis* weitergehend mittels MALDI-imaging-HRMS untersucht.

Abb. 4.1.18 zeigt den Samenquerschnitt mit den Ionenbildern der monoisotopischen Massen der Addukt-Ionen von Maytansine (identische Ionenbilder für $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$ und $[M+K]^+$). Obwohl die Mutterpflanze kein Maytansine enthielt, konnte Maytansine im Samen detektiert werden. Die Lokalisierung zeigt, dass sich die Zielverbindung sowohl in den Kotyledonen als auch im Endosperm detektieren lässt, mit einer Akkumulation im Endosperm zur Samenhülle. Zur weiteren Bestätigung wurden die Kotyledonen und das Endosperm separat gemessen und ebenfalls Maytansine detektiert (Anhang Abb. M52) Das Akkumulationsmuster mit der erhöhten Konzentration von Maytansine zum Randbereich lässt auf die ökologische Rolle von Maytansine als chemische Abwehrverbindung gegen Fraßfeinde, Insekten, und/oder Pflanzenpathogene wie Bakterien oder Pilze vermuten. So zeigten z.B. die Maytansinoid-haltigen Samenextrakte von *Trewia nudiflora* Aktivität gegen diverse Insekten wie *Diabrotica undecimpunctata howardi*, *Ostrinia nubilalis*, *Laspeyresia pomonella*, *Argyrotaenia velutinana*, *Conotrachelus nenuphar*, *Acalymma vittatum* und *Menacanthus stramineus* (Freedman *et al.*, 1982). Durch die Verwendung von Maytansine als Abwehrstoff würden die Überlebenschancen der Samen und damit die nachwachsende Generation geschützt und eine erfolgreiche Keimung gewährleistet werden. Der chemische Schutz von Samen durch endogene Sekundärmetabolite ist ebenfalls für andere Pflanzen bekannt (Fenner & Thompson 2005; Borges *et al.*, 2008; Kestring *et al.*, 2009; Fine & Mesones 2011; Dalling *et al.*, 2011; White *et al.*, 2018). Da sowohl vor als auch nach der Samenbildung kein Maytansine in der Mutterpflanze detektiert werden konnte, ist der Transport von Maytansine von der Mutterpflanze in die Samen abwegig und die Maytansine-Biosynthese scheint im Samen stattzufinden.

Dabei fungiert die Samenbildung wahrscheinlich als interner Auslöser für die Biosynthese. Die Abwesenheit von Maytansine in der Mutterpflanze und die dokumentierte Variabilität in der Detektierbarkeit von Maytansinoiden in *Maytenus* und *Putterlickia* Pflanzen unterstützen die Vermutung (Pullen *et al.*, 2003; Cassady *et al.*, 2004). Nach diesen Messungen wurde eine weitere *M. senegalensis* Pflanze (Klon der untersuchten Pflanze/gleiche Mutterpflanze) vom botanischen Garten Berlin, die ebenfalls frische Samen besaß, zur Verfügung gestellt. Während die Mutterpflanze ebenfalls keine Maytansinoide enthielt, konnte in den Samen analog zur ersten Pflanze Maytansine detektiert werden (Anhang Abb. M53). Des Weiteren wurde in *M. heterophylla* Samen aus Südafrika neben Maytansine, Maytanprine und Maytanbutine detektiert, in den Extrakten mittels HPLC-HRMS² bestätigt und die örtliche Verteilung mittels MALDI-imaging-HRMS visualisiert (Anhang Abb. M54, M55).

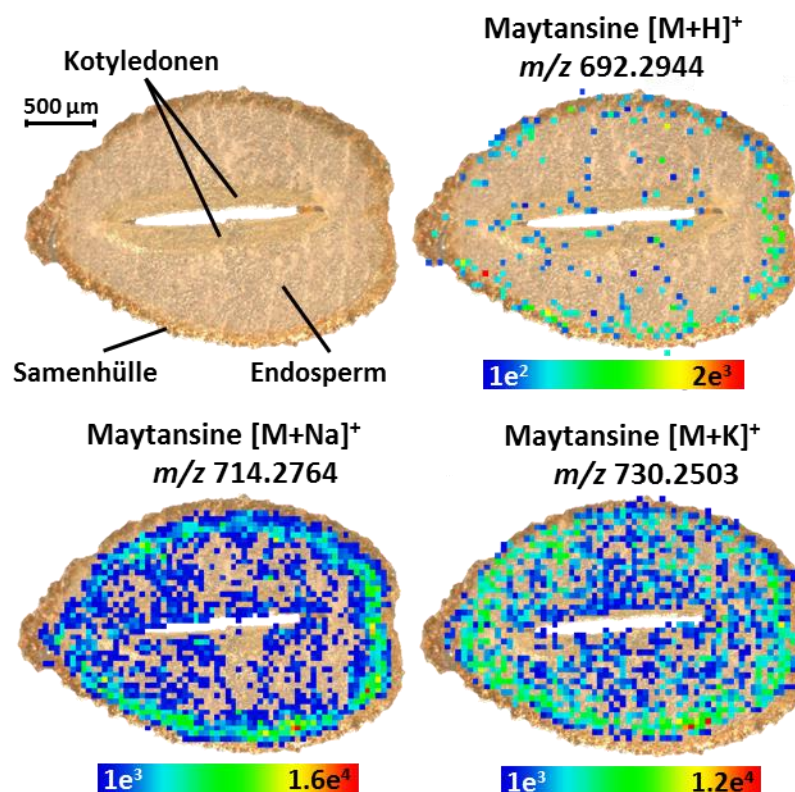


Abb. 4.1.18: Lokalisierung von Maytansine in *M. senegalensis* Samen mittels MALDI-imaging-HRMS. Optisches Bild des Querschnittes zusammen mit Ionenbildern von Maytansine ($[M+H]^+$ m/z 692.2944; $[M+Na]^+$ m/z 714.2764; $[M+K]^+$ m/z 730.2503; ± 2 ppm; Ortsauflösung: 40 μm ; Scanbereich: 3600x2560 μm).

Die ökologische Bedeutung von Maytansine als chemische Abwehrverbindung für die Sicherstellung der Nachkommenschaft scheint nicht nur für eine Pflanze bzw. Spezies, sondern womöglich für weitere Pflanzen der Familie Celastraceae zu gelten. Samen die Maytansinoide enthalten, hätten aufgrund der Bioaktivitäten einen evolutionären Vorteil gegenüber maytansinod-losen Samen. Im Sinne der natürlichen Auslese erklärt sich damit auch die Präsenz von Maytansinoiden nur in bestimmten Genera bzw.

Spezies. Zusätzlich würde dies ebenfalls die „Synthese-Kosten“ für diese Sekundärmetaboliten rechtfertigen. Ob die Pflanzen alleine, gemeinsam mit der endophytischen Gemeinschaft (wie bei *M. serrata*), oder die endophytische Gemeinschaft alleine (wie bei *Putterlickia verrucosa* und *P. retrospinosa* (Kusari *et al.*, 2014a)) für die Maytansine-Biosynthese verantwortlich sind, konnte mit den verwendeten analytischen Methoden allein nicht geklärt werden. Hier wären genetische Untersuchungen in der Zukunft zielführend. Die Sicherstellung des Überlebens der Wirtspflanze durch chemischen Schutz durch Maytansinoide ist sowohl für die Pflanze als auch für die Endophyten (Sicherstellung ihres Habitats/ökologische Nische) von höchster Wichtigkeit.

Einige der Samen wurden in Erde gepflanzt, regelmäßig gewässert und keimten schließlich. Die verschiedenen Pflanzengewebe (Radicula, Hypokotyl, Epikotyl, Kotyledonen und Laubblätter) der Keimlinge wurden ebenfalls mittels MALDI-imaging-HRMS auf Maytansinoide hin untersucht. Abb. 4.1.19 zeigt die Querschnitte der Kompartimente mit übergelegten Ionenbildern (± 2 ppm) sowie Querschnitte mit Phloroglucinol/HCl-Färbung zur Visualisierung der anatomischen Strukturen und morphologischen Merkmale. Das für den Stofftransport verantwortliche ligninhaltige Leitbündel ist violett gefärbt. Im Hypokotyl wurden die Addukt-Ionen von Maytansine ($[M+H]^+$, $[M+Na]^+$, $[M+K]^+$) mit einer Akkumulierung im Cortex detektiert (Abb. 4.1.19A). Das Leitbündel ist frei von Maytansine ($<LOD$). Da nur wenige Keimlinge und Samen zur Verfügung standen, konnte keine Extraktion und HPLC-HRMS-Messung durchgeführt werden. Um kein Falsch-positives Ergebnis zu erhalten, wurden die MS-Spektren der MALDI-Messungen von Maytansine ($[M+Na]^+$, $[M+K]^+$) zur Verifizierung herangezogen. Abb. M56 im Anhang bestätigt durch das charakteristische Isotopenverhältnis einfach-chlorierter Moleküle (M zu M+2-Verhältnis ca. 3:1) die Identität von Maytansine. Im Epicotyl wurde Maytansine mit geringeren Intensitäten, ebenfalls im Bereich des Cortex nachgewiesen (Abb. 4.1.19B). In der Radicula bzw. Keimwurzel wurde die Zielverbindung dagegen mit hohen Intensitäten in Quer- und Längsschnitten im Cortex gemessen (Abb. 4.1.19C, D). Sowohl auf der Oberfläche der Radicula bzw. Rhizodermis als auch in den Keimblättern/Kotyledonen und den Laubblättern konnte kein Maytansine detektiert werden ($<LOD$).

Zusammenfassend lässt sich ein Verteilungsmuster von Maytansine im Keimling ableiten. In Hypokotyl, Keimwurzel und Epikotyl ist Maytansine im Cortex zwischen Endodermis und Epidermis akkumuliert. Durch die Akkumulierung im Randbereich der Pflanzengewebe scheint erneut die ökologische Bedeutung als Abwehrsubstanz zur Gewährleistung der Entwicklung der nächsten Generation von Tochterpflanzen plausibel. Diese Hypothese wird weiter bekräftigt durch die Tatsache, dass die höchsten Intensitäten von Maytansine in der Keimwurzel und dem Hypokotyl gemessen wurden. Da sich diese beiden Gewebe in unmittelbarem Kontakt mit dem Boden befinden, sind diese Kompartimente, speziell der Rhizosphärenbereich, einem höheren Risiko von Angriffen von Pflanzenpathogenen wie Bakterien und Pilzen ausgesetzt (Wink 1988; Berendsen *et al.*, 2012; Bakker *et al.*, 2013). Hier lässt sich hypothetisch eine Korrelation von notwendiger hoher Maytansine-Konzentration und biotischem Schad- bzw. Gefahrenpotential ziehen. Ob Maytansine im Keimling in den verschiedenen Kompartimenten synthetisiert wird oder vom Samen abgegeben bzw. im

Keimling verteilt wird kann nicht geklärt werden. Aufgrund der Ionen-Intensitäten und dem Größenvergleich von Samen zu Keimling liegt jedoch eine Biosynthese im Keimling nahe. Ein gewisser Übertrag von Maytansine vom Samen auf den Keimling kann dabei nicht ausgeschlossen werden.

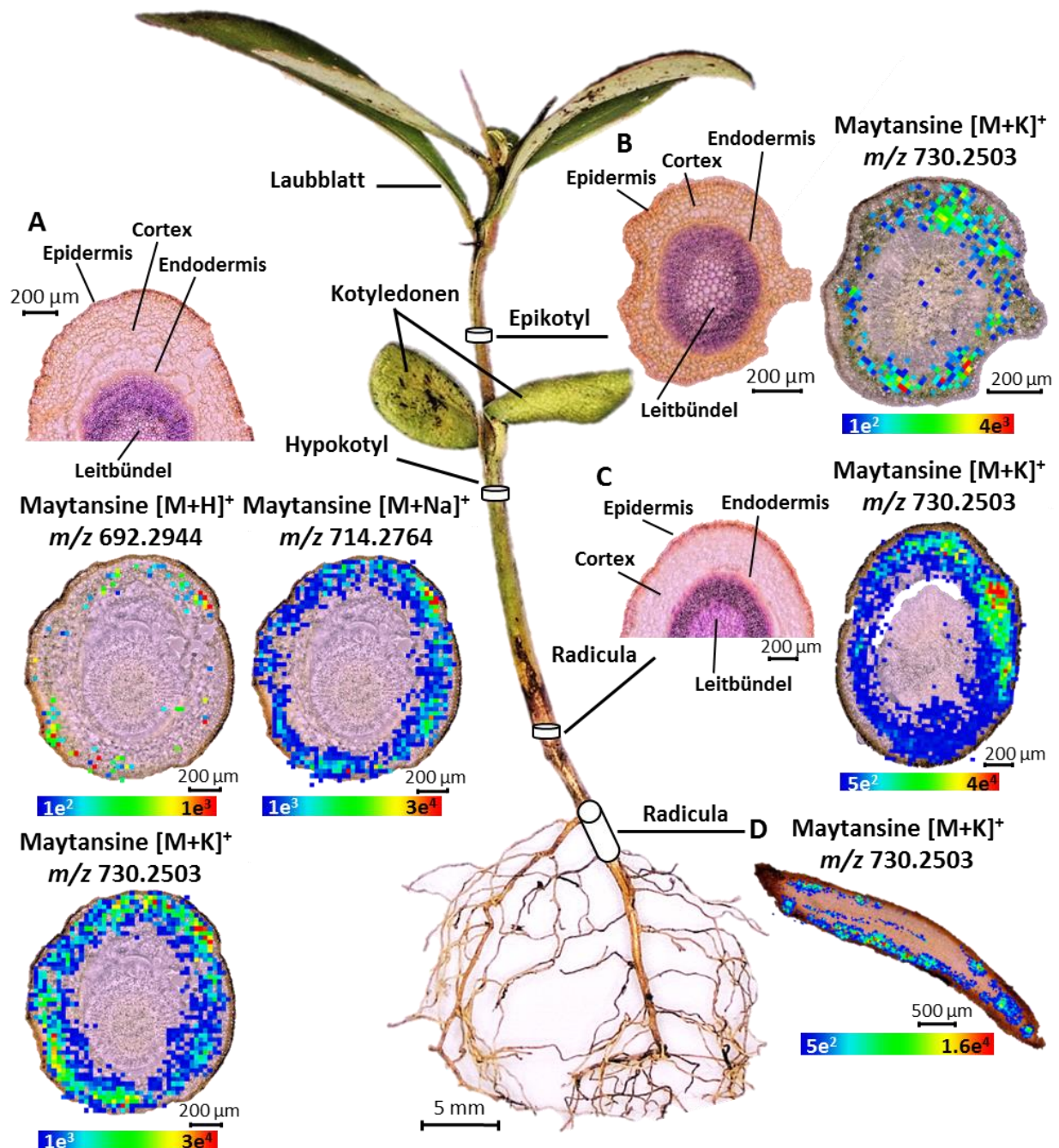


Abb. 4.1.19: Untersuchung verschiedener Gewebe eines *M. senegalensis* Keimlings mittels MALDI-imaging-HRMS zusammen mit Querschnitten mit Phloroglucinol/HCl-Färbung zur Identifizierung von anatomischen Strukturen. Querschnitte von Hypokotyl (Ortsauflösung: 30 µm; Scanbereich: 1740x1800 µm (A)), Epikotyl (Ortsauflösung: 20 µm; Scanbereich: 1340x1280 µm (B)), Radicula (Ortsauflösung: 30 µm; Scanbereich: 1770x2220 µm (C)) und Längsschnitt der Radicula (Ortsauflösung: 25 µm; Scanbereich: 5575x1475 µm (D)). Lokalisierung von Maytansine ([M+H]⁺ *m/z* 692.2944; [M+Na]⁺ *m/z* 714.2764; [M+K]⁺ *m/z* 730.2503; ± 2 ppm).

Seit der Entdeckung von Maytansine im Jahr 1972 durch die Gruppe von Kupchan (Kupchan *et al.*, 1972a, 1972b) haben mehrere Studien das sporadische und variable Auftreten von Maytansine in verschiedenen Pflanzen gezeigt. Obwohl die ökologische Bedeutung der Maytansine-Produktion vorhergesagt wurde, blieb eine „Proof-of-Concept“-Studie wie diese bislang aus.

Zusammenfassend können durch die Untersuchung der verschiedenen Lebensabschnitte der *M. senegalensis* Pflanze auf Maytansine (Abb. 4.1.20) folgende Schlussfolgerungen getroffen werden.

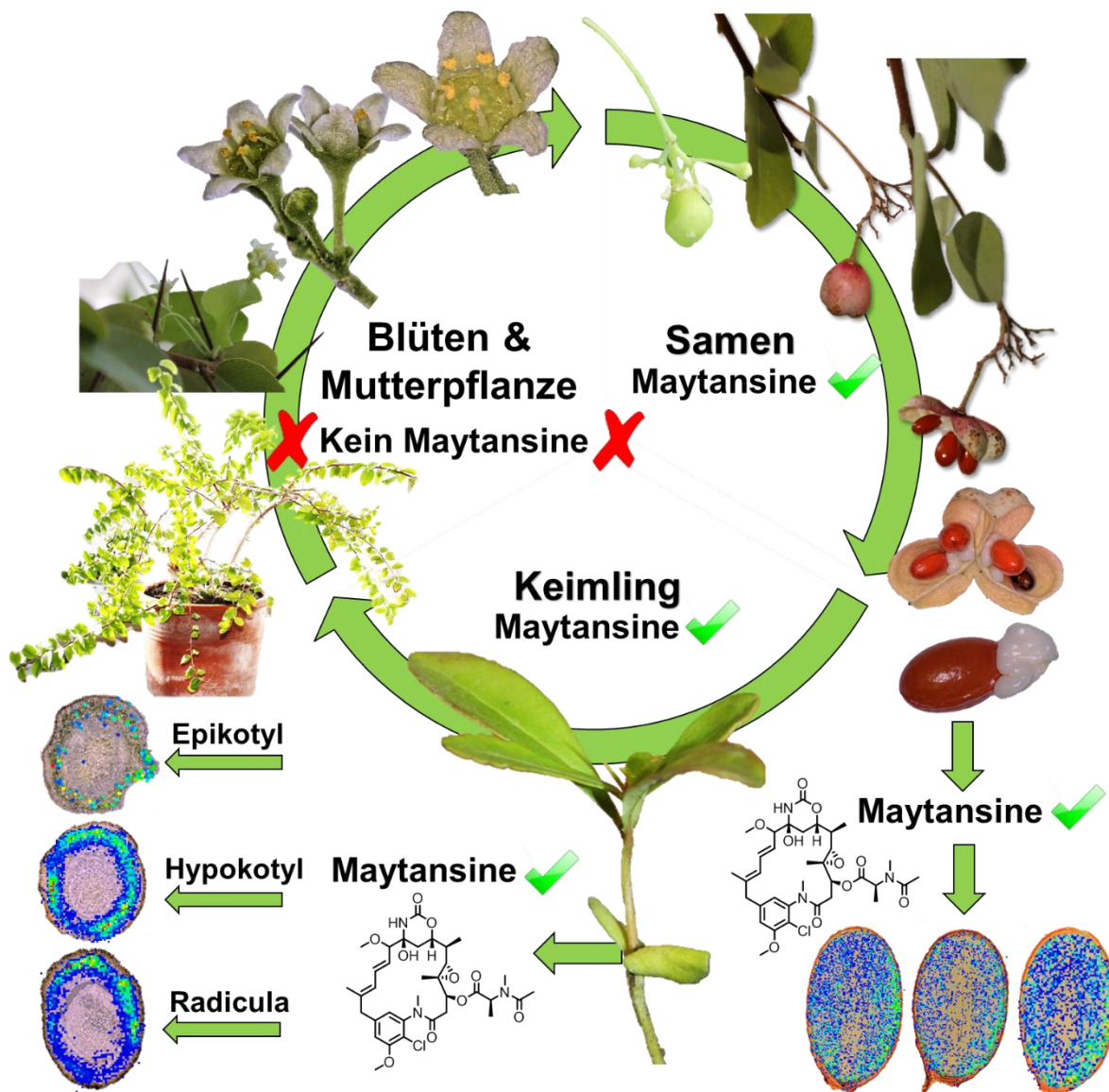


Abb. 4.1.20: Untersucher Lebenszyklus von *M. senegalensis* (Mutterpflanze und Blüte-, Samen-, Keimungsphase). Keine Maytansinoide in der Mutterpflanze und den Blüten. Detektion von Maytansine in Samen und verschiedenen Geweben des Keimlings (Epikotyl, Hypokotyl und Radicula).

Die charakteristische Akkumulation von Maytansine im Samen zum Randbereich des Endosperms hin zur Samenhülle und in den Geweben des Keimlings (Epikotyl,

Hypokotyl, Radicula) im Cortex-Bereich, legt die ökologische Rolle von Maytansine als chemischer Abwehrstoff gegen biotische Faktoren nahe. Eindringende Fraßfeinde, Insekten, Bakterien oder Pilze kämen in direkten Kontakt mit den Maytansinoiden mit Wirkung gegen Insekten, Mikroorganismen und Eukaryoten (Hanka & Barnett 1974; Tanida *et al.*, 1979, 1980a, 1980b; Freedman *et al.*, 1982; Hatano *et al.*, 1984; Cassady *et al.*, 2004). Interessanterweise wird gerade der empfindliche Lebensabschnitt der Keimungsphase in *M. senegalensis* speziell von Maytansine geschützt. Der Einsatz von bioaktiven Verbindungen gegen eindringende Pflanzenpathogene, Insekten und Fraßfeinde zum Schutz von Samen und Keimlingen ist ebenfalls für andere Pflanzenarten bekannt (Fenner & Thompson 2005; Borges *et al.*, 2008; Kestring *et al.*, 2009; Fine & Mesones 2011; Dalling *et al.*, 2011; White *et al.*, 2018). Der langfristige Nutzen durch Erhöhung der Wahrscheinlichkeit des Fortbestandes der Art rechtfertigt daher auch die Produktionskosten (Substrate und Energieaufwand) der Sekundärmetaboliten. Maytansine-haltige Samen und Keimlinge besitzen dadurch einen evolutionären Überlebensvorteil gegenüber Pflanzen die nicht fähig sind Maytansinoide zu produzieren. Falls Endophyten in *M. senegalensis* für die Maytansine-Biosynthese verantwortlich sind, würden die Produzenten die Wirtspflanze und damit ihren eigenen Lebensraum bzw. ökologische Nische schützen. Des Weiteren weist die Detektion von Maytansine in Samen und Keimlingen auf einen möglichen horizontalen Transfer von Endophyten/endophytischer Gemeinschaft über den Samen hin. Diese Möglichkeit wurde bereits vermutet, jedoch fehlten bisher jedwede analytischen Hinweise und Ergebnisse (Cassady *et al.*, 2004).

Eine weitere Erkenntnis ist die mögliche Erklärung der häufig berichteten Variabilität bzw. die wechselnde Detektierbarkeit von Maytansinoiden in verschiedenen Pflanzenproben (Pullen *et al.*, 2003; Cassady *et al.*, 2004). Die Studie zeigt, dass in der Mutterpflanze sowie in der Blütephase kein Maytansine detektiert werden konnten, jedoch im Samen und Keimlingen (Abb. 4.1.20). Dies legt nahe, dass es eine gewebespezifische Produktion bzw. mögliche Auslöser für die Biosynthese in speziellen Lebensabschnitten gibt. Damit könnte die variierende Anwesenheit erklärt werden.

4.1.6 Monitoring der örtlichen Verteilung von Maytansinoiden während des Lebenszyklus von *Putterlickia verrucosa*

Parallel zur Untersuchung der Lebensabschnitte von *Maytenus senegalensis* wurde die Blüte-, Samen- und Keimungsphase von *Putterlickia verrucosa* intensiv untersucht. Im Jahr 2014 wurde gezeigt, dass die Biosynthese von Maytansine in *Putterlickia verrucosa* von der endophytischen Gemeinschaft in den Wurzeln selbstständig durchgeführt werden kann (Kusari *et al.*, 2014a). Damit sind Endophyten die eigentlichen Maytansinoid-Produzenten in dieser Spezies und nicht die Pflanze. Umso mehr stellt sich die Frage ob und in welcher örtlichen Verteilung Maytansinoide in den verschiedenen Abschnitten der Fortpflanzung und Entwicklung der nächsten Generation der Pflanze auftreten. Verschiedene Gewebe der einzelnen Phasen wurden mittels MALDI-imaging-HRMS analysiert und die Samen und Blüten zusätzlich extrahiert und mittels HPLC-HRMS quantifiziert. Im Folgenden werden die einzelnen Ergebnisse mit Hinblick auf einen möglichen Transfer von Maytansinoiden vom Samen auf den Keimling, einen Transport von Maytansinoiden innerhalb der Pflanzengewebe des Keimlings und die ökologische Rolle von Maytansinoiden in *P. verrucosa* geschildert. Außerdem wird erläutert, inwieweit die erhaltenen Ergebnisse auf einen möglichen vertikalen Transfer der zur Maytansine-Biosynthese fähigen endophytischen Gemeinschaft von der Mutterpflanze über den Samen auf die nächste Generation (Keimling) deuten.

4.1.6.1 Quantifizierung der Maytansinoid-Gehalte mittels HPLC-HRMS in Samen und Blüten

Neben der MALDI-imaging-HRMS Analysen wurden zur Bestätigung der Identität der Maytansinoide sowie zur Quantifizierung Extrakte von Blüten und Samen untersucht. Tab. 10 zeigt die Ergebnisse der Quantifizierung. In allen Geweben zeigten sich im Vergleich zum Pflanzen-Screening verschiedener *Maytenus* Spezies deutlich höhere Gehalte in den Samen und Blüten. Dabei zeigten die Samen mit einem Gehalt von über 12 mg/kg Maytansine die höchsten Werte der gesamten Arbeit. Außerdem wurde im Samen-Extrakt mit acht Maytansinoiden die höchste Anzahl an Zielmolekülen detektiert. Neben den bekannten Stoffen Maytansine, Maytanprine, Maytanbutine, Normaytancyprine und Maytanacine wurden für diese Spezies erstmals die Maytansinoide Maytanvaline, Maytansine-Vorstufe 6 und Mallotusine bzw. iso-Mallotusine detektiert (Kupchan *et al.*, 1977; Sneden 1982; Brossi 1985; Pullen *et al.*, 2003; Kusari *et al.*, 2014a).

Zur Verifizierung wurden MS/MS-Experimente durchgeführt und die MS²-Spektren der Maytansinoide des Samen-Extraktes beispielhaft im Anhang hinterlegt (Abb. M57). Mallotusine bzw. iso-Mallotusine konnten mittels MSⁿ-Messungen nicht unterschieden werden. Zusätzlich ist der Fragmentierungsweg von Maytanacine gezeigt, da dieser Maytansinoid zum ersten Mal in dieser Arbeit detektiert und identifiziert wurde (Abb. M58). Neben den Samen wurden die Samen-Kapseln untersucht, in denen die Samen reifen. Nach der Reifung öffnen sich die Kapseln und geben den Samen frei. Auch hier wurden Maytansine, Maytanprine und Maytanbutine detektiert, jedoch im Vergleich zu den Samen in geringeren Konzentrationen.

Interessanterweise wurden die Zielmoleküle im Vergleich zur *M. senegalensis* Studie in den Blüten von *P. verrucosa* detektiert. Für die Untersuchung der Blüten wurden diese vom Stengel (Blütenverbindung) getrennt und separat analysiert. In beiden Geweben wurden grundsätzlich hohe Gehalte an Maytansinoiden detektiert. Da Maytansinoide sowohl in der Blüte als auch im Stengel gefunden wurden, liegt die Vermutung nahe, dass ein Transport von der Pflanze durch den Stengel in die Blüten stattfindet. Erneut liegt der Schluss nahe, dass die empfindlichen und anfälligen Entwicklungsschritte zur Erzeugung der nächsten Generation wie die Blüte- und Samenphase chemisch durch Maytansinoide vor biotischen Gefahren geschützt sind.

Tab. 10: Maytansinoid-Gehalte in *P. verrucosa* Geweben.

Maytansinoid	mg/kg Pflanze (Trockengewicht)			
	Samen	Samenkapsel	Blüte	Stengel
Maytansine	12.82	0.72	1.56	1.75
Maytanprine	8.46	0.31	0.85	1.12
Maytanbutine	4.30	0.12	0.30	0.56
Maytanvaline	0.46	-	0.05	0.16
Maytansine-Vorstufe 6	0.16	-	-	-
Normaytancyprine	0.59	-	-	-
Maytanacine	0.60	-	0.07	0.12
(iso)-Mallotusine	0.12	-	-	-

Bestimmungsgrenze: 50 ng; Nachweisgrenze: 10 ng

4.1.6.2 Blütephase

Die Blüten der Blüten mehrerer *P. verrucosa* Pflanzen wurden vereint, extrahiert und mittels HPLC-HRMS quantifiziert. Zusätzlich wurden diverse Sektionsschnitte (Längs- und Querschnitte) angefertigt und MALDI-imaging-HRMS Messungen durchgeführt. Zunächst wurden die detektierten Maytansinoide quantifiziert und hohe Gehalte ermittelt (Tab. 10).

Die MALDI-imaging-HRMS Messungen (Abb. 4.1.21A-D) zeigten geringe Ionenintensitäten sodass nur für Maytansine repräsentative Ionenbilder generiert werden konnten. In den Längsschnitten (entlang der Blütenachse) wird Maytansine im Gewebe um den Fruchtknoten (Ovarium) detektiert. Dies zeigt ebenfalls der Querschnitt auf Höhe kurz unterhalb des Fruchtknotens (Abb. 4.1.21C). Der Querschnitt des Stieles (Abb. 4.1.21D) zeigt dagegen eine Akkumulierung im Zentrum des Gewebes. Zusammenfassend kann geschlussfolgert werden, dass die Blüten aufgrund der hohen Gehalte an zytotoxischen Maytansinoiden vermutlich vor Fraßfeinden, Pilzen und Bakterien geschützt sind. Auffällig dabei ist die Akkumulierung um den Fruchtknoten. Damit würde der empfindliche und wichtige Schritt der Blütephase bzw. der Bestäubung mit anschließender Samenentwicklung chemisch geschützt sein.

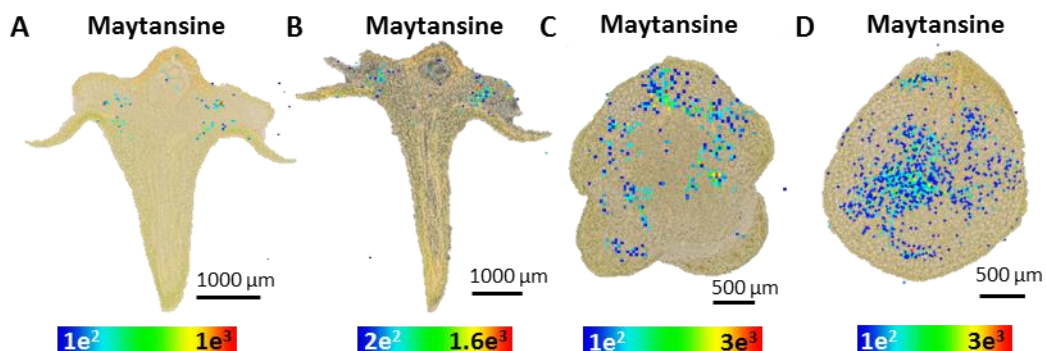


Abb. 4.1.21: MALDI-imaging-HRMS von *P. verrucosa* Blüten-Längsschnitten ((A) Scanbereich: 6125x5320 µm; Ortsauflösung: 35 µm; (B) Scanbereich: 6000x5800 µm; Ortsauflösung: 40 µm) und Querschnitten (Ortsauflösung: 40 µm; (C) Scanbereich: 3200x3360 µm; (D) Scanbereich: 2700x2600 µm) mit Lokalisierung von Maytansinen ($[M+K]^+$ m/z 730.2503, ± 2 ppm).

4.1.6.3 Samenphase

Aus den befruchteten Blüten entstehen die Kapselfrüchte von *P. verrucosa* mit ca. zwei bis drei Samen pro Samenkapsel. Physisch geschützt reifen die Samen in den geschlossenen Samenkapseln bis sich die Kapseln öffnen und die Samen freigeben (Abb. 4.1.22A, B). Die Samen sind weiterhin von einem orangenen Samenmantel (Arillus) umgeben und hängen zunächst noch an den Samenkapseln bis sie sich selbständig lösen und zur Erde fallen.

Sowohl die Samenkapseln als auch der Samenmantel wurden mittels MALDI-imaging-HRMS untersucht. Abb. 4.1.22C und D zeigen, dass sowohl in der Kapsel als auch im Mantel Maytansinoide vorhanden sind. Für die Kapsel konnte nur für Maytansine ein aussagekräftiges Ionenbild erzeugt werden. Die Extraktion und Analyse mittels HPLC-HRMS zeigte jedoch ebenso die Anwesenheit von Maytanprine und Maytanbutine. Auf der Oberfläche des Mantels können Maytansine, Maytanprine und Maytanbutine detektiert werden.

Die Kapsel bietet dem Samen zunächst physischen Schutz gegen Pflanzenpathogene, Insekten und Fraßfeinde. Außerdem wird der Samen chemisch durch Maytansinoide in Kapsel und Mantel geschützt, da diese eine hohe Zytotoxizität besitzen und aktiv gegen Protozoen, Hefen, Pilze und Insekten wirken ((Hanka & Barnett 1974; Tanida *et al.*, 1979, 1980a, 1980b; Freedman *et al.*, 1982; Hatano *et al.*, 1984; Cassady *et al.*, 2004)). Dies bringt einen zusätzlichen evolutionären Vorteil gegenüber Pflanzen die diese Sekundärmetaboliten nicht besitzen.

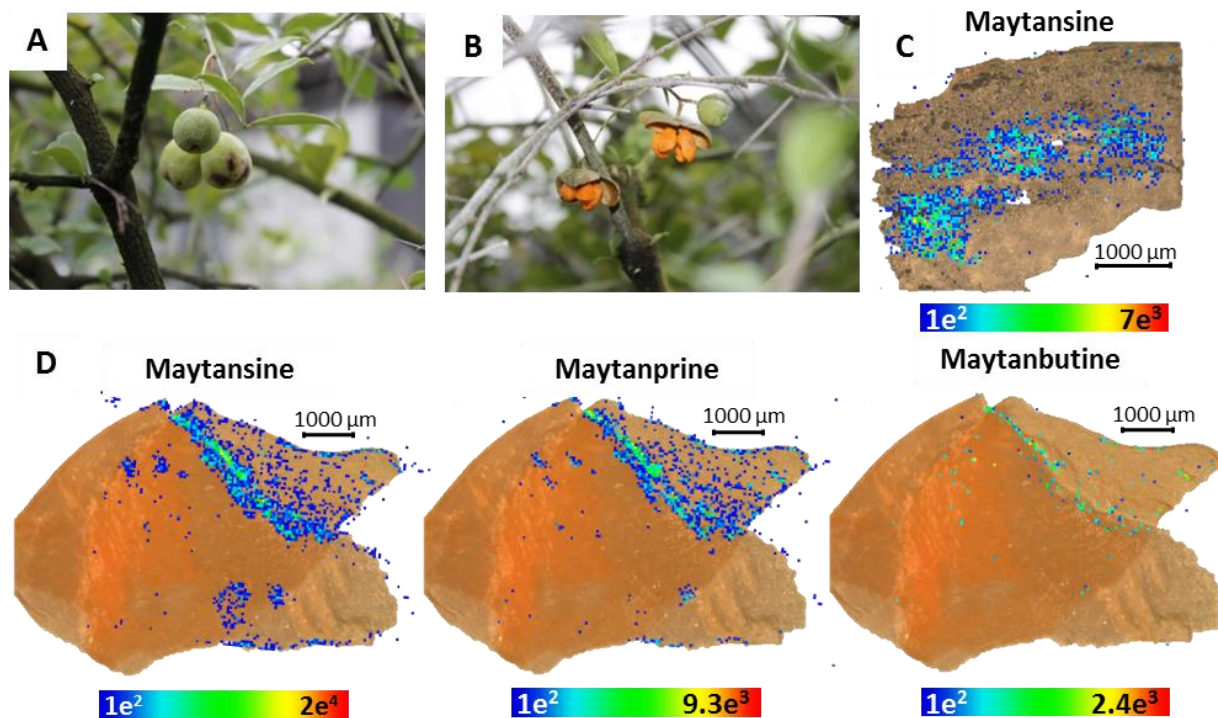


Abb. 4.1.22: *P. verrucosa* Samenkapsel geschlossen (A), Samenkapsel geöffnet mit Samen und Samenmantel (B), MALDI-imaging-HRMS der Samenkapsel ((C) Scanbereich: 7450x5400 µm; Ortsauflösung: 50 µm) und der Samenmantel ((D) Scanbereich: 5400x4720 µm; Ortsauflösung: 40 µm). Lokalisierung von Maytansine ([M+K]⁺ *m/z* 730.2503), Maytanprine ([M+K]⁺ *m/z* 744.2659) und Maytanbutine ([M+K]⁺ *m/z* 758.2816).

Abb. 4.1.23 zeigt die MALDI-imaging-HRMS Ergebnisse von Querschnitten eines *P. verrucosa* Samens. Auffällig sind die hohen Intensitäten mit denen die verschiedenen Maytansinoide sowohl in den Kotyledonen als auch im Endosperm gemessen wurden. Auf der Samenhülle konnten dagegen keine Maytansinoide detektiert werden. Sowohl die hohen Ionenintensitäten der MALDI-imaging Messungen als auch die Maytansinoid-Gehalte der Quantifizierung (siehe Tab. 10, z.B. >12 mg/kg Maytansine) und die hohe Anzahl der zytotoxischen Stoffe deuten erneut auf die ökologische Rolle von Maytansine bzw. allgemein von Maytansinoiden als chemische Abwehrverbindungen von biotischen Gefahren zum Schutz des Samens und damit der nächsten Generation hin.

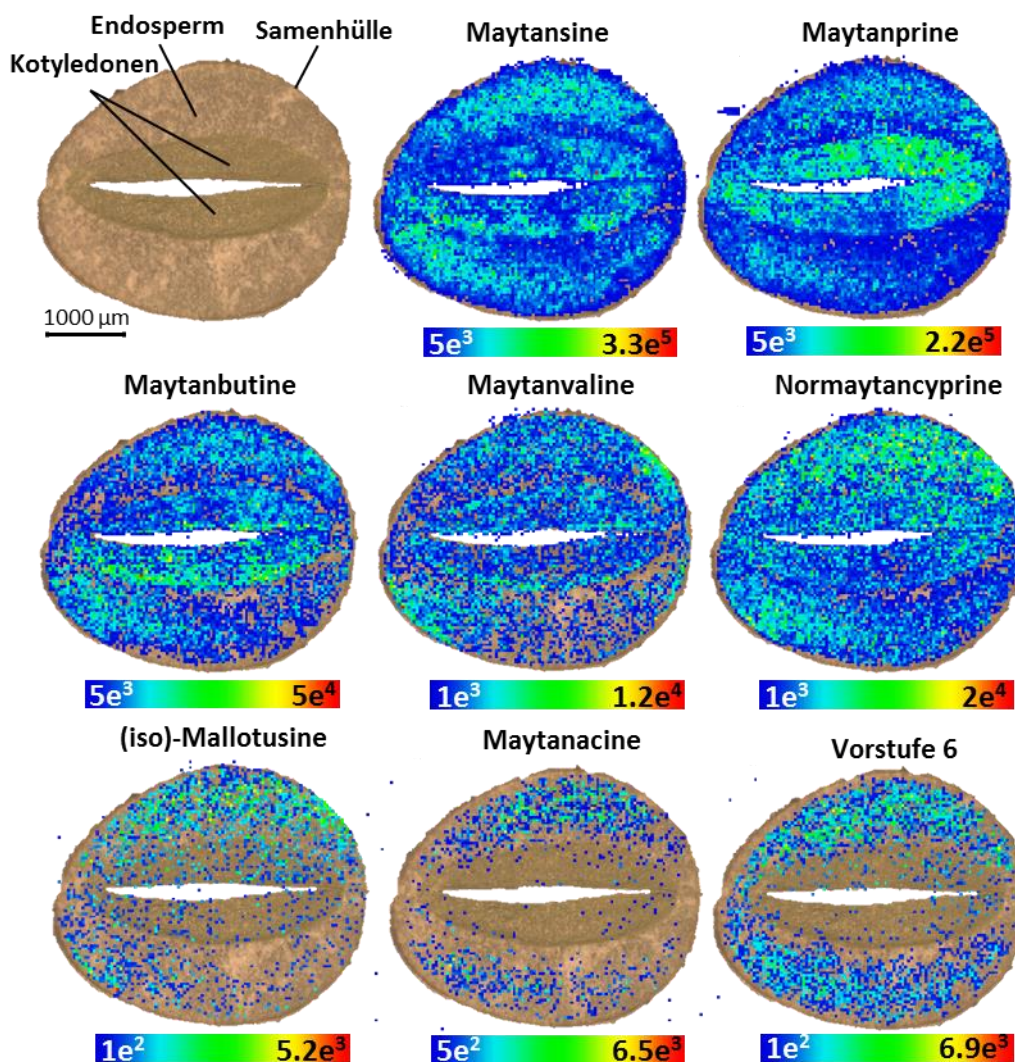


Abb. 4.1.23: MALDI-imaging-HRMS eines ungekeimten *P. verrucosa* Samens (Scanbereich: 5400x4360 µm; Ortsauflösung: 40 µm). Lokalisierung von Maytansine ($[M+K]^+$ m/z 730.2503), Maytanprine ($[M+K]^+$ m/z 744.2659), Maytanbutine ($[M+K]^+$ m/z 758.2816), Maytanvaline ($[M+K]^+$ m/z 772.2973), Normaytancyprine ($[M+K]^+$ m/z 770.2816), (iso)-Mallotusine ($[M+K]^+$ m/z 784.2973), Maytanacine ($[M+K]^+$ m/z 645.1976) und Maytansine-Vorstufe 6 ($[M+K]^+$ m/z 716.2347) (± 2 ppm).

P. verrucosa gehört zur Gruppe der Zweikeimblättrigen (Dikotyledonen). Daher sind die zwei Keimblätter (Kotyledonen) bereits im Samen als Querschnitt zu erkennen. Die Detektion der Zielmoleküle auf den Kotyledonen im Samen lässt bereits den Schluss zu, dass ein Übertrag dieser Stoffe vom Samen auf den Keimling stattfindet und im Keimling ebenfalls Maytansinoide in den herausgewachsenen Keimblättern zu finden sind. Ob die Stoffe in der Pflanze synthetisiert und in den Samen transportiert werden oder ob die Synthese im Samen stattfindet kann nicht abschließend geklärt werden. In den Verbindungsstücken vom Zweig zum Samen konnten jedoch keine aussagekräftigen Ionenbilder generiert werden. Daher liegt die Vermutung nahe, dass die gemessenen Maytansinoide im Samen produziert wurden. Dieses Verhalten wäre analog zu den untersuchten *M. senegalensis* Samen und spricht erneut für eine Aktivierung bzw. erhöhte Maytansinoid-Produktion in bestimmten Lebensphasen beziehungsweise Pflanzengeweben.

Da bereits gezeigt wurde, dass die untersuchten *P. verrucosa* Pflanzen diese Sekundärmetaboliten nicht selbstständig synthetisieren können sondern die bakterielle endophytische Gemeinschaft der Wurzeln (Souvik *et al.*, 2014), ist ein vertikaler Transfer der Maytansinoid-produzierenden Endophyten über den Samen hin zur nächsten Generation denkbar. Diverse Studien konnten einen vertikalen Transfer von bakteriellen und fungalen Endophyten über den Samen hin zur Tochterpflanze zeigen (Frank *et al.*, 2017; Shahzad *et al.*, 2018). Ausserdem gibt es zahlreiche Beispiele für das Vorhandensein von Endophyten innerhalb von oberflächensterilisierten Samen diverser Nutz- und Wildpflanzen (Okunishi *et al.*, 2005; Vega *et al.*, 2005; Ferreira *et al.*, 2008; Kaga *et al.*, 2009; Johnston-Monje & Raizada 2011; Liu *et al.*, 2013; Zawoznik *et al.*, 2014; Alibrandi *et al.*, 2017; Verma *et al.*, 2017; White *et al.*, 2018). Darunter auch in verschiedenen Geweben des Samens wie der Hülle, dem Endosperm und den embryonischen Geweben (Compant *et al.*, 2011; Glassner *et al.*, 2017; Mitter *et al.*, 2017). So konnte z.B. ein vertikaler Transfer von *Paraburkholderia phytofirmans* über die Bestäubung der Blumen, die Samenbildung bis hin zum Keimling (Radikula) gezeigt werden (Mitter *et al.*, 2017). Sowohl bakterielle als auch fungale Endophyten in verschiedenen Samen sind in der Lage, das Pflanzenwachstum bzw. die Keimung zu fördern, die Stress-Toleranz der Wirtspflanze gegenüber biotischen und abiotischen Faktoren zu erhöhen und Sekundärmetaboliten zu produzieren mit antimikrobiellen Eigenschaften (Shahzad *et al.*, 2018). Infolgedessen liegt die Vermutung nahe, dass auch die Maytansinoid-produzierenden Endophyten in *P. verrucosa* in den Samen vorhanden sind und Maytansinoide produzieren, welche wiederum der Pflanze durch den chemischen Schutz der Samen nützen könnten.

4.1.6.4 Keimung

Der erste Entwicklungsschritt der Keimung ist das Aufbrechen des Samens und Herauswachsen der Keimwurzel (Radicula). Die MALDI-Ionenbilder zeigen erhöhte Intensitäten der Maytansinoide in der Radicula und den Kotyledonen im Vergleich zum Endosperm (Abb. 4.1.24). Die Charakteristik der Akkumulation in den Kotyledonen in dieser Keimungsphase, spricht für die Variante der Endospermspeicherung als Typ der Stoffspeicherung, bei denen die Kotyledonen „die Funktion von Saugorganen“ einnehmen, die aktiv Stoffe aus dem Endosperm aufnehmen und damit in den Keimling transferieren (Schopfer und Brennicke 2010). Da in den Kotyledonen bereits vor der Keimung Maytansinoide detektiert wurden (Abb. 4.1.23), ist auch eine Kotyledonenspeicherung möglich, wobei sich beide Stoffspeichertypen hier ergänzen. Da die Radicula aus dem Samen wächst und die Kotyledonen im weiteren Verlauf aus dem Samengewebe herausgezogen werden, konnte ein Übertrag von Maytansinoiden vom Samen auf den Sprössling gezeigt werden. Damit wird die „Beladung“ von Kotyledonen und Keimwurzel innerhalb des Samens von der nächsten Generation mitgenommen. Die hohen Ionenintensitäten deuten erneut auf die ökologische Rolle von Maytansinoiden als chemische Abwehrstoffe hin. Im Vergleich zum ungekeimten Samen (Abb. 4.1.23) bei dem die Maytansinoide im Endosperm und den Kotyledonen mit einheitlicheren Ionenintensitäten detektiert werden, zeigt der keimende Samen eine stärkere Akkumulierung in den herauswachsenden Geweben und reduzierte Intensitäten im Endosperm. Die Ionenbilder lassen einen zusätzlichen Transfer bzw. eine Verlagerung von Maytansinoiden vom Endosperm auf die herauswachsenden Gewebe vermuten.

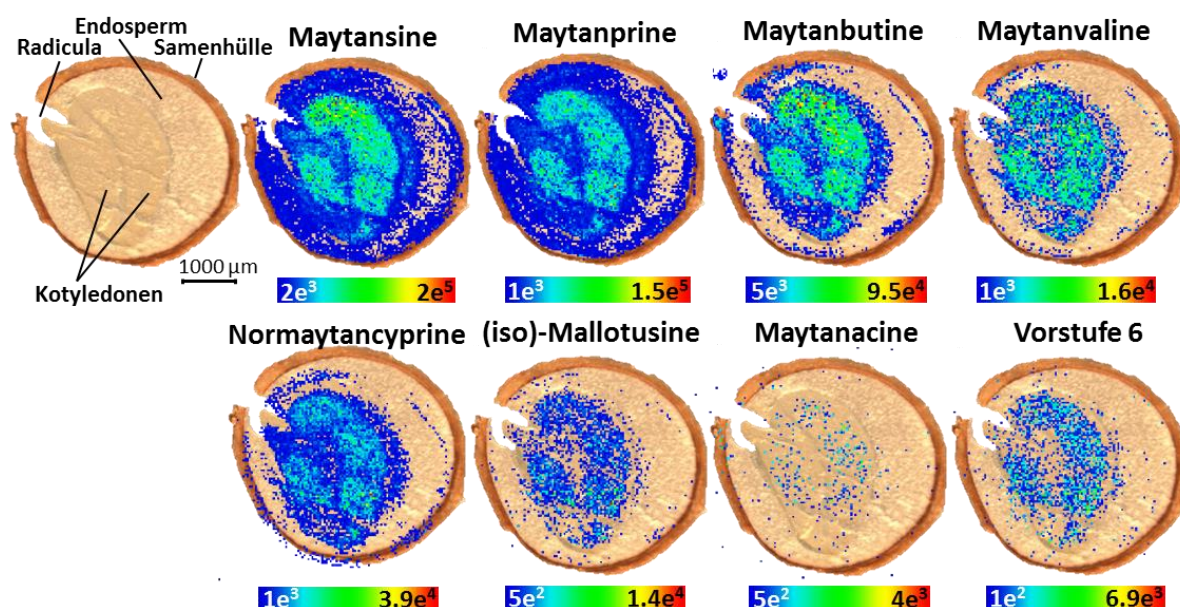


Abb. 4.1.24: MALDI-imaging-HRMS eines keimenden *P. verrucosa* Samens (Scanbereich: 3440x4840 µm; Ortsauflösung: 40 µm). Lokalisierung von Maytansine ($[M+K]^+$ m/z 730.2503), Maytanprine ($[M+K]^+$ m/z 744.2659), Maytanbutine ($[M+K]^+$ m/z 758.2816), Maytanvaline ($[M+K]^+$ m/z 772.2973), Normaytancyprine ($[M+K]^+$ m/z 770.2816), (iso)-Mallotusine ($[M+K]^+$ m/z 784.2973), Maytanacine ($[M+K]^+$ m/z 645.1976) und Maytansine-Vorstufe 6 ($[M+K]^+$ m/z 716.2347) (± 2 ppm).

Abb. 4.1.25 zeigt die MALDI-imaging-HRMS Messungen von Längsschnitten der Keimwurzel. Interessanterweise werden die abundanten Maytansinoide (Maytansine, Maytanprine, Maytanbutine) mit hohen Ionenintensitäten im Randbereich des Cortexes hin zur Rhizosphäre der Radicula detektiert und eine zusätzliche Akkumulierung im Wurzelhaarbereich gemessen. Der Wurzelhaarbereich ist der Ort der Wasser- und Salzaufnahme und der erhöhten Wechselwirkung mit der Umgebung (Grierson & Schiefelbein 2002; Datta *et al.*, 2011). Durch die vielen Wurzelhaare ist die Oberfläche extrem vergrößert (Curl & Truelove 1986; Grierson & Schiefelbein 2002; Datta *et al.*, 2011). Dadurch ist dieser Bereich einem zusätzlichen Risiko von Pflanzenpathogenen wie Bakterien und Pilzen ausgesetzt. Das in diesem Bereich eine Akkumulierung von Maytansinoiden zu detektieren ist, legt erneut den Schluss nahe, dass die Stoffe mit ihrer antibakteriellen und antimykotischen Wirkung (Cassady *et al.*, 2004) den Keimling chemisch beschützen.

In Verbindung mit der Kenntnis, dass die endophytische Gemeinschaft der Wurzeln für die Biosynthese von Maytansine in *P. verrucosa* verantwortlich ist (Kusari *et al.*, 2014a), kann vermutet werden, dass aufgrund der hohen Ionenintensitäten in dem Wurzelhaarbereich des Keimlings eine erneute Biosynthese stattfindet. Dies würde einen vertikalen Transfer der Endophyten von der Mutterpflanze über den Samen hin zum Keimling bedeuten. Werden sowohl die Größen/Volumina als auch die Ionenintensitäten von Samen und Keimwurzel bzw. Keimling verglichen, ist die Schlussfolgerung, dass eine Synthese von Maytansinoiden im Keimling stattfindet naheliegend. Eine einmalige Beladung des Samens bzw. des Keimlings durch die Samenbildung rechtfertigt nicht die hohen Intensitäten mit denen die Maytansinoide in den verschiedenen Keimlingsgeweben detektiert werden.

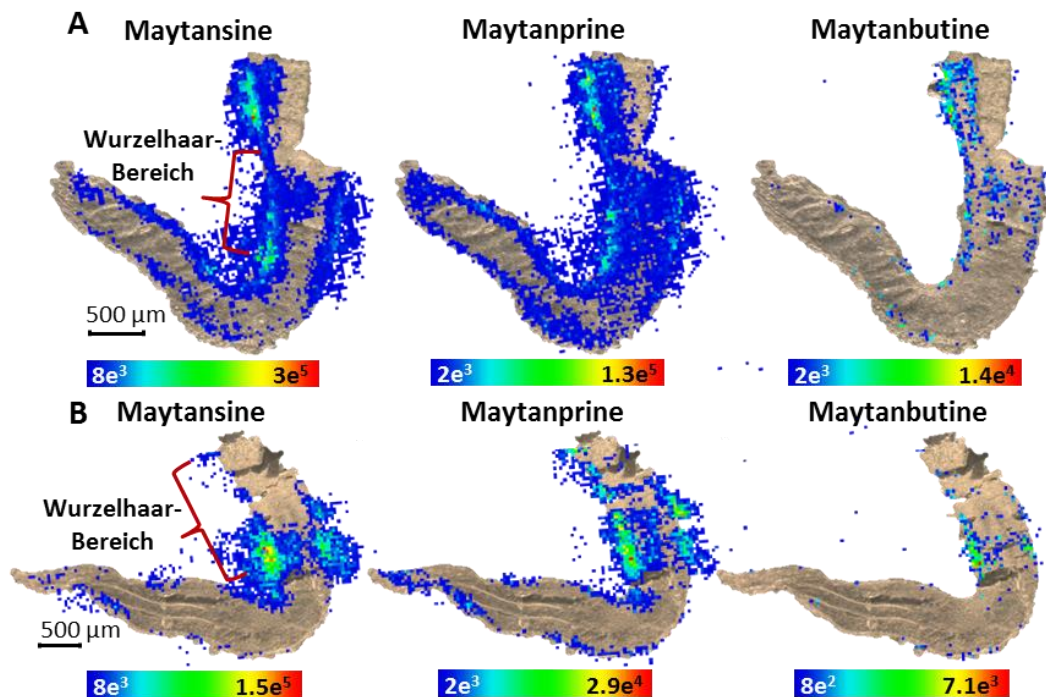


Abb. 4.1.25: MALDI-imaging-HRMS von *P. verrucosa* Radicula Längsschnitten ((A) Scanbereich: 4170x4260 µm; Ortsauflösung: 30 µm; (B) Scanbereich: 5160x3400 µm; Ortsauflösung: 40 µm). Lokalisierung von Maytansine ([M+K]⁺ *m/z* 730.2503), Maytanprine ([M+K]⁺ *m/z* 744.2659) und Maytanbutine ([M+K]⁺ *m/z* 758.2816) (± 2 ppm).

Die Lokalisierung der Maytansinoide innerhalb der drei Pflanzengewebe des Sprosslings mit Keimblättern wurde ebenfalls mittels MALDI-imaging-HRMS untersucht (Abb. 4.1.26). In allen Kompartimenten werden die Stoffe detektiert, was einen hohen Verteilungsgrad zeigt und für einen möglichen Transport innerhalb der Pflanze spricht. Die höchsten Intensitäten in diesem Entwicklungsschritt werden in den Randbereichen der Kotyledonen (unterhalb der Cuticula im Mesophyll) und des Hypokotyls (Cortex) gemessen. In der Radicula werden die Maytansinoide hauptsächlich im Zentralzylinder detektiert.

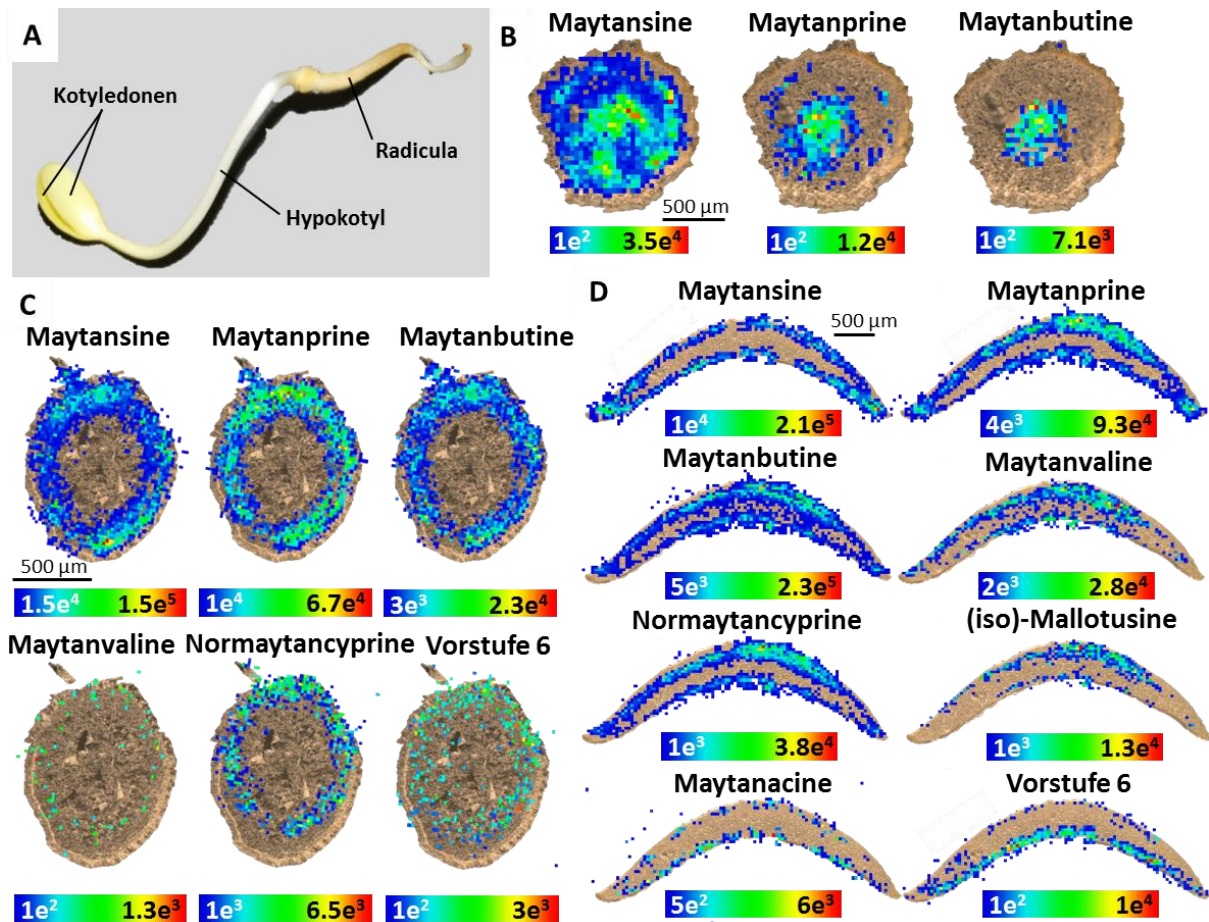


Abb. 4.1.26: MALDI-imaging-HRMS eines *P. verrucosa* Sprossling. Optisches Bild des Sprosslings (A), MALDI-imaging-HRMS von der Radicula ((B) Scanbereich: 2440x2360 μm ; Ortsauflösung: 40 μm), dem Hypokotyl ((C) Scanbereich: 2400x2375 μm ; Ortsauflösung: 25 μm) und den Kotyledonen ((D) Scanbereich: 5320x2960 μm ; Ortsauflösung: 40 μm). Lokalisierung von Maytansine ([M+K]⁺ m/z 730.2503), Maytanprine ([M+K]⁺ m/z 744.2659), Maytanbutine ([M+K]⁺ m/z 758.2816), Maytanvaline ([M+K]⁺ m/z 772.2973), Normaytancyprine ([M+K]⁺ m/z 770.2816), (iso)-Mallotusine ([M+K]⁺ m/z 784.2973), Maytanacine ([M+K]⁺ m/z 645.1976) und Maytansine-Vorstufe 6 ([M+K]⁺ m/z 716.2347) ($\pm$ 2 ppm).

Nach der Keimung und dem Herauswachsen des Sprosslings aus dem Samen, bleibt der Samen zurück bzw. fällt von den Keimblättern ab. Abb. 4.1.27 zeigt die MALDI-imaging Untersuchung des Samens nach erfolgter Keimung. Die Ionenbilder der Maytansinoide innerhalb des Samens nach der Keimung weisen im Vergleich zum ungekeimten Samen (Abb. 4.1.23) deutlich reduzierte Intensitäten im Endosperm auf.

Die Kotyledonen sind mit dem Sprössling herausgewachsen und daher nicht mehr vorhanden. Grundsätzlich ist bekannt, dass verschiedene Stoffe wie Zucker und Proteine vom Endosperm auf den Keimling übertragen werden bzw. der Keimling von den Ressourcen des Endosperms zehrt (Fincher 1989; Leubner-Metzger *et al.* 1995; Bewley 1997; Schopfer und Brennicke 2010; Yan *et al.*, 2014). Dabei handelt es sich meistens um Stoffe die für den Primärstoffwechsel benötigt werden. So werden z.B. häufig Enzyme zur Aufspaltung des Zuckers freigesetzt und diese aktiv auf die Kotyledonen übertragen. Inwieweit ein „aktiver“ Transport von Maytansinoiden vom Endosperm des Samens auf den herauswachsenden Keimling stattfindet kann nicht abschließend gezeigt werden. Die reduzierten Intensitäten weisen jedoch deutlich auf einen möglichen Transfer von Maytansinoiden vom Endosperm des Samens auf den keimenden Sprössling hin.

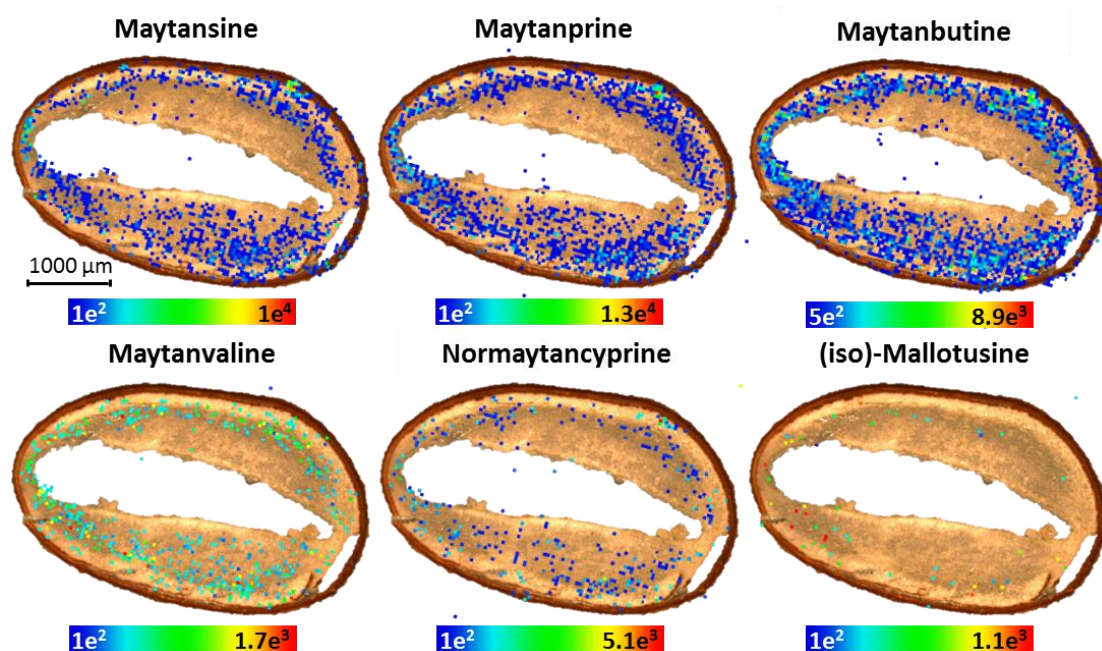


Abb. 4.1.27: MALDI-imaging-HRMS eines *P. verrucosa* Samens nach erfolgter Keimung (Scanbereich: 5680x3640 µm; Ortsauflösung: 40 µm). Lokalisierung von Maytansine ([M+K]⁺ *m/z* 730.2503), Maytanprine ([M+K]⁺ *m/z* 744.2659), Maytanbutine ([M+K]⁺ *m/z* 758.2816), Maytanvaline ([M+K]⁺ *m/z* 772.2973), Normaytancyprine ([M+K]⁺ *m/z* 770.2816) und (iso)-Mallotusine ([M+K]⁺ *m/z* 784.2973) (± 2 ppm).

Der nächste Entwicklungsschritt der Keimung ist die Ausbildung der ersten Laubblätter. Abb. 4.1.28 zeigt die MALDI-imaging-HRMS Ergebnisse dieser Untersuchung. Im Gegensatz zum vorherigen Keimungsstadium sind die Intensitäten in den Kotyledonen stark reduziert. Dagegen werden nun die höchsten Ionenintensitäten im Cortex des Hypokotyls detektiert. Ein Transfer von Maytansinoiden von den Kotyledonen in das Hypokotyl kann vermutet werden. Zum einen aufgrund der Verschiebung der Intensitätsverhältnisse der Maytansinoide zum vorherigen Keimungsabschnitt und zum anderen aufgrund der sich darstellenden Ionenbilder der Kotyledonen. Nur in den Blattspitzen, den vom Leitbündel entferntesten Bereichen, können die Zielmoleküle noch detektiert werden. In der Keimwurzel werden die Zielmoleküle sowohl im Cortextbereich als auch im

Zentralzylinder gemessen. Da die Maytansinoide in den mit dem Stofftransport assoziierten Geweben gefunden werden, zeigt dies erneut einen möglichen Transport zwischen Radicula und Hypokotyl während der Keimung. In den Laubblättern konnten keine Maytansinoide detektiert werden. Die Ergebnisse deuten auf eine Verschiebung bzw. Akkumulation in den empfindlichen Geweben wie Radicula und Hypokotyl, welche aufgrund des Bodenkontaktes am ehesten biotischen Gefahren ausgesetzt sind.

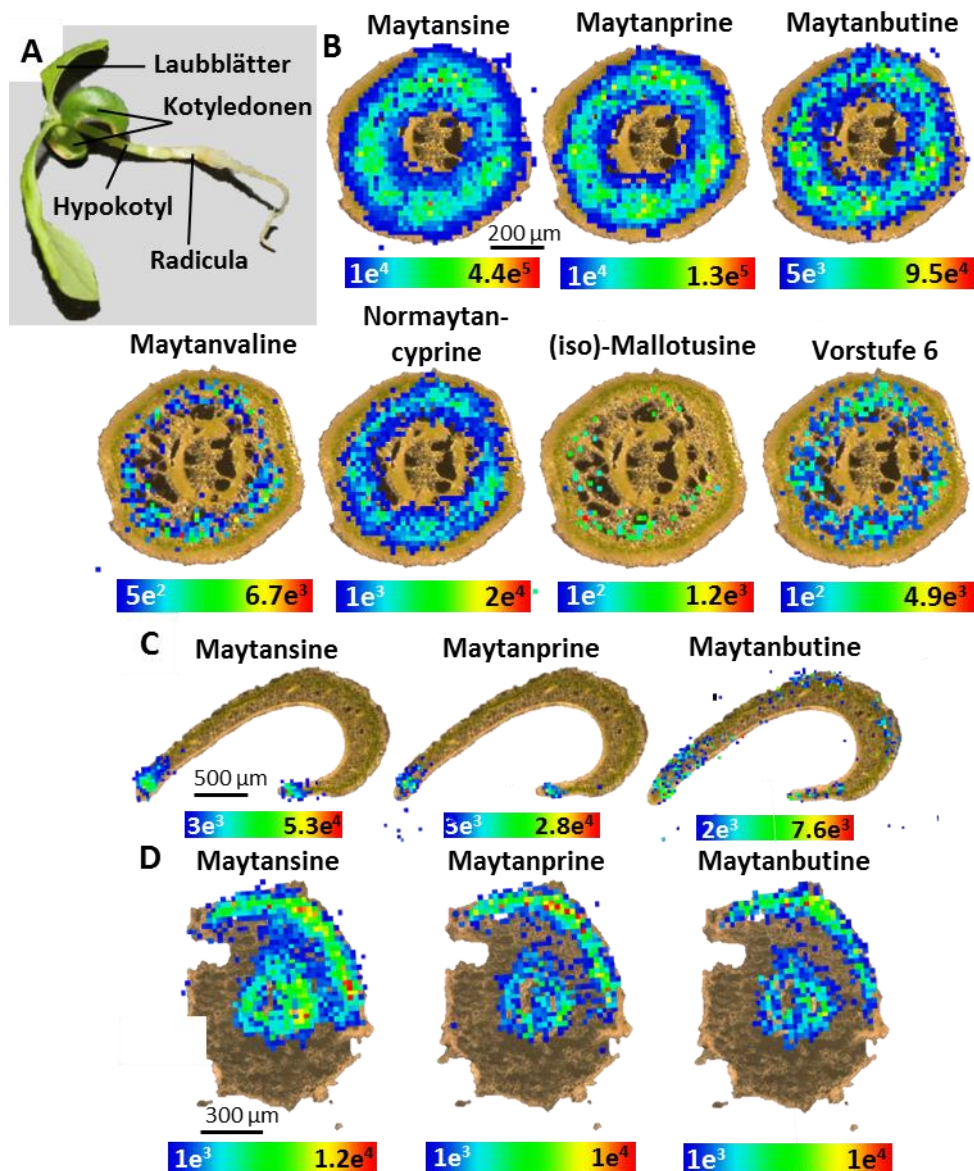


Abb. 4.1.28: MALDI-imaging-HRMS eines *P. verrucosa* Sprössling mit ersten Laubblättern. Optisches Bild des Sprösslings (A), MALDI-Imaging-HRMS vom Hypokotyl ((B) Scanbereich: 1875x1600 μm ; Ortsauflösung: 25 μm), den Kotyledonen ((C) Scanbereich: 3420x2010 μm ; Ortsauflösung: 30 μm) und der Radicula ((D) Scanbereich: 2450x2075 μm ; Ortsauflösung: 25 μm). Lokalisierung von Maytansine ([M+K]⁺; m/z 730.2503), Maytanprine ([M+K]⁺ m/z 744.2659), Maytanbutine ([M+K]⁺ m/z 758.2816), Maytanvaline ([M+K]⁺ m/z 772.2973), Normaytancyprine ([M+K]⁺ m/z 770.2816), (iso)-Mallotusine ([M+K]⁺ m/z 784.2973) und Maytansine-Vorstufe 6 ([M+K]⁺ m/z 716.2347) ($\pm$ 2 ppm). Laubblätter ohne Maytansinoide.

4.1.6.5 Zusammenfassung der Untersuchung der Keimung von *P. verrucosa*

Im Folgenden wird der untersuchte Keimungsprozess von *P. verrucosa* in Hinblick auf die örtliche Verteilung von Maytansinoiden und die Veränderungen im zeitlichen Verlauf, einen möglichen Transfer innerhalb der Pflanze bzw. zwischen verschiedenen Geweben und die ökologische Bedeutung der Zielmoleküle, rekapitulierend erörtert. Abb. 4.1.29 zeigt die Zusammenfassung der MALDI-imaging-HRMS Ergebnisse beispielhaft an den Ionenbildern des Hauptmetaboliten Maytansine.

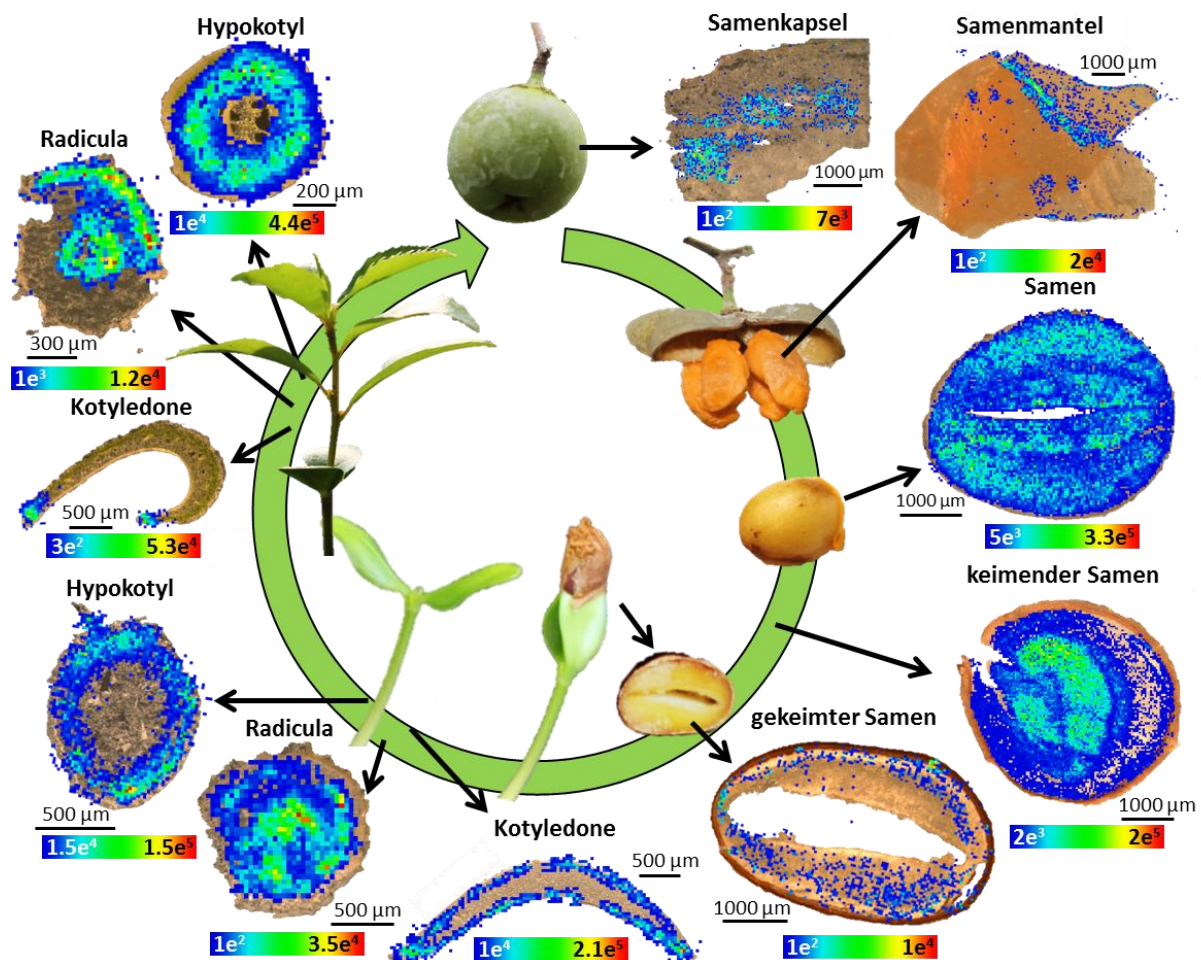


Abb. 4.1.29: Zusammenfassung der MALDI-imaging-HRMS Ergebnisse der Untersuchung des Keimungsprozesses von *P. verrucosa*. Darstellung der örtlichen Verteilung von Maytansine ($[M+K]^+$; m/z 730.2503, ± 2 ppm) in verschiedenen Geweben der untersuchten Keimungsstadien.

Die Samen entwickeln sich nach erfolgter Bestäubung der Blüten aus der Samenanlage in der geschlossenen Samenkapsel, welche den Samen während der Entwicklung physischen Schutz bietet. Sowohl die MALDI-imaging-HRMS Messungen als auch die Quantifizierung mittels HPLC-HRMS zeigten die Präsenz von Maytansinoiden in den Samenkapseln. Damit schützen die Samenkapseln den Samen auch chemisch vor biotischen Gefahren wie Pflanzenpathogenen. Nach einiger Zeit (1-3 Monate) öffnen sich die Samenkapseln. Der Samen ist dabei umhüllt vom Samenmantel (Arillus). Dieser beinhaltet ebenfalls Maytansinoide. Im Samen selber wurden hohe Ionenintensitäten der Zielmoleküle detektiert. Diese sind sowohl im Endosperm als auch in den Kotyledonen verteilt. Die hohen Gehalte deuten erneut auf die ökologische Rolle von Maytansinoiden als chemische Schutzstoffe während der

Keimung hin. Bei beginnender Keimung werden die Maytansinoide akkumuliert in den Kotyledonen und der herauswachsenden Keimwurzel detektiert. Dagegen sind die Intensitäten im Endosperm reduziert. Der Transfer vom Endosperm auf die herauswachsenden Gewebe bzw. Kotyledonen ist ein bekanntes Phänomen (Schopfer und Brennicke 2010). Dies wird ebenfalls durch die Messung des zurückbleibenden Samens nach der Keimung untermauert. Im Vergleich sind die Intensitäten ca. um das 100-fache reduziert.

Im entstandenen Keimling werden die Maytansinoide im Hypokotyl, der Radicula und den Kotyledonen detektiert. Die Kotyledonen haben ihren Maytansinoid-Gehalt bereits im Samen erhalten. Interessanterweise wird jedoch im Vergleich nun eine Akkumulierung im Randbereich kurz unter der Blatt-Epidermis (Cuticula) und keine breite Verteilung wie im inneren des Samens gemessen. Im Hypokotyl sind die Maytansinoide im Cortex akkumuliert. In der Radicula werden die Zielmoleküle sowohl im Leitbündel als auch im Randbereich (Cortex) detektiert. Der Trend der Akkumulierung im Hypokotyl und der Radicula und der Reduzierung in den Kotyledonen wird im weiteren Entwicklungsverlauf verstärkt. Im Sprössling mit ausgebildeten Laubblättern können die Maytansinoide in den Kotyledonen nur noch in den Blattspitzen detektiert werden. Die Ionenbilder deuten im zeitlichen Verlauf auf einen Transport von den Kotyledonen auf das Hypokotyl hin. Nur am vom Leitbündel der Kotyledonen entferntesten Punkt (Blattspitzen) können noch Maytansinoide detektiert werden. Die Übertragung des Speichermaterials (hier Maytansinoide) von den Kotyledonen auf die wachsenden Pflanzenorgane wie Hypokotyl und Radicula sind bekannte Mechanismen (Schopfer und Brennicke 2010). In den Laubblättern können keine Zielmoleküle gefunden werden. Im zeitlichen Verlauf scheinen die Maytansinoide von den „unwichtigeren“ Kompartimenten wegtransportiert zu werden und auf die für das Überleben wichtigeren Pflanzengewebe wie das Hypokotyl und die Radicula konzentriert. Die Akkumulierung im Cortex von Hypokotyl und Radicula deuten erneut auf die ökologische Bedeutung von Maytansinoiden als Abwehrstoffe vor Bakterien, Pilzen und Fraßfeinden hin. Gerade im Bodenbereich sind diese biotischen Gefahren erhöht (Curl & Truelove 1986; Berendsen *et al.*, 2012; Bakker *et al.*, 2013; Mendes *et al.*, 2013). Ein bisher ungeklärter Aspekt ist ein möglicher vertikaler Transfer der zur Maytansine-Biosynthese fähigen endophytischen Gemeinschaft (Kusari *et al.*, 2014a) von der Mutterpflanze über den Samen auf die nächste Generation. Die Untersuchungen deuten jedoch aufgrund der hohen Gehalte und der Nichtnachweisbarkeit eines Transportes von Mutterpflanze auf den Samen, auf eine Maytansinoid-Produktion innerhalb des Samens hin. Außerdem ist im Vergleich von Ionenintensitäten und Volumina bzw. Größe der Pflanzengewebe zwischen Samen und Keimling eine Maytansinoid-Produktion im Keimling wahrscheinlich und kein alleiniger Übertrag aus dem Samen. Die endophytische Gemeinschaft könnte übertragen worden sein und sich wie bei der Mutterpflanze in den Wurzeln (Radicula) etabliert haben, was eine Biosynthese im Keimling erklären würde. Der mögliche vertikale Transfer der zur Maytansinoid-Biosynthese fähigen endophytischen Gemeinschaft von der Mutterpflanze auf die nächste Generation ist offensichtlich komplex und von diversen unbekannten Faktoren abhängig. Somit wird nicht jeder Übertrag auf die sich entwickelnden Keimlinge erfolgreich sein. Dies würde ebenfalls die Variabilität der Anwesenheit von Maytansinoiden in der gleichen Spezies erklären.

4.2. Bakterieller Endophyt *Serratia marcescens* MSRBB2

Während der Untersuchung von *Maytenus serrata* (Bambui, Kamerun 2014) auf Maytansinoide, wurden neben der endophytischen Gemeinschaft, einzelne Endophyten aus dem frischen Pflanzenmaterial isoliert. Dabei fiel ein Bakterium mit einer starken roten Pigment-Produktion auf und wurde weitergehend untersucht. Die Identifizierung 16s rDNS-Sequenzierung ergab, dass es sich bei dem Bakterium um *Serratia marcescens* handelt (interner Code: MSRBB2). In den Folgenden Kapiteln werden die einzelnen Studien geschildert, darunter die Strukturaufklärung des Sekundärmetaboliten-Spektrums, Markierungsstudien mit stabilen Isotopenmarkierten Vorläufer-Molekülen zur Untersuchung der Biosynthese von Prodigininen und Serratamoliden sowie die chemische Interaktion von *S. marcescens* mit koexistierenden Pilzendophyten. Dabei lag der Fokus bei der Aufklärung der ökologischen Bedeutung der Prodiginine und Serratamolide für den Produzenten *S. marcescens* in der Interaktion. Zur Aufklärung wurden vor allem MALDI-imaging-HRMS Messungen genutzt. Zuletzt wurde eine Methode entwickelt, die stabile Isotopenmarkierung zur Untersuchung von Biosynthesewegen von mikrobiellen Sekundärmetaboliten auf Agar mit direkter Visualisierung *via* MALDI-imaging-HRMS ermöglicht.

4.2.1 Aufklärung des Sekundärmetaboliten-Spektrums von *S. marcescens* MSRBB2

Zu Beginn der Studie des isolierten bakteriellen Endophyten *S. marcescens* MSRBB2 wurde das Sekundärmetaboliten-Spektrum mittels HPLC-HRMS untersucht. Mit Hilfe von HRMSⁿ-Experimenten konnten 33 Verbindungen, darunter 7 Prodiginine und 26 Serratamolide, identifiziert werden. Neben dem bekannten roten Pigment Prodigiosin konnten sechs weitere Prodiginine (Abb. 4.2.1), Alkylketten-Derivate (kürzere (C₃-C₄, **1-2**) oder längere (C₆-C₉, **4-7**) Alkylketten an der C3-Position des C-Ringes) von Prodigiosin (C₅, **3**), anhand ihrer monoisotopischen Massen detektiert werden. Die HPLC-HRMS-Auswertung zeigte Prodigiosin eindeutig als Hauptmetabolit der Stoffgruppe (Anhang, Abb. S1).

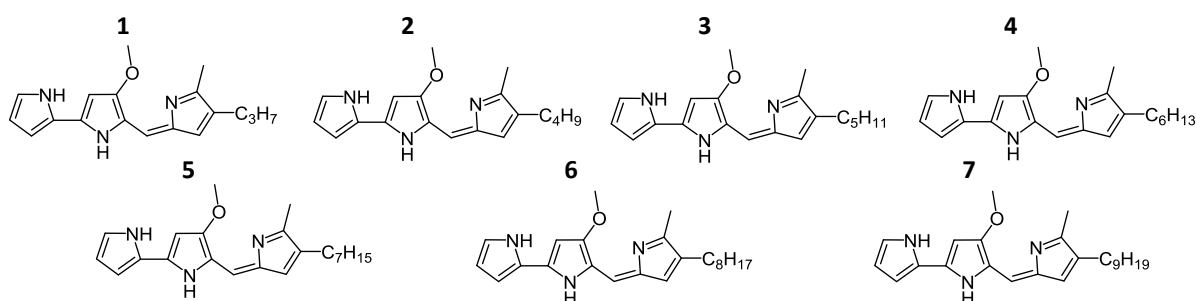


Abb. 4.2.1: Von *S. marcescens* MSRBB2 produzierte Prodiginine **1-7** (Prodigiosin **3**).

Die verschiedenen Strukturanaloga konnten durch ihre charakteristischen Fragmentierungsmuster in MSⁿ-Experimenten eindeutig identifiziert werden. Abb. 4.2.2 zeigt das MS²-Spektrum von Prodigiosin. Das Hauptfragment m/z 309 bildet die Abspaltung der Methylgruppe der Methoxygruppe. Bei der Abspaltung verlässt die Methyl-Gruppe das Mutterion als Radikal. Dabei unterliegt das resultierende Fragment wahrscheinlich einer Umlagerungsreaktion, welche das Fragment stabilisiert (Chen *et al.*, 2008). Die weiteren Fragmentierungen dieses Ions ist die Spaltung vom C-Ring mitsamt der Alkylkette vom Bipyrrrol und liefert m/z 149. Weitere Abspaltung von -CH₃ mit anschließender Zyklisierung ergibt m/z 134. Die Abspaltung der Alkylkette vom Hauptfragment m/z 309 liefert das Ion m/z 252, welches für alle Prodiginine identisch ist. Ebenfalls identisch für alle Derivate ist das Fragment m/z 175, welches durch Abspaltung des C-Ringes gebildet wird. Vom Mutterion (m/z 324) wird durch Neutralteilchenverlust von Methanol m/z 292 gebildet. Im Anhang sind weitere MSⁿ-Spektren sowie die Fragmentierungspfade für alle identifizierten Prodiginine hinterlegt (Abb. S2-S21). Obwohl *S. marcescens* ein intensiv studiertes Bakterium ist, berichten wir nach bestem Wissen zum ersten Mal von der Biosynthese der Alkylketten-Derivate von Prodigiosin durch einen *S. marcescens* Strang. Zuvor wurden diese Prodiginine nur in marinen Bakterien wie *Zooshikella rubidus* (Lee *et al.*, 2011), *Pseudoalteromonas rubra* (Fehér *et al.*, 2008) und *Hahella chejuensis* (Kim *et al.*, 2007 & 2008) berichtet.

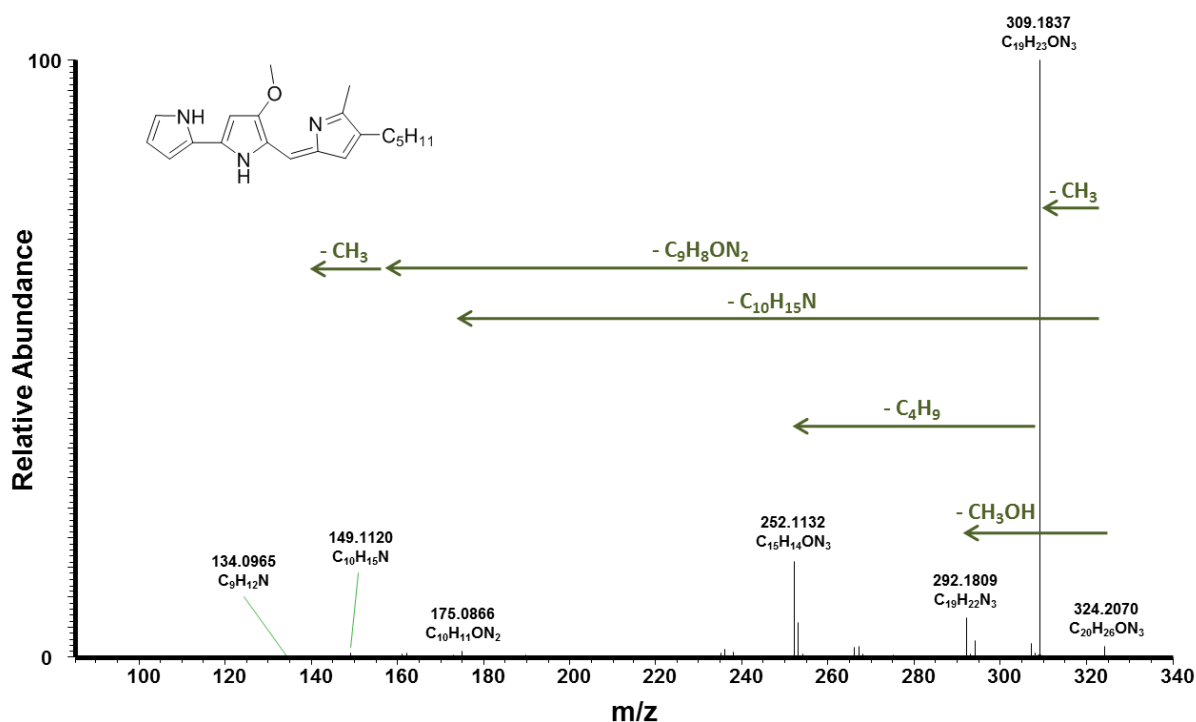
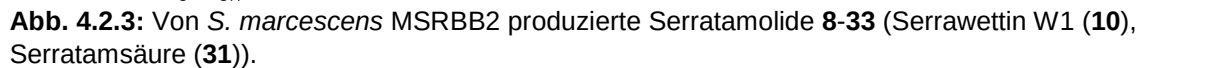


Abb. 4.2.2: HPLC-HRMS²-Spektrum von Prodigiosin (3) ([M+H]⁺ m/z 324).

Neben den Prodigininen produzierte *S. marcescens* MSRBB2 eine Vielzahl von Serratamoliden (Abb. 4.2.3, **8-33**). Dabei wird die bekannte Verbindung Serrawettin W1 (**10**) (Wasserman *et al.*, 1962) als Hauptmetabolit dieser Naturstoffklasse produziert (Chromatogramme im Anhang, Abb. S22-S26).



die Ionen m/z 276, 258, 240 (C_{10} -Seitenkette) als auch m/z 304, 286, 268 (C_{12} -Seitenkette). Das Serratamolid **17** ($C_{10}+C_{12:1}$) mit einer Doppelbindung liefert dementsprechend die Ionen m/z 276, 258, 240 (C_{10} -Seitenkette) und m/z 302, 284, 266 ($C_{12:1}$ -Seitenkette).

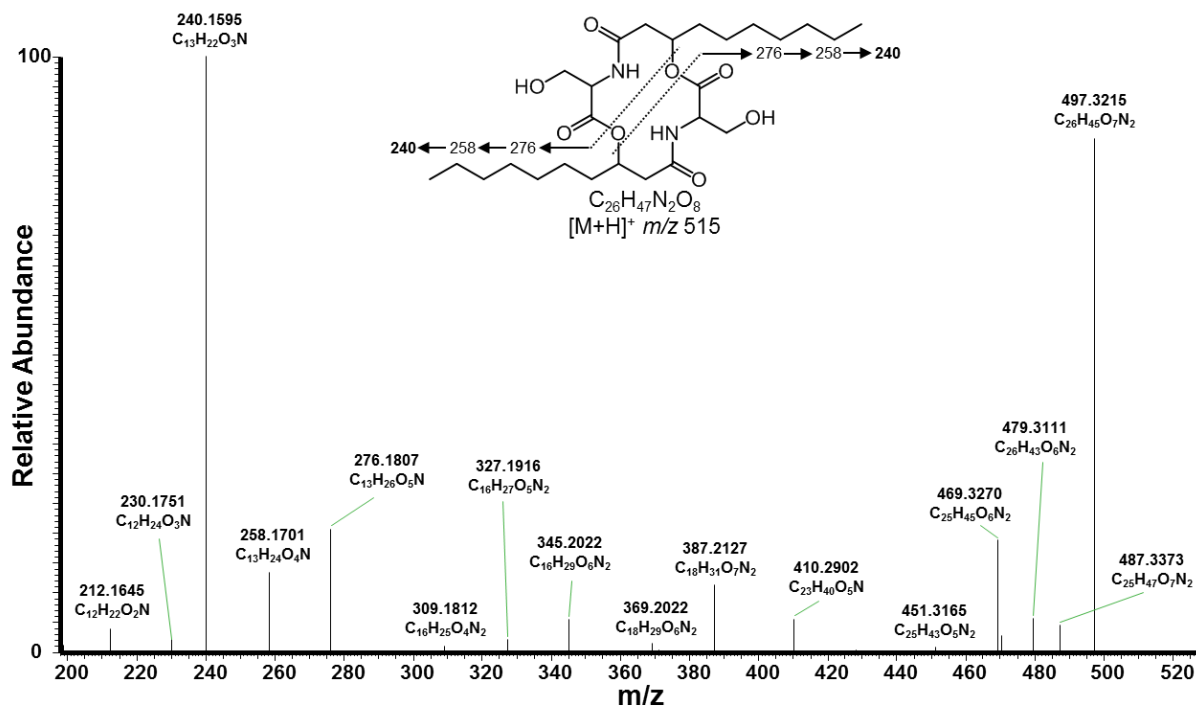


Abb. 4.2.4: HPLC-HRMS²-Spektrum von Serrawettin W1 (**10**).

Neben weiteren bekannten Serratamoliden (**8-14**, **17**, **21**, **23**) (Dwivedi *et al.*, 2008, Thies *et al.*, 2014) konnten neue Derivate mit einer zusätzlichen Doppelbindung in der Alkylseitenkette (**15**, **16**, **18**, **19**), offenen Ringstrukturen (**20**, **22**, **24-27**) und offene Ringstrukturen mit einer zusätzlichen Doppelbindung (**28-30**) mittels charakteristischer MS²-Spektren identifiziert und Fragmentierungswege erstellt werden (Anhang Abb. S28-S79). Die Position der Doppelbindung in der Alkylkette kann nicht über MSⁿ-Experimente festgestellt werden, wird jedoch aus Biosynthese-Sicht analog zur bekannten Verbindung **17** (Dwivedi *et al.*, 2008) an Position C5 vermutet. Zusätzlich konnten drei Serratamolid-„Monomere“ (**31-33**) der intensivsten zyklischen Serratamolide identifiziert werden. Das Monomer von Serrawettin W1 ($C_{10}+C_{10}$, **10**) ist die Serratamsäure (C_{10} , **31**) (Cartwright 1957). Korrespondierend zur cyclischen Verbindung **14** ($C_{12}+C_{12}$) wird ebenfalls ein Serratamolid-Monomer mit einer C_{12} Seitenkette detektiert (**32**). Passend zur Verbindung **17** ($C_{12}+C_{12:1}$) kann ein Monomer mit einer Doppelbindung ($C_{12:1}$, **33**) identifiziert werden. Durch preparative Chromatographie konnten die Hauptmetaboliten Prodigiosin (**3**), Serrawettin W1 (**10**) und Serratamsäure (**31**) aufgereinigt und die Strukturen mittels 1D- und 2D-NMR bestätigt werden (Abb. S80-S90) (Song *et al.*, 2006, Dwivedi *et al.*, 2008).

4.2.2 Markierungsstudien mit stabilen isotopenmarkierten Vorläufer-Molekülen zur Untersuchung der Biosynthese von Prodigininen und Serratamoliden

4.2.2.1 Prodiginine

Nachdem Prodigiosin und die Alkylketten-Derivate von Prodigiosin (C3-Position) mittels MSⁿ Experimenten eindeutig identifiziert werden konnten, wurde untersucht ob alle produzierten Prodiginine einen gemeinsamen Biosyntheseweg aufweisen und aus den gleichen Vorläufer-Molekülen synthetisiert werden. Um diese Frage zu klären, wurden Markierungsstudien mit *S. marcescens* MSRBB2 in flüssigem Nährmedium mit stabilen isotopenmarkierten Vorläufer-Molekülen durchgeführt. In der Vergangenheit haben sich bereits Markierungsstudien, z.B. mit ¹³C-, ¹⁵N- und ¹⁴C-markierten Substanzen, zur Untersuchung der Biosynthese verschiedener Prodiginine bewährt (Gerber *et al.*, 1978; Hubbard *et al.*, 1950; Shrimpton *et al.*, 1963; Quadri *et al.*, 1971; Cushley *et al.*, 1971; Wasserman *et al.*, 1973).

Um die Biosynthese der Alkylketten-Derivate aufzuklären wurden die Aminosäuren [1-¹³C]-L-Prolin, [Methyl-D₃]-L-Methionin, [¹⁵N]-L-Serin sowie ¹⁵NH₄Cl und [1,2-¹³C₂]-Natriumacetat verwendet. Aufgrund der hohen Massenauflösung kann der Einbau von ¹⁵N von der natürlichen ¹³C-monoisotopischen Masse unterschieden werden. Der Massenunterschied zwischen dem Einbau eines ¹⁵N- zu ¹³C-Atoms beträgt 0.00632 Da (Audi und Wapastra 1993 & 1995), wogegen die eingestellte Fehlerbreite von ± 2 ppm für Prodigiosin nur ± 0.00065 Da beträgt. Um hohe Einbauraten zu erzielen wurden zunächst verschiedene Minimalmedien in einem OSMAC-Versuch (Bode *et al.*, 2002) getestet. Jedoch zeigten die Fermentationen mit *S. marcescens* MSRBB2 keine Pigmentbildung in den ausgewählten Nährmedien (M6-, Koser-Citrat- und Simmons-Citrat-Medium, leichte Pigmentproduktion in M9-Medium). Daher wurde das ursprüngliche komplexe Nährmedium (NB) mit bidest. Wasser auf die Hälfte bzw. ein Viertel der eigentlichen Konzentration verdünnt. Dabei zeigten sich folgende Abhängigkeiten: Je nährstoffreicher das Medium war, desto höher war die Pigmentproduktion und desto kleiner war die Einbaurate der markierten Vorstufen und umgekehrt.

Durch Auswertung der HPLC-HRMS-Messungen der Extrakte der verschiedenen Markierungsversuche konnte der Einbau der Vorläufer-Moleküle durch die charakteristische Massenverschiebung der eingebauten stabilen Isotope in Massenspektren gezeigt werden. Die Massenspektren der verschiedenen Markierungen der Prodiginine sowie zum Vergleich der unmarkierten Verbindungen sind im Anhang hinterlegt (Abb. S91-S115). Abb. 4.2.5 zeigt beispielhaft die Massenspektren von Prodigiosin mit inkorporiertem [1-¹³C]-L-Prolin, [Methyl-D₃]-L-Methionin, [¹⁵N]-L-Serin und ¹⁵NH₄Cl.

Neben der Identifizierung des Einbaus mittels monoisotopischer Massen wurden MS/MS-Untersuchungen der markierten Prodiginine durchgeführt, die zusätzlich die Position des Einbaus durch charakteristische Fragmentierung bestätigen. Alle MS/MS-Spektren sowie die zugehörigen Fragmentierungswege der markierten Verbindungen sind im Anhang hinterlegt (Abb. S116-S182).

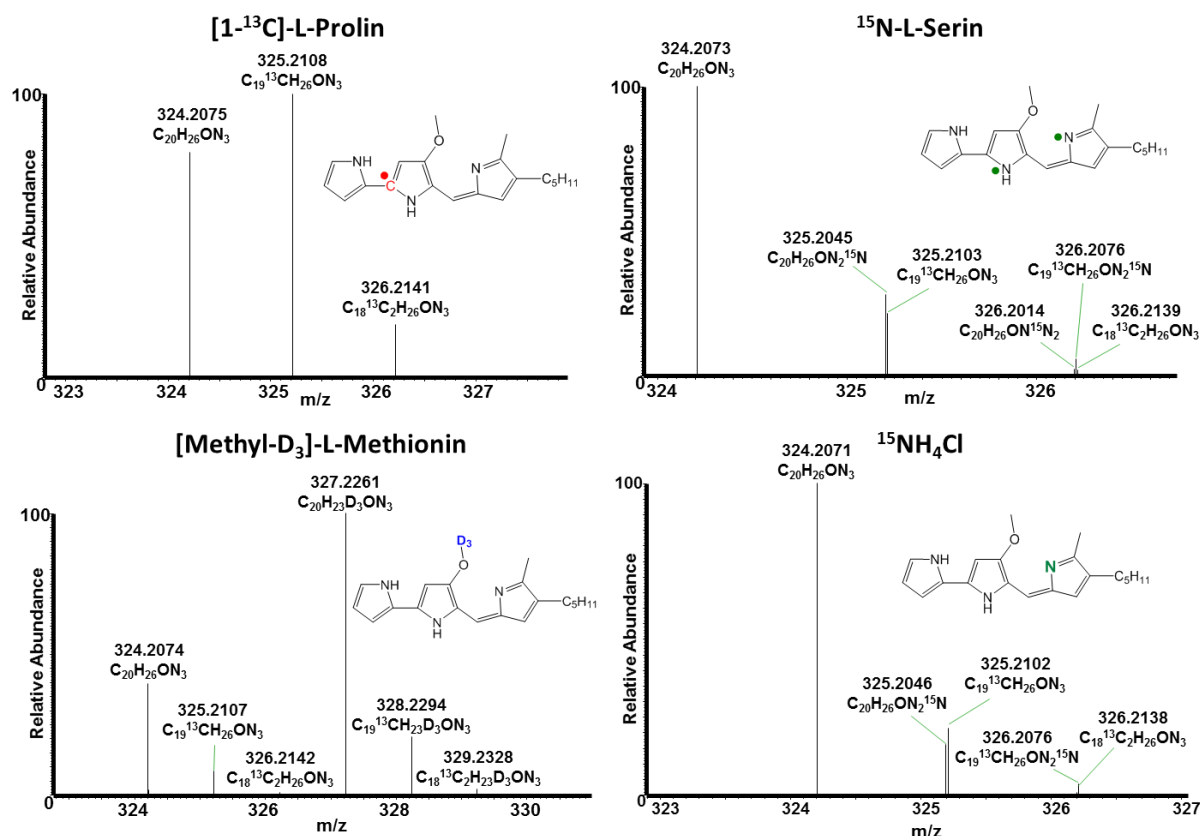


Abb. 4.2.5: MS-Spektren von Prodigiosin mit inkorporierten stabilen isotoopenmarkierten Vorläufer-Molekülen (¹⁵NH₄Cl, [¹⁵N]-L-Serin, [1-¹³C]-L-Prolin, [Methyl-D₃]-L-Methionin).

Abb. 4.2.6 zeigt die Zusammenfassung der Markierungsstudien der von *S. marcescens* MSRBB2 produzierten Prodiginine. Durch den Nachweis des Einbaus der verschiedenen markierten Vorläufer-Moleküle in alle Prodiginine, konnte gezeigt werden, dass die Alkylketten-Derivate von Prodigiosin in *S. marcescens* MSRBB2 einen gemeinsamen Biosyntheseweg aufweisen. Im Folgenden wird die Biosynthese sowie der Einbau der Vorläufermoleküle am Beispiel von Prodigiosin (**3**) erläutert.

Das Tripyrrol wird aus der Kondensationsreaktion des Monopyrrols MAP (2-Methyl-3-n-Amylpyrrol) und dem Bipyrrrol MBC (4-Methoxy-2,2'-Bipyrrrol-5-Carbaldehyd) gebildet. Aufgrund der unterschiedlich langen Alkylketten der Prodiginine (C₃-C₉) an der C3-Position vom C-Ring, müssen sich auch die Monopyrrole bereits in den Alkylketten unterscheiden. Für die verschiedenen Prodiginine gibt es daher analoge MAP-Derivate. Dies zeigt eine geringe Substratspezifität für die beteiligten Enzyme. Vor allem das Enzym für die Kondensation von MBC und verschiedenen MAP-Homologen (PigC) veranschaulicht die bekannte geringe Substratspezifität (Williamson *et al.*, 2006; Klein *et al.*, 2017). Die anfänglichen Vorläufer von MAP (z.B. 2-Octenal für Prodigiosin) werden durch Enzyme des Fettsäure-Biosyntheseweges oder durch Autooxidation von ungesättigten Fettsäuren gebildet (Williamson *et al.*, 2006).

Sowohl der Einbau von ¹⁵NH₄Cl als auch [¹⁵N]-L-Serin in MAP konnte gezeigt werden. Dabei ist anzunehmen, dass vor dem Einbau von [¹⁵N]-L-Serin die bekannte Umwandlung zu Glycin stattfindet (Grundy *et al.*, 2002), analog früherer Studien

(Wasserman *et al.*, 1973). [^{15}N]-L-Serin wird zusätzlich einmalig in das Bipyrrrol MBC eingebaut und liefert den Stickstoff des B-Ringes der Prodiginine. Das Bipyrrrol MBC ist im Gegensatz zu MAP für alle Prodiginine ein identisches Intermediat. Der Einbau der D_3 -Gruppe von [Methyl- D_3]-L-Methionin zeigt, dass die Methylgruppe der Methoxy-Gruppe der Prodiginine von L-Methionin stammt. L-Prolin ist die Grundsubstanz aus der MBC und damit der A-Ring der Prodiginine synthetisiert wird, was durch den Einbau der markierten Aminosäure ([$1\text{-}^{13}\text{C}$]-L-Prolin) gezeigt werden konnte.

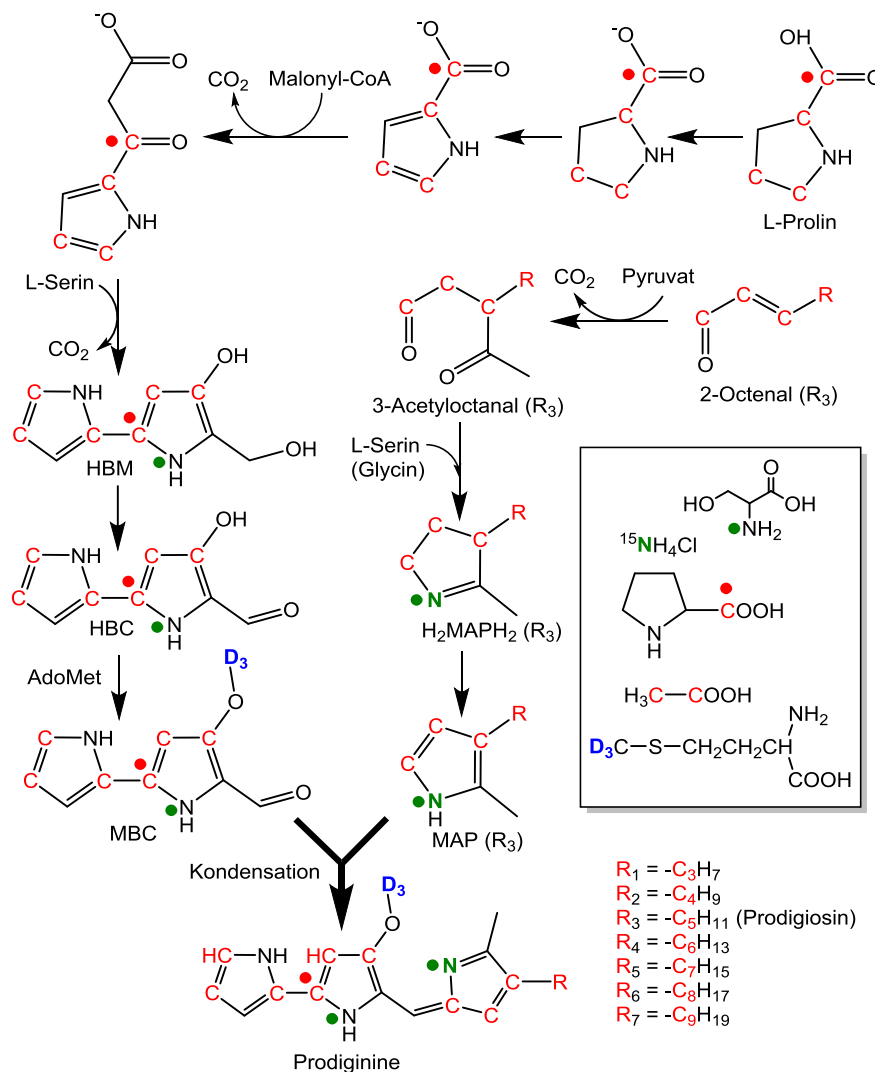


Abb. 4.2.6: Gemeinsamer Biosyntheseweg der von *S. marcescens* MSRBB2 produzierten Prodiginine, aufgeklärt durch Markierungsstudien mit stabilen isotoopenmarkierten Vorläufer-Molekülen ($^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$, [^{15}N]-L-Serin, [$1\text{-}^{13}\text{C}$]-L-Prolin, [Methyl- D_3]-L-Methionin, [$1,2\text{-}^{13}\text{C}_2$]-Natriumacetat) in flüssigem Nährmedium und HPLC-HRMS Analyse. Der Biosyntheseweg wird basierend auf den ermittelten Ergebnissen in Kombination mit Veröffentlichungen (Williamson *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2007) erstellt. AdoMet: S-Adenosylmethionin; HBM: 4-Hydroxy-2,2'-Bipyrrrol-5-Methylalkohol; MAP: 2-Methyl-3-Amylpyrrrol; MBC: 4-Methoxy-2,2'-Bipyrrrol-5-Carboxylaldehyd; HBC: 4-Hydroxy-2,2'-Bipyrrrol-5-Carboxylaldehyd.

Des Weiteren zeigten die Markierungsversuche mit [$1,2\text{-}^{13}\text{C}_2$]-Natriumacetat, dass die verschiedenen Alkylketten der Prodiginine von Acetateinheiten gebildet werden. Dabei

wird die Alkylkette vermutlich durch sukzessive Kondensation der Acetateinheiten durch eine Polyketide-Synthetase verlängert (Gerber *et al.*, 1978). Dies bestätigen Massenpeaks mit ungerader Massenverschiebung (z.B. M+5). Die Anzahl der eingebauten Acetateinheiten hängt dabei von der Kettenlänge der Derivate ab. Tab. 11 zeigt die ermittelten Einbauraten der Acetateinheiten in die verschiedenen Prodiginine. Übereinstimmend mit vorherigen Studien, zeigen die Ergebnisse einen maximalen Einbau von sieben Acetateinheiten in Prodigiosin (Massenverschiebung von 14 Da; Gerber *et al.*, 1978). Dabei werden drei Acetateinheiten in die Alkylkette (C3-Position, Ring C), jeweils eine Einheit in den C-Ring und B-Ring und zwei weitere Einheiten über den Krebs-Zyklus und Prolin-Bildung in den A-Ring eingebaut (Gerber *et al.*, 1978). Zusätzliche MS²-Spektren von Prodigiosin mit fünf, sechs und sieben eingebauten markierten Acetateinheiten (höchsten Einbauraten/Intensitäten) sind im Anhang hinterlegt (Abb. S183-S185).

Tab. 11: Peakhöhenverhältnisse aus HPLC-HRMS-Spektren von mit [1,2-¹³C₂]-Natriumacetat markierten Prodigininen, produziert von *S. marcescens* MSRBB2 in verschiedenen Fütterungsstudien (2 mg/mL [1,2-¹³C₂]-Natriumacetat in ½ bzw. ¼* (v:v) verdünnter Nährlösung; n.n = nicht nachweisbar).

Signalintensitäten in Bezug auf M [%]									
Nr.	Prodiginin	M+2	M+4	M+6	M+8	M+10	M+12	M+14	M+16
1	2-Methyl-3-propyl-P.	138	69	30	11	9	6	-	-
2	2-Methyl-3-butyl-P.	508	468	98	15	n.n.	n.n.	-	-
3*	2-Methyl-3-pentyl-P.	557	1676	2523	1990	740	85	8	-
4	2-Methyl-3-hexyl-P.	302	349	203	64	3	n.n.	n.n.	-
5*	2-Methyl-3-heptyl-P.	577	1949	3702	4148	2662	804	87	2
7	2-Methyl-3-nonyl-P.	266	348	192	58	8	n.n.	n.n.	n.n.

Die maximale Anzahl an eingebauten Acetateinheiten und damit die maximale Massenverschiebung ist abhängig von der Kettenlänge der Prodiginine. So wird z.B. ein maximaler Einbau für 2-Methyl-3-propyl-Prodiginin von sechs Acetateinheiten (Massenverschiebung von 12 Da) und für 2-Methyl-3-heptyl-Prodiginin von acht Einheiten (Massenverschiebung von 16 Da) detektiert. Aufgrund unterschiedlich hoher Produktionsraten der verschiedenen Prodiginine und des Einbaus unmarkierter Vorläufermolekülen aus dem komplexen Nährmedium, kann der theoretische maximale Einbau von Acetateinheiten nicht für alle Derivate bestätigt werden (bzw. <LOD).

Zusammengefasst zeigt die Markierungsstudie, dass die vom endophytischen *S. marcescens* MSRBB2 produzierten Alkylketten-Derivate von Prodigiosin einen gemeinsamen Biosyntheseweg aufweisen.

4.2.2.2 Serratamolide

Die mit stabilen Isotopen markierten Vorläufer-Moleküle der Markierungsstudien wurden so gewählt, dass neben den Prodigininen auch der Biosyntheseweg der Serratamolide weiter untersucht werden konnte. Insbesondere konnte festgestellt werden, dass die produzierten Serratamolide einen gemeinsamen Biosyntheseweg aufweisen. Die Biosynthese von Serrawettin W1 (Hauptmetabolit der produzierten Serratamolide) wird von einer unimodularen nicht-ribosomalen Peptidsynthetase (NRPS) durchgeführt. Serrawettin W1 ist ein zyklisches symmetrisches Dilacton (Cyclo-(D-3-hydroxy-decanoyl-L-seryl)₂) mit Alkylseitenketten. Die NRPS verwendet ausschließlich die Aminosäure L-Serin als Substrat (Wasserman *et al.*, 1962, Li *et al.*, 2005; Tanikawa *et al.*, 2006). Für die Synthese von Serrawettin W1 ist das zweite Vorläufer-Molekül 3-D-Hydroxydecanoyl, welches aus dem Fettsäure-Biosyntheseweg stammt (Li *et al.*, 2005). Durch die hohe Anzahl verschiedener Serratamolide (Seitenketten, Doppelbindung, nicht zyklisch) ist eine geringe Substratspezifität der NRPS naheliegend. Serratamolide mit offener Ringstruktur und Serratamid-„Monomere“ weisen darauf hin, dass die intramolekularen Esterbindungen für die Zyklisierung nicht notwendig sind für die Freigabe aus der Thioesterasedomäne der NRPS. Eine andere Möglichkeit ist, dass diese Verbindungen keine freigegebenen Intermediate darstellen, sondern durch die Hydrolyse der zyklischen Serratamolide im Nährmedium entstehen (Abb. 4.2.7). Die Markierungsstudien mit [¹⁵N]-L-Serin und [1,2-¹³C₂]-Natriumacetat lieferten folgende Ergebnisse. Obwohl die Einbaurate von [¹⁵N]-L-Serin gering war, konnte der zweifache Einbau für die meisten Serratamolide in HRMS-Spektren bestätigt werden (Abb. S186-S200 im Anhang). Außerdem konnte der Einbau der markierten Acetateinheiten gezeigt werden, was diese als Bausteine der verschiedenen Serratamolide bzw. ihrer entsprechenden Hydroxyfettsäuren als Vorstufen bestätigt (Anhang, Tab 15).

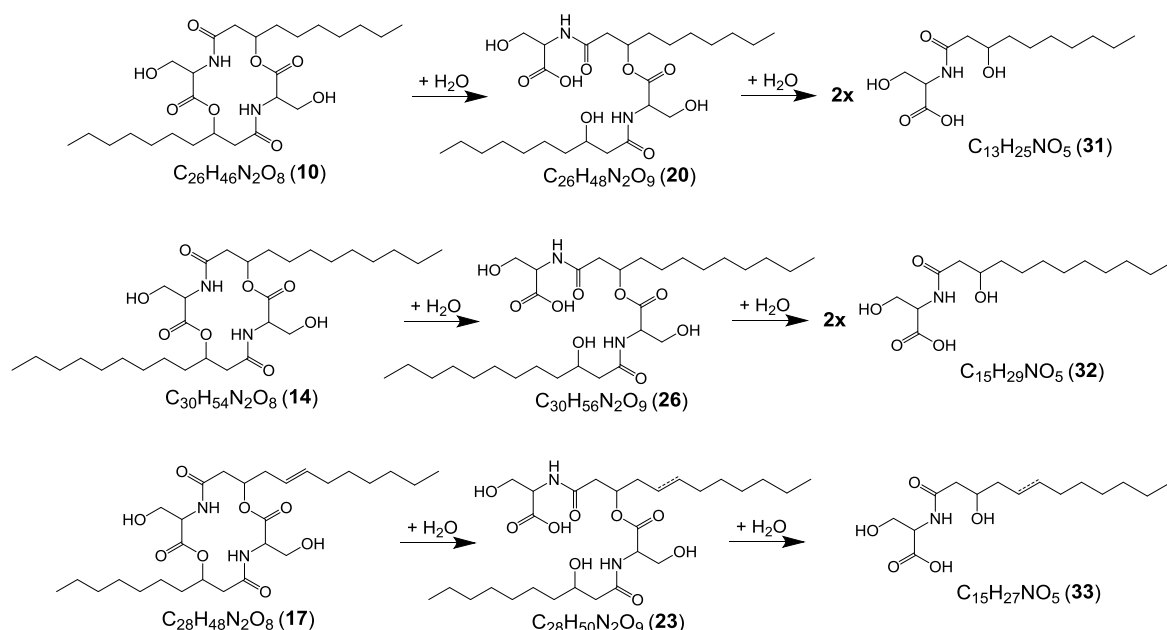


Abb. 4.2.7: Mögliche Hydrolyse von zyklischen Serratamoliden führt zu Serratamoliden mit offener Ringstruktur bzw. „Monomeren“.

4.2.3 Interaktion von *S. marcescens* MSRBB2 mit assoziierten endophytischen Pilzen derselben Wirtspflanze

Nachdem die Prodiginine und Serratamolide identifiziert und die Biosynthese für die Derivate untersucht wurden, stellte sich die Frage nach der ökologischen bzw. physiologischen Bedeutung dieser Sekundärmetabolite für den produzierenden Organismus *S. marcescens* MSRBB2. Die ökologische Rolle von Prodigininen, insbesondere von Prodigiosin, ist bisher nicht vollständig geklärt. Bisherige Hypothesen sind z.B., dass Prodigiosin ein Abfallprodukt des primären Metabolismus bzw. metabolische Senke für NAD(P)H oder Prolin (Bu'Lock 1961) ist. Vor allem in Hinblick auf die diversen Bioaktivitäten von Prodigiosin (z.B. antibakteriell, antimykotisch) liegt jedoch die Vermutung nahe, dass die Verbindung eine wichtige Rolle für das Überleben des Organismus spielt (Williams & Quadri 1980; Demain 1995; Thomson *et al.*, 2000; Xu *et al.*, 2007; Danevčič *et al.*, 2016; Su *et al.*, 2017). Diese Theorie wird gestützt durch Vergleiche zwischen Umweltisolaten und klinischen Isolaten von *S. marcescens*. Dabei zeigen Umweltisolate häufiger rote Pigmentierung (Prodiginin-Produktion), die klinischen Isolate sind dagegen häufiger unpigmentierte, weiße Stränge (Ding & Williams 1983; Aucken & Pitt 1998). Daher war der nächste Schritt der Studie die mögliche ökologische Bedeutung der produzierten Prodiginine in der Interaktion von *S. marcescens* MSRBB2 und endophytischen Pilzen derselben ökologischen Nische (Wirtspflanze) zu untersuchen. Dazu wurden aus derselben Wirtspflanze drei Pilzendophyten isoliert und zunächst mittels ITS-Sequenzierung (internal transcribed spacer) identifiziert. Aus der Rinde von *M. serrata* wurden zwei endophytische Pilze, *Pestalotiopsis virgatula* (Code: MSRBF1) und *Aspergillus caesiellus* (Code: MSRBF2), sowie eine endophytische *Pichia* spp. (Code MSRRF1) aus den Wurzeln derselben Wirtspflanze, isoliert.

Um die Wechselwirkung bzw. Interaktion der koexistierenden endophytischen Mikroorganismen zu untersuchen wurden die endophytischen Pilze in einem Konfrontationsassay mit *S. marcescens* MSRBB2 co-kultiviert (Abb. 4.2.8). Insbesondere lag der Fokus auf der Prodiginin-Produktion durch das endophytische Bakterium. Die Pilze wurden als Linien ausgestrichen und auf beiden Seiten mit *S. marcescens* konfrontiert (Abb. 4.2.8B). Dabei zeigte sich eine starke Inhibierung des Pilzwachstums durch *S. marcescens* im Vergleich zur Monokultivierung (Abb. 4.2.8A). Um sicherzustellen, dass dieser Effekt auf das Metabolitenspektrum und nicht auf eine Nährstoffkonkurrenz bzw. eine physische Barriere aufgrund der bakteriellen Biomasse zurückzuführen ist, wurden die Pilze zur Kontrolle ebenfalls mit anderen Bakterien (*Escherichia coli* und *Staphylococcus aureus*, Anhang Abb. S201-S203) co-kultiviert. Außerdem konnte eine aktivierte und erhöhte Pigment-Produktion (Prodiginine) in Anwesenheit der koexistierenden Pilze festgestellt werden. Um diesen Effekt weitergehend zu untersuchen wurden Co-Kultivierungen mit für *S. marcescens* MSRBB2 „unbekannten“ Pilzen die nicht aus derselben Wirtspflanze stammen durchgeführt (Abb. 4.2.8C, D). Dazu wurden für jeden koexistierenden Endophyten ein Pilz desselben Genus ausgewählt (*Aspergillus fumigatus*, *Pichia membranifaciens*, *Pestalotiopsis versicolor*). Interessanterweise zeigten diese Pilze keine aktivierte Prodiginin-Biosynthese bei *S. marcescens* MSRBB2. Außerdem wurde das Pilzwachstum kaum inhibiert, insbesondere *A. fumigatus* und *P. virgatula* konnten *S. marcescens* MSRBB2 vollständig überwachsen. *P. membranifaciens* zeigte

allgemein nur ein langsames Wachstum. Zum einen zeigten diese Experimente, dass ein möglicher Erkennungsprozess der koexistierenden endophytischen Pilze durch *S. marcescens* MSRBB2 stattfindet, der eine Prodiginin-Biosynthese auslöst. Zum anderen korrelierte die Wachstumshemmung der endophytischen Pilze mit der Pigment-Produktion.

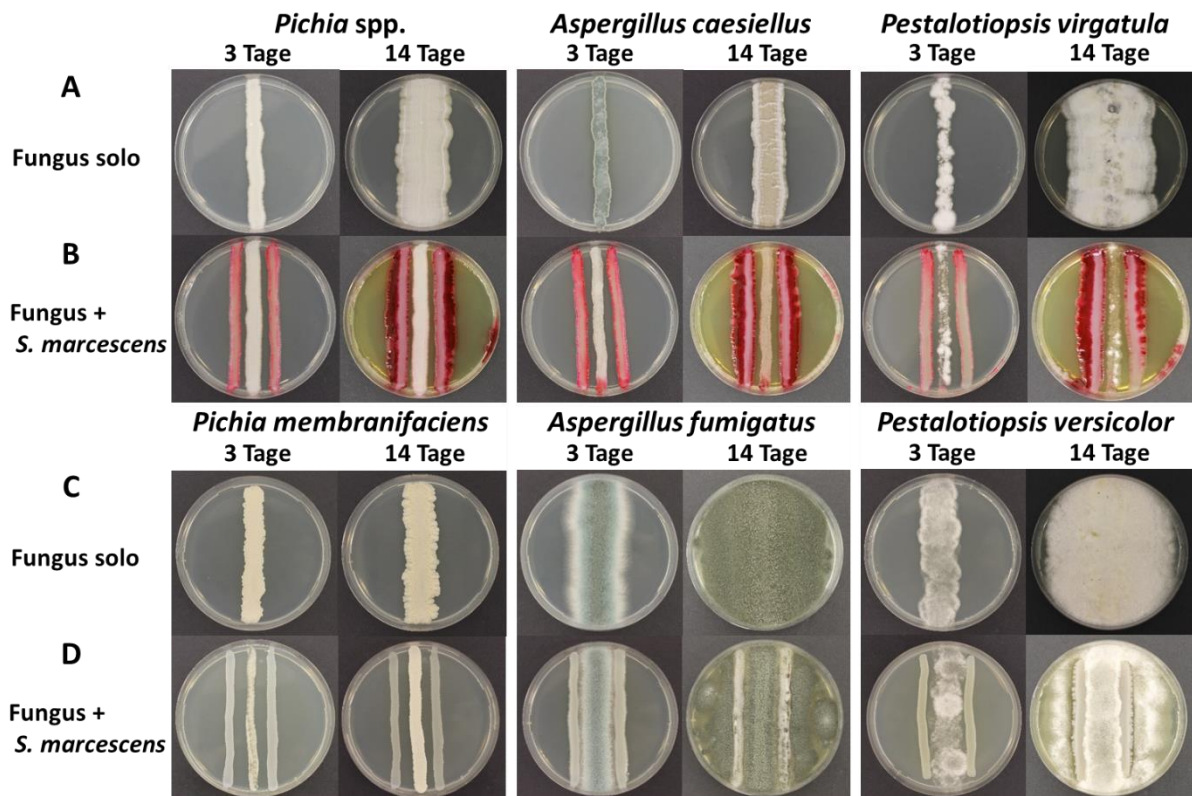


Abb. 4.2.8: Co-Kultivierungen von endophytem *S. marcescens* MSRBB2 und assoziierten Pilzendophyten (A, B: *Pichia* spp., *Aspergillus caesiellus*, *Pestalotiopsis virgatula*) aus der gleichen Wirtspflanze und nicht verwandten Pilzen (C, D: *Aspergillus fumigatus* (DSM 21023), *Pichia membranifaciens* (DSM 70366), *Pestalotiopsis versicolor* (DSM 62887)). Optische Aufnahmen von Monokultivierungen (A, C) und Co-Kultivierungen mit *S. marcescens* MSRBB2 (B, D) nach 3 und 14 Tagen. Anwesenheit von assoziierten Pilzendophyten aus derselben Wirtspflanze löst Prodigininbiosynthese bei *S. marcescens* MSRBB2 aus.

Um die Auswirkungen der Anwesenheit von *S. marcescens* MSRBB2 auf die Pilze nicht nur optisch, sondern auch mikroskopisch zu untersuchen, wurden Rasterelektronenmikroskopie-Messungen (REM) von den Co-Kultivierungen durchgeführt und mit den Pilz-Monokulturen (axenisch) abgeglichen (Anhang Abb. S204-S223). Der Vergleich zeigt, dass keine Zerstörung der Pilzstrukturen wie Konidien, Konidiophoren, Hyphen oder Myzel in der Anwesenheit von *S. marcescens* MSRBB2 festzustellen sind. Es konnte nur eine Kolonisierung der Pilzbiomasse durch *S. marcescens* MSRBB2 beobachtet werden.

Aufgrund der für andere Pilze bekannten antimykotischen Wirkung von Prodigiosin (Someya *et al.*, 2001 & 2005; Xu *et al.*, 2007; Su *et al.*, 2017; Jimtha *et al.*, 2017) lag die Vermutung nahe, dass die produzierten Prodiginine der Grund für die Wachstumshemmung sind. Um dies zu überprüfen, wurden verschiedene Disc-Assays mit aufgereinigtem Prodigiosin (zeit- und dosisabhängig) mit den koexistierenden endophytischen Pilzen durchgeführt. Abb. 4.2.9 zeigt beispielhaft die Wachstumshemmung der drei Pilze (vollständige Assays im Anhang, Abb. S224-S229) durch Prodigiosin. Damit kann die Inhibierung auf die produzierten Prodiginine zurückgeführt werden. Prodigiosin wird von *S. marcescens* MSRBB2 als chemische Abwehrverbindung bzw. als Allelochemikalie im Antagonismus mit den koexistierenden Pilzendophyten eingesetzt. Dieses Konzept konnte ebenfalls für andere Bakterien gezeigt werden (Bull *et al.*, 2015; Preciado *et al.*, 2016; Vallet *et al.*, 2017; White, J. F. *et al.*, 2018).

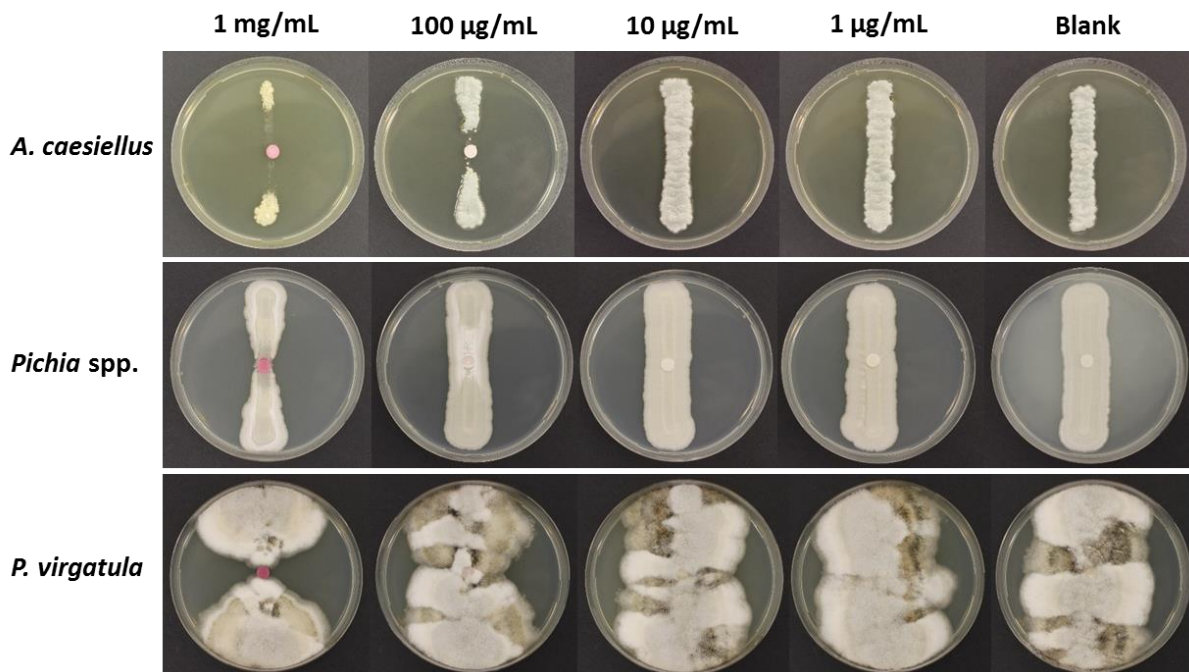


Abb. 4.2.9: Disc-Assay von Prodigiosin mit unterschiedlichen Konzentrationen mit Pilzendophyten (*Aspergillus caesiellus*, *Pichia* spp., *Pestalotiopsis virgatula*) nach 7 Tagen Inkubation bei 30 °C.

Um auszuschließen, dass die Wachstumshemmung auf durch *S. marcescens* MSRBB2 produzierte Chitinase-Enzyme zurückzuführen ist, wurden zwei agarbasierte Chitinase-Assays durchgeführt. Denn grundsätzlich ist bekannt, dass diese Enzyme eine Wachstumshemmung bei Pilzen hervorrufen und eine Zersetzung der Pilzstrukturen (Myzel, Konidien, etc.) bewirken können (Tan *et al.*, 2015). Abb. 4.2.10A zeigt, dass *S. marcescens* MSRBB2 grundsätzlich in der Lage ist Chitinasen zu produzieren. Der Farbumschlag des Indikatorfarbstoffs Bromcresol-Purpur (violett) wird durch eine pH-Wert Änderung verursacht, welche wiederum auf den Abbau von Chitin durch Chitinasen zurückzuführen ist (Agrawal & Kotasthane 2012). Der Strang MSRBB2 ist damit grundsätzlich in der Lage Chitinase zu produzieren. Da jedoch die Co-Kultivierungen auf PDA mit einer Glukose-Konzentration von 20 g/L durchgeführt

worden sind und Glukose ein bekannter Inhibitor der Chitinase-Expression ist (Monreal & Reese 1969), wurde der gleiche Chitin-Agar mit zusätzlichen 20 g/L Glukose angefertigt. Abb. 4.2.10B zeigt, dass in der Anwesenheit von Glukose keine Chitinasen produziert werden. Damit kann in den Co-Kultivierungen zusätzlich ausgeschlossen werden, dass die Wachstumshemmung der Pilze auf Chitinasen zurückzuführen ist. Dennoch können im Konfrontationsassay synergistische Effekte durch andere Sekundärmetaboliten von *S. marcescens* MSRBB2 auf die Inhibierung der Pilze nicht ausgeschlossen werden. Nichtsdestotrotz konnte die physiologische Bedeutung von Prodigiosin für *S. marcescens* MSRBB2 als chemischer Abwehrstoff vor allem durch die aktivierte Biosynthese der Pigmente und die Disc-Assays gezeigt werden.

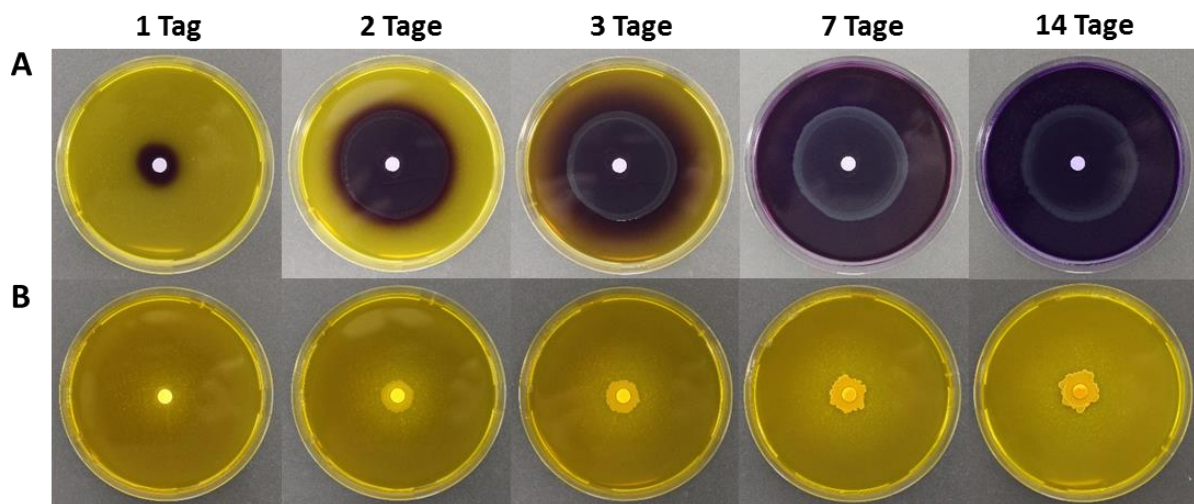


Abb. 4.2.10: Inkubation von *S. marcescens* MSRBB2 auf zwei Chitin-Medien bei 30 °C für 14 Tage. Chitinase-Nachweismedium (A) zeigt die Expression von Chitinase Enzymen durch Farbänderung des Indikators Bromcresol-Purpur an (Agrawal & Kotasthane 2012). Abbau von Chitin führt zu einer pH-Änderung und Farbumschlag. B zeigt das Chitinase-Nachweismedium mit zusätzlichen 20 g/L Glukose, bei dem Glukose die Chitinase-Expression inhibiert.

4.2.4 Visualisierung der chemischen Interaktion von *S. marcescens* MSRBB2 mit koexistierenden Pilzendophyten mittels MALDI-imaging-HRMS

Die Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation (MALDI) Technik als etablierte Analysenmethode zur Visualisierung von Sekundärmetaboliten in verschiedenen organischen Proben (Svatos 2010; Yang *et al.*, 2009, 2012; Watrous & Dorrestein 2011; Fujino *et al.*, 2016; Sørensen *et al.*, 2017; Dunham, *et al.*, 2017;) wurde eingesetzt, um die Interaktion von *S. marcescens* MSRBB2 mit den koexistierenden Pilzen auf chemischer Ebene weiter zu untersuchen und Erkenntnisse über die physiologische Rolle der Sekundärmetaboliten zu gewinnen. Dabei wird durch die Visualisierung der räumlichen Verteilung der Sekundärmetaboliten *in situ* versucht Rückschlüsse auf die ökologische Bedeutung zu ziehen. Dazu wurde *S. marcescens* MSRBB2 erneut mit *Pichia* spp. (MSRRF1) und *A. caesiellus* (MSRBF2) co-kultiviert. Aufgrund der Anforderungen von MALDI-imaging-HRMS Messungen an die Proben und Probenvorbereitung, konnte *P. virgatula* nicht weiter untersucht werden. Durch die Höhe des Myzels und der Hyphen konnte kein notwendiges planares Höhenprofil generiert werden. In den folgenden Kapiteln wird bei der Auswertungen der Messungen zwischen Prodigininen und Serratamoliden unterschieden.

4.2.4.1 Prodiginine

Die Co-Kultivierungen von *S. marcescens* MSRBB2 mit *A. caesiellus* und *Pichia* spp. wurden optisch beobachtet und dokumentiert (bis zu 7 Tagen) sowie die räumliche und zeitliche Verteilung der Sekundärmetaboliten durch MALDI-imaging-HRMS untersucht. Dabei konnte wie bereits bei den Konfrontationsassays festgestellt, eine aktivierte und erhöhte Prodiginin-Biosynthese festgestellt werden. Insbesondere konnte eine Anreicherung der Pigmente in Richtung der Pilze beobachtet werden.

Abb. 4.2.11 zeigt die Akkumulierung nach 3 bzw. 7 Tagen während der Co-Kultivierung von *S. marcescens* MSRBB2 mit den Pilzendophyten (A, B). Die starke Produktion und Akkumulation wird durch die Präsenz der Pilze ausgelöst, was die Kontrollversuche von *S. marcescens* MSRBB2 Mono-Kultivierungen verdeutlichen (Abb. 4.2.11C). Speziell im Bereich des direkten Kontakts sowie auf der *S. marcescens* Biomasse die die Pilze überwuchert/kolonisiert ist eine intensive Prodiginin-Biosynthese festzustellen. Diese Grenzbereiche wurden weitergehend mittels MALDI-imaging-HRMS untersucht.

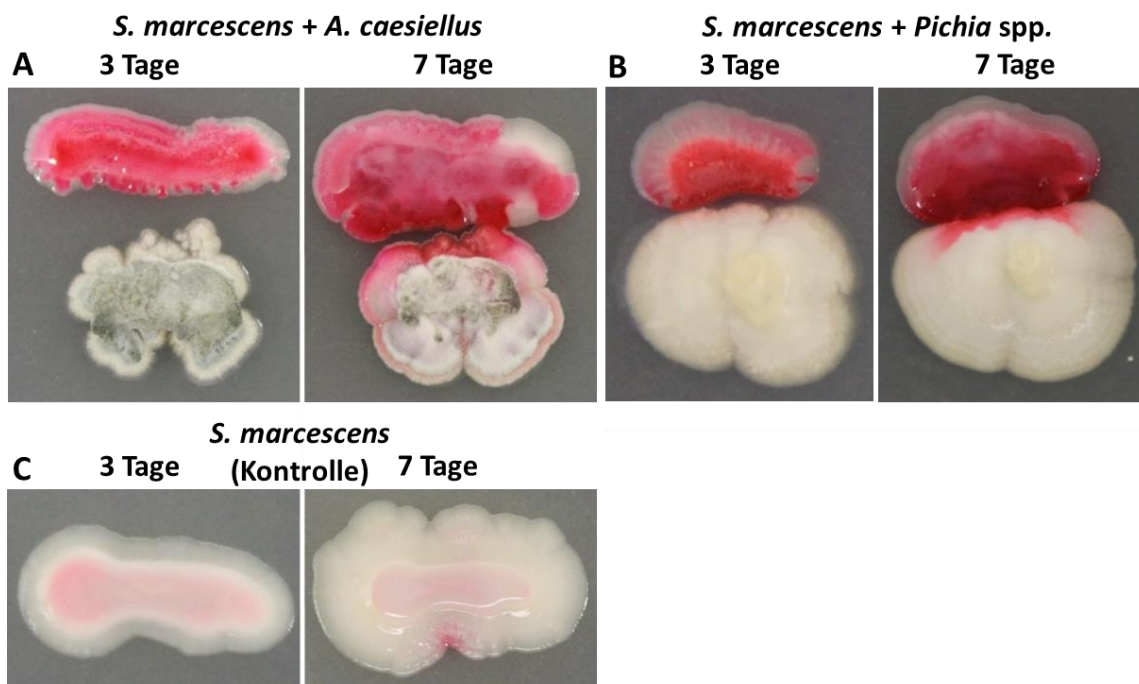


Abb. 4.2.11: Co-Kultivierung von bakteriellem Endophyt *S. marcescens* MSRBB2 (oben) und Pilzendophyten ((A) *Aspergillus caesiellus* (unten); (B) *Pichia* spp. (unten)). Akkumulation und verstärkte Produktion von Prodigininen (rote Pigmente) an der Kontaktstelle in Gegenwart der Pilze. Kontrolle von *S. marcescens* MSRBB2 in Abwesenheit der Pilze (C).

Abb. 4.2.12 zeigt die örtliche Verteilung von Prodigiosin in der Interaktion von *S. marcescens* MSRBB2 mit dem Pilzendophyt *A. caesiellus* für unterschiedliche Inkubationszeiten (3 (A), 5 (B), 7 (C, D) Tage). Zu Beginn (Abb. 4.2.12A, B) wird Prodigiosin mit hoher Intensität an der dem Pilz zugewandten Seite der Bakterienkolonie akkumuliert. Nach 7 Tagen berührte *S. marcescens* MSRBB2 den Pilz und kolonisierte die Pilzbiomasse. Speziell an der Grenzfläche bzw. auf dem

Pilzgewebe konnte eine erhöhte Prodigiosin-Intensität detektiert werden. Dies konnte zusätzlich mikroskopisch gezeigt werden (Anhang, Abb. S230).

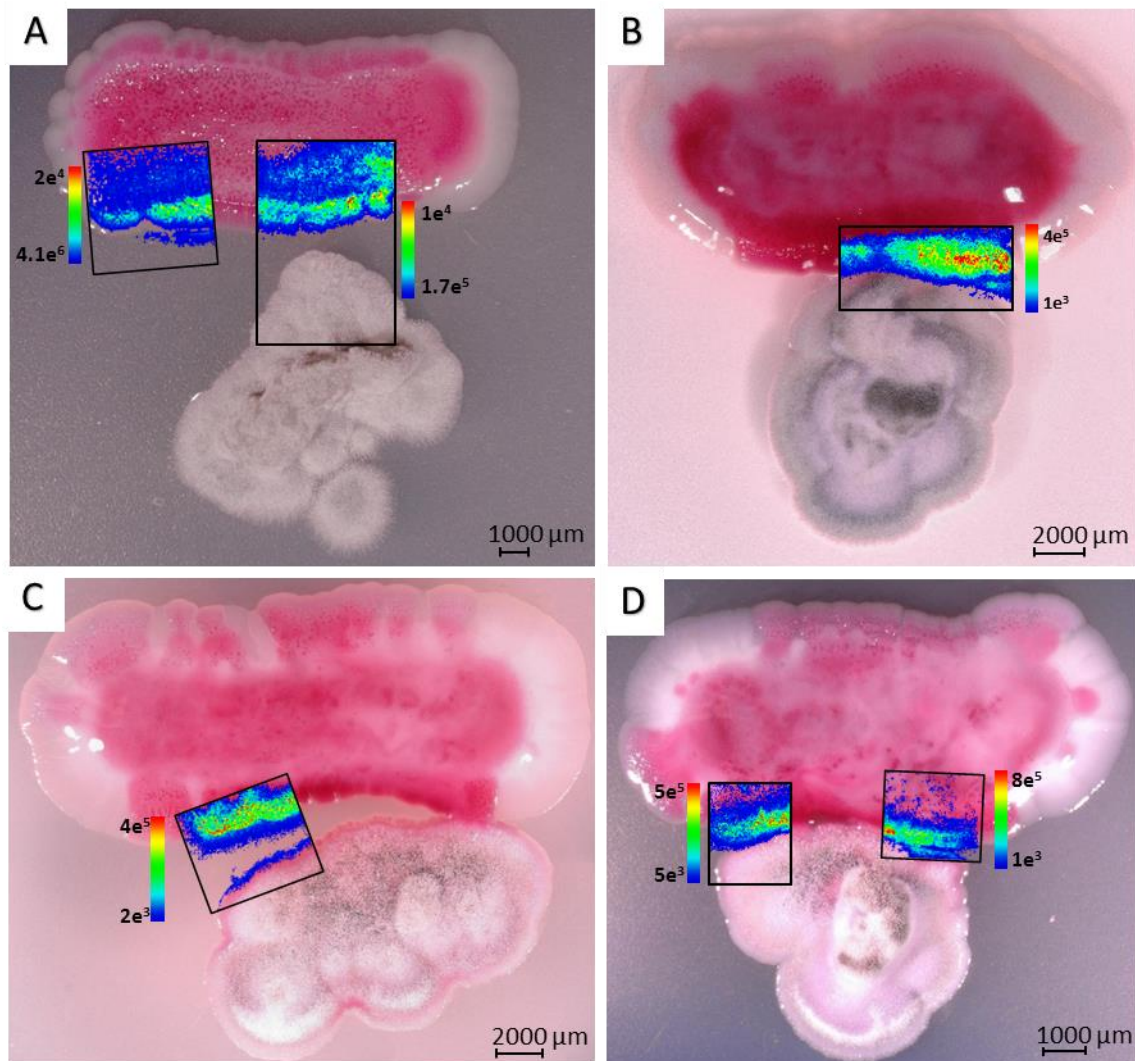


Abb. 4.2.12: MALDI-imaging-HRMS zeigt die örtliche Verteilung von Prodigiosin (**3**, $[M+H]^+ \pm 2$ ppm) während der Co-Kultivierung von *S. marcescens* MSRBB2 (oben) und dem endophytischen Pilz *Aspergillus caesiellus* (unten) nach 3 (A), 5 (B) und 7 (C, D) Tagen Inkubation.

Neben der Untersuchung des Hauptmetaboliten Prodigiosin, wurden ebenfalls mittels monoisotopischer Masse Ionenbilder der identifizierten Aalkylkettenderivate (Prodiginine) erzeugt und die örtliche Verteilung visualisiert. Abb. 4.2.13 zeigt die Ionenbilder der produzierten Prodiginine (**1-5**, **6** und **7** <LOD, siehe Abb. 4.2.1) in der Interaktion von *S. marcescens* MSRBB2 mit *A. caesiellus* (A) sowie *Pichia* spp. (C) nach 7 Tagen. Auffällig ist, dass alle Prodiginine eine identische örtliche Verteilung aufweisen mit einer Akkumulation in Richtung der Pilze. Dies bestätigt erneut eine gemeinsame Biosynthese und Enzymregulation (Markierungsstudien) sowie eine analoge physiologische Rolle als chemische Abwehrstoffe analog zu Prodigiosin. Da Prodigiosin in hohen Konzentrationen während der Interaktion synthetisiert wird, konnten MALDI-Imaging-HRMS² Messungen durchgeführt werden (Abb. 4.2.13B, D).

Identische Ionenbilder der charakteristischen Fragmente bestätigen die Identität erneut.

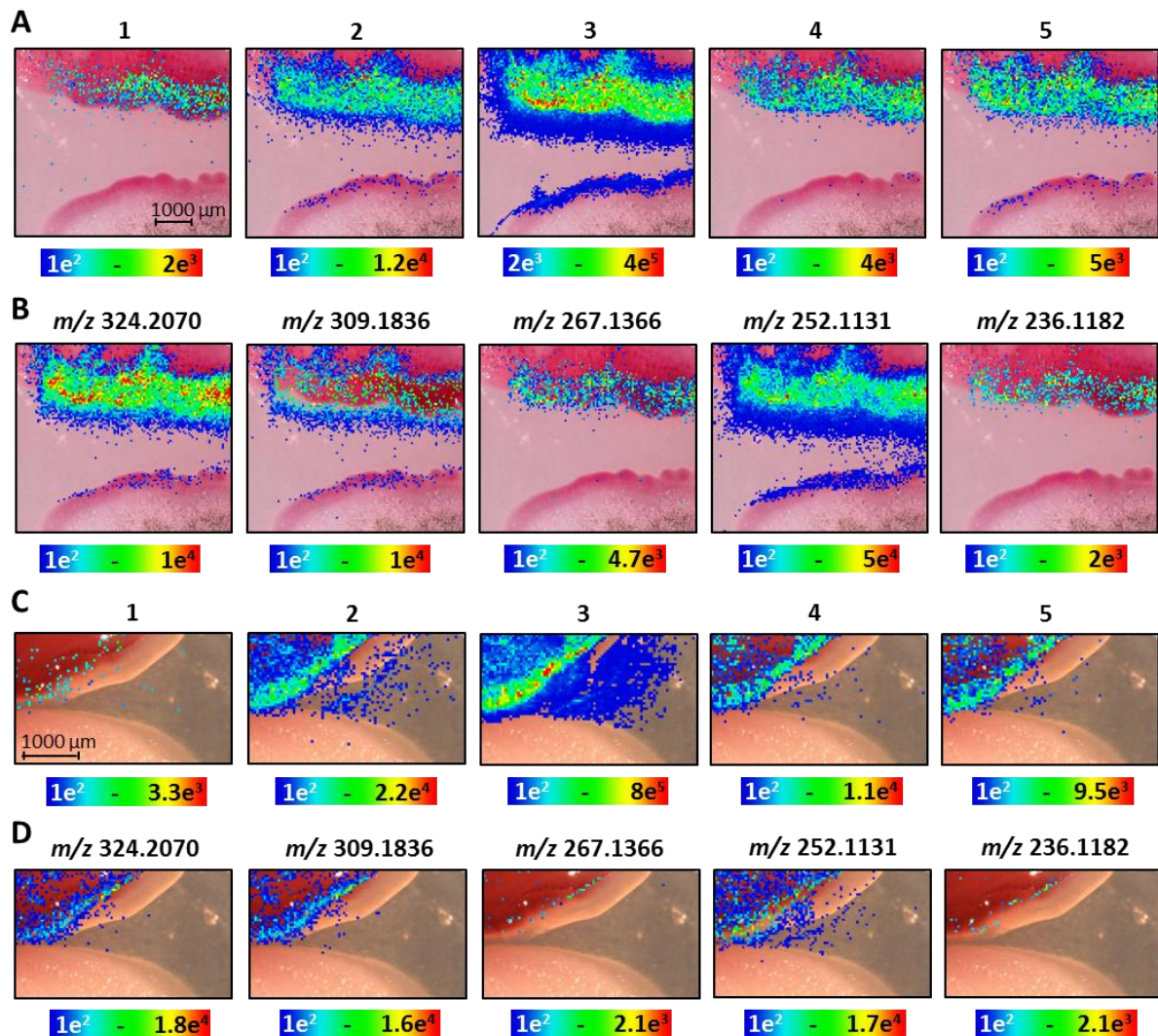


Abb. 4.2.13: MALDI-imaging-HRMS zeigt die Lokalisierung von Prodigininen (1-5, $[M+H]^+ \pm 2$ ppm) während der Co-Kultivierung von *S. marcescens* MSRBB2 (oben) und Pilzendophyten (A, B: *Aspergillus caesiellus* (unten); C, D: *Pichia* spp. (unten)) nach 7 Tagen Inkubation. MALDI-Imaging-HRMS² zeigt die Fragmente von Prodiginosin (3; B, D).

Neben den gezeigten Messungen wurden zur Bestätigung weitere MALDI-imaging-HRMS⁽²⁾-Messungen diverser biologischer Replikate und Zeitpunkte (Inkubationsdauer) durchgeführt (Anhang Abb. S231-S235). Zur Kontrolle wurden *S. marcescens* MSRBB2 Monokulturen untersucht bei denen in der Abwesenheit der koexistierenden Pilzendophyten keine Akkumulation am Randbereich der Kolonien festzustellen war (Anhang, Abb. S236, S237). Die erhöhte Prodiginosin-Biosynthese in Gegenwart koexistierender Pilze wurde ebenfalls durch Extraktion und HPLC-HRMS-Vergleich bestätigt (Anhang, Abb. S238).

4.2.4.2 Serratamolide

Aufgrund der chemischen Eigenschaften der verschiedenen Serratamolide als Biotenside wurde die ökologische Bedeutung für den Produzenten als Benetzungsmittel (wetting agent) grundsätzlich bereits gezeigt (Matsuyama *et al.*, 1985, 1986, 1992, 1995, 1996; Thies *et al.*, 2014). Durch die Fähigkeit die Oberflächenspannung von Wasser zu reduzieren, erlauben die Serratamolide dem Produzenten eine verstärkte Translokation auf verschiedenen Oberflächen, insbesondere auf Agar, und erhöhen damit die Motilität, das Schwärmen und die Kolonisierung neuer Oberflächen. Als Rückschluss erhöhen diese Biotenside damit die allgemeine Wettbewerbsfähigkeit von *S. marcescens* in der Umwelt.

Es ist bekannt, dass die Serratamid- und Prodiginin-Biosynthese bei *S. marcescens* durch die Inkubation bei 37 °C inhibiert wird (Matsuyama *et al.*, 1986). Um zunächst die allgemeinen Eigenschaften der Serratamolide zur Erhöhung der Motilität für den untersuchten endophytischen *S. marcescens* Strang MSRBB2 zu zeigen, wurde das endophytische Bakterium auf Nähragar sowohl bei 30 °C als auch bei 37 °C inkubiert. Abb. 4.2.14 zeigt die Ergebnisse des Experimentes zusammen mit der Bestätigung mittels Extraktion und HPLC-HRMS Messung. Bei 30 °C ist die Serrawettin W1 und Pigment Produktion zusammen mit einer stark erhöhten Kolonietranslokation/ Ausbreitung deutlich zu erkennen, während bei 37 °C eine stark reduzierte Serrawettin W1 Synthese, keine Pigmentproduktion und nur eine geringe Kolonieverteilung festzustellen ist.

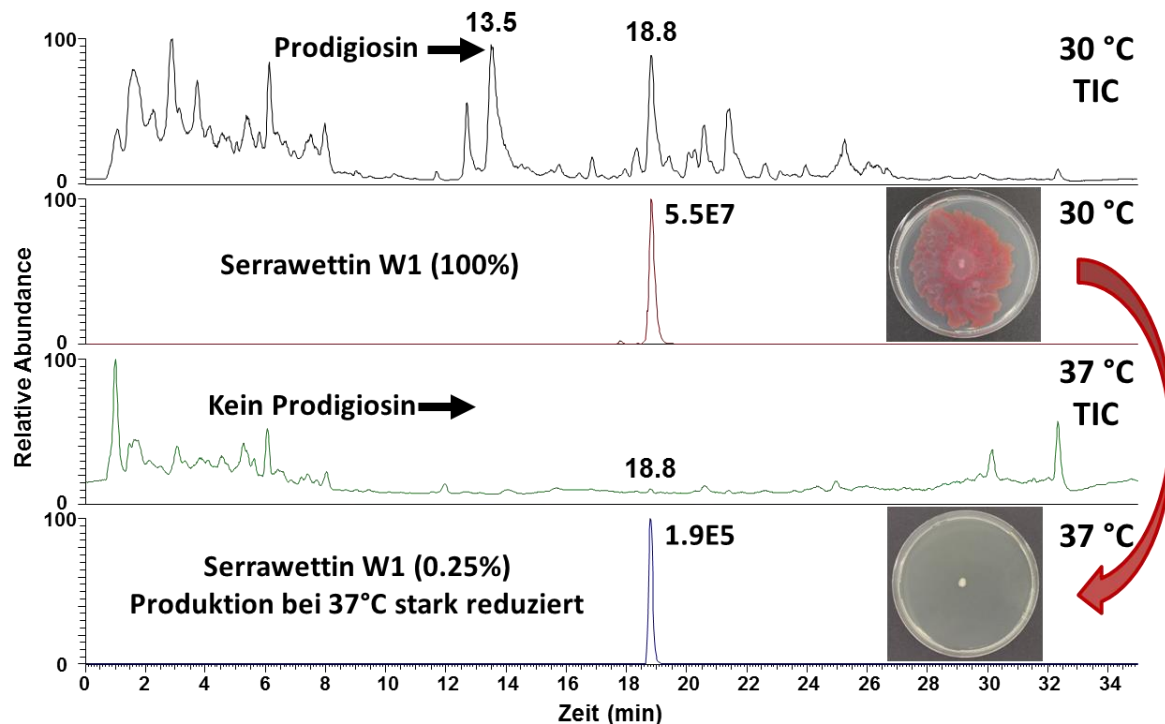


Abb. 4.2.14: HPLC-HRMS Vergleich der Extrakte von *S. marcescens* MSRBB2 inkubiert auf Nähragar bei 30 °C und 37 °C für 24 Stunden. Optische Bilder, TIC und extrahierte Ionenchromatogramme von Serrawettin W1 ($[M+H]^+ \pm 2$ ppm). Hohe Serrawettin W1 Produktion bei 30 °C führt zur erhöhten Translokation/Mobilität.

Um die physiologische Rolle der von *S. marcescens* MSRBB2 produzierten Serratamolide für den produzierenden Organismus *in situ* zu untersuchen, wurden Co-Kultivierungen mit dem koexistierenden Pilzendophyten *A. caesiellus* angesetzt und die räumliche Verteilung der Zielmoleküle mittels MALDI-imaging-HRMS visualisiert. Dazu wurde die Interaktion zu unterschiedlichen Zeitpunkten gemessen. Abb. 4.2.15 zeigt die Ionenbilder der Verbindungen nach 3 Tagen Co-Kultivierung. Alle detektierten Serratamolide zeigen eine grundsätzlich identische Verteilung, eine Akkumulation am Randbereich der *S. marcescens* MSRBB2 Biomasse in Richtung von *A. caesiellus*. Die identischen Ionenbilder bestätigen erneut eine gemeinsame Biosynthese und Enzymregulation der Derivate.

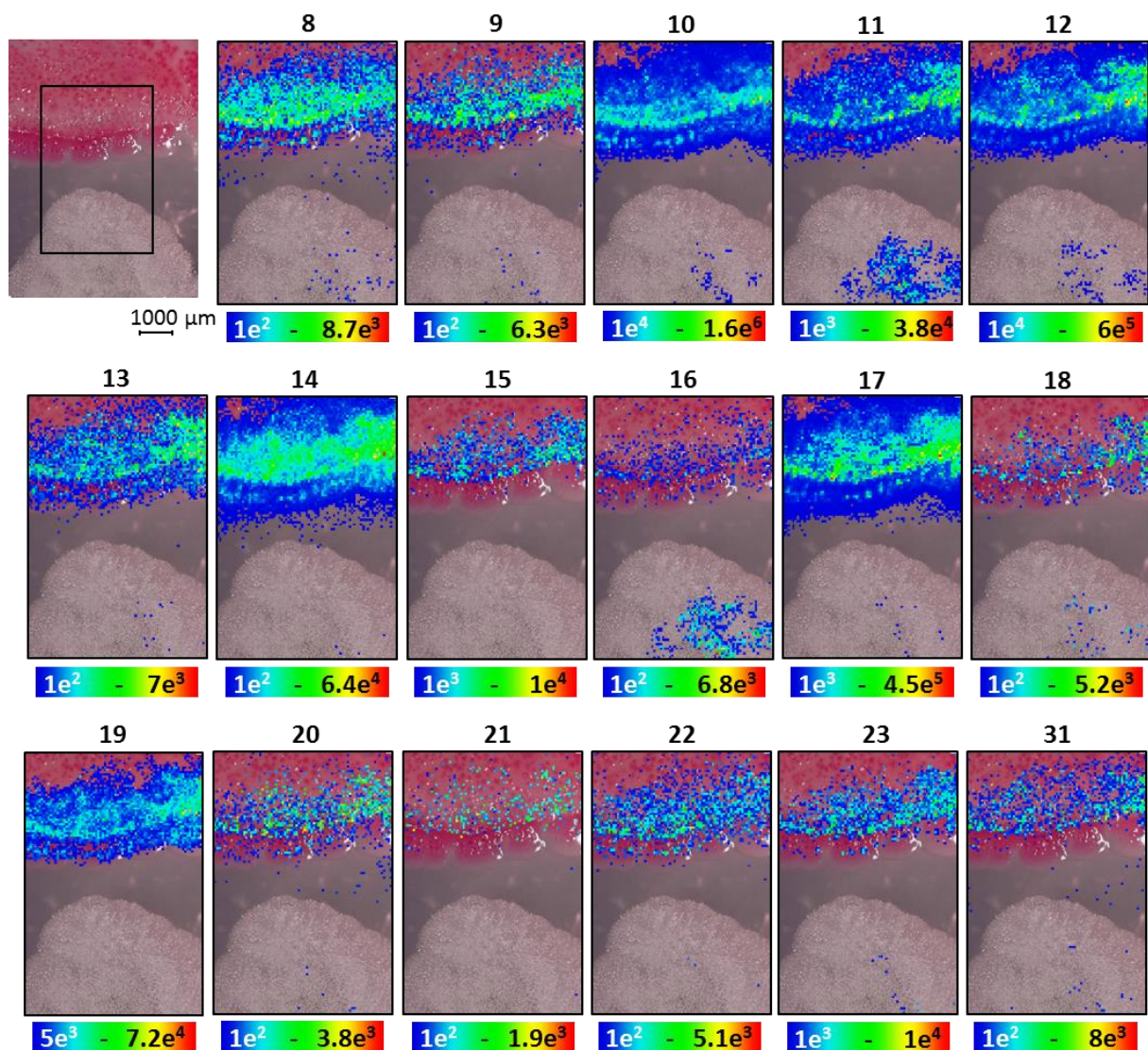


Abb. 4.2.15: MALDI-imaging-HRMS zeigt die Lokalisierung von Serratamoliden (8-23, 31, $[\text{M}+\text{K}]^+ \pm 2$ ppm) während der Co-Kultivierung von *S. marcescens* MSRBB2 (oben) und Pilzendophyt *Aspergillus caesiellus* (unten) nach 3 Tagen Inkubation.

Im weiteren zeitlichen Verlauf der Interaktion werden die Serratamolide im Gegensatz zu den Prodigininen, welche weiterhin auf der Koloniefäche akkumulieren

(Abb. 4.2.13), in den Agar freigesetzt. Abb. 4.2.16 zeigt neben der Anreicherung auf der Koloniegrenze die Freisetzung durch erhöhte Intensitäten der Zielmoleküle auf dem Agar zwischen *S. marcescens* MSRBB2 und *A. caesiellus*. Die verstärkte Produktion und Freisetzung der Biotenside erhöht die Beweglichkeit von *S. marcescens* MSRBB2 und ermöglicht die Überwindung der Distanz zum Pilz sowie die Kolonisierung des Myzels. Die Kolonisierung der Pilzbiomasse konnte ebenfalls in den REM-Messungen (Anhang Abb. S204-S223) gezeigt werden.

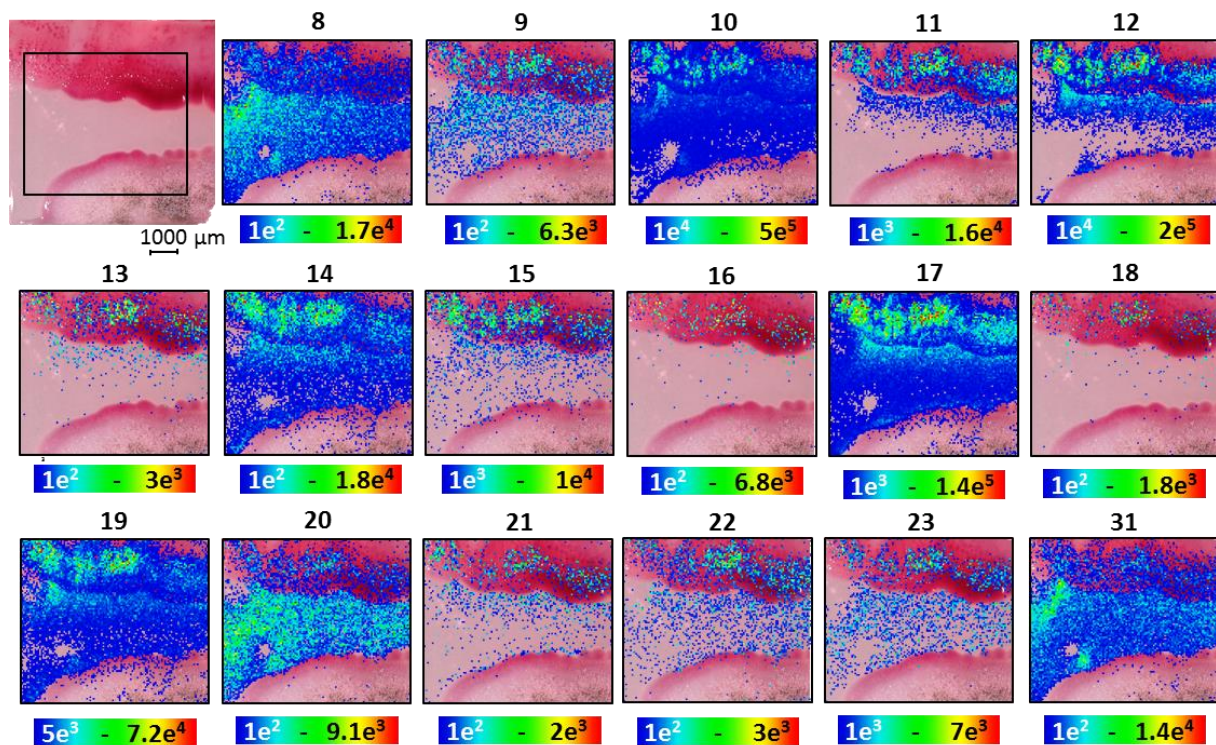


Abb. 4.2.16: MALDI-imaging-HRMS zeigt die Lokalisierung von Serratamoliden (**8-23, 31**, $[M+K]^+ \pm 2$ ppm) während der Co-Kultivierung von *S. marcescens* MSRBB2 (oben) und Pilzendophyt *Aspergillus caesiellus* (unten) nach 7 Tagen Inkubation.

Weitere MALDI-imaging-HRMS Messungen von verschiedenen Replikaten und Zeitpunkten sind im Anhang hinterlegt (Abb. S239-S242). Zum Vergleich wurden Monokulturen von *S. marcescens* MSRBB2 untersucht, bei denen eine deutlich geringere (wenn überhaupt) Serratamolid-Produktion detektiert wurde (Anhang Abb. S243, S244). Die Anwesenheit von *A. caesiellus* führt zu einer verstärkten Biosynthese der Serratamolide. Der Vergleich der Ionenbilder von Serratamoliden und Prodigininen zeigt zunächst (3 Tage) ähnliche örtliche Verteilungen der Stoffe (Akkumulation am Randbereich). Frühere Studien bestätigen die Korrelation zwischen Serrawettin W1- und Prodigiosin-Produktion (Matsuyama *et al.*, 1986 & 1995), was auf eine gemeinsame Regulation der Enzymexpression und damit der Biosynthese deutet. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass die Biosynthese beider Stoffe sowohl durch einen Transkriptionsregulator (HexS) (Tanikawa *et al.*, 2006) als auch das Protein pswP (Sunaga *et al.*, 2004) reguliert wird. Dies erklärt die detektierte ähnliche örtliche Verteilung von Serratamoliden und Prodigininen bei *S. marcescens* MSRBB2.

4.2.5 Einfluss von *S. marcescens* MSRBB2 auf die Wirtspflanze *M. serrata*

Neben den Auswirkungen des Sekundärmetaboliten-Spektrums von *S. marcescens* MSRBB2 auf die koexistierenden Pilzendophyten, stellte sich die Frage ob die produzierten Verbindungen womöglich für die Wirtspflanze *M. serrata* schädlich sind. Da keine lebende *M. serrata* Pflanze zur Verfügung stand, wurden drei verschiedene *Maytenus* Spezies (*M. canariensis*, *M. heterophylla*, *M. senegalensis*) mit einem Blattpunktionstest auf mögliche Schädigungen durch Prodiginine und Serratamolide getestet. Dazu wurden die aufgereinigten Hauptmetabolite Prodigiosin und Serrawettin W1 stellvertretend für die Stoffgruppen verwendet. Abb. 4.2.17 zeigt, dass keiner der Stoffe Läsionen, Nekrose oder andere phytotoxische Effekte an den getesteten Pflanzen verursacht haben. Gerade im Hinblick auf die antimikrobiellen Wirkungen von Prodigiosin, darunter antimykotische Aktivitäten gegen diverse Pflanzenpathogene (Someya *et al.*, 2001 & 2005; Xu *et al.*, 2007; Tan, D. *et al.*, 2015; Danevčič *et al.*, 2016; Su *et al.*, 2017; Jimtha *et al.*, 2017), liegt die Vermutung nahe, dass die Wirtspflanze von den Sekundärmetaboliten von *S. marcescens* MSRBB2 profitiert und geschützt wird. Interessanterweise wird *S. marcescens* nicht durch die Anwesenheit der detektierten Maytansinoide in der Wirtspflanze beeinflusst bzw. inhibiert. Dies bestätigte ebenfalls eine Studie bei der Ansamitocine keine antibakterielle Wirkung bei *S. marcescens* zeigen konnten (Tanida *et al.*, 1980b). Dies lässt eine symbiotische Beziehung zwischen endophytischem *S. marcescens* und *M. serrata* vermuten.

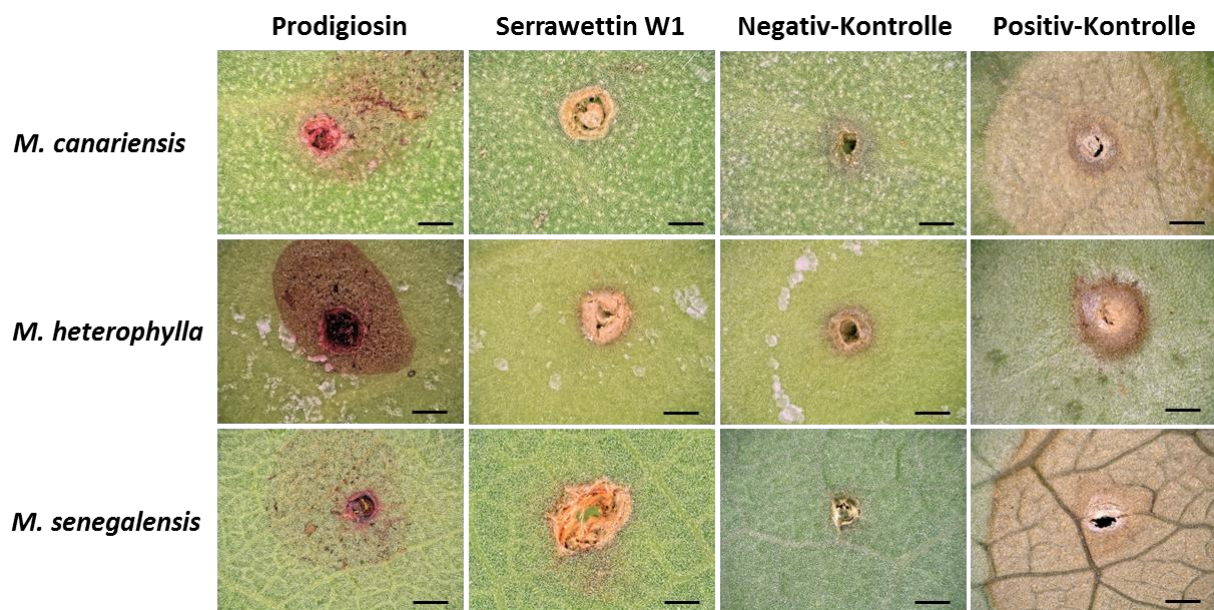


Abb. 4.2.17: Mikroskopische Bilder des Blattpunktionstestes von *M. canariensis*, *M. heterophylla*, und *M. senegalensis* gegen Prodigiosin und Serrawettin W1 nach 6 Tagen (Messbalken = 500 µm). Als Negativ-Kontrolle diente das Lösungsmittel (H₂O:MeOH 4:1, v:v) und als Positiv-Kontrolle für Schädigungen wurde Atrazin verwendet.

4.2.6 Stabile Isotopenmarkierung von Sekundärmetaboliten auf Agar und Visualisierung mittels MALDI-imaging-HRMS

In der Forschung von Prodigininen sowie des Produzenten *S. marcescens* wurde die Biosynthese vor allem zwischen 1950 bis 1973 mittels Markierungsstudien mit ^{13}C -, ^{14}C - und ^{15}N -markierten Vorläufern durchgeführt. Dabei wurden die Studien wie für Markierungsstudien von mikrobiellen Metaboliten üblich, in flüssigem Medium durchgeführt. In der darauffolgenden Zeit wurden hauptsächlich genetische Ansätze verfolgt, wobei der chemische Beweis zum Teil fehlte (Williamson *et al.*, 2006; Su *et al.*, 2017). Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit die Biosynthese, vor allem die der Prodiginine, erneut mittels stabiler Isotopenmarkierung untersucht um den analytischen Beweis sicherzustellen (Kapitel 4.2.2.1). Ausserdem erwies sich MALDI-imaging-HRMS als effektives Werkzeug zum Verständniss der ökologischen Bedeutung der Sekundärmetaboliten. Daraus entwickelte sich die Fragestellung, ob und inwiefern eine Kombination von MALDI-imaging-HRMS und stabiler Isotopenmarkierung direkt auf Agarmedium möglich ist.

Dazu wurde eine Methode erarbeitet und folgende Aspekte untersucht. Werden isotopenmarkierte Vorläufer-Moleküle im Agar in die Sekundärmetaboliten eingebaut? Ist die Einbaurate vergleichbar mit Studien in flüssigem Medium? Kann die Isotopenmarkierung der Sekundärmetabolite direkt auf dem Agar mittels MALDI-imaging-HRMS visualisiert werden? Welche Mengen an Vorläufer-Molekülen ist für einen Einbau notwendig?

Diese Fragestellungen werden in den folgenden Kapiteln geklärt und die entwickelte Methode vorgestellt.

4.2.6.1 Methodenentwicklung – Stabile-Isotopen-Markierung von Sekundärmetaboliten auf Agar

Durch die zuvor durchgeführte Untersuchung der Biosynthesen von Prodigininen und Serratamoliden in flüssigem Nährmedium (NB) war bekannt, dass die stabilen isotoopenmarkierten Vorläufer-Moleküle $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$, $[1-^{13}\text{C}]\text{-L-Prolin}$, $[\text{Methyl-}\text{D}_3]\text{-L-Methionin}$ und $[^{15}\text{N}]\text{-L-Serin}$ eingebaut werden. In flüssigem Nährmedium konnten ausreichend hohe Einbauraten mit Konzentrationen von 1 oder 2 mg/mL erzielt werden. Daher wurden die zwei verschiedenen Agar (PDA und NA) ebenfalls mit 1 mg/mL dotiert. Die Zugabe der isotoopenmarkierten Vorläufer-Moleküle geschah vor dem Autoklavieren. Da stabile isotoopenmarkierte Verbindungen kostenintensiv bzw. speziell synthetisiert werden müssen, wurde zur Einsparung von Material mit kleinen Petrischalen (60 x 15 mm) anstelle der Standardgröße (ca. 94 x 16 mm) gearbeitet.

Abb. 4.2.18 zeigt die methodischen Arbeitsschritte der Probenvorbereitung. Zur weiteren Kosteneinsparung wird zunächst unmarkierter Agar gegossen und sich verfestigen lassen. Danach wird der gleiche Agar, dotiert mit der entsprechenden isotoopenmarkierten Verbindung, als dünne Schicht (1-2 mm) erneut gegossen.

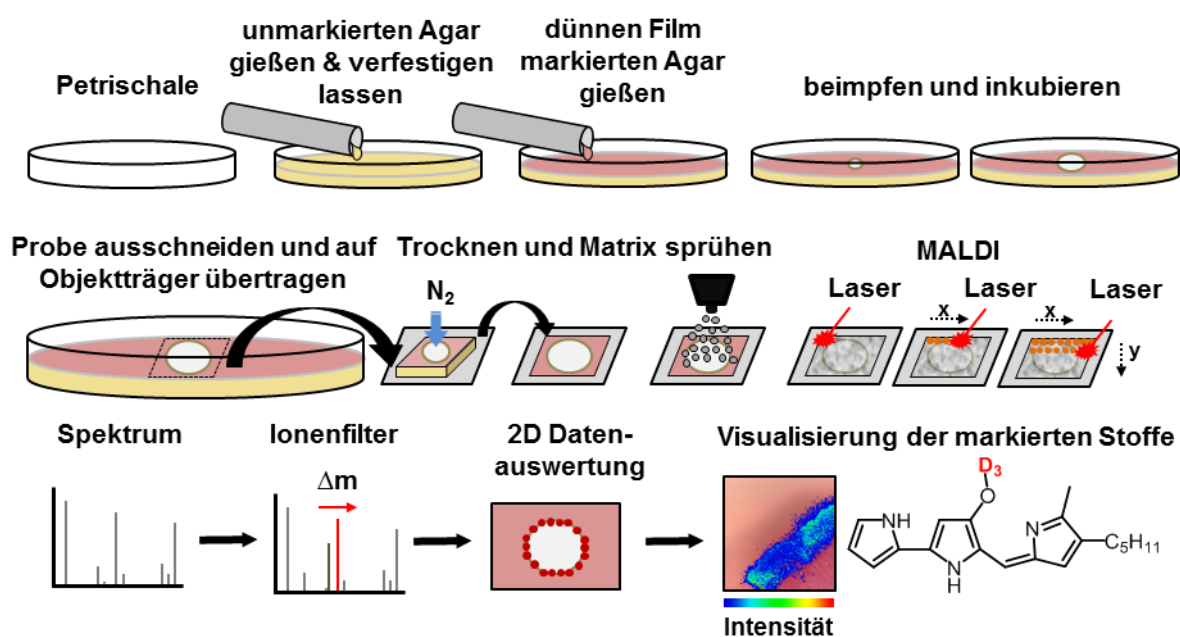


Abb. 4.2.18: Arbeitsschritte für stabile Isotopenmarkierung von Sekundärmetaboliten auf Agar und Visualisierung der örtlichen Verteilung der markierten Stoffe mittels MALDI-imaging-HRMS.

Dies ist die eigentliche Agarschicht, die vom Mikroorganismus zum Wachstum und zur Synthese von Sekundärmetaboliten verwendet wird. Insgesamt sollte der Agar eine Dicke von ca. 5-6 mm aufweisen (3-4 mm unmarkierter Agar). Dies ist notwendig, damit die Probe überhaupt für eine Messung vorbereitet werden kann. Nachdem der Agar beimpft und der Mikroorganismus gewachsen ist, wird die Probe ausgeschnitten und auf einen Objektträger überführt und mit doppelseitigem Klebeband fixiert. Hier zeigte sich, dass der Agar beim Übertragen zerbricht wenn er zu dünn ist. Im Anschluss wird die Probe getrocknet. Dies kann generell an der Luft geschehen, zur

Beschleunigung der Probenvorbereitung wurde jedoch mit einem Stickstoffstrom getrocknet. Erst nachdem das Wasser des Agars verdunstet ist, kann die Probe unter Standardbedingungen mit Matrix besprüht werden. Falls der Agar zu dünn ist, zerbricht er häufig auch während des Trocknungsvorganges. Nach dem Matrixsprühen kann die Probe gemessen werden. Der zumessende Agarbereich sollte quadratisch ausgeschnitten werden. Durch den Trocknungsvorgang reduzieren sich bei quadratischen Proben alle Seiten gleichmäßig. Bei rechteckigen Proben kann sich die Probe verziehen und das gemessene Ionenbild nicht mehr auf das Mikroskopbild der ungetrockneten Probe gelegt werden. Durch die Verwendung kleiner Petrischalen und der Methode einen dünnen Agarfilm (2-3 mL) zu gießen, wurden nur 2-3 mg der isotopenmarkierten Vorläufer-Moleküle verwendet. In den folgenden Kapiteln wird gezeigt, dass bereits diese geringe Menge ausreicht um den Einbau der isotopenmarkierten Verbindungen sowohl mittels MALDI-imaging-HRMS als auch mit Extraktion und HPLC-HRMS zu zeigen.

4.2.5.2 Markierungsstudien von Serratamoliden auf Agar

Im Kapitel 4.2.2.2 konnte der bekannte Einbau von L-Serin in Serrawettin W1 über die Markierungsstudie von $[^{15}\text{N}]$ -L-Serin in Nährlösung gezeigt und für die anderen Serratamolide verifiziert werden (Wasserman *et al.*, 1962, Li *et al.*, 2005; Tanikawa *et al.*, 2006). Zur Untersuchung der stabilen Isotopenmarkierung der Serratamolide auf Agar, wurde daher erneut $[^{15}\text{N}]$ -L-Serin als Zugabe verwendet. Abb. 4.2.19 zeigt die MALDI-imaging-HRMS Ionenbilder von Serrawettin W1 (A, **10**), ein Serratamolid mit längerer Alkylkette (B, **12**) und mit Doppelbindung (C, **17**) auf Kartoffel-Dextrose-Agar. Obwohl die Einbaurrate gering ist, können sowohl für die einfache als auch die zweifache Inkorporation von $[^{15}\text{N}]$ -L-Serin aussagekräftige Ionenbilder generiert werden.

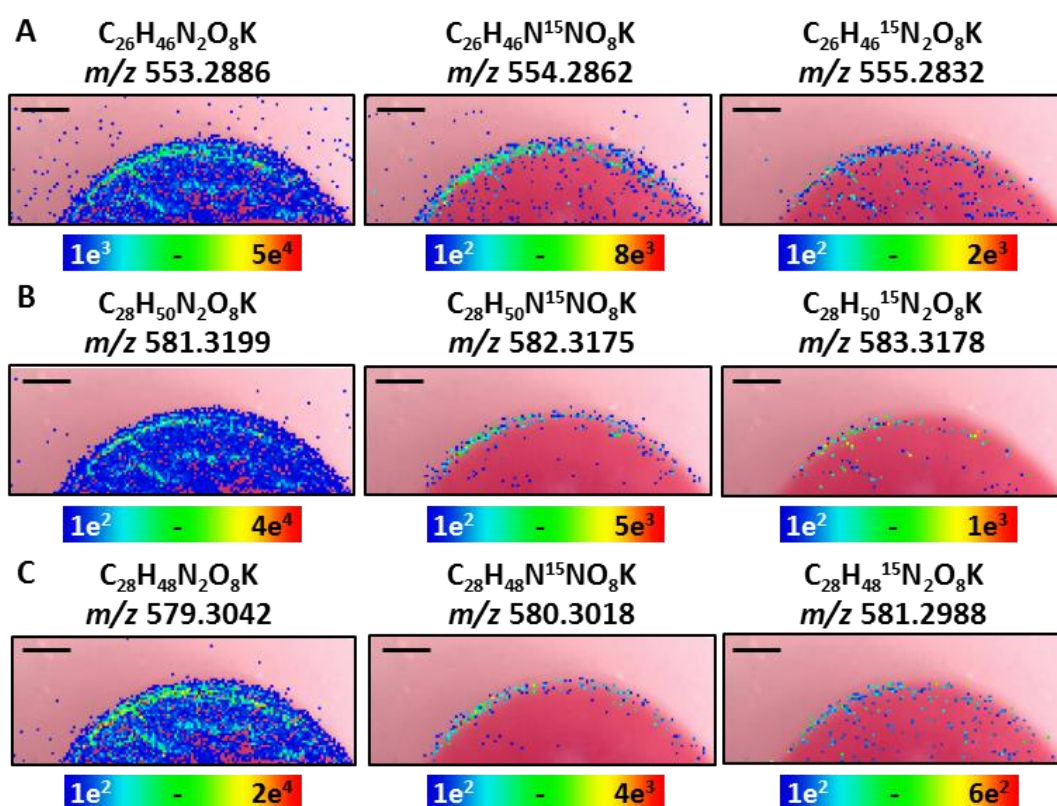


Abb. 4.2.19: MALDI-imaging-HRMS zeigt die Lokalisierung von Serratamoliden (A: Serrawettin W1 (**10**); B: $\text{C}_{10}+\text{C}_{12}$ (**12**); C: $\text{C}_{10}+\text{C}_{12:1}$ (**17**)), produziert von *S. marcescens* MSRBB2 nach 7 Tagen Inkubation auf Kartoffel-Dextrose-Agar mit Zusatz von 1 mg/mL $[^{15}\text{N}]$ -L-Serin. Darstellung von unmarkierten Serratamoliden sowie einfachem und doppeltem Einbau von ^{15}N ($[\text{M}+\text{K}]^+ \pm 3$ ppm). Skala repräsentiert 1 mm.

Tab. 12 zeigt den Vergleich der Peakhöhenverhältnisse der unmarkierten Serratamolide und der monoisotopischen Masse des einmaligen Einbaus von ^{15}N . Dafür wurden jeweils zwei Platten des jeweiligen Agars (NA, PDA), dotiert mit 1 mg/mL $[^{15}\text{N}]$ -L-Serin extrahiert und mittels HPLC-HRMS ausgewertet. Auf Kartoffel-Dextrose-Agar wurden die höchsten Einbauraten erzielt. Speziell im Vergleich der Inkubation in flüssiger Nährlösung (NB) zeigen sich die Vorteile der Isotopenmarkierung von

Sekundärmetaboliten auf Agar. Für die flüssige Inkubation wurden 100 mg [^{15}N]-L-Serin in 50 mL Nährlösung gegeben. Dennoch konnten nicht alle Serratamolide detektiert werden. Für die Markierungsstudie auf Agar wurden dagegen nur insgesamt 4 mg [^{15}N]-L-Serin benötigt. Es wurden jeweils zwei Platten Agar extrahiert mit je 2 mL markierten Agar (dünne Schicht auf unmarkiertem Agar) mit einer Dotierung von 1mg/mL [^{15}N]-L-Serin. Dies unterstreicht die Effizienz und Verbesserung (weniger Substanz/Kosten) der direkten Isotopenmarkierung auf Agar im Vergleich zum flüssigem Medium auch für die Extraktion und HPLC-HRMS-Analyse. Durch die Fixierung der isotopenmarkierten Vorläufer-Moleküle auf Agar und die resultierende Forcierung der Aufnahme durch *S. marcescens* MSRBB2 und Inkorporation in die Serratamolide, konnten speziell auf PDA höhere Einbauraten erzielt werden als in flüssigem Nährmedium. Weitere MALDI-imaging-HRMS Messungen sowie HRMS-Spektren der Serratamolide sind im Anhang hinterlegt (Abb. S186-S200, S245-S290).

Tab. 12: Peakhöhenverhältnisse von markierten und unmarkierten Serratamoliden ($1 \times ^{15}\text{N}$ zur unmarkierten Stoffmasse in %), produziert von *S. marcescens* MSRBB2 auf Agar (NA, PDA) und in Nährlösung (NB) mit Zusatz von [^{15}N] -L-Serin nach Extraktion und HPLC-HRMS (n.n. = nicht nachweisbar).

Serratamolid Nr. Summen- formel		Signalintensitäten in Bezug auf M [%] ^{15}N -L-Serin		
		NA 1 mg/mL [%]	PDA 1 mg/mL [%]	NB 2 mg/mL [%]
10	$\text{C}_{26}\text{H}_{46}\text{N}_2\text{O}_8$	10	29	18
11	$\text{C}_{27}\text{H}_{48}\text{N}_2\text{O}_8$	10	29	16
12	$\text{C}_{28}\text{H}_{50}\text{N}_2\text{O}_8$	13	25	20
13	$\text{C}_{29}\text{H}_{52}\text{N}_2\text{O}_8$	15	23	16
14	$\text{C}_{30}\text{H}_{54}\text{N}_2\text{O}_8$	13	25	17
16	$\text{C}_{27}\text{H}_{46}\text{N}_2\text{O}_8$	19	24	n.n.
17	$\text{C}_{28}\text{H}_{48}\text{N}_2\text{O}_8$	18	31	18
18	$\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{N}_2\text{O}_8$	18	32	n.d.
19	$\text{C}_{30}\text{H}_{52}\text{N}_2\text{O}_8$	17	27	16
20	$\text{C}_{26}\text{H}_{48}\text{N}_2\text{O}_9$	14	33	21
21	$\text{C}_{27}\text{H}_{50}\text{N}_2\text{O}_9$	13	29	n.d.
22	$\text{C}_{28}\text{H}_{52}\text{N}_2\text{O}_9$	13	28	19
23	$\text{C}_{28}\text{H}_{50}\text{N}_2\text{O}_9$	13	29	19
25	$\text{C}_{29}\text{H}_{54}\text{N}_2\text{O}_9$	13	31	n.d.
26	$\text{C}_{30}\text{H}_{56}\text{N}_2\text{O}_9$	12	28	17
27	$\text{C}_{31}\text{H}_{58}\text{N}_2\text{O}_9$	12	22	n.d.
28	$\text{C}_{29}\text{H}_{52}\text{N}_2\text{O}_9$	15	28	n.d.
29	$\text{C}_{30}\text{H}_{54}\text{N}_2\text{O}_9$	15	29	15
30	$\text{C}_{31}\text{H}_{56}\text{N}_2\text{O}_9$	15	28	n.d.
31	$\text{C}_{13}\text{H}_{25}\text{NO}_5$	10	20	18
32	$\text{C}_{15}\text{H}_{29}\text{NO}_5$	11	20	17
33	$\text{C}_{15}\text{H}_{27}\text{NO}_5$	13	23	18

4.2.6.3 Markierungsstudien von Prodigininen auf Agar

Durch die Markierungsstudien in flüssigem Nährmedium (Kapitel 4.2.2.1) war bekannt, dass die stabilen isotoptenmarkierten Vorläufer-Moleküle $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$, $[1-^{13}\text{C}]\text{-L-Prolin}$, $[\text{Methyl-D}_3]\text{-L-Methionin}$ und $[^{15}\text{N}]\text{-L-Serin}$ in Prodigiosin und die Alkylketten-Derivate (Abb. 4.2.1, 1-7) eingebaut werden. Zur Untersuchung der Methode wurden sowohl Nähragar als auch Kartoffel-Dextrose-Agar, jeweils mit Zugabe der markierten Vorläufer-Moleküle, mit *S. marcescens* MSRBB2 beimpft, inkubiert und mittels MALDI-imaging-HRMS analysiert.

Abb. 4.2.20 zeigt die Zusammenfassung der Isotoptenmarkierung. Dargestellt sind die Ionenbilder der monoisotoptischen Massen der verschiedenen eingebauten Vorläufer (A, C) in den Hauptmetaboliten Prodigiosin sowie die Ionenbilder der Masse von unmarkiertem Prodigiosin zum Vergleich (B, D) auf Nähragar (A, B) und Kartoffel-Dextrose-Agar (C, D). Aufgrund der hohen Massenaufösung und Genauigkeit kann der ^{15}N Einbau von der natürlichen ^{13}C -monoisotoptischen Masse mit den angelegten Ionenfilter (± 2 ppm) unterschieden werden. Die hohen gemessenen Intensitäten der Massen mit ^{15}N Einbau im Vergleich zur unmarkierten Masse bestätigen die Inkorporation von $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ und $[^{15}\text{N}]\text{-L-Serin}$. Die Markierung mit $[1-^{13}\text{C}]\text{-L-Prolin}$ überlagert naturgemäß den natürlichen ^{13}C -Isotoptenpeak. Aufgrund der hohen Ionenintensität (ca. 80%) kann der Einbau jedoch visualisiert werden. Die natürliche ^{13}C -Häufigkeit im Vergleich zur ^{12}C -Häufigkeit beträgt bei Prodigiosin ca. 22%. Im Idealfall sollten daher Isotoptenmarkierungen mit einer Massenverschiebung von mehr als 2 Da verwendet werden um Überlagerungen mit den natürlichen M+1 und M+2 ^{13}C -monoisotoptischen Massen auszuschließen. Dies wurde erfolgreich mit dem Einbau der D_3 -Methylgruppe von $[\text{Methyl-D}_3]\text{-L-Methionin}$ in Prodigiosin gezeigt. Die Ionenintensitäten zeigen, dass die Einbaurrate über 100% liegt.

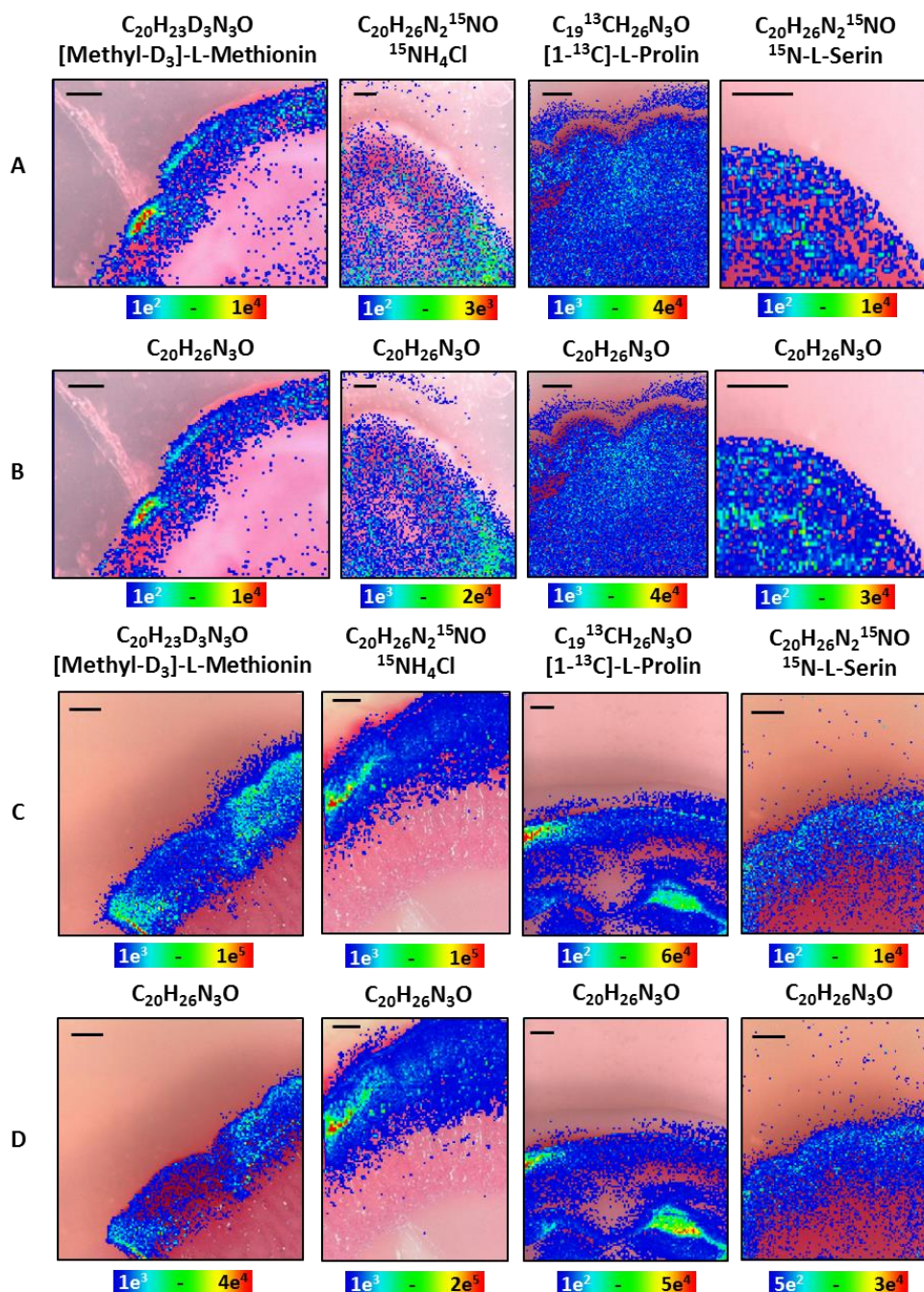


Abb. 4.2.20: MALDI-imaging-HRMS zeigt die Lokalisierung von markiertem (A, C) und unmarkiertem (B, D) Prodigiosin (3 , $[M+H]^+ \pm 2$ ppm) auf Nähragar (A, B) und Kartoffel-Dextrose-Agar (C, D), produziert von *S. marcescens* MSRBB2 nach 7 Tagen Inkubation. Der Agar wurde mit 1 mg/mL $^{15}NH_4Cl$, [1- ^{13}C]-L-Prolin, [Methyl- D_3]-L-Methionin und [^{15}N]-L-Serin versetzt. Skala repräsentiert 1 mm.

Neben Prodigiosin konnte der Einbau von [1- ^{13}C]-L-Prolin und [Methyl- D_3]-L-Methionin für die am stärksten produzierten Prodiginine ($2-5$) ebenfalls gezeigt werden. Abb. 4.2.21A und C zeigen die Visualisierung der isotopenmarkierten Prodiginine. Der Einbau und die resultierende Massenverschiebung durch die D_3 -Methylgruppe kann eindeutig gezeigt werden. Der Einbau von [1- ^{13}C]-L-Prolin überlagert den natürlichen ^{13}C -Peak. Die erhöhte Intensität dieser Masse hebt sich jedoch deutlich von den Massen der unmarkierten Prodiginine bzw. der natürlichen ^{13}C Intensität ab (Vgl.

Abb. S291 im Anhang). Für die Zugabe der Aminosäuren L-Prolin und L-Methionin wurde eine verstärkte Pigmentproduktion berichtet (Qadri & Williams 1970). Dieser Effekt konnte in den Markierungsstudien bestätigt werden. Um den Einbau der Markierung neben den Ionenfiltern der monoisotopischen Massen noch eindeutiger zu verifizieren, wurden MALDI-imaging-HRMS² Messungen von D₃-markiertem Prodigiosin (Abb. 4.2.21B) durchgeführt. Die charakteristischen Fragmente bestätigen die Inkorporation. Weitere MALDI-imaging-HRMS Messungen von biologischen Replikate und Kontroll-Ansätzen sind im Anhang platziert (Abb. S292-324).

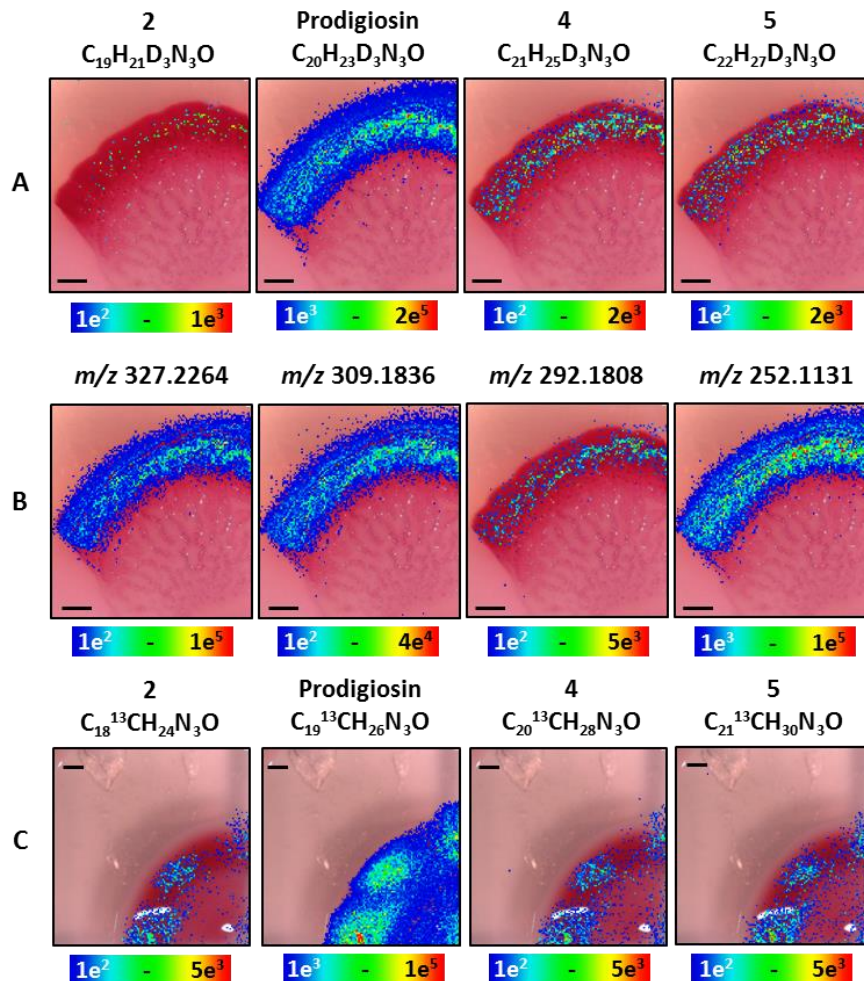


Abb. 4.2.21: MALDI-imaging-HRMS zeigt die Lokalisierung von markierten Prodigininen (A, C; **2-5**, $[M+H]^+ \pm 2$ ppm) auf Kartoffel-Dextrose-Agar, produziert von *S. marcescens* MSRBB2 nach 7 Tagen Inkubation. Der Agar wurde mit 1 mg/mL [Methyl-D₃]-L-Methionin (A, B) und [1-¹³C]-L-Prolin (C) markiert. MALDI-imaging-HRMS² von markiertem Prodigiosin ([Methyl-D₃]-L-Methionin, (B), $C_{20}H_{23}D_3N_3O$, $[M+H]^+ \pm 3$ ppm). Skala repräsentiert 1 mm.

Durch Vergleich der Ionenbilder und Intensitäten von markiertem und unmarkiertem Prodigiosin kann die Einbaurate bereits mittels MALDI-imaging-HRMS berechnet werden (Abb. 4.2.20). Um die Einbauraten zu berechnen, wurden je 1-2 Petrischalen von NA und PDA mit den verschiedenen markierten Vorläufer-Molekülen mit *S. marcescens* MSRBB2 inkubiert, extrahiert und die Peakhöhenverhältnisse mittels

HPLC-HRMS ausgewertet. Tab. 13 zeigt die Einbauraten der Prodiginine und MBC, dem Intermediat der Prodiginine, für die verschiedenen Markierungsversuche. In der Tendenz wurden die Vorläufer-Moleküle stärker auf dem Kartoffel-Dextrose-Agar als auf Nähragar eingebaut. Der Einbau von $[1-^{13}\text{C}]$ -L-Prolin ist hoch genug, um sich von der natürlichen ^{13}C -Häufigkeit deutlich zu unterscheiden (ca. 22%). Die Abhängigkeit von verwendeter Konzentration der Markierungssubstanz und Höhe der Einbaurate wurde durch $[\text{Methyl-D}_3]$ -L-Methionin gezeigt (0.5, 1, 2 mg/mL). Wie zu erwarten steigt die Einbaurate mit der Konzentration. Interessanterweise, reichen jedoch bereits 0.5 mg/mL $[\text{Methyl-D}_3]$ -L-Methionin (1-1.5 mg pro Petrischale) um aussagekräftige Markierungsraten zu erzielen. Dies zeigt die Vorteile dieser Methode gegenüber der üblichen Markierungsversuche in flüssigem Medium. Für analoge Aussagen über die Biosynthese der Prodiginine wurden in flüssigen Nährmedium mindestens 50 mg markierte Vorläufer-Moleküle (1 mg/mL) verwendet. Der Einbau von ^{15}N durch Zugabe von $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ und $[^{15}\text{N}]$ -L-Serin war unter 30%. Zusätzlich konnten die Markierungen für das Intermediat der Prodiginin-Biosynthese MBC (4-Methoxy-2,2'-bipyrrrol-5-carbaldehyd) gezeigt werden. Alle HRMS-Spektren des Vergleiches der Peakhöhenverhältnisse sind im Anhang hinterlegt (Abb. S325-S405).

Tab. 13: Peakhöhenverhältnisse von markierten und unmarkierten Prodigininen und MBC (relativ zur unmarkierten Stoffmasse in %), produziert von *S. marcescens* MSRBB2 auf Agar (NA, PDA) mit Zusatz von $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$, $[1-^{13}\text{C}]$ -L-Prolin, $[\text{Methyl-D}_3]$ -L-Methionin und $[^{15}\text{N}]$ -L-Serin nach Extraktion und HPLC-HRMS (n.n. = nicht nachweisbar).

Prodiginin	Agar	Signalintensitäten in Bezug auf M [%]					
		$^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ 1 mg/mL	$[1-^{13}\text{C}]$ -L-Prolin 1 mg/mL	^{15}N -L-Serin 1 mg/mL	$[\text{Methyl-D}_3]$ -L-Methionin		
					0.5 mg/mL	1 mg/mL	2 mg/mL
(1) 2-Methyl-3-propyl-P.	NA	10	84	18	128	215	439
(2) 2-Methyl-3-butyl-P.	NA	10	66	21	170	227	472
(3) 2-Methyl-3-pentyl-P.	NA	11	72	23	174	202	478
(4) 2-Methyl-3-hexyl-P.	NA	15	87	23	155	202	445
(5) 2-Methyl-3-heptyl-P.	NA	15	91	21	145	201	429
(6) 2-Methyl-3-octyl-P.	NA	8	83	18	n.n.	n.n.	464
(7) 2-Methyl-3-nonyl-P.	NA	8	79	19	n.n.	n.n.	456
MBC	NA	-	71	8	169	204	466
(1) 2-Methyl-3-propyl-P.	PDA	11	118	25	91	329	>1000
(2) 2-Methyl-3-butyl-P.	PDA	11	113	25	92	275	816
(3) 2-Methyl-3-pentyl-P.	PDA	16	126	28	95	252	744
(4) 2-Methyl-3-hexyl-P.	PDA	16	119	27	90	249	798
(5) 2-Methyl-3-heptyl-P.	PDA	15	133	27	88	238	713
(6) 2-Methyl-3-octyl-P.	PDA	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
(7) 2-Methyl-3-nonyl-P.	PDA	n.n.	n.n.	n.n.	93	329	>1000
MBC	PDA	-	102	16	88	278	703

Zusammenfassend konnte mit der entwickelten Methode gezeigt werden, dass bereits geringe Mengen isotoopenmarkierte Vorläufer-Moleküle für die Isotoopenmarkierung von Sekundärmetaboliten auf Agar sowie die direkte Visualisierung der örtlichen Verteilung mittels MALDI-imaging-HRMS ausreichen. Die Extraktion der Platten und Analyse mittels HPLC-HRMS zeigte sich bei den untersuchten Sekundärmetaboliten und Markierungen in Bezug auf die Einsatzmenge deutlich im Vorteil zu der Standardmethode für Markierungsstudien in flüssigem Medium. Grundsätzlich liefert die direkte Visualisierung der Isotoopenmarkierung nicht nur die räumliche Verteilung sondern durch die Detektion eingebauter Vorläufer-Moleküle direkte Einblicke in die Biosynthese der entsprechenden Sekundärmetaboliten. Zusätzlich konnte eine Abhängigkeit der Einbaurrate und der Konzentration der markierten Vorläufer-Moleküle gezeigt werden. Die entwickelte Kombination aus MALDI-imaging-HRMS und Isotoopenmarkierung kann auf jedwede Art von Isotoopenmarkierung, auf verschiedene feste Agarmedien, Sekundärmetaboliten und Mikroorganismen angewendet werden.

5. Schlussfolgerung und Ausblick

Der Fokus dieser Arbeit lag auf dem Einsatz und der Anwendung massenspektrometrischer und bildgebender Verfahren zur Untersuchung von pflanzlichen und bakteriellen Sekundärmetaboliten. Hierbei zeigten sich die Vorteile und die Nützlichkeit hochauflösender Massenspektrometrie für die Naturstoffforschung. Insbesondere bei geringen Konzentrationen der Zielmoleküle, wie im Fall der Maytansinoide (ca. 1mg/kg Pflanzenmaterial) in verschiedenen *Maytenus* und *Putterlickia* Pflanzen ermöglichte die hohe Empfindlichkeit der Massenspektrometer die Identifizierung und Strukturbestätigung der Verbindungen. Aufgrund intensiver MSⁿ-Experimente wurden in dieser Arbeit sowohl bekannte Maytansinoide, zwei unbekannte hydroxilierte Derivate als auch unbekannte Vorläufer-Moleküle bzw. Intermediate der Maytansine-Biosynthese identifiziert. Die erarbeiteten Fragmentierungswege können in Zukunft zur Strukturbestätigung und Identifizierung herangezogen werden.

Die Aufklärung der Maytansine-Biosynthese in *M. serrata* zeigte, dass sich die Art des Biosyntheseweges in verschiedenen Spezies grundsätzlich voneinander unterscheiden können, womöglich sogar innerhalb einer Spezies. Kurz vor dem Beginn dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die endophytische Gemeinschaft der Wurzeln von *Putterlickia verrucosa* und *Putterlickia retrospinosa* für die Maytansine-Produktion in diesen Pflanzen verantwortlich ist (Kusari *et al.*, 2014a). Dagegen wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass die Biosynthese in *M. serrata* zwischen der endophytischen Gemeinschaft der Stammrinde und der Wirtspflanze zusammen mit ihren kryptischen Endophyten aufgeteilt ist. Im Vergleich sind dies zwei grundsätzlich verschiedene ökologische Beziehungen zwischen Endophyten und Wirtspflanze sowie Biosyntheserouten. Um weitere Einblicke in diese Themengebiete zu erlangen, könnten in der Zukunft die Maytansinoid-Biosynthesewege in weiteren *Maytenus* Spezies untersucht werden, z.B. in *Maytenus heterophylla* oder *Maytenus senegalensis*, zwei Spezies die im Screening sowohl relativ hohe Maytansinoid-Gehalte als auch Variabilität in der Detektierbarkeit der Zielverbindungen zeigten.

Die Untersuchung der Samen- und Keimungsphasen von *P. verrucosa* und *M. senegalensis* lieferte die folgenden neuen Erkenntnisse. Für zwei *M. senegalensis* Pflanzen konnte gezeigt werden, dass in den Mutterpflanzen kein Maytansine produziert wurde, jedoch in den Samen und den Keimlingen (Eckelmann *et al.*, 2017). Die Abhängigkeit der Maytansine-Biosynthese für spezifische Lebensabschnitte bzw. Gewebe liefert eine neue Erklärung für die bekannte Variabilität in der Präsenz der Zielmoleküle in verschiedenen Pflanzen einer Spezies (Pullen *et al.*, 2003). Des Weiteren konnte die ökologische Bedeutung der Maytansinoide für die Wirtspflanzen aus der örtlichen bzw. zeitlichen Verteilung, speziell während der Samen- und Keimungsphasen als chemische Abwehrstoffe vor biotischen Gefahren abgeleitet werden. Hieraus ergeben sich für die Zukunft weitere Forschungsansätze. Zum einen könnte untersucht werden, ob die an der Maytansinoid-Biosynthese beteiligten endophytischen Gemeinschaften einem vertikalen Transfer von den Mutterpflanzen über die Samen hin zur nächsten Generation der Tochterpflanzen (Keimlinge) unterliegen. Zum anderen könnten die biologischen und molekularen Auslöser für die Biosynthese in spezifischen Geweben bzw. Lebensabschnitten erforscht werden.

Das zweite Themengebiet dieser Arbeit war die Untersuchung der Interaktion von *S. marcescens* und koexistierender Pilzendophyten, alle isoliert aus derselben Wirtspflanze *M. serrata*. Der Ansatz, die Bedingungen bzw. Verhältnisse die in der Natur bzw. in der ökologischen Nische des Organismus vorherrschen nachzuahmen und *S. marcescens* nicht als Reinkultur zu untersuchen, erwies sich als zielführend. Dabei zeigte sich, dass *S. marcescens* die Pilzendophyten aus derselben ökologischen Nische selektiv erkennt und die Prodiginin-Biosynthese durch die Präsenz der Pilze aktiviert wird. Bei Co-Kultivierungen mit Pilzen derselben Genera, die nicht aus derselben Wirtspflanze stammen, trat diese Korrelation nicht auf. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass der gebildete Hauptmetabolit Prodigiosin das Pilzwachstum inhibiert. Die selektive Erkennung zusammen mit der Inhibierung des Wachstums veranschaulicht die ökologische Rolle der Prodiginine als Allelochemikalien bzw. chemische Abwehrverbindungen im Antagonismus von *S. marcescens* und den Pilzendophyten. Zusätzlich konnte die physiologische Rolle der Serratamolide als Biotenside, die die Ausbreitung und Kolonisierung neuer Oberflächen durch *S. marcescens* verbessern, *in situ* mittels MALDI-imaging-HRMS visualisiert werden.

Sowohl im Themengebiet der Maytansinoide als auch bei der Untersuchung von *S. marcescens* erwies sich das bildgebende Verfahren MALDI-imaging-HRMS als nützliches analytisches Werkzeug zur Aufklärung verschiedener Fragestellungen. Die Visualisierung der örtlichen Verteilung von Molekülen *in situ* ermöglicht durch das spezifische Muster der Verteilung neue Einblicke in verschiedene Themengebiete. Es können durch die Ableitung des Einsatzortes von Sekundärmetaboliten Rückschlüsse auf die ökologische Bedeutung der Stoffe für den Produzenten getroffen werden und die Orte der Biosynthese oder der Transport von Stoffen innerhalb verschiedener Gewebe visualisiert werden.

Speziell für die Interaktion von Mikroorganismen wird sich MALDI-imaging-HRMS als analytische Technik zur Visualisierung von Sekundärmetaboliten und Vorläufer-Molekülen, Untersuchung der chemischen Kommunikation, Aufklärung von Biosynthesewegen oder der Untersuchung ökologischer Beziehungen wie Antagonismus oder Symbiose, durchsetzen.

6. Literaturverzeichnis

- Agrawal, T. & Kotasthane, A. S. Chitinolytic assay of indigenous *Trichoderma* isolates collected from different geographical locations of Chhattisgarh in Central India. *SpringerPlus* **1**:73 (2012).
- Ahmed, M. S., Fong, H. H. S., Soejarto, D. D., Dobberstein, R. H., Waller, D. P. & Moreno-Azorero, R. High-performance liquid chromatographic separation and quantitation of maytansinoids in *Maytenus ilicifolia*. *J Chromatogr* **213**(2), 340-344 (1981).
- Alibrandi, P. *et al.* The seed endosphere of *Anadenanthera colubrina* is inhabited by a complex microbiota, including *Methylobacterium* spp. and *Staphylococcus* spp. with potential plant-growth promoting activities. *Plant Soil* 1-19 (2017).
- Anderson, D. M., Carolan, V. A., Crosland, S., Sharples, K. R. & Clench, M. R. Examination of the distribution of nicosulfuron in sunflower plants by matrix-assisted laser desorption/ionisation mass spectrometry imaging. *Rapid Commun Mass Spectrom* **23**, 1321-1327 (2009).
- Aucken, H. M. & Pitt, T. L. Antibiotic resistance and putative virulence factors of *Serratia marcescens* with respect to O and K serotypes. *J Med Microbiol* **47**, 1105-1113 (1998).
- Audi, G. & Wapstra, A. H. The 1993 Atomic mass evaluation. 1. Atomic mass table. *Nucl Phys A* **565**, 1-65 (1993).
- Audi, G. & Wapstra, A. H. The 1995 update to the atomic mass evaluation. *Nucl Phys A* **595**, 409-480 (1995).
- Bakker, P. A., Berendsen, R. L., Doornbos, R. F., Wintermans, P. C. & Pieterse, C. M. The rhizosphere revisited: root microbiomics. *Front Plant Sci* **4**, 1-7 (2013).
- Bakker, M. G., Chaparro, J. M., Manter, D. K. & Vivanco, J. M. Impacts of bulk soil microbial community structure on rhizosphere microbiomes of *Zea mays*. *Plant Soil* **392**, 115-126 (2015).
- Balerna, M., Keller-Schierlein, W., Martius, C., Wolf, H. & Zöhner, H. Metabolic products of microorganisms. 72. Naphthomycin, an antimetabolite of vitamin K. *Arch Mikrobiol* **65**, 303-317 (1969).
- Basit, F., Cristofanon, S. & Fulda, S. Obatoclastin (GX15-070) triggers necroptosis by promoting the assembly of the necrosome on autophagosomal membranes. *Cell Death Differ* **20**, 1161-1173 (2013).
- Bentley, S. D. *et al.* Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature* **417**(6885), 141-147 (2002).
- Berendsen, R. L., Pieterse, C. M. & Bakker, P.A. The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends Plant Sci* **17**, 478-486 (2012).
- Bewley, J.D. Seed germination and dormancy. *Plant Cell* **9**(7), 1055-1066 (1997).

- Bhandari, D. R., Schott, M., Römpf, A., Vilcinskas, A. & Spengler, B. Metabolite localization by atmospheric pressure high-resolution scanning microprobe matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry imaging in whole-body sections and individual organs of therove beetle *Paederus riparius*. *Anal Bioanal Chem* **407**(8), 2189-2201 (2015).
- Bjarnholt, N., Li, B., D'Alvise, J. & Janfelt, C. Mass spectrometry imaging of plant metabolites – principles and possibilities. *Nat Prod Rep* **31**, 818-837 (2014).
- Blum, R. H. *et al.* A therapeutic trial of Maytansine. *Cancer Clin. Trials* **1**(2), 113-117 (1978).
- Bode, H. B., Bethe, B., Höfs, R. & Zeeck, A. Big effects from small changes: possible ways to explore nature's chemical diversity. *ChemBioChem* **3**, 619-627 (2002).
- Borges, R.M., Bessière, J.-M. & Hossaert-McKey, M. The chemical ecology of seed dispersal in monoecious and dioecious figs. *Funct Ecol* **22**, 484-493 (2008).
- Borodina, I. *et al.* Genome-scale analysis of *Streptomyces coelicolor* A3(2) metabolism. *Genome Res* **15**(6), 820-829 (2005).
- Boughton, B. A., Thinagaran, D., Sarabia, D., Bacic, A. & Roessner, U. Mass spectrometry imaging for plant biology: a review. *Phytochem Rev* **15**, 445-488 (2016).
- Boyd M. R. & Paull, K. D. Some practical considerations and applications of the national cancer institute in vitro anticancer drug discovery screen. *Drug Dev Res* **34**(2), 91-109 (1995).
- Braune, W., Leman, A. & Taubert, H. Pflanzenanatomisches Praktikum I. Zur Einführung in die Anatomie der Samenpflanzen. 9. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg 2009.
- Brossi, A. The alkaloids, chemistry and pharmacology, Vol. 25, 142-156. Academic Press Inc., London (1985).
- Bull, J. J, Crandall, C., Rodriguez, A. & Krone, S. M. Models for the directed evolution of bacterial allelopathy: bacteriophage lysins. *PeerJ* **3**, e879 (2015).
- Bu'Lock, J. D. Intermediary metabolism and antibiotic synthesis. *Annu Rev Microbiol* **3**, 293-342 (1961).
- Calvori, C., Frontali, L., Leoni, L. & Tecce, G. Effect of rifamycin on protein synthesis. *Nature* **207**, 417-418 (1965).
- Carbonell, G. V., Della Colleta, H. H., Yano, T., Darini, A. L., Levy, C. E. & Fonseca, B. A. Clinical relevance and virulence factors of pigmented *Serratia marcescens*. *FEMS Immunol Med Microbiol* **28**(2), 143-149 (2000).
- Caroll, B. J., Moss, S. J., Bai, L., Kato, Y., Toelzer, S., Yu, T. W. & Floss, H. G. Identification of a set of genes involved in the formation of the substrate for the incorporation of the unusual “glycolate” chain extension unit in ansamitocin biosynthesis. *J Am Chem Soc* **124**(16), 4176-4177 (2002).
- Cartwright, N. J. The structure of serratamic acid. *Biochem J* **67**, 663-669 (1957).

Cassady, J. M., Chan, K. K., Floss, H. G. & Leistner, E. Recent developments in the maytansinoid antitumor agents. *Chem Pharm Bull* **52**, 1-26 (2004).

Chaoming, L., Bingjun, L., Shengji, P., Yunli, Z., Liyun, H. & Yiming, Y. Chemical analysis and plant sources of maytansinoids. *Acta Bot Sinica* **25**(4), 363-369 (1983).

Chaurand, P., Schwartz, S. A. & Caprioli, R. M. Imaging mass spectrometry: a new tool to investigate the spatial organization of peptides and proteins in mammalian tissue sections. *Curr Opin Chem Biol* **6**, 676-681 (2002).

Chen, K. *et al.* Unusual odd-electron fragments from even-electron protonated prodiginine precursors using positive-ion electrospray tandem mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom* **12**, 1856-1866 (2008).

Chithra, S., Jasim, B., Sachidanandan, P., Jyothis, M. & Radhakrishnan, E. K. Piperine production by endophytic fungus *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from *Piper nigrum*. *Phytomedicine* **21**(4), 534-540 (2014).

Compant, S., Mitter, B., Colli-Mull, J. G., Gangl, H. & Sessitsch, A. Endophytes of grapevine flowers, berries, and seeds: Identification of cultivable bacteria, comparison with other plant parts, and visualization of niches of colonization. *Microb Ecol* **62**, 188-197 (2011).

Curl, E. A. & Truelove, B. The Rhizosphere. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg 1986.

Cushley, R. J., Anderson, D. R., Lipsky, S. R., Sykes, R. J. & Wasserman, H. H. Carbon-13 Fourier transform nuclear magnetic resonance spectroscopy. II. Pattern of biosynthetic incorporation of [1-¹³C]- and [2-¹³C]acetate into prodigiosin. *J Am Chem Soc* **93**, 6284-6286 (1971).

Dalisay, D. S. *et al.* Dirigent protein-mediated lignan and cyanogenic glucoside formation in flax seed: integrated omics and MALDI mass spectrometry imaging. *J Nat Prod* **78**, 1231-1242 (2015).

Dalling, J. W., Davis, A. S., Schutte, B. J. & Arnold, A. E. Seed survival in soil: Interacting effects of predation, dormancy and the soil microbial community. *J Ecol* **99**, 89-95 (2011).

Danevčič, T., Vezjak, M. B., Zorec, M. & Stopar, D. Prodigiosin - A multifaceted *Escherichia coli* antimicrobial agent. *PLoS ONE* **11**, e0162412 (2016).

Datta, S. *et al.* Root hairs: development, growth and evolution at the plant-soil interface. *Plant Soil* **346**, 1-14 (2011).

Demain, A. L. Why do microorganisms produce antimicrobials? In fifty years of antimicrobials: Past perspectives and future trends. Symposium 53, Hunter, P. A., Darby, G. K. & Russell, N. J. (eds). Cambridge: Society for General Microbiology, 205-228 (1995).

Darshan, N. & Manonmani, H. K. Prodigiosin and its potential applications. *J Food Sci Technol* **52**(9), 5393-5407 (2015).

- Darshan, N. & Manonmani, H. K Prodigiosin inhibits motility and activates bacterial cell death revealing molecular biomarkers of programmed cell death. *AMB Express* **6**(50) (2016).
- De Bary, A. Hofmeister's Handbuch der Physiologischen Botanik: Morphologie und Physiologie der Pilze, Flechten und Myxomyceten (Band 2), Leipzig: Wilhelm Engelmann (1866).
- Ding, M. & Williams, R. P. Biosynthesis of prodigiosin by white strains of *Serratia marcescens* isolated from patients. *J Clin Microbiol* **17**, 476-480 (1983).
- Dong, Y. *et al.* Sample preparation for mass spectrometry imaging of plant tissues: A review. *Front Plant Sci* **7**, 60 (2016).
- Drathen, A. *et al.* Genetic engineering of silaffin-like peptides for binding and precipitating siliceous materials. *ChemistrySelect* **1**, 4765-4771 (2016).
- Dunham, S. J., Ellis, J. F., Li, B. & Sweedler, J. V. Mass spectrometry imaging of complex microbial communities. *Acc Chem Res* **50**, 96-104 (2017).
- Dwivedi, D. *et al.* Antimycobacterial serratamolides and diacyl peptoglucosamine derivatives from *Serratia* sp. *J Nat Prod* **71**, 637-41 (2008).
- Ebrahim W. *et al.* Metabolites from the fungal endophyte *Aspergillus austroafricanus* in axenic culture and in fungal–bacterial mixed cultures. *J Nat Prod* **79**(4), 914-922 (2016).
- Eckelmann, D., Kusari, S. & Spiteller, M. Occurrence and spatial distribution of maytansinoids in *Putterlickia pyracantha*, an unexplored resource of anticancer compounds. *Fitoterapia* **113**, 175-181 (2016).
- Eckelmann, D. Kusari, S. & Spiteller, M. Spatial profiling of maytansine during the germination process of *Maytenus senegalensis* seeds. *Fitoterapia* **119**, 51-56 (2017).
- Ehring, H., Karas, M. & Hillenkamp, F. Role of photoionization and photochemistry in ionization processes of organic molecules and relevance for matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *Org Mass Spectrom* **27**, 472-480 (1992).
- El-Elimat, T., Raja, H. A., Graf, T. N., Faeth, S. H., Cech, N. B. & Oberlies, N. H. Flavonolignans from *Aspergillus iizukae*, a fungal endophyte of milk thistle (*Silybum marianum*). *J Nat Prod* **77**(2), 193-199 (2014).
- Enomoto, H. *et al.* Visualisation of abscisic acid and 12-oxo-phytodienoic acid in immature *Phaseolus vulgaris* L. seeds using desorption electrospray ionisation-imaging mass spectrometry. *Sci Rep* **7**, 42977 (2017).
- Evert, R. F. Esaus Pflanzenanatomie. Meristeme, Zellen und Gewebe der Pflanzen – ihre Struktur, Funktion und Entwicklung. 3. Edition, John Wiley and Sons 2006, Walter de Gruyter GmbH & Co. KG 2009.
- Fang, J. & Dorrestein, P. C. Emerging mass spectrometry techniques for the direct analysis of microbial colonies. *Curr Opin Microbiol* **19**, 120-129 (2014).

- Fehér, D., Barlow, R. S., Lorenzo, P. S. & Hemscheidt, T. K. A 2-substituted prodiginine, 2-(p-hydroxybenzyl)prodigiosin, from *Pseudoalteromonas rubra*. *J Nat Prod* **71**, 1970-1972 (2008).
- Fenner, M. & Thompson, K. The ecology of seeds. Cambridge: Cambridge University Press., 250, (2005).
- Ferreira, A., Quecine, M. C., Lacava, P. T., Oda, S., Azevedo, J. L. & Araújo, W. L. Diversity of endophytic bacteria from *Eucalyptus* species seeds and colonization of seedlings by *Pantoea agglomerans*. *FEMS Microbiol Lett* **287**, 8-14 (2008).
- Fincher, G. B. Molecular and cellular biology associated with endosperm mobilization in germinating cereal grains. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Bioi* **40**, 305-46 (1989).
- Fine, P. V. A. & Mesones, I. The role of natural enemies in the germination and establishment of *Pachira* (Malvaceae) trees in the peruvian amazon. *Biotropica* **43**, 265-269 (2011).
- Floss, H. G. From ergot to ansamycins - 45 years in biosynthesis. *J Nat Prod* **69**(1), 158-169 (2006).
- Frank, A. C., Guzmán, J. P. S. & Shay, J. E. Transmission of bacterial endophytes. *Microorganisms* **5**, 70 (2017).
- Freedman, B., Reed, D. K., Powell, R. G., Madrigal, R. V. & Smith Jr., C. R. Biological activities of *Trewia nudiflora* extracts against certain economically important insect pests. *J Chem Ecol* **8**, 409-418 (1982).
- Fujino, Y., Minamizaki, T., Yoshioka, H., Okada, M. & Yoshiko, Y. Imaging and mapping of mouse bone using MALDI-imaging mass spectrometry. *Bone Rep* **5**, 280-285 (2016).
- Fukuyama, Y. Liquid matrices in MALDI-MS. In applications of ionic liquids in science and technology, Scott Handy (eds.), INTECH Open Access Publisher (2011).
- Fürstner A. Chemistry and biology of roseophilin and the prodigiosin alkaloids: a survey of the last 2500 years. *Angew Chem Int Ed Engl* **42**(31), 3582-3603 (2003).
- Gerber, N. N. Prodigiosin-like Pigments from *Actinomadura* (*Nocardia*) *pelletieri* and *Actinomadura madurae*. *Appl Microbiol* **18**(1), 1-3 (1969).
- Gerber, N. N. Prodigiosin-like pigments. *CRC Crit Rev Microbiol* **3**, 469-485 (1975).
- Gerber, N. N. et al. Biosynthesis of prodiginines. ¹³C resonance assignments and enrichment patterns in nonyl-, cyclononyl-, methylcyclodecyl-, and butylcycloheptylprodiginine produced by actinomycete cultures supplemented with ¹³C-labeled acetate and ¹⁵N-labeled nitrate. *Can J Chem* **56**, 1155-1163 (1978).
- Glassner, H., Zchori-Fein, E., Yaron, S., Sessitsch, A., Sauer, U. & Compant, S. Bacterial niches inside seeds of *Cucumis melo* L. *Plant Soil* **2017**, 1-13.
- Gokhale, R. S., Tsuji, S. Y., Cane, D. E. & Khosla, C. Dissecting and exploiting intermodular communication in polyketide synthases. *Science* **284**, 482-485 (1999).

- Gorzolka, K., Bednarz, H. & Niehaus, K. Detection and localization of novel hordatine-like compounds and glycosylated derivatives of hordatines by imaging mass spectrometry of barley seeds. *Planta* **239**, 1321-1335 (2014).
- Grierson, C. & Schiefelbein, J. Root Hairs. *Arabidopsis Book* **1**, (2002) e0060.
- Grundy, F. & Henkin, T. Synthesis of serine, glycine, cysteine, and methionine. In *Bacillus subtilis* and its closest relatives. Sonenshein, A., Losick, R. & Hoch, J. (ed), ASM Press, Washington, DC. doi: 10.1128/9781555817992.ch18 (2002).
- Ha, M., Kwak, J. H., Kim, Y. & Zee, O. P. Direct analysis for the distribution of toxic glycoalkaloids in potato tuber tissue using matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric imaging. *Food Chem* **133**, 1155-1162 (2012).
- Hamel, E. Natural products which interact with tubulin in the vinca domain: Maytansine, rhizoxin, phomopsin a, dolastatins 10 and 15 and halichondrin B. *Pharmacol Therap* **55**, 31-51 (1992).
- Hanka, L. J. & Barnett, M. S. Microbiological assays and bioautography of maytansine and its homologues. *Antimicrob Agents Chemother* **6**, 651-652 (1974).
- Hasegawa, T., Tanida, S., Hatano, K., Higashide, E. & Yoneda, M. Motile actinomycetes: *Actinosynnema pretiosum* subsp. *pretiosum*, subsp. nov., and *Actinosynnema pretiosum* subsp. *auranticum*, subsp. nov. *Int J Syst Bacteriol* **33**(2), 314-320 (1983).
- Hatano, K., Higashide, E., Akiyama, S.-I. & Yoneda, M. Selective accumulation of ansamitocins P-2, P-3 and P-4, and biosynthetic origins of their acyl moieties. *Agric Biol Chem* **48**, 1721-1729 (1984).
- Hatano, K., Higashide, E. & Yoneda, M. Bioassay of ansamitocin P-3, an antitumor antibiotic. *Agric Biol Chem* **48**, 1889-1890 (1984).
- Heldt, H.-W. & Piechulla B. Pflanzenbiochemie. 5. Auflage, Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2015.
- Higashide, E. et al. Ansamitocin, a group of novel maytansinoid antibiotics with antitumour properties from *Nocardia*. *Nature* (London) **270**, 721-722 (1977).
- Hillenkamp, F. & Karas, M. The MALDI Process and Method. In MALDI MS. A practical guide to instrumentation, methods, and applications. 2. Edition, Hillenkamp, F. & Peter-Katalinic, J. (eds.), Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA (2014).
- Hood, D. W., Heidstra, R., Swoboda, U. K. & Hodgson, D. A. Molecular genetic analysis of proline and tryptophan biosynthesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2): interaction between primary and secondary metabolism - a review. *Gene* **115**, 5-12 (1992).
- Horn, P. J. et al. Imaging heterogeneity of membrane and storage lipids in transgenic *Camelina sativa* seeds with altered fatty acid profiles. *Plant J* **76**, 138-150 (2013).
- Hornung, A. et al. A genomic screening approach to the structure-guided identification of drug candidates from natural sources. *Chembiochem* **8**(7), 757-766 (2007).

- Hubbard, R & Rimington, C. The biosynthesis of prodigiosin, the tripyrrylmethene pigment from *Bacillus prodigiosus* (*Serratia marcescens*). *Biochem J* **46**, 220-225 (1950).
- Huitu, Z. *et al.* PCR screening of 3-amino-5-hydroxybenzoic acid synthase gene leads to identification of ansamycins and AHBA-related antibiotic producers in Actinomycetes. *J Appl Microbiol* **106**(3), 755-763 (2009).
- Issel B. F. & Crooke, S. T. Maytansine. *Cancer Treat Rev* **5**, 199-207 (1978).
- Izawa, M., Tanida, S. & Asai, M. Ansamitocin analogs from a mutant strain of *Nocardia*. II. Isolation and structure. *J Antibiot* **34**(5), 496-506 (1981).
- Jimtha, C. J., Jishma, P., Sreelekha, S., Chithra, S. & Radhakrishnan, E. K. Antifungal properties of prodigiosin producing rhizospheric *Serratia sp.* *Rizosphere* **3**, 105-108 (2017).
- Johnston-Monje, D. & Raizada, M. N. Conservation and diversity of seed associated endophytes in Zea across boundaries of evolution, ethnography and ecology. *PLoS ONE* **6**, (2011) e20396.
- Julius, B. T., Leach, K. A., Tran, T. M., Mertz, R. A. & Braun, D. M. Sugar transporters in plants: new insights and discoveries. *Plant Cell Physiol* **58**(9), 1442-1460 (2017).
- Kadereit, J. W., Körner, C., Kost, B. & Sonnewald, U. Lehrbuch der Pflanzenwissenschaften. 37. Auflage, Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014.
- Kaga, H., Mano, H., Tanaka, F., Watanabe, A., Kaneko, S. & Morisaki, H. Rice seeds as sources of endophytic bacteria. *Microbes Environ* **24**, 154-162 (2009).
- Kang, Q., Shen, Y. & Bai, L. Biosynthesis of 3,5-AHBA-derived natural products. *Nat Prod Rep* **29**(2), 243-263 (2012).
- Karam, G. N. Biomechanical model of the xylem vessels in vascular plants. *Ann Bot* **95**(7), 1179-1186 (2005).
- Karas, M., Bachmann, D. & Hillenkamp, F. Influence of the wavelength in highirradiance ultraviolet laser desorption mass spectrometry of organic molecules. *Anal Chem* **57**, 2935-2939 (1985).
- Karas, M., Bachmann, D., Bahr, U. & Hillenkamp, F. Matrix-assisted ultravioletlaser desorption of non-volatile compounds. *Int J Mass Spectrom Ion Proc* **78**, 53-68 (1987).
- Karas, M., Glückmann, M. & Schäfer, J. Ionization in matrix-assisted laser desorption/ionization: singly charged molecular ions are the lucky survivors. *J Mass Spectrom* **35**, 1-12 (2000).
- Kawauchi, K. *et al.* A possible immunosuppressant, cycloprodigiosin hydrochloride, obtained from *Pseudoalteromonas denitrificans*. *Biochem Biophys Res Commun* **237**, 543-547 (1997).
- Kestring, D., Menezes, L. C. C. R., Tomaz, C. A., Lima, G. P. P. & Rossi, M. N. Relationship among phenolic contents, seed predation, and physical seed traits in *Mimosa bimucronata* plants. *J Plant Biol* **52**, 569-576 (2009).

- Kibby, J. J., McDonald, I. A. & Rickards, R. W. 3-Amino-5-hydroxybenzoic acid as a key intermediate in ansamycin and maytansinoid biosynthesis. *J Chem Soc Chem Commun* **16**, 768-769 (1980).
- Kim, C.-G., Kirschning, A., Bergon, P., Ahn, Y., Wang, J. J., Shibuya, M. & Floss, H. G. Formation of 3-amino-5-hydroxybenzoic acid, the precursor of mC₇N units in ansamycin antibiotics, by a new variant of shikimate pathway. *J Am Chem Soc* **114**(12), 4941-4943 (1992).
- Kim, C.-G. *et al.* Biosynthesis of 3-amino-5-hydroxybenzoic acid, the precursor of mC₇N units in ansamycin antibiotics. *J Am Chem Soc* **118**(32), 7486-7491 (1996).
- Kim, C.-G., Yu, T.-W., Fryhle, C. B., Handa, S. & Floss, H. G. 3-Amino-5-hydroxybenzoic acid synthase, the terminal enzyme in the formation of the precursor of mC₇N units in rifamycin and related antibiotics. *J Biol Chem* **273**(11), 6030-6040 (1998).
- Kim, D. *et al.* Biosynthesis of antibiotic prodiginines in the marine bacterium *Hahella chejuensis* KCTC 2396. *J Appl Microbiol* **102**, 937-944 (2007).
- Kim, D. *et al.* Red to red - the marine bacterium *Hahella chejuensis* and its product prodigiosin for mitigation of harmful algal blooms. *J Microbiol Biotechnol* **18**, 1621-1629 (2008).
- Klein, A. S. *et al.* New prodigiosin derivatives obtained by mutasynthesis in *Pseudomonas putida*. *ACS Synth Biol* **6**, 1757-1765 (2017).
- Knoblauch, M. & Oparka, K. The structure of the phloem: still more questions than answers. *Plant J* **70**, 147-156 (2012).
- Krings, M., Harper, C. J. & Taylor, E. L. Fungi and fungal interactions in the Rhynie chert: a review of the evidence, with the description of *Perexiflasca tayloriana* gen. et sp. nov. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **373**(1739), pii: 20160500 (2018).
- Krueger, R., Pfenninger, A., Fournier, I., Glückmann, M. & Karas, M. Analyte incorporation and ionization in matrixassisted laser desorption/ionization visualized by pH indicator molecular probes. *Anal Chem* **73**, 5812-5821 (2001).
- Kubota, T., Brünjes, M., Frenzel, T., Xu, J., Kirschning, A. & Floss, H. G. Determination of the cryptic stereochemistry of the first PKS chain-extension step in ansamitocin biosynthesis by *Actinosynnema pretiosum*. *Chembiochem* **7**(8), 1221-1225 (2006).
- Kupchan, S. M. *et al.* Maytansine, a novel antileukemic ansa macrolide from *Maytenus ovatus*. *J Am Chem Soc* **94**, 1354-1356 (1972a).
- Kupchan, S. M., Komoda, Y., Thomas, G. J. & Hintz, H. P. Maytanprine and Maytanbutine, new antileukaemic ansa macrolides from *Maytenus buchananii*. *J Chem Soc Chem Commun* **1065** (1972b).
- Kupchan, S. M., Komoda, Y., Branfman, A. R., Dailey, R. G. & Zimmerly, V. A. Novel maytansinoids Structural interrelations and requirements of antileukemic activity. *J Am Chem Soc* **96**, 3706-3708 (1974).

- Kupchan, S. M. *et al.* The maytansinoids. Isolation, structural elucidation, and chemical interrelation of novel ansa macrolides. *J Org Chem* **42**(14), 2349-2357 (1977).
- Kusari, S., Lamshöft, M., Zühlke, S. & Spiteller, M. An endophytic fungus from *Hypericum perforatum* that produces hypericin. *J Nat Prod* **71**(2), 159-162 (2008).
- Kusari, S., Zühlke, S. & Spiteller, M. An endophytic fungus from *Camptotheca acuminata* that produces camptothecin and analogues. *J Nat Prod* **72**(1), 2-7 (2009).
- Kusari, S. & Spiteller, M. Are we ready for industrial production of bioactive plant secondary metabolites utilizing endophytes? *Nat Prod Rep* **28**, 1203-1207 (2011).
- Kusari, S., Zühlke, S. & Spiteller, M. Effect of artificial reconstitution of the interaction between the plant *Camptotheca acuminata* and the fungal endophyte *Fusarium solani* on camptothecin biosynthesis. *J Nat Prod* **74**(4), 764-775 (2011).
- Kusari, S. & Spiteller, M. Metabolomics of endophytic fungi producing associated plant secondary metabolites: progress, challenges and opportunities. In *Metabolomics*, Roessner, U. (eds), Rijeka, Croatia: InTech, 241-266 (2012).
- Kusari, S., Hertweck, C. & Spiteller, M. Chemical ecology of endophytic fungi: Origins of secondary metabolites. *J Biol Chem* **19**(7), 792-798 (2012).
- Kusari, S. *et al.* Endophytes are hidden producers of maytansine in *Putterlickia* roots. *J Nat Prod* **77**, 2577-2584 (2014a).
- Kusari, S., Singh, S. & Jayabaskaran, C. Biotechnological potential of plant-associated endophytic fungi: hope versus hype. *Trends Biotechnol* **32**(6), 297-303 (2014b).
- Kusari, S., Singh, S. & Jayabaskaran, C. Rethinking production of Taxol® (paclitaxel) using endophyte biotechnology. *Trends Biotechnol* **32**(6), 304-311 (2014c).
- Lancini G. & Grandi M. Biosynthesis of Ansamycins. In: *Biosynthesis. Antibiotics*, Vol. 4, Corcoran, J. W. (eds), Springer, Berlin, Heidelberg (1981).
- Lambert, J. M. & Morris, C. Q. Antibody-drug conjugates (ADCs) for personalized treatment of solid tumors: A review. *Adv Ther* **34**(5), 1015-1035 (2017).
- Larson, G. M., Schaneberg, B. T. & Sneden, A. T. Two new maytansinoids from *Maytenus buchananii*. *J Nat Prod* **62**, 361-363 (1999).
- Lay, J. O. MALDI-ToF mass spectrometry of bacteria. *Mass Spectrom Rev* **20**, 172-194 (2001).
- Lee, J. S. *et al.* Exceptional production of both prodigiosin and cycloprodigiosin as major metabolic constituents by a novel marine bacterium, *Zooshikella rubidus* S1-1. *Appl Environ Microbiol* **77**, 4967-4973 (2011).
- Lee, J. W. *et al.* Mass spectrometry based profiling and imaging of various ginsenosides from *Panax ginseng* roots at different ages. *Int J Mol Sci* **18**(6), 1114 (2017).
- Leubner-Metzger, G., Fründt, C., Vogeli-Lange, R. & Meins, F. Jr. Class I P-1,3-glucanases in the endosperm of tobacco during germination. *Plant Physiol* **109**, 751-759 (1995).

- Li, G., Kusari, S., Golz, C., Strohmann, C. & Spiteller, M. Three cyclic pentapeptides and a cyclic lipopeptide produced by endophytic *Fusarium decemcellulare* LG53. *RSC Adv* **6**, 54092-54098 (2016).
- Li, H., Tanikawa, T., Sato, Y., Nakagawa, Y. & Matsuyama, T. *Serratia marcescens* gene required for surfactant serrawettin W1 production encodes putative aminolipid synthetase belonging to nonribosomal peptide synthetase family. *Microbiol Immunol* **49**, 303-310 (2005).
- Li, X-G. *et al.* Harnessing the potential of halogenated natural product biosynthesis by mangrove-derived actinomycetes. *Mar Drugs* **11**, 3875-3890 (2013).
- Li, X.-J., Zhang, Q., Zhang, A.-L. & Gao, J.-M. Metabolites from *Aspergillus fumigatus*, an endophytic fungus associated with *Melia azedarach*, and their antifungal, antifeedant, and toxic activities. *J Agric Food Chem* **60**(13), 3424-3431 (2012).
- Liu, W. T. *et al.* Imaging mass spectrometry of intraspecies metabolic exchange revealed the cannibalistic factors of *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**, 16286-16290 (2010).
- Liu, Y., Zuo, S., Zou, Y., Wang, J. & Song, W. Investigation on diversity and population succession dynamics of endophytic bacteria from seeds of maize (*Zea mays* L., Nongda108) at different growth stages. *Ann Microbiol* **63**, 71-79 (2013).
- Liu, Z., Floss, H. G., Cassady, J. M. & Chan, K. K. Metabolism studies of the anti-tumor agent maytansine and its analog ansamitocin P-3 using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J Mass Spectrom* **40**(3), 389-399 (2005).
- Lucas, W. J. *et al.* The plant vascular system: evolution, development and functions. *J Integr Plant Biol* **55**, 294-388 (2013).
- Lüdemann, H.-C., Redmond, R. W. & Hillenkamp, F. Singlet-singlet annihilation in UV-MALDI studied by fluorescence spectroscopy. *Rapid Commun Mass Spectrom* **16**, 1287-1294 (2002).
- Maggini *et al.* Plant-endophytes interaction influences the secondary metabolism in *Echinacea purpurea* (L.) Moench: an *in vitro* model. *Sci Rep* **7**(1):16924 (2017).
- Mahajan, D. M. *et al.* CoMSIA and POM analyses of anti-malarial activity of synthetic prodiginines. *Bioorg Med Chem Lett* **22**, 4827-4835 (2012).
- Mahajan, D. T., Masand, V. H., Patil, K. N., Hadda, T. B. & Rastija, V. Integrating GUSAR and QSAR analyses for antimalarial activity of synthetic prodiginines against multi drug resistant strain. *Med Chem Res* **22**, 2284-2292 (2013).
- Mahlen, S. D. *Serratia* infections: from military experiments to current practice. *Clin Microbiol Rev* **24**, 755-791 (2011).
- Mandelbaum-Shavit, F., Wolpert-DeFilippes, M. K. & Johns, D. G. Binding of maytansine to rat brain tubulin. *Biochem Biophys Res Commun* **72**(1), 47-54, 1976.
- Masi, M. *et al.* Cochliotoxin, a dihydropyranopyran-4,5-dione, and its analogues produced by *Cochliobolus australiensis* display phytotoxic activity against buffelgrass (*Cenchrus ciliaris*). *J Nat Prod* **80**, 1241-1247 (2017).

Matsuyama, T., Fujita, M. & Yano, I. Wetting agent produced by *Serratia marcescens*. *FEMS Microbiol Lett* **28**, 125-129 (1985).

Matsuyama, T., Murakami, T., Fujita, M., Fujita, S. & Yano, I. Extracellular vesicle formation and biosurfactant production by *Serratia marcescens*. *J Gen Microbiol* **132**, 865-875 (1986).

Matsuyama, T. *et al.* A novel extracellular cyclic lipopeptide which promotes flagellum-dependent and -independent spreading growth of *Serratia marcescens*. *J Bacteriol* **174**, 1769-1776 (1992).

Matsuyama, T., Bhasin, A. & Harshey, R. M. Mutational analysis of flagellum-independent surface spreading of *Serratia marcescens* 274 on a low-agar medium. *J Bacteriol* **177**, 987-991 (1995).

Matsuyama, T. & Nakagawa, Y. Surface-active exolipids: Analysis of absolute chemical structures and biological functions. *J Microbiol Methods* **25**, 165-175 (1996).

Mendes, R. Garbeva, P. & Raaijmakers, J. M. The rhizosphere microbiome: significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. *FEMS Microbiol Rev* **37**(5), 634-663 (2013).

Mitter, B. *et al.* A new approach to modify plant microbiomes and traits by introducing beneficial bacteria at flowering into progeny seeds. *Front Microbiol* **8**, (2017).

Monreal, J. & Reese, E. T. The chitinase of *Serratia marcescens*. *Can J Microbiol* **15**(7), 689-696 (1969).

Moore, J. L., Richard, M., Caprioli, R. M. & Skaar, E. P. Advanced mass spectrometry technologies for the study of microbial pathogenesis. *Curr Opin Microbiol* **19**, 45-51 (2014).

Moree, W. J. *et al.* Microbiota of healthy corals are active against fungi in a light-dependent Manner. *ACS Chem Biol* **9**, 2300-2308 (2014).

Nakao, H., Senokuchi, K., Umebayashi, C., Masuda, T., Oyama, Y. & Yonemori, S. Cytotoxic activity of maytanprine isolated from *Maytenus diversifolia* in human leukemia K562 cells. *Biol Pharm Bull* **27**, 1236-1240 (2004).

Nettleton Jr., D. E., Balitz, D. M., Brown, M., Moseley, J. E. & Myllymaki, R. W. Large scale isolation of maytansine and other maytansinoids from the seeds of *Maytenus rothiana* using preparative LC. *J Nat Prod* **44**(3), 340-347 (1981).

Norris, J. L. & Caprioli, R. M. Analysis of tissue specimens by matrix-assisted laser desorption/ionization imaging mass spectrometry in biological and clinical research. *Chem Rev* **113**(4), 2309-2342 (2013).

Okunishi, S., Sako, K., Mano, H., Imamura, A. & Morisaki, H. Bacterial flora of endophytes in the maturing seed of cultivated rice (*Oryza sativa*). *Microbes Environ* **20**, 168-177 (2005).

Papireddy, K. *et al.* Antimalarial activity of natural and synthetic prodiginines. *J Med Chem* **54**, 5296-5306 (2011).

- Papireddy, K., Kelly, J. X. & Reynolds, K. A. Synthesis and structure–activity relationships of tambjamines and B-ring functionalized prodiginines as potent antimalarials. *J Med Chem* **58**(18), 7286-7309 (2015).
- Parakh, S., Gan, H. K., Parslow, A. C., Burvenich, I. J. G., Burgess, A. W. & Scott, A. M. Evolution of anti-HER2 therapies for cancer treatment. *Cancer Treat Rev* **59**, 1-21 (2017).
- Parikh, S. A. *et al.* Phase II study of obatoclox mesylate (GX15-070), a small-molecule BCL-2 family antagonist, for patients with myelofibrosis. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* **10**(4), 285-289 (2010).
- Partida-Martínez, L. P. & Heil, M. The microbe-free plant: fact or artifact? *Front Plant Sci* **2**:100 (2011).
- Pérez-Tomás, R., Montaner, B., Llagostera, E. & Soto-Cerrato, V. The prodigiosins, proapoptotic drugs with anticancer properties. *Biochem Pharmacol* **66**, 1447-1452 (2003).
- Petrini, O. Fungal endophytes of tree Leaves. Herausgeber: Andrews, J H. & Hirano S. S. Microbial Ecology of Leaves, Part 3, New York, Springer, 179-197 (1991).
- Perez, H. L., Cardarelli, P. M., Deshpande, S., Gangwar, S., Schroede, G. M., Vite, G. D. & Borzilleri, R. M. Antibody–drug conjugates: current status and future directions. *Drug Discov Today* **19**(7), 869-881 (2014).
- Plattner, R. D. & Powell R. G. Tandem mass spectrometry of maytansinoids. *J Nat Prod* **49**(3), 475-482 (1986).
- Preciado, G. M. *et al.* Bacteriocins and its use for multidrug-resistant bacteria control (Chapter 16). In Antibiotic Resistance - Mechanisms and New Antimicrobial Approaches, 329-349 (2016).
- Prideaux, B. *et al.* High-sensitivity MALDI-MRM-MS imaging of moxifloxacin distribution in tuberculosis-infected rabbit lungs and granulomatous lesions. *Anal Chem* **83**, 2112-2118 (2011).
- Prideaux, B., ElNaggar, M. S., Zimmerman, M., Wiseman, J. M., Li, X. & Dartois, V. Mass spectrometry imaging of levofloxacin distribution in TB-infected pulmonary lesions by MALDI-MSI and continuous liquid microjunction surface sampling. *Int J Mass Spectrom* **377**, 699-708 (2015).
- Priya, K. A., Satheesh, S., Ashokkumar, B., Varalakshmi, P., Selvakumar, G. & Sivakumar, N. Antifouling activity of prodigiosin from estuarine isolate of *Serratia marcescens* CMST 07. In: Microbiological research in agroecosystem management, Velu, R. K. (ed) Vol XVI. Springer, New Delhi (2013).
- Pu, X., Qu, X., Chen, F., Bao, J., Zhang, G. & Luo, Y. Camptothecin-producing endophytic fungus *Trichoderma atroviride* LY357: isolation, identification, and fermentation conditions optimization for camptothecin production. *Appl Microbiol Biotechnol* **97**(21), 9365-9375 (2013).
- Pullen, C., *et al.* Occurrence and non-detectability of maytansinoids in individual plants of the genera *Maytanus* and *Putterlickia*. *Phytochemistry* **62**, 377-387 (2003).

- Qadri, S. M. H. & Williams, R. P. Incorporation of methionine into prodigiosin. *Biochim Biophys Acta* **230**, 181-184 (1971).
- Robinson, S., Warburton, K., Seymour, M., Clench, M. & Thomas-Oates, J. Localization of water-soluble carbohydrates in wheat stems using imaging matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *New Phytol* **173**, 438-444 (2007).
- Rosenthal, S., Harris, D. T., Horton, J. & Glick, J. H. Phase II study of maytansine in patients with advanced lymphomas: an eastern cooperative oncology group pilot study. *Cancer Treat Rep* **64**(10-11), 1115-1117 (1980).
- Samrot, A., Chandana, K., Senthilkumar, P. & Narendrakumar, G. Optimization of prodigiosin production by *Serratia marcescens* SU-10 and evaluation of its bioactivity. *Int Res J Biotechnol* **2**, 128-133 (2011).
- Schopfer, P. & Brennicke, A. Pflanzenphysiologie. 7. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Springer (2010).
- Schulz, B., Römmert, A. K., Dammann, U., Aust, H. J. & Strack, D. The endophyte-host interaction: a balanced antagonism. *Mycol Res* **103**, 1275-1283 (1999).
- Schulz, B. & Boyle, C., Editor: Sieber, T. N. Microbial Root Endophytes. In Soil Biology, Volume 9, Springer-Verlag Berlin Heidelberg (2006).
- Seyer, A., Einhorn, J., Brunelle, A. & Lapré´vote, O. Localization of flavonoids in seeds by cluster time-of-flight secondary ion mass spectrometry imaging. *Anal Chem* **82**, 2326-2333 (2010).
- Shahzad, R., Khan, A. L., Bilal, S., Asaf, S. & Lee, I. J. What is there in seeds? Vertically transmitted endophytic resources for sustainable improvement in plant growth. *Front Plant Sci* **9**:24 (2018).
- Shrimpton, D. M., Marks, G. S. & Bogorad, L. Studies on the biosynthesis of prodigiosin in *Serratia marcescens*. *Biochim Biophys Acta* **14**, 408-415 (1963).
- Singleton, P. & Sainsbury, D. Dictionary of Microbiology and Molecular Biology. 3. Edition, Johan Willy and Sons Ltd. (2001).
- Singh, B., Vishwakarma, R. A. & Bharate, S. B. QSAR and pharmacophore modeling of natural and synthetic antimalarial prodiginines. *Curr Comput Aided Drug Des* **9**, 350-359 (2013).
- Snedden, A. T. & Beemsterboer, G. L. Normaytansine, a new antileukemic ansa macrolide from *Maytenus buchananii*. *J Nat Prod* **43**(5), 637-640 (1980).
- Snedden, A. T., Sumner, W. C. & Kupchan, M. S. Normaytancyprine, a minor antileukemic ansa macrolide from *Putterlickia verrucosa*. *J Nat Prod* **45**, 624-628 (1982).
- Someya, N., Nakalima, M., Hirayae, K., Hibi, T. & Akutsu, K. Synergistic antifungal activity of chitinolytic enzymes and prodigiosin produced by biocontrol bacterium, *Serratia marcescens* strain B2 against gray mold pathogen *Botrytis cinerea*. *J Gent Plant Pathol* **67**, 312-317 (2001).

- Song, M. J., Bae, J., Lee, D. S., Kim, C. H., Kim, J. S., Kim, S. W. & Hong S. I. Purification and characterization of prodigiosin produced by integrated bioreactor from *Serratia* sp. KH-95. *J Biosci Bioeng* **101**(2), 157-161 (2006).
- Sørensen, I. S. *et al.* Combination of MALDI-MSI and cassette dosing for evaluation of drug distribution in human skin explant. *Anal Bioanal Chem* **409**, 4993-5005 (2017).
- Spengler, B. Mass spectrometry imaging of biomolecular information. *Anal Chem* **87**, 64-82 (2015).
- Spiteller, P., Bai, L., Shang, G., Carroll, B. J., Yu, T.-W. & Floss, H. G. The post-polyketide synthase modification steps in the biosynthesis of the antitumor agent ansamitocin by *Actinosynnema pretiosum*. *J Am Chem Soc* **125**, 14236-14237 (2003).
- Stierle, A., Strobel, G. & Stierle, D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew. *Science* **260**(5105), 214-216 (1993).
- Strobel, G. & Daisy, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiol Mol Biol Rev* **67**(4), 491-502 (2003).
- Su, C., Liu, Y., Sun, Y. & Li, Z. Complete genome sequence of *Serratia* sp. YD25 (KCTC 42987) presenting strong antagonistic activities to various pathogenic fungi and bacteria. *J Biotechnol* **245**, 9-13 (2017).
- Suchocki, J. A. & Sneden, A. T. Characterization of decomposition products of maytansine. *J Pharm Sci* **76**(9), 738-743 (1987).
- Sunaga, S., Li, H., Sato, Y., Nakagawa, Y. & Matsuyama, T. Identification and characterization of the *pswP* gene required for the parallel production of prodigiosin and serrawettin W1 in *Serratia marcescens*. *Microbiol Immunol* **48**, 723-728 (2004).
- Suwanborirux, K., Chang, C. J., Spjut, R. W. & Cassady, J. M. Ansamitocin P-3, a maytansinoid, from *Claopodium crispifolium* and *Anomodon attenuatus* or associated actinomycetes. *Experientia* **46**(1), 117-120 (1990).
- Svatos, A. Mass spectrometric imaging of small molecules. *Trends Biotechnol* **28**, 425-434 (2010).
- Tan, D. *et al.* Identification of an endophytic antifungal bacterial strain isolated from the rubber tree and its application in the biological control of Banana Fusarium wilt. *PLoS ONE* **10**, e0131974 (2015).
- Tanida, S., Higashide, E. & Yoneda, M. Inhibition of cilia regeneration of *Tetrahymena* by ansamitocins, new antitumor antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* **16**, 101-103 (1979).
- Tanida, S., Hasegawa, T., Hatano, K., Higashide, E. & Yoneda, M. Ansamitocins, maytansinoid antitumor antibiotics. Producing organism, fermentation, and antimicrobial activities. *J Antibiot* **33**, 192-198 (1980a).
- Tanida, S., Hasegawa, T. & Higashide, E. A simple method for determining antitubulinic activities of ansamitochins and related compounds using a cilia regeneration system with deciliated *Tetrahymena*. *Agric Biol Chem* **44**, 1847-1853 (1980b).

- Tanida, S., Izawa, M. & Hasagawa, T. Ansamycin analogs from a mutant strain of *Nocardia* I. Isolation of the mutant, fermentation and antimicrobial properties. *J Antibiot* **34**, 489-495 (1981).
- Tanikawa, T., Nakagawa, Y. & Matsuyama, T. Transcriptional downregulator HexS controlling prodigiosin and serrawettin W1 biosynthesis in *Serratia marcescens*. *Microbiol Immunol* **50**, 587-596 (2006).
- Tata, A., Perez, C., Campos, M. L., Bayfield, M. A., Eberlin, M. N. & Ifa, D. R. Imprint desorption electrospray ionization mass spectrometry imaging for monitoring secondary metabolites production during antagonistic interaction of fungi. *Anal Chem* **87**(24), 12298-12305 (2015).
- Taylor, T. N. & Taylor, E. L. The rhynie chert ecosystem: a model for understanding fungal interactions. Editors: Bacon, C. W. & White, Jr. J. F. *Microbial Endophytes*, Marcel Decker Inc., New York, 31-48 (2000).
- Taylor, T. N., Klavins, S. D., Krings, M., Taylor, E. L., Kerp, H. & Hass H. Fungi from the Rhynie chert: a view from the dark side. *Trans Roy Soc Edinburgh: Earth Sci* **94**, 457-473 (2004 for 2003).
- Thies, S. *et al.* Heterologous production of the lipopeptide biosurfactant serrawettin W1 in *Escherichia coli*. *J Biotechnol* **181**, 27-30 (2014).
- Thomson, N. R., Crow, M. A., McGowan, S. J., Cox, A. & Salmond, G. P. Biosynthesis of carbapenem antibiotic and prodigiosin pigment in *Serratia* is under quorum sensing control. *Mol Microbiol* **36**, 539-556 (2000).
- Traxler, M. F., Watrous, J. D., Alexandrov, T., Dorrestein, P. C & Koltera, R. Interspecies interactions stimulate diversification of the *Streptomyces coelicolor* secreted metabolome. *mBio* **4**(4): e00459-13.
- Trede, D. *et al.* Exploring three-dimensional matrix-assisted laser desorption/ionization imaging mass spectrometry data: three-dimensional spatial segmentation of mouse kidney. *Anal Chem* **84**, 6079-6087 (2012).
- Trutko, S. & Akimenko, V. The role of prodigiosin biosynthesis in the regulation of oxidative metabolism of the producer *Serratia marcescens*. *Mikrobiologiya* **58**, 723-729 (1989).
- United States, Patent Application Publication, Pub. No.: US 2003/0109682 A1, 2003 (Santi *et al.*).
- Vallet, M. *et al.* An integrative approach to decipher the chemical antagonism between the competing endophytes *Paraconiothyrium variable* and *Bacillus subtilis*. *J Nat Prod* **80**, 2863-2873 (2017).
- Van den Honert, T. H. Water transport in plants as a catenary process. *Discussions of the Faraday Society*, 146-153 (1948).
- van Remoortere, A. *et al.* MALDI imaging and profiling MS of higher mass proteins from tissue. *J Am Soc Mass Spectrom* **21**, 1922-1929 (2010).

- Vega, F. E., Pava-Ripoll, M., Posada, F. & Buyer, J. S. Endophytic bacteria in *Coffea arabica* L. *J Basic Microbiol* **45**, 371-380 (2005).
- Venghateri, J. B., Gupta, T. K., Verma, P. J., Kunwar, A. & Panda, D. Ansamitocin P3 depolymerizes microtubules and induces apoptosis by binding to tubulin at the vinblastine site. *PLoS One* **8**(10): e75182 (2013).
- Verma, S. K., Kingsley, K., Irizarry, I., Bergen, M., Kharwar, R. N. & White, J. F. Seed vectored endophytic bacteria modulate development of rice seedlings. *J Appl Microbiol* **122**, 1680-1691 (2017).
- Walitang, D. I., Kim, K., Madhaiyan, M., Kim, Y. K., Kang, Y. & Sa, T. Characterizing endophytic competence and plant growth promotion of bacterial endophytes inhabiting the seed endosphere of Rice. *BMC Microbiol* **17**(1), 209 (2017).
- Wani, M. C., Taylor, H. L., Wall, M. E., Coggon, P. & McPhail, A. T. Plant antitumor agents. VI. Isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *J Am Chem Soc* **93**(9), 2325-2327 (1971).
- Wani, M. C., Taylor, H. L. & Wall, M. E. Plant antitumor agents: colubrinol, antileukaemic ansa macrolides from *Colubrina texensis*. *J Chem Soc Chem Comm* **470**, 390 (1973).
- Wang, W. X., Kusari, S., Sezgin, S., Lamshöft, M., Kusari, P., Kayser, O. & Spiteller, M. Hexacyclopeptides secreted by an endophytic fungus *Fusarium solani* N06 act as crosstalk molecules in *Narcissus tazetta*. *Appl Microbiol Biotechnol* **99**(18), 7651-7662 (2015).
- Wasserman, H. H. *et al.* Biosynthesis of prodigiosin. Incorporation patterns of carbon-13-labeled alanine, proline, glycine, and serine elucidated by Fourier transform nuclear magnetic resonance. *J Am Chem Soc* **95**, 6874-6875 (1973).
- Wasserman, H. H., Keggi, J. J. & McKeon, J. E. Structure of serratamolides. *J Am Chem Soc* **84**, 2978-2982 (1962).
- Watrous, J. D. & Dorrestein, P. C. Imaging mass spectrometry in microbiology. *Nat Rev Microbiol* **9**, 683-694 (2011).
- Watrous, J. D., Phelan, V. V., Hsu, C.-C., Moree, W. J., Duggan, B. M. Alexandrov, T. & Dorrestein, P. C. Microbial metabolic exchange in 3D. *ISME J* **7**, 770-780 (2013).
- White, J. F. *et al.* Disease protection and allelopathic interactions of seed-transmitted endophytic pseudomonads of invasive reed grass (*Phragmites australis*). *Plant Soil* **422**, 195-208 (2018).
- Williams, R. P. Biosynthesis of prodigiosin, a secondary metabolite of *Serratia marcescens*. *Appl Microbiol* **25**(3), 396-402 (1973).
- Williams, R. P. & Quadri, S. M. The pigments of *Serratia*. In the genus *Serratia*. By Graevenitz, A. & Rubin S. J. (eds), Boca Raton, FL: *CRC Press Inc*, 31-75 (1980).
- Williamson, N. R., Fineran, P. C., Leeper, F. J. & Salmond, G. P. The biosynthesis and regulation of bacterial prodiginines. *Nat Rev Microbiol* **12**, 887-899 (2006).

- Williamson, N. R., Fineran, P. C., Gristwood, T., Chawrai, S. R., Leeper, F. J. & Salmond, G. P. C. Anticancer and immunosuppressive properties of bacterial prodiginines. *Future Microbiol* **2**(6), 605-618 (2007).
- Windt, C. W., Vergeldt, F. J., De Jager, P. A. & Van As, H. MRI of long-distance water transport: a comparison of the phloem and xylem flow characteristics and dynamics in poplar, castor bean, tomato and tobacco. *Plant Cell Environ* **29**, 1715-1729 (2006).
- Wings, S., Müller, H., Berg, G., Lamshöft M. & Leistner, E. A study of the bacterial community in the root system of the maytansine containing plant *Putterlickia verrucosa*. *Phytochemistry* **91**, 158-164 (2013).
- Wink, M. Plant breeding: importance of plant secondary metabolites for protection against pathogens and herbivores. *Theor Appl Genet* **75**, 225-233 (1988).
- Wolpert-DeFilippes, M. K., Adamson, R. H., Cysyk, R. L. & Johns, D. G. Initial studies on the cytotoxic action of maytansine, a novel ansa macrolide. *Biochem Pharmacol* **24**(6), 751-754 (1975).
- Wu, Y., Kang, Q., Shen, Y., Su, W. & Bai, L. Cloning and functional analysis of the naphthomycin biosynthetic gene cluster in *Streptomyces* sp. CS. *Mol Biosyst* **7**(8), 2459-2469 (2011).
- Xiao, J., Zhang, Q., Gao, Y.-Q., Tang, J. J., Zhang, A.-L. & Gao, J.-M. Secondary metabolites from the endophytic *Botryosphaeria dothidea* of *Melia azedarach* and their antifungal, antibacterial, antioxidant, and cytotoxic activities. *J Agric Food Chem* **62**(16), 3584-3590 (2014).
- Xu, D., Xia, X., Xu, N. & An, L. Isolation and identification of a novel endophytic bacterial strain with antifungal activity from wild blueberry *Vaccinium uliginosum*. *Ann Microbiol* **57**(4), 673-676 (2007).
- Yalcin, E. B. & de la Monte, S. M. Review of matrix-assisted laser desorption ionization-imaging mass spectrometry for lipid biochemical histopathology. *J Histochem Cytochem* **63**(10), 762-771 (2015).
- Yan, D., Duermeyer, L., Leoveanu, C. & Nambara, E. The functions of the endosperm during seed germination. *Plant Cell Physiol* **55**(9), 1521-1533 (2014).
- Yang, J. Y. et al. Primer on agar-based microbial imaging mass spectrometry. *J Bacteriol* **194**, 6023-6028 (2012).
- Yang, Y. L., Xu, Y., Straight, P. & Dorrestein, P. C. Translating metabolic exchange with imaging mass spectrometry. *Nat Chem Biol* **5**, 885-887 (2009).
- Yoshimura, Y., Zaima, N., Moriyama, T. & Kawamura, Y. Different localization patterns of anthocyanin species in the pericarp of black rice revealed by imaging mass spectrometry. *PLoS ONE* **7**(2), e31285 (2012).
- Yu, V. L. *Serratia marcescens*: historical perspective and clinical review. *N Engl J Med* **300**, 887-893 (1979).

Yu, T. W. *et al.* The biosynthetic gene cluster of the maytansinoid antitumor agent ansamitocin from *Actinosynnema pretiosum*. *Proc Natl Acad Sci* **99**(12), 7968-7973 (2002).

Zawoznik, M. S., Vázquez, S. C., Díaz Herrera, S. M. & Groppa, M. D. Search for endophytic diazotrophs in barley seeds. *Braz J Microbiol* **45**, 621-625 (2014).

Zimmermann, M. H. & Milburn, J. A. (Eds.) *Transport in Plants I*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg (1975).

Zaima, N., Hayasaka, T., Goto-Inoue, N. & Setou, M. Matrix-assisted laser desorption/ionization imaging mass spectrometry. *Int J Mol Sci* **11**, 5040-5055 (2010).

7. Anhang

7.1 Untersuchung verschiedener *Maytenus* und *Putterlickia* Spezies auf Maytansinoide

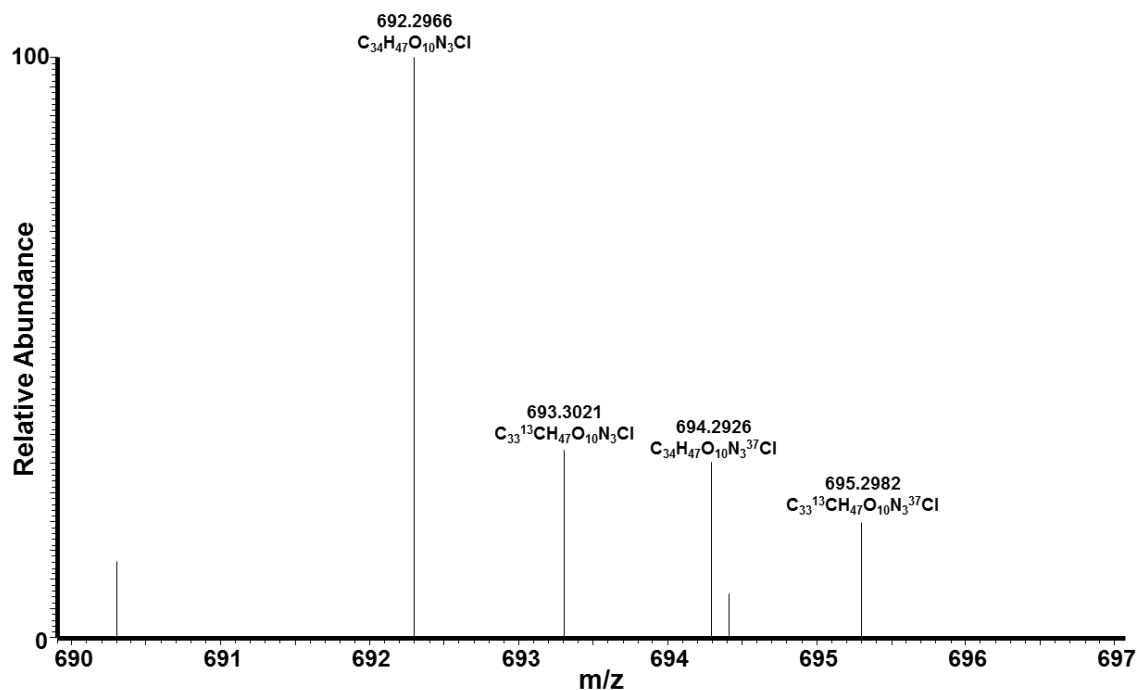


Abb. M1: HRMS-Spektrum von Maytansin (m/z 692) aus dem Pflanzenextrakt der Rinde von *M. serrata* (Bafoussam, September 2014).

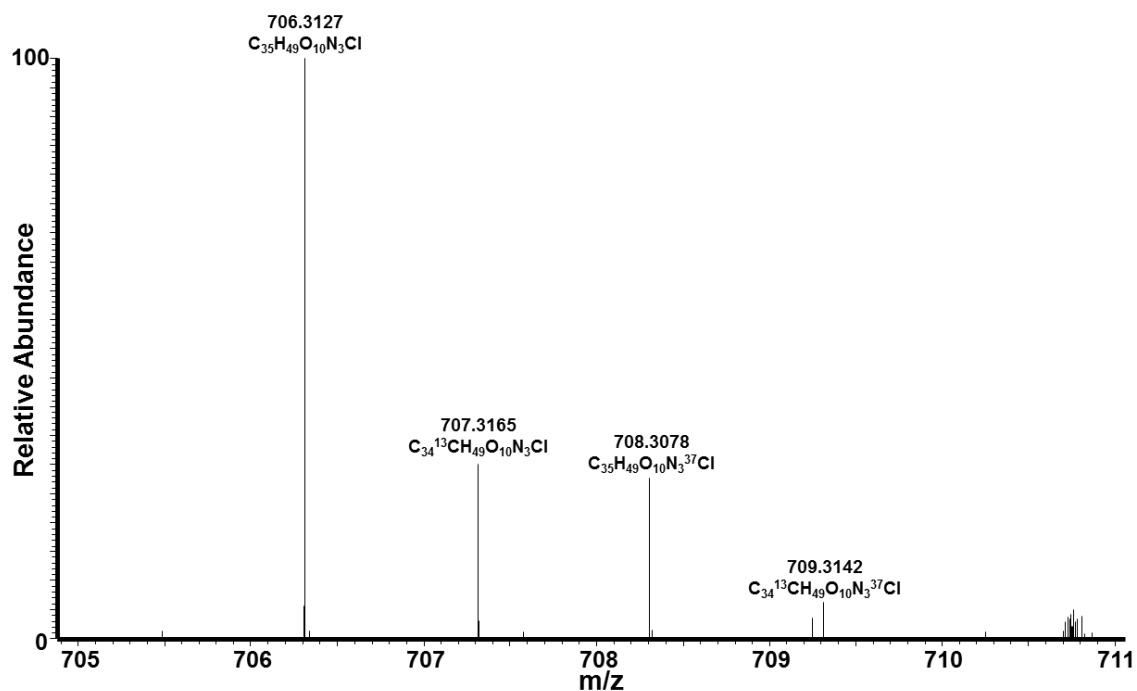


Abb. M2: HRMS-Spektrum von Maytanprine (m/z 706) aus dem Pflanzenextrakt der Rinde von *M. serrata* (Bafoussam, September 2014).

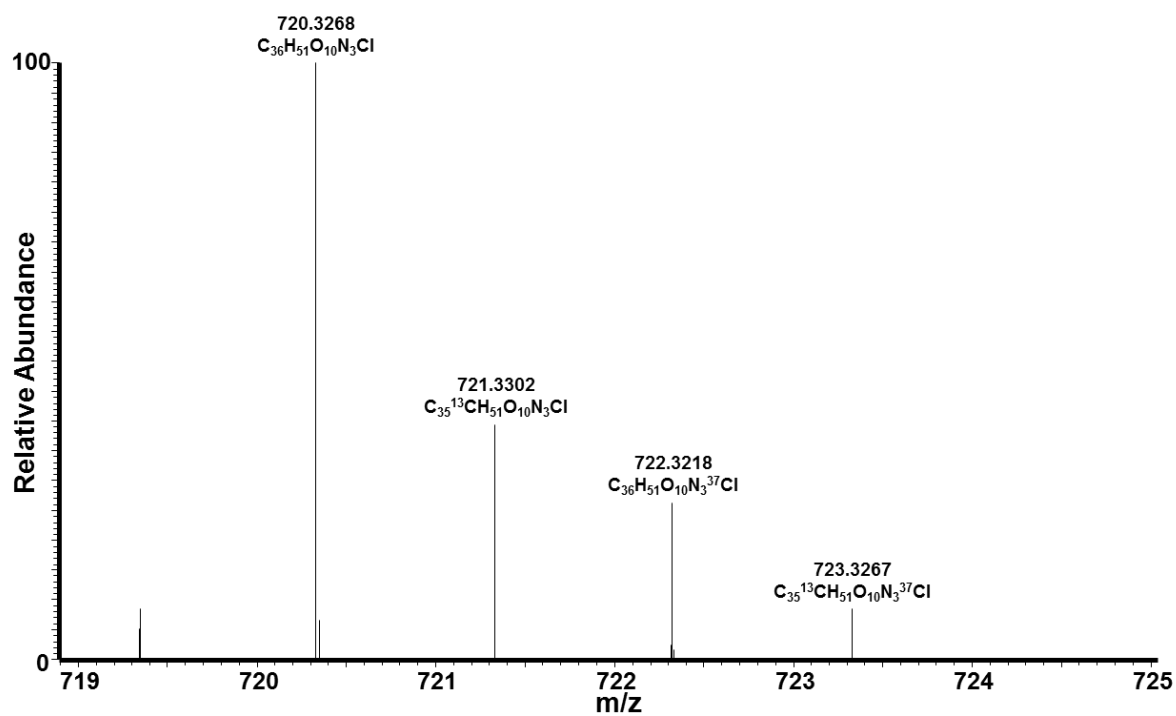


Abb. M3: HRMS-Spektrum von Maytanbutine (m/z 730) aus dem Pflanzenextrakt der Wurzel von *M. serrata* (Bafoussam, September 2014).

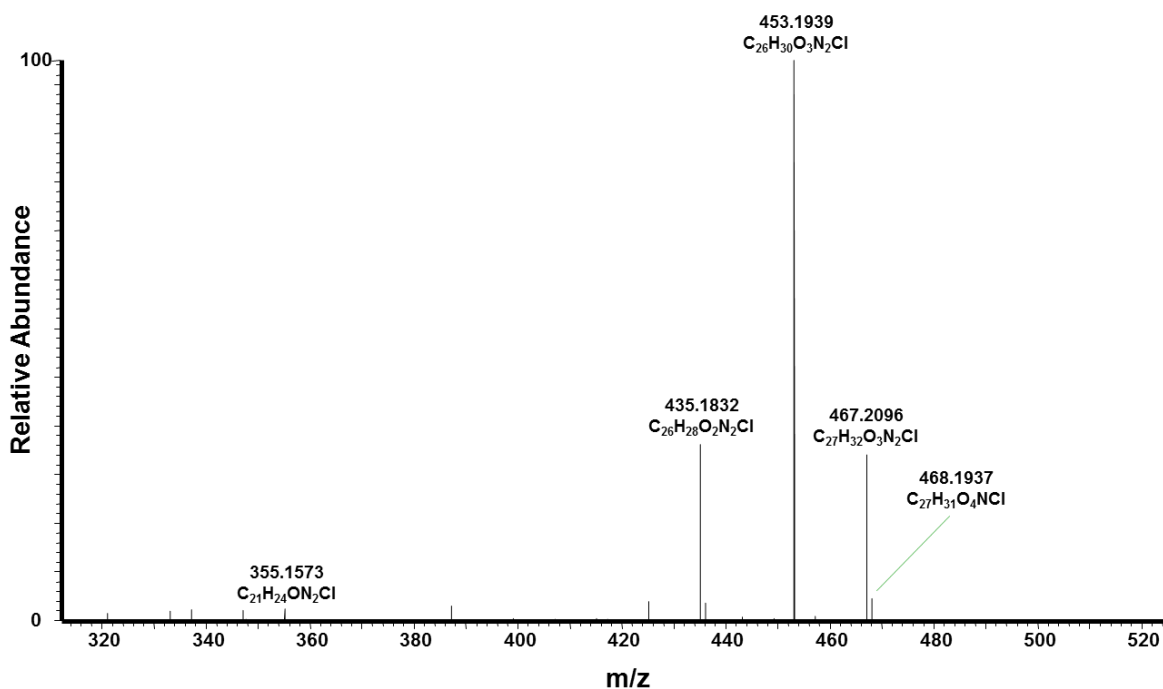
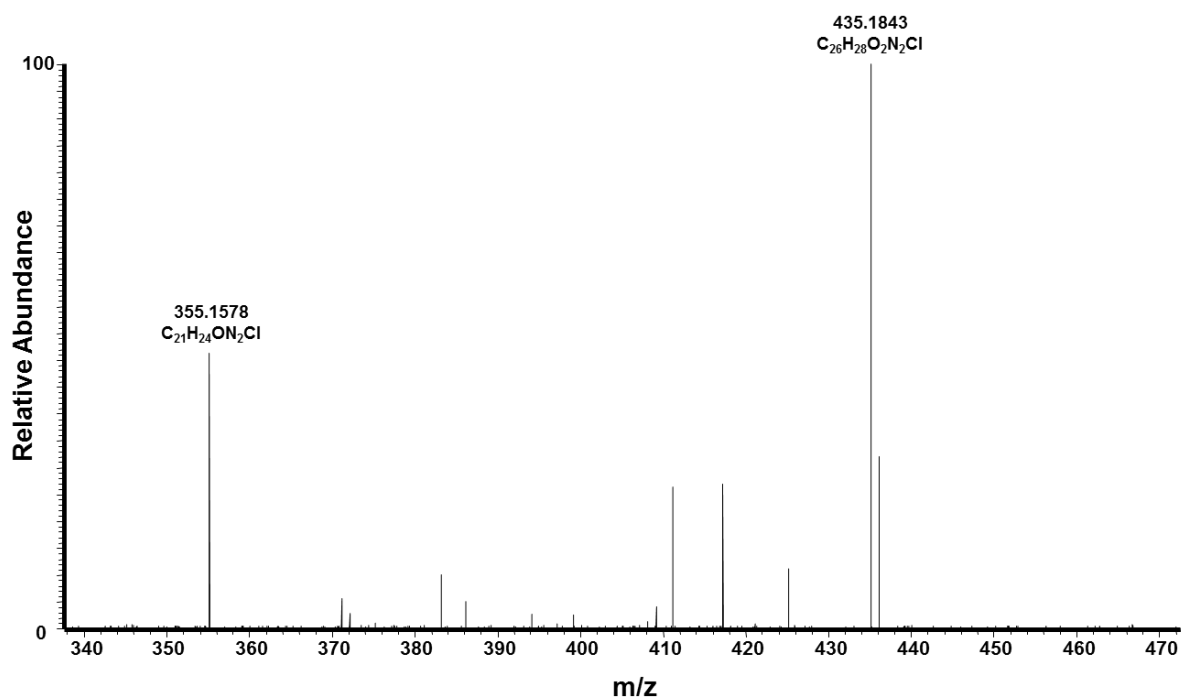
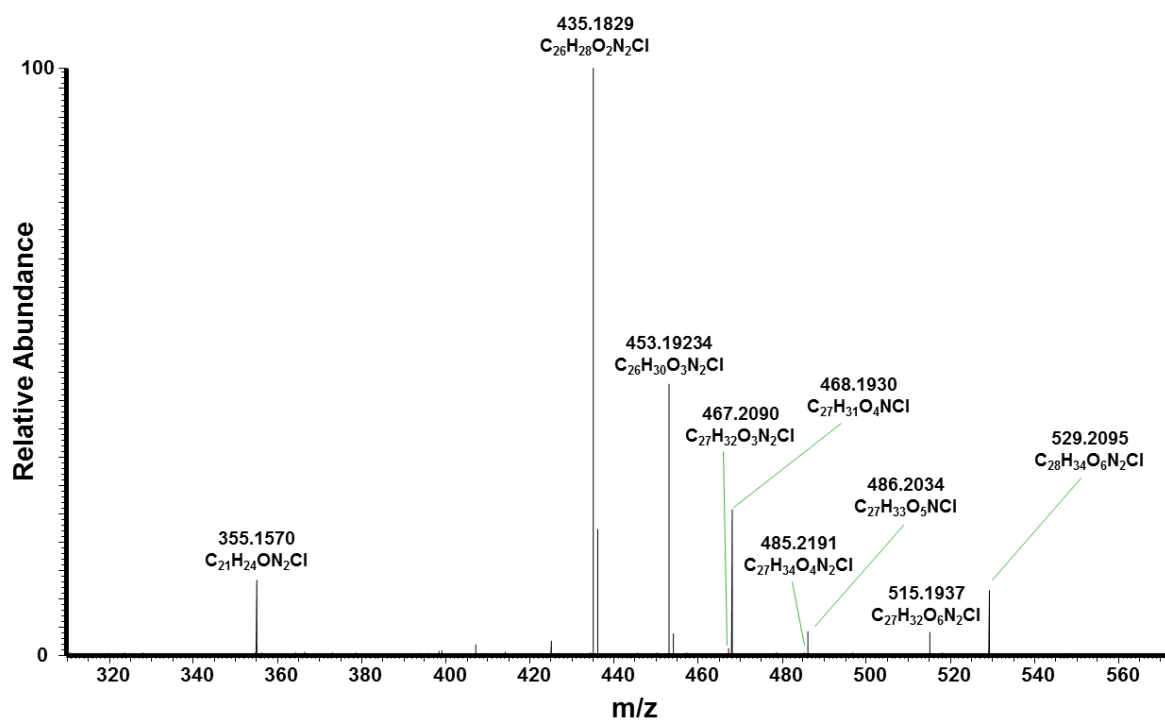


Abb. M4: MS³-Spektrum von Maytansine (m/z 692 $\rightarrow$ 485).

Abb. M5: MS³-Spektrum von Maytansine (m/z 692 $\rightarrow$ 453).Abb. M6: MS³-Spektrum von Maytanprine (m/z 706 $\rightarrow$ 547).

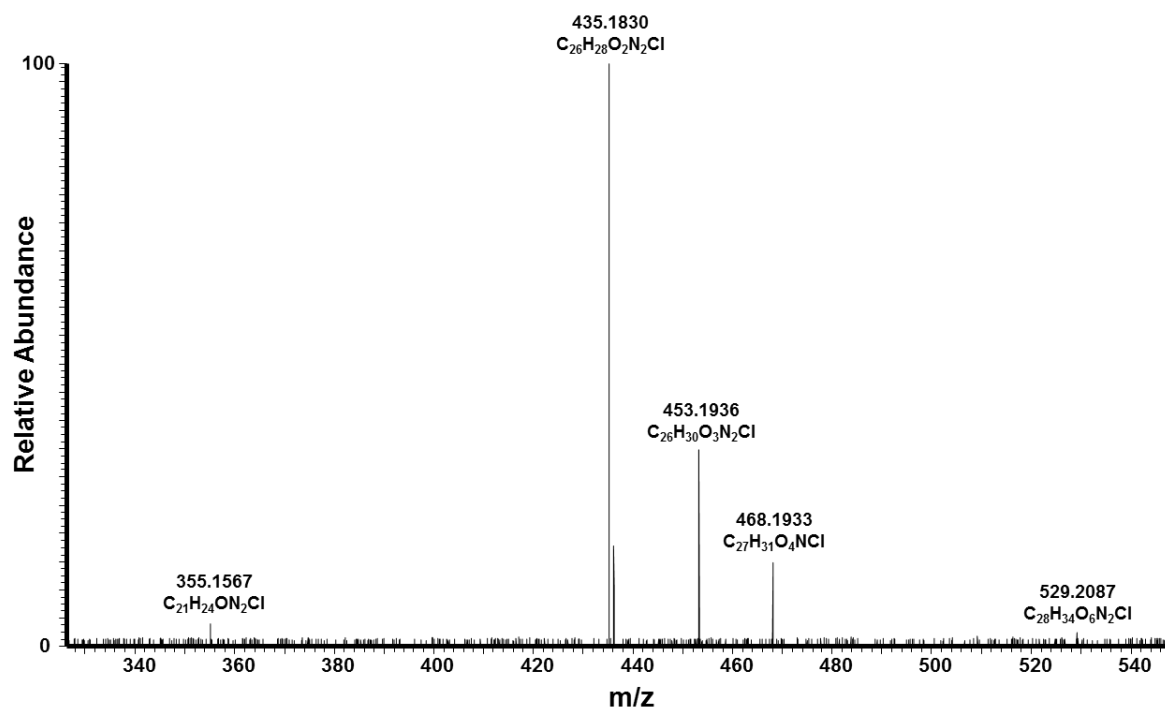


Abb. M7: MS³-Spektrum von Maytanbutine (m/z 720 $\rightarrow$ 547).

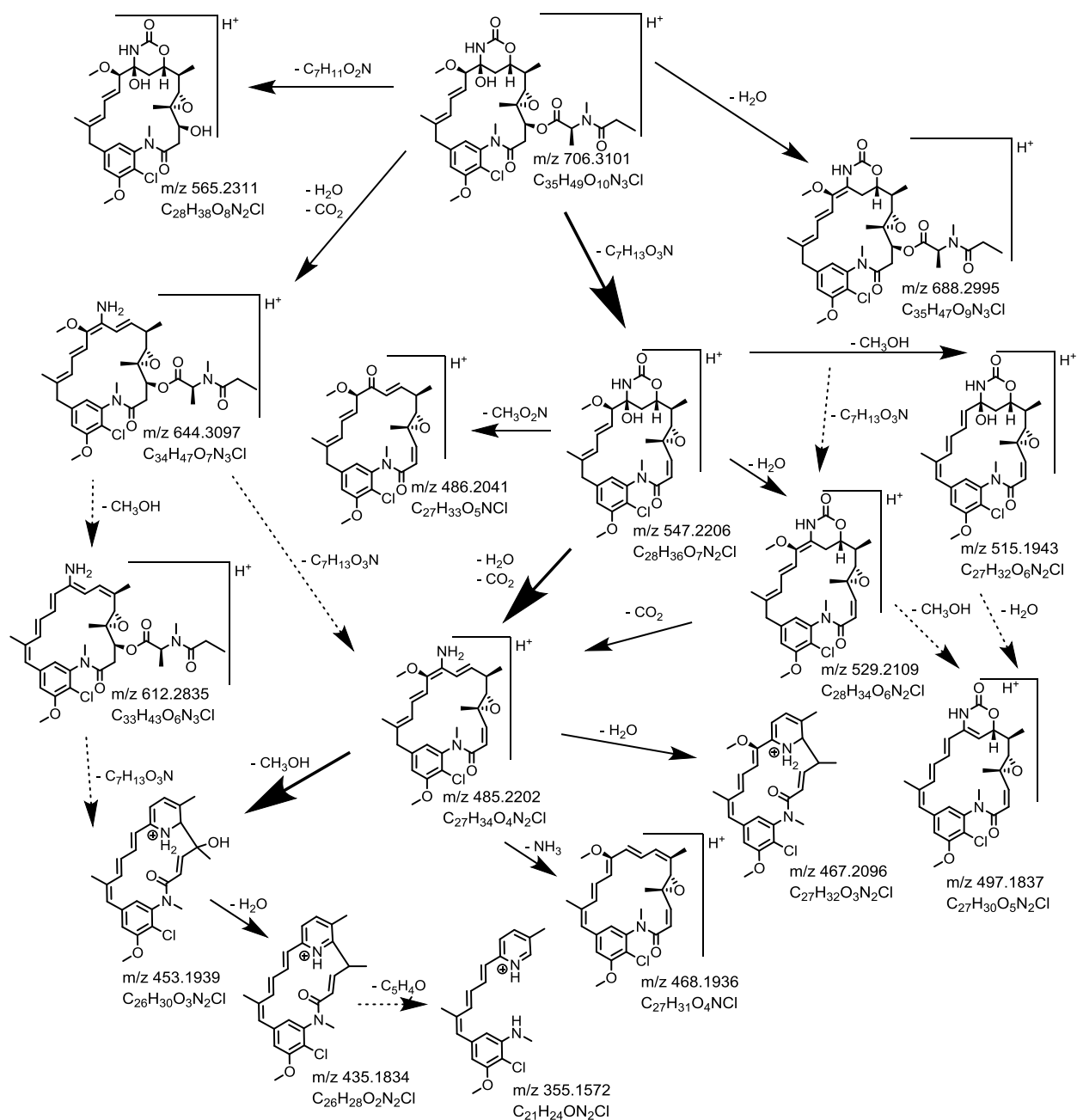


Abb. M8: Fragmentierungsweg von Maytanprine.

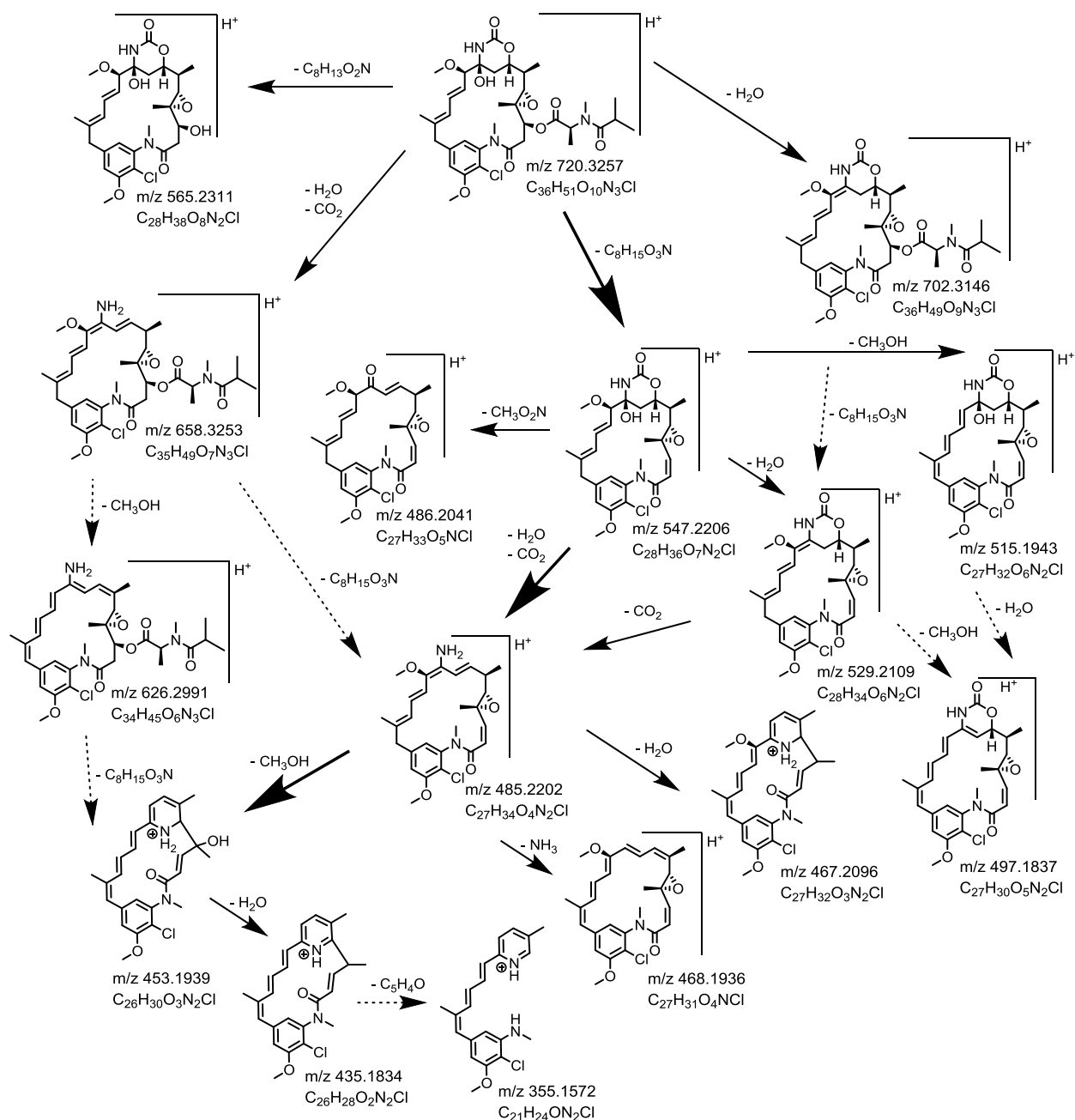


Abb. M9: Fragmentierungsweg von Maytanbutine.

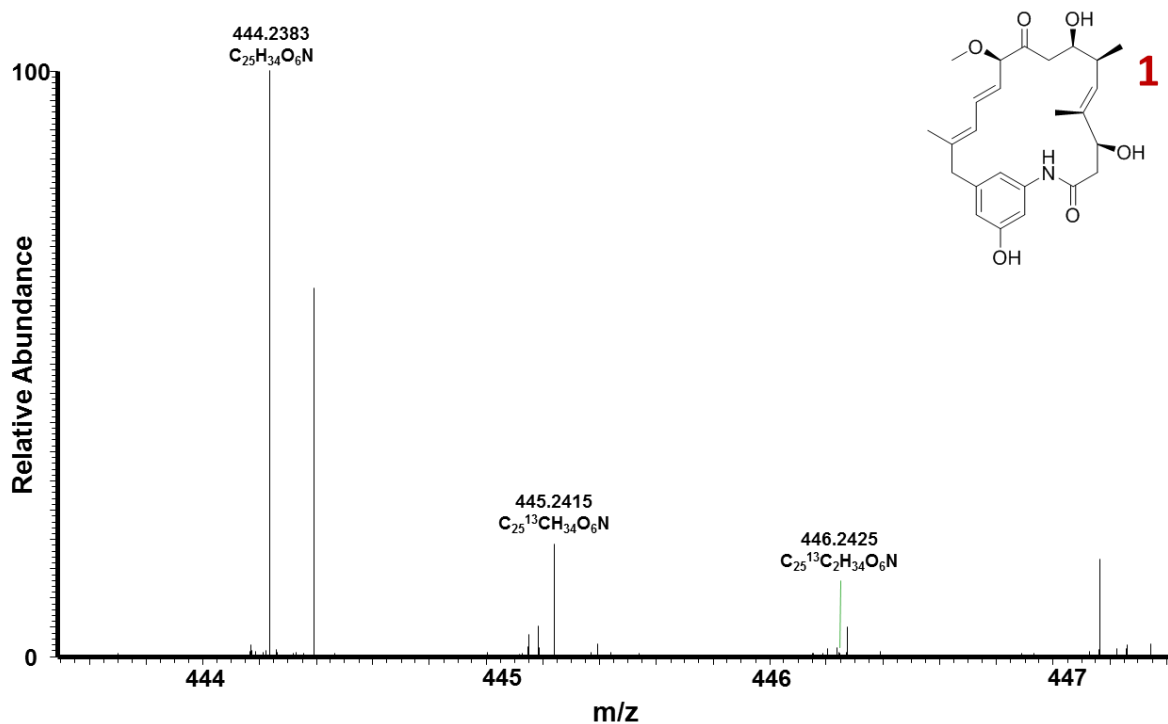


Abb. M10: HRMS-Spektrum der Maytansine-Vorstufe 1 aus dem Pflanzenextrakt der Rinde von *M. serrata* (Bafoussam, September 2014).

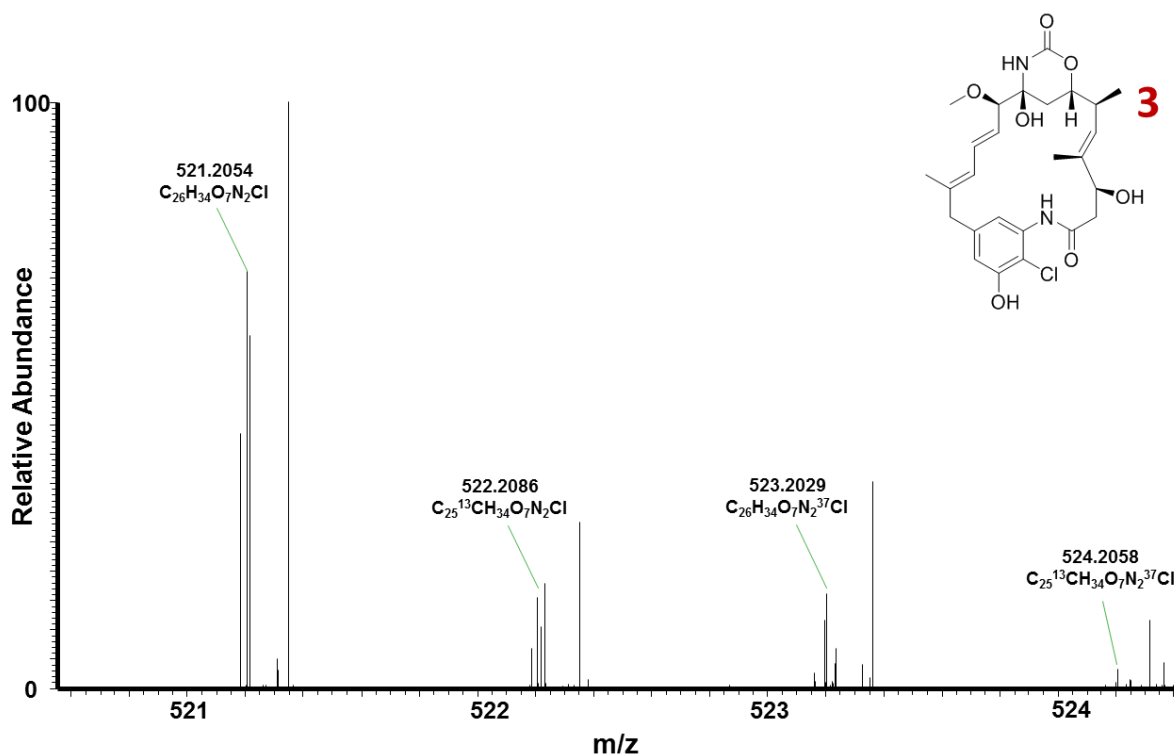


Abb. M11: HRMS-Spektrum der Maytansine-Vorstufe 3 aus dem Pflanzenextrakt der Rinde von *M. serrata* (Bafoussam, September 2014).

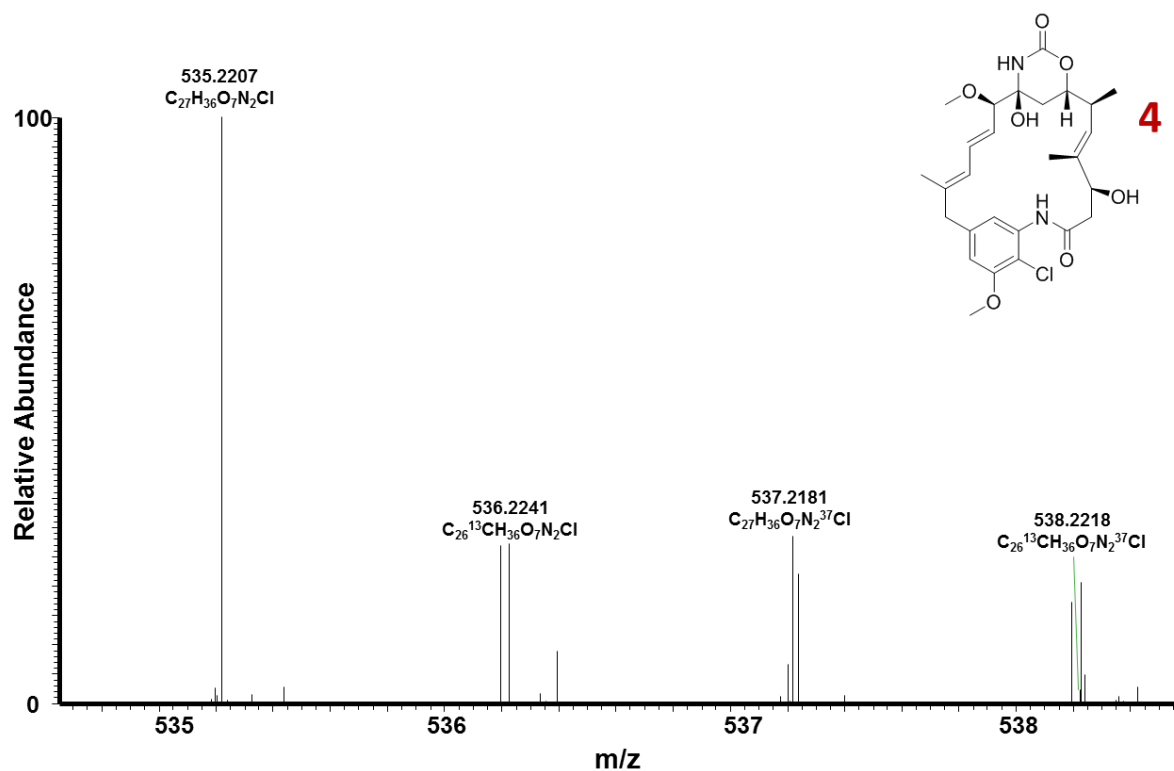


Abb. M12: HRMS-Spektrum der Maytansine-Vorstufe 4 aus dem Pflanzenextrakt der Rinde von *M. serrata* (Bafoussam, September 2014).

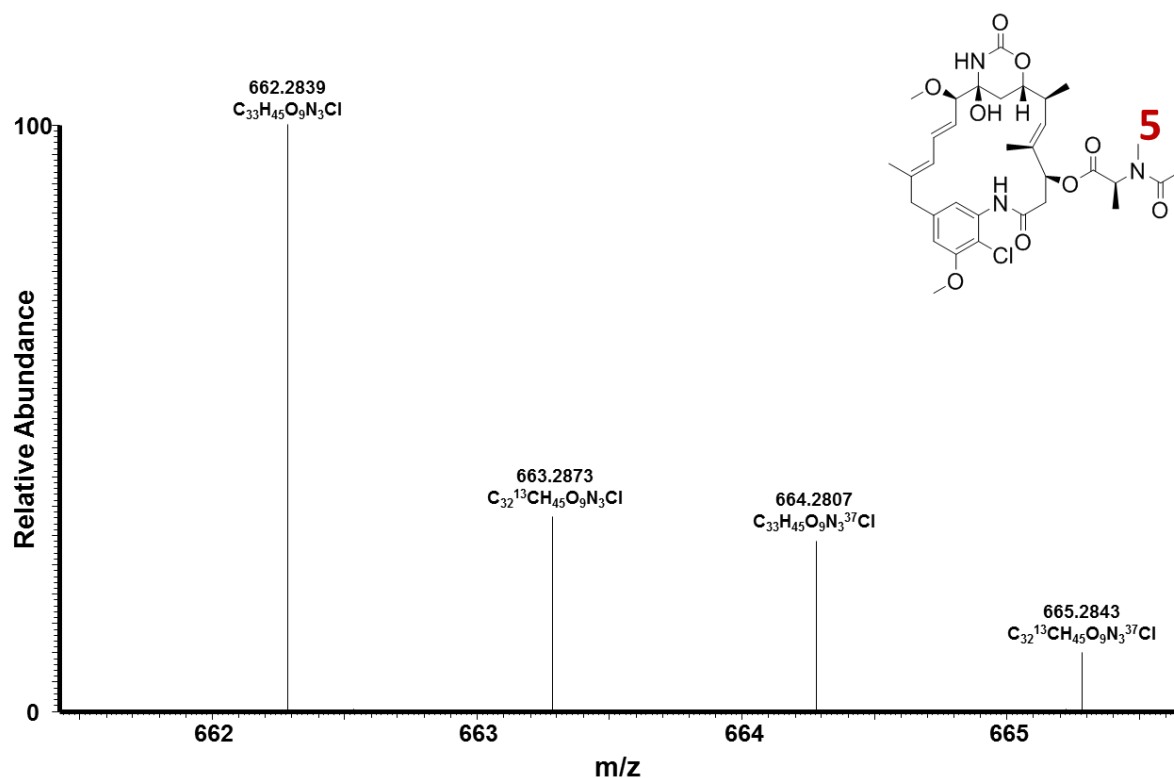


Abb. M13: HRMS-Spektrum der Maytansine-Vorstufe 5 aus dem Pflanzenextrakt der Rinde von *M. serrata* (Bafoussam, September 2014).

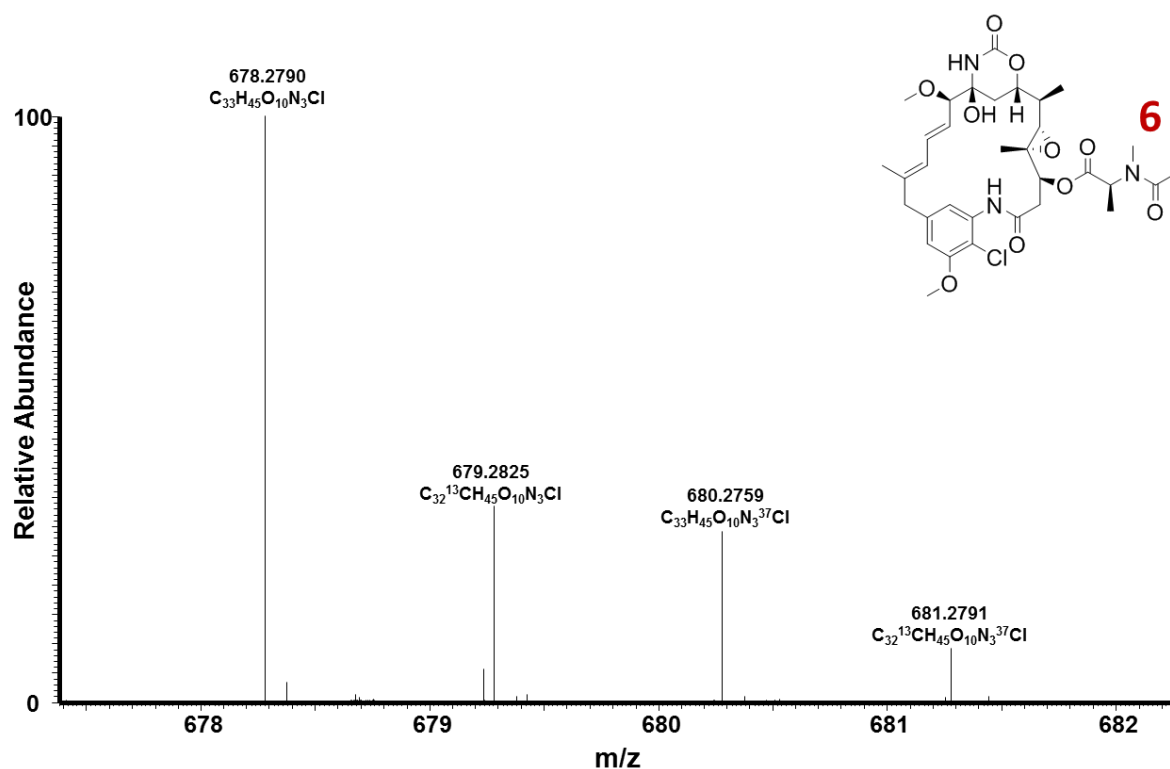


Abb. M14: HRMS-Spektrum der Maytansine-Vorstufe 6 aus dem Pflanzenextrakt der Rinde von *M. serrata* (Bafoussam, September 2014).

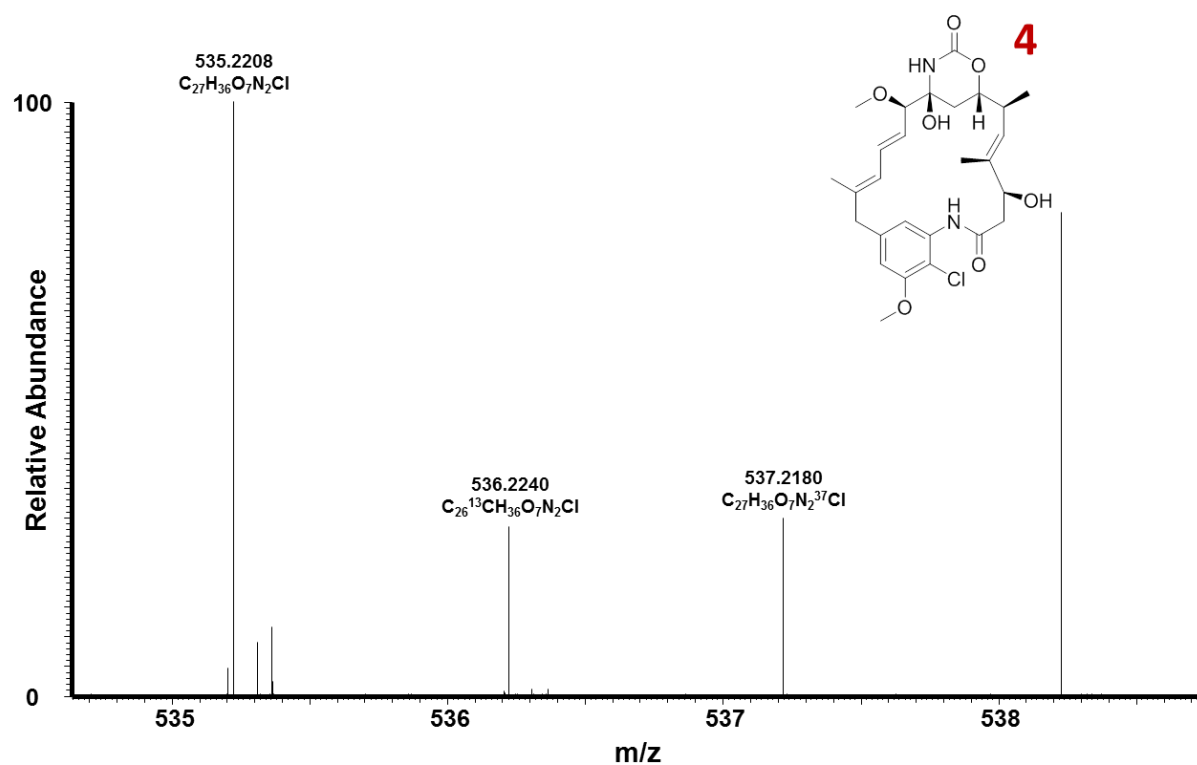


Abb. M15: HRMS-Spektrum der Maytansin-Vorstufe 4 aus dem Pflanzenextrakt der Wurzel von *M. serrata* (September 14).

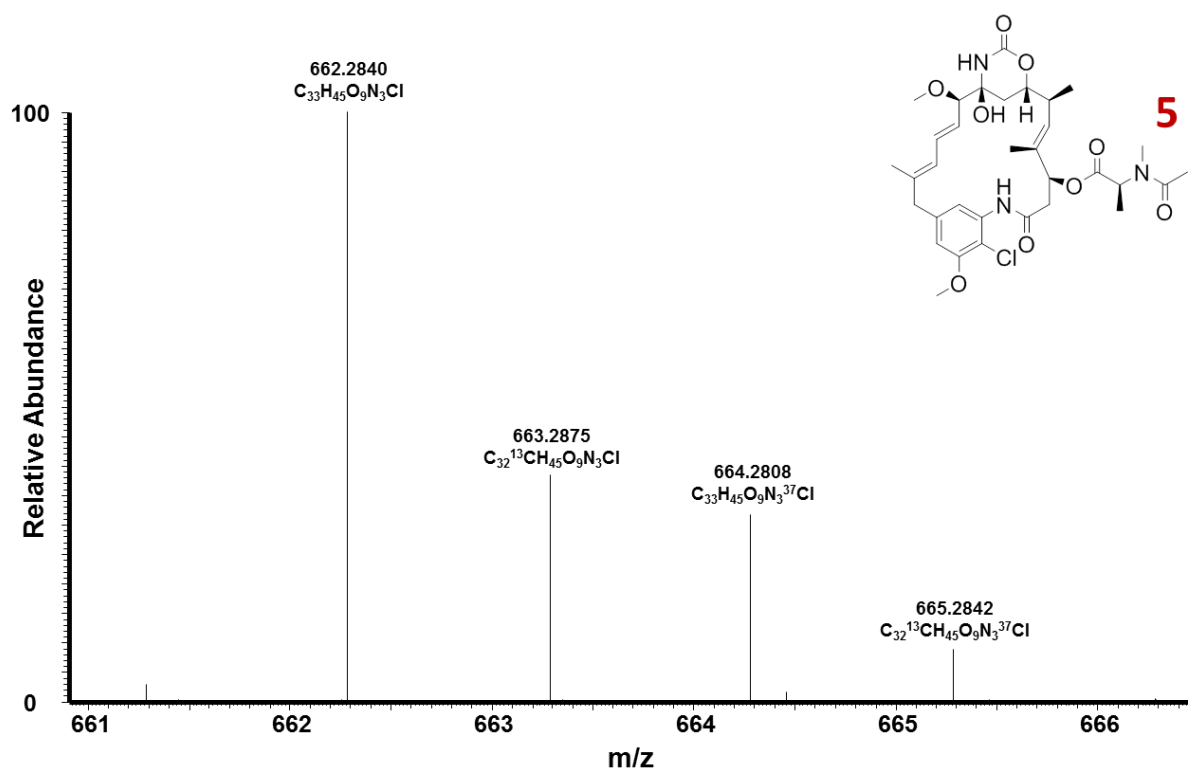


Abb. M16: HRMS-Spektrum der Maytansin-Vorstufe 5 aus dem Pflanzenextrakt der Wurzel von *M. serrata* (September 14).

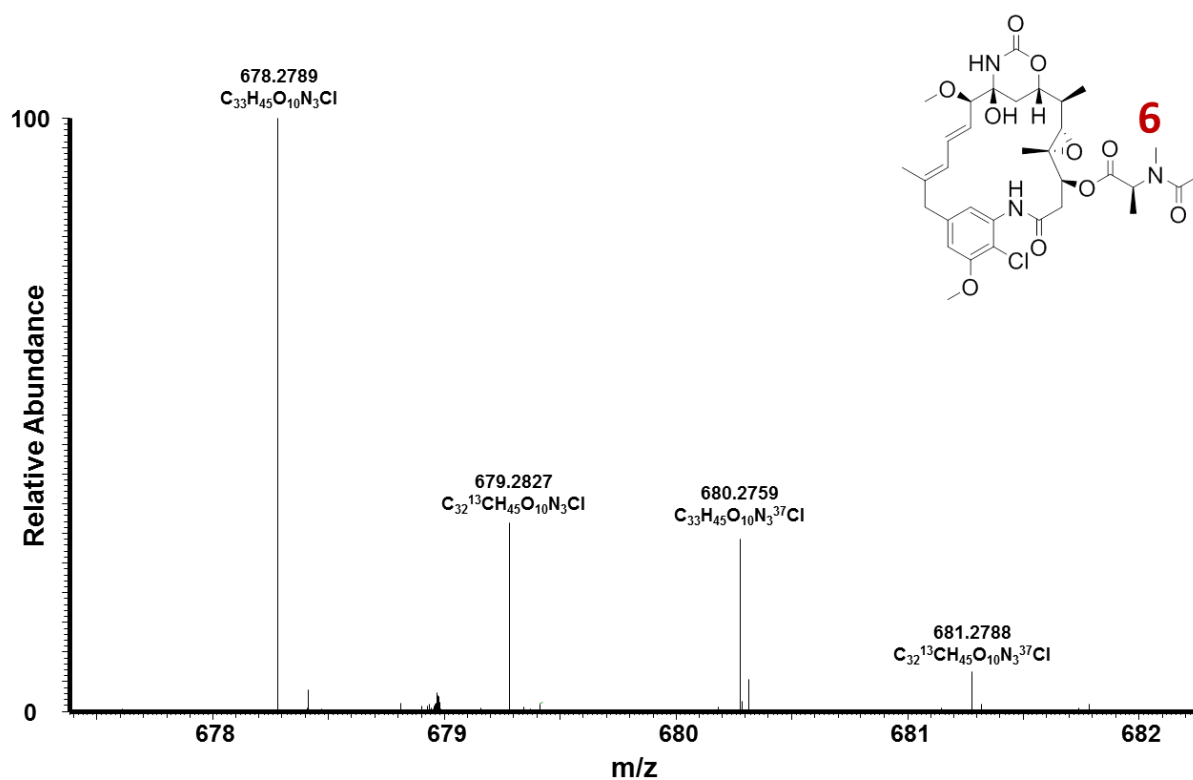


Abb. M17: HRMS-Spektrum der Maytansin-Vorstufe 6 aus dem Pflanzenextrakt der Wurzel von *M. serrata* (September 14).

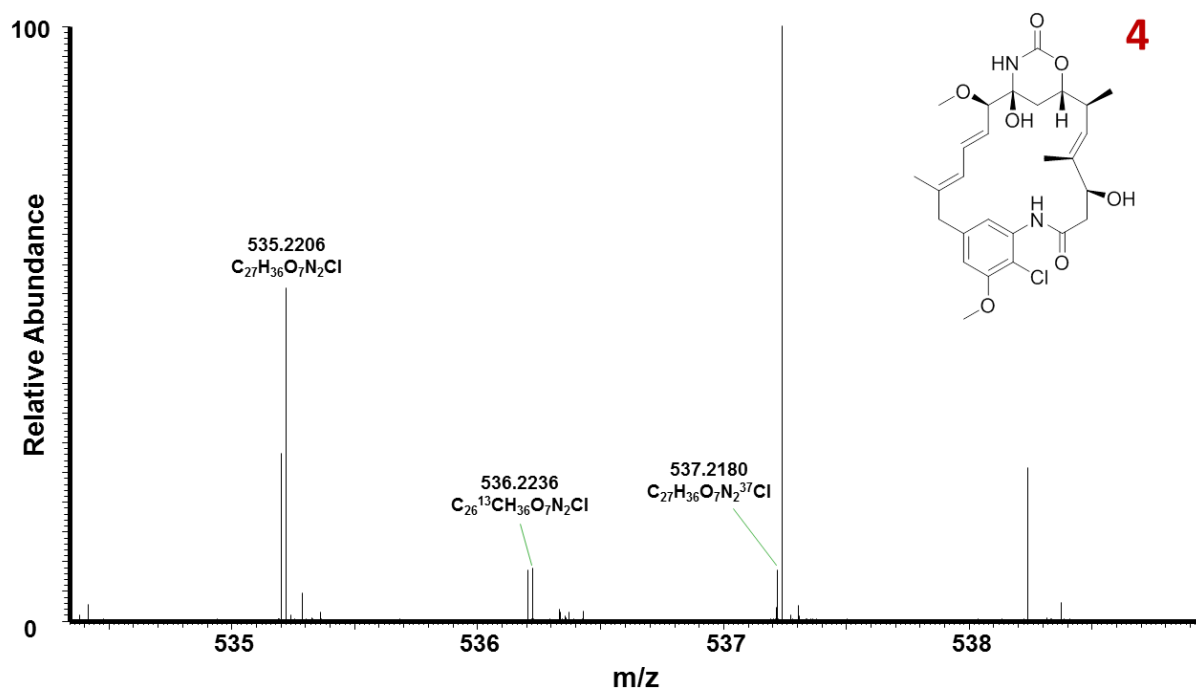


Abb. M18: HRMS-Spektrum der Maytansin-Vorstufe 4 aus dem Pflanzenextrakt der Blätter von *M. serrata* (September 14).

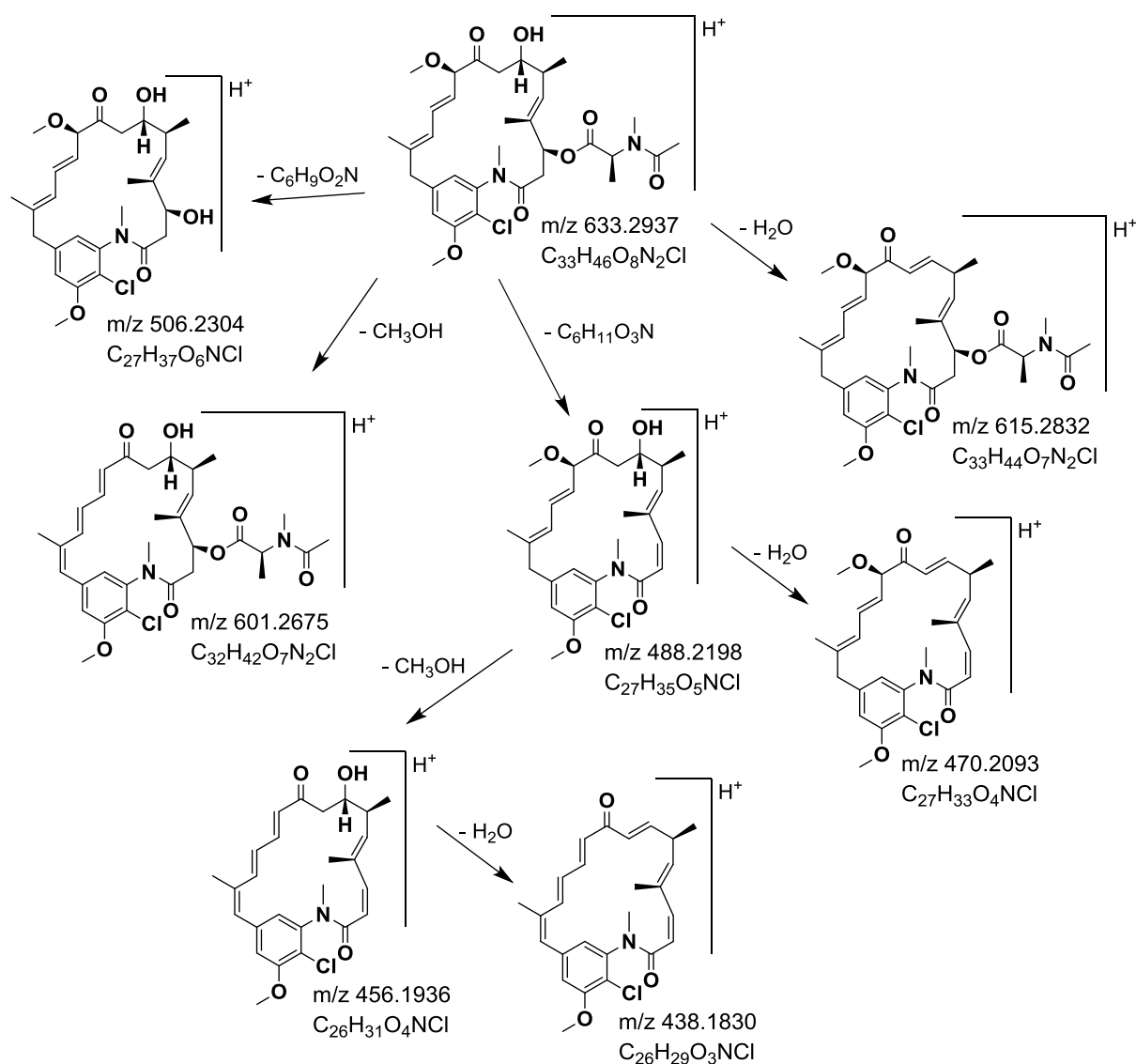


Abb. M19: Fragmentierungsweg der Maytansine-Vorstufe ohne Carbamat- und Epoxidgruppe.

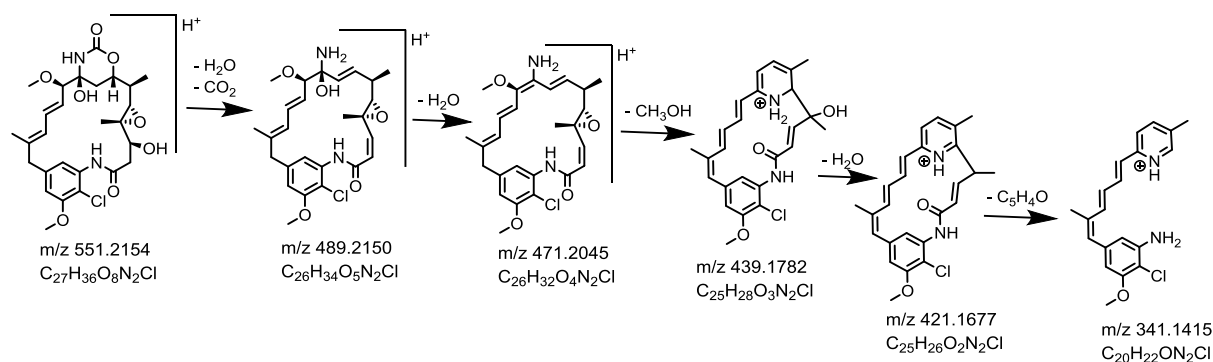


Abb. M20: Fragmentierungsweg der Maytansine-Vorstufe ohne N-Methylierung und Esterseitenkette.

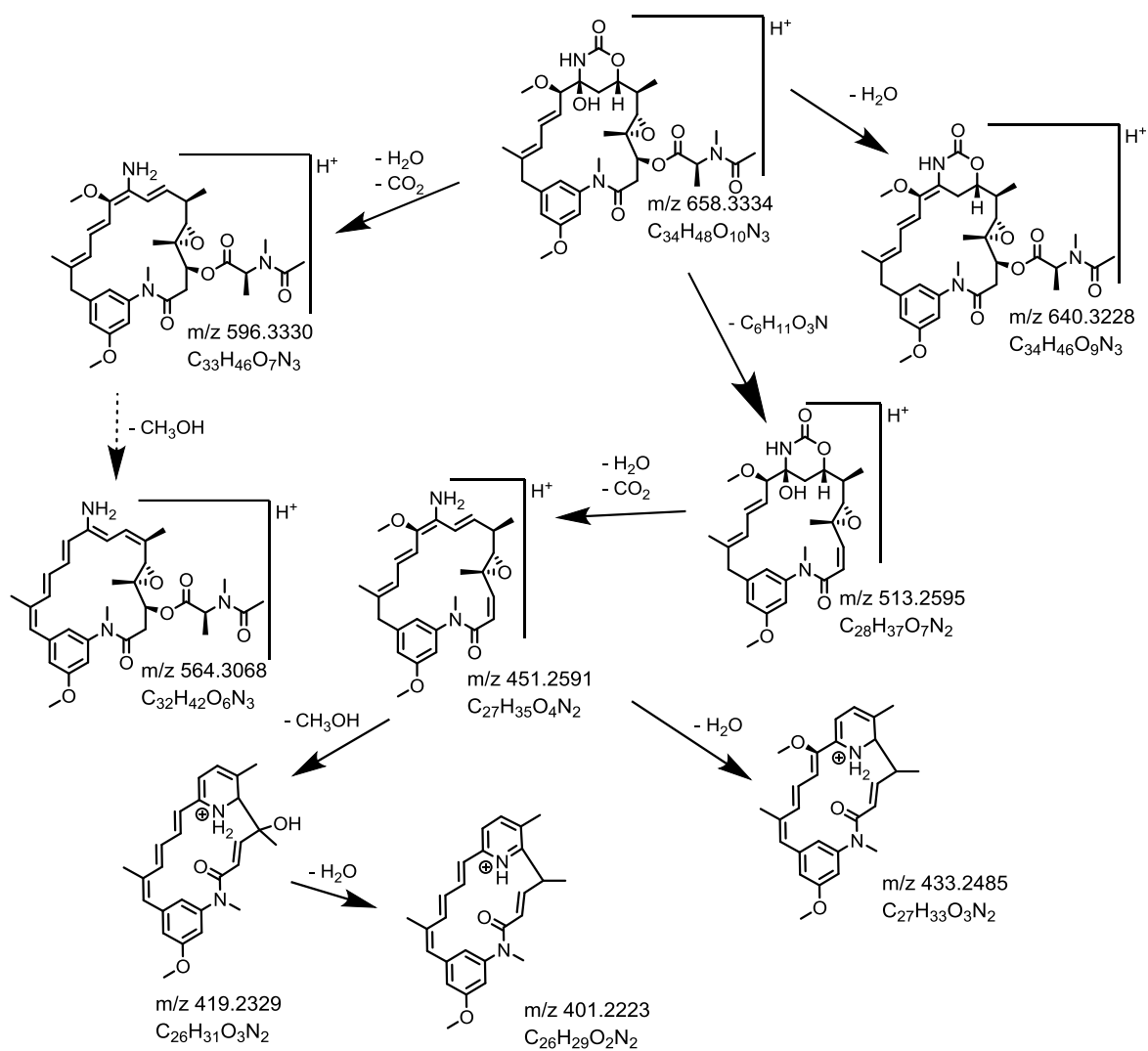


Abb. M21: Fragmentierungsweg der Maytansine-Vorstufe ohne Chlor (19-Deschlor-Maytansine).

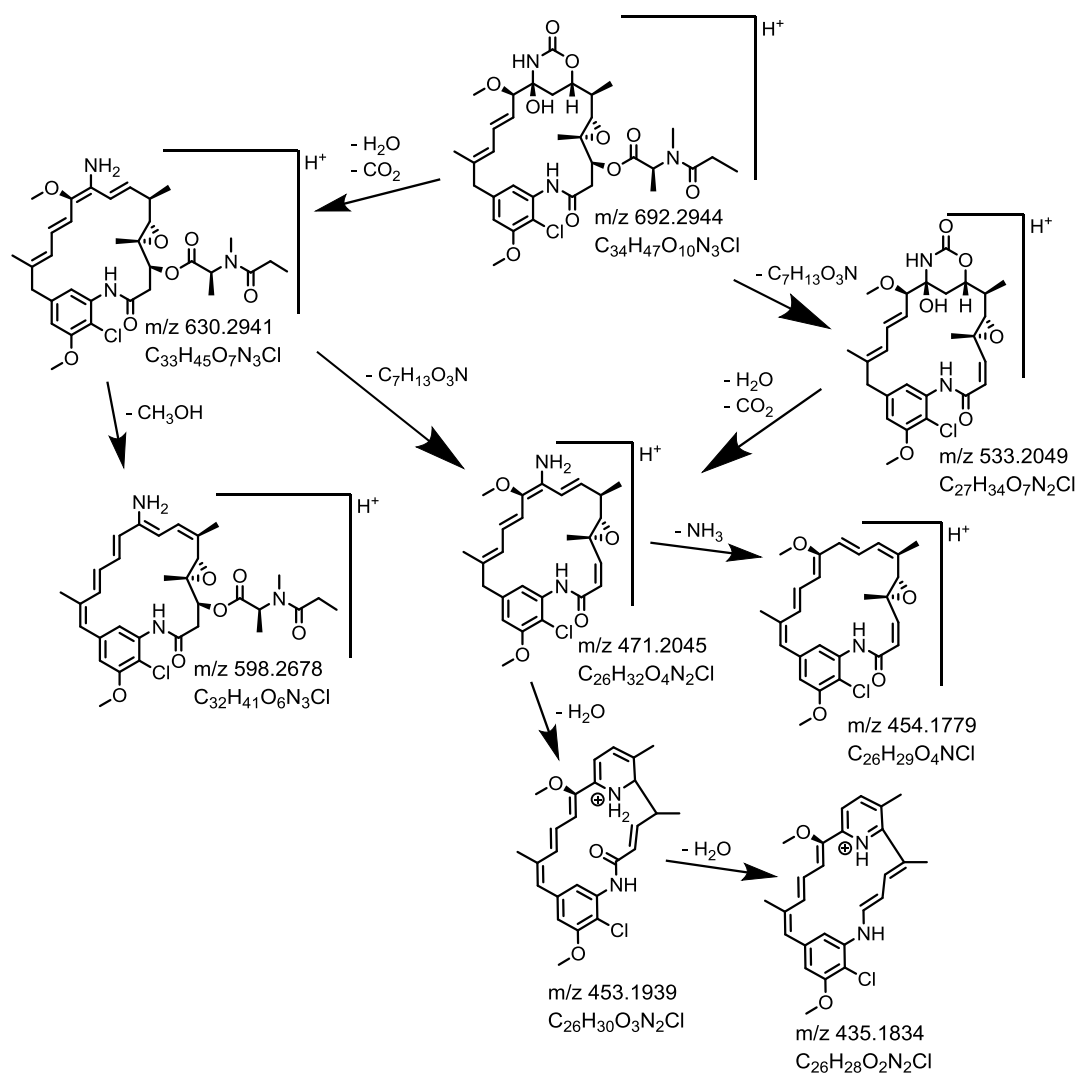


Abb. M22: Fragmentierungsweg der Maytanprine-Vorstufe 6 (vgl. Maytansine-Vorstufe 6).

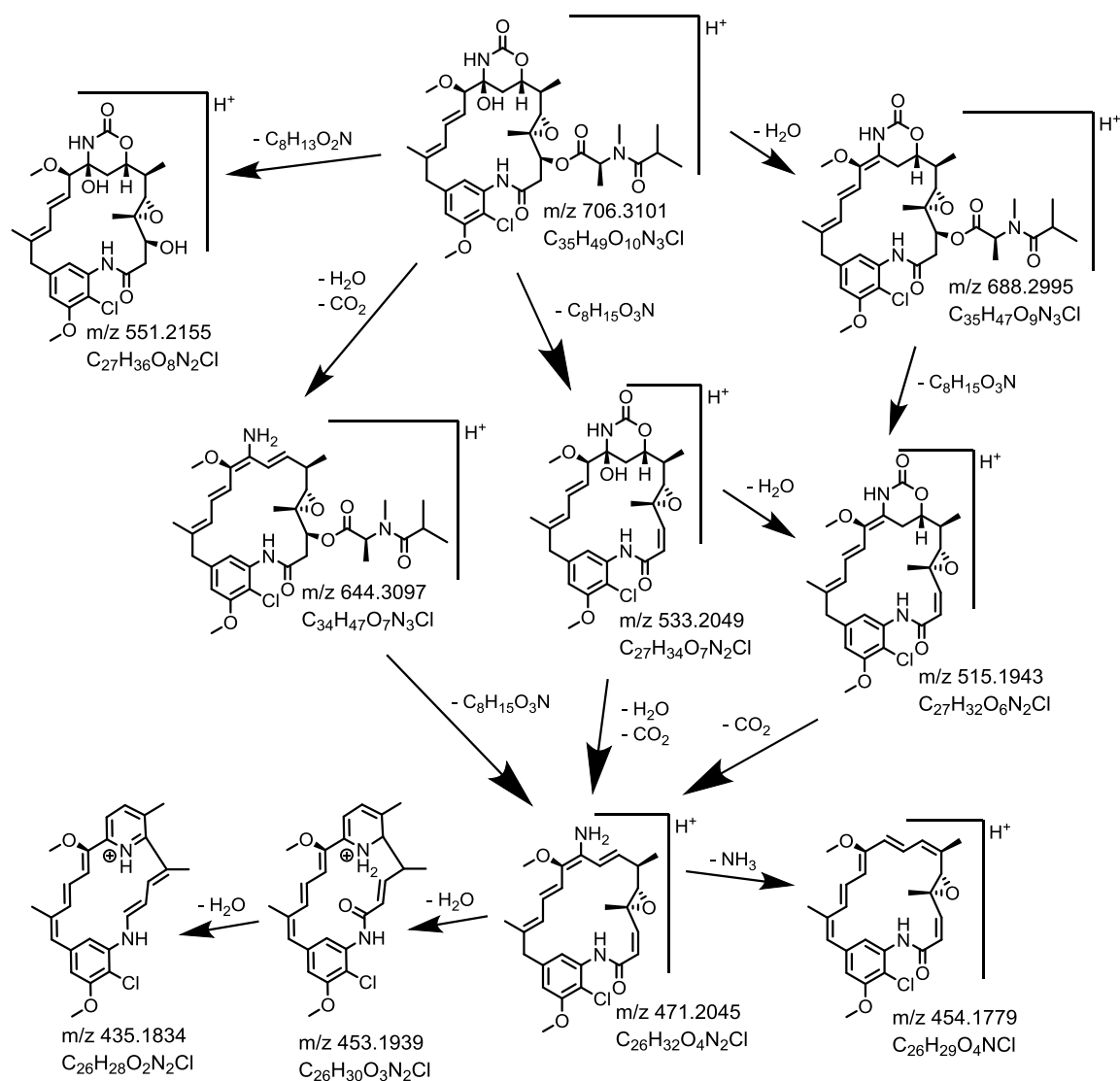


Abb. M23: Fragmentierungsweg der Maytanbutine-Vorstufe 6 (vgl. Maytansine-Vorstufe 6).

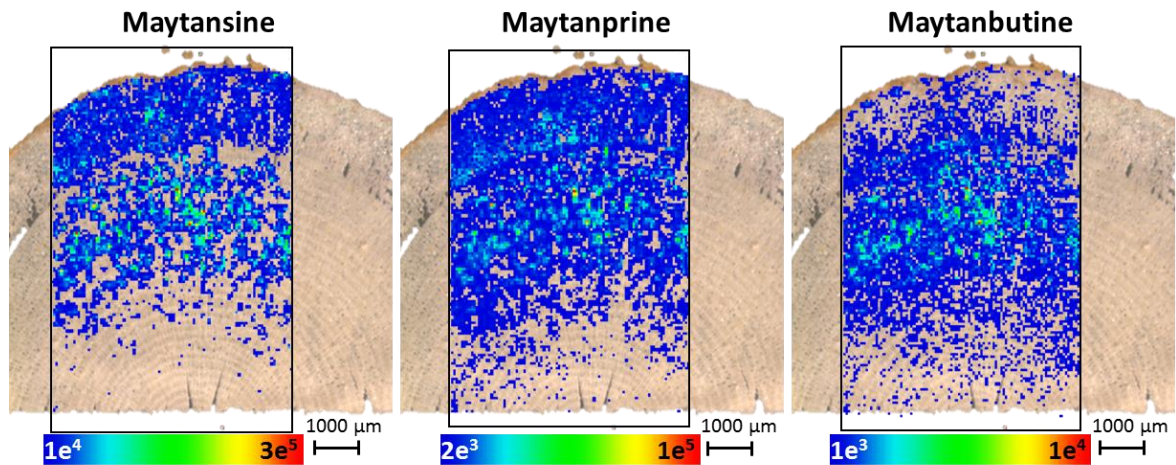


Abb. M24: MALDI-imaging-HRMS von *M. serrata* Wurzel-Querschnitt, Bafoussam, Kamerun, September 2014 (Scanbereich: 4850x7100 µm, Ortsauflösung: 50 µm; ± 2 ppm). Lokalisierung von Maytansine ($[M+K]^+$; m/z 730.2503), Maytanprine ($[M+K]^+$; m/z 744.2659) und Maytanbutine ($[M+K]^+$; m/z 758.2816).

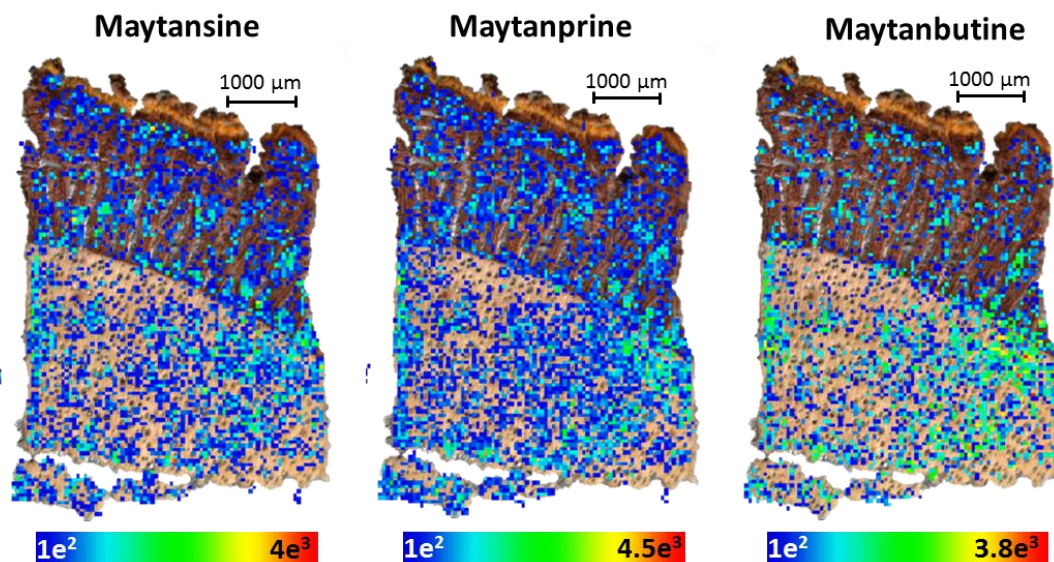


Abb. M25: MALDI-imaging-HRMS von *M. serrata* Wurzel-Querschnitt, Bambui, Kamerun, Dezember 2014 (Scanbereich: 5225x7040 µm, Ortsauflösung: 55 µm; ± 2 ppm). Lokalisierung von Maytansine ($[M+K]^+$; m/z 730.2503), Maytanprine ($[M+K]^+$; m/z 744.2659) und Maytanbutine ($[M+K]^+$; m/z 758.2816).

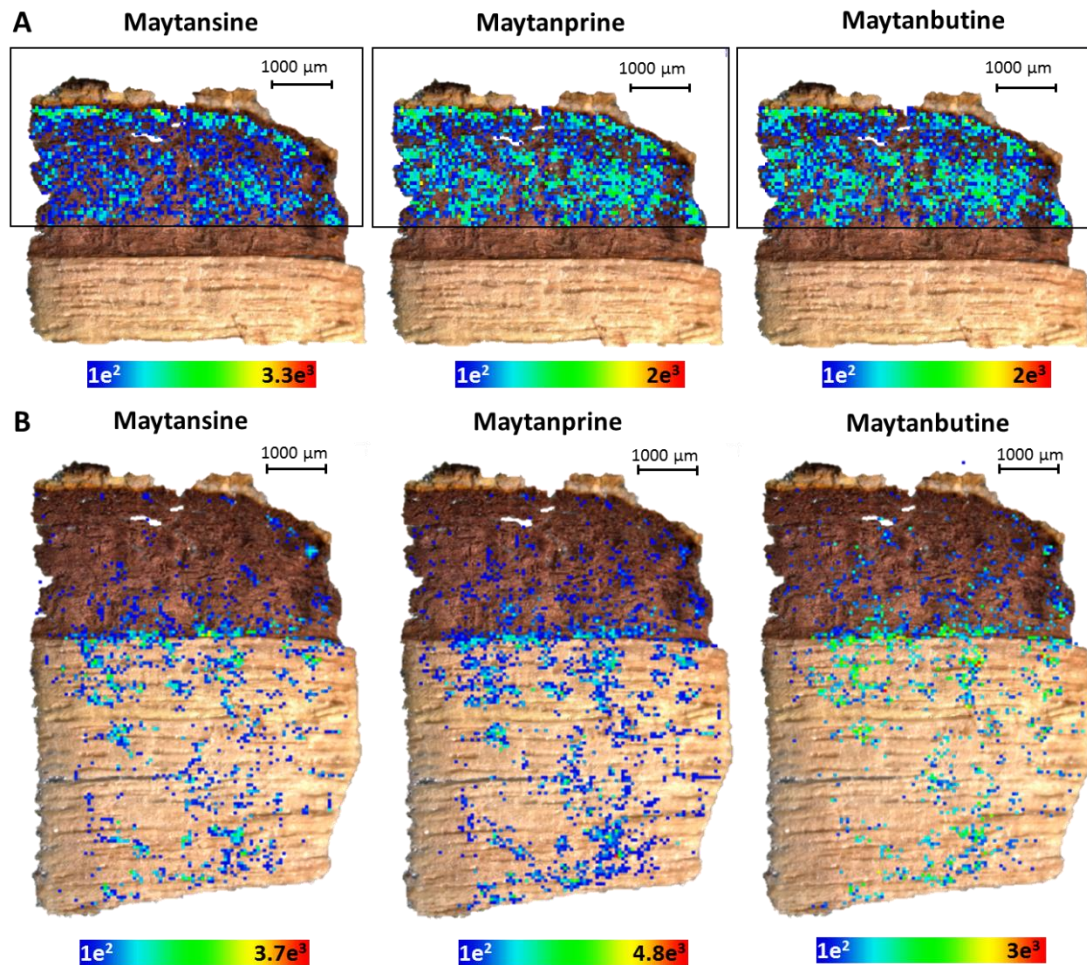


Abb. M26: MALDI-imaging-HRMS von *M. serrata* Wurzel-Longschnitt, Bambui, Kamerun, Dezember 2014 (Scanbereich: A: 6160x3190 μm ; B: 6380x8690; Ortsauflösung: 55 μm ; ± 2 ppm). Lokalisierung von Maytansine ($[\text{M}+\text{K}]^+$; m/z 730.2503), Maytanprine ($[\text{M}+\text{K}]^+$; m/z 744.2659) und Maytanbutine ($[\text{M}+\text{K}]^+$; m/z 758.2816).

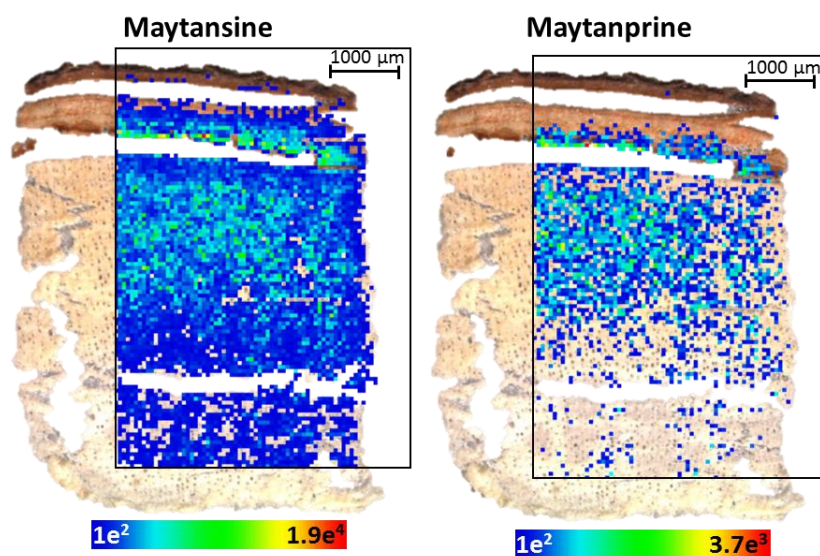


Abb. M27: MALDI-imaging-HRMS von *M. serrata* Stamm-Querschnitt, Bambui, Kamerun, Dezember 2014 (Scanbereich: 6360x4500 μm ; Ortsauflösung: 60 μm ; ± 2 ppm). Lokalisierung von Maytansine ($[\text{M}+\text{K}]^+$; m/z 730.2503) und Maytanprine ($[\text{M}+\text{K}]^+$; m/z 744.2659).

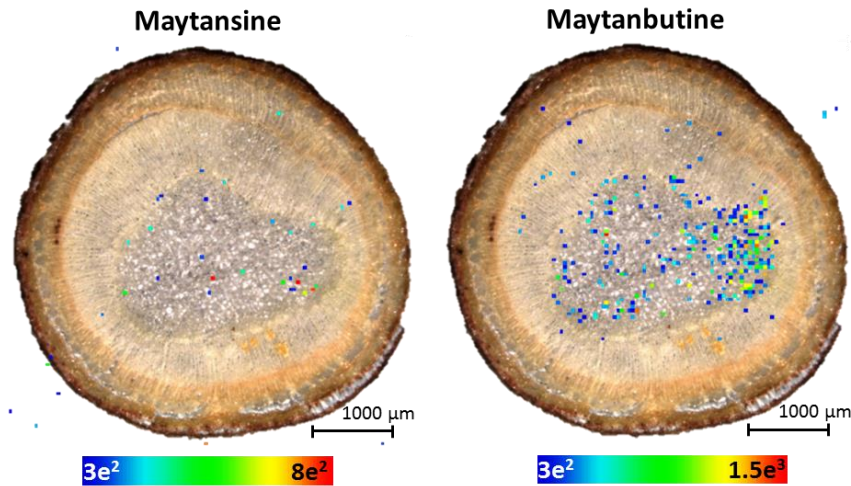


Abb. M28: MALDI-imaging-HRMS von *M. senegalensis* Zweig-Querschnitt, Tonga, Kamerun, Dezember 2014 (Scanbereich: 5650x5850 μm , Ortsauflösung: 50 μm ; ± 2 ppm). Lokalisierung von Maytansine ($[\text{M}+\text{K}]^+$; m/z 730.2503) und Maytanbutine ($[\text{M}+\text{K}]^+$ m/z 758.2816).

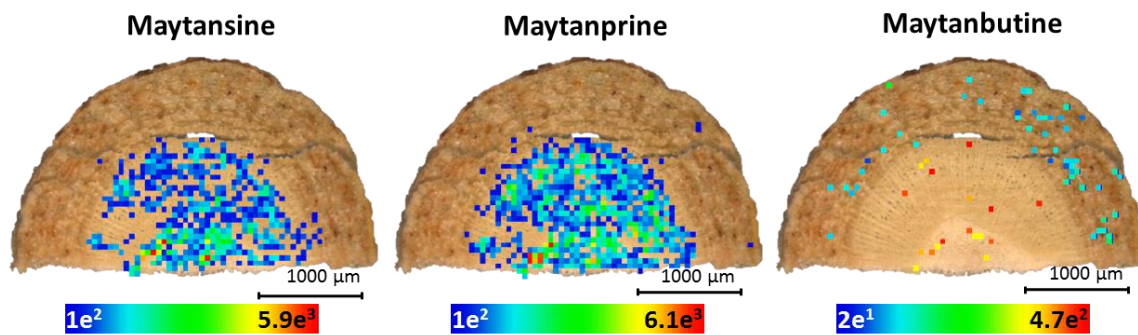


Abb. M29: MALDI-imaging-HRMS von *M. senegalensis* Wurzel-Querschnitt, Molepolole, Botswana, April 2015 (Scanbereich: 4500x2500 μm , Ortsauflösung: 50 μm ; ± 2 ppm). Lokalisierung von Maytansine ($[\text{M}+\text{K}]^+$; m/z 730.2503), Maytanprine ($[\text{M}+\text{K}]^+$; m/z 744.2659) und Maytanbutine ($[\text{M}+\text{K}]^+$ m/z 758.2816).

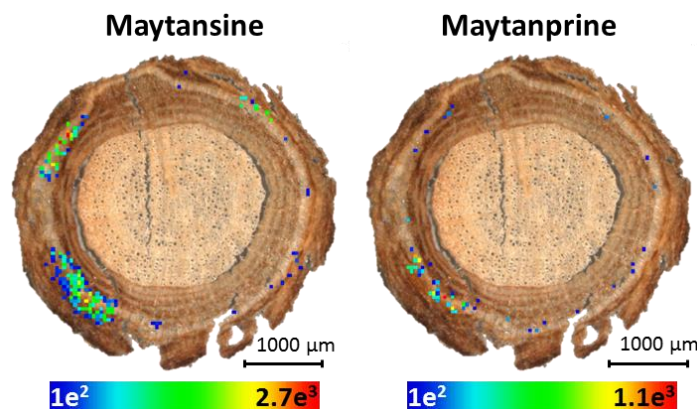


Abb. M30: MALDI-imaging-HRMS von *M. senegalensis* (schwarze) Wurzel-Querschnitt, Molepolole, Botswana, April 2015 (Scanbereich: 4800x4800 μm , Ortsauflösung: 50 μm ; ± 2 ppm). Lokalisierung von Maytansine ($[\text{M}+\text{K}]^+$; m/z 730.2503) und Maytanbutine ($[\text{M}+\text{K}]^+$ m/z 758.2816).

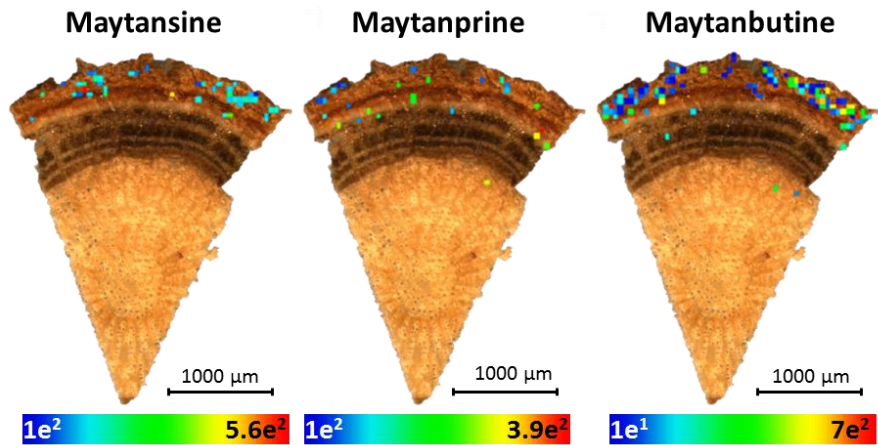


Abb. M31: MALDI-imaging-HRMS von *M. senegalensis* (schwarze) Wurzel-Querschnitt, Molepolole, Botswana, April 2015 (Scanbereich: 3500x6400 μm , Ortsauflösung: 50 μm ; ± 2 ppm). Lokalisierung von Maytansine ($[\text{M}+\text{K}]^+$; m/z 730.2503), Maytanprine ($[\text{M}+\text{K}]^+$; m/z 744.2659) und Maytanbutine ($[\text{M}+\text{K}]^+$; m/z 758.2816).

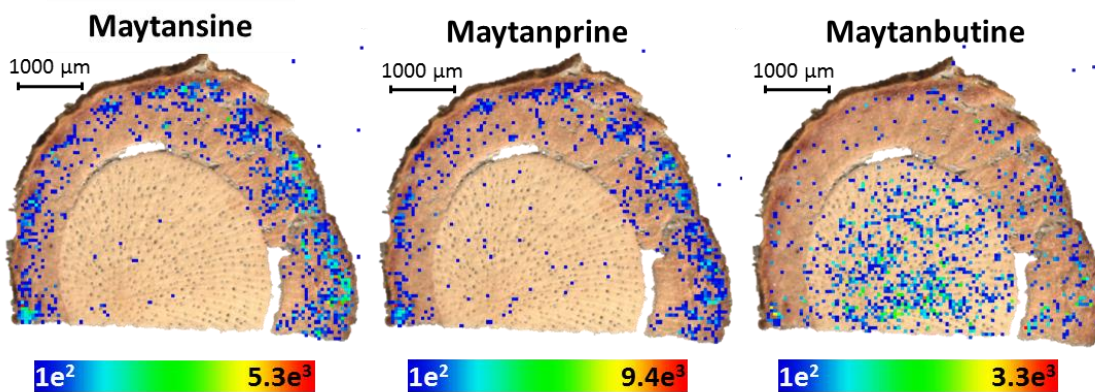


Abb. M32: MALDI-imaging-HRMS von *M. senegalensis* (schwarze) Wurzel-Querschnitt, Ejura Mampong, Ghana, Juni 2015 (Scanbereich: 5800x5050 μm , Ortsauflösung: 50 μm ; ± 2 ppm). Lokalisierung von Maytansine ($[\text{M}+\text{K}]^+$; m/z 730.2503), Maytanprine ($[\text{M}+\text{K}]^+$; m/z 744.2659) und Maytanbutine ($[\text{M}+\text{K}]^+$; m/z 758.2816).

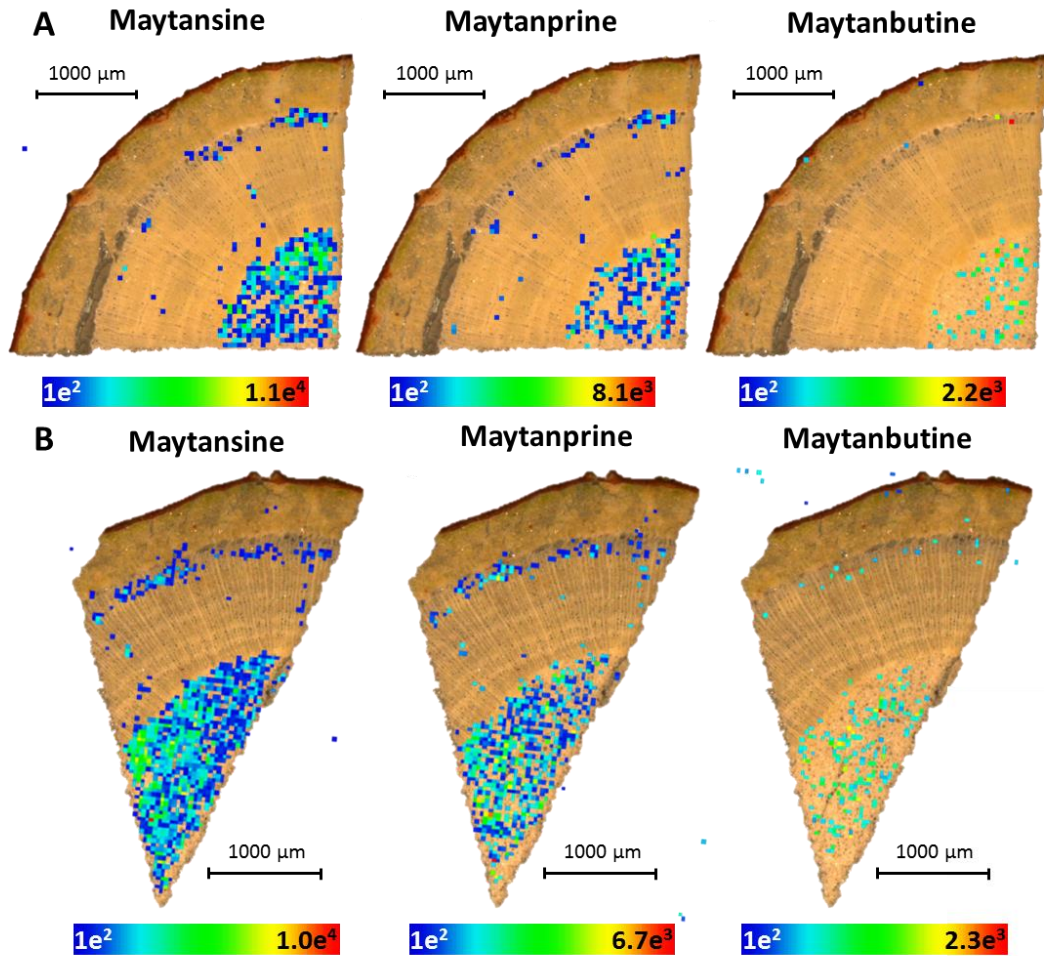


Abb. M33: MALDI-imaging-HRMS von *M. heterophylla* Zweig-Querschnitten, Bonnievale, Südafrika, Oktober 2015 (Scanbereich: A: 4200x3850 μm , Ortsauflösung: 50 μm ; B 3480x4880 μm , Ortsauflösung: 40 μm ; ± 2 ppm). Lokalisierung von Maytansine ($[\text{M}+\text{K}]^+$; m/z 730.2503), Maytanprine ($[\text{M}+\text{K}]^+$; m/z 744.2659) und Maytanbutine ($[\text{M}+\text{K}]^+$; m/z 758.2816).

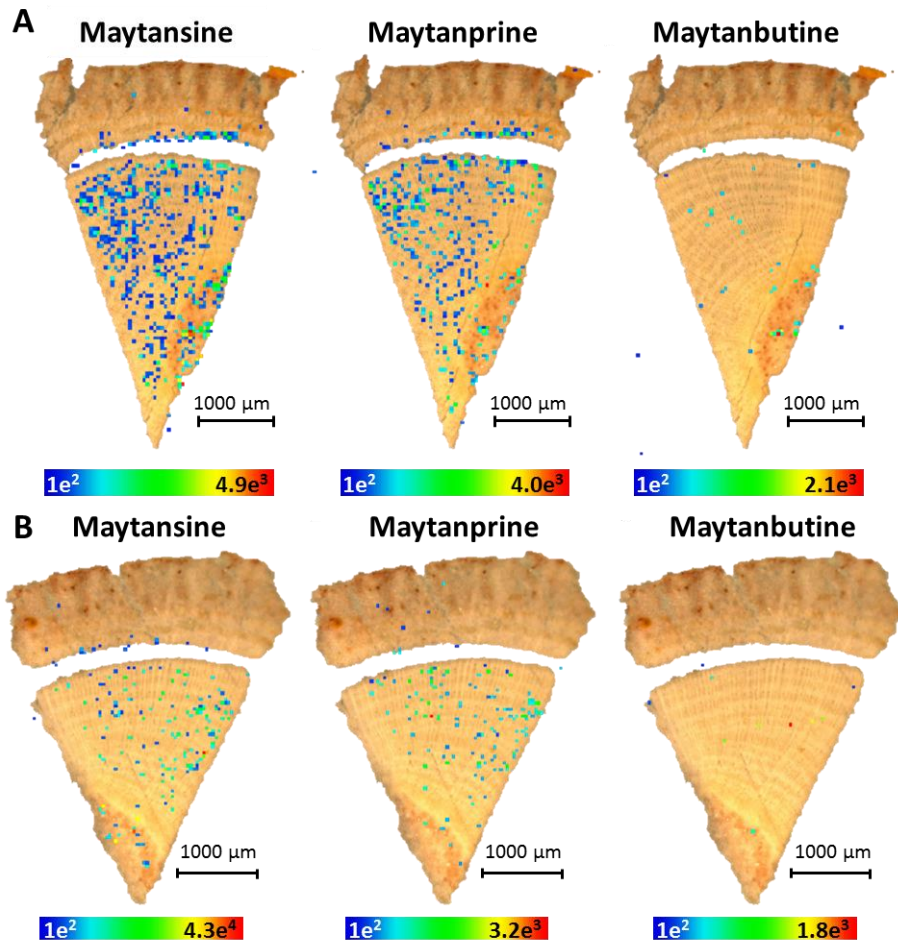


Abb. M34: MALDI-imaging-HRMS von *M. heterophylla* Wurzel-Querschnitten, Bonnievale, Südafrika, Oktober 2015 (Scanbereich: A: 4600x5850 µm, Ortsauflösung: 50 µm; B: 4440x5360 µm, Ortsauflösung: 40 µm; ± 2 ppm). Lokalisierung von Maytansine ($[M+K]^+$; m/z 730.2503), Maytanprine ($[M+K]^+$; m/z 744.2659) und Maytanbutine ($[M+K]^+$; m/z 758.2816).

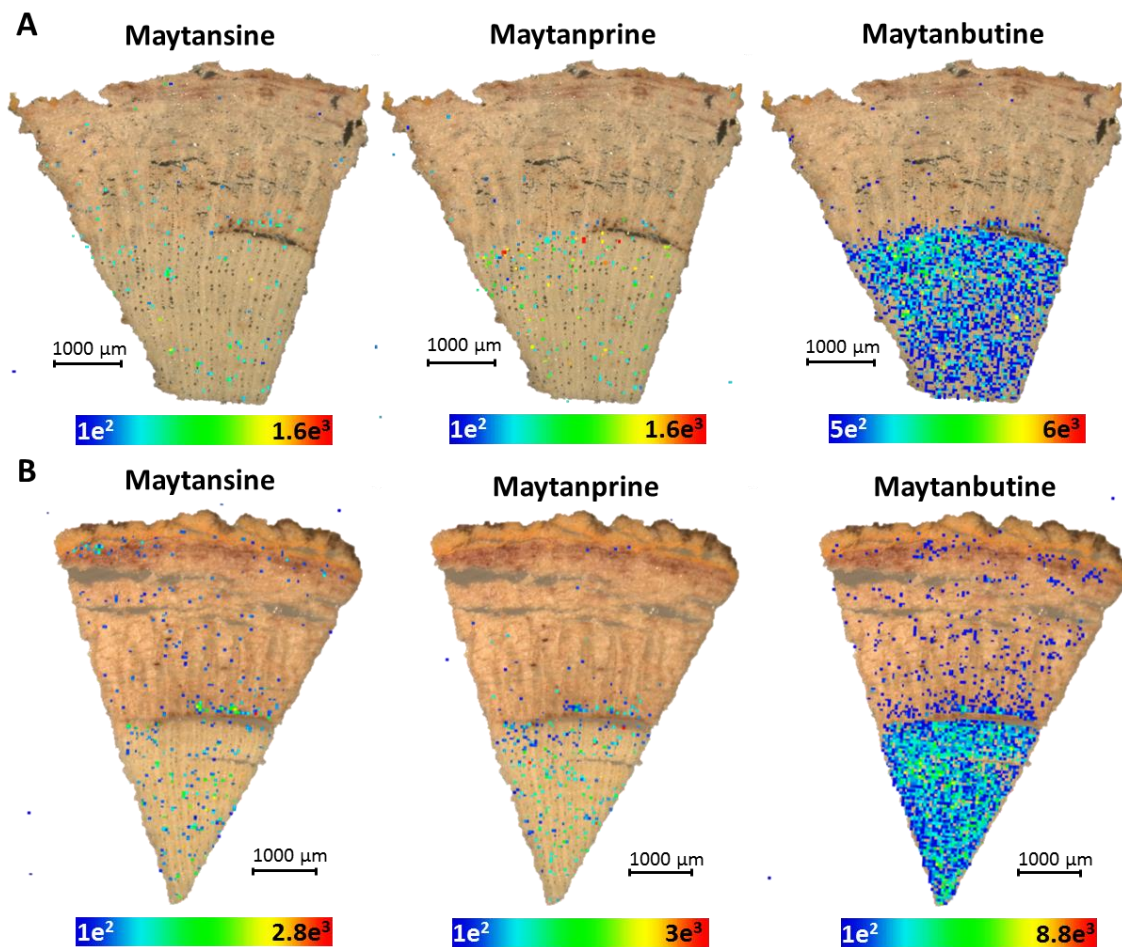


Abb. M35: MALDI-imaging-HRMS von *M. senegalensis* Wurzel-Querschnitten, Kwahu Asakraka II, Ghana, April 2016 (Scanbereich: A: 5760x5540 μm ; B 5520x7080 μm , Ortsauflösung: 40 μm ; ± 2 ppm). Lokalisierung von Maytansine ($[\text{M}+\text{K}]^+$; m/z 730.2503), Maytanprine ($[\text{M}+\text{K}]^+$; m/z 744.2659) und Maytanbutine ($[\text{M}+\text{K}]^+$ m/z 758.2816).

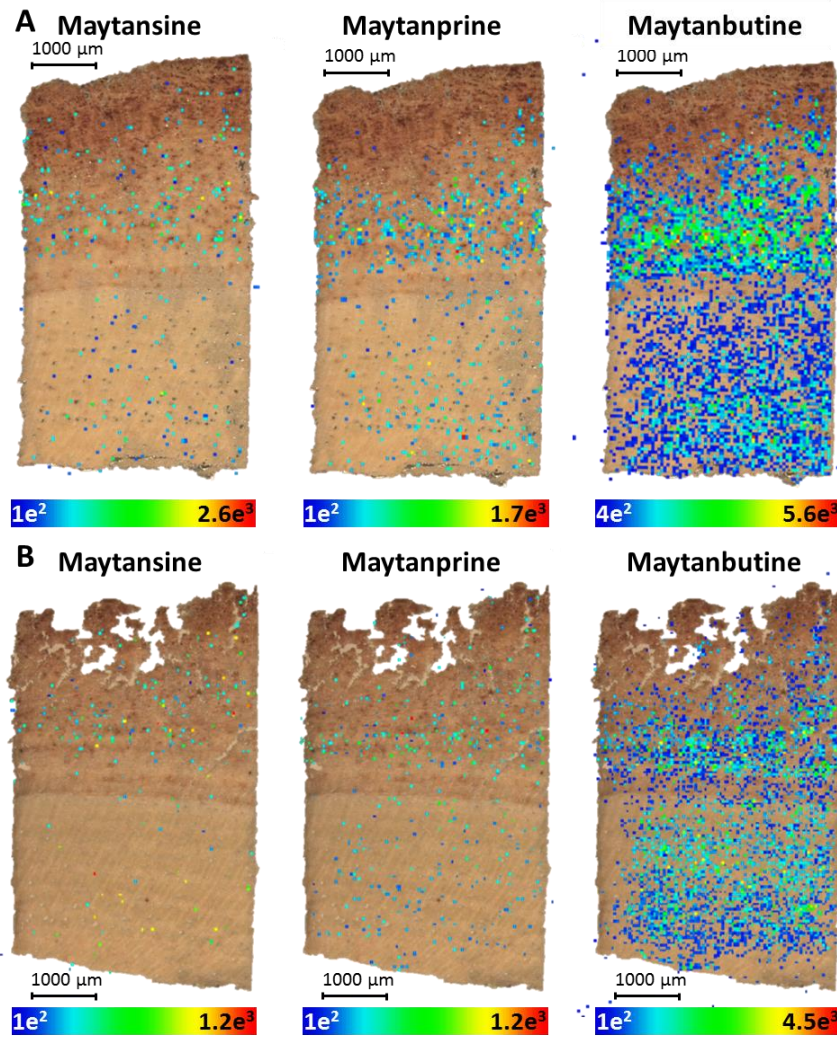


Abb. M36: MALDI-imaging-HRMS von *M. ovatus* Wurzel-Querschnitten, Nigeria, Juni 2016 (Scanbereich: A: 4700x7500 µm, Ortsauflösung: 50 µm; B 4600x7520 µm, Ortsauflösung: 40 µm; ± 2 ppm). Lokalisierung von Maytansine ($[M+K]^+$; m/z 730.2503), Maytanprine ($[M+K]^+$; m/z 744.2659) und Maytanbutine ($[M+K]^+$; m/z 758.2816).

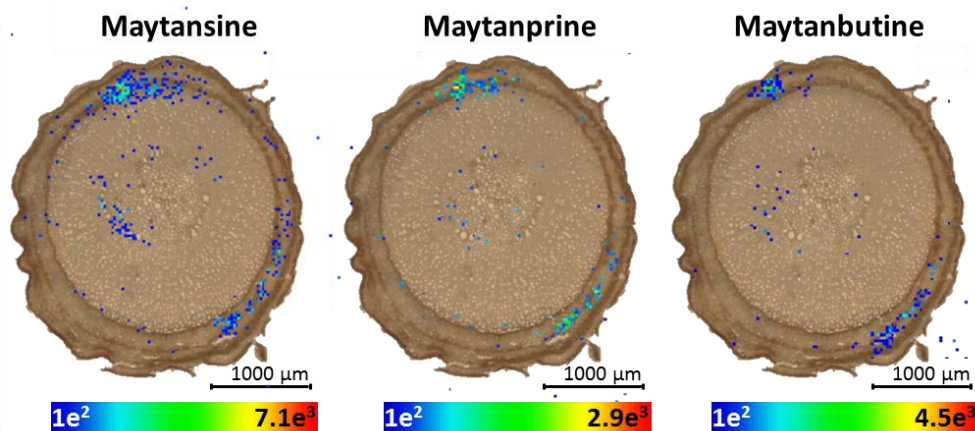


Abb. M37: MALDI-imaging-HRMS von *M. ovatus* Zweig-Querschnitt, Nigeria, Juni 2016 (Scanbereich: 3825x4050 µm, Ortsauflösung: 25 µm; ± 2 ppm). Lokalisierung von Maytansine ($[M+K]^+$; m/z 730.2503), Maytanprine ($[M+K]^+$; m/z 744.2659) und Maytanbutine ($[M+K]^+$; m/z 758.2816).

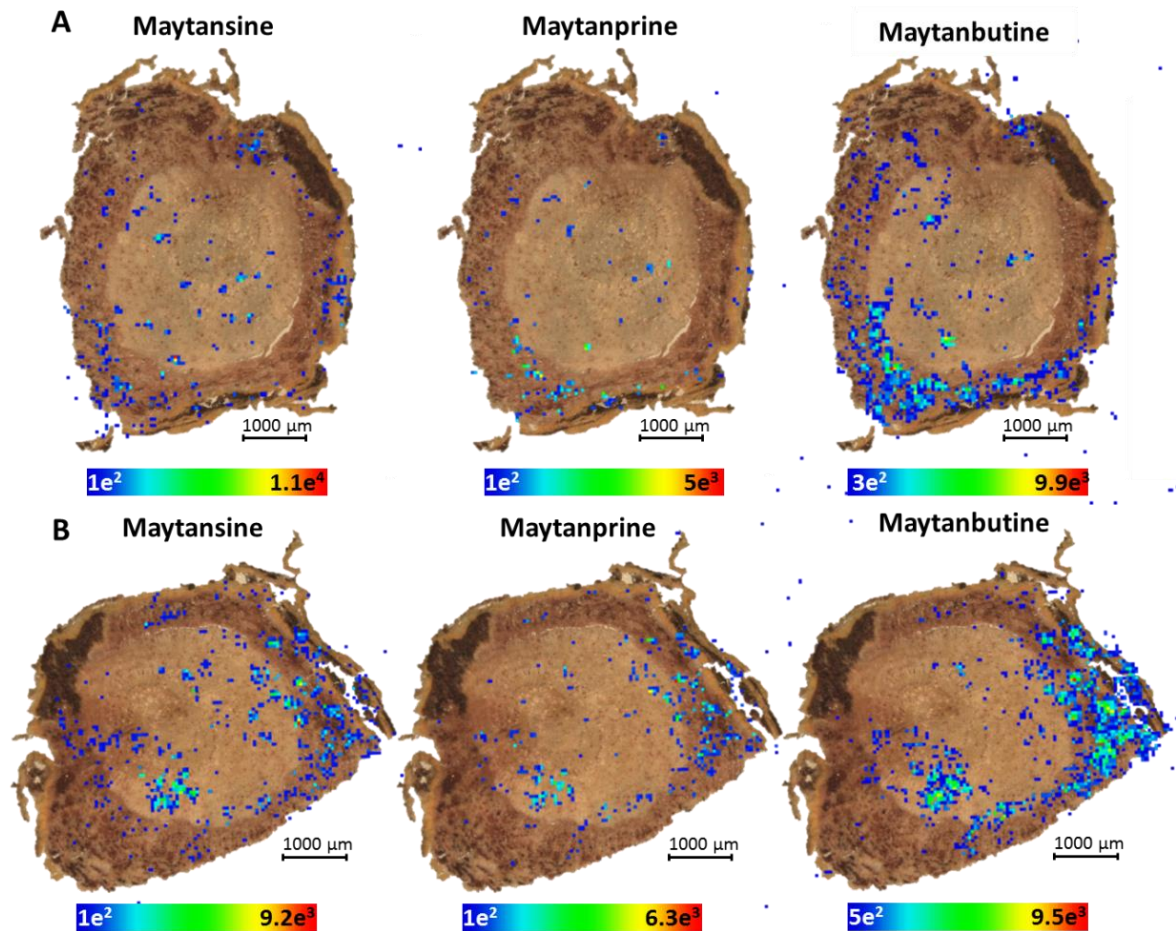


Abb. M38: MALDI-imaging-HRMS von *M. senegalensis* Wurzel-Querschnitten, Nigeria, Juni 2016 (Scanbereich: A: 4840x5680 μm ; B: 5840x5240 μm ; Ortsauflösung: 40 μm ; ± 2 ppm). Lokalisierung von Maytansine ($[\text{M}+\text{K}]^+$; m/z 730.2503), Maytanprine ($[\text{M}+\text{K}]^+$; m/z 744.2659) und Maytanbutine ($[\text{M}+\text{K}]^+$; m/z 758.2816).

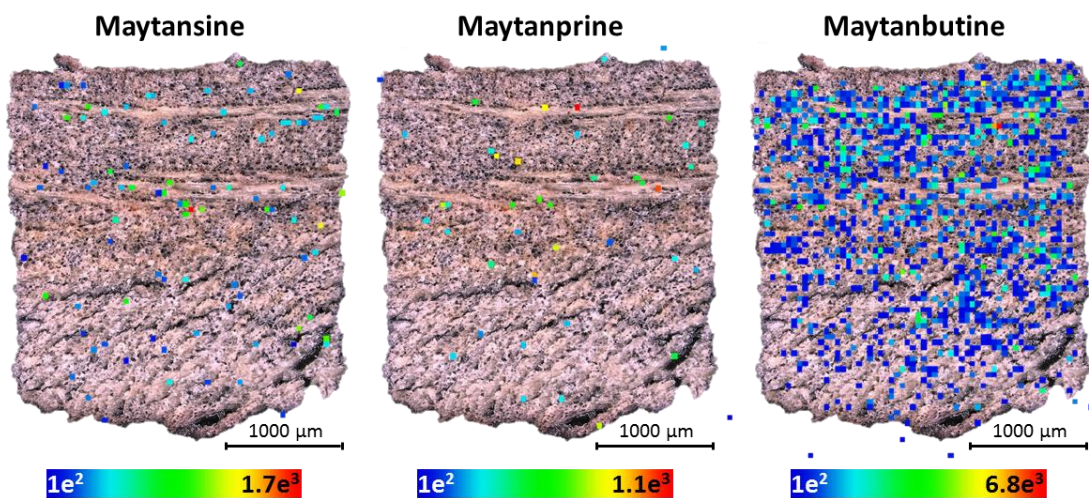


Abb. M39: MALDI-imaging-HRMS von *M. heterophylla* Wurzel-Querschnitt, Tchouta moussa, Kamerun, Dezember 2016 (Scanbereich: 3160x3160 μm , Ortsauflösung: 40 μm ; ± 2 ppm). Lokalisierung von Maytansine ($[\text{M}+\text{K}]^+$; m/z 730.2503), Maytanprine ($[\text{M}+\text{K}]^+$; m/z 744.2659) und Maytanbutine ($[\text{M}+\text{K}]^+$; m/z 758.2816).

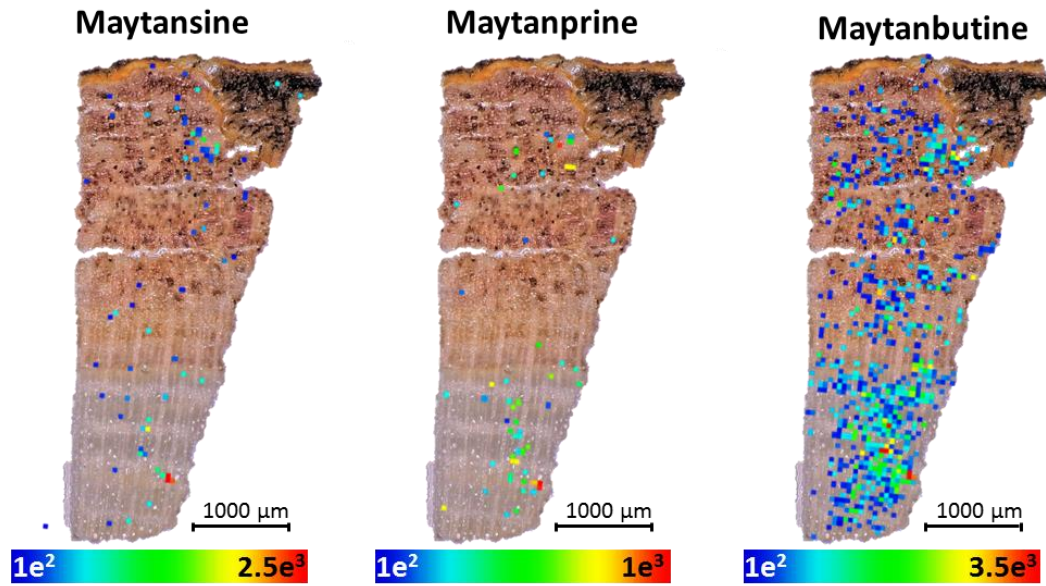


Abb. M40: MALDI-imaging-HRMS von *M. senegalensis* Stamm-Querschnitt, Tonga, Kamerun, Dezember 2016 (Scanbereich: 3050x5600 µm, Ortsauflösung: 50 µm; ± 2 ppm). Lokalisierung von Maytansine ($[M+K]^+$; m/z 730.2503), Maytanprine ($[M+K]^+$; m/z 744.2659) und Maytanbutine ($[M+K]^+$; m/z 758.2816).

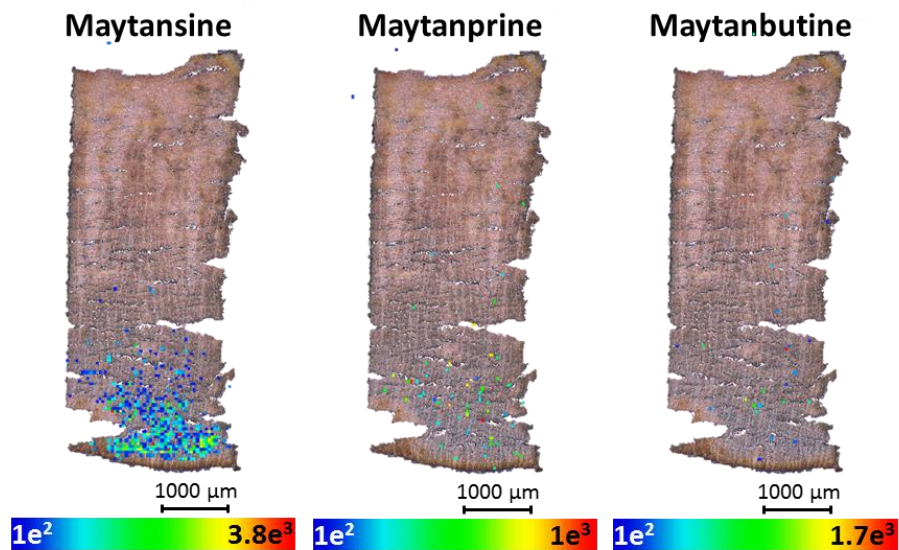


Abb. M41: MALDI-imaging-HRMS von *M. senegalensis* Stammrinden-Querschnitt (Cortex), Bambui, Kamerun, Dezember 2016 (Scanbereich: 2920x6360 µm, Ortsauflösung: 40 µm; ± 2 ppm). Lokalisierung von Maytansine ($[M+K]^+$; m/z 730.2503), Maytanprine ($[M+K]^+$; m/z 744.2659) und Maytanbutine ($[M+K]^+$; m/z 758.2816).

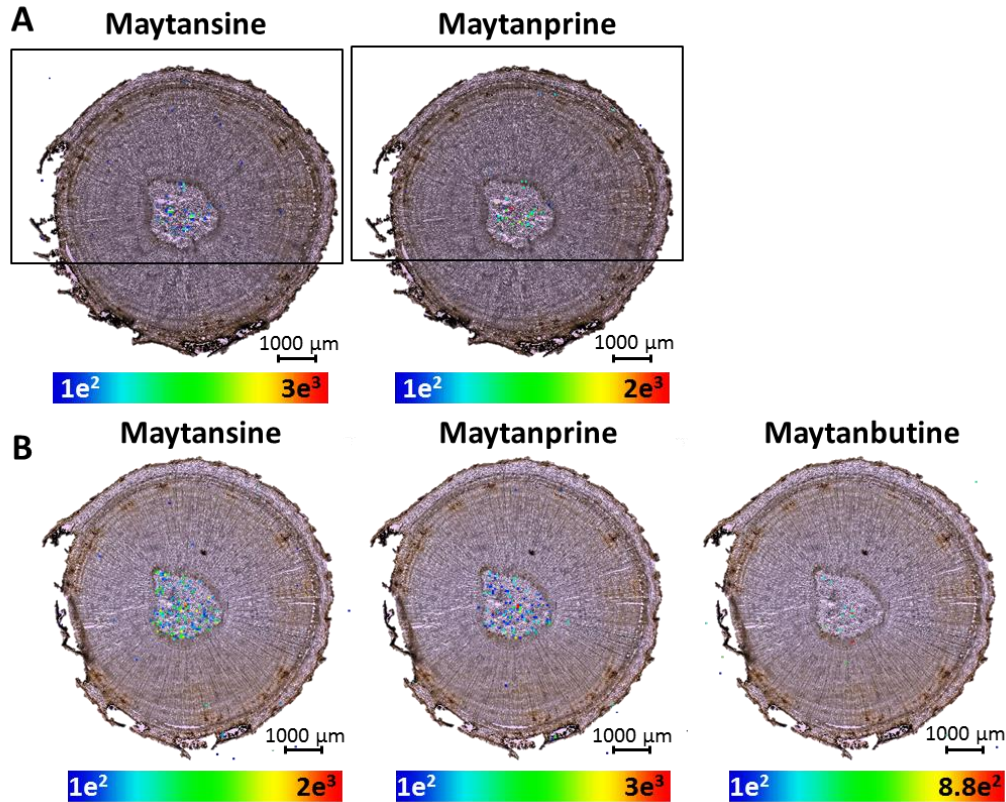


Abb. M42: MALDI-imaging-HRMS von *M. heterophylla* Wurzel-Querschnitten, Barrydale, Südafrika, Februar 2017 (Scanbereich: A: 8500x5500 µm; B: 8100x8100 µm; Ortsauflösung: 50 µm; ± 2 ppm). Lokalisierung von Maytansine ([M+K]⁺; *m/z* 730.2503), Maytanprine ([M+K]⁺; *m/z* 744.2659) und Maytanbutine ([M+K]⁺; *m/z* 758.2816).

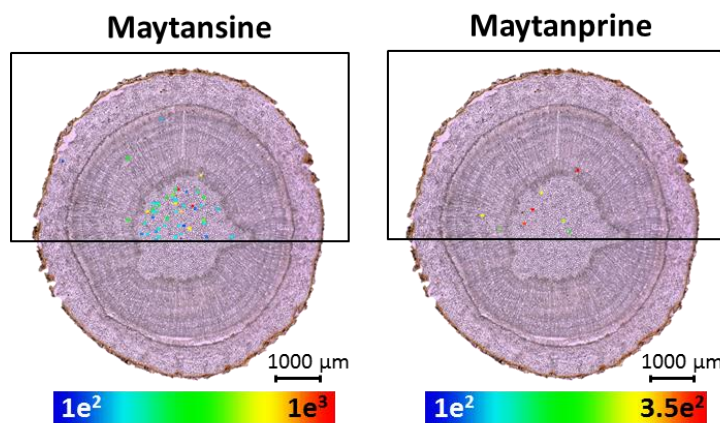


Abb. M43: MALDI-imaging-HRMS von *M. heterophylla* Wurzel-Querschnitt, Seweweekspoort, Südafrika, Februar 2017 (Scanbereich: 8500x5500 µm, Ortsauflösung: 60 µm; ± 2 ppm). Lokalisierung von Maytansine ([M+K]⁺; *m/z* 730.2503) und Maytanprine ([M+K]⁺; *m/z* 744.2659).

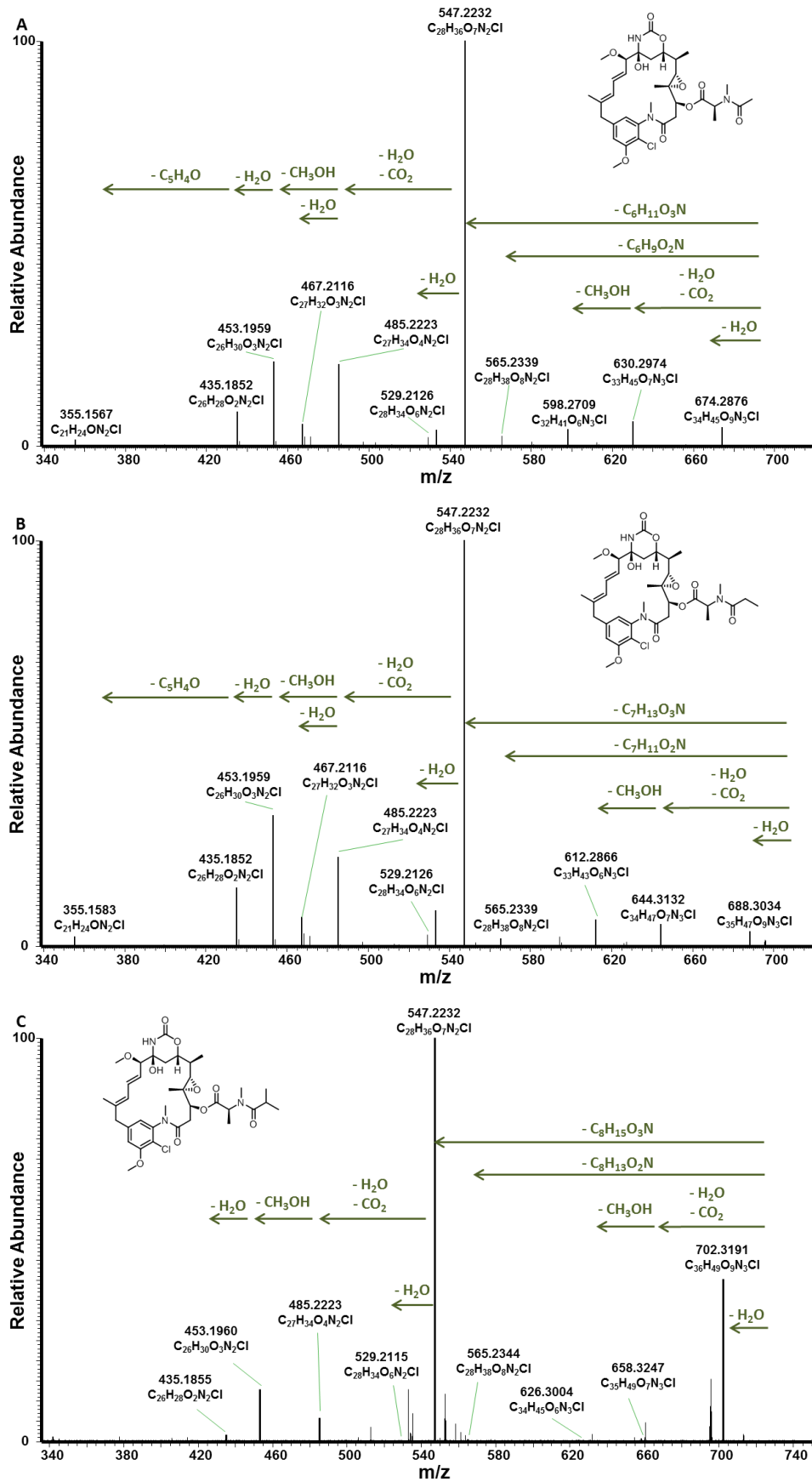


Abb. M44: MS²-Spektrum von Maytansine (m/z 692; (A)), Maytanprine (m/z 706; (B)) und Maytanbutine (m/z 720; (C)) aus dem *P. pyracantha* Stamm-Extrakt.

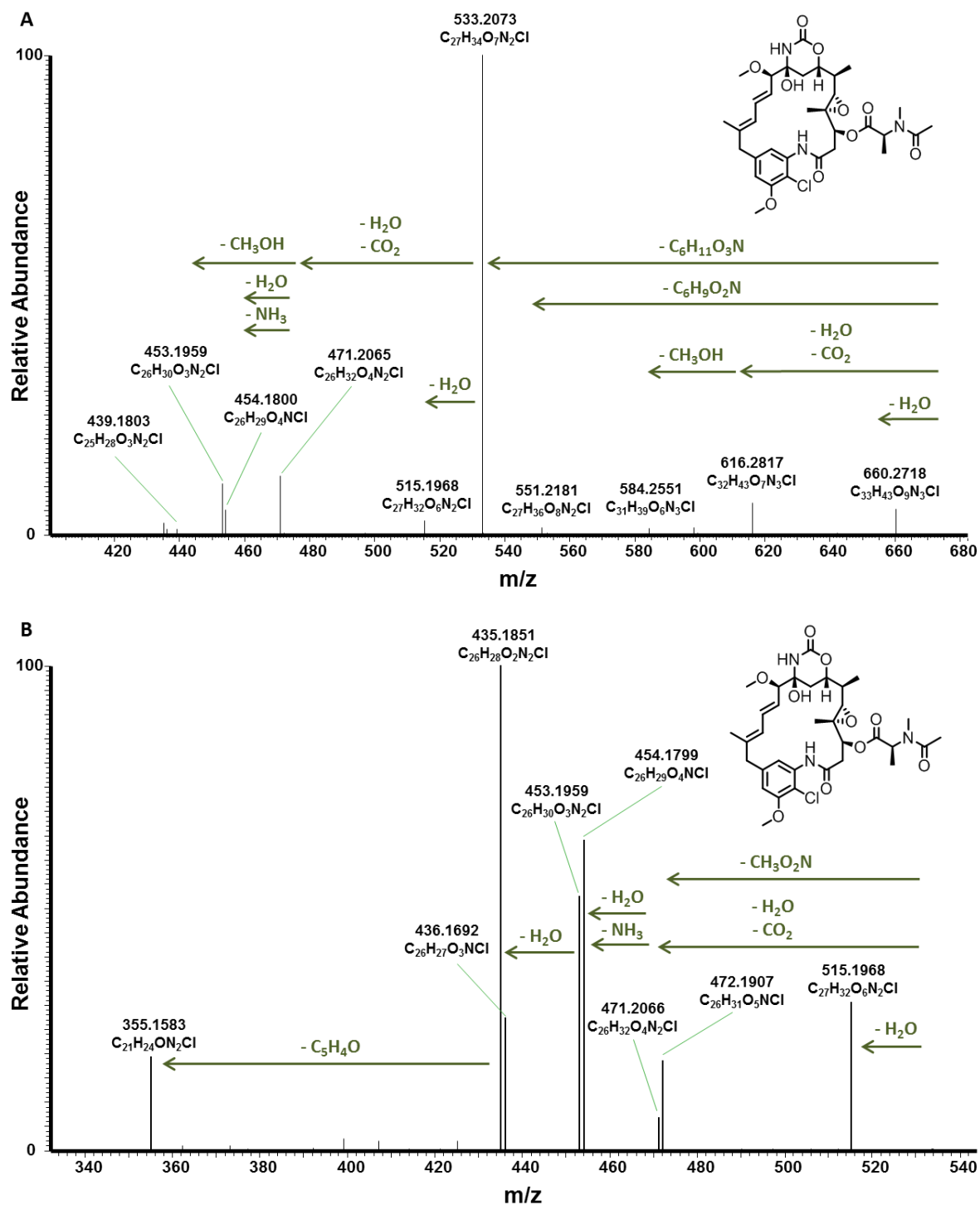


Abb. M45: MS²-Spektrum von Maytansine-Vorstufe 6 (m/z 678; (A)) und MS³-Spektrum (m/z 678 → 533; (B)).

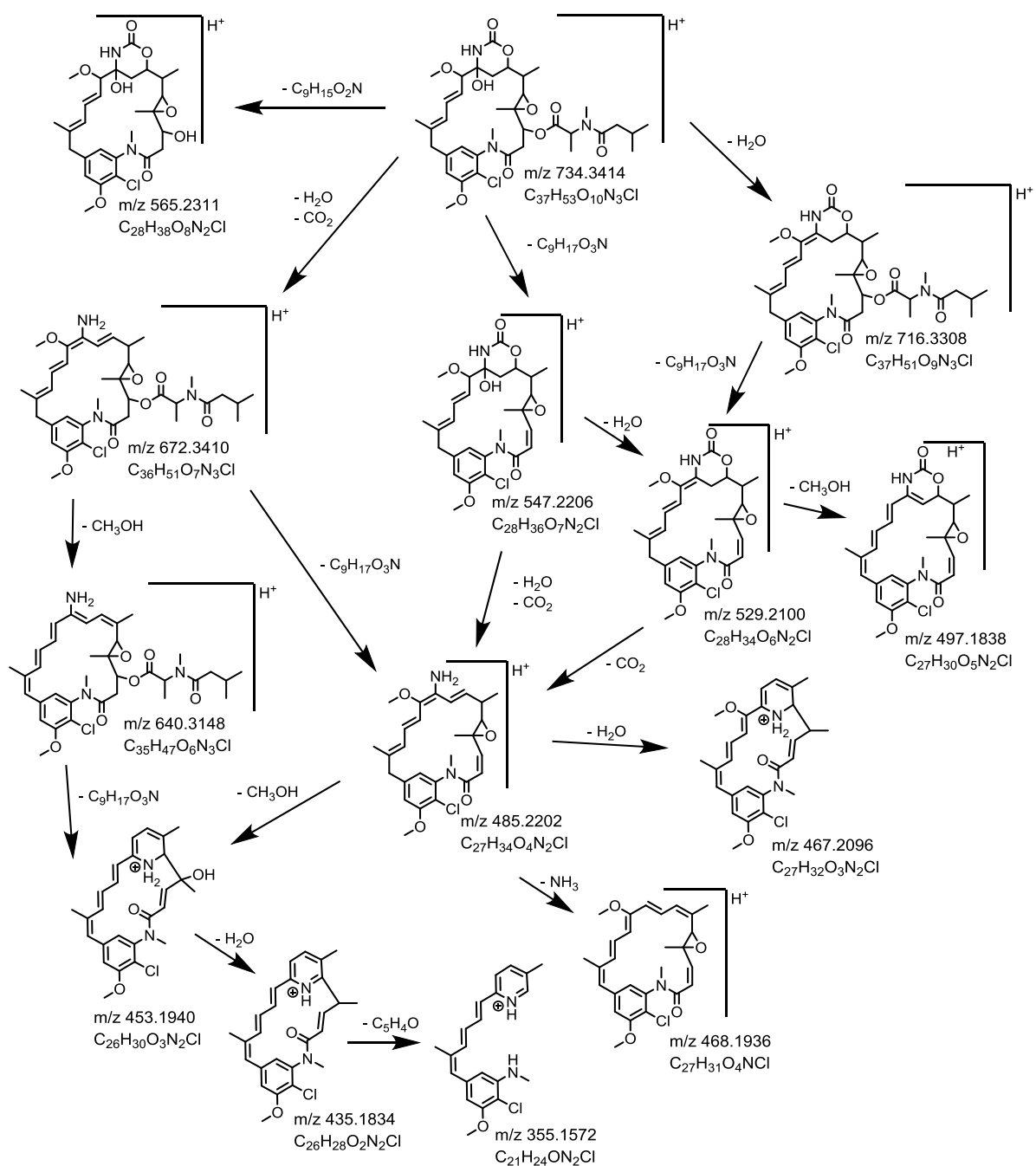


Abb. M46: Fragmentierungsweg von Maytanvaline.

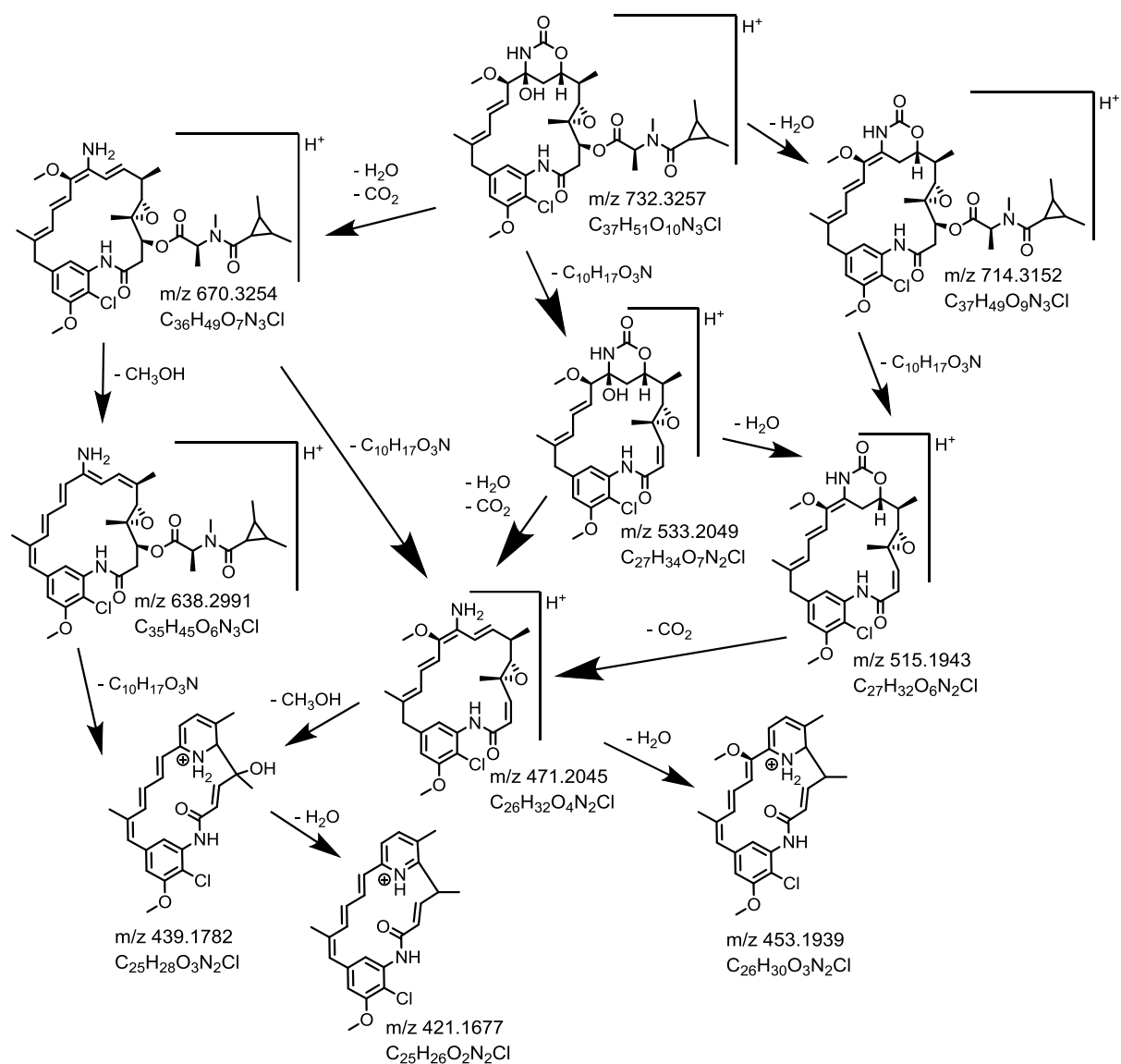


Abb. M47: Fragmentierungsweg von Normaytancyprine.

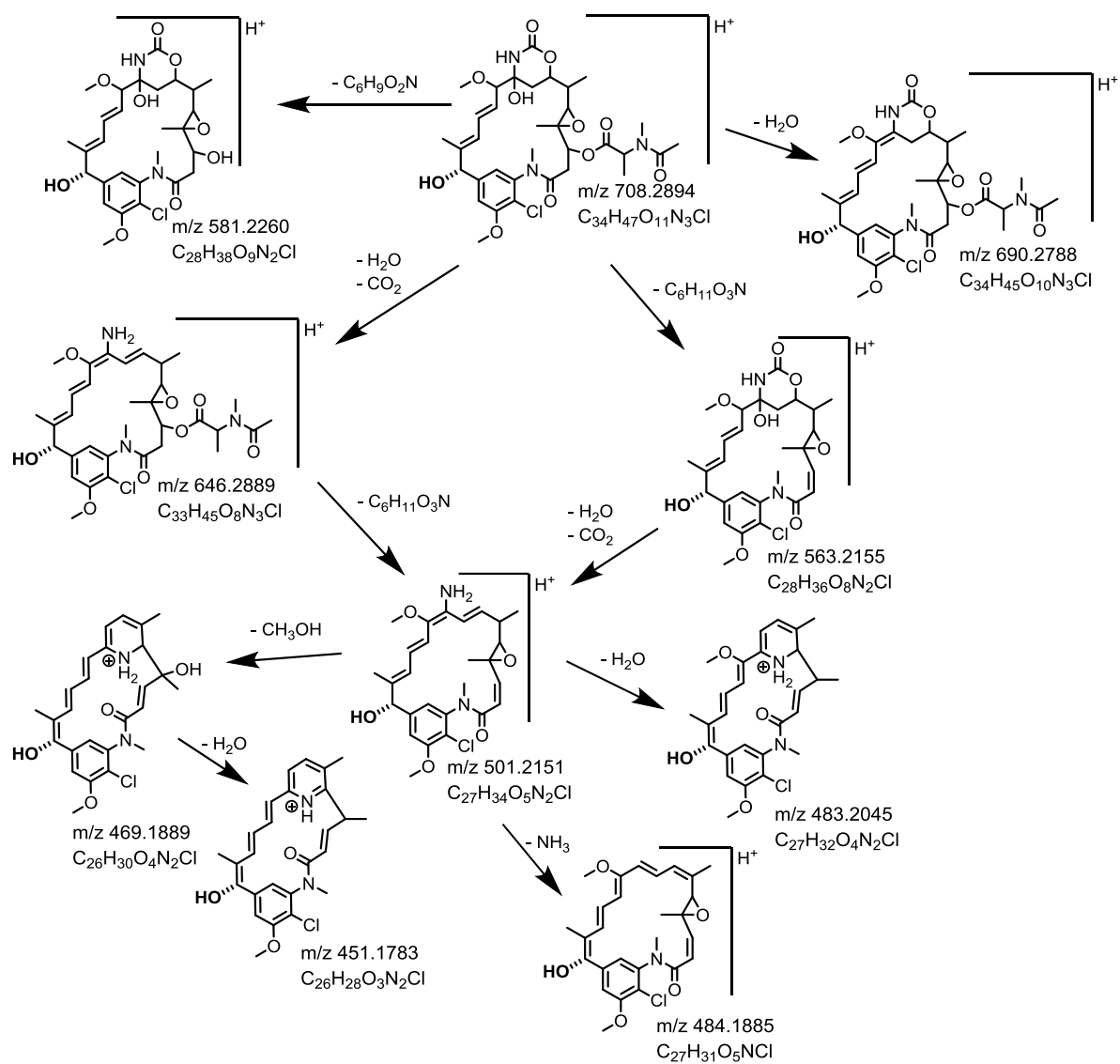


Abb. M48: Fragmentierungsweg von hydroxiliertem Maytansine.

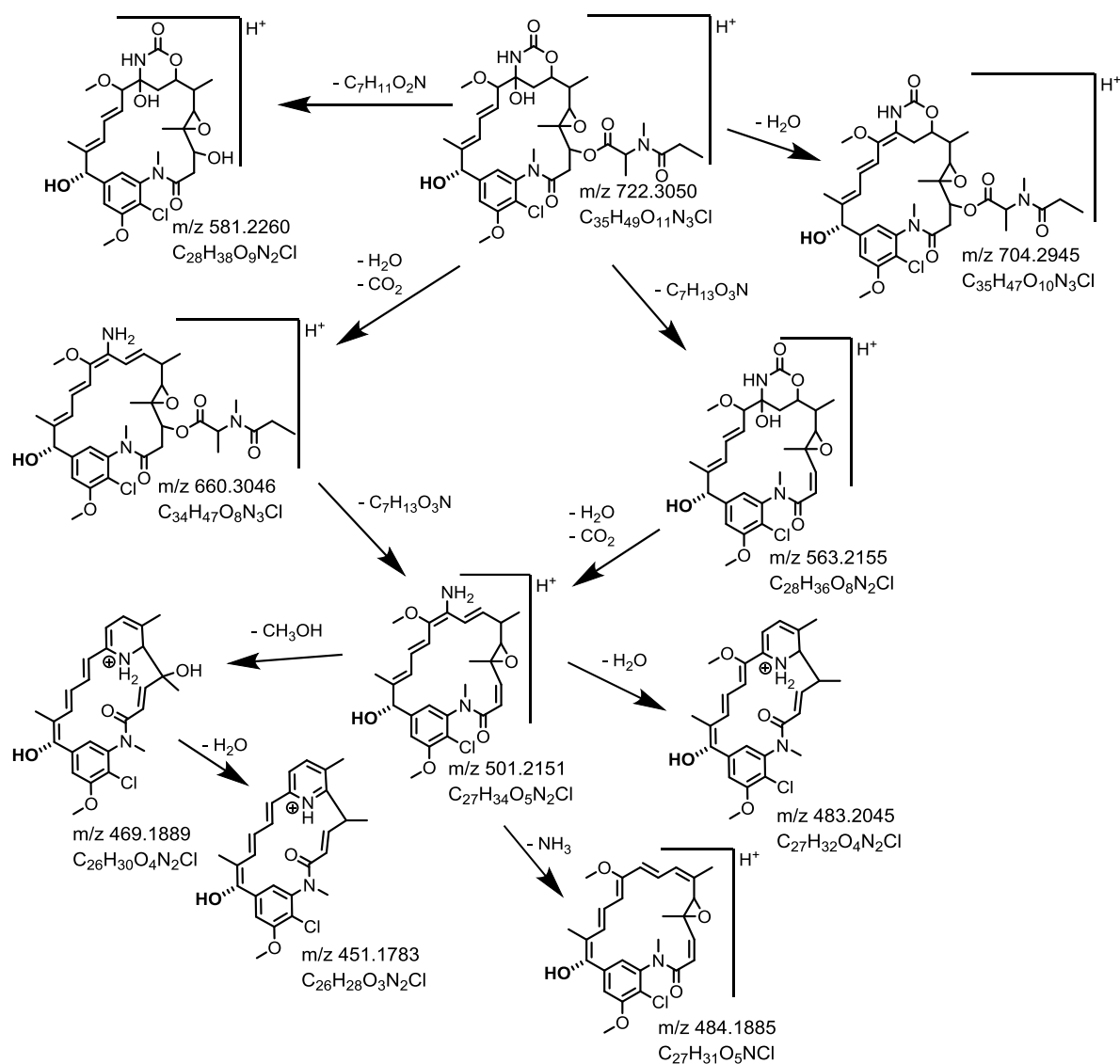
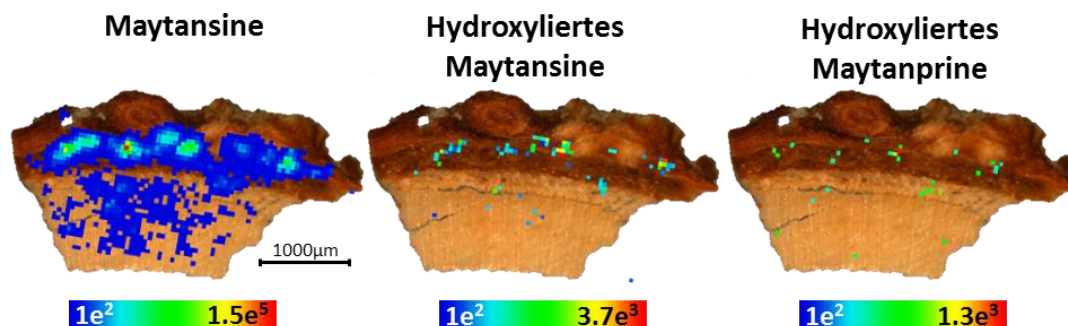


Abb. M49: Fragmentierungsweg von hydroxyliertem Maytanprine.

Abb. M50: MALDI-imaging-HRMS vom *P. pyracantha* Stamm (Scanbereich: 3720x2600 μm ; Ortsauflösung: 40 μm ; ± 2 ppm). Lokalisierung von Maytansine ($[M+K]^+$; m/z 730.2503), hydroxyliertem Maytansine ($[M+K]^+$; m/z 746.2452), und hydroxyliertem Maytanprine ($[M+K]^+$; m/z 760.2609).

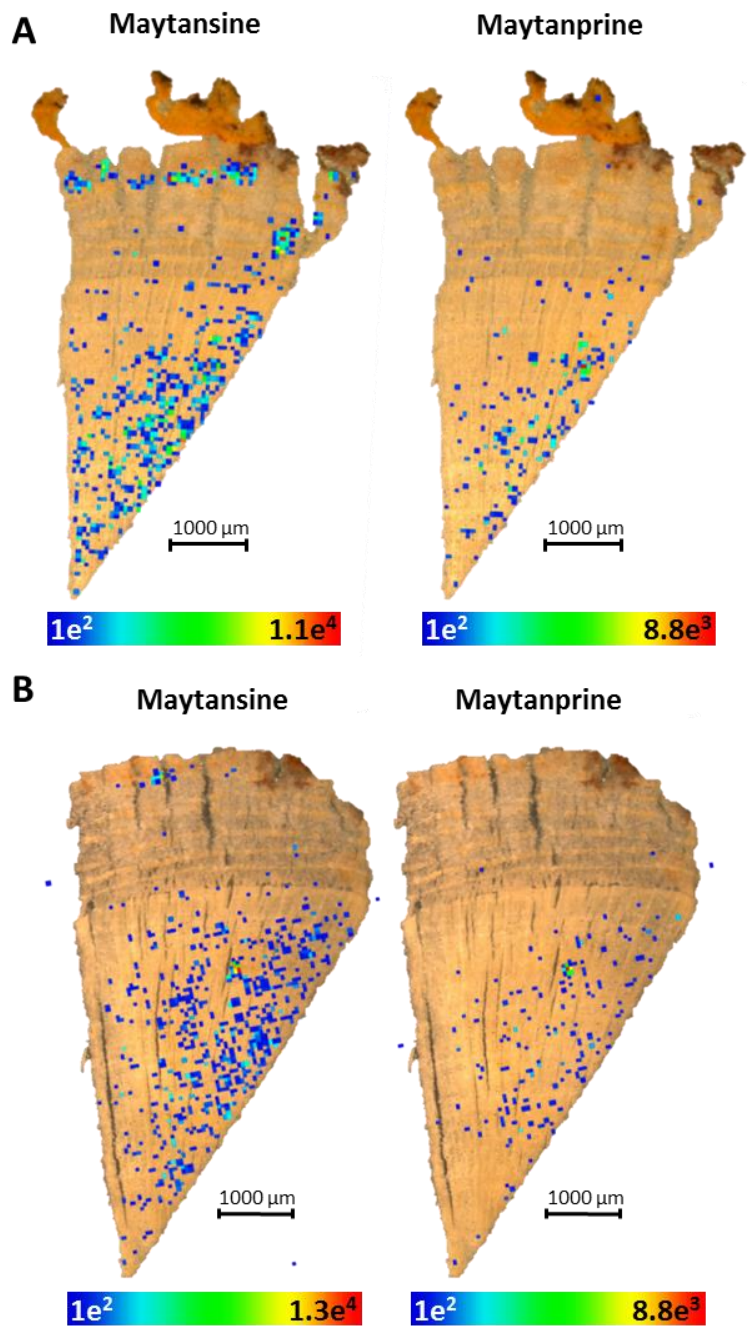


Abb. M51: MALDI-imaging-HRMS von *P. pyracantha* Wurzel-Querschnitten (Scanbereich: A: 4920x7800 μm ; B 5760x8160 μm ; Ortsauflösung: 60 μm ; ± 2 ppm). Lokalisierung von Maytansine ($[M+K]^+$; m/z 730.2503) und Maytanprine ($[M+K]^+$; m/z 744.2659).

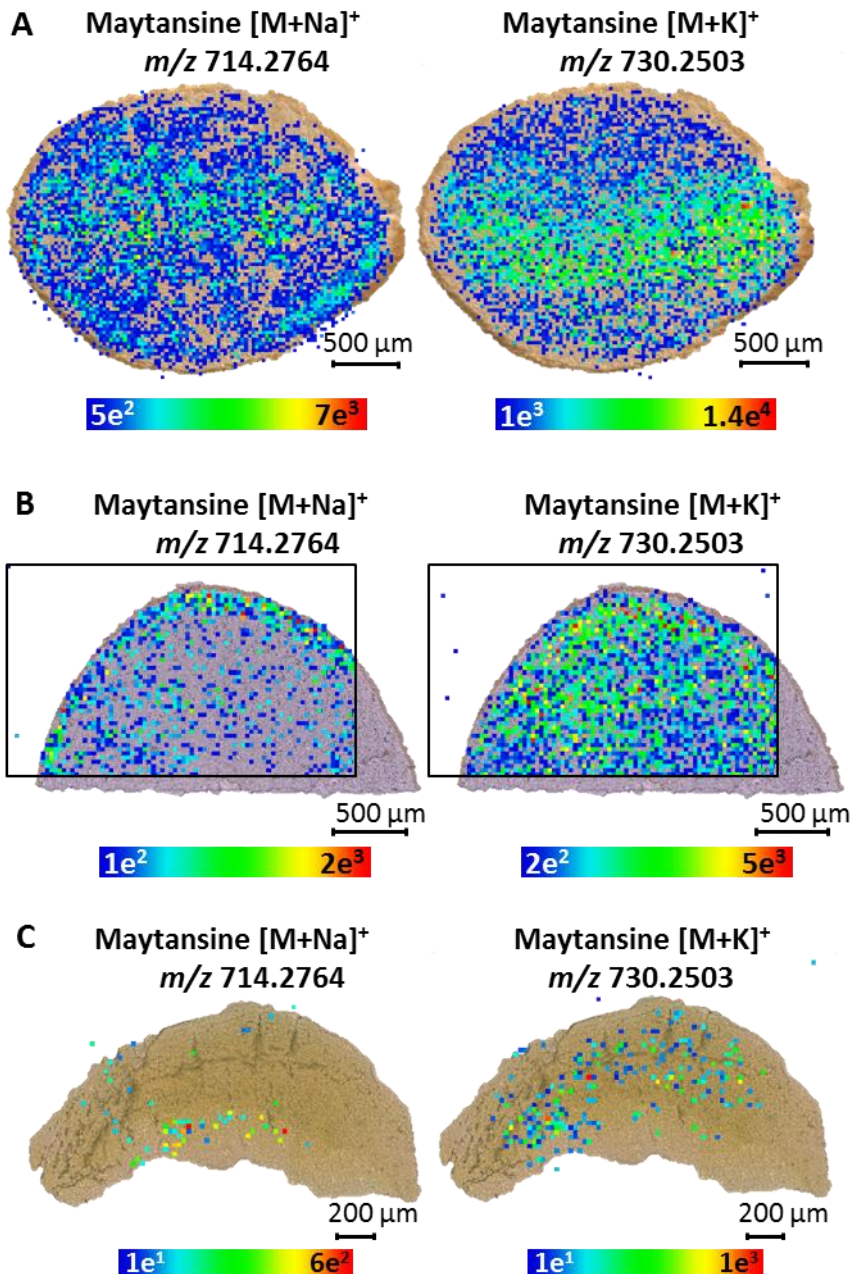


Abb. M52: MALDI-imaging-HRMS zeigt die örtliche Verteilung von Maytansine ($[M+Na]^+$ m/z 714.2764; $[M+K]^+$ m/z 730.2503; ± 2 ppm) in Gewebe-Querschnitten von *M. senegalensis* Samen. Mikroskopische Aufnahmen mit übergelegten Ionenbildern vom Endosperm (A: Scanbereich: 3900x3000 μm ; Ortsauflösung: 30 μm ; B: Scanbereich: 3280x2000 μm ; Ortsauflösung: 40 μm) und Kotyledonen (C: Scanbereich: 3680x2400 μm ; Ortsauflösung: 40 μm).

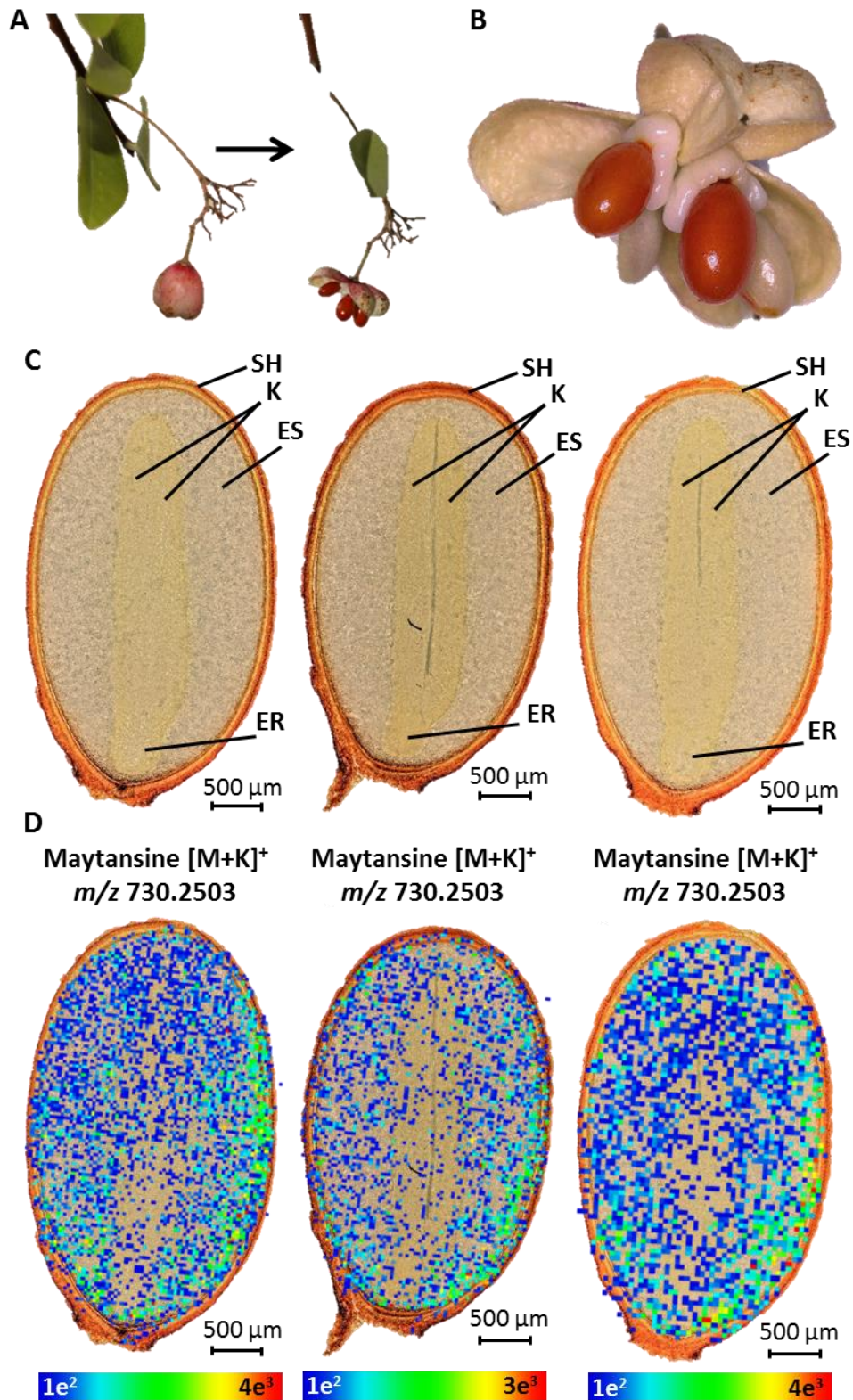


Abb. M53: Bilder von *M. senegalensis* Samenkapsel (A) und Nahaufnahme der geöffneten Samenkapsel (B). Mikroskopische Aufnahmen von Querschnitten mit zugeordneten Geweben ((C) SH: Samenhülle; K: Kotyledonen; ES: Endosperm; ER: Keimwurzel / Hypokotyl). MALDI-imaging-HRMS zeigt die räumliche Verteilung von Maytansine ([M+K]⁺ m/z 730.2503; ± 2 ppm) in verschiedenen Querschnitten von *M. senegalensis* Samen (D). Linkes MALDI-Ionenbild: Scanbereich: 3255x4970 µm; Ortsauflösung: 35 µm. Zentrales MALDI-Ionenbild: Scanbereich: 3220x5040 µm; Ortsauflösung: 35 µm. Rechtes MALDI-Ionenbild: Scanbereich: 3200x4900 µm; Ortsauflösung: 50 µm.

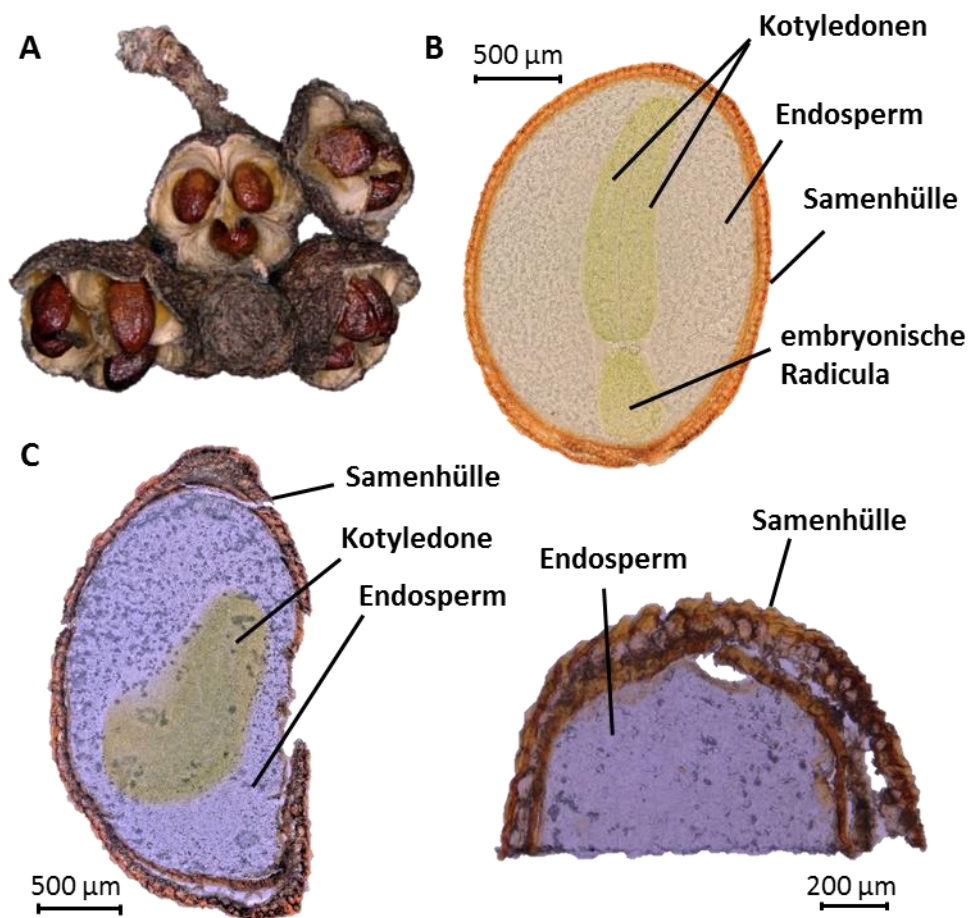


Abb. M54: Bild von *M. heterophylla* Samen (A) aus Südafrika zusammen mit mikroskopischen Bildern von Querschnitten (B, C). Von Querschnitten (C) wurden MALDI-imaging-HRMS Messungen angefertigt.

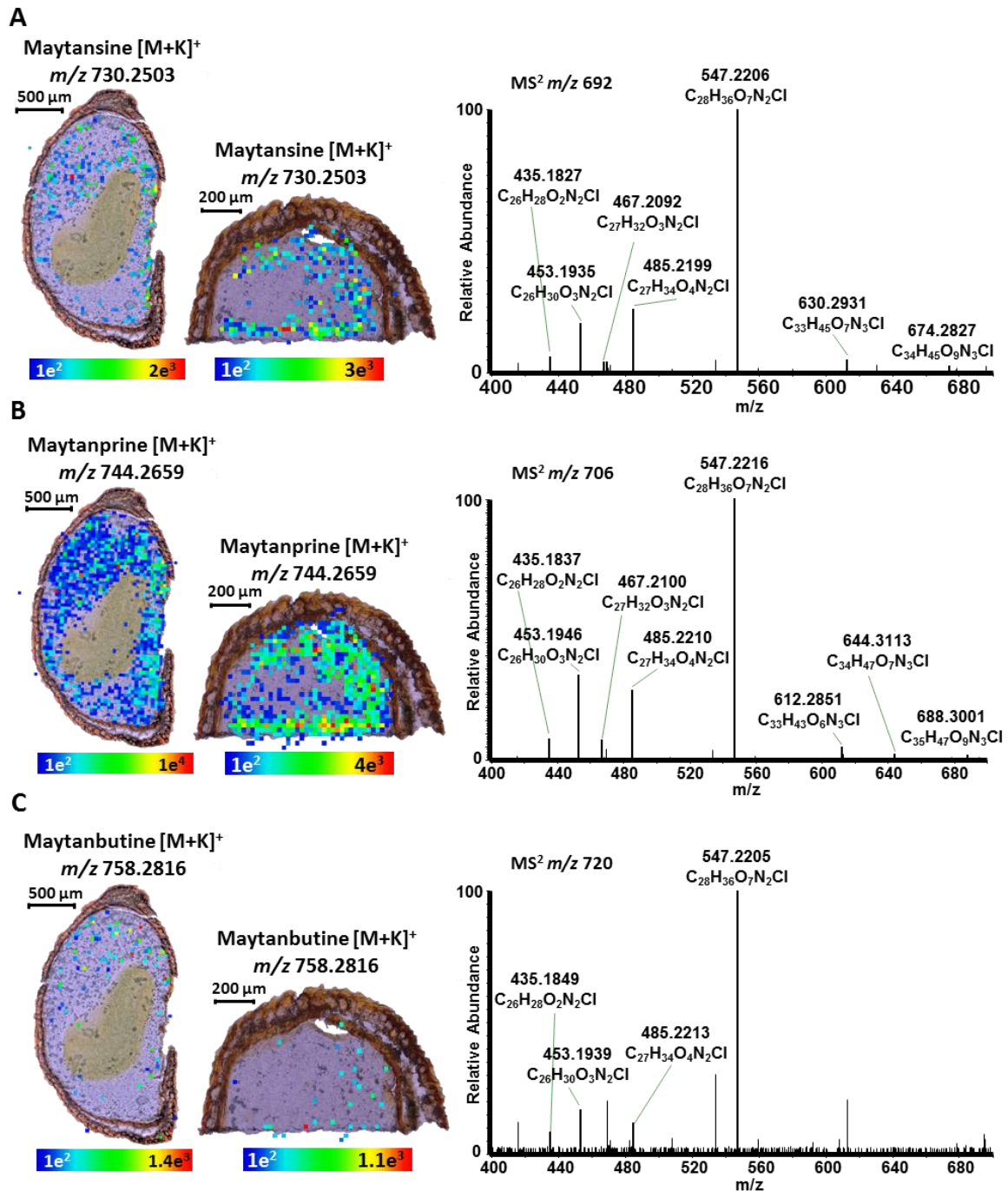


Abb. M55: Querschnitte von *M. heterophylla* Samen untersucht mittels MALDI-imaging-HRMS und HPLC-HRMS²-Spektren vom Samenextrakt von Maytansine (A), Maytanprine (B) und Maytanbutine (C). Linkes MALDI-Ionenbild: Scanbereich: 2560x3680 µm; Ortsauflösung: 40 µm. Rechtes MALDI-Ionenbild: Scanbereich: 1980x1290 µm; Ortsauflösung: 30 µm. Lokalisierung von Maytansine ([M+K]⁺ m/z 730.2503), Maytanprine ([M+K]⁺ m/z 744.2659) und Maytanbutine ([M+K]⁺ m/z 758.2816).

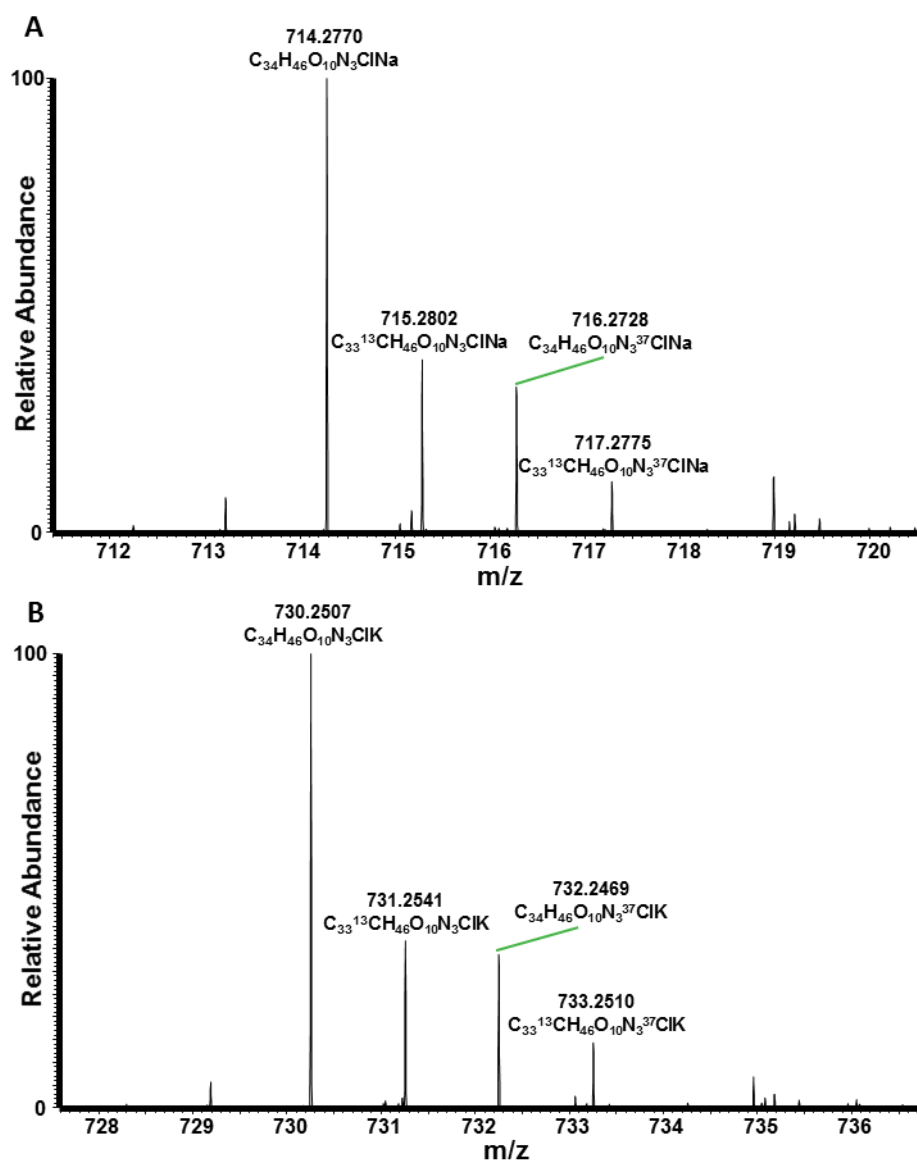


Abb. M56: MALDI-HRMS-Spektren von Maytansine (A: $[M+Na]^+$ m/z 714.2764 und B: $[M+K]^+$ m/z 730.2503) von *M. senegalensis* Hypokotyl (Keimling).

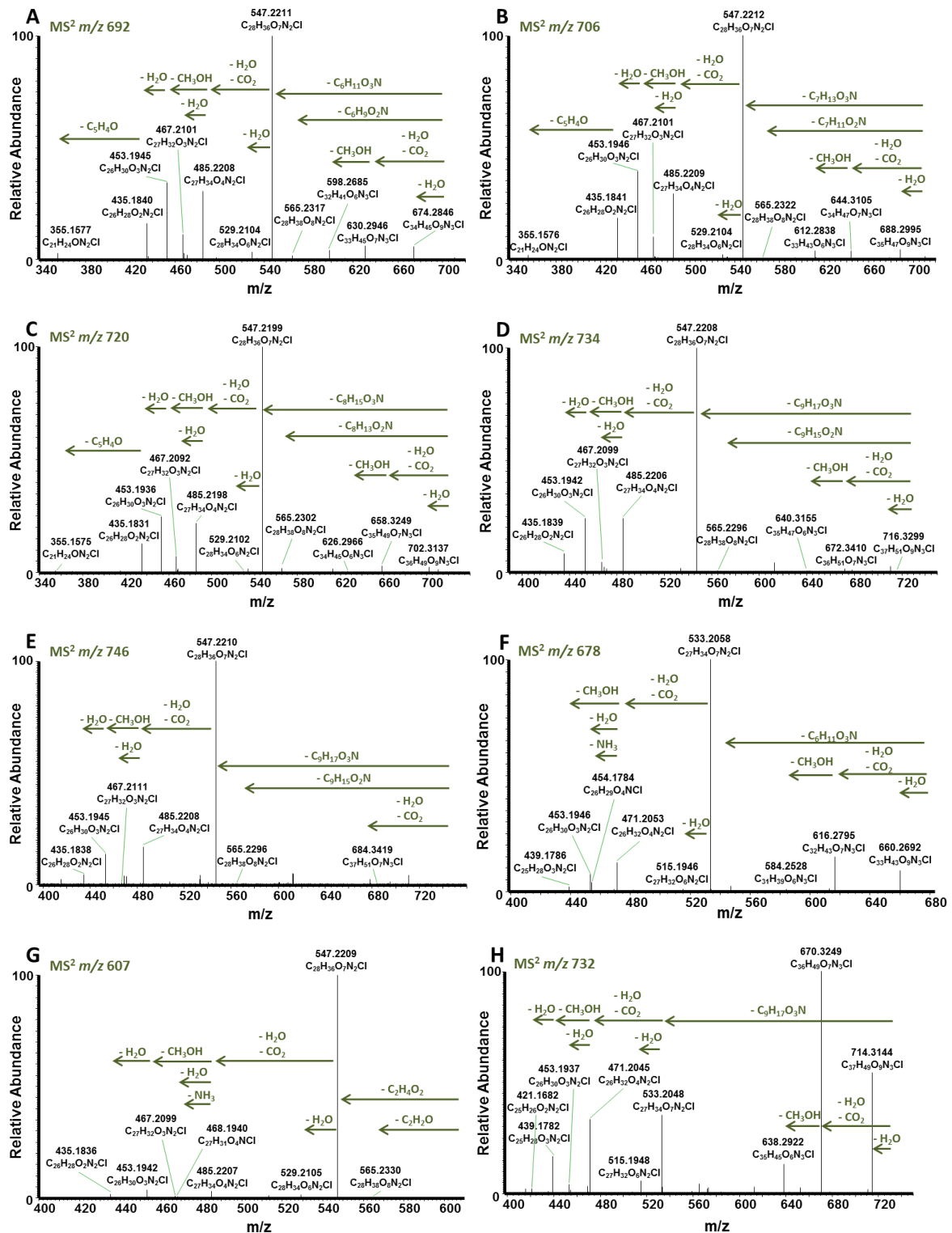


Abb. M57: HRMS² von Maytansine (A), Maytanprine (B), Maytanbutine (C), Maytanvaline (D), (iso)-Mallotusine (E), Maytansine-Vorstufe 6 (F), Maytanacine (G) und Normaytancyprine (H) aus *P. verrucosa* Samenextrakt.

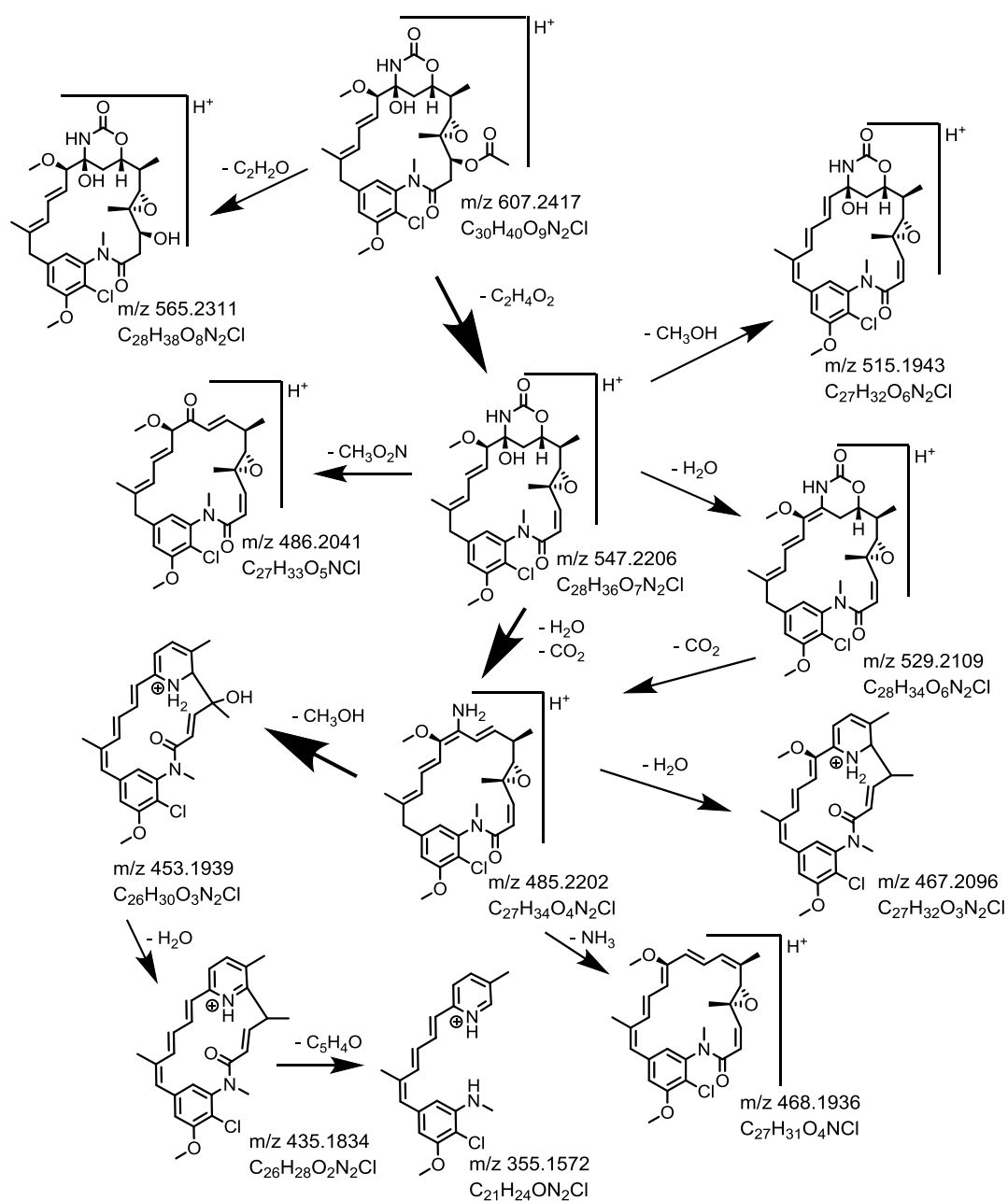


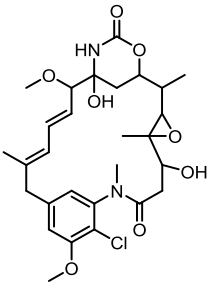
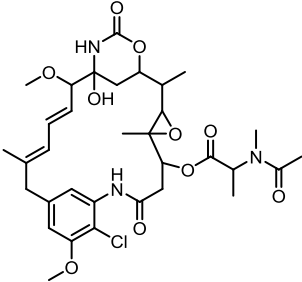
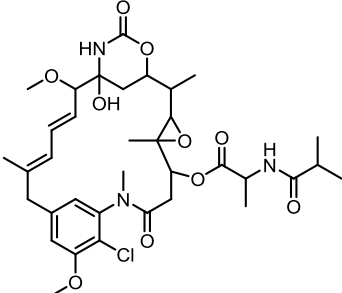
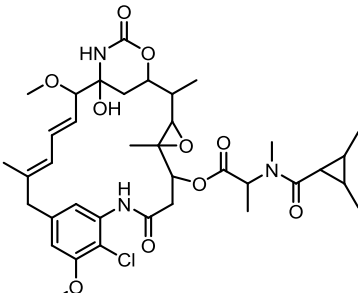
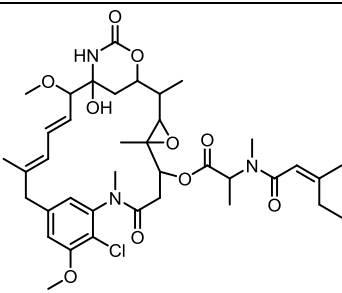
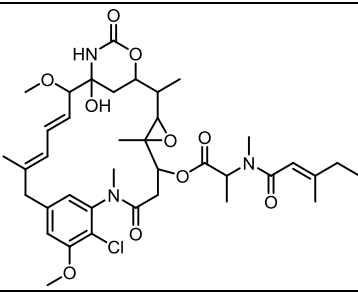
Abb. M58: Fragmentierungsweg von Maytanacine aus *P. verrucosa* Samenextrakt.

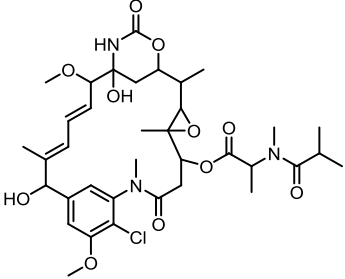
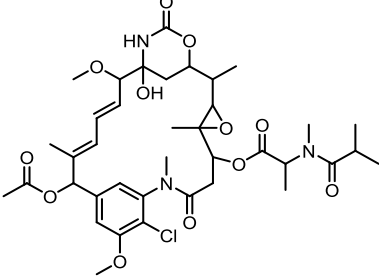
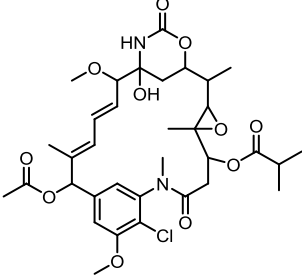
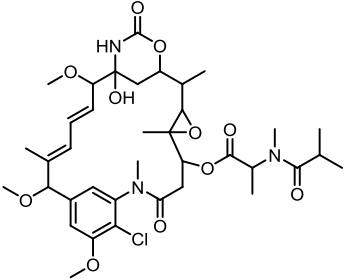
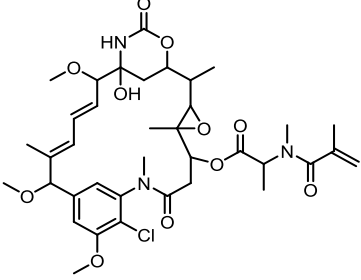
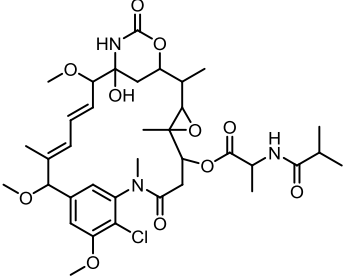
Tabellen

Tab. 14: Maytansinoid-Liste mit Summenformeln, Massen und chemischen Strukturen.

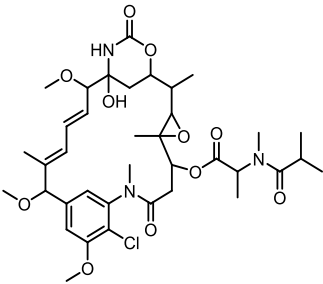
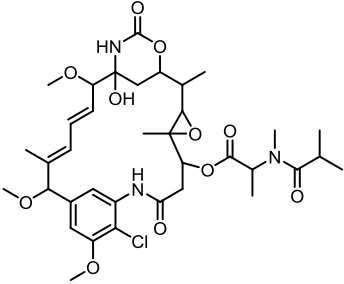
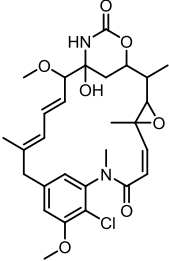
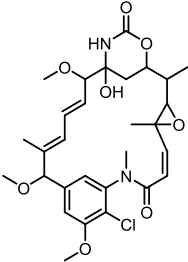
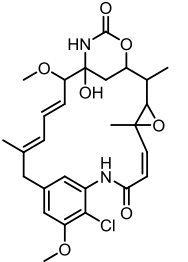
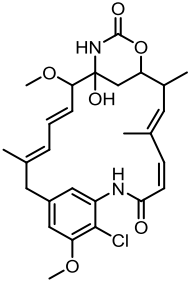
Name	[M+H] ⁺ Summenformel Masse	[M+Na] ⁺ Summenformel Masse	Struktur
Maytansine	C ₃₄ H ₄₇ O ₁₀ N ₃ Cl 692.2945	C ₃₄ H ₄₆ O ₁₀ N ₃ ClNa 714.2764	
Maytanprine	C ₃₅ H ₄₉ O ₁₀ N ₃ Cl 706.3101	C ₃₅ H ₄₈ O ₁₀ N ₃ ClNa 728.2920	
Maytanbutine	C ₃₆ H ₅₁ O ₁₀ N ₃ Cl 720.3258	C ₃₆ H ₅₀ O ₁₀ N ₃ ClNa 742.3077	
Maytanvaline	C ₃₇ H ₅₃ O ₁₀ N ₃ Cl 734.3414	C ₃₇ H ₅₂ O ₁₀ N ₃ ClNa 756.3233	
Maytanacine	C ₃₀ H ₄₀ O ₉ N ₂ Cl 607.2417	C ₃₀ H ₃₉ O ₉ N ₂ ClNa 629.2236	

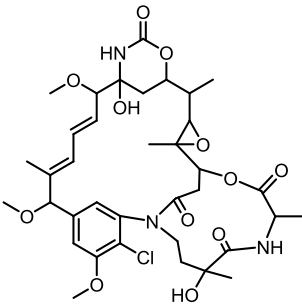
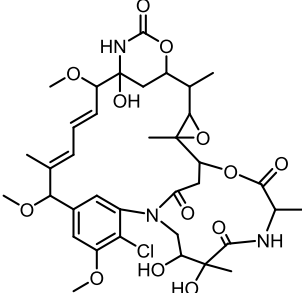
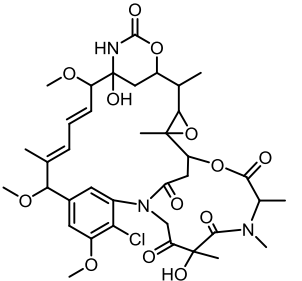
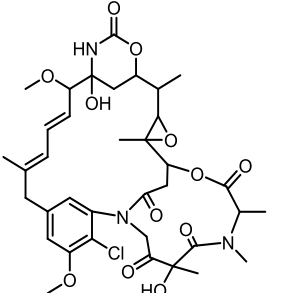
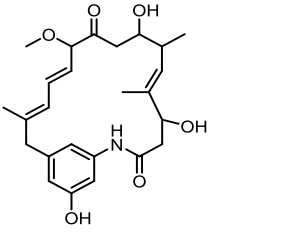
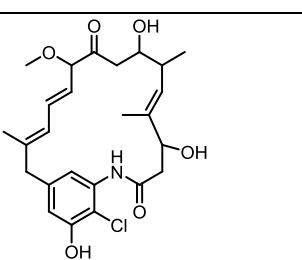
7. Anhang

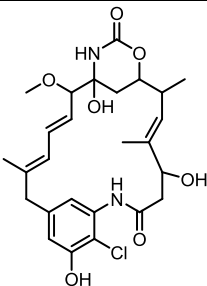
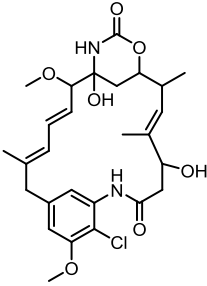
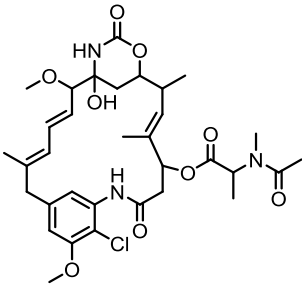
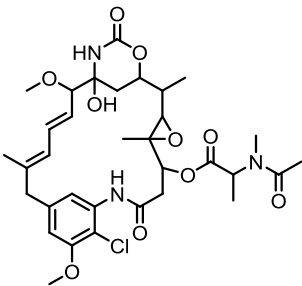
Maytansinol	$C_{28}H_{38}O_8N_2Cl$ 565.2311	$C_{28}H_{37}O_8N_2ClNa$ 587.2131	
Normaytansine	$C_{33}H_{45}O_{10}N_3Cl$ 678.2788	$C_{33}H_{44}O_{10}N_3ClNa$ 700.2607	
2'-N'-Demethyl-maytanbutine	$C_{35}H_{49}O_{10}N_3Cl$ 706.3101	$C_{35}H_{48}O_{10}N_3ClNa$ 728.2920	
Normaytancyprine	$C_{37}H_{51}O_{10}N_3Cl$ 732.3258	$C_{37}H_{50}O_{10}N_3ClNa$ 754.3077	
Mallotusine	$C_{38}H_{53}O_{10}N_3Cl$ 746.3414	$C_{38}H_{52}O_{10}N_3ClNa$ 768.3233	
Isomallotusine	$C_{38}H_{53}O_{10}N_3Cl$ 746.3414	$C_{38}H_{52}O_{10}N_3ClNa$ 768.3233	

Colubrinol	$C_{36}H_{51}O_{11}N_3Cl$ 736.3207	$C_{36}H_{50}O_{11}N_3ClNa$ 758.3026	
Colubrinol Acetat	$C_{38}H_{53}O_{12}N_3Cl$ 778.3312	$C_{38}H_{52}O_{12}N_3ClNa$ 800.3132	
Maytanbutacine	$C_{34}H_{46}O_{11}N_2Cl$ 693.2785	$C_{34}H_{44}O_{11}N_2ClNa$ 715.2604	
Trewiasine	$C_{37}H_{53}O_{11}N_3Cl$ 750.3363	$C_{37}H_{52}O_{11}N_3ClNa$ 772.3183	
Dehydrotrewiasine	$C_{37}H_{51}O_{11}N_3Cl$ 748.3207	$C_{37}H_{50}O_{11}N_3ClNa$ 770.3026	
Demethyltrewiasine	$C_{36}H_{51}O_{11}N_3Cl$ 736.3207	$C_{36}H_{50}O_{11}N_3ClNa$ 758.3026	
10-Epitrewiasine	$C_{37}H_{53}O_{11}N_3Cl$	$C_{37}H_{52}O_{11}N_3ClNa$	

7. Anhang

	750.3363	772.3183	
Nortrewiasine	$C_{36}H_{51}O_{11}N_3Cl$ 736.3207	$C_{36}H_{50}O_{11}N_3ClNa$ 758.3026	
Maysine	$C_{28}H_{36}O_7N_2Cl$ 547.2206	$C_{28}H_{35}O_7N_2ClNa$ 569.2025	
Trewsine	$C_{29}H_{38}O_8N_2Cl$ 577.2311	$C_{29}H_{37}O_8N_2ClNa$ 599.2131	
Normaysine	$C_{27}H_{34}O_7N_2Cl$ 533.2049	$C_{27}H_{33}O_7N_2ClNa$ 555.1869	
Maysenine	$C_{27}H_{34}O_6N_2Cl$ 517.2100	$C_{27}H_{33}O_6N_2ClNa$ 539.1919	
Treflorine	$C_{36}H_{49}O_{12}N_3Cl$	$C_{36}H_{48}O_{12}N_3ClNa$	

	750.2999	772.2819	
Trenudine	$C_{36}H_{49}O_{13}N_3Cl$ 766.2948	$C_{36}H_{48}O_{13}N_3ClNa$ 788.2768	
N-Methyltrenudone	$C_{37}H_{49}O_{13}N_3Cl$ 778.2948	$C_{37}H_{48}O_{13}N_3ClNa$ 800.2768	
Maytanbicyclinol	$C_{36}H_{47}O_{12}N_3Cl$ 748.2843	$C_{36}H_{46}O_{12}N_3ClNa$ 770.2662	
Vorstufe 1	$C_{25}H_{34}O_6N$ 444.2381	$C_{25}H_{33}O_6NNa$ 466.2200	
Vorstufe 2	$C_{25}H_{33}O_6NCl$ 478.1991	$C_{25}H_{32}O_6NClNa$ 500.1810	

Vorstufe 3	$C_{26}H_{34}O_7N_2Cl$ 521.2049	$C_{26}H_{33}O_7N_2ClNa$ 543.1869	
Vorstufe 4	$C_{27}H_{36}O_7N_2Cl$ 535.2206	$C_{27}H_{35}O_7N_2ClNa$ 557.2025	
Vorstufe 5	$C_{33}H_{45}O_9N_3Cl$ 662.2839	$C_{33}H_{44}O_9N_3ClNa$ 684.2658	
Vorstufe 6	$C_{33}H_{45}O_{10}N_3Cl$ 678.2788	$C_{33}H_{44}O_{10}N_3ClNa$ 700.2607	

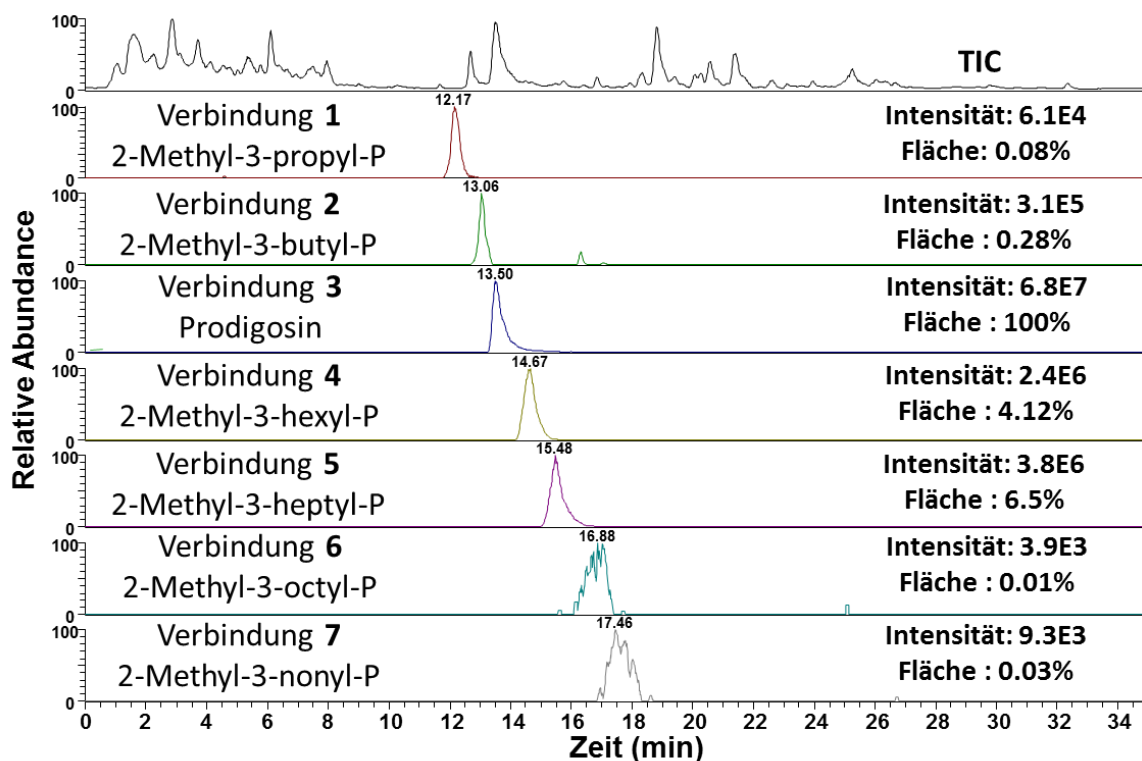
7.2 Bakterieller Endophyt *Serratia marcescens* MSRBB2

Abb.S1: HPLC-HRMS Auswertung der Prodiginine (1-7). TIC, Ionenchromatogramme mit Massenfiltern und relativer Flächenvergleich zum Hauptmetabolit Prodigosin.

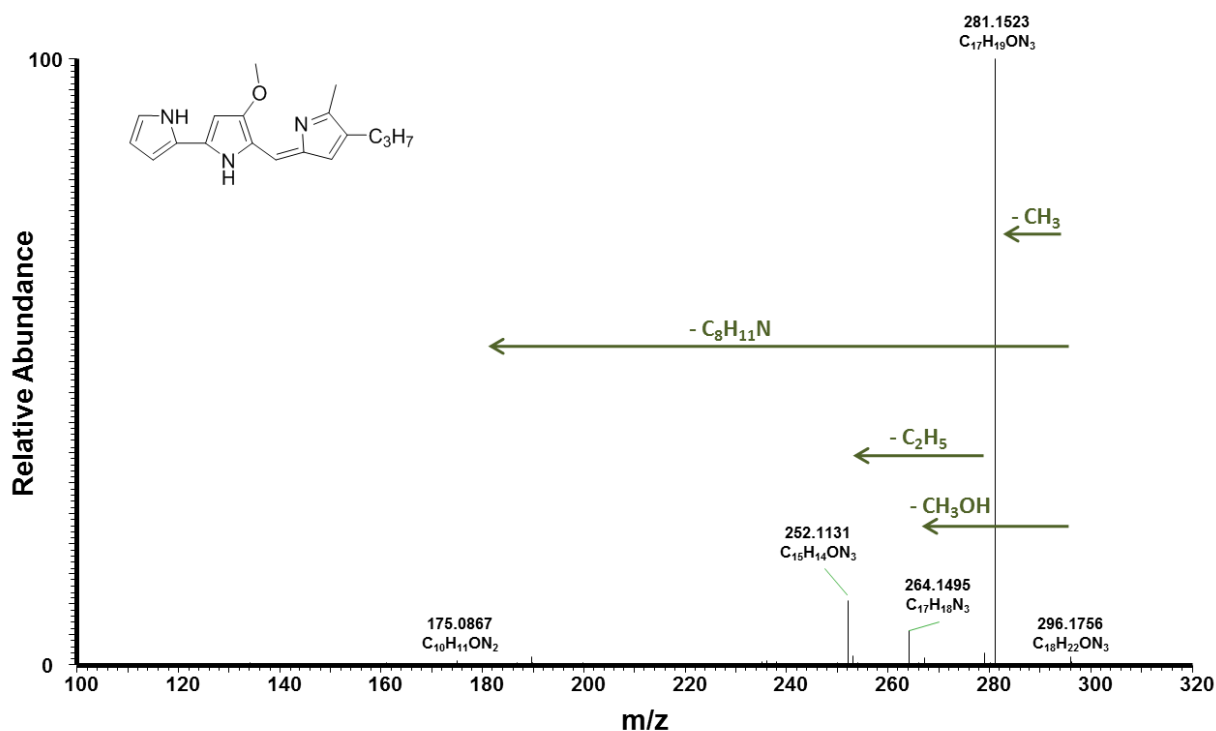


Abb.S2: HRMS²-Spektrum von 2-Methyl-3-propyl-Prodiginin (Verbindung 1 $[M+H]^+$: m/z 296, $C_{18}H_{22}N_3O$).

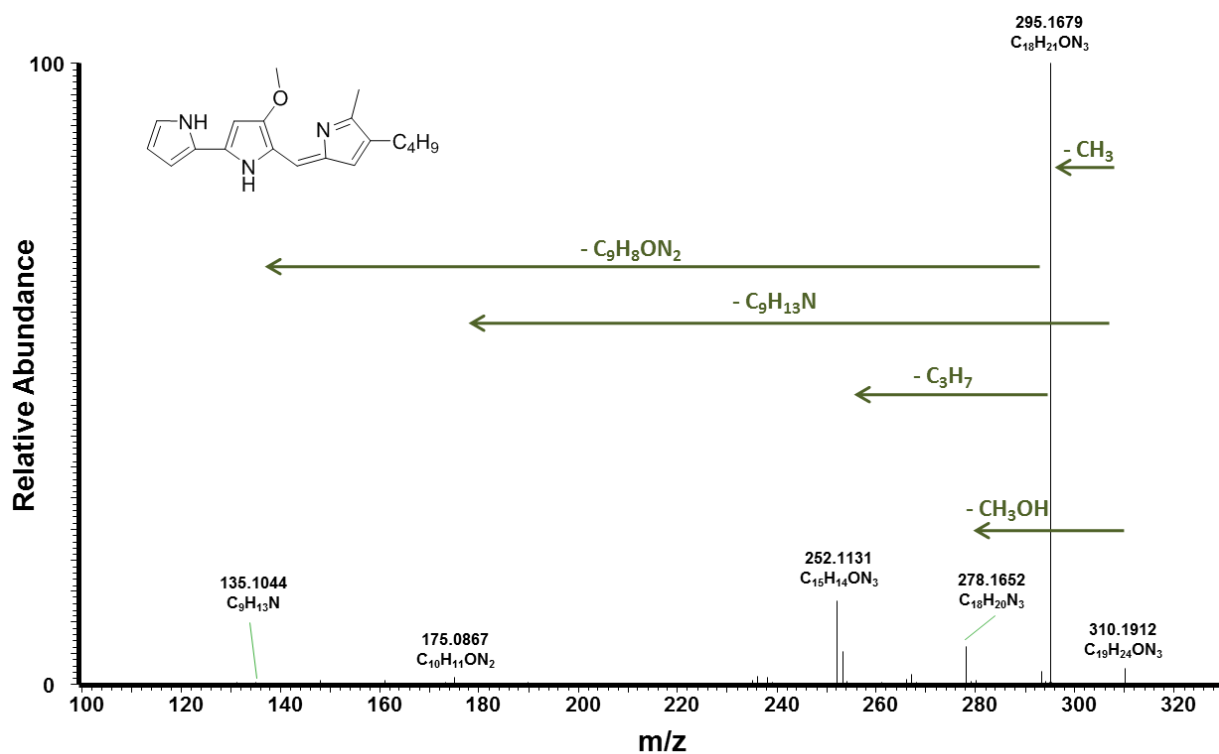


Abb. S3: HRMS²-Spektrum von 2-Methyl-3-butyl-Prodiginin (Verbindung 2 [M+H]⁺: m/z 310, C₁₉H₂₄N₃O).

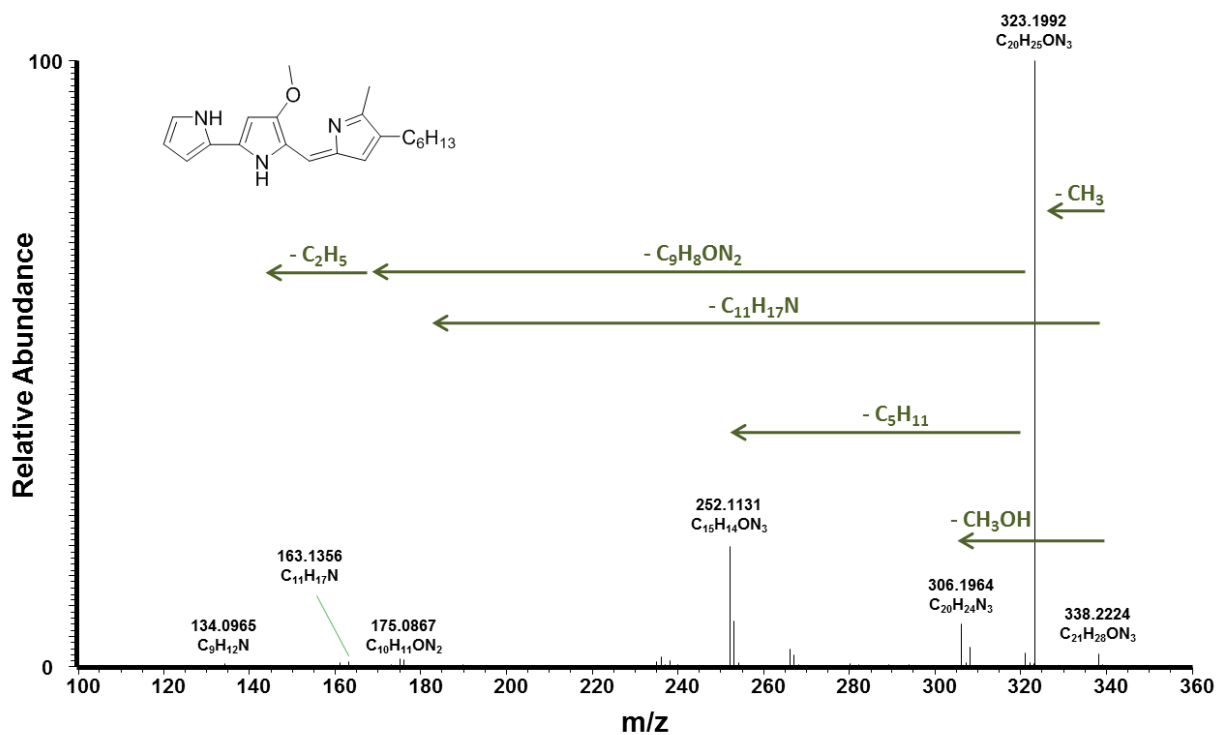


Abb. S4: HRMS²-Spektrum von 2-Methyl-3-hexyl-Prodiginin (Verbindung 4 [M+H]⁺: m/z 338, C₂₁H₂₈N₃O).

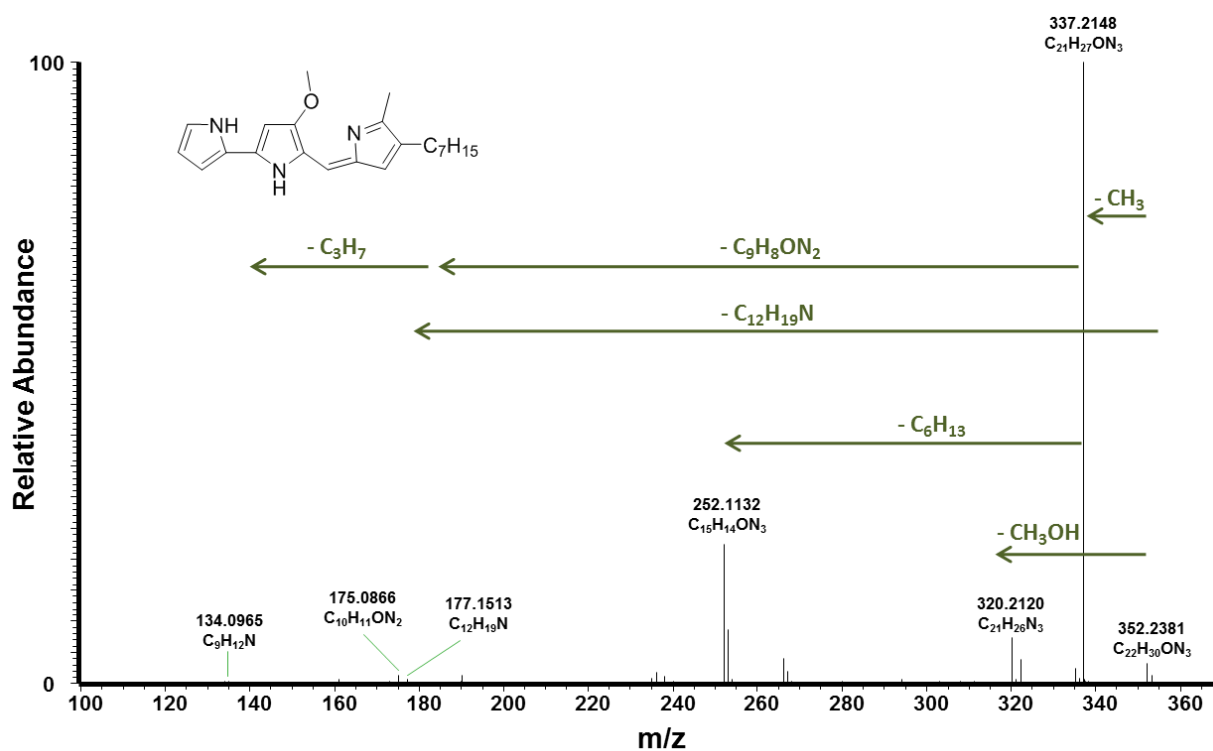


Abb. S5: HRMS²-Spektrum von 2-Methyl-3-heptyl-Prodiginin (Verbindung 5 [M+H]⁺: m/z 352, C₂₂H₃₀N₃O).

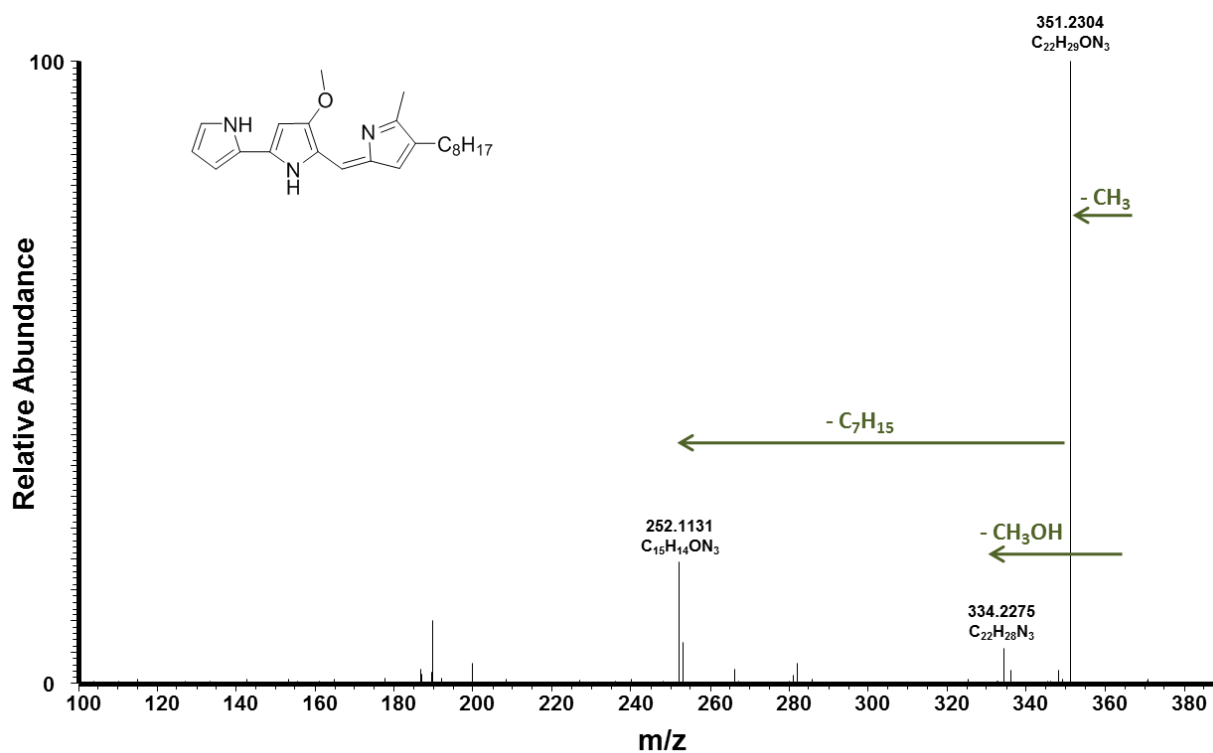


Abb. S6: HRMS²-Spektrum von 2-Methyl-3-octyl-Prodiginin (Verbindung 6 [M+H]⁺: m/z 366, C₂₃H₃₂N₃O).

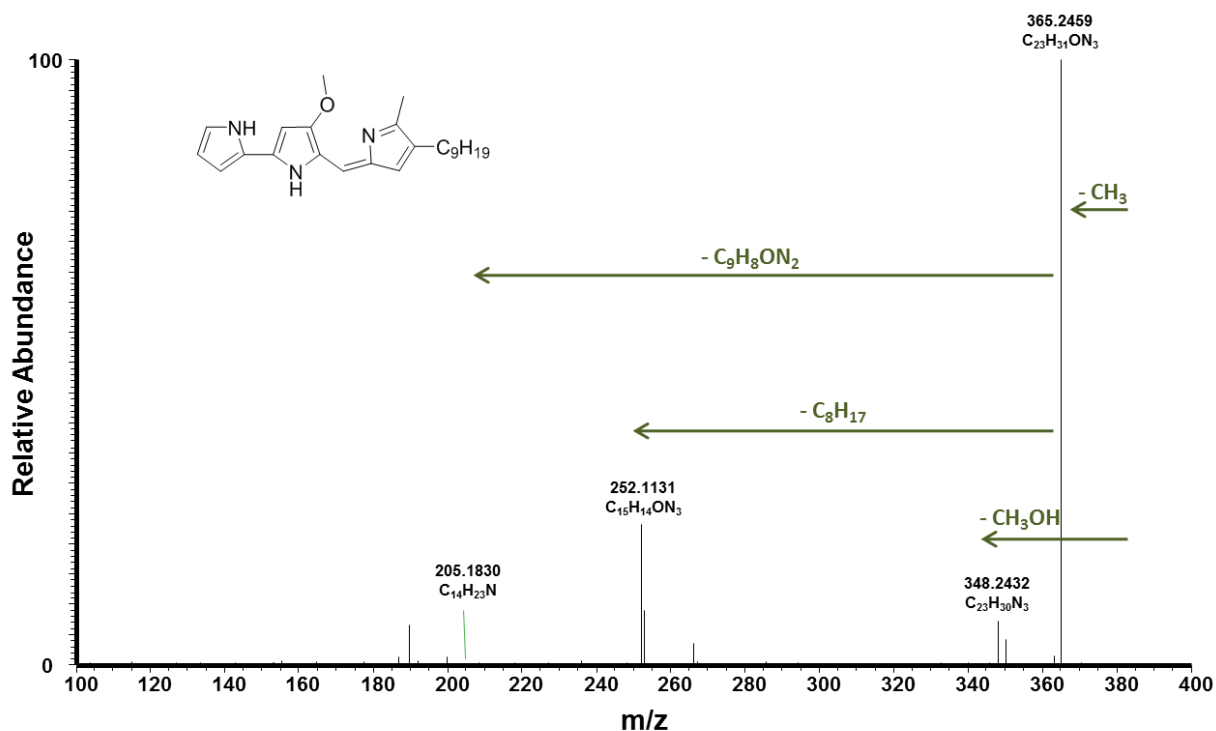


Abb. S7: HRMS²-Spektrum von 2-Methyl-3-nonyl-Prodiginin (Verbindung 7 [M+H]⁺: m/z 380, C₂₄H₃₄N₃O).

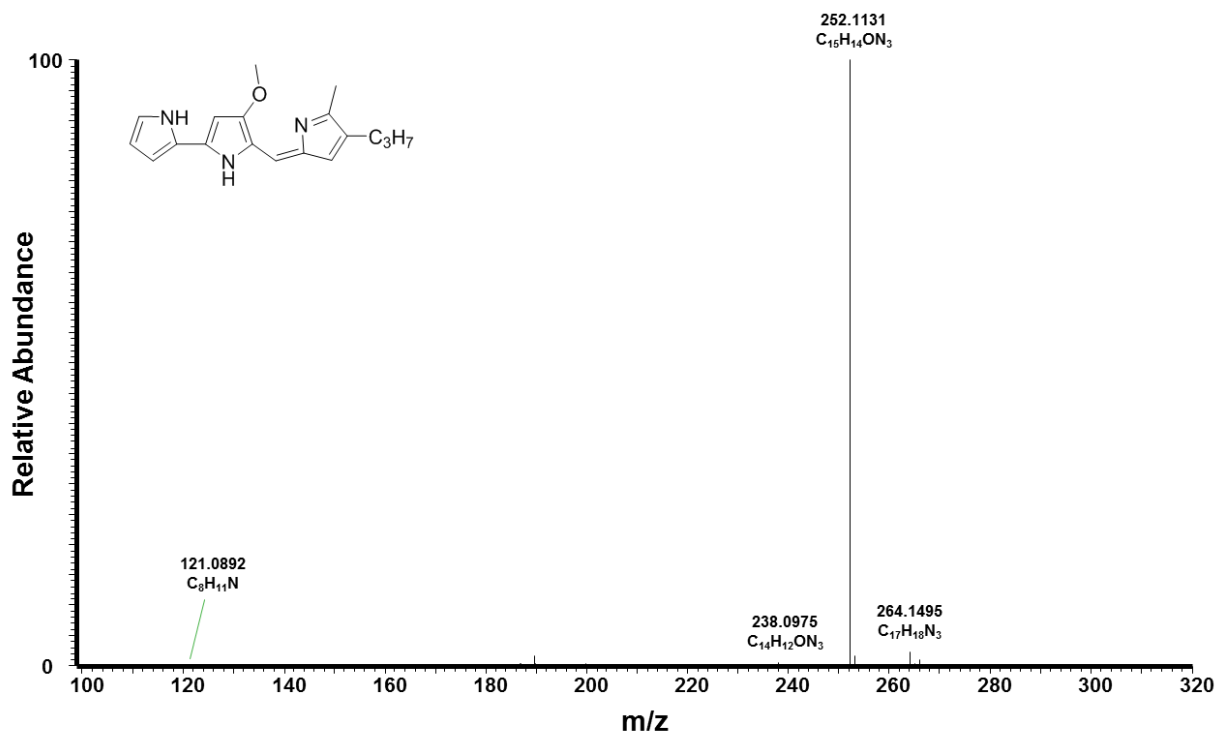


Abb. S8: HRMS³-Spektrum von 2-Methyl-3-propyl-Prodiginin (Verbindung 1 [M+H]⁺: m/z 296 via 281).

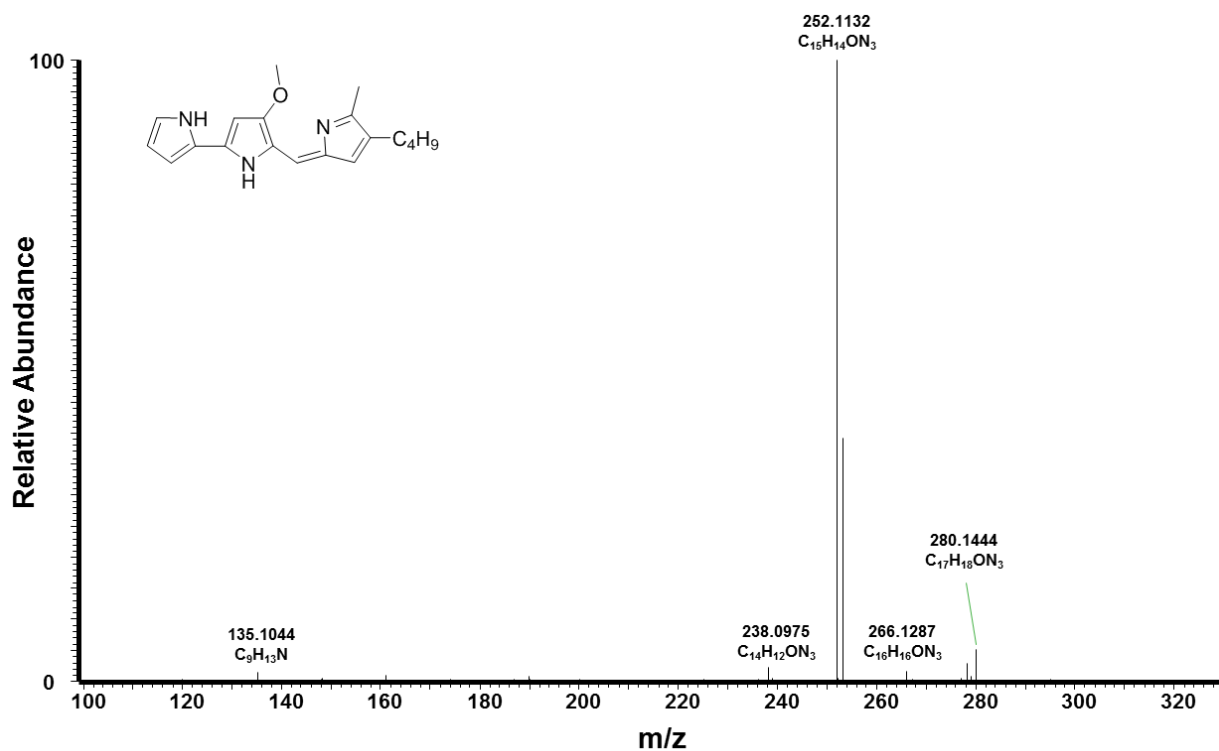


Abb. S9: HRMS³-Spektrum von 2-Methyl-3-butyl-Prodiginin (Verbindung 2 [M+H]⁺: m/z 310 via 295).

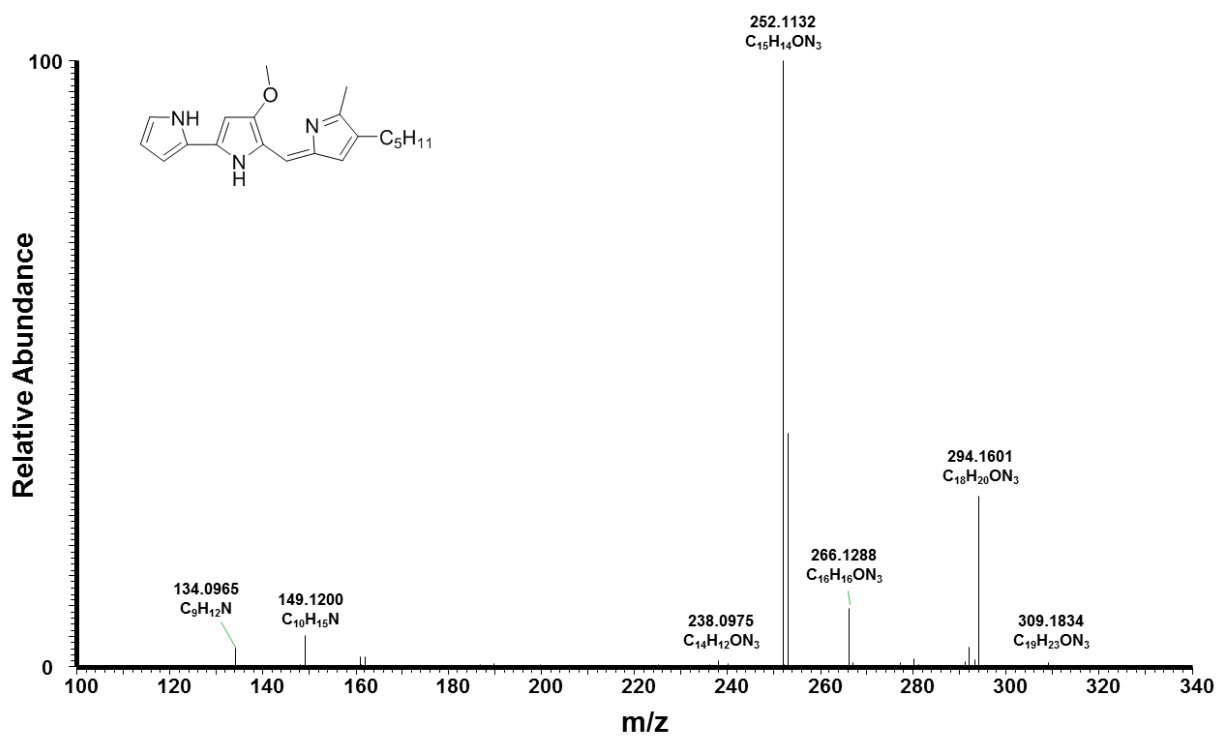


Abb. S10: HRMS³-Spektrum von Prodigiosin (Verbindung 3 [M+H]⁺: m/z 324 via 309).

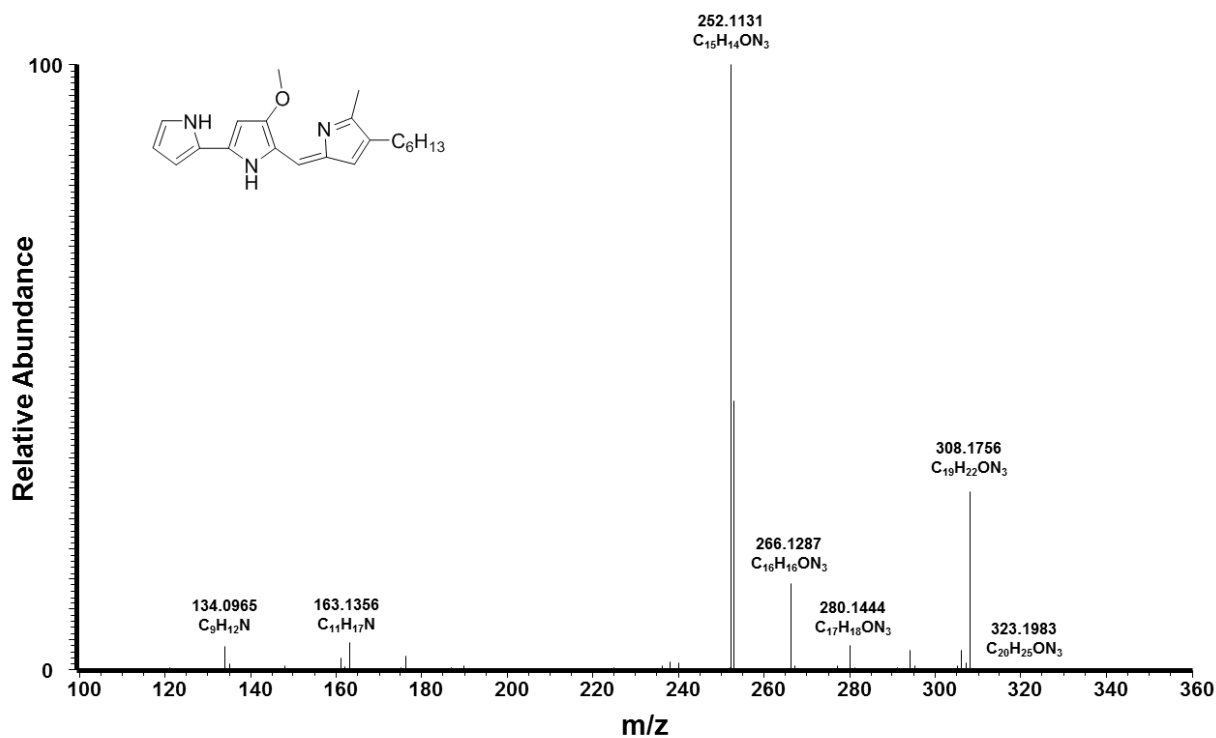


Abb. S11: HRMS³-Spektrum von 2-Methyl-3-hexyl-Prodiginine (Verbindung 4 [M+H]⁺: m/z 338 via 323).

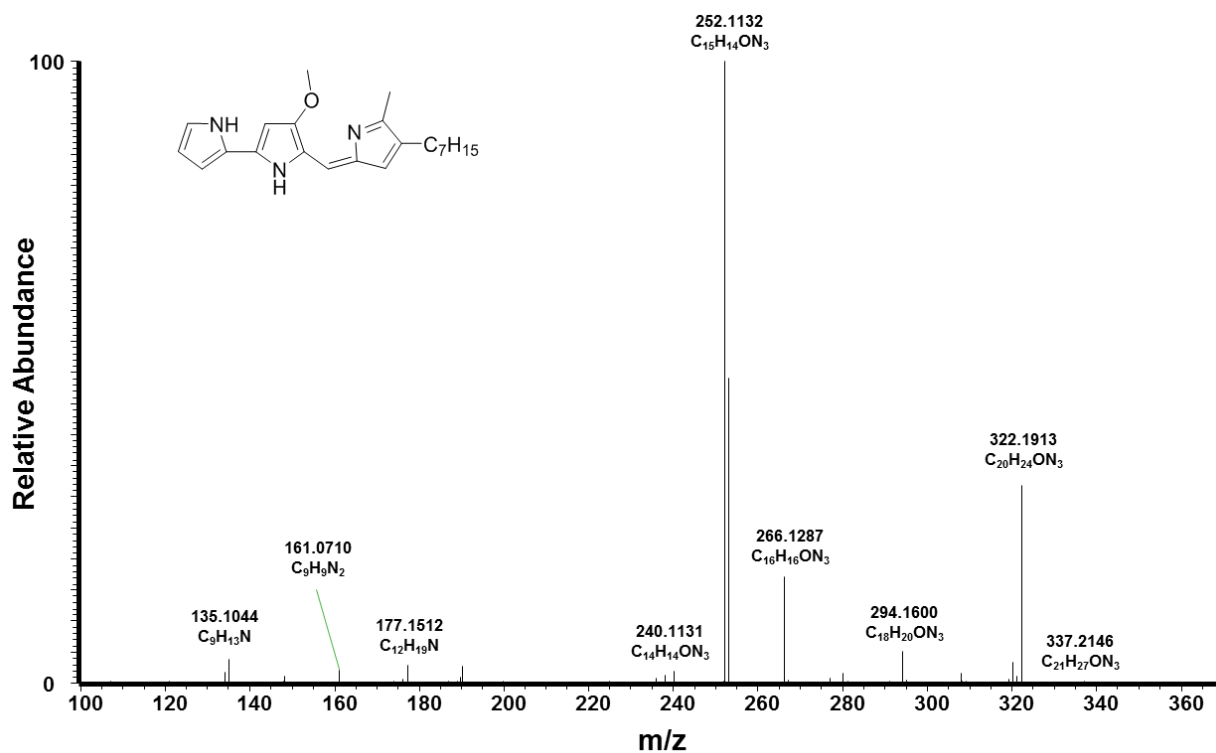


Abb. S12: HRMS³-Spektrum von 2-Methyl-3-heptyl-Prodiginin (Verbindung 5 [M+H]⁺: m/z 352 via 337).

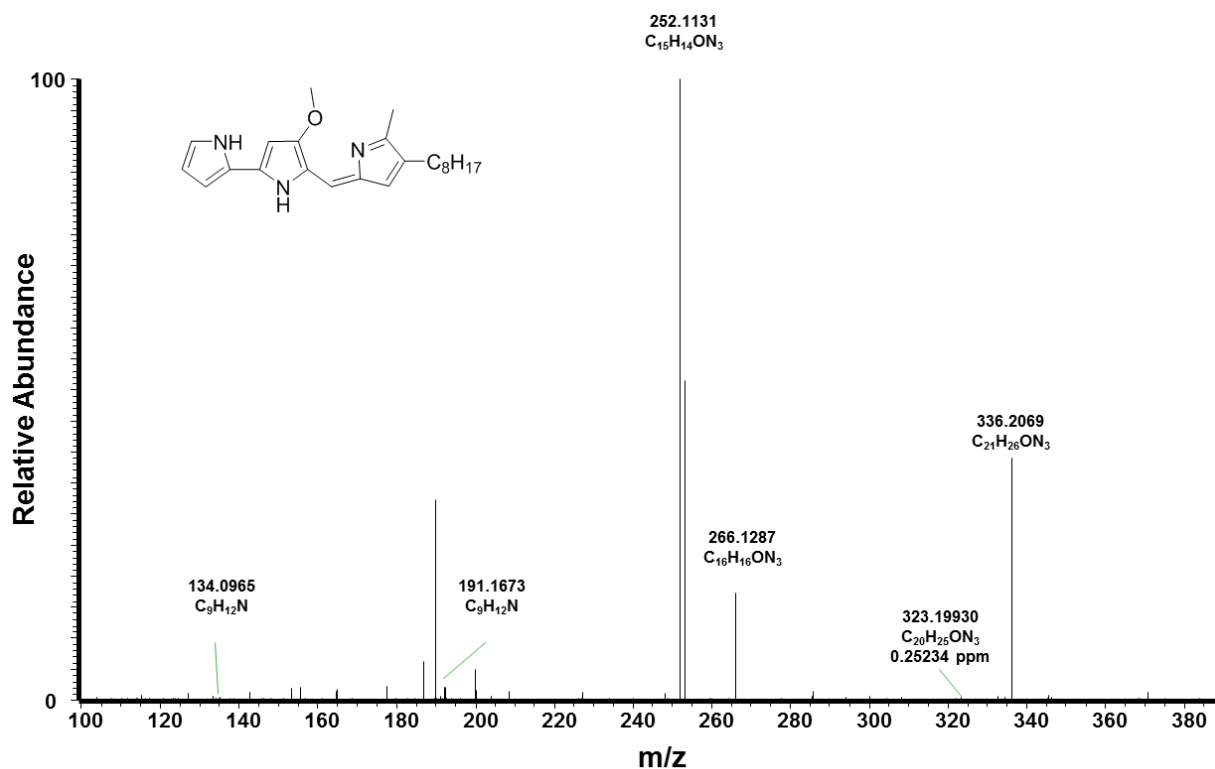


Abb. S13: HRMS³-Spektrum von 2-Methyl-3-octyl-Prodiginin (Verbindung 6 $[M+H]^+$: m/z 366 via 351).

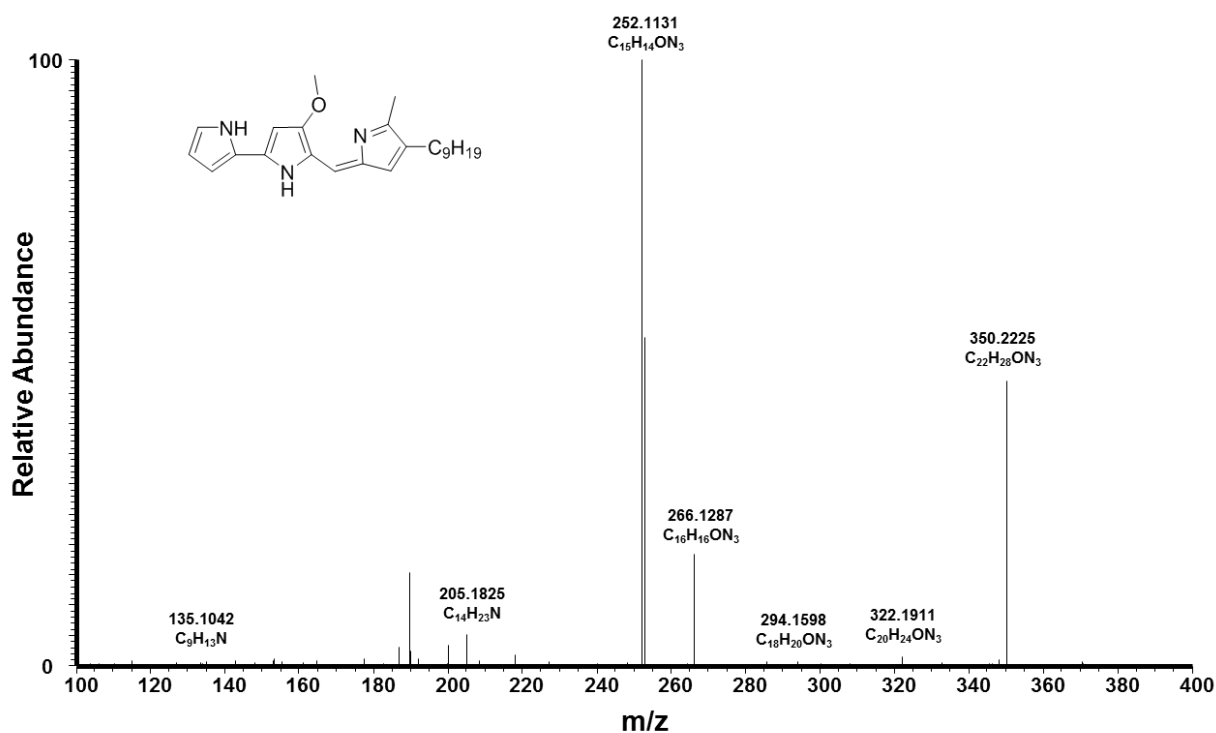


Abb. S14: HRMS³-Spektrum von 2-Methyl-3-nonyl-Prodiginin (Verbindung 7 $[M+H]^+$: m/z 380 via 365).

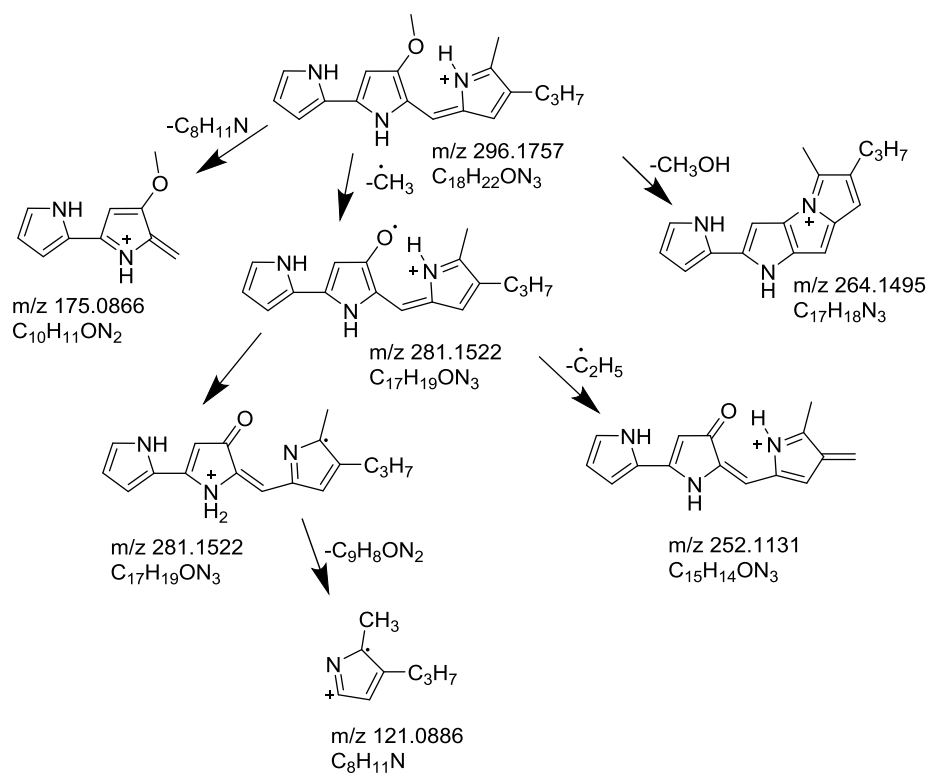


Abb. S15: Fragmentierungsweg von 2-Methyl-3-propyl-Prodiginin (Verbindung 1 $[M+H]^+$: m/z 296, $C_{18}H_{22}N_3O$).

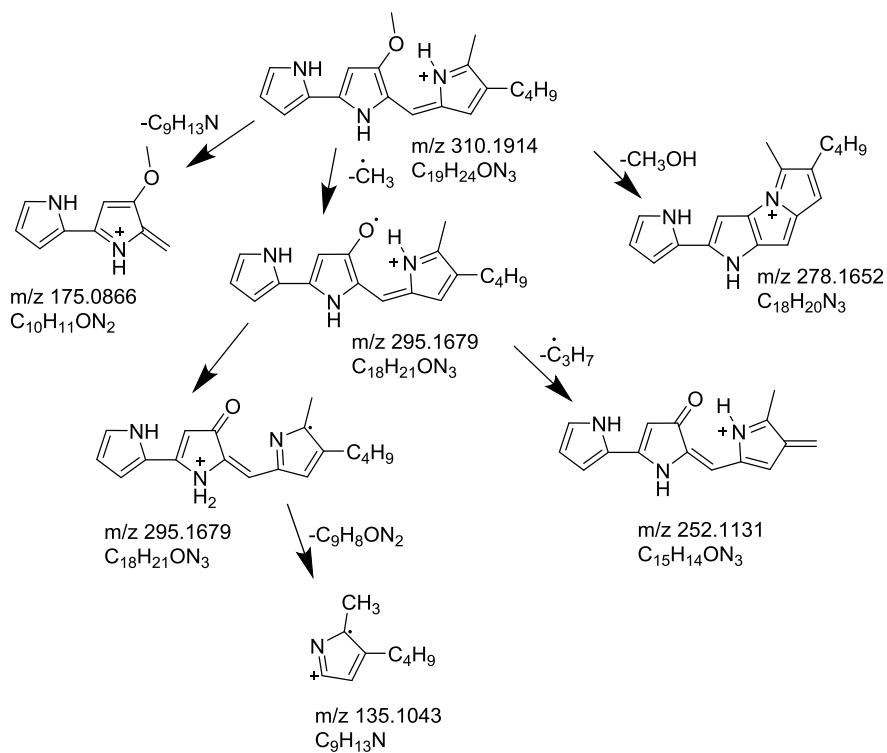


Abb. S16: Fragmentierungsweg von 2-Methyl-3-butyl-Prodiginin (Verbindung 2 $[M+H]^+$: m/z 310, $C_{19}H_{24}N_3O$).

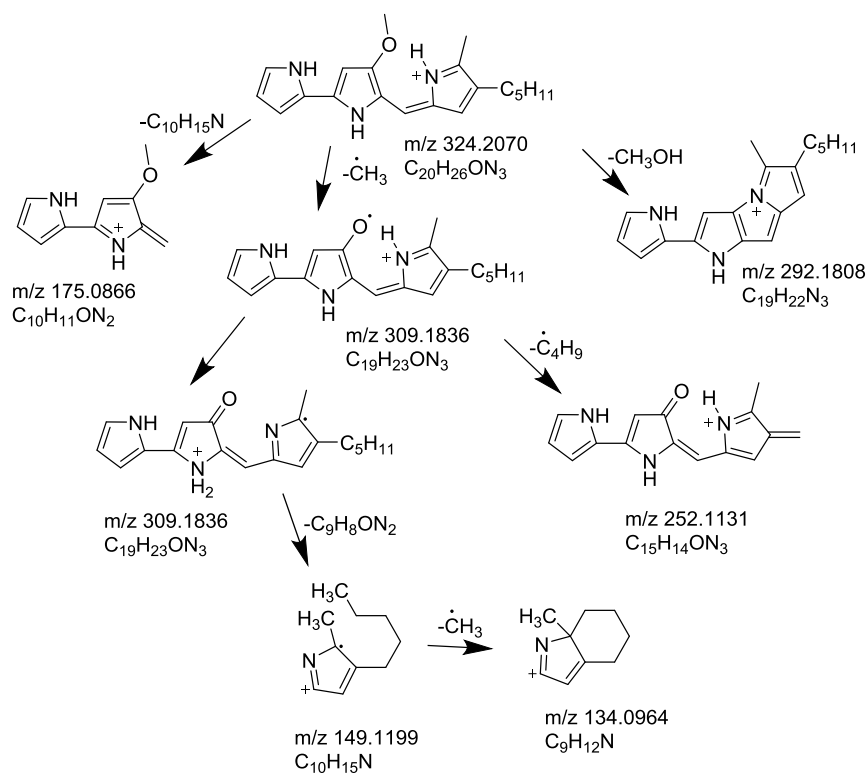


Abb. S17: Fragmentierungsweg von Prodigiosin (Verbindung 3 $[M+H]^+$: m/z 324, $C_{20}H_{26}N_3O$).

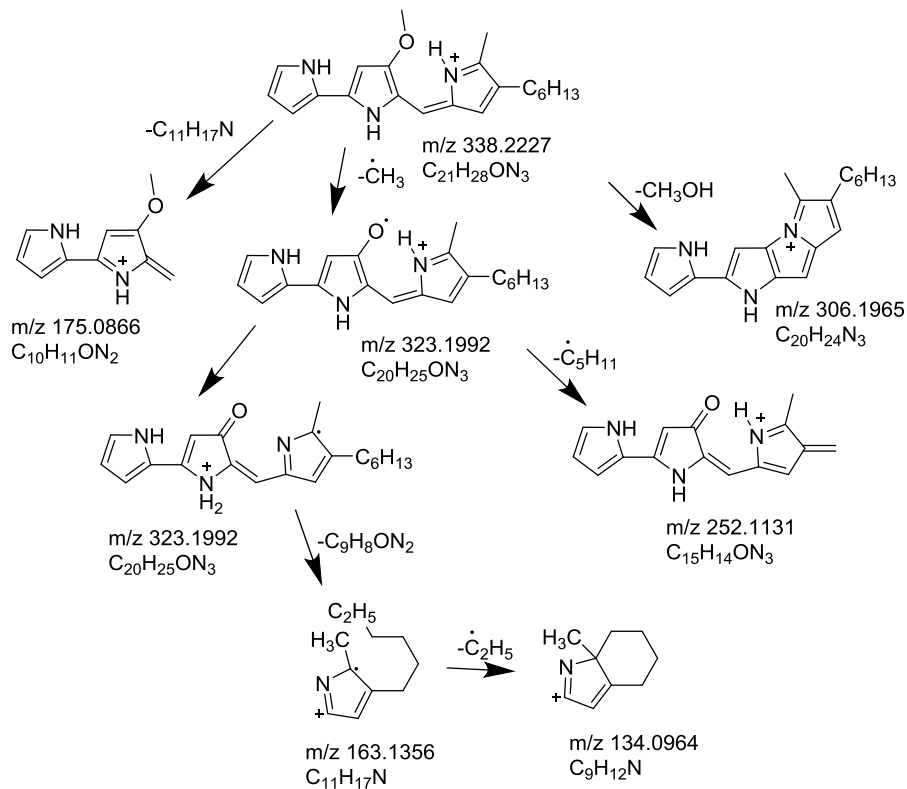


Abb S18: Fragmentierungsweg von 2-Methyl-3-hexyl-Prodiginin (Verbindung 4 $[M+H]^+$: m/z 338, $C_{21}H_{28}N_3O$).

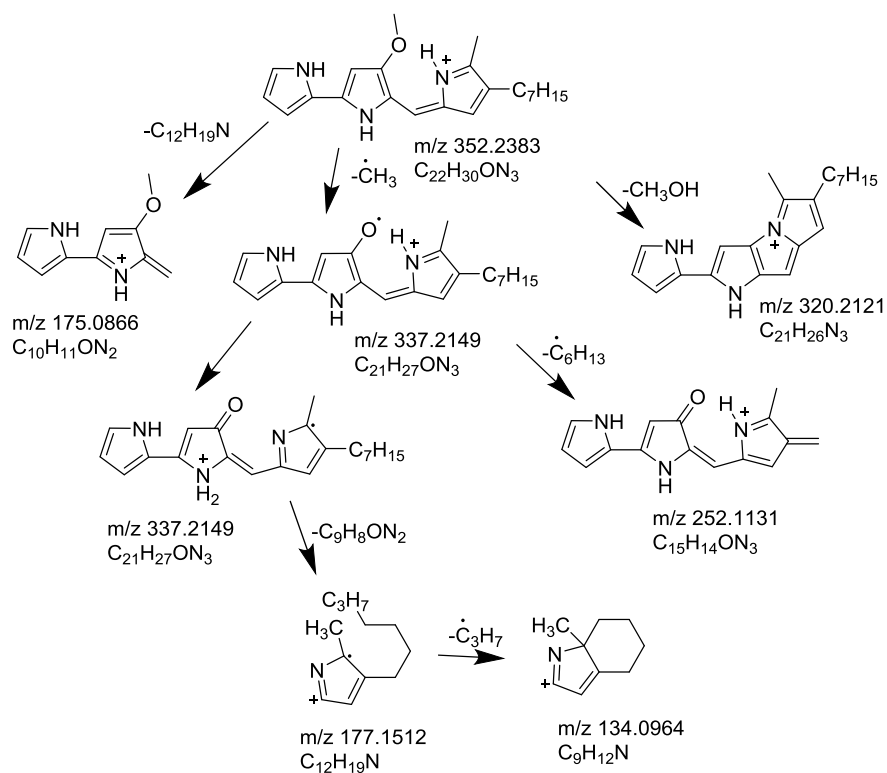


Abb. S19: Fragmentierungsweg von 2-Methyl-3-heptyl-Prodiginin (Verbindung 5 $[M+H]^+$: m/z 352, $C_{22}H_{30}N_3O$).

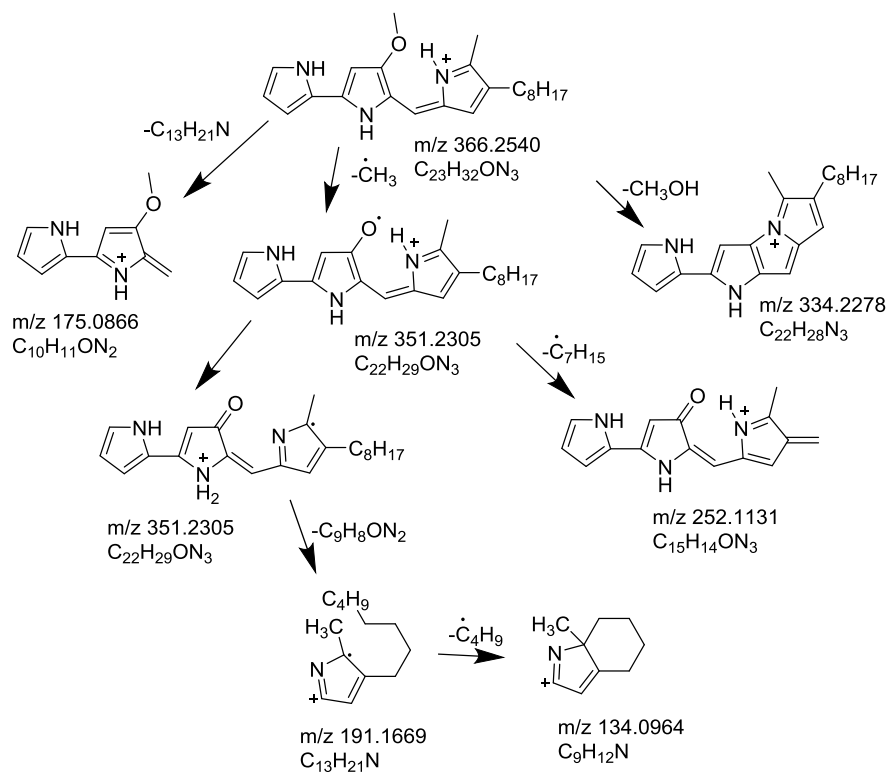


Abb. S20: Fragmentierungsweg von 2-Methyl-3-octyl-Prodiginin (Verbindung 6 $[M+H]^+$: m/z 366, $C_{23}H_{32}N_3O$).

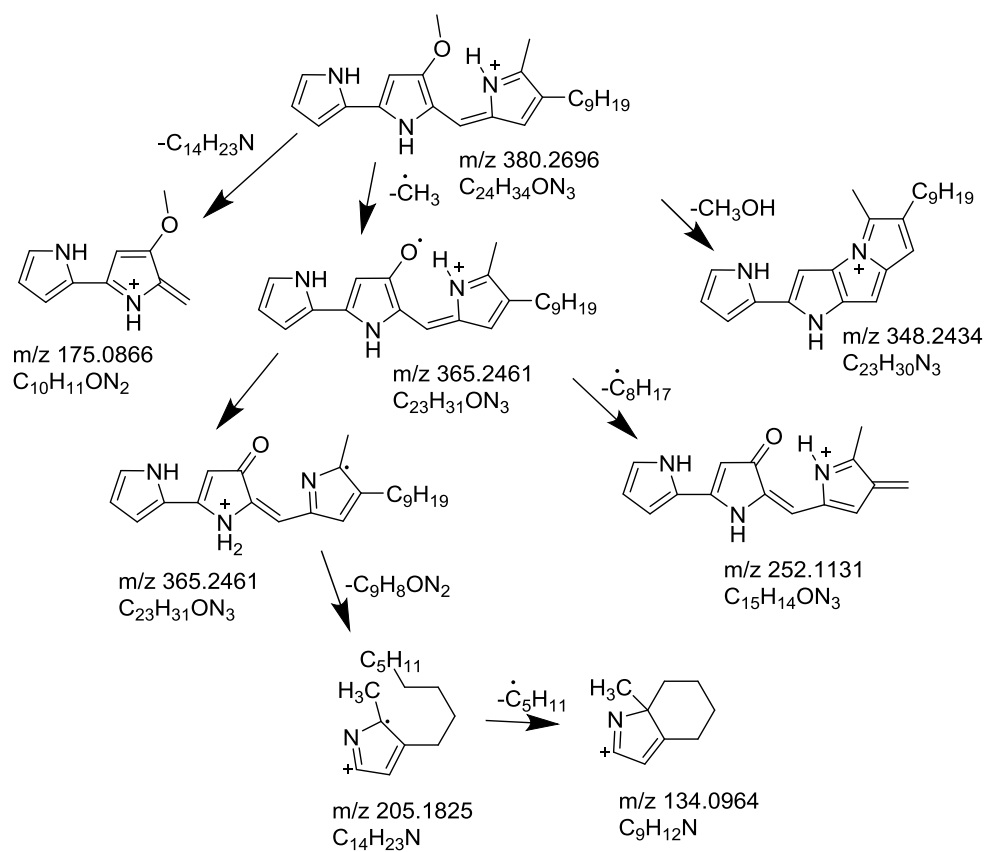


Abb. S21: Fragmentierungsweg von 2-Methyl-3-nonyl-Prodiginin (Verbindung **7** [M+H]⁺: *m/z* 380, C₂₄H₃₄N₃O).

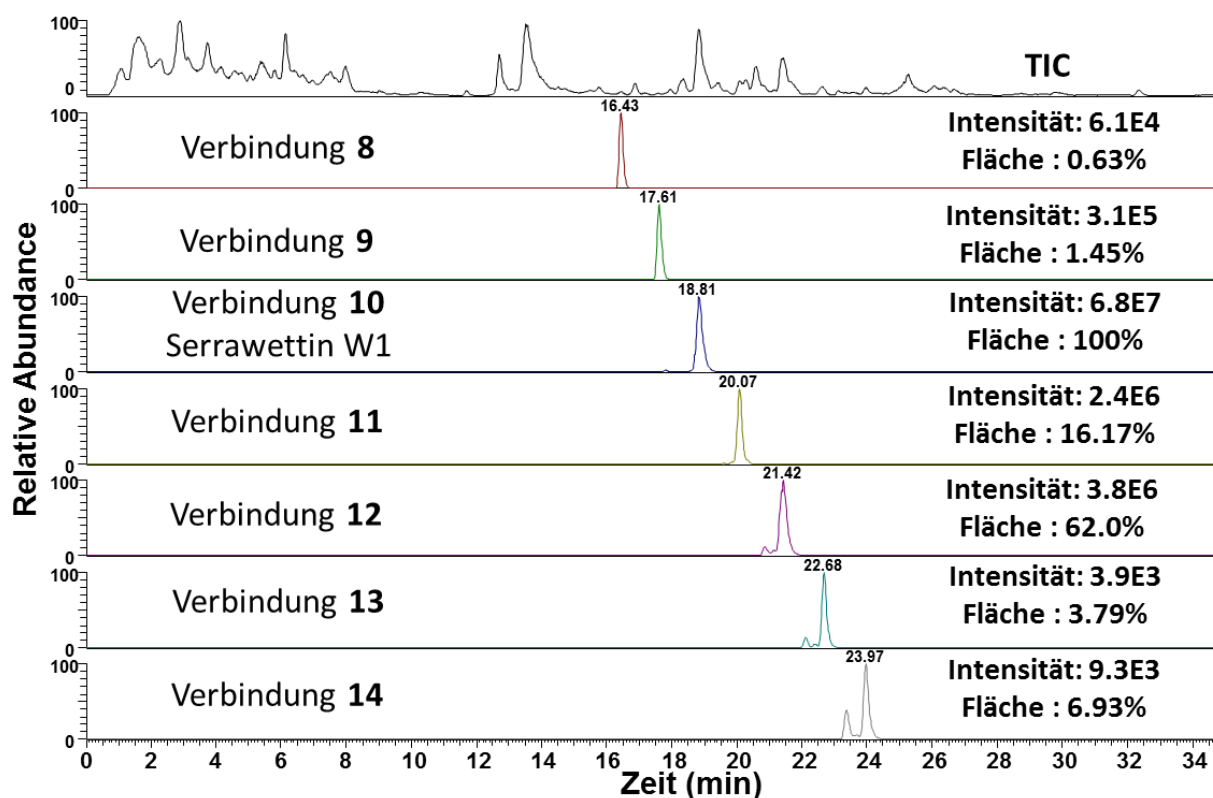


Abb. S22: HPLC-HRMS Auswertung der Serratamolide (8-14). TIC, Ionenchromatogramme mit Massenfiltern und relativer Flächenvergleich zum Hauptmetabolit Serrawettin W1.

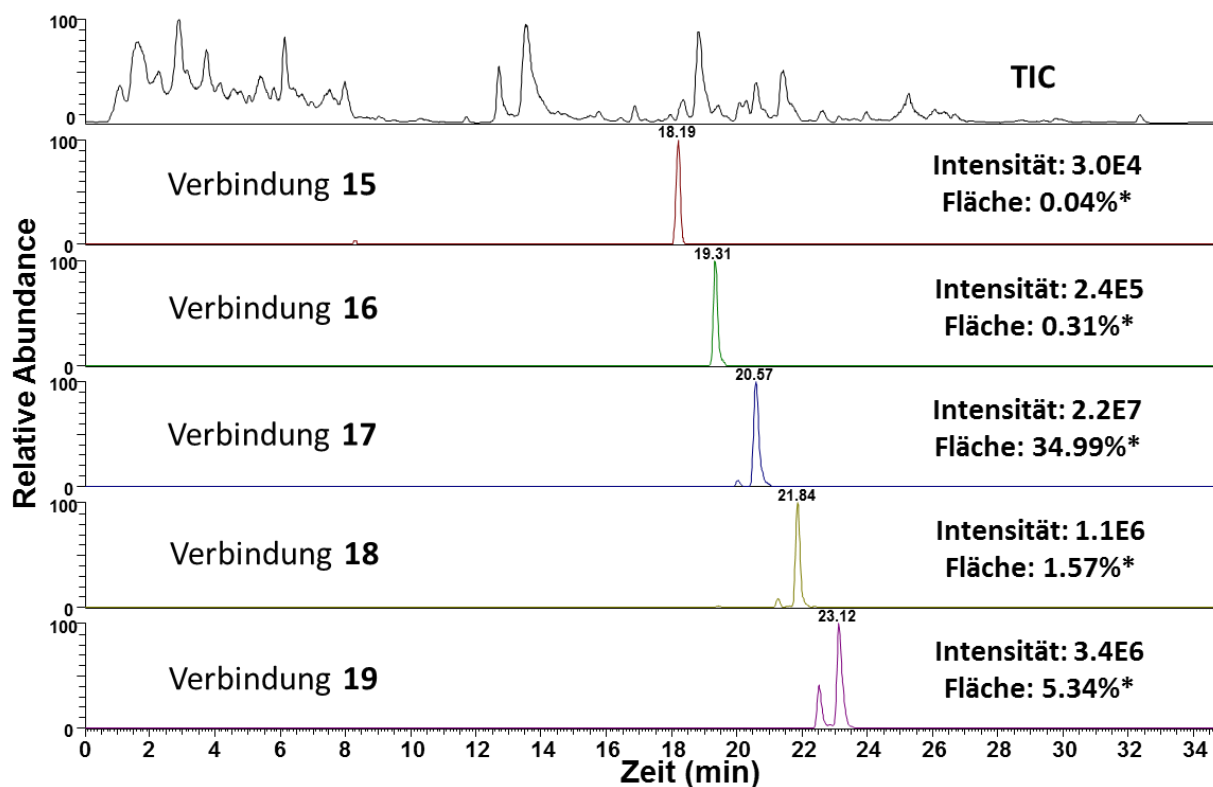


Abb. S23: HPLC-HRMS Auswertung der Serratamolide (15-19). TIC, Ionenchromatogramme mit Massenfiltern und relativer Flächenvergleich zum Hauptmetabolit Serrawettin W1*.

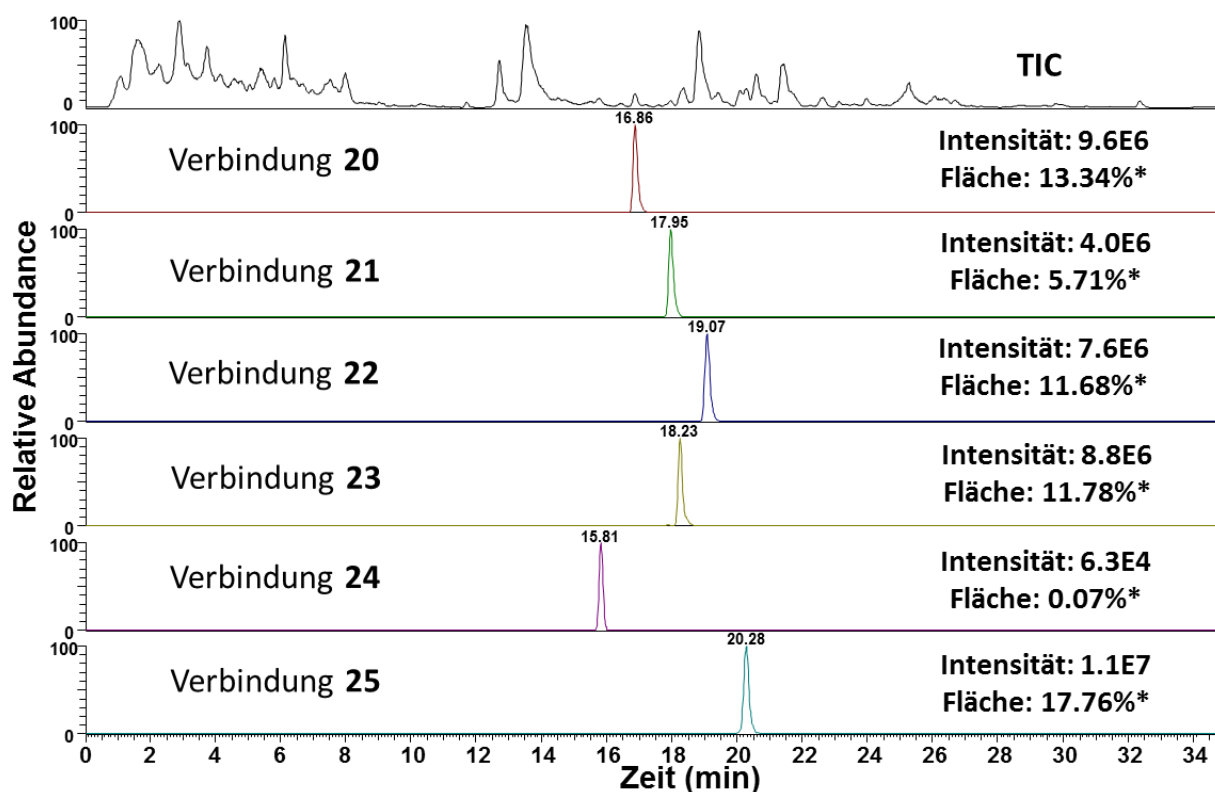


Abb. S24: HPLC-HRMS Auswertung der Serratamolide (20-25). TIC, Ionenchromatogramme mit Massensfiltern und relativer Flächenvergleich zum Hauptmetabolit Serrawettin W1*.

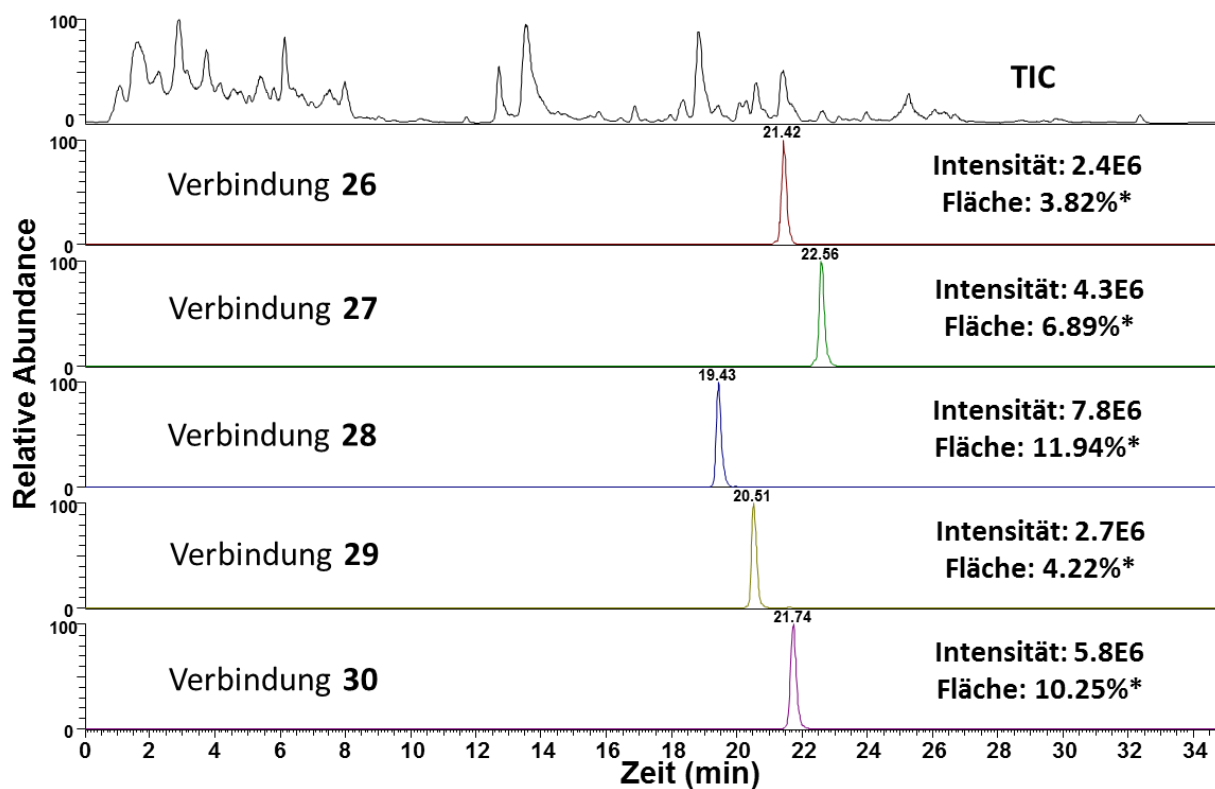


Abb. S25: HPLC-HRMS Auswertung der Serratamolide (26-30). TIC, Ionenchromatogramme mit Massensfiltern und relativer Flächenvergleich zum Hauptmetabolit Serrawettin W1*.

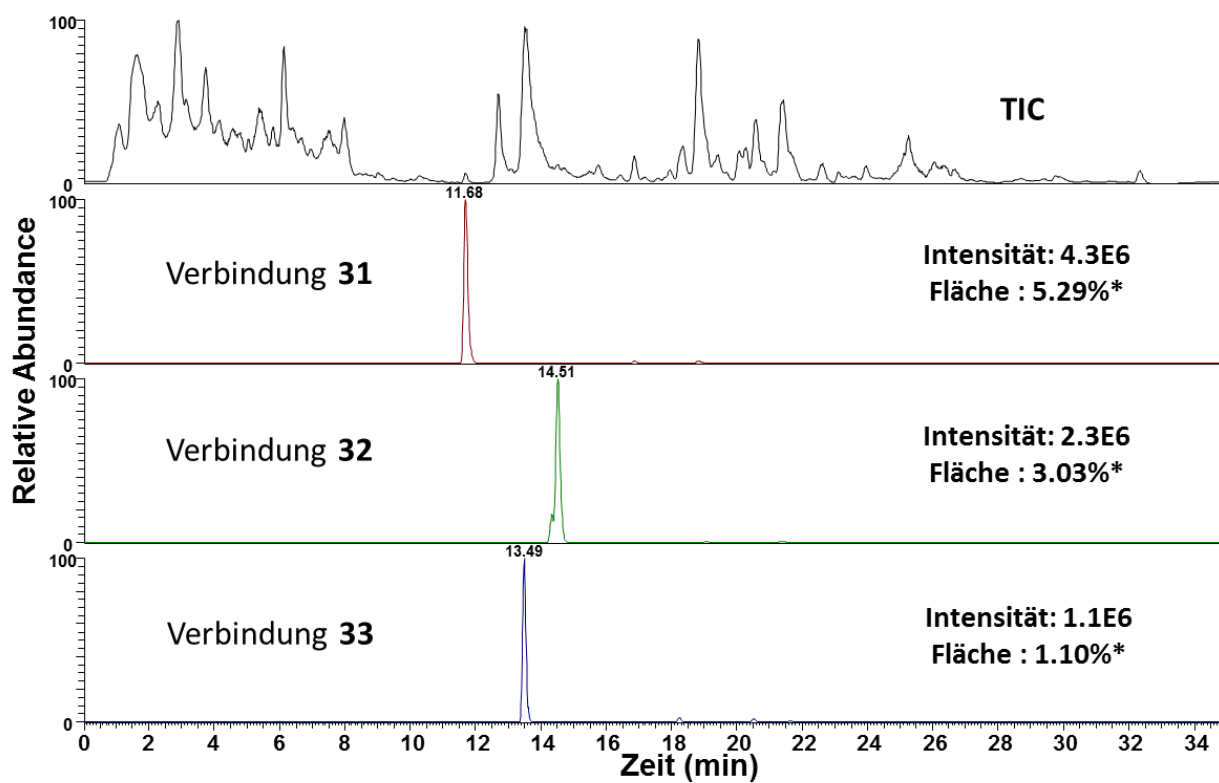


Abb. S26: HPLC-HRMS Auswertung der Serratamolide (**31-33**). TIC, Ionenchromatogramme mit Massenfiltern und relativer Flächenvergleich zum Hauptmetabolit Serrawettin W1*.

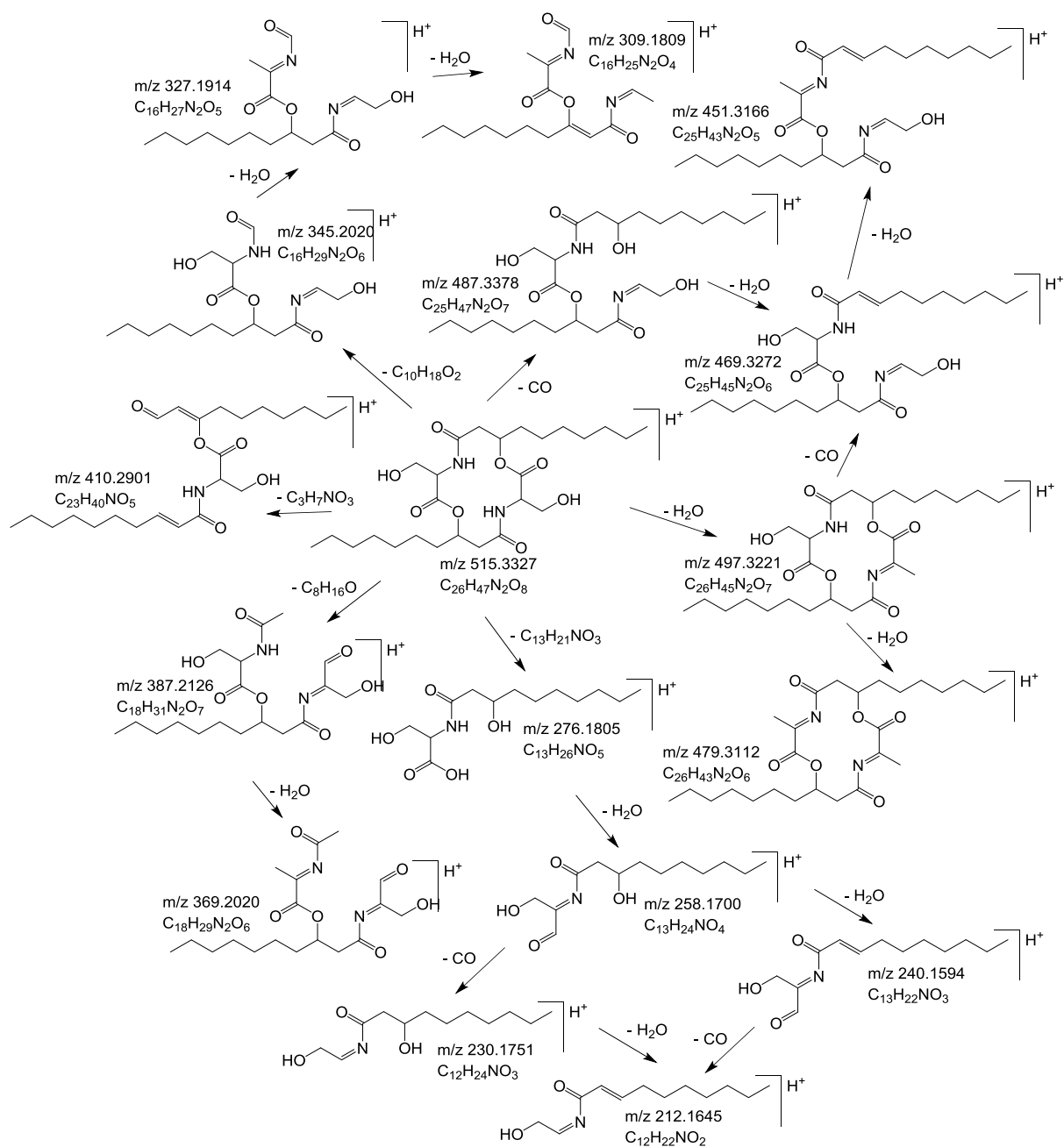


Abb. S27: Fragmentierungsweg von Serrawettin W1 / Serratamolide C₁₀+C₁₀ (Verbindung 10 [M+H]⁺: m/z 515, C₂₆H₄₇N₂O₈).

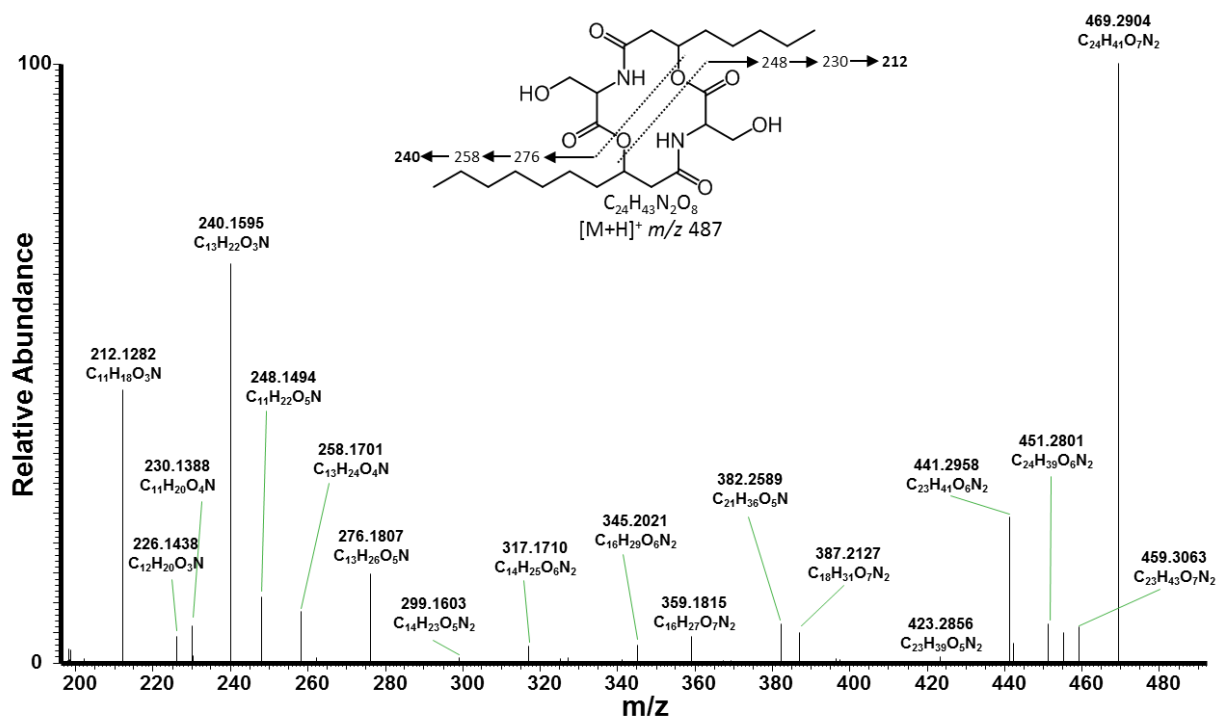


Abb. S28: HRMS²-Spektrum von Serratamolide C₈+C₁₀ (Verbindung 8 [M+H]⁺: m/z 487, C₂₄H₄₃N₂O₈).

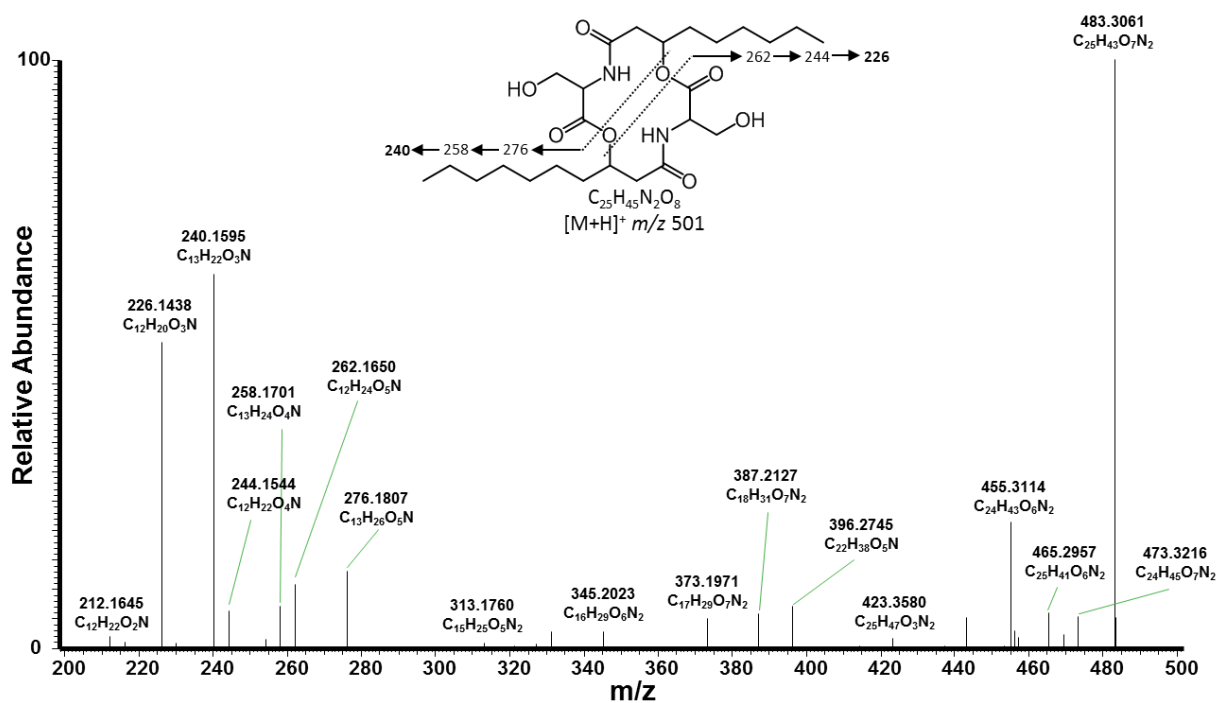


Abb. S29: HRMS²-Spektrum von Serratamolide C₉+C₁₀ (Verbindung 9 [M+H]⁺: m/z 501, C₂₅H₄₅N₂O₈).

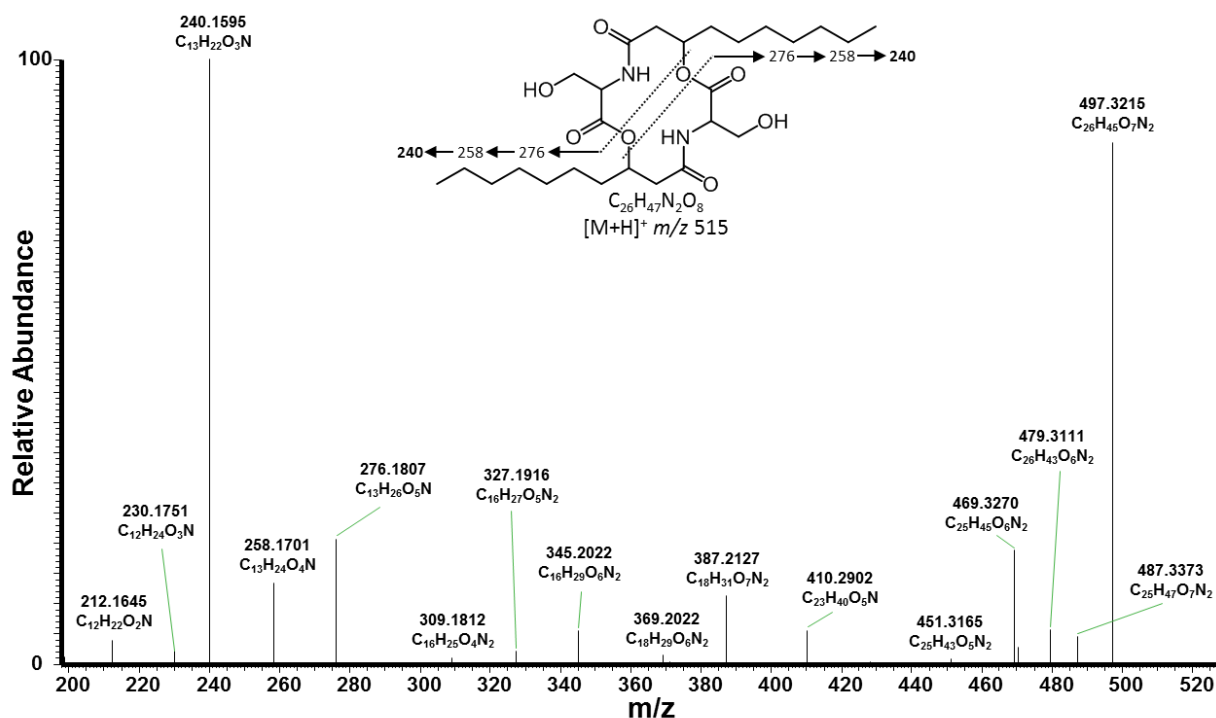


Abb S30: HRMS²-Spektrum von Serrawettin W1 / Serratamolide C₁₀+C₁₀ (Verbindung 10 $[M+H]^+$: m/z 515, C₂₆H₄₇N₂O₈).

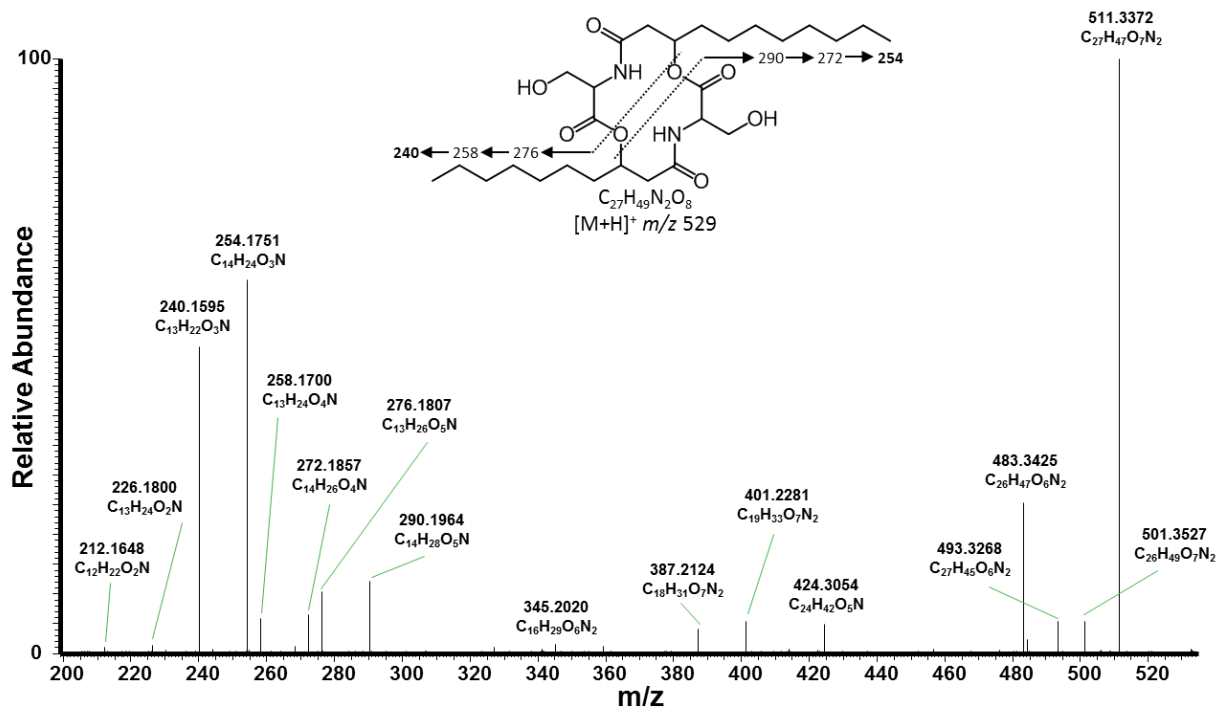


Abb. S31: HRMS²-Spektrum von Serratamolide C₁₀+C₁₁ (Verbindung 11 $[M+H]^+$: m/z 529, C₂₇H₄₉N₂O₈).

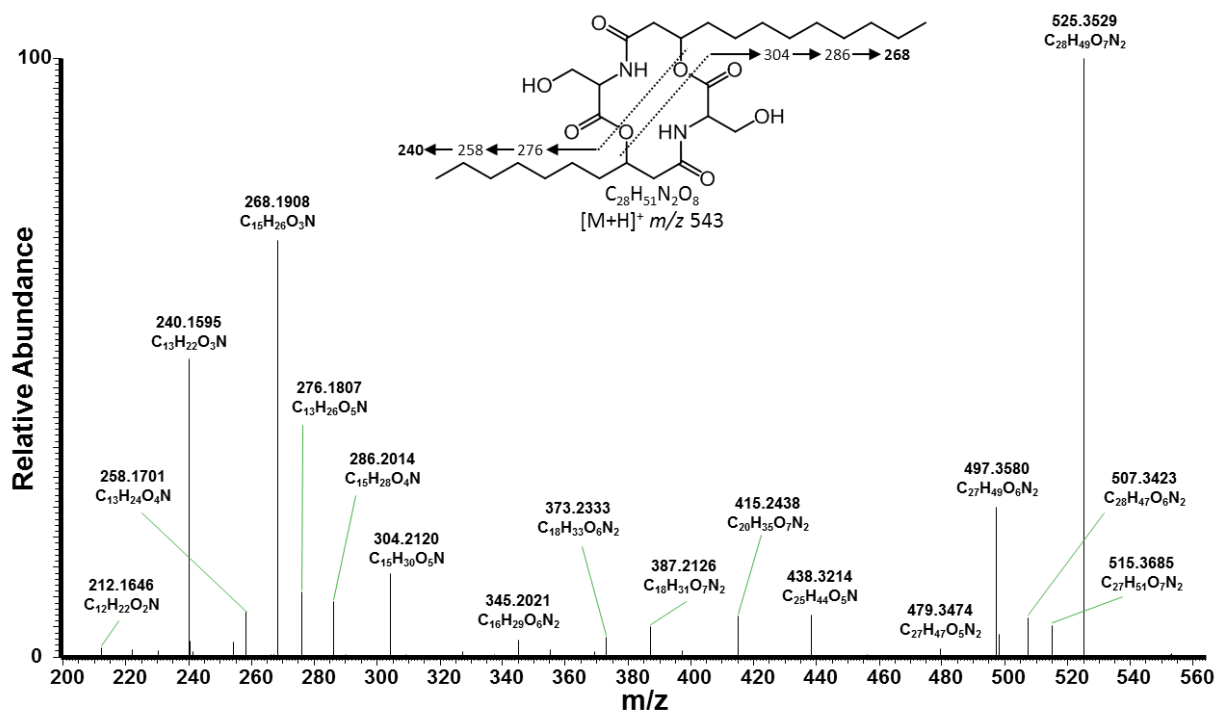


Abb. S32: HRMS²-Spektrum von Serratamolide C₁₀+C₁₂ (Verbindung 12 [M+H]⁺: m/z 543, C₂₈H₅₁N₂O₈).

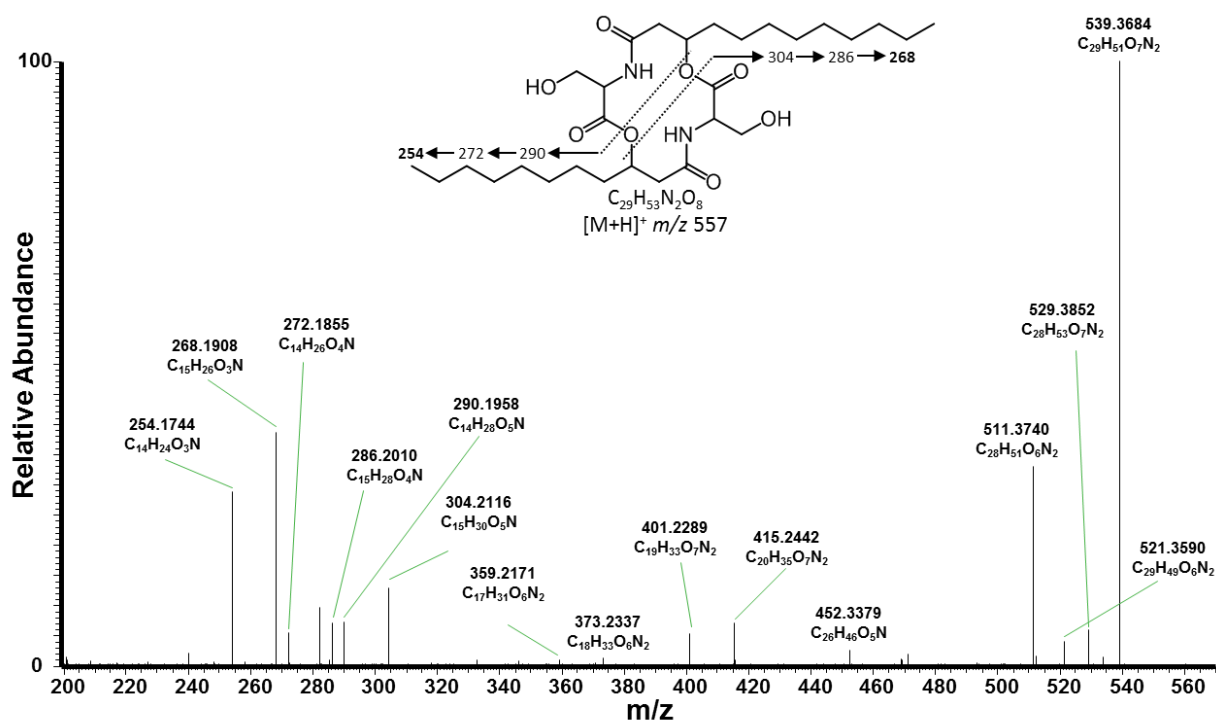
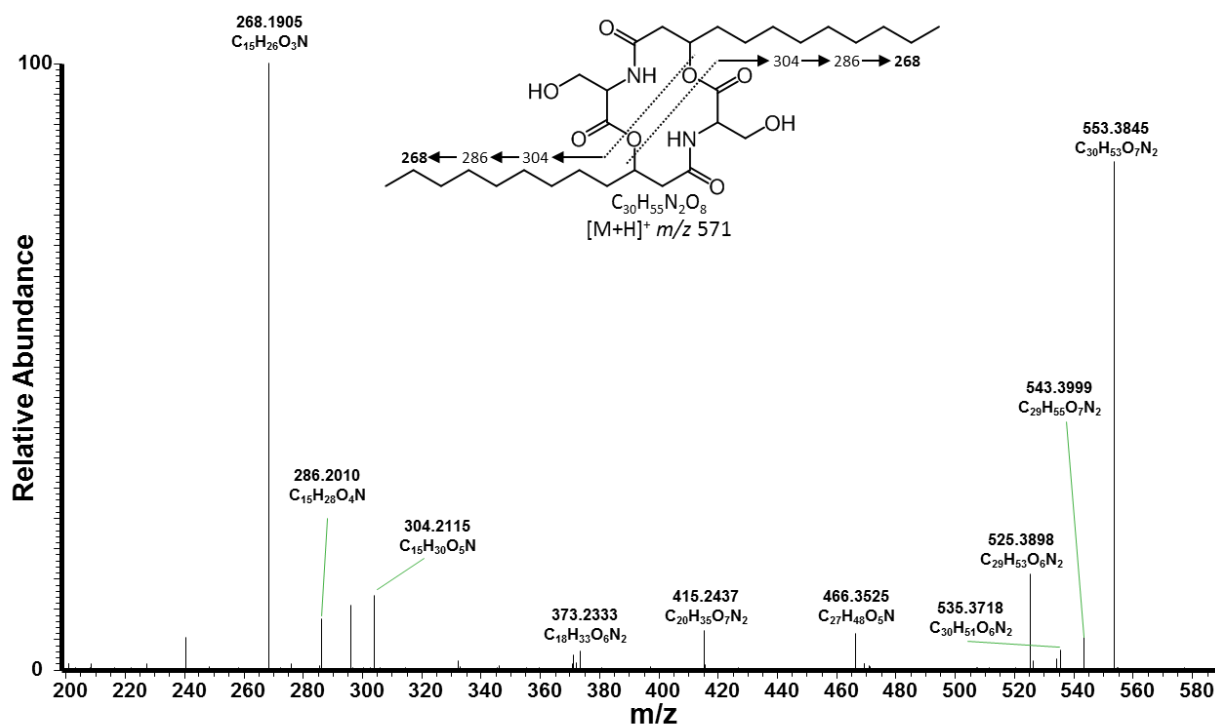
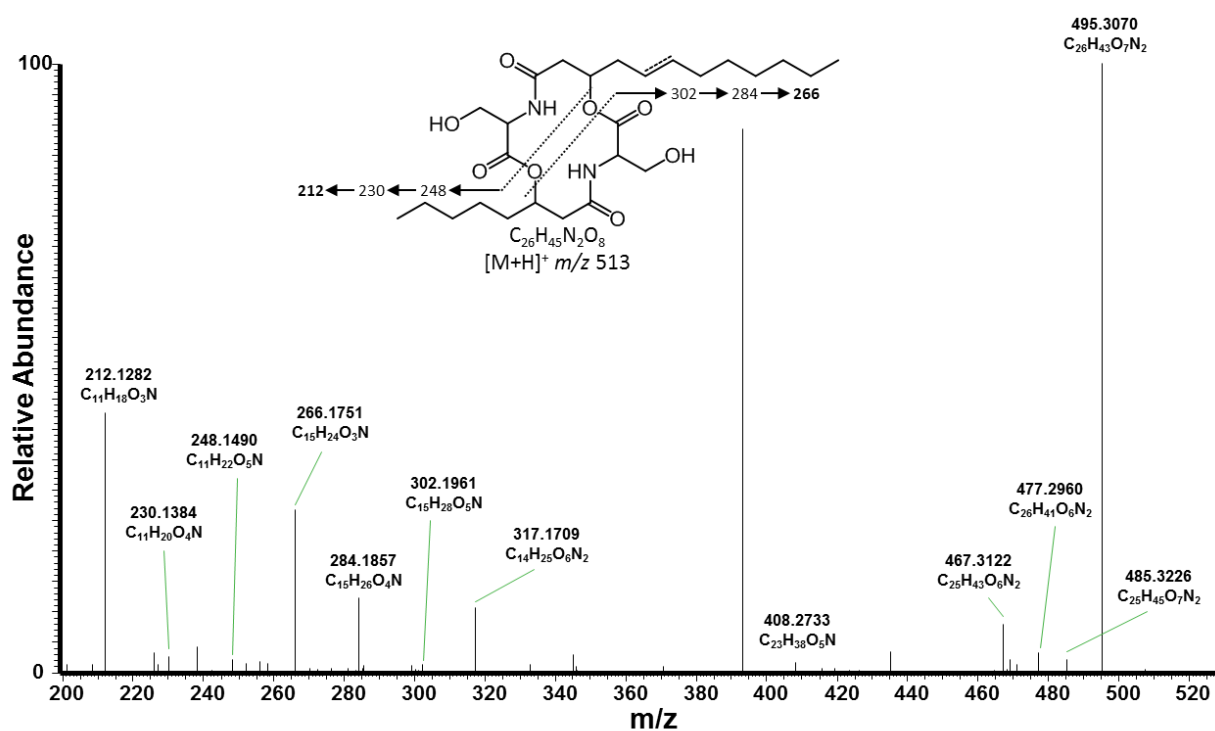


Abb. S33: HRMS²-Spektrum von Serratamolide C₁₁+C₁₂ (Verbindung 13 [M+H]⁺: m/z 557, C₂₉H₅₃N₂O₈).

Abb. S34: HRMS²-Spektrum von Serratamolide C₁₂+C₁₂ (Verbindung **14** [M+H]⁺: m/z 571, C₃₀H₅₅N₂O₈).Abb. S35: HRMS²-Spektrum von Serratamolide C₈+C_{12:1} (Verbindung **15** [M+H]⁺: m/z 513, C₂₆H₄₅N₂O₈).

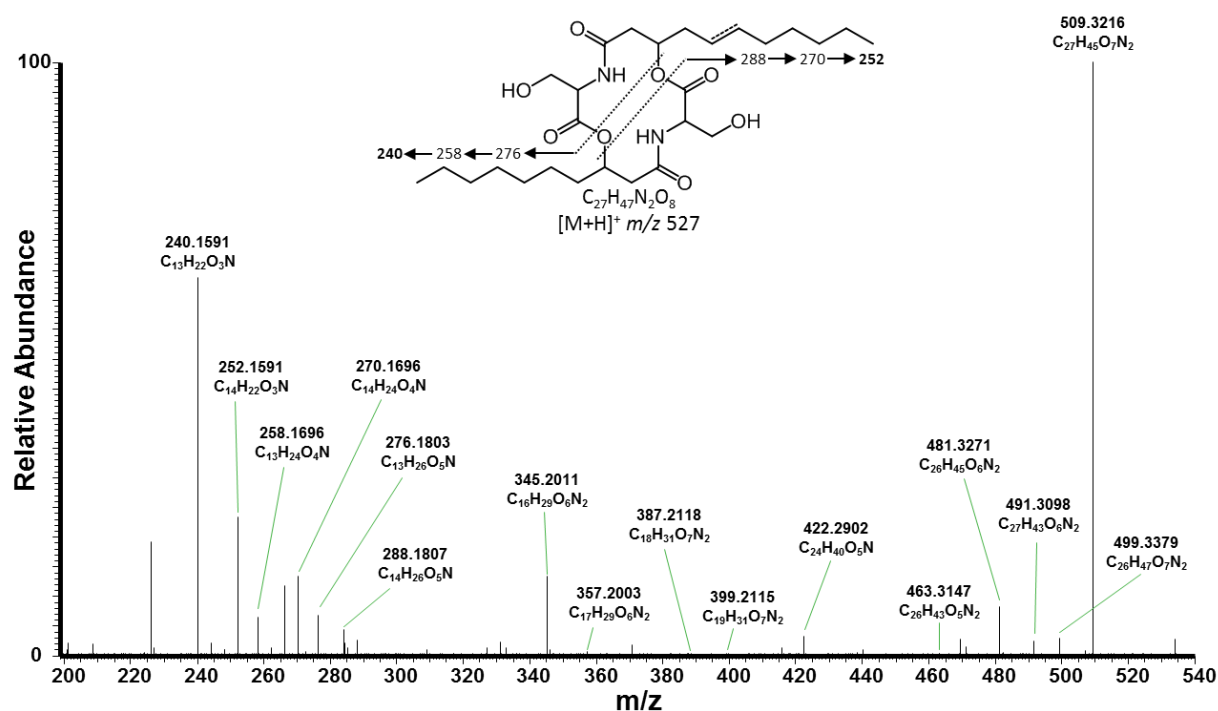


Abb. S36: HRMS²-Spektrum von Serratamolide C₁₀+C_{11:1} (Verbindung **16** [M+H]⁺: *m/z* 527, C₂₇H₄₇N₂O₈).

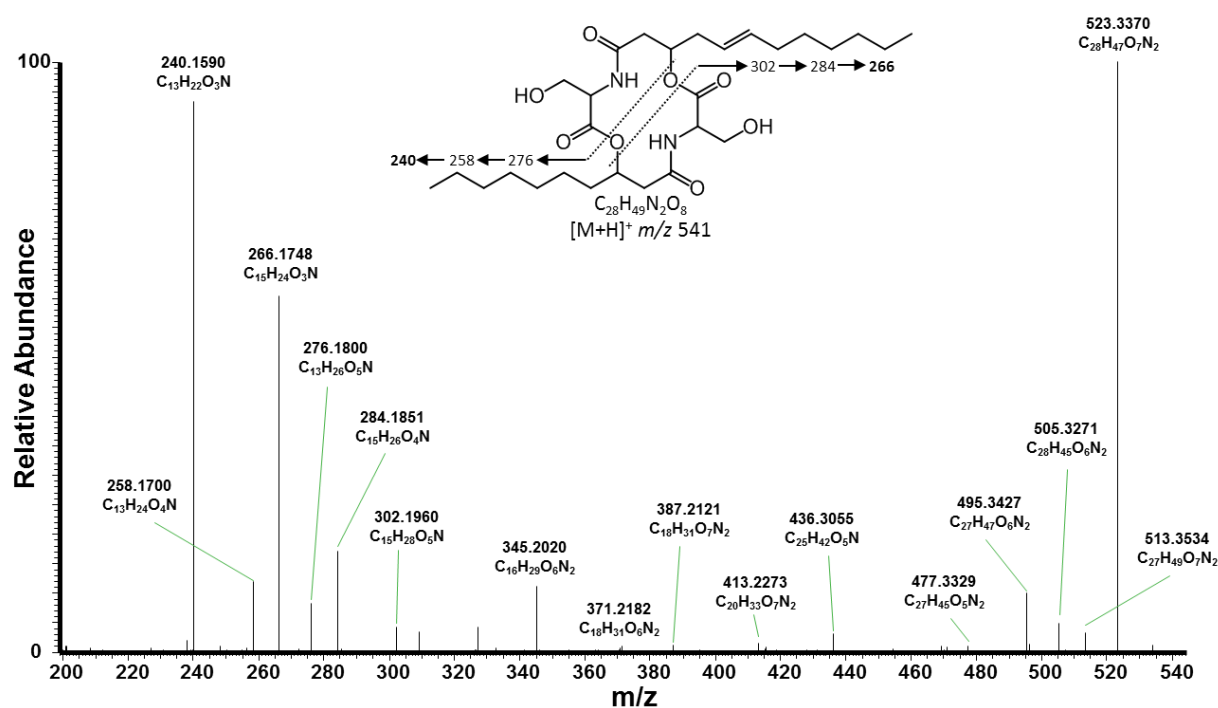


Abb. S37: HRMS²-Spektrum von Serratamolide C₁₀+C_{12:1} (Verbindung **17** [M+H]⁺: *m/z* 541, C₂₈H₄₉N₂O₈).

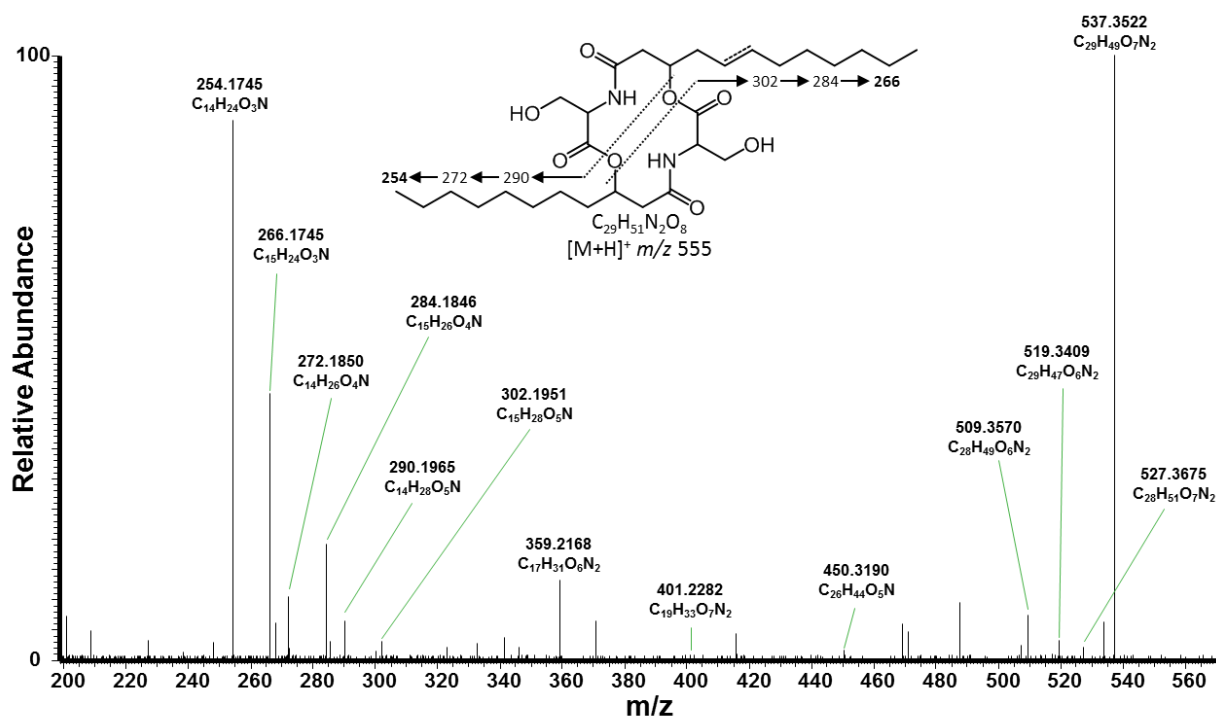


Abb. S38: HRMS²-Spektrum von Serratamolide $C_{11}+C_{12:1}$ (Verbindung **18** $[M+H]^+$: m/z 555, $C_{29}H_{51}N_2O_8$).

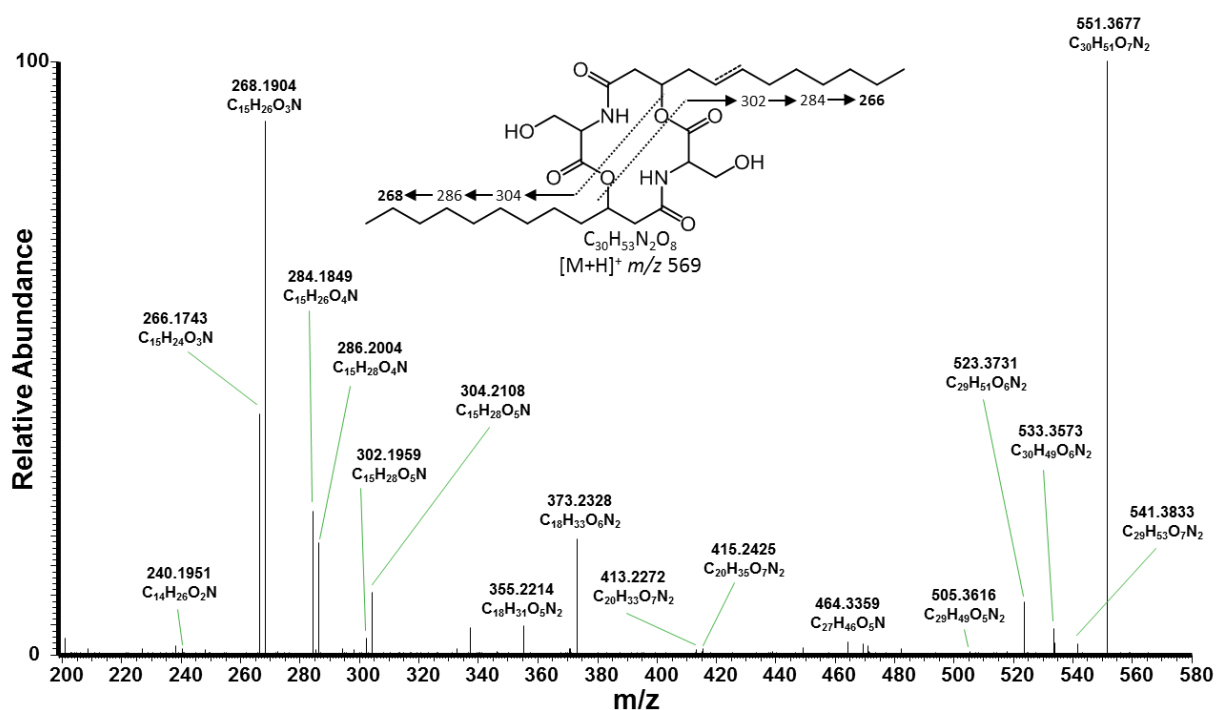


Abb. S39: HRMS²-Spektrum von Serratamolide $C_{12}+C_{12:1}$ (Verbindung **19** $[M+H]^+$: m/z 569, $C_{30}H_{53}N_2O_8$).

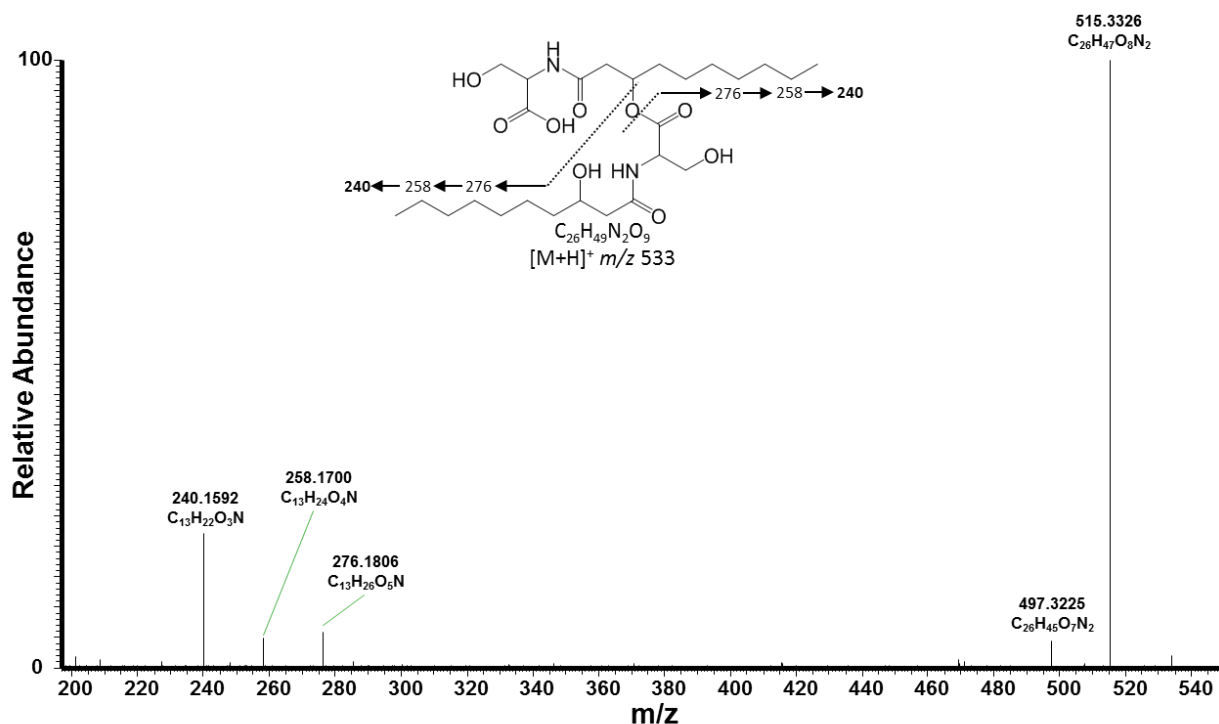


Abb. S40: HRMS²-Spektrum von Serratamolide C₁₀+C₁₀ (geöffnete Ringstruktur, Verbindung **20** [M+H]⁺: *m/z* 533, C₂₆H₄₉N₂O₉).

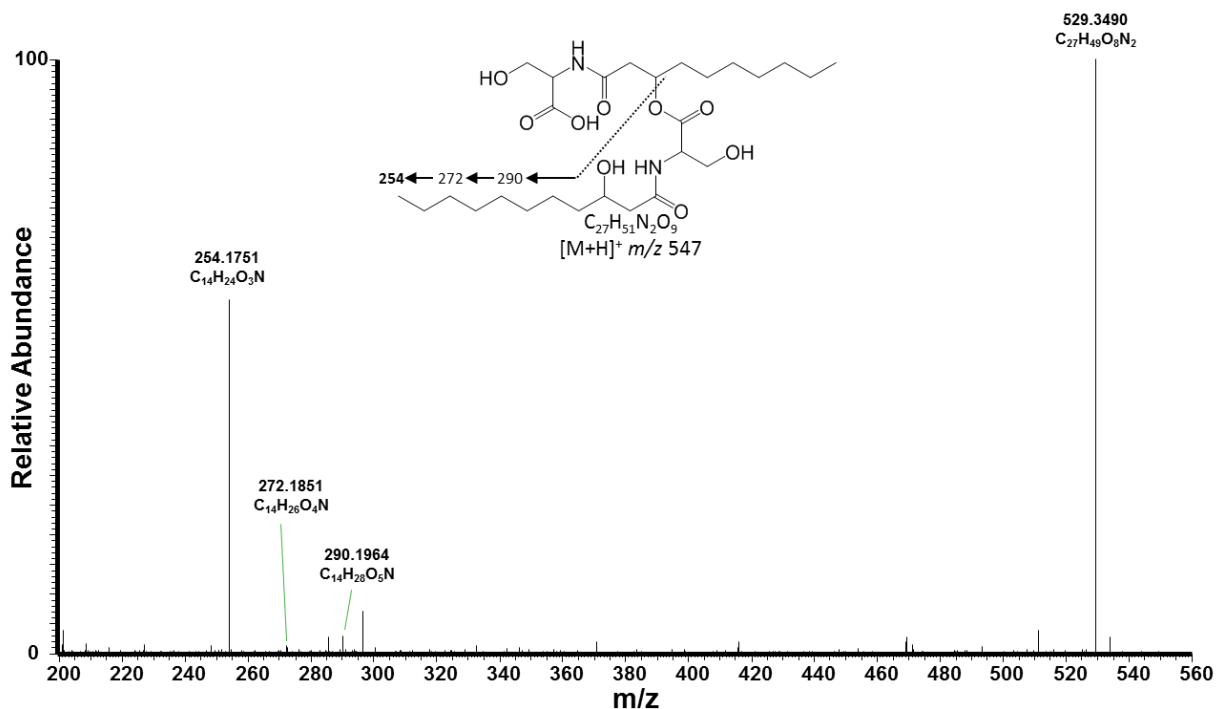


Abb. S41: HRMS²-Spektrum von Serratamolide C₁₀+C₁₁ (geöffnete Ringstruktur, Verbindung **21** [M+H]⁺: *m/z* 547, C₂₇H₅₁N₂O₉).

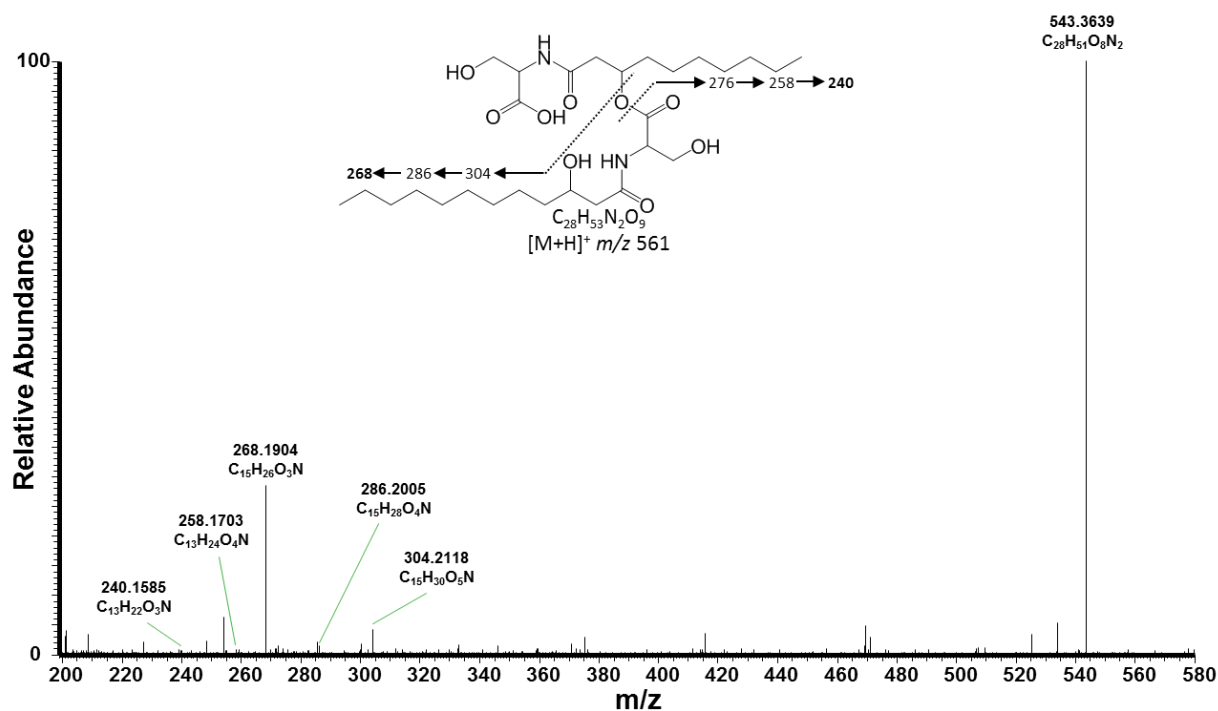


Abb. S42: HRMS²-Spektrum von Serratamolide C₁₀+C₁₂ (geöffnete Ringstruktur, Verbindung 22 [$M+H$]⁺: m/z 561, C₂₈H₅₃N₂O₉).

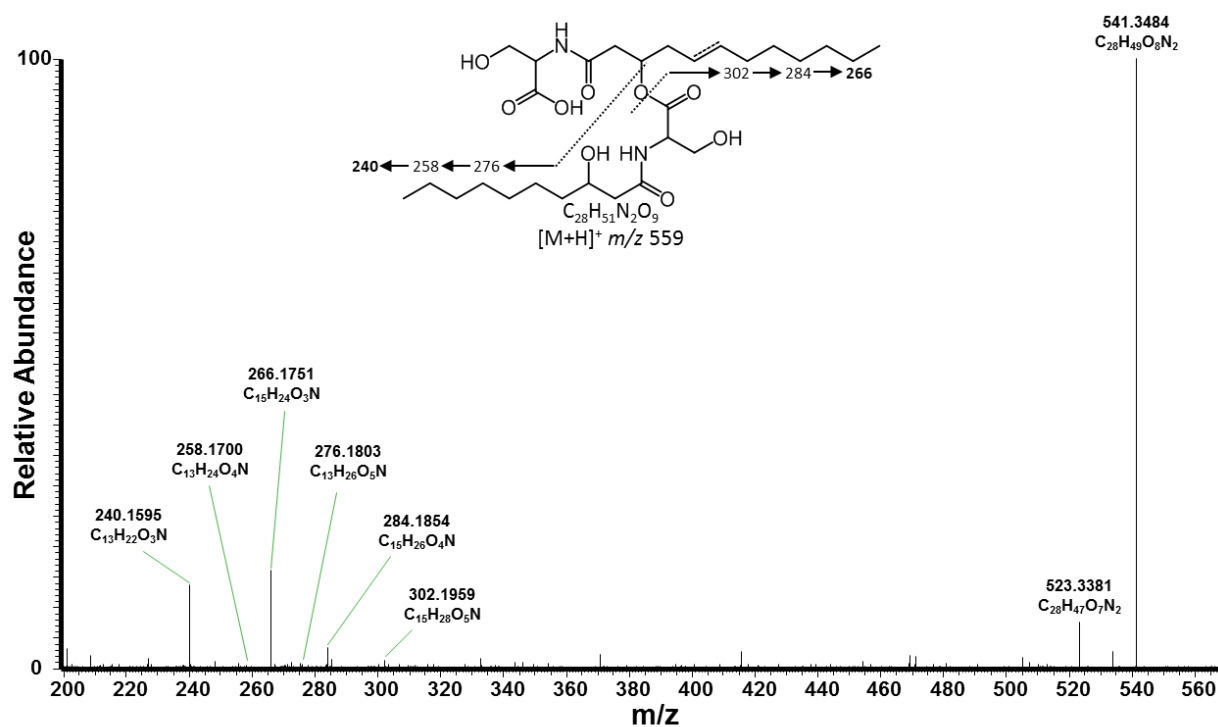


Abb. S43: HRMS²-Spektrum von Serratamolide C₁₀+C_{12:1} (geöffnete Ringstruktur, Verbindung 23 [$M+H$]⁺: m/z 559, C₂₈H₅₁N₂O₉).

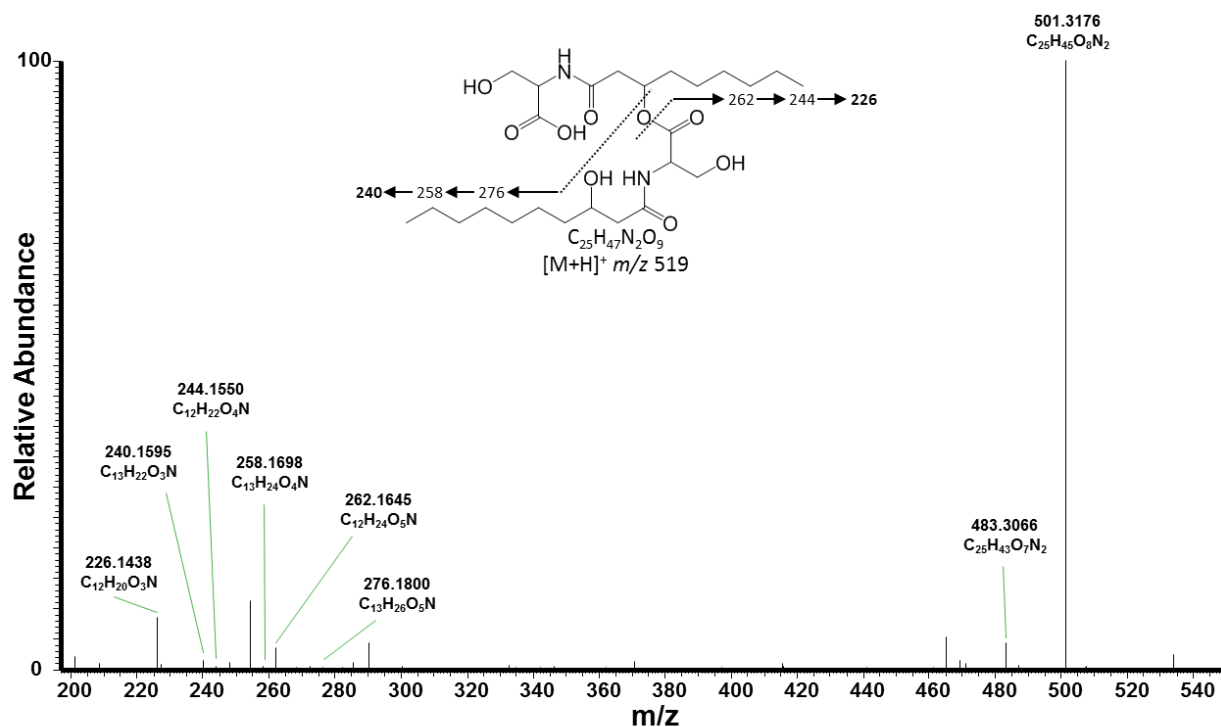


Abb. S44: HRMS²-Spektrum von Serratamolide C₉+C₁₀ (geöffnete Ringstruktur, Verbindung 24 [M+H]⁺: m/z 519, C₂₅H₄₇N₂O₉).

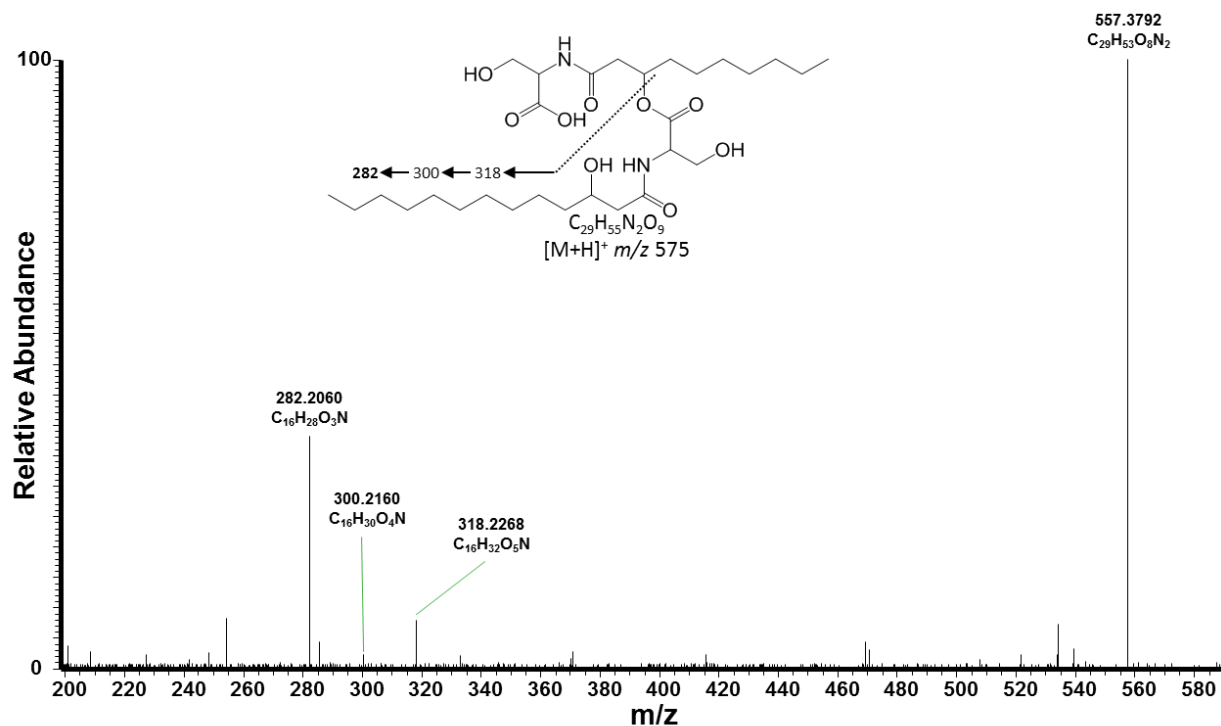


Abb. S45: HRMS²-Spektrum von Serratamolide C₁₀+C₁₃ (geöffnete Ringstruktur, Verbindung 25 [M+H]⁺: m/z 575, C₂₉H₅₅N₂O₉).

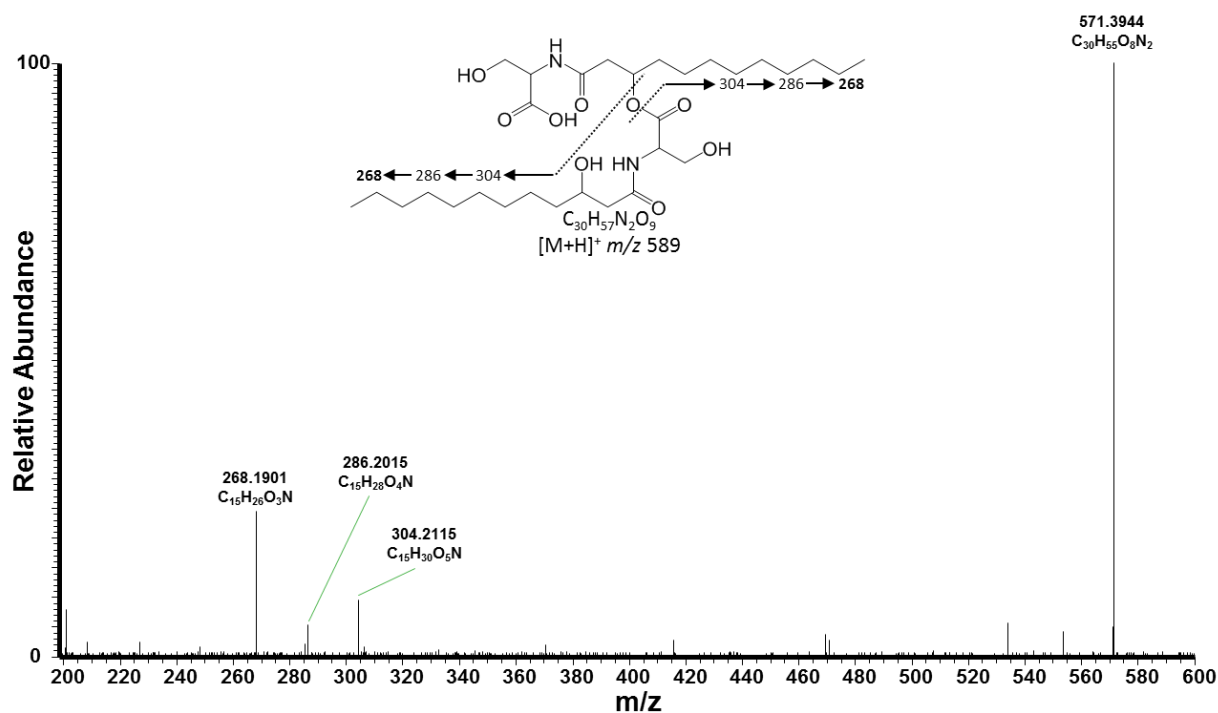


Abb. S46: HRMS²-Spektrum von Serratamolide C₁₂+C₁₂ (geöffnete Ringstruktur, Verbindung 26 [$M+H$]⁺: m/z 589, C₃₀H₅₇N₂O₉).

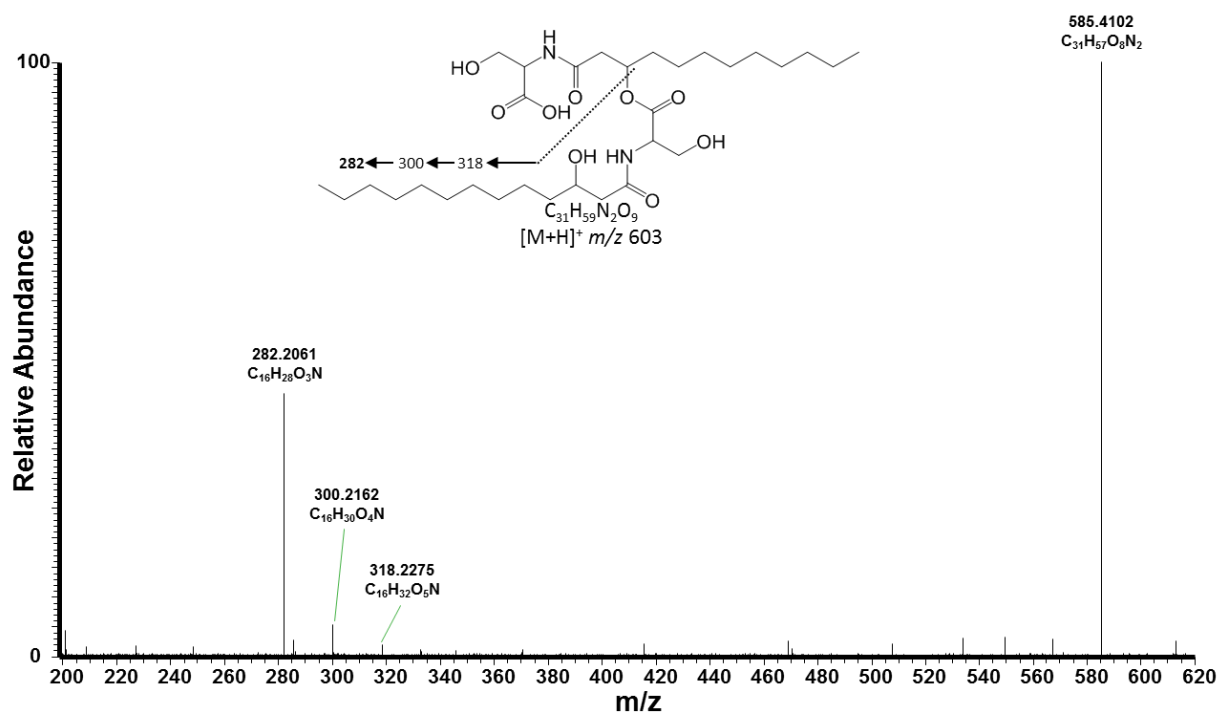


Abb. S47: HRMS²-Spektrum von Serratamolide C₁₂+C₁₃ (geöffnete Ringstruktur, Verbindung 27 [$M+H$]⁺: m/z 603, C₃₁H₅₉N₂O₉).

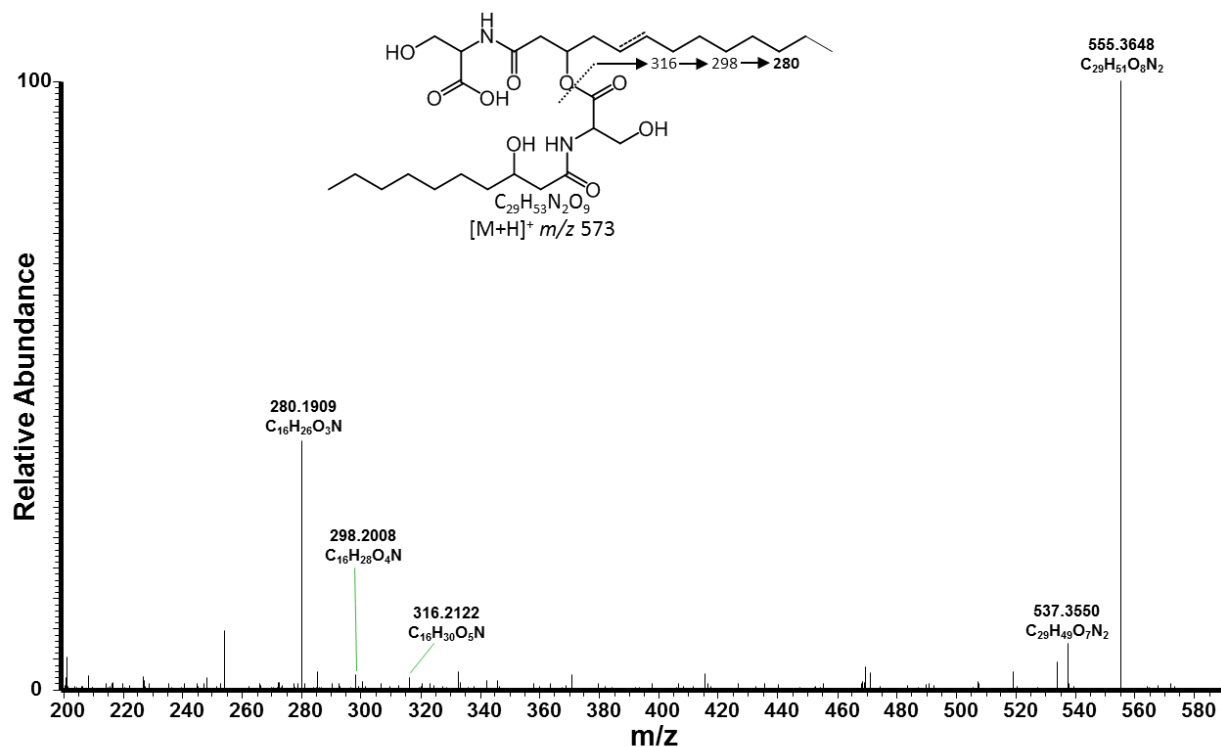


Abb. S48: HRMS²-Spektrum von Serratamolide C₁₀+C_{13:1} (geöffnete Ringstruktur, Verbindung **28** [M+H]⁺: m/z 573, C₂₉H₅₃N₂O₉).

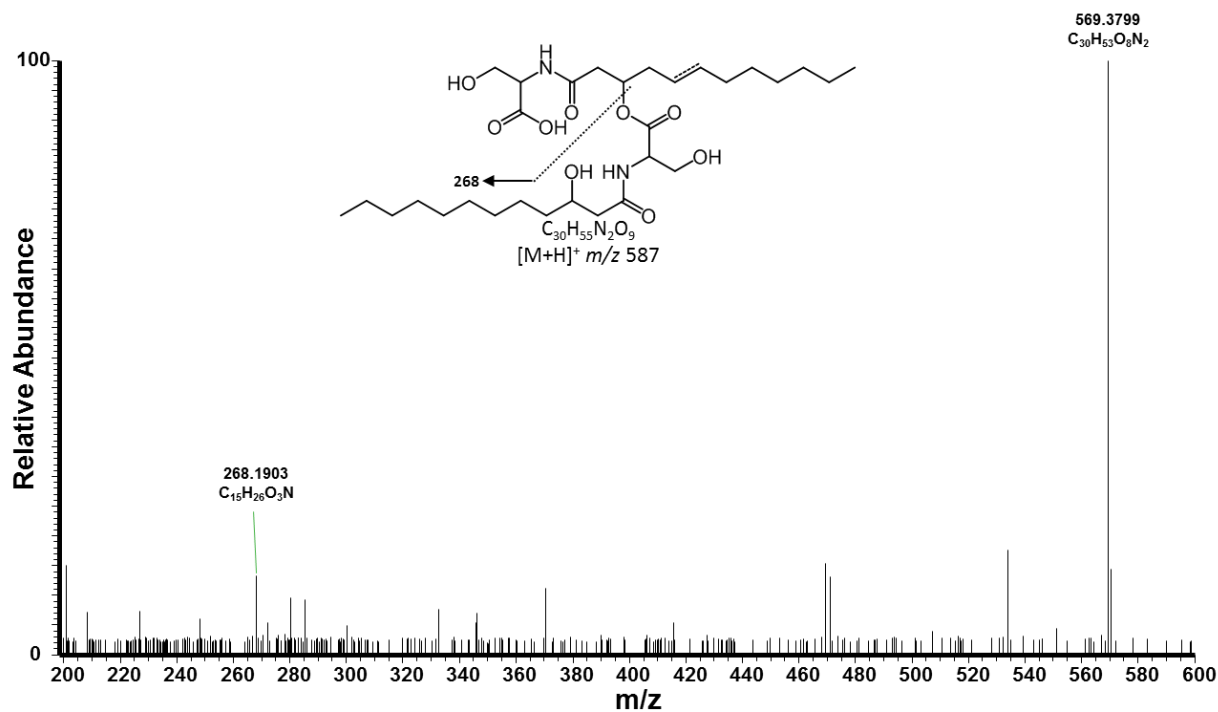


Abb. S49: HRMS²-Spektrum von Serratamolide C₁₂+C_{12:1} (geöffnete Ringstruktur, Verbindung **29** [M+H]⁺: m/z 587, C₃₀H₅₅N₂O₉).

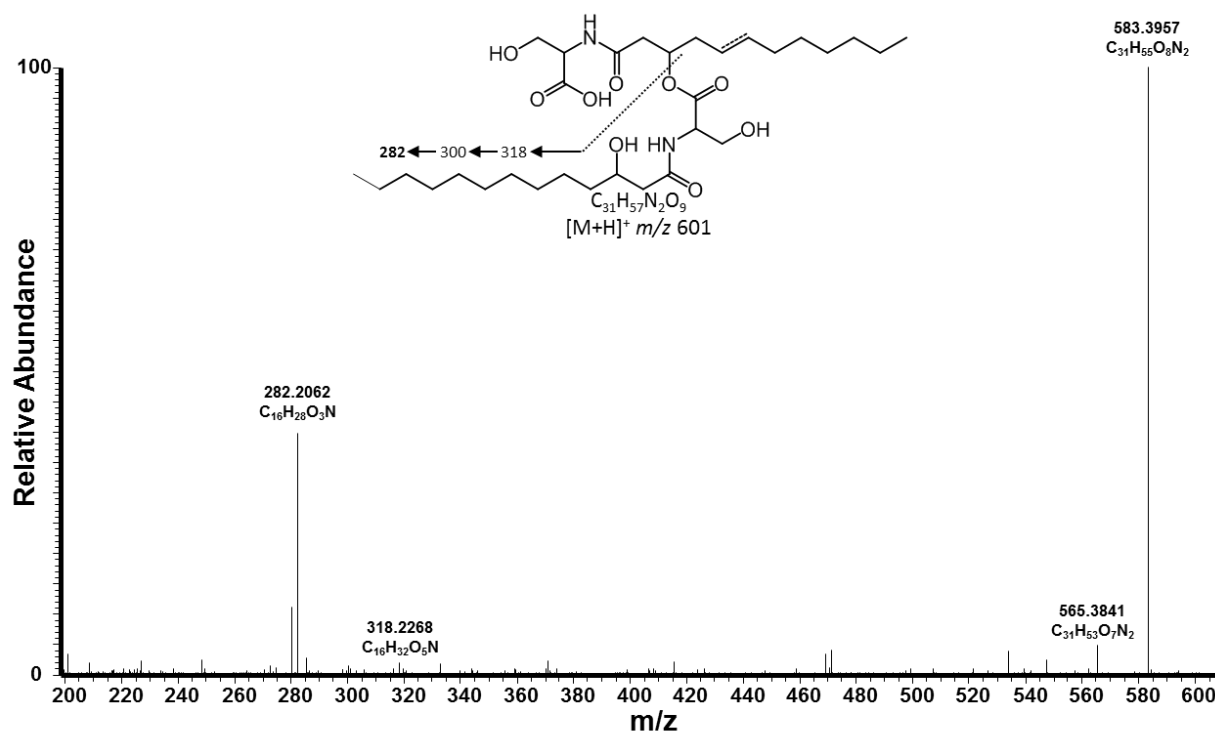


Abb. S50: HRMS²-Spektrum von Serratamolide $C_{13}+C_{12:1}$ (geöffnete Ringstruktur, Verbindung 30) $[M+H]^+$: m/z 601, $C_{31}H_{57}N_2O_9$.

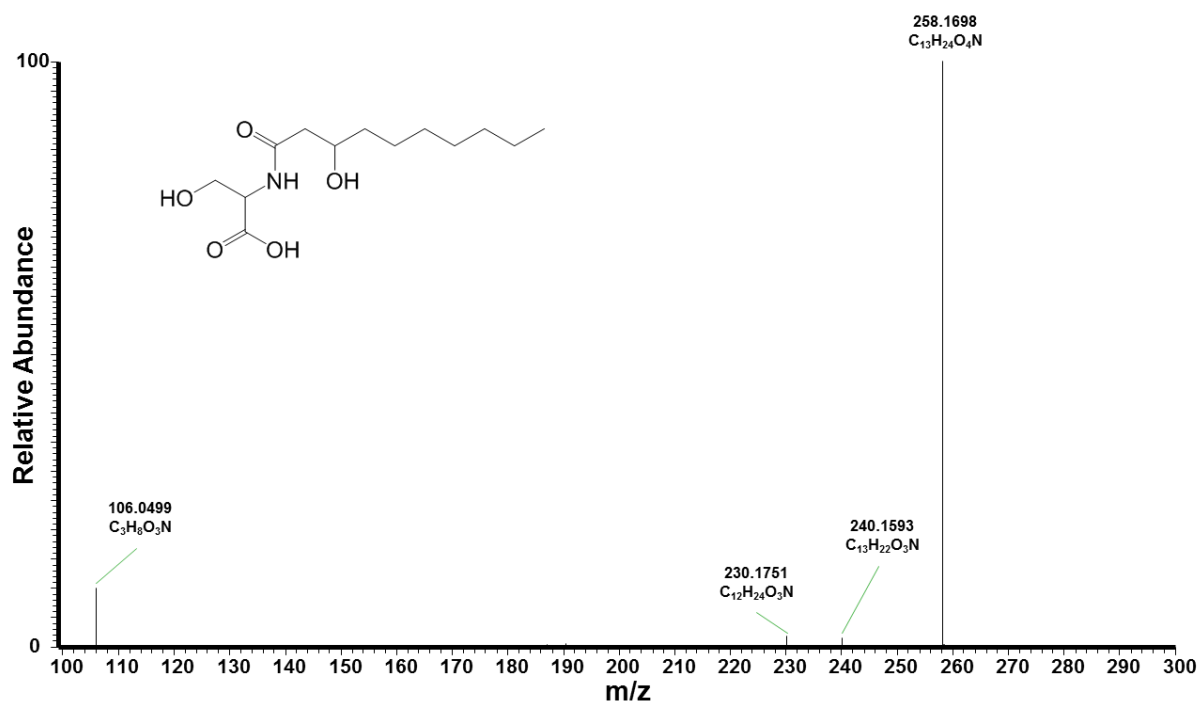


Abb. S51: HRMS²-Spektrum von Serratamsäure (N-(D-3-Hydroxydecanoyl)-L-Serin, Verbindung 31) $[M+H]^+$: m/z 276, $C_{13}H_{26}NO_5$.

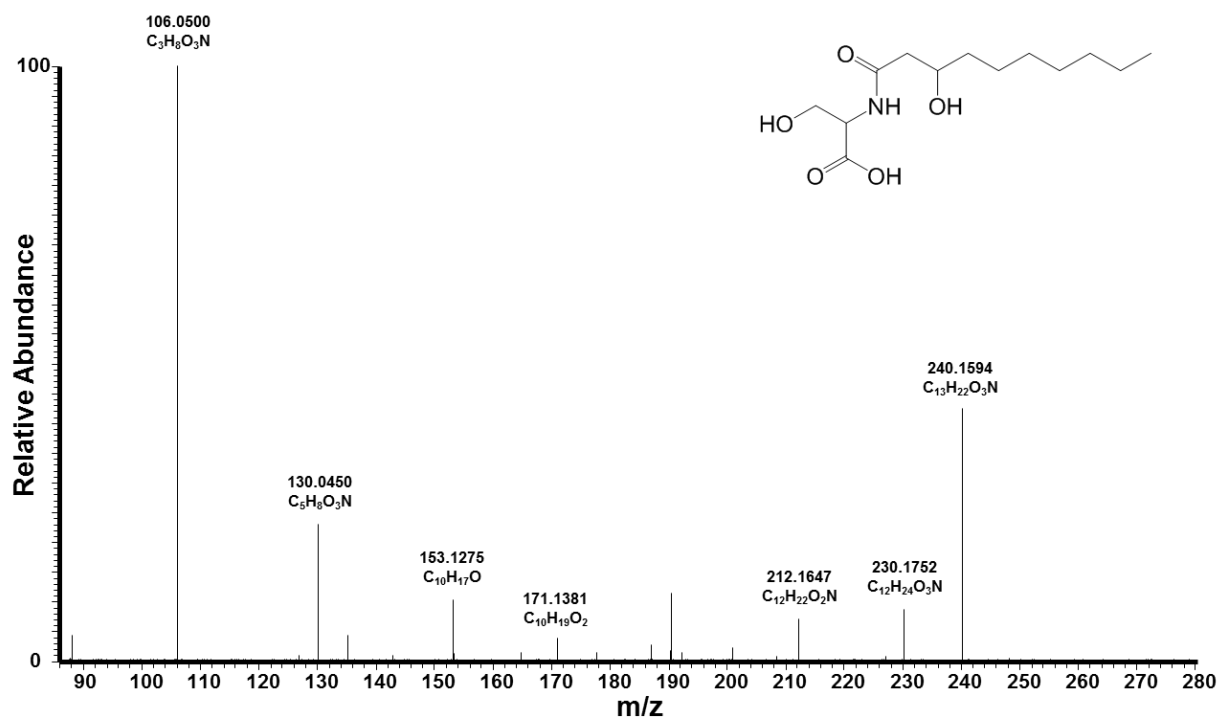


Abb. S52: HRMS³-Spektrum von Serratamsäure (N-(D-3-Hydroxydecanoyl)-L-Serin, (Verbindung 31 [M+H]⁺: m/z 276 via 258)).

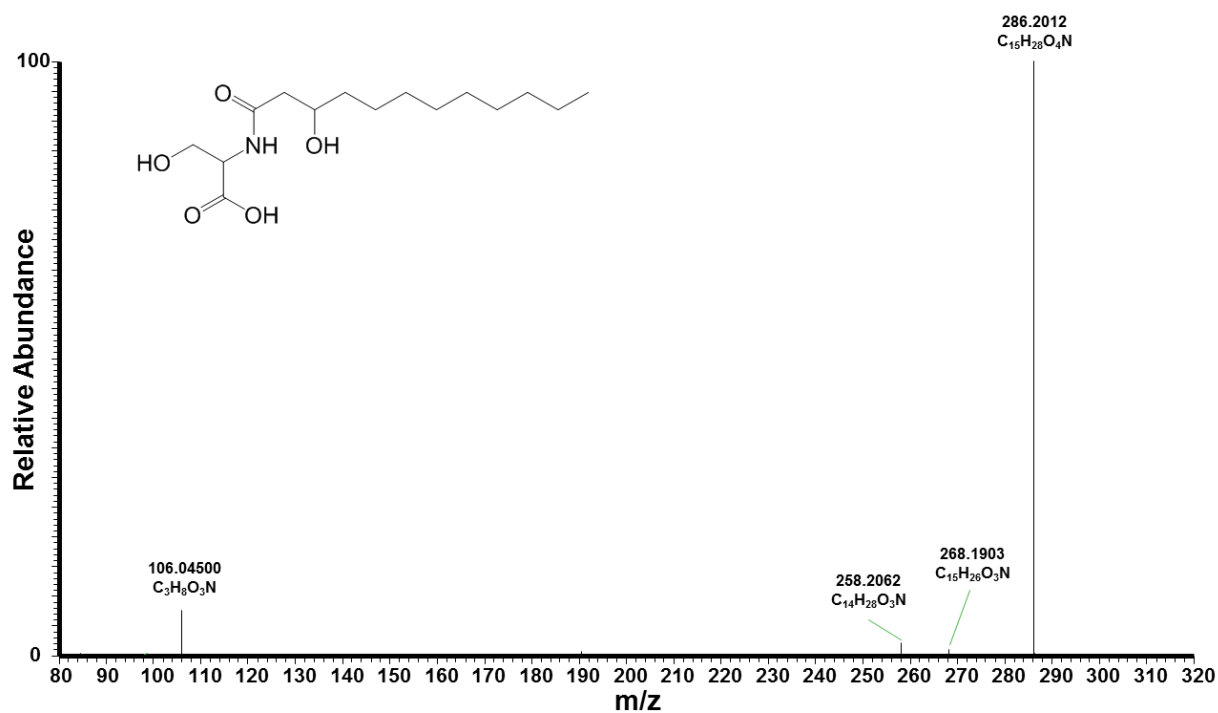


Abb. S53: HRMS²-Spektrum von Serratamsäure-Derivat (Verbindung 32 [M+H]⁺: m/z 304, C₁₅H₃₀NO₅).

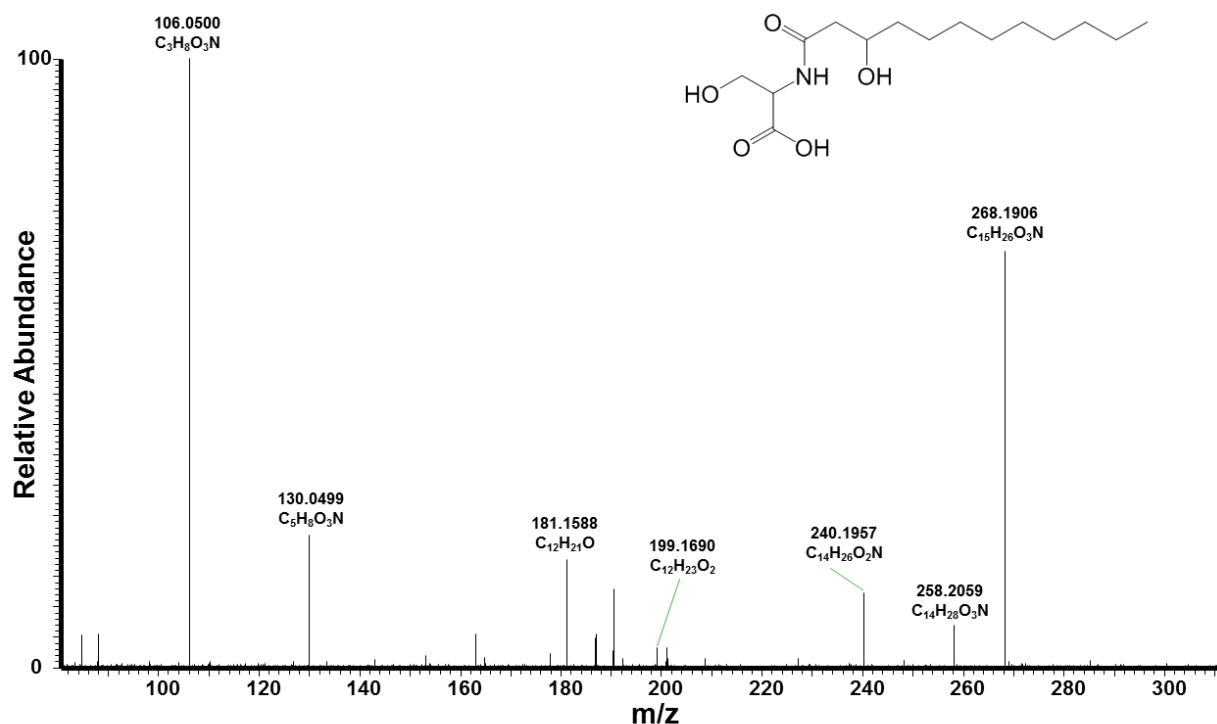


Abb. S54: HRMS³-Spektrum von Serratamsäure-Derivat (Verbindung **32** [M+H]⁺: m/z 304 via 286).

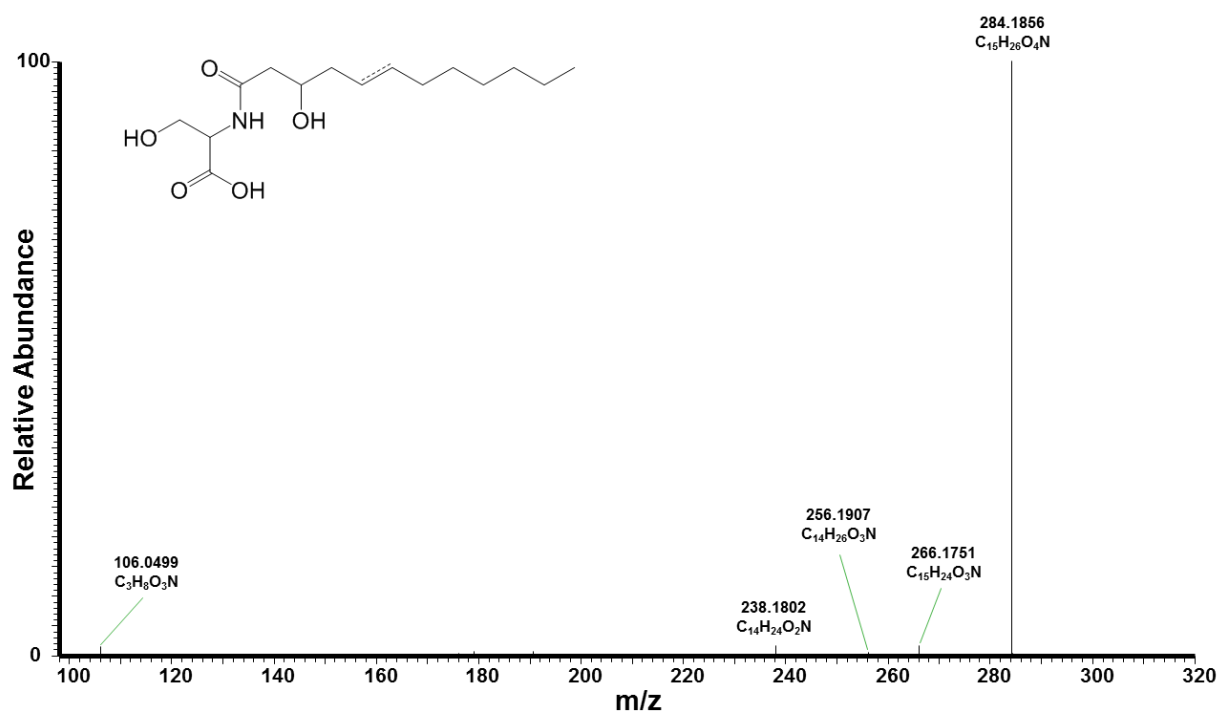


Abb. S55: HRMS²-Spektrum von Serratamsäure-Derivat mit Doppelbindung (Verbindung **33** [M+H]⁺: m/z 302, C₁₅H₂₈NO₅).

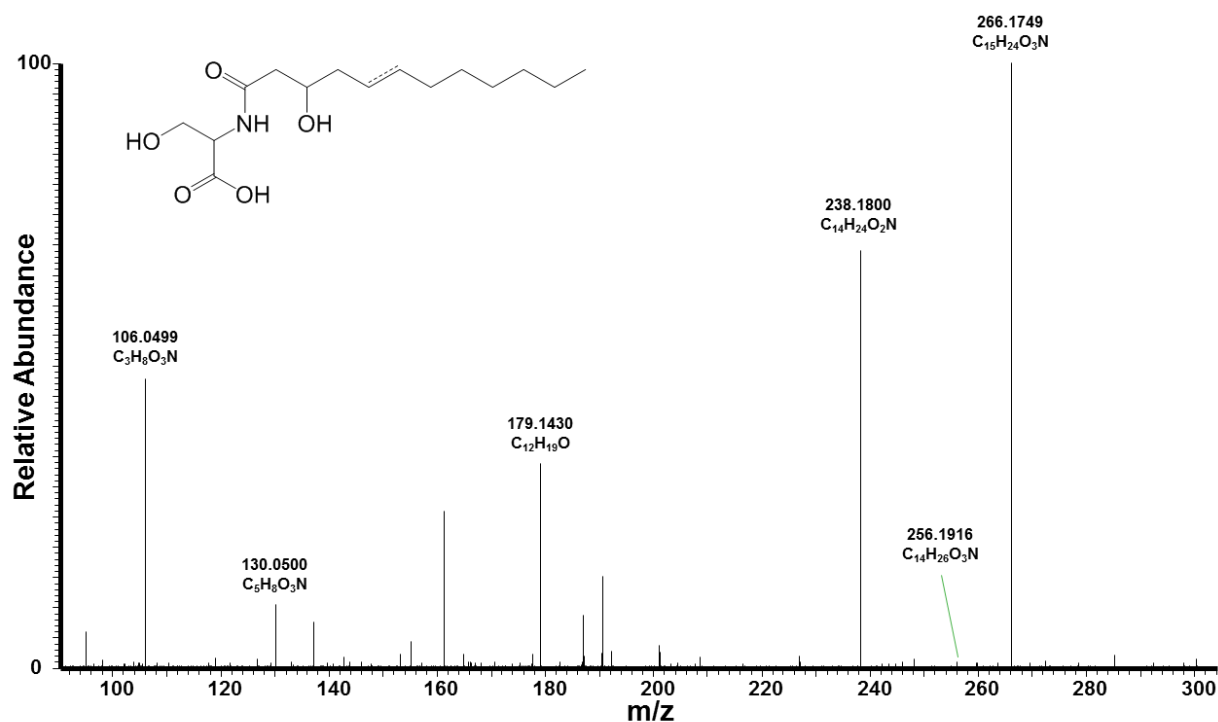


Abb. S56: HRMS³-Spektrum von Serratamsäure-Derivat mit Doppelbindung (Verbindung **33** [M+H]⁺: m/z 302 via 284).

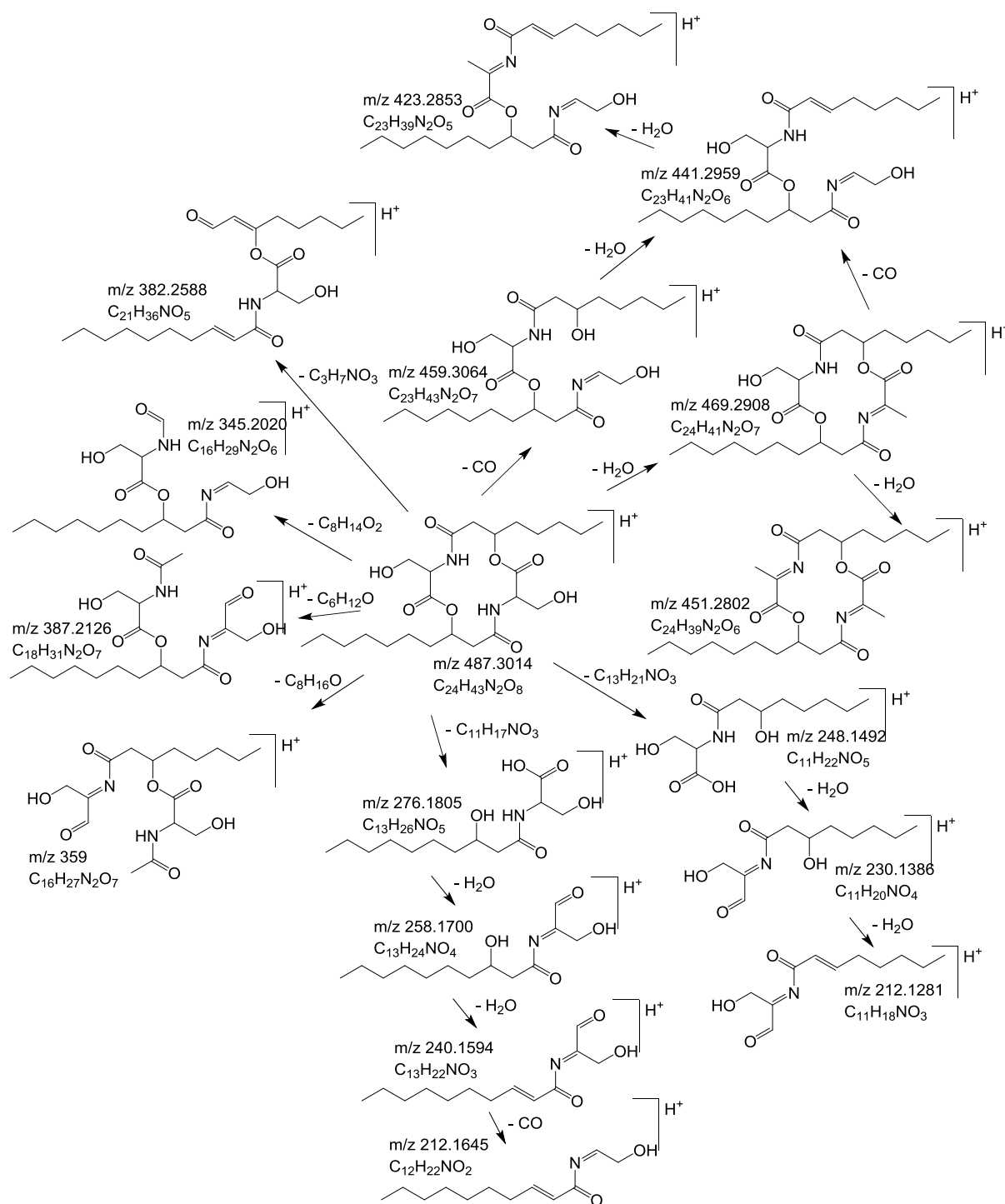


Abb. S57: Fragmentierungsweg von Serratamolide C₈+C₁₀ (Verbindung 8 [M+H]⁺: m/z 487, C₂₄H₄₃N₂O₈).

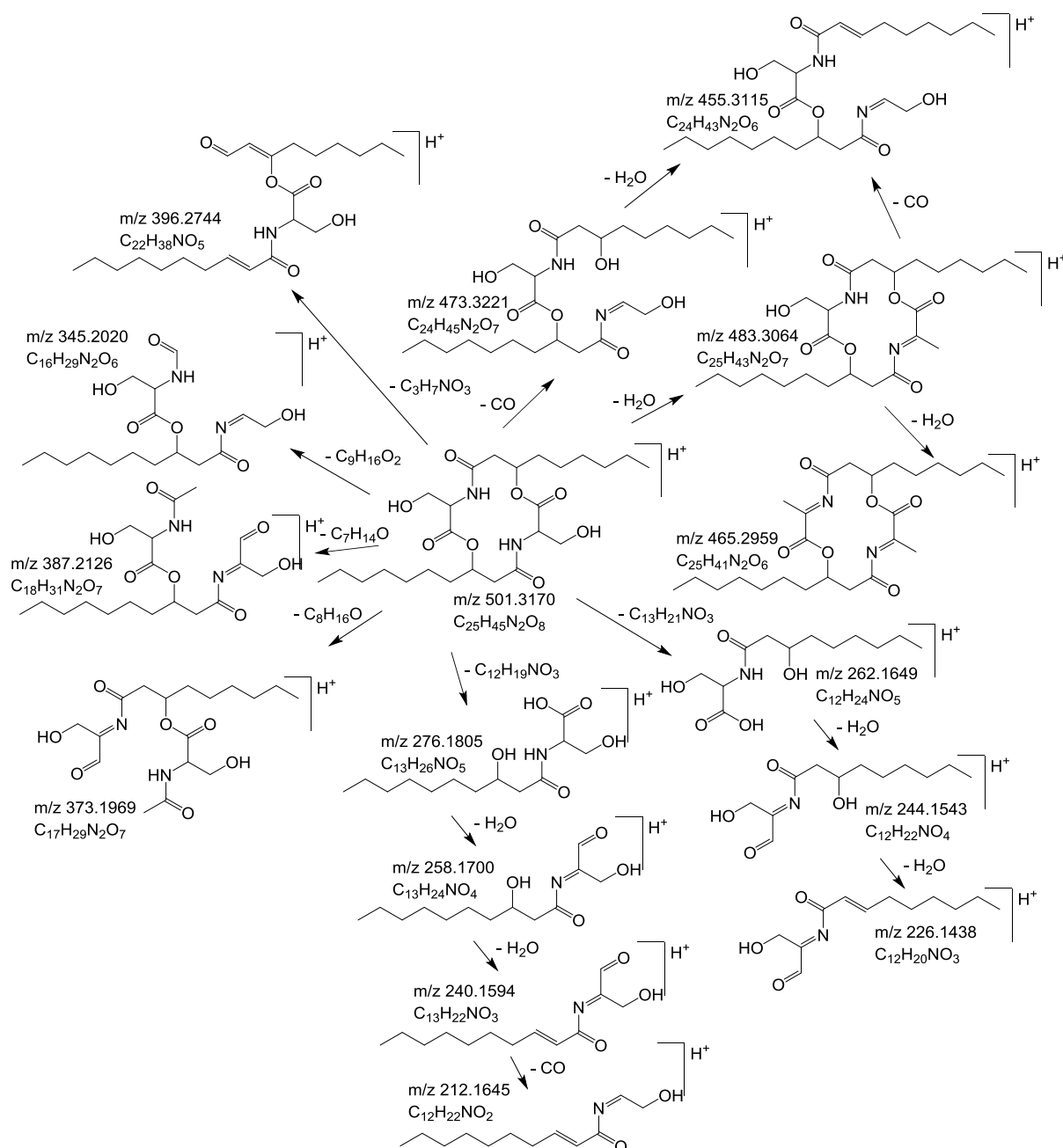


Abb. S58: Fragmentierungsweg von Serratamolide C_9+C_{10} (Verbindung **9** $[M+H]^+$: m/z 501, $C_{25}H_{45}N_2O_8$).

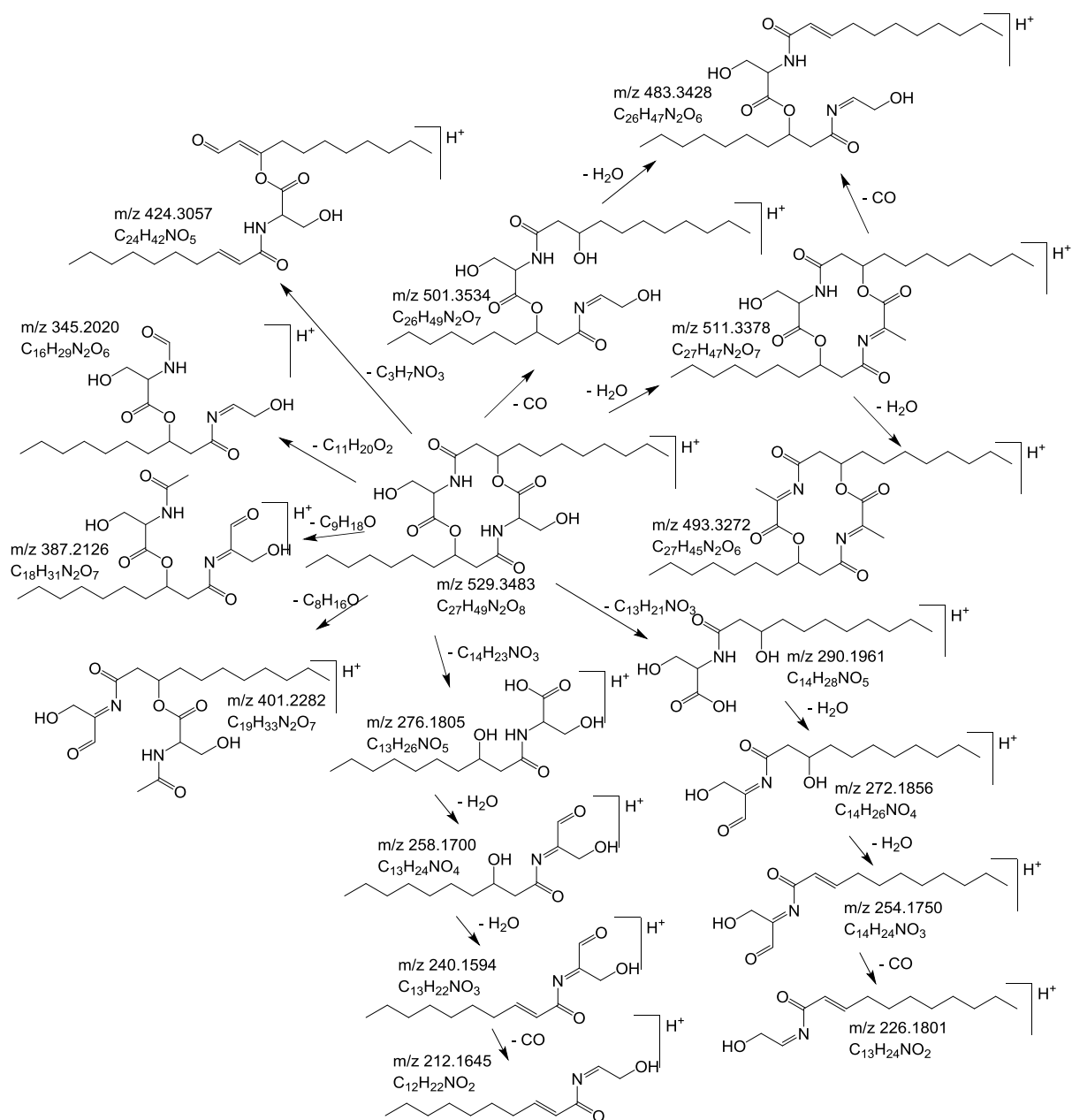


Abb. S59: Fragmentierungsweg von Serratamolide $C_{10}+C_{11}$ (Verbindung **11** $[M+H]^+$: m/z 529, $C_{27}H_{49}N_2O_8$).

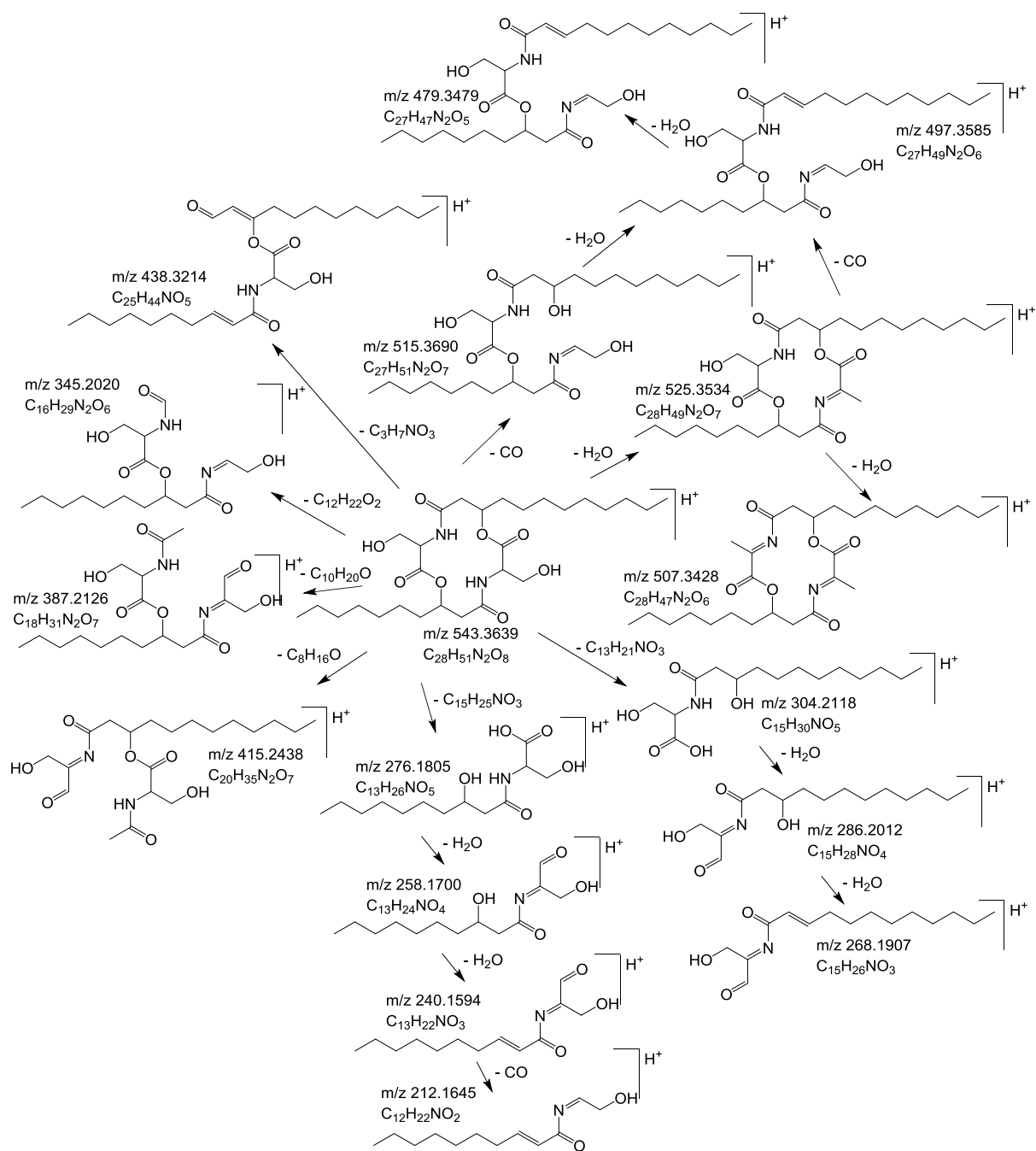


Abb. S60: Fragmentierungsweg von Serratamolide C₁₀+C₁₂ (Verbindung **12** [M+H]⁺: m/z 543, C₂₈H₅₁N₂O₈).

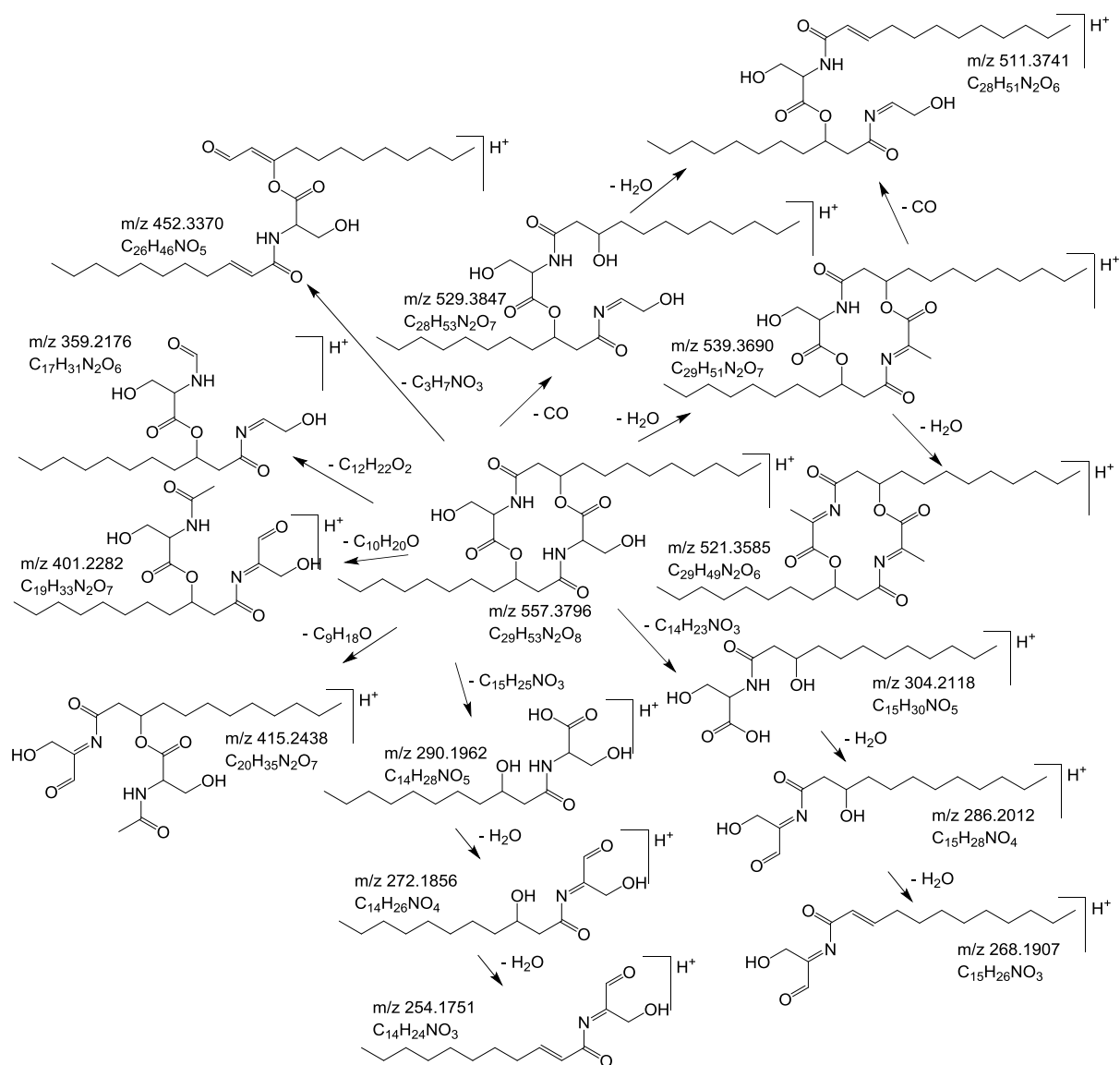


Abb. S61: Fragmentierungsweg von Serratamolide $C_{11}+C_{12}$ (Verbindung 13 $[M+H]^+$: m/z 557, $C_{29}H_{53}N_2O_8$).

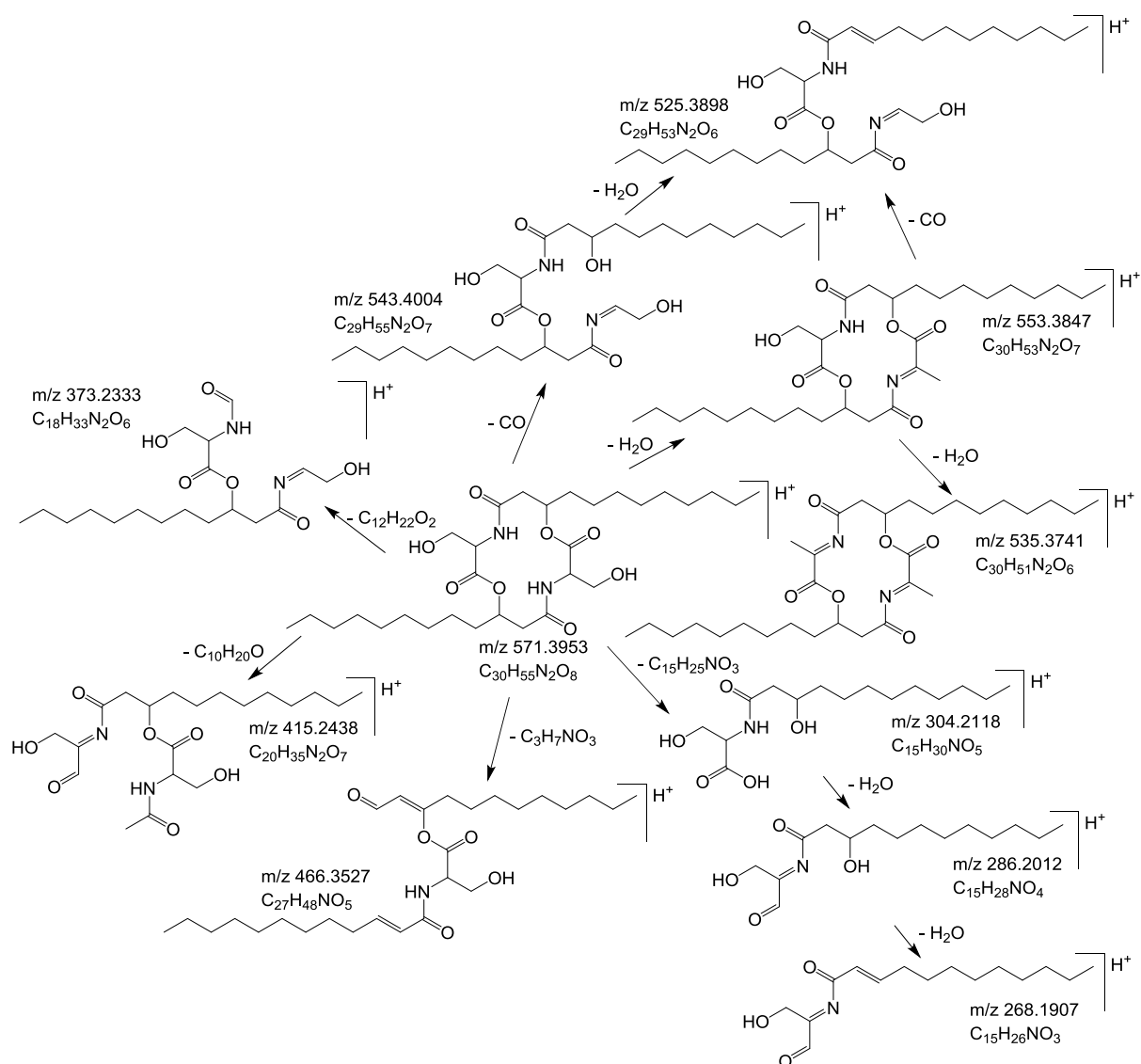


Abb. S62: Fragmentierungsweg von Serratamolide $C_{12}+C_{12}$ (Verbindung **14**) $[M+H]^+$: m/z 571, $C_{30}H_{55}N_2O_8$.

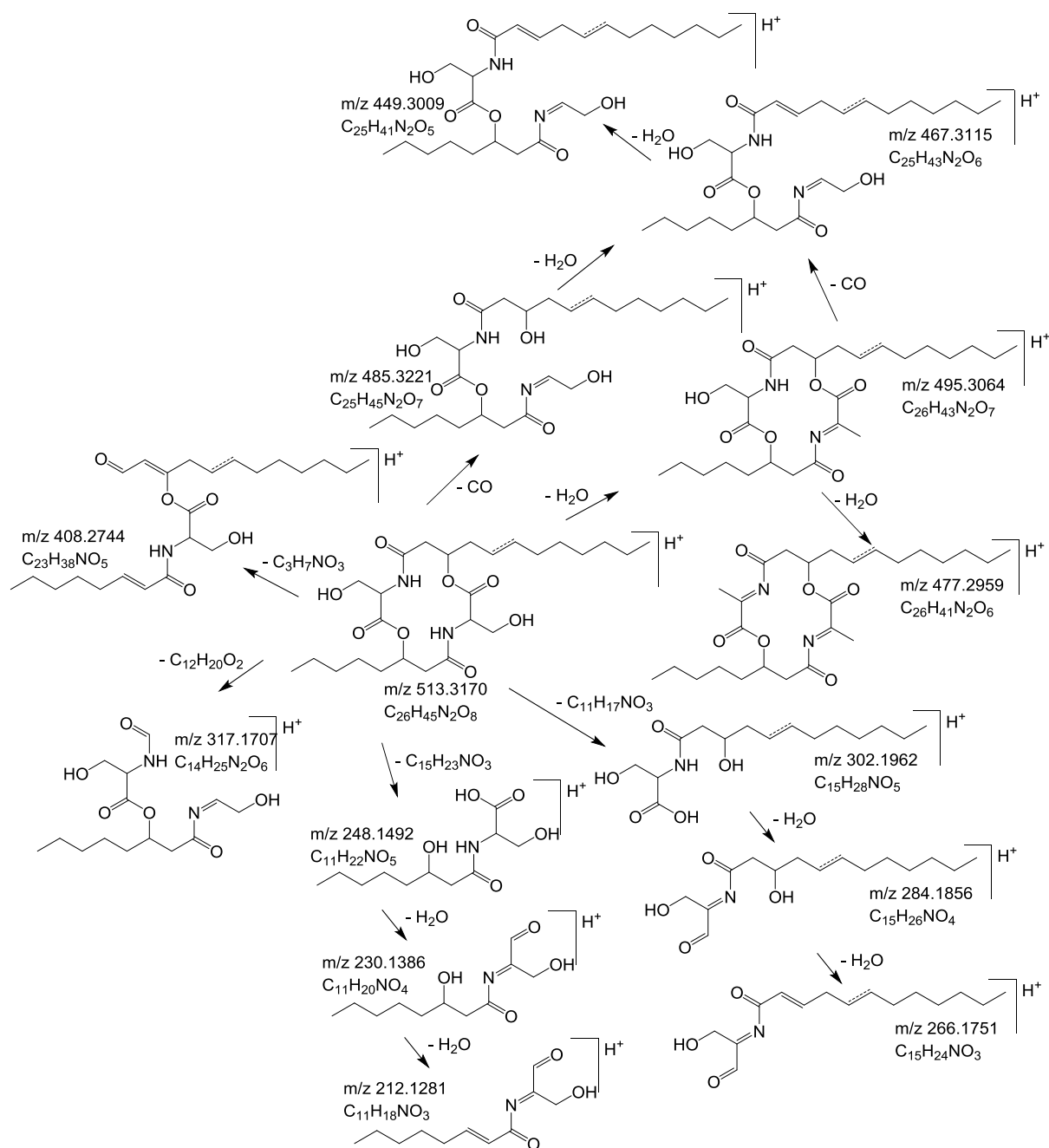


Abb. S63: Fragmentierungsweg von Serratamolide $C_8+C_{12:1}$ (Verbindung **15** $[M+H]^+$: m/z 513, $C_{26}H_{45}N_2O_8$).

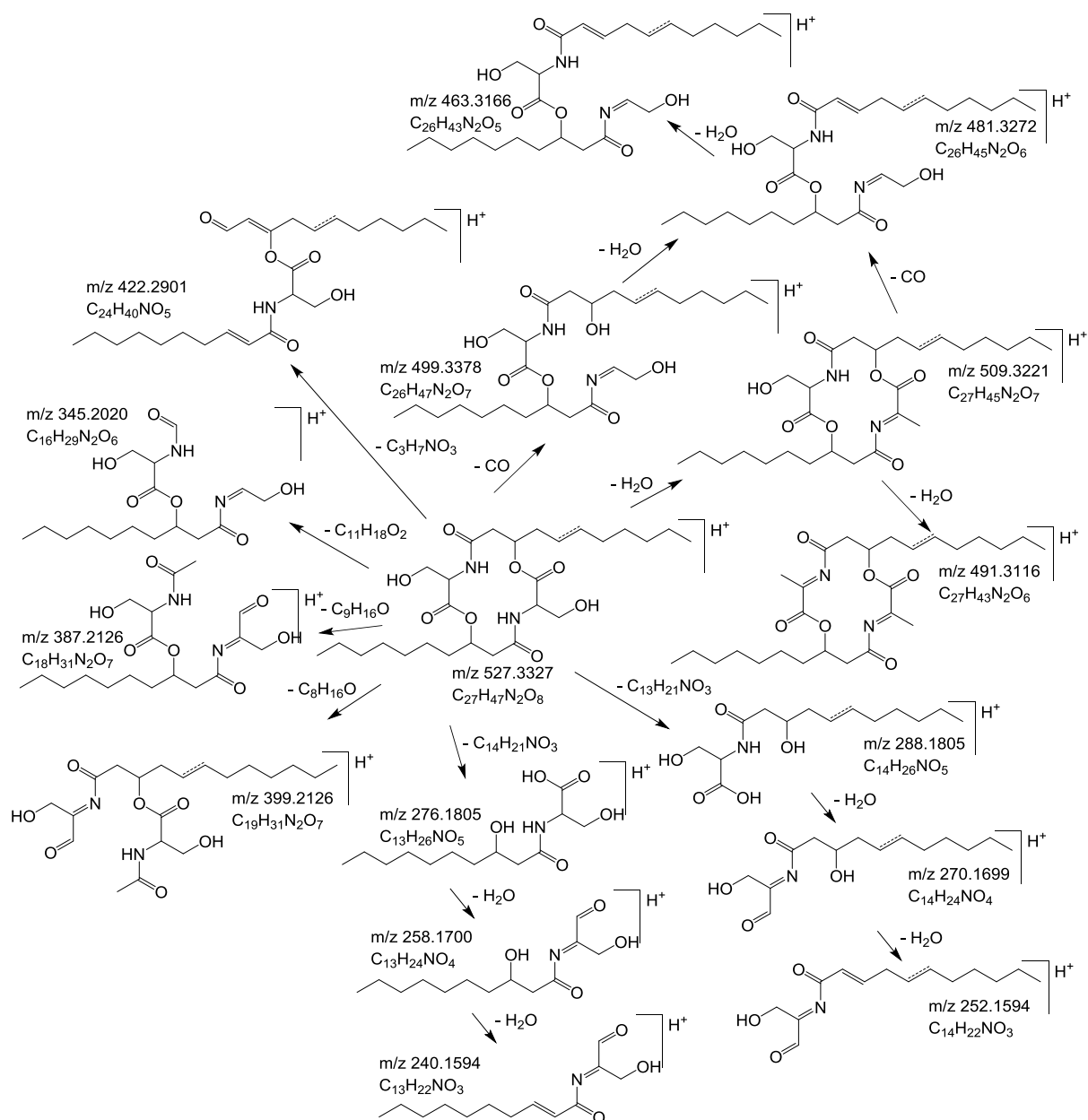


Abb. S64: Fragmentierungsweg von Serratamolide C₁₀+C_{11:1} (Verbindung 16 [M+H]⁺: m/z 527, C₂₇H₄₇N₂O₈).

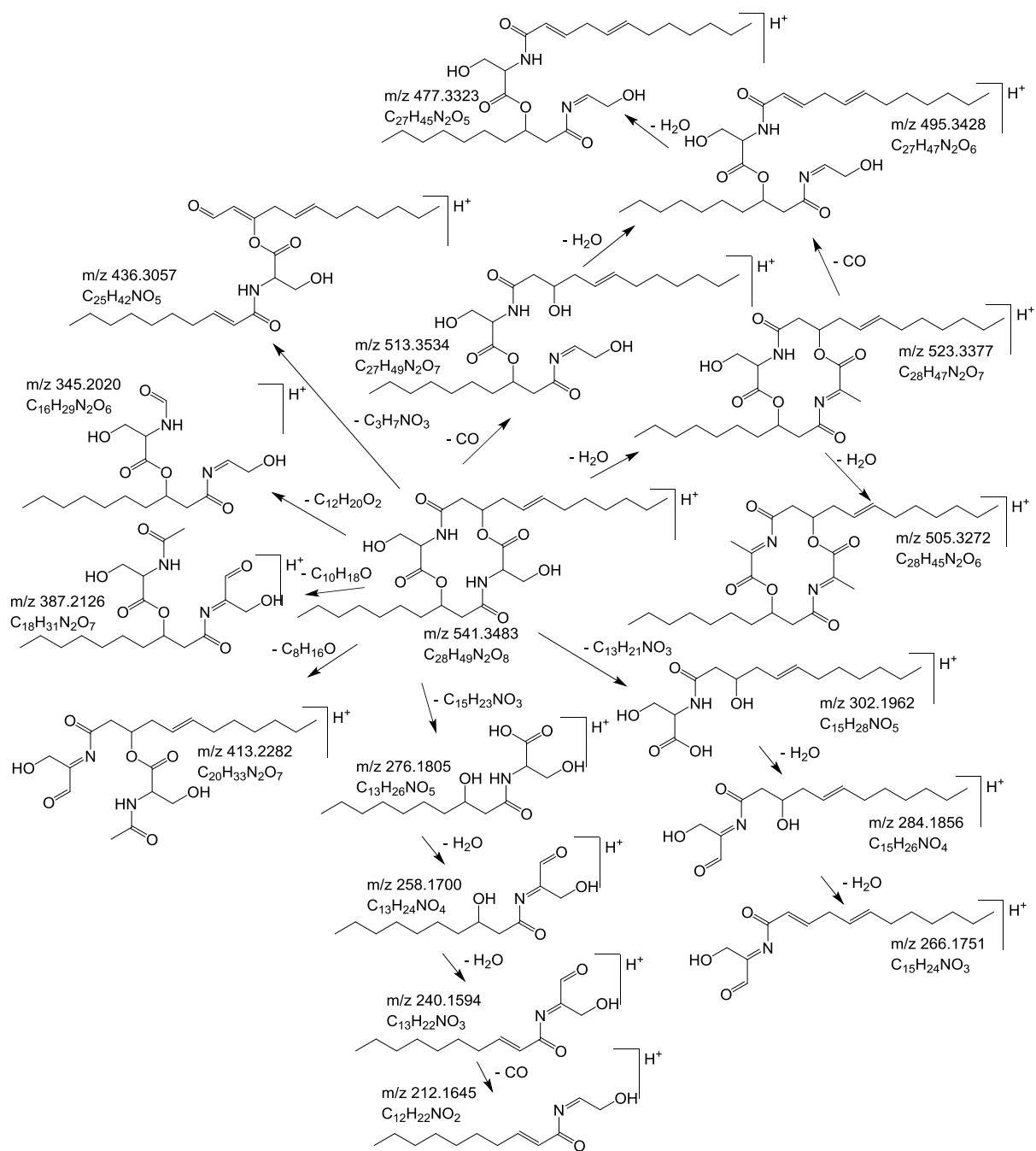


Abb. S65: Fragmentierungsweg von Serratamolide $C_{10}+C_{12:1}$ (Verbindung 17 $[M+H]^+$: $m/z\ 541$, $C_{28}H_{49}N_2O_8$).

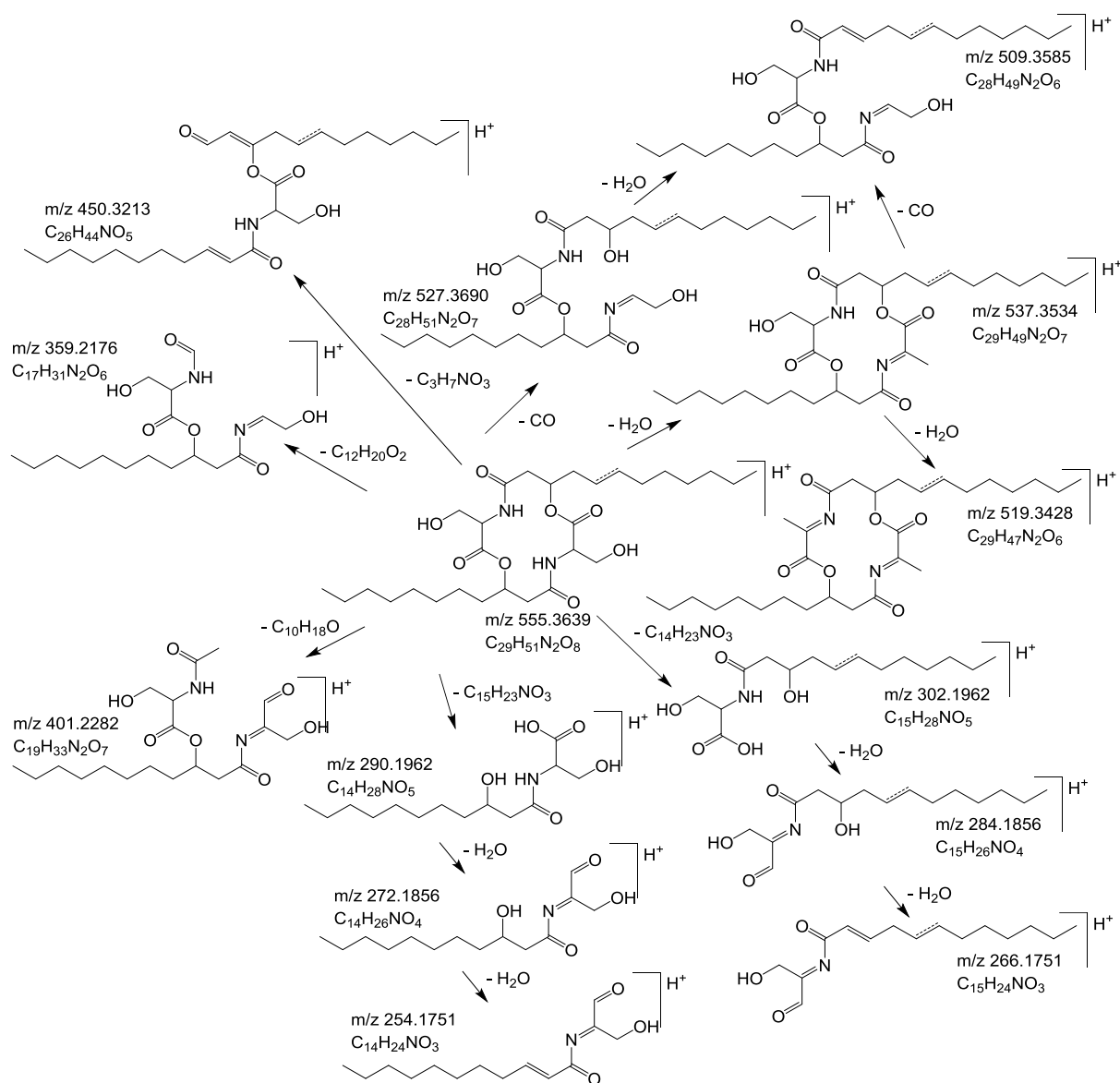


Abb. S66: Fragmentierungsweg von Serratamolide $C_{11}+C_{12:1}$ (Verbindung 18 $[M+H]^+$ m/z 555, $C_{29}H_{51}N_2O_8$).

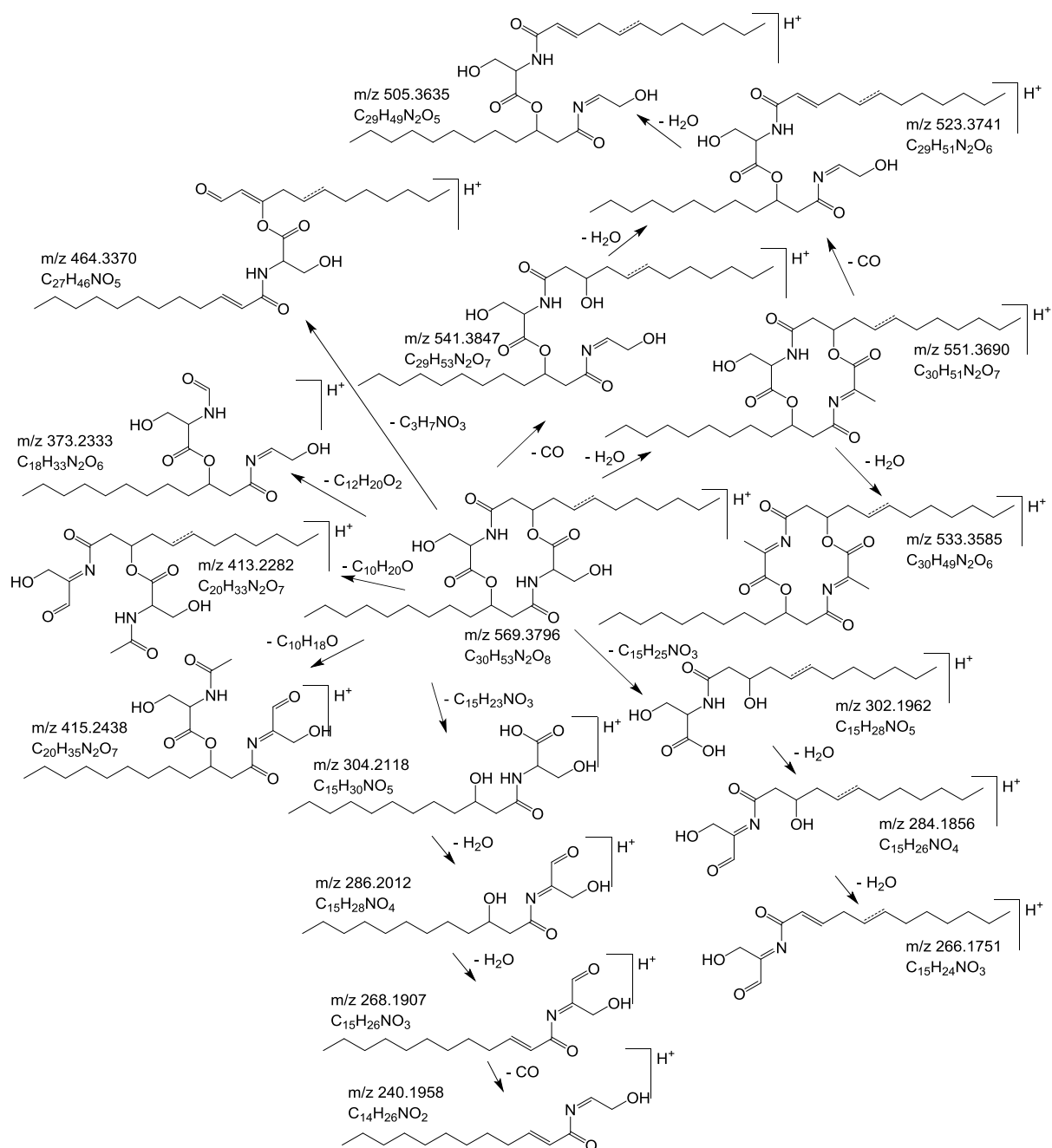


Abb. S67: Fragmentierungsweg von Serratamolide $C_{12}+C_{12:1}$ (Verbindung 19 $[M+H]^+$: m/z 569, $C_{30}H_{53}N_2O_8$).

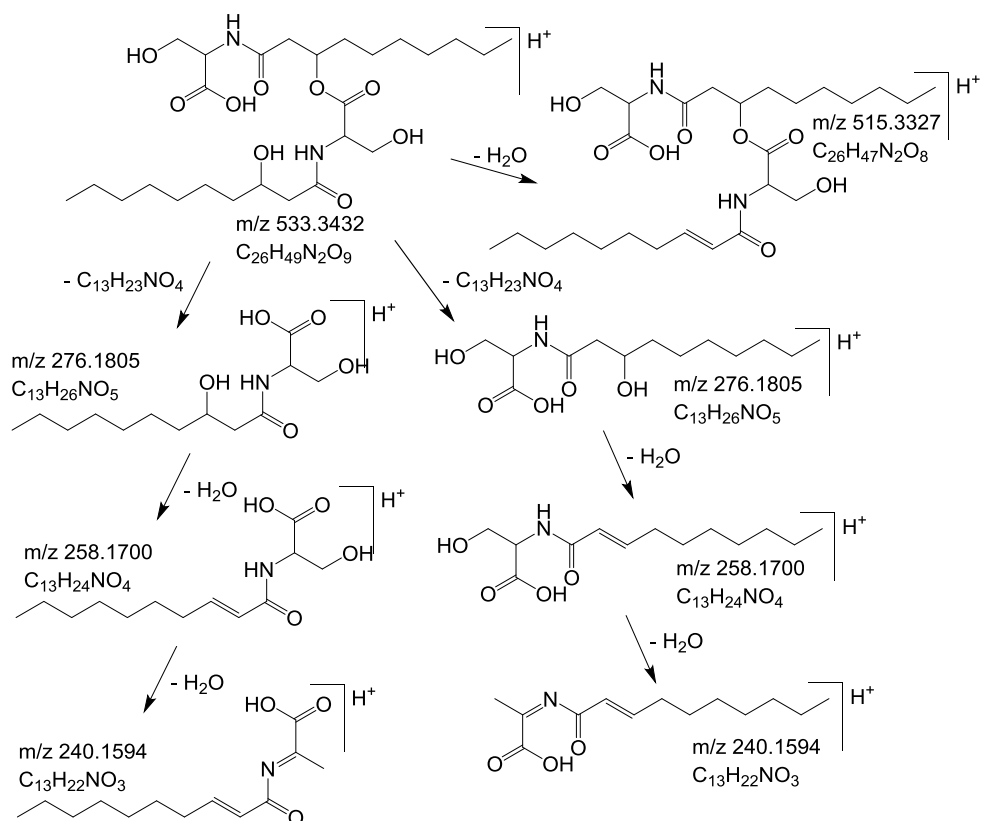


Abb. S68: Fragmentierungsweg von Serratamolide $C_{10}+C_{10}$ (geöffnete Ringstruktur, Verbindung 20) $[M+H]^+$: m/z 533, $C_{26}H_{49}N_2O_9$).

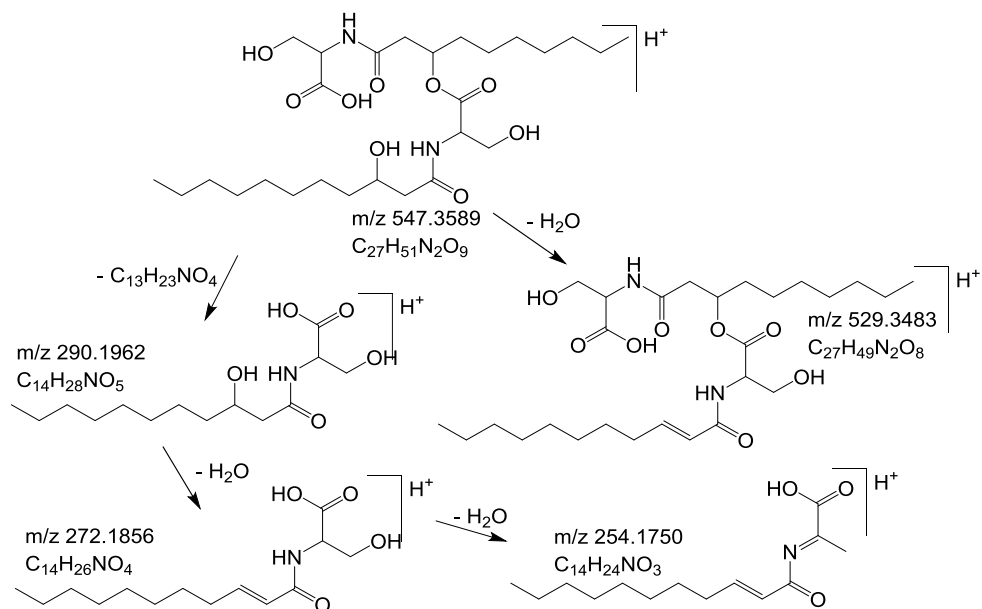


Abb. S69: Fragmentierungsweg von Serratamolide $C_{10}+C_{11}$ (geöffnete Ringstruktur, Verbindung 21) $[M+H]^+$: m/z 547, $C_{27}H_{51}N_2O_9$).

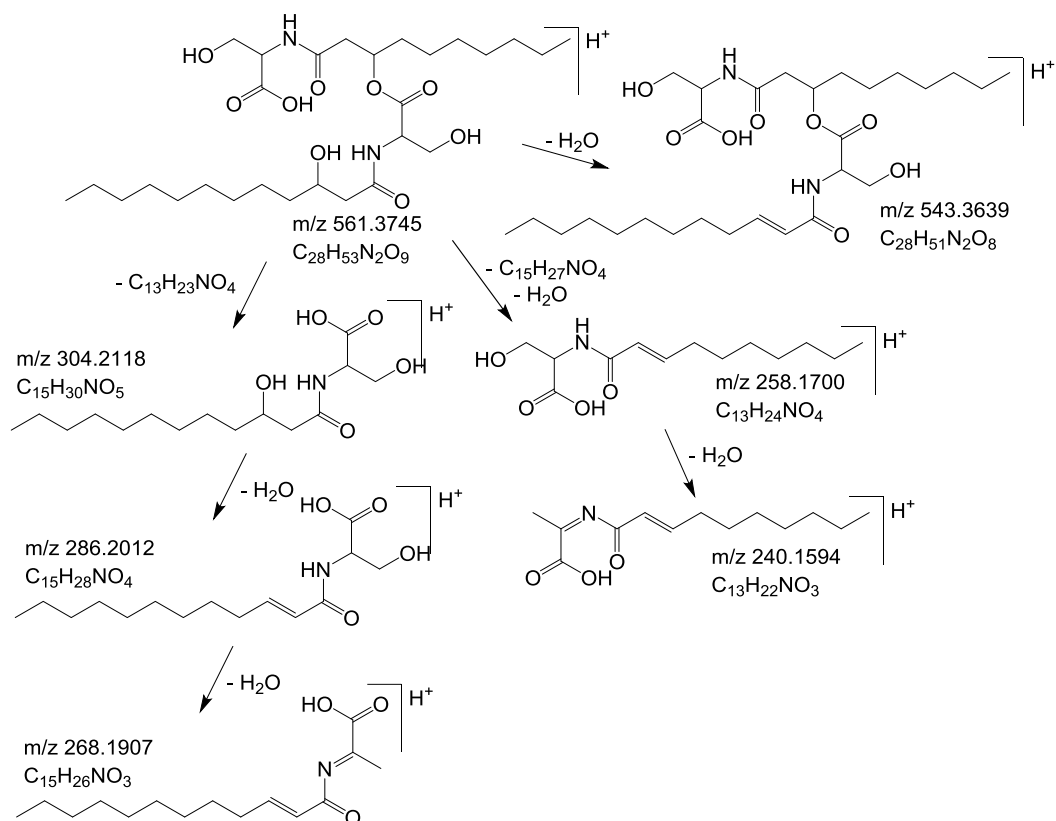


Abb. S70: Fragmentierungsweg von Serratamolide $C_{10}+C_{12}$ (geöffnete Ringstruktur, Verbindung 22) $[M+H]^+$: m/z 561, $C_{28}H_{53}N_2O_9$).

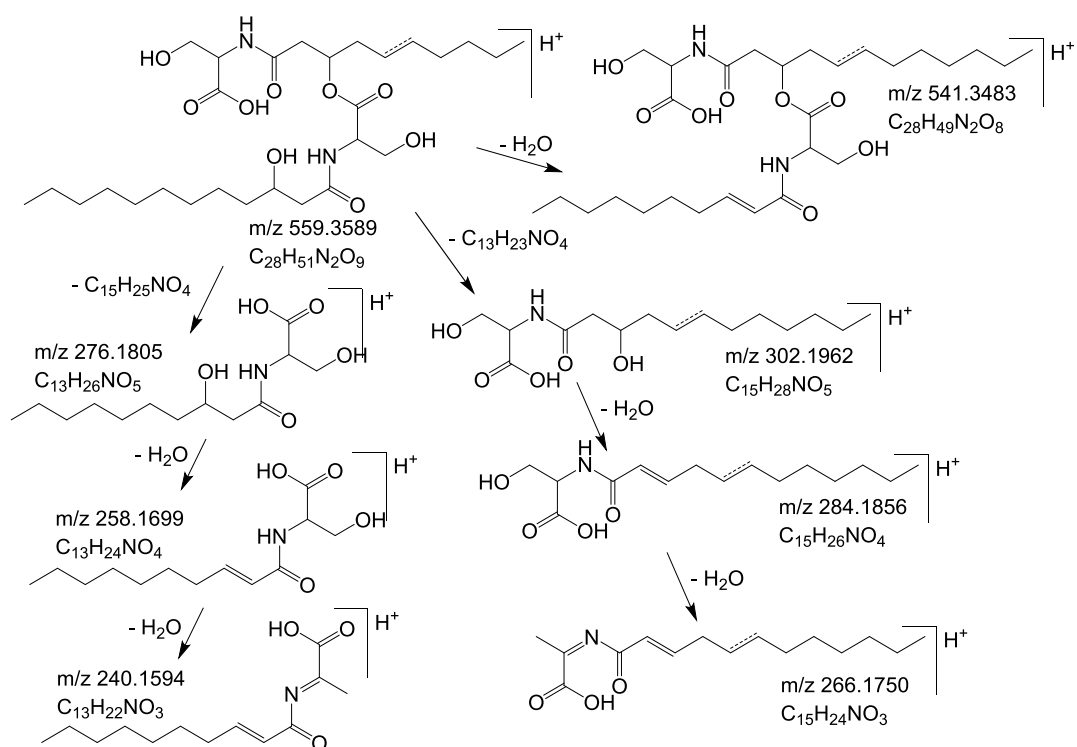


Abb. S71: Fragmentierungsweg von Serratamolide $C_{10}+C_{12:1}$ (geöffnete Ringstruktur, Verbindung 23) $[M+H]^+$: m/z 559, $C_{28}H_{51}N_2O_9$).

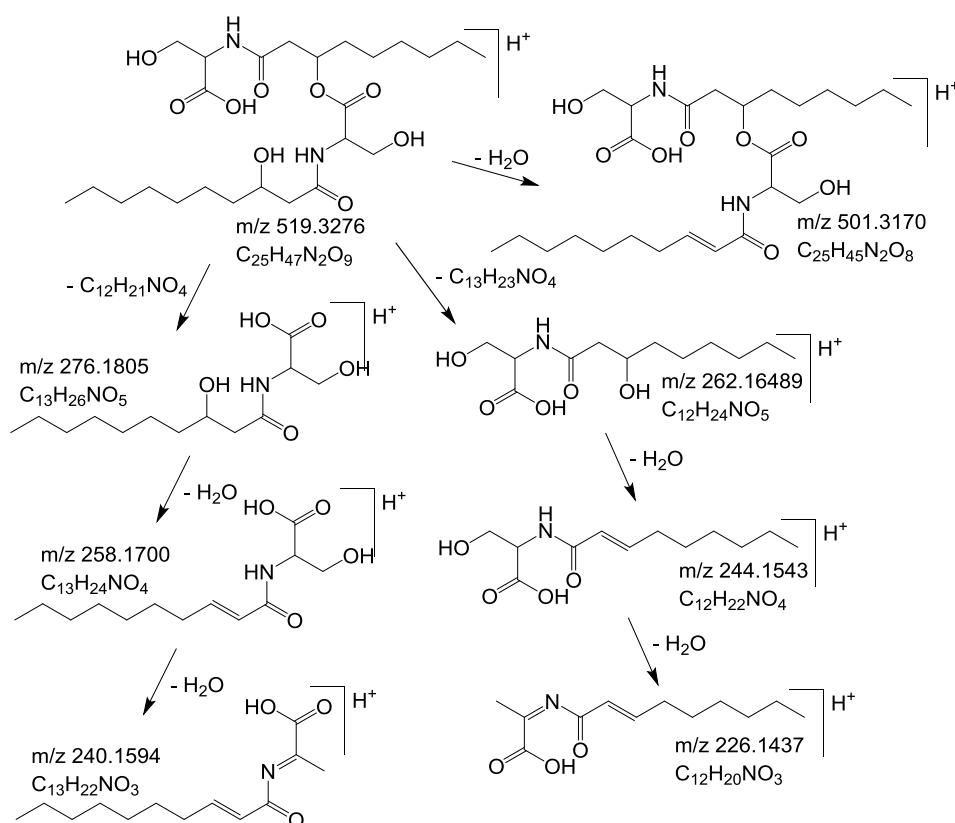


Abb. S72: Fragmentierungsweg von Serratamolide C₉+C₁₀ (geöffnete Ringstruktur, Verbindung 24) [M+H]⁺: m/z 519, C₂₅H₄₇N₂O₉.

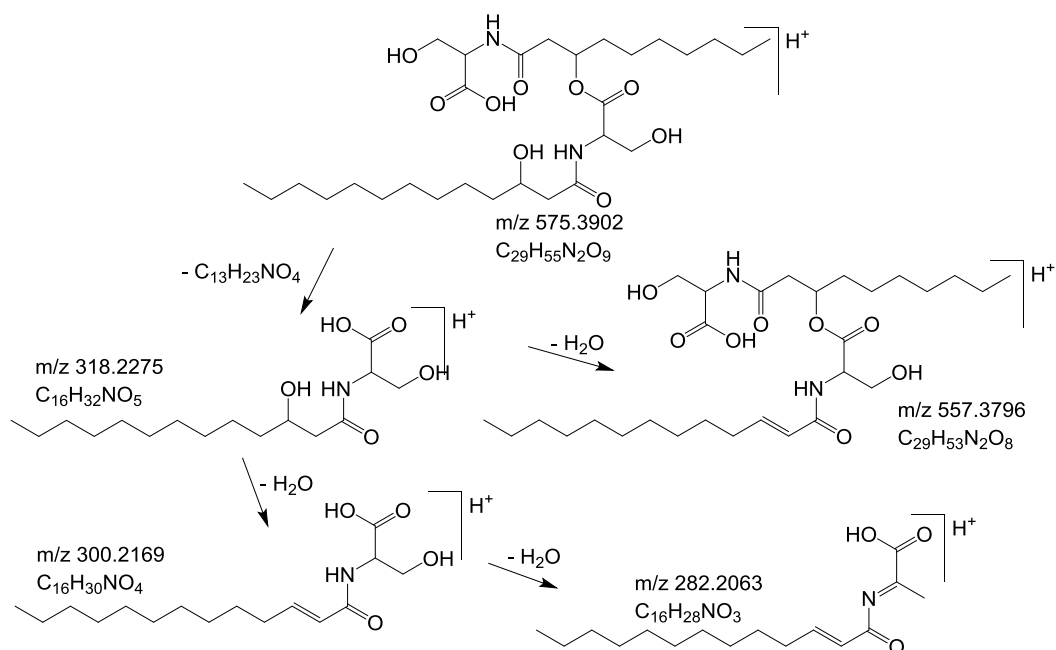


Abb. S73: Fragmentierungsweg von Serratamolide C₁₀+C₁₃ (geöffnete Ringstruktur, Verbindung 25) [M+H]⁺: m/z 575, C₂₉H₅₅N₂O₉.

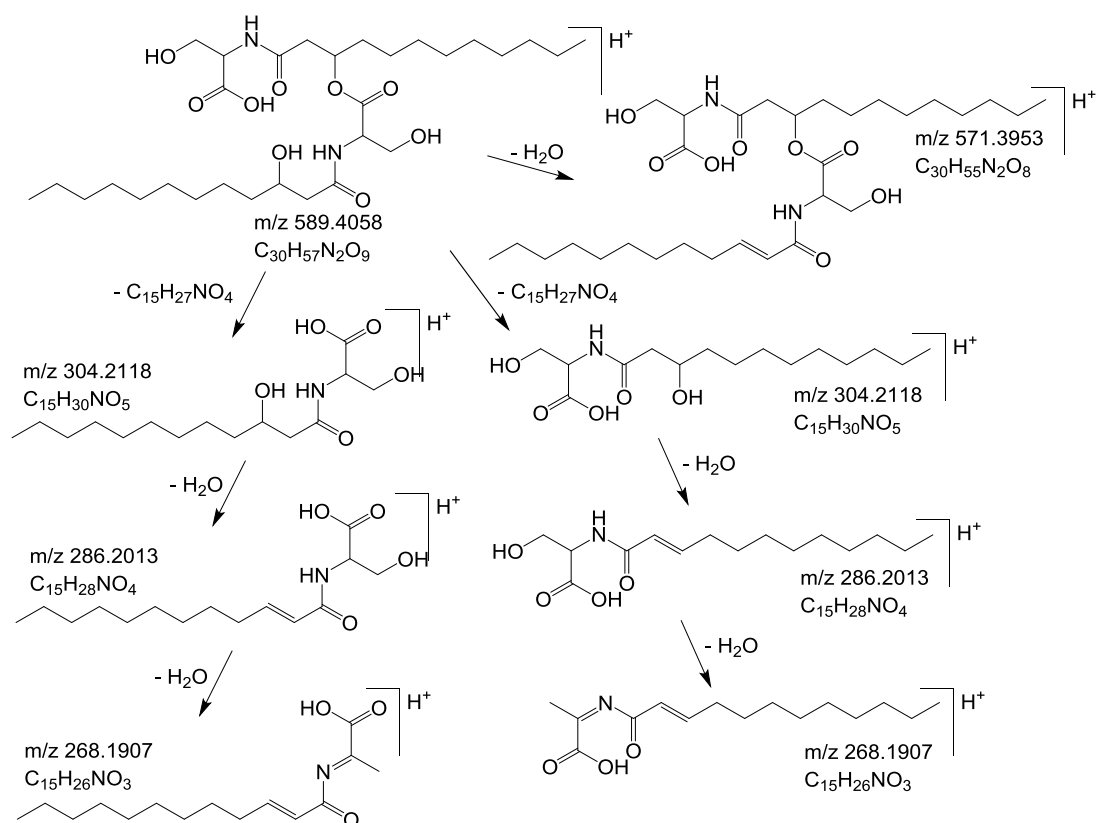


Abb. S74: Fragmentierungsweg von Serratamolide $C_{12}+C_{12}$ (geöffnete Ringstruktur, Verbindung 26) $[M+H]^+$: m/z 589, $C_{30}H_{57}N_2O_9$.

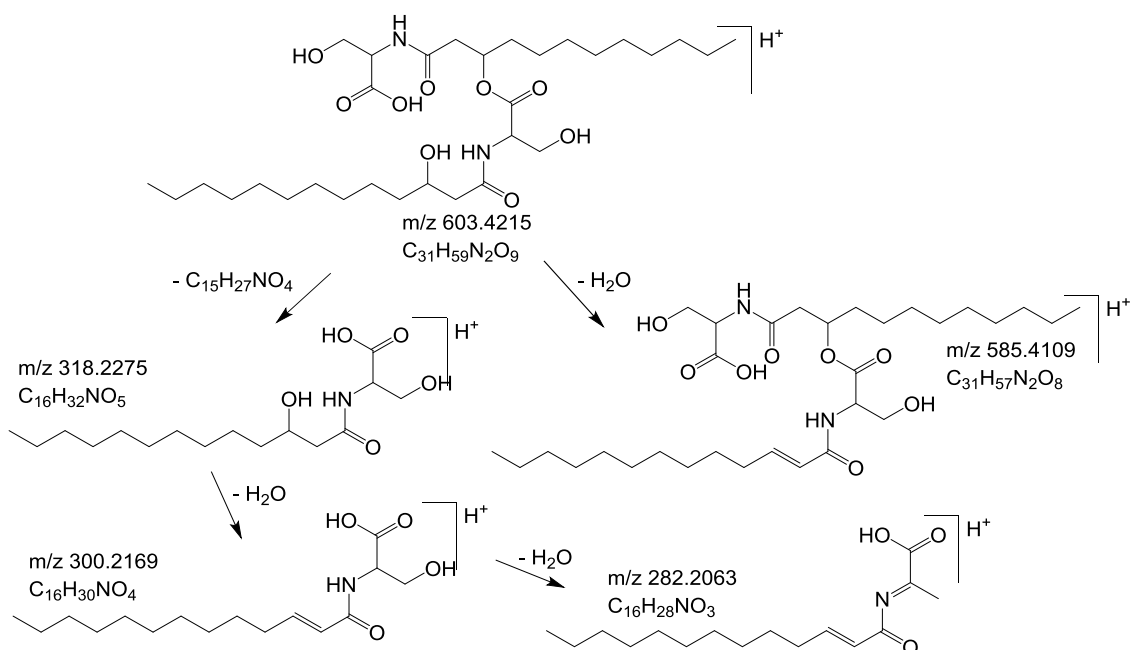


Abb. S75: Fragmentierungsweg von Serratamolide $C_{12}+C_{13}$ (geöffnete Ringstruktur, Verbindung 27) $[M+H]^+$: m/z 603, $C_{31}H_{59}N_2O_9$.

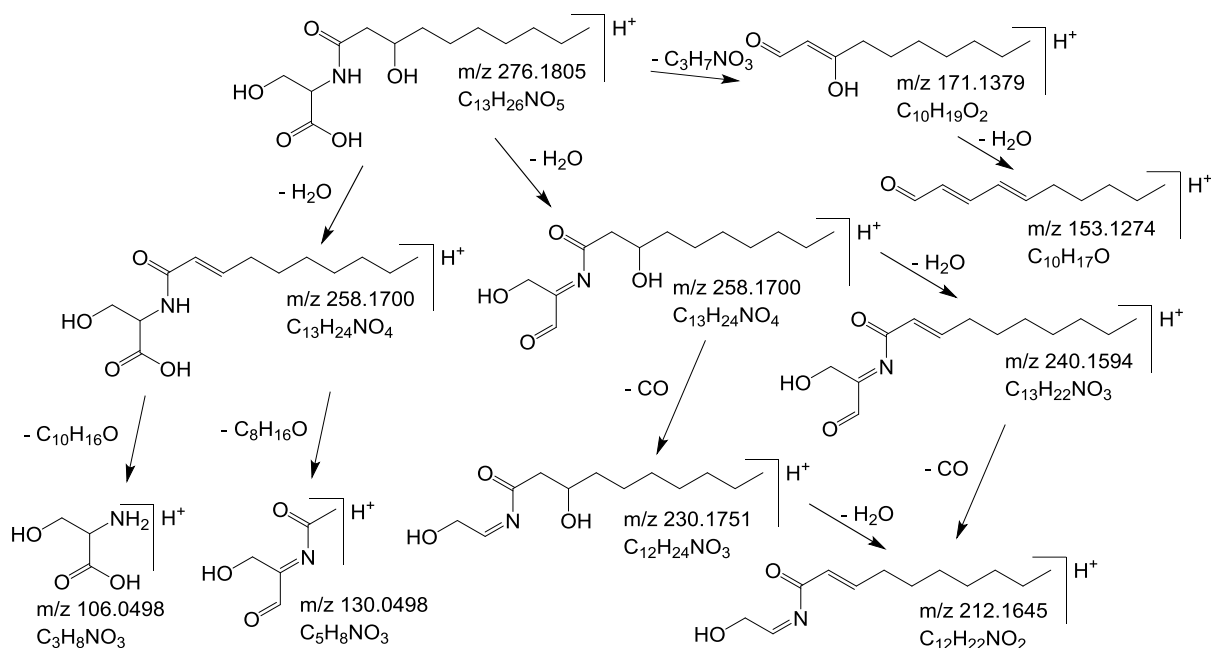


Abb. S76: Fragmentierungsweg von Serratamsäure (N-(D-3-Hydroxydecanoyl)-L-Serin, Verbindung 31 $[M+H]^+$: m/z 276, $C_{13}H_{26}NO_5$).

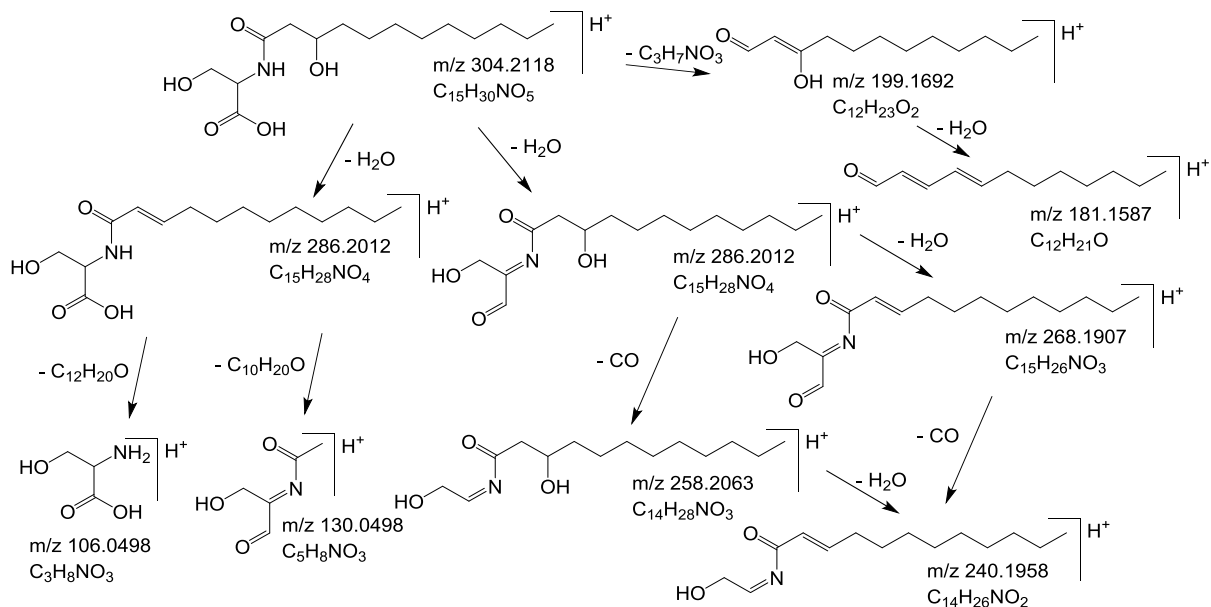


Abb. S77: Fragmentierungsweg von Serratamsäure-Derivat (Verbindung 32 $[M+H]^+$: m/z 304 via 286).

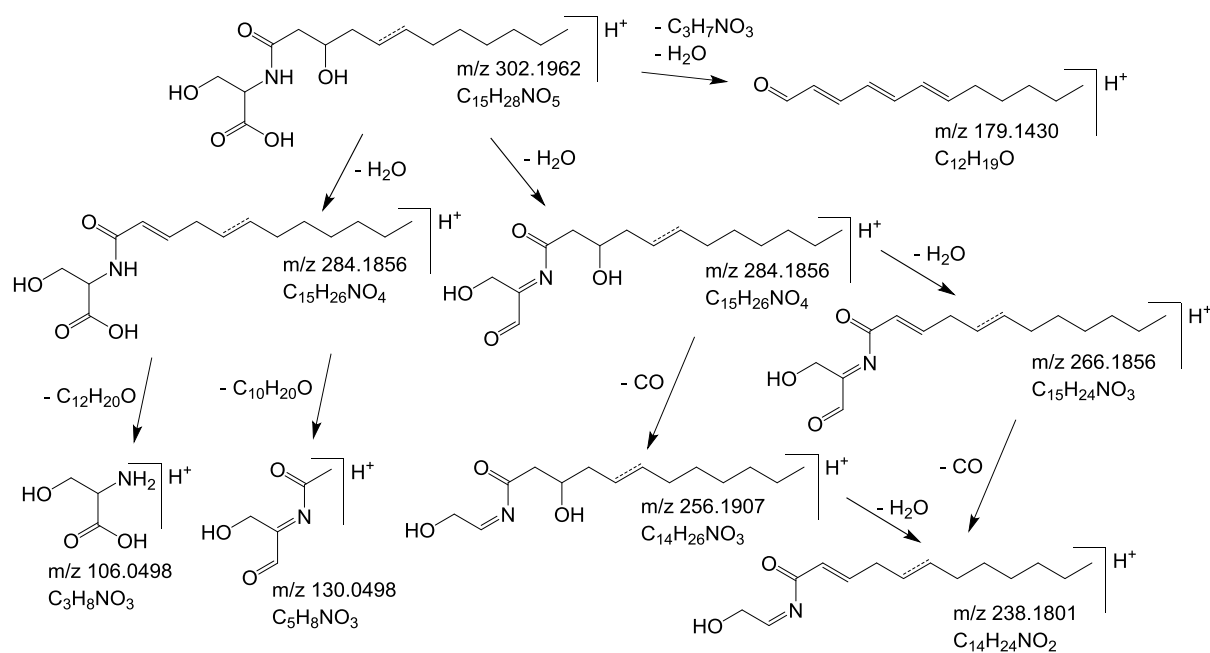


Abb. S78: Fragmentierungsweg von Serratamsäure-Derivat mit Doppelbindung (Verbindung **33** $[M+H]^+$: m/z 302, $C_{15}H_{28}NO_5$).

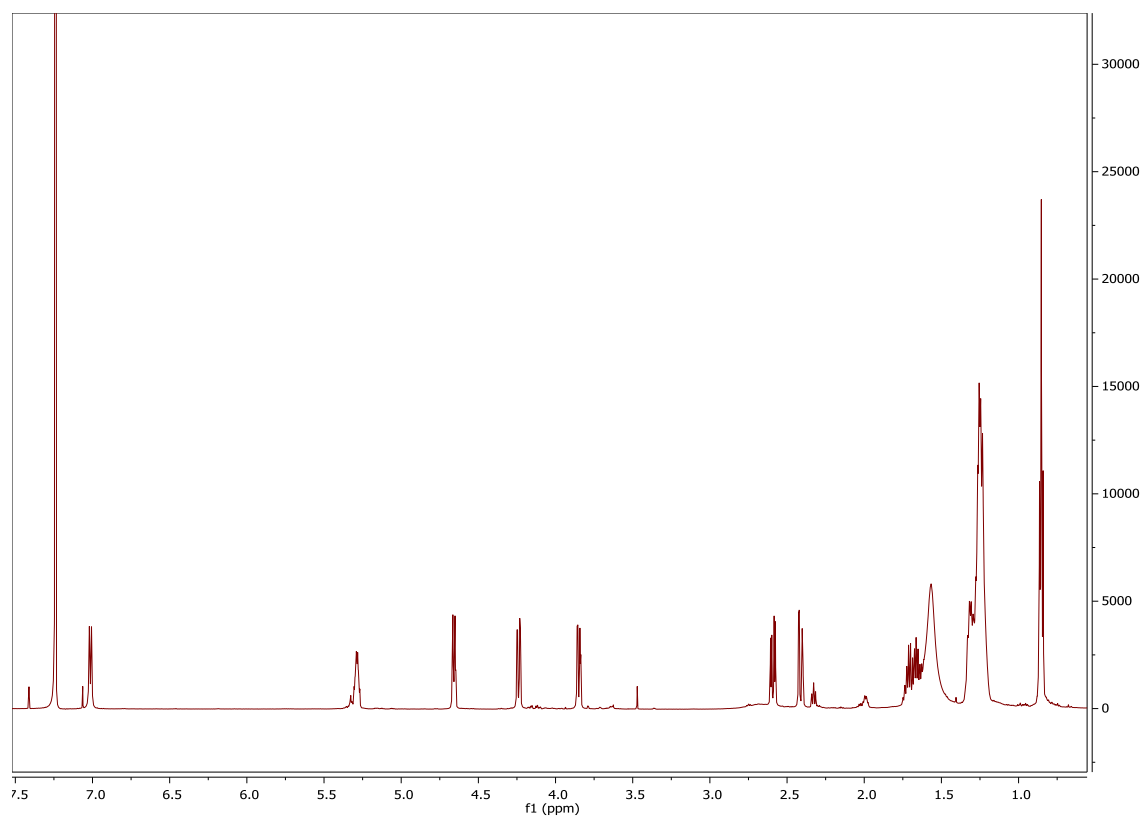


Abb. S79: ^1H -NMR Spektrum von Serrawettin W1 / Serratamolide $\text{C}_{10}+\text{C}_{10}$ (Verbindung **10**, CDCl_3 , 600 MHz).

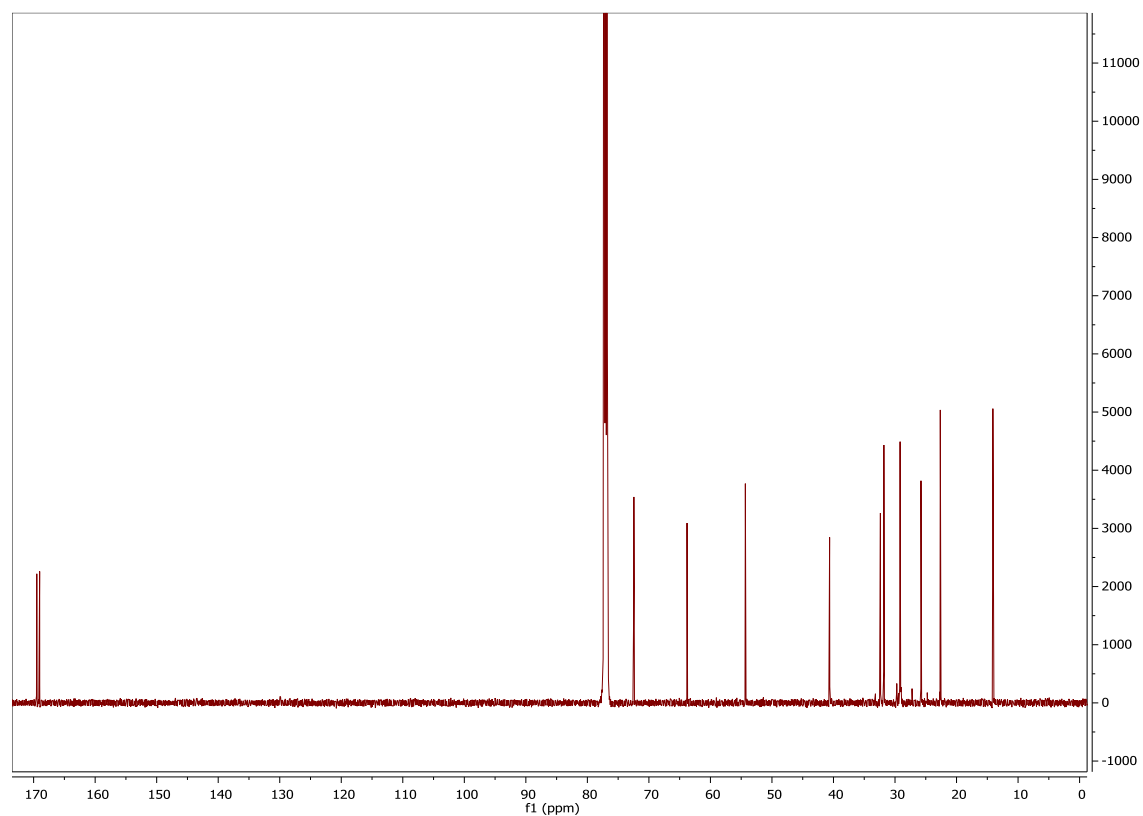


Abb. S80: ^{13}C -NMR Spektrum von Serrawettin W1 / Serratamolide $\text{C}_{10}+\text{C}_{10}$ (Verbindung **10**, CDCl_3 , 150 MHz).

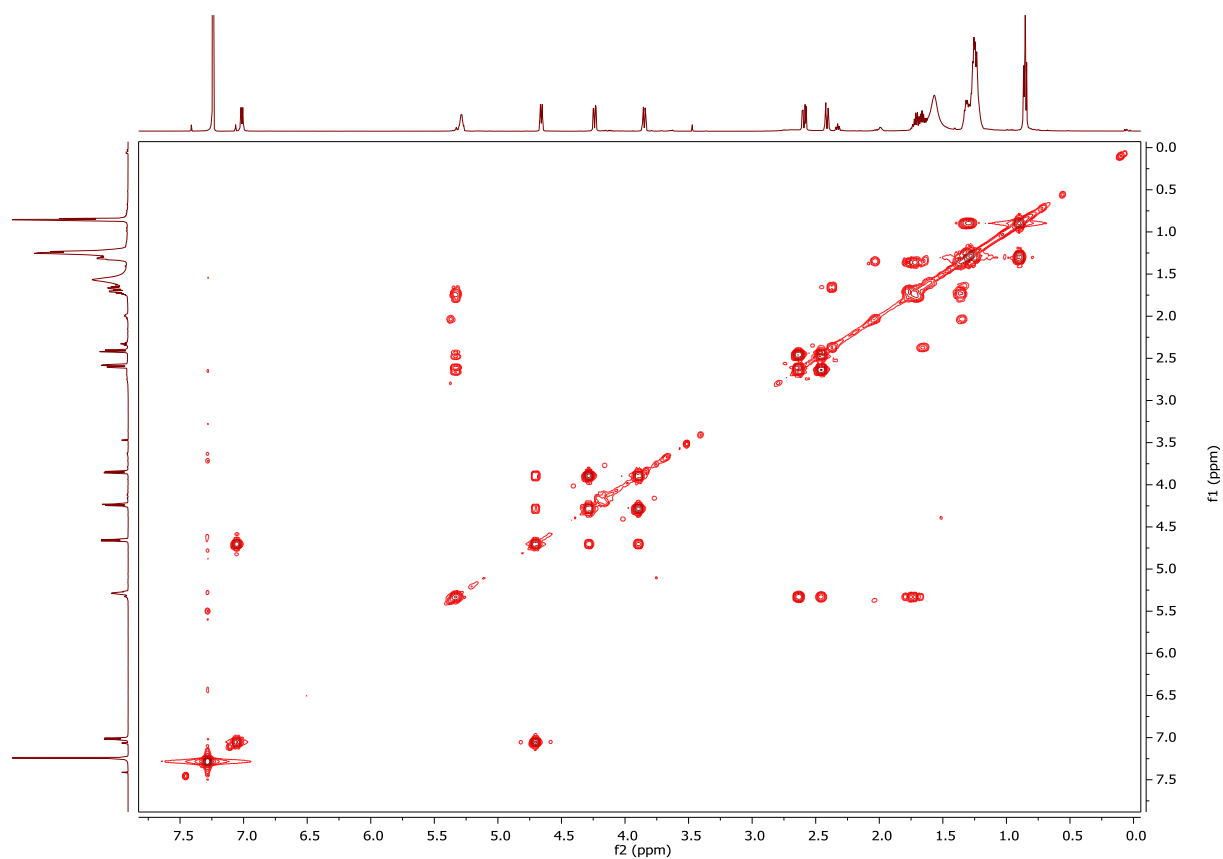


Abb. S81: COSY NMR Spektrum von Serrawettin W1 / Serratamolide C₁₀+C₁₀ (Verbindung **10**, CDCl₃).

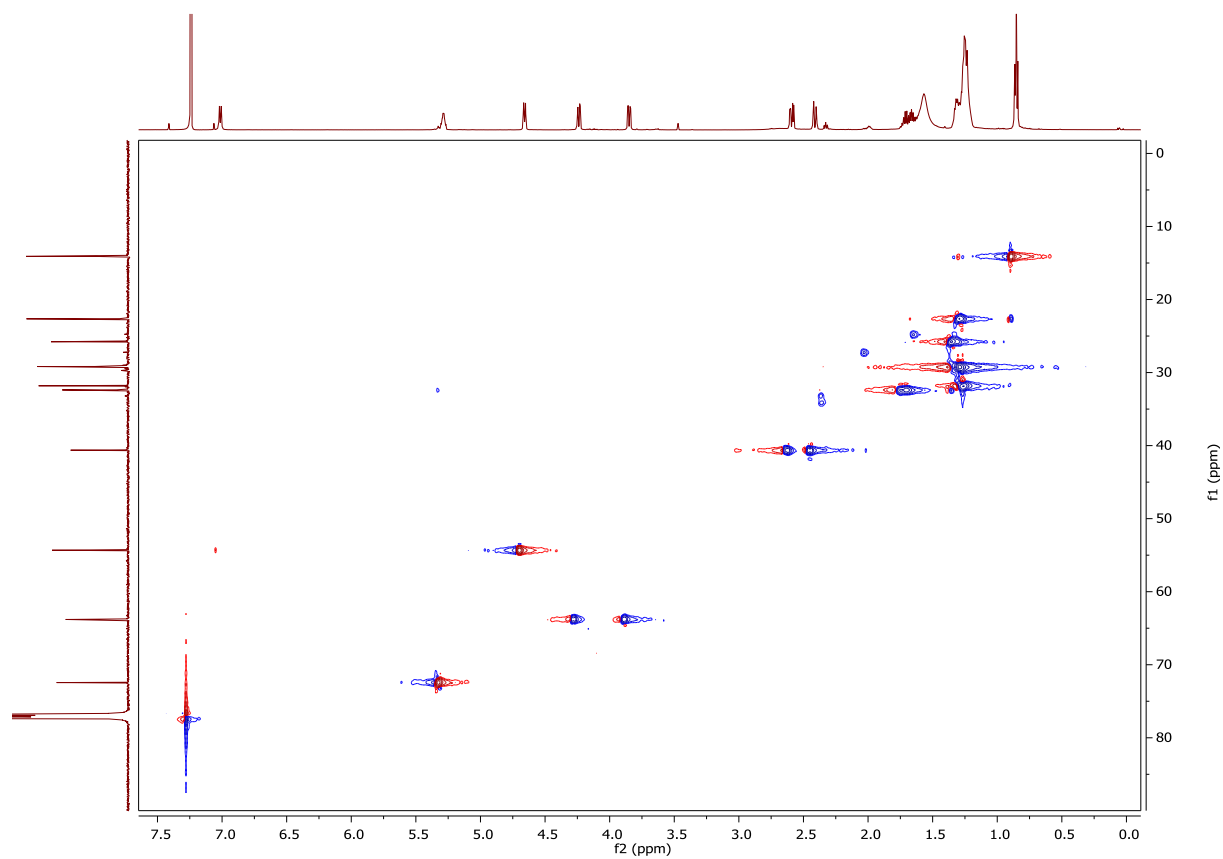


Abb. S82: HSQC NMR Spektrum von Serrawettin W1 / Serratamolide C₁₀+C₁₀ (Verbindung **10**, CDCl₃).

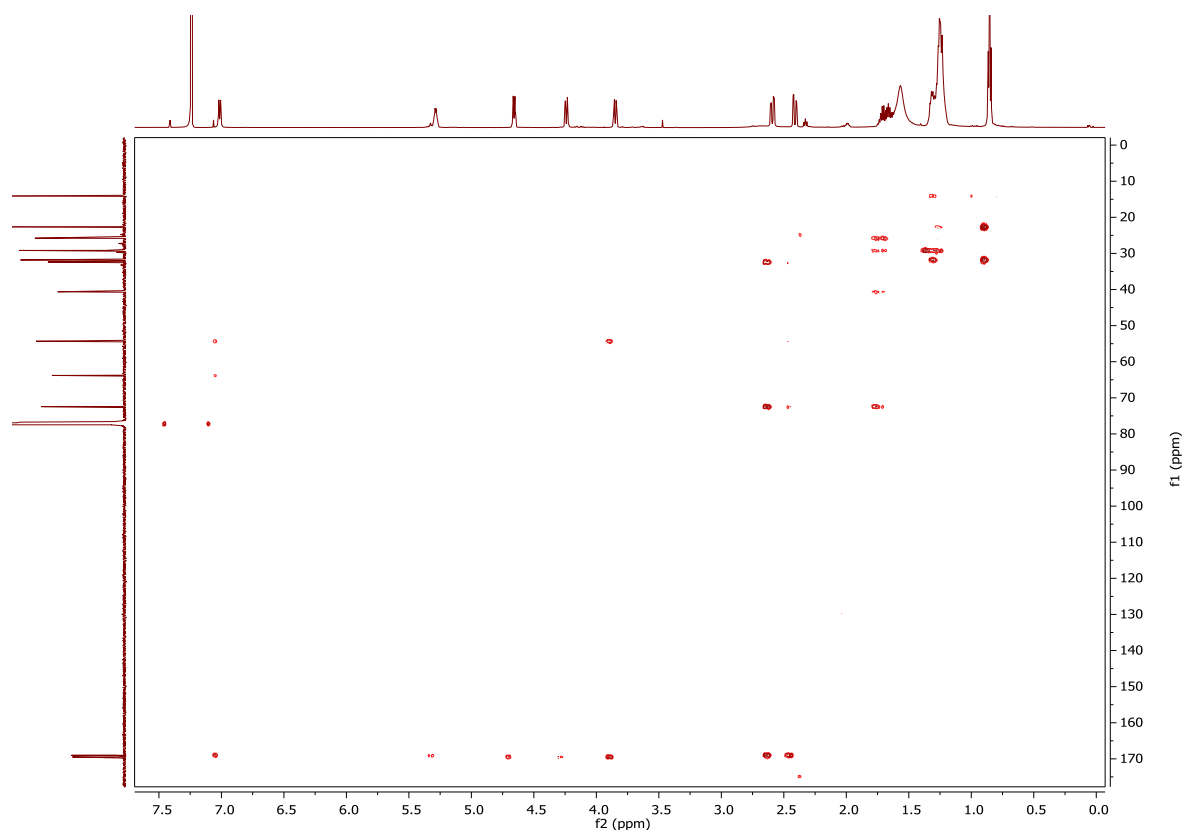


Abb. S83: HMBC NMR Spektrum von Serrawettin W1 / Serratamolide C₁₀+C₁₀ (Verbindung **10**, CDCl₃).

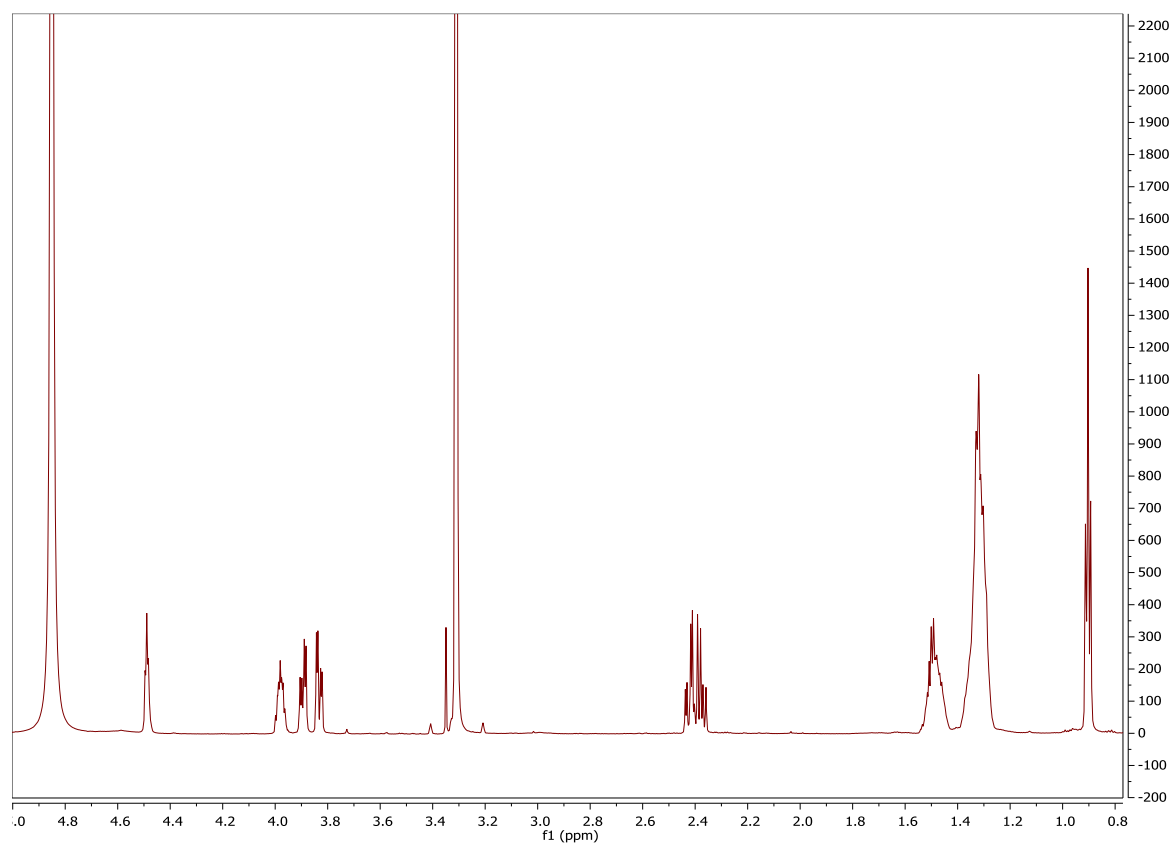


Abb. S84: ¹H-NMR Spektrum von Serratamsäure (N-(D-3-Hydroxydecanoyl)-L-Serin, Verbindung **31**, MeOD, 700 MHz).

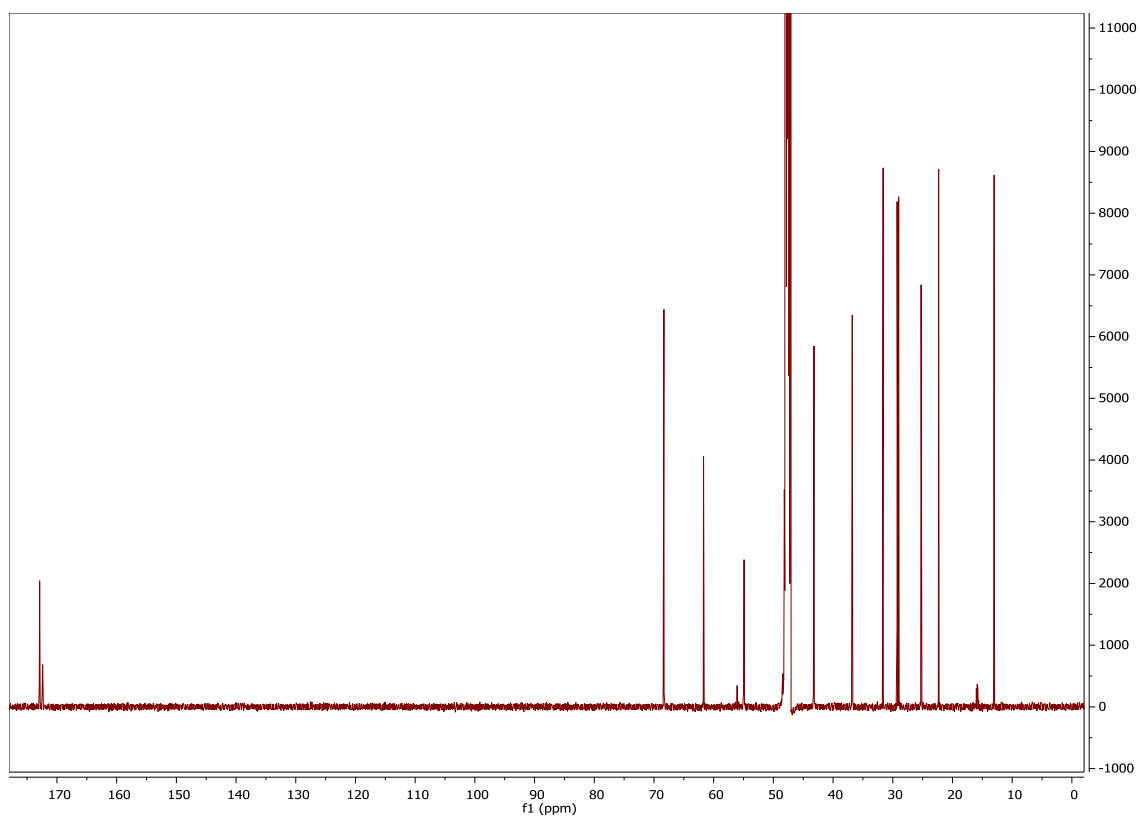


Abb. S85: ^{13}C -NMR Spektrum von Serratamsäure (N-(D-3-Hydroxydecanoyl)-L-Serin, Verbindung **31**, MeOD, 175 MHz).

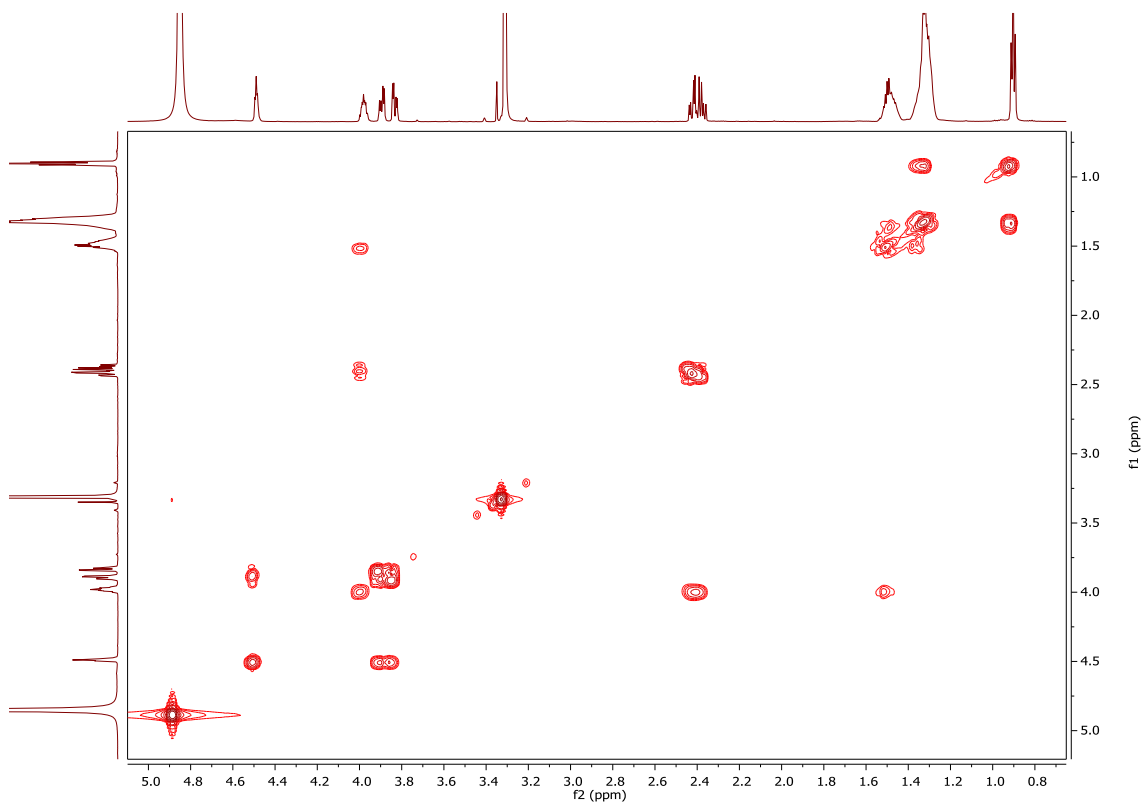


Abb. S86: COSY NMR Spektrum von Serratamsäure (N-(D-3-Hydroxydecanoyl)-L-Serin, Verbindung **31**, MeOD).

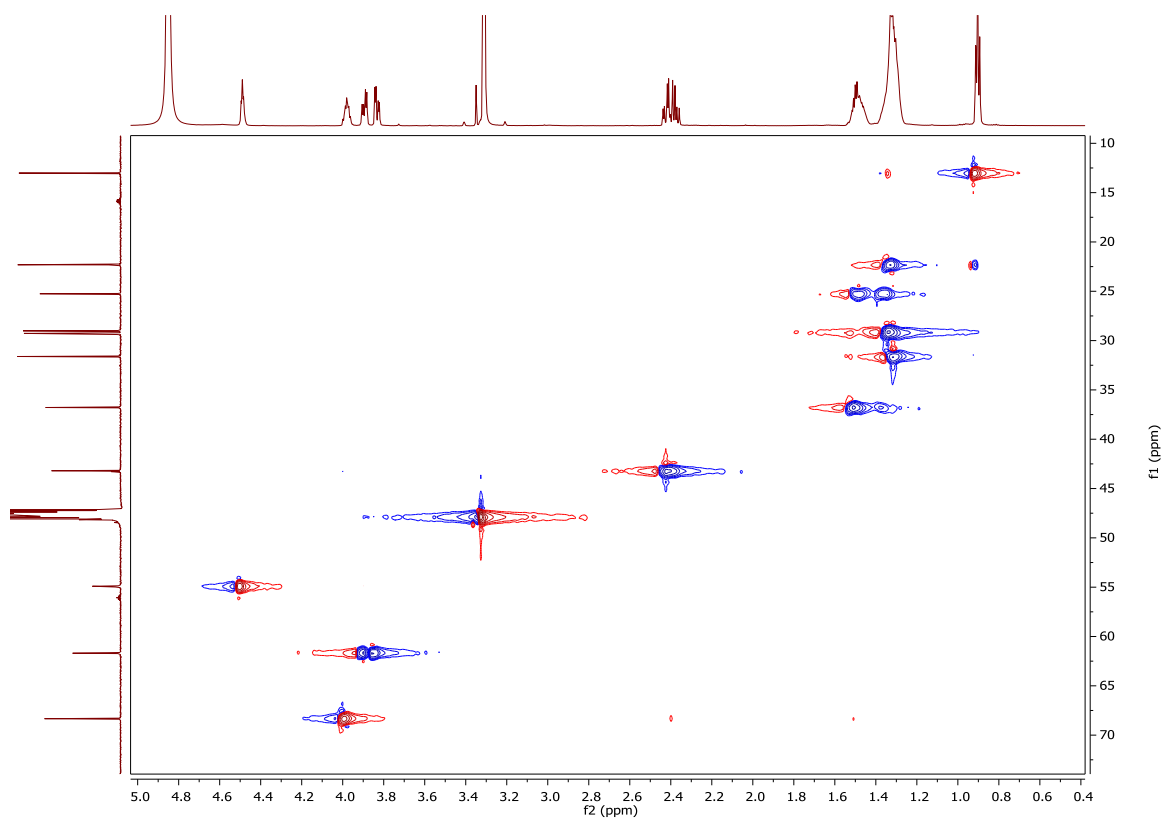


Abb.S87: HSQC NMR Spektrum von Serratamsäure (N-(D-3-Hydroxydecanoyl)-L-Serin, Verbindung 31, MeOD).

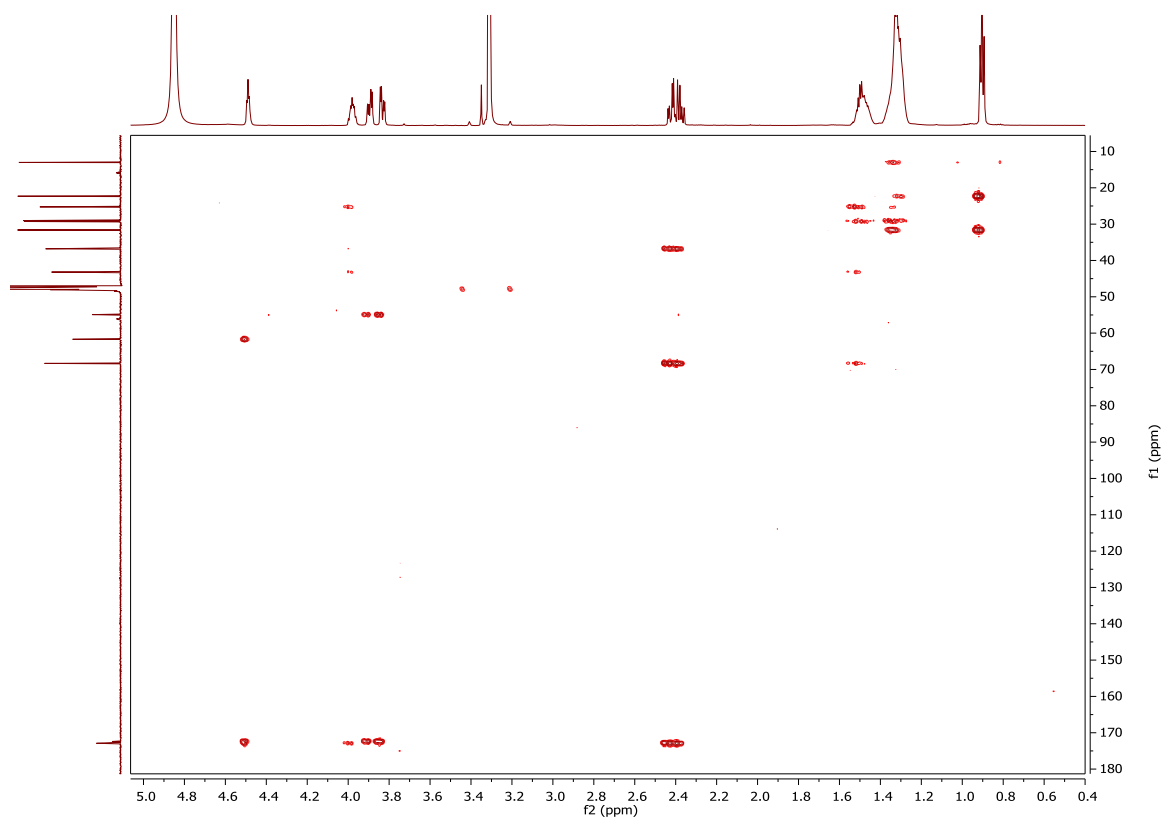


Abb. S88: HMBC NMR Spektrum von Serratamsäure (N-(D-3-Hydroxydecanoyl)-L-Serin, Verbindung 31, MeOD).

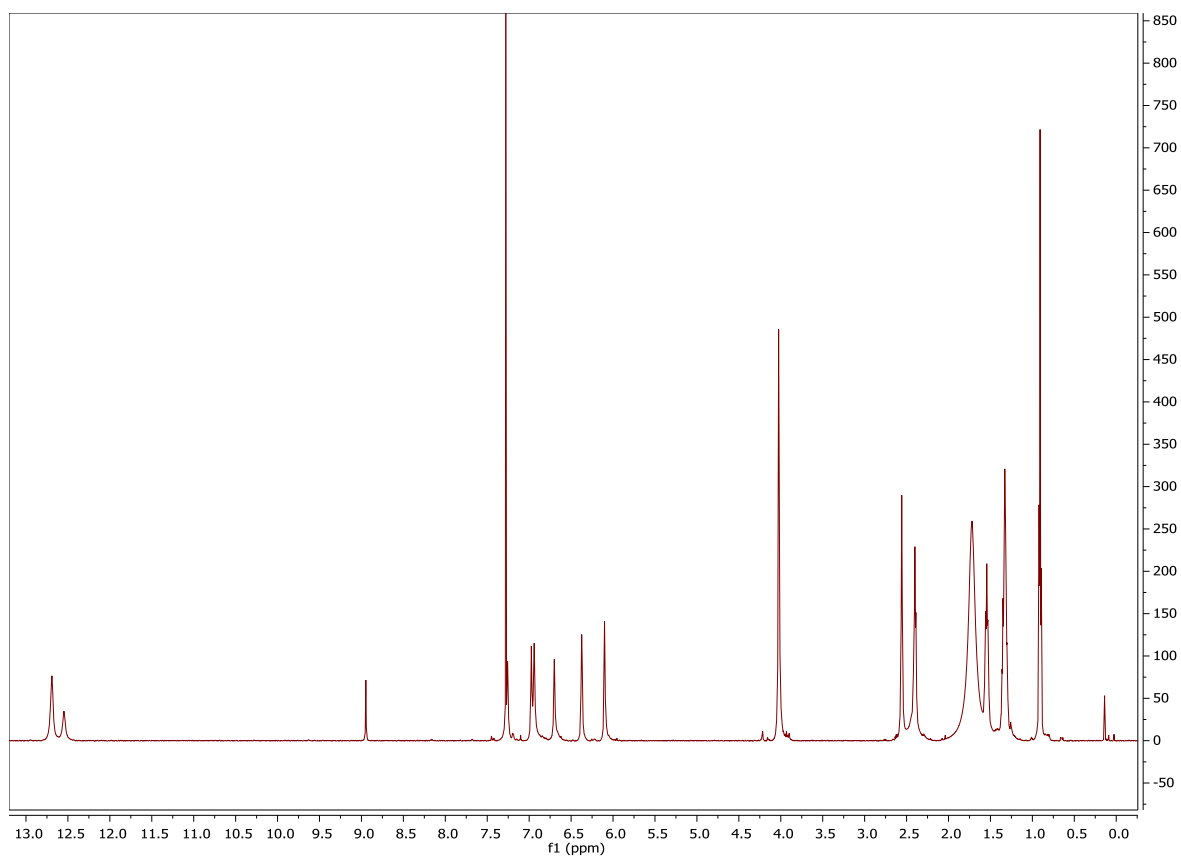


Abb. S89: ^1H -NMR Spektrum von Prodigiosin (Verbindung **3**, CDCl_3 , 600 MHz).

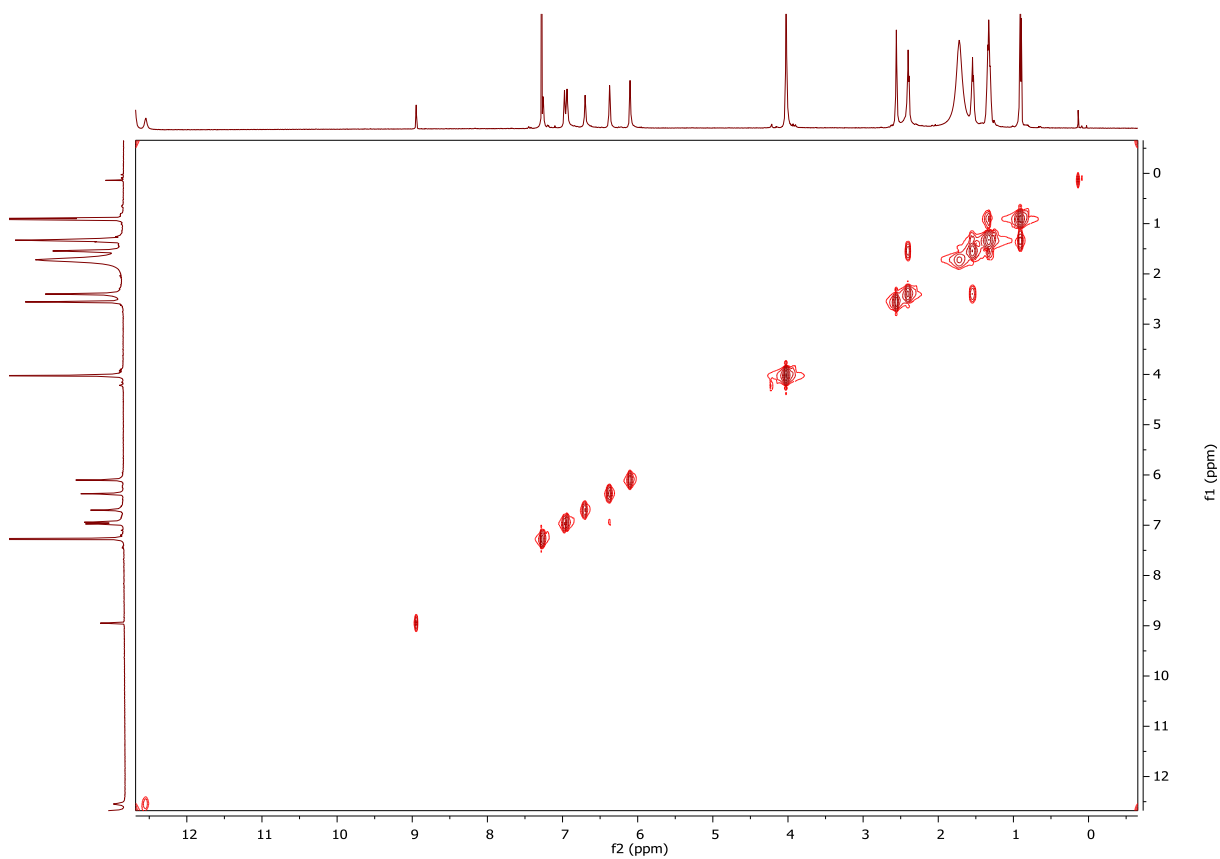


Abb. S90: COSY NMR Spektrum von Prodigiosin (Verbindung **3**, CDCl_3 , 600 MHz).

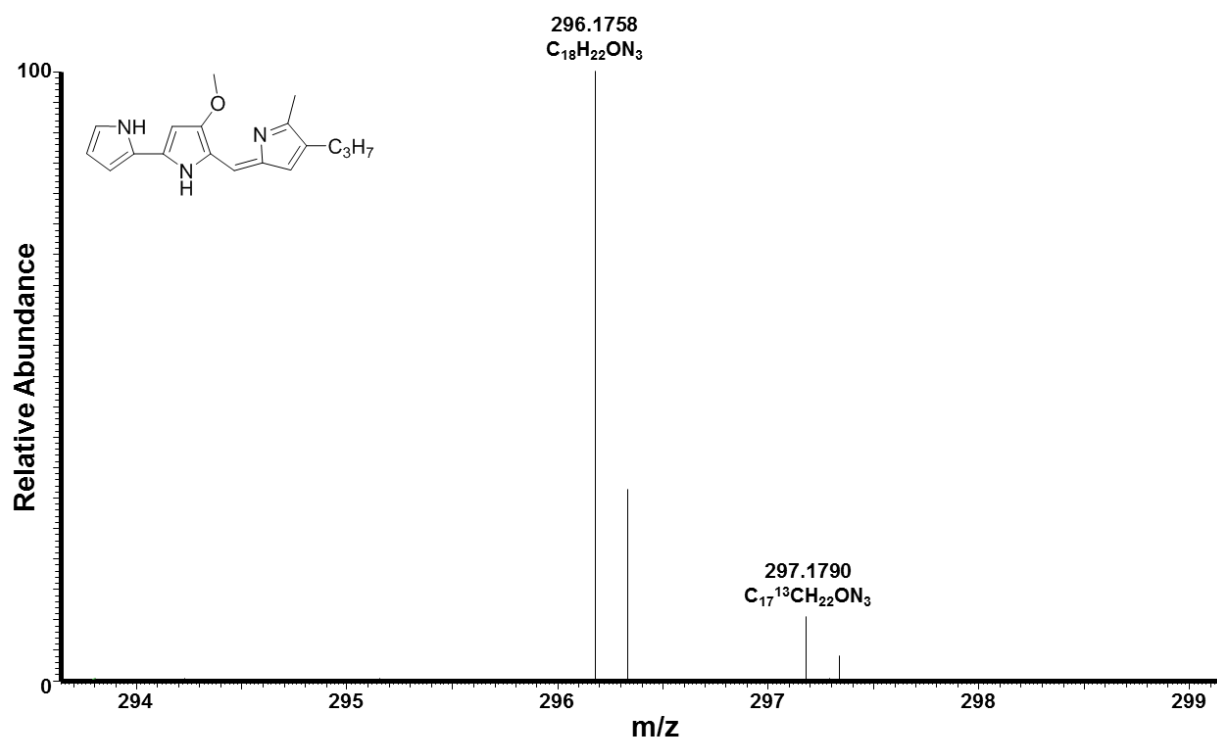


Abb. S91: HRMS-Spektrum von 2-Methyl-3-propyl-Prodiginin (Verbindung 1 $[M+H]^+$: m/z 296, $C_{18}H_{22}N_3O$).

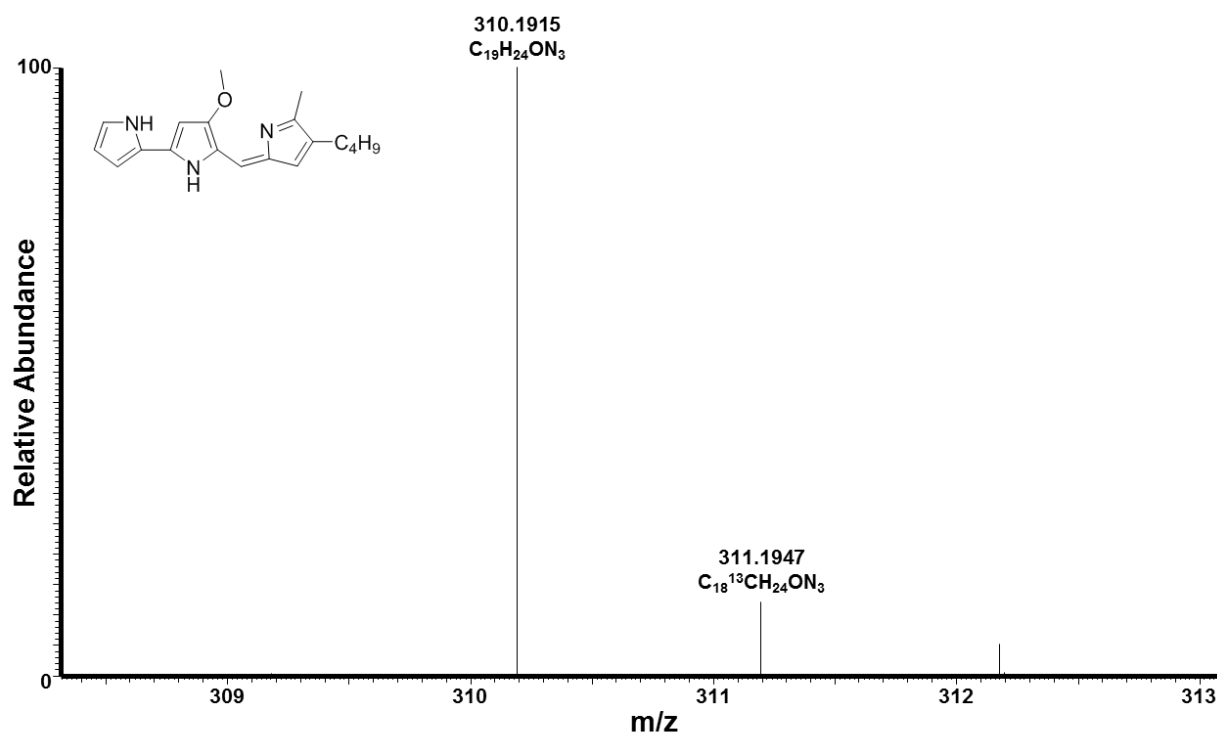


Abb. S92: HRMS-Spektrum von 2-Methyl-3-butyl-Prodiginin (Verbindung 2 $[M+H]^+$: m/z 310, $C_{19}H_{24}N_3O$).

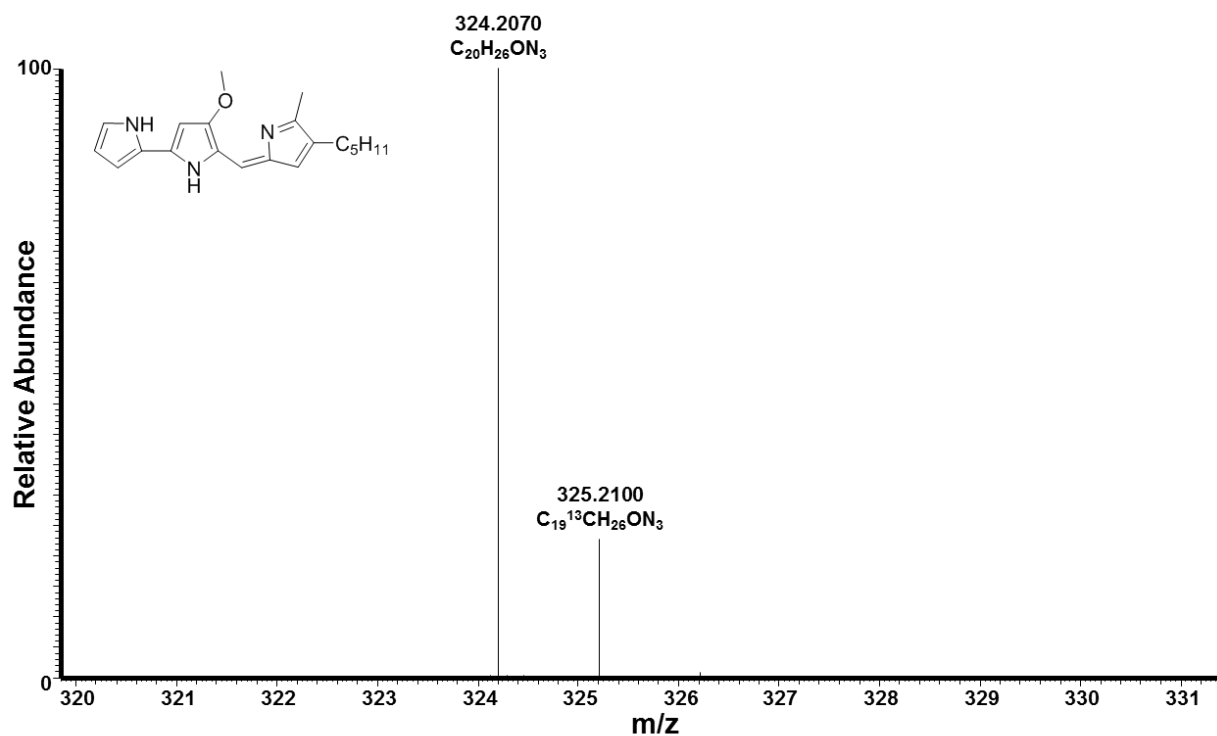


Abb. S93: HRMS-Spektrum von Prodigiosin (Verbindung 3 $[M+H]^+$: m/z 324, $C_{20}H_{26}N_3O$).

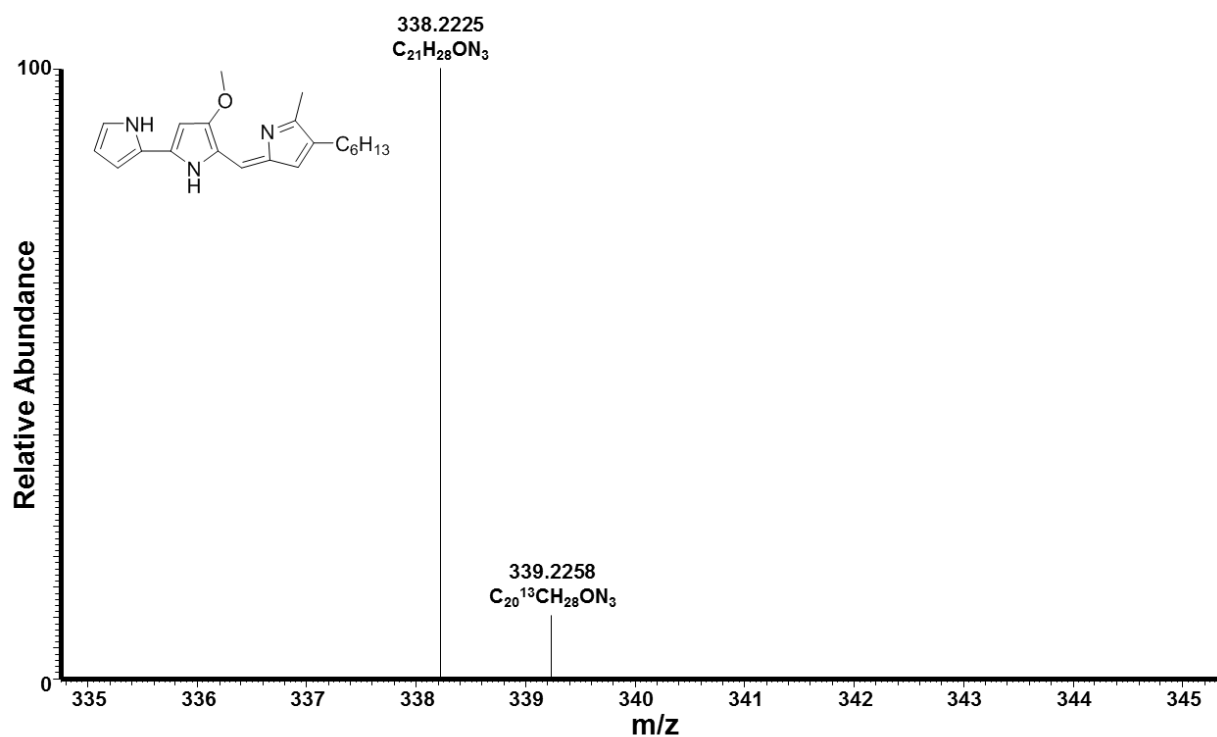


Abb. S94: HRMS-Spektrum von 2-Methyl-3-hexyl-Prodiginin (Verbindung 4 $[M+H]^+$: m/z 338, $C_{21}H_{28}N_3O$).

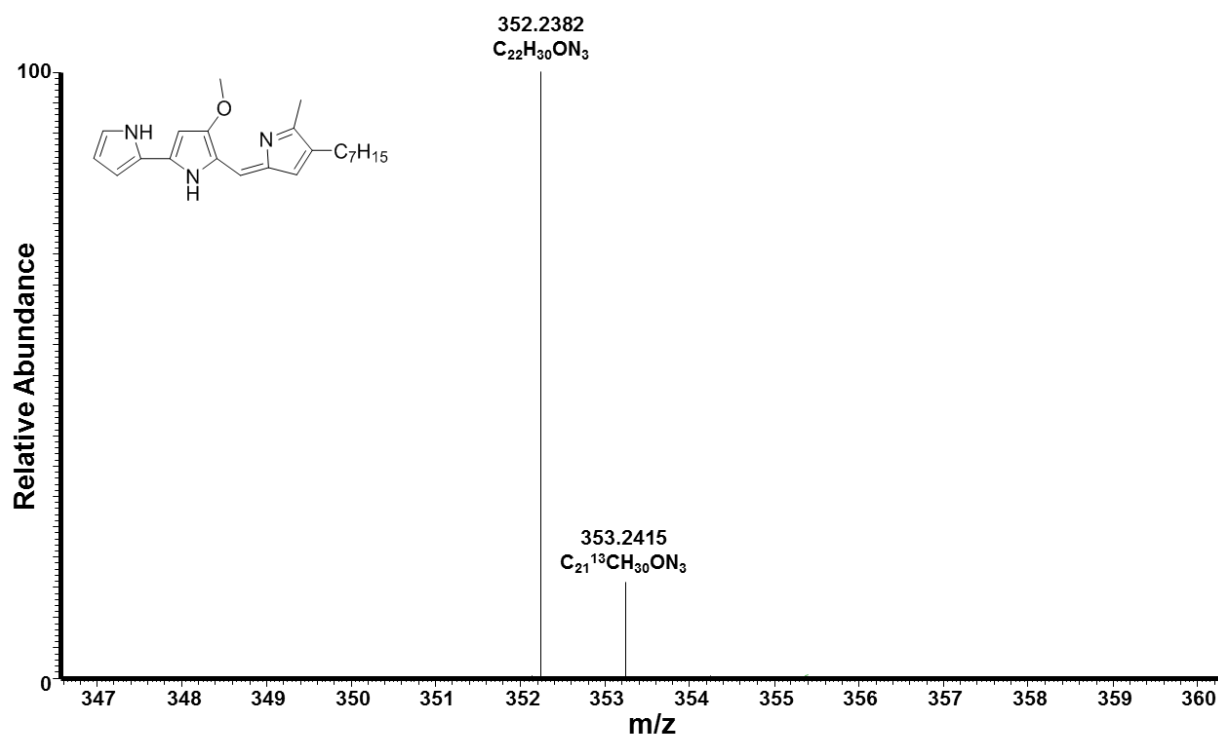


Abb. S95: HRMS-Spektrum von 2-Methyl-3-heptyl-Prodiginin (Verbindung **5** $[M+H]^+$: m/z 352, $C_{22}H_{30}N_3O$).

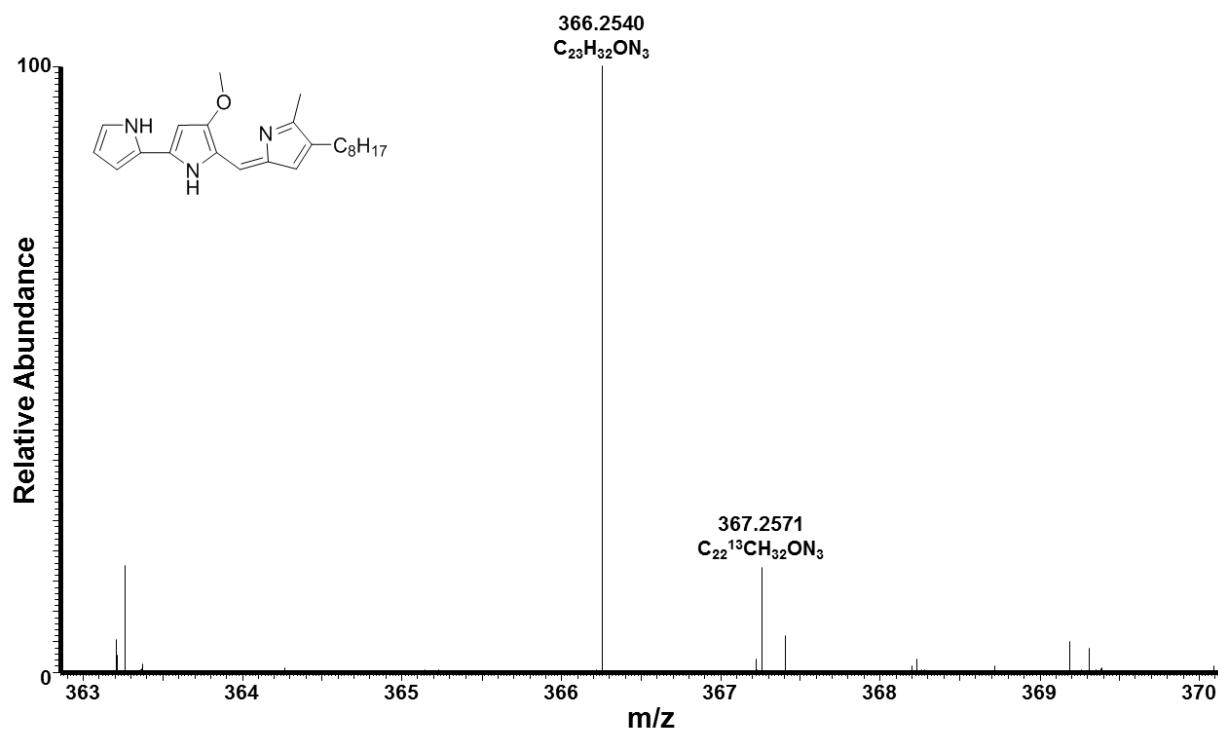


Abb. S96: HRMS-Spektrum von 2-Methyl-3-octyl-Prodiginin (Verbindung **6** $[M+H]^+$: m/z 366, $C_{23}H_{32}N_3O$).

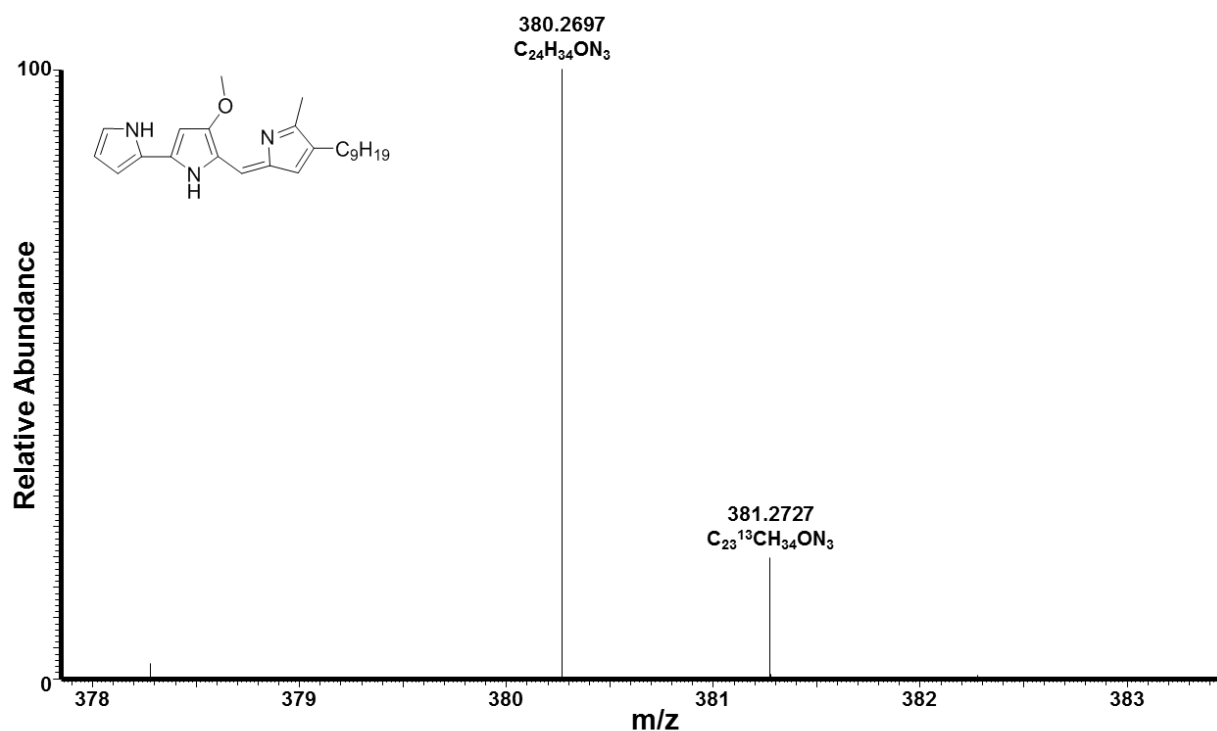


Abb. S97: HRMS-Spektrum von 2-Methyl-3-nonyl-Prodiginin (Verbindung 7 $[M+H]^+$: m/z 380, $C_{24}H_{34}N_3O$).

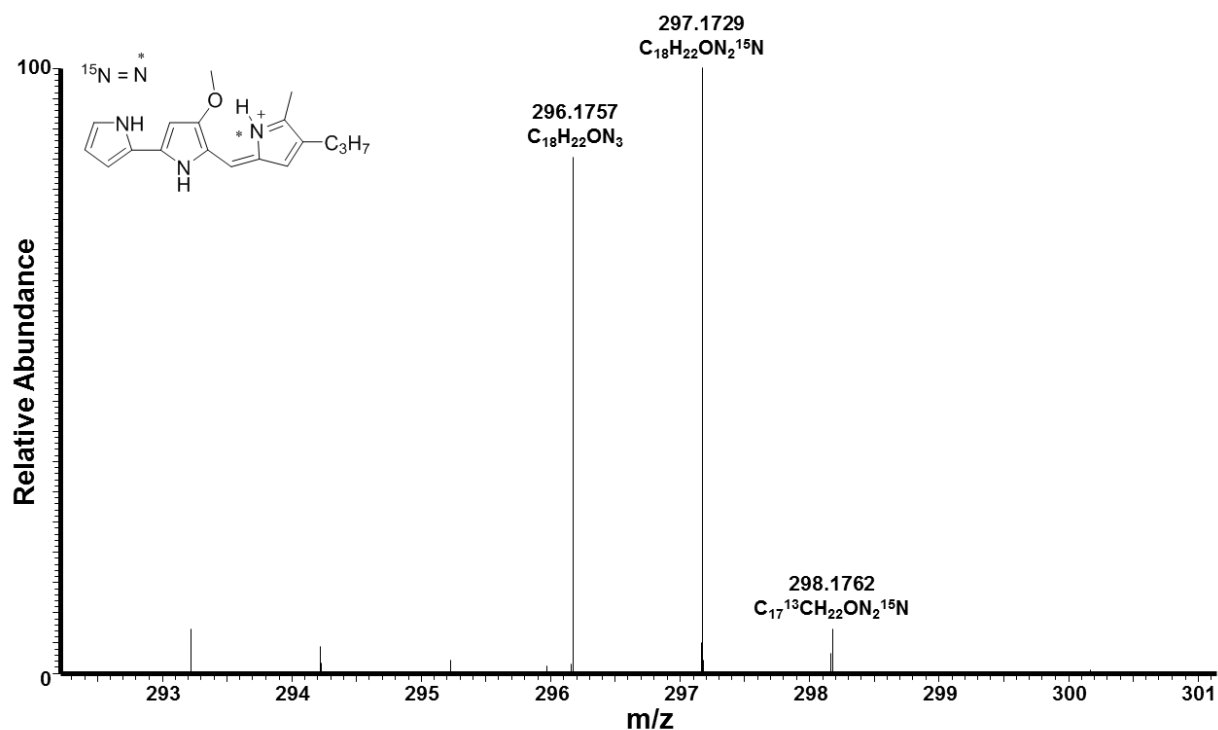


Abb. S98: HRMS-Spektrum von 2-Methyl-3-propyl-Prodiginin mit eingebautem ^{15}N von $^{15}NH_4Cl$ (Verbindung 1 $[M+H]^+$: m/z 297, $C_{18}H_{22}N_2^{15}NO$).

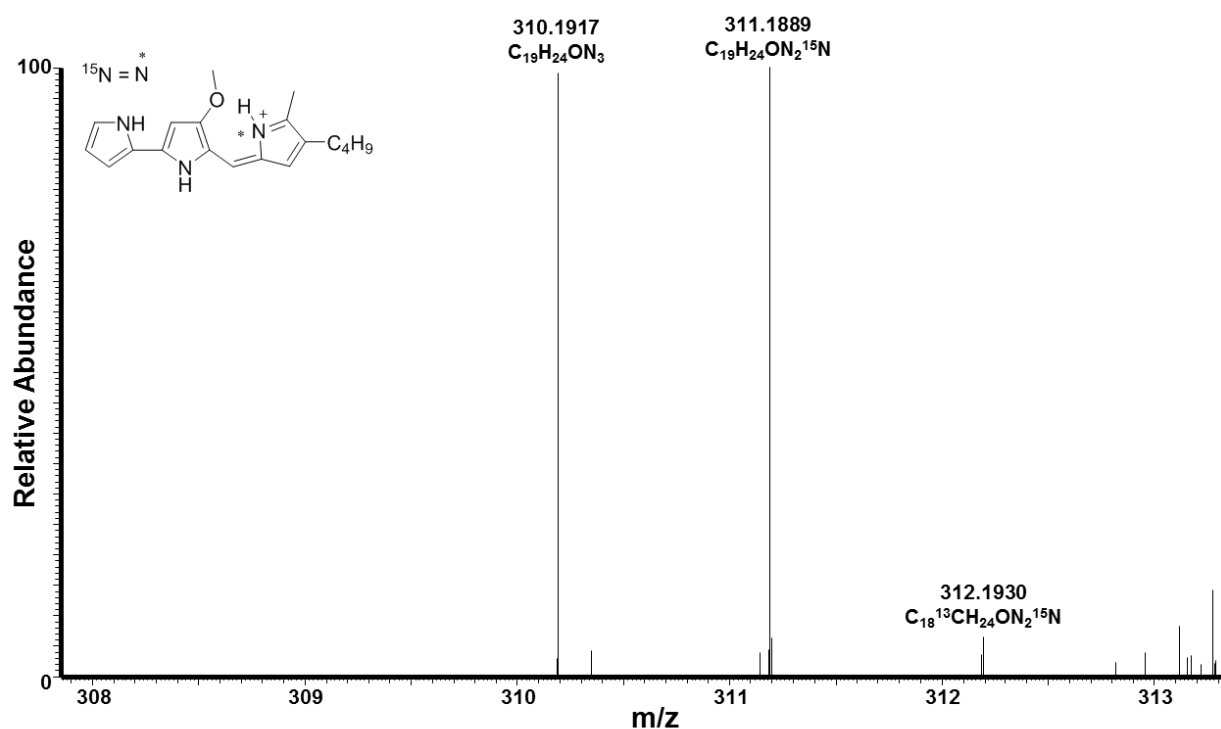


Abb. S99: HRMS-Spektrum von 2-Methyl-3-butyl-Prodiginin mit eingebautem ^{15}N von $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ (Verbindung **2** $[\text{M}+\text{H}]^+$: m/z 311, $\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{N}_2^{15}\text{NO}$).

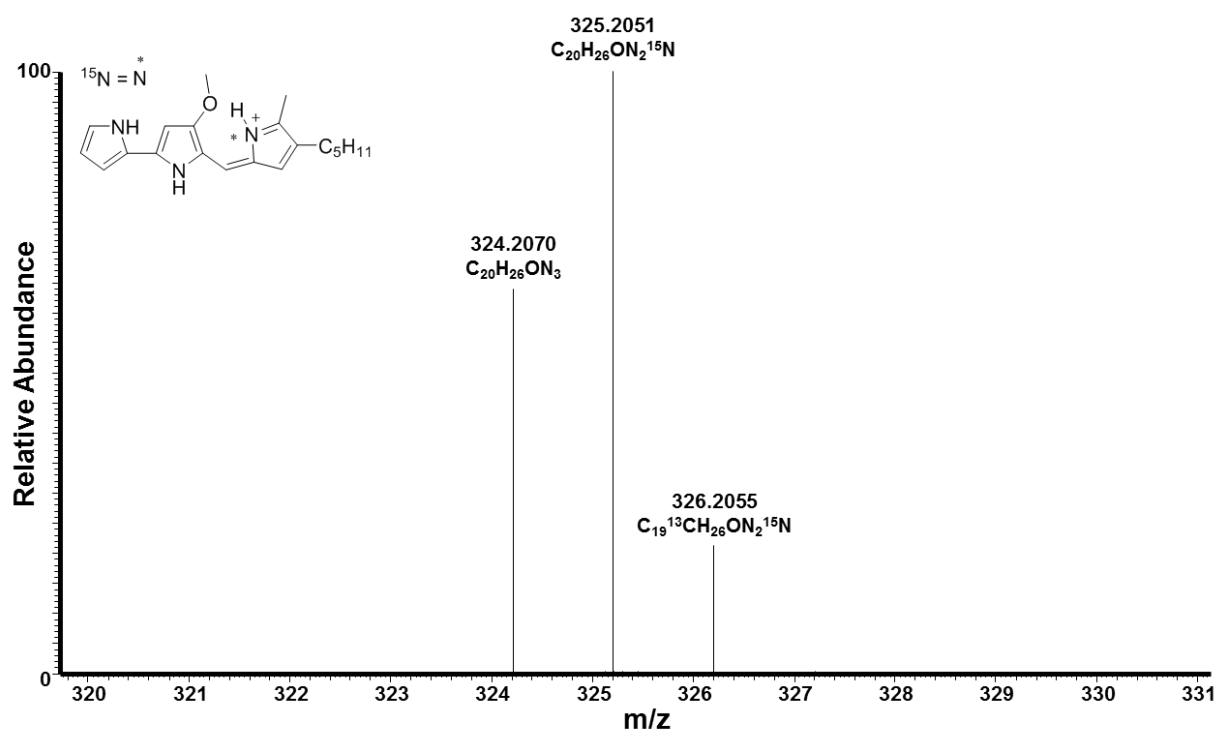


Abb. S100: HRMS-Spektrum von Prodigiosin mit eingebautem ^{15}N von $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ (Verbindung **3** $[\text{M}+\text{H}]^+$: m/z 325, $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{N}_2^{15}\text{NO}$).

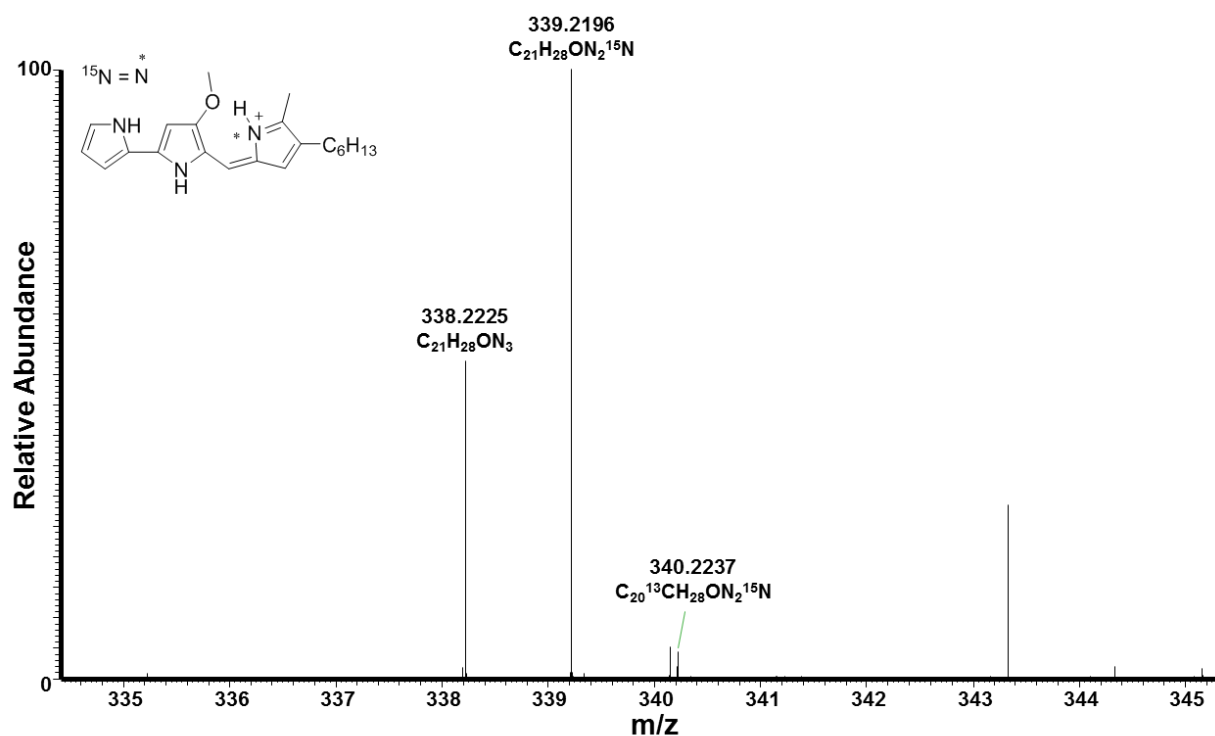


Abb. S101: HRMS-Spektrum von 2-Methyl-3-hexyl-Prodiginin mit eingebautem ^{15}N von $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ (Verbindung 4 $[\text{M}+\text{H}]^+$: m/z 339, $\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{N}_2^{15}\text{NO}$).

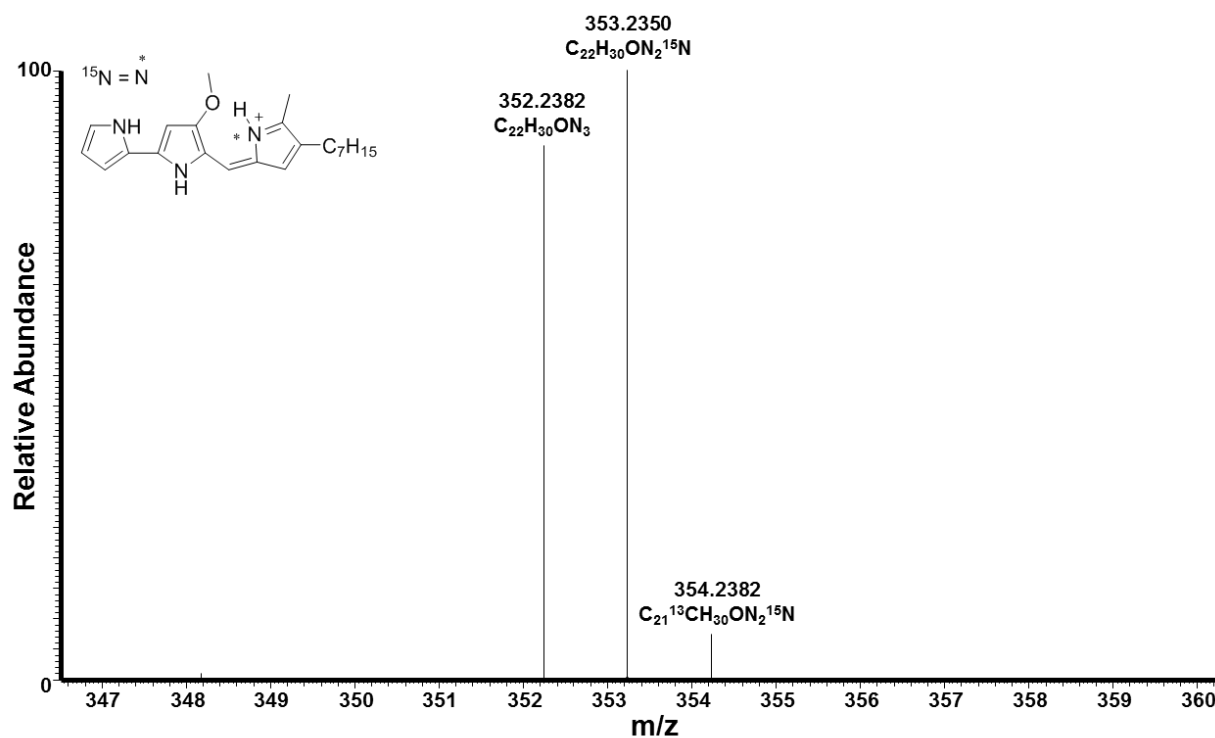


Abb. S102: HRMS-Spektrum von 2-Methyl-3-heptyl-Prodiginin mit eingebautem ^{15}N von $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ (Verbindung 5 $[\text{M}+\text{H}]^+$: m/z 353, $\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{N}_2^{15}\text{NO}$).

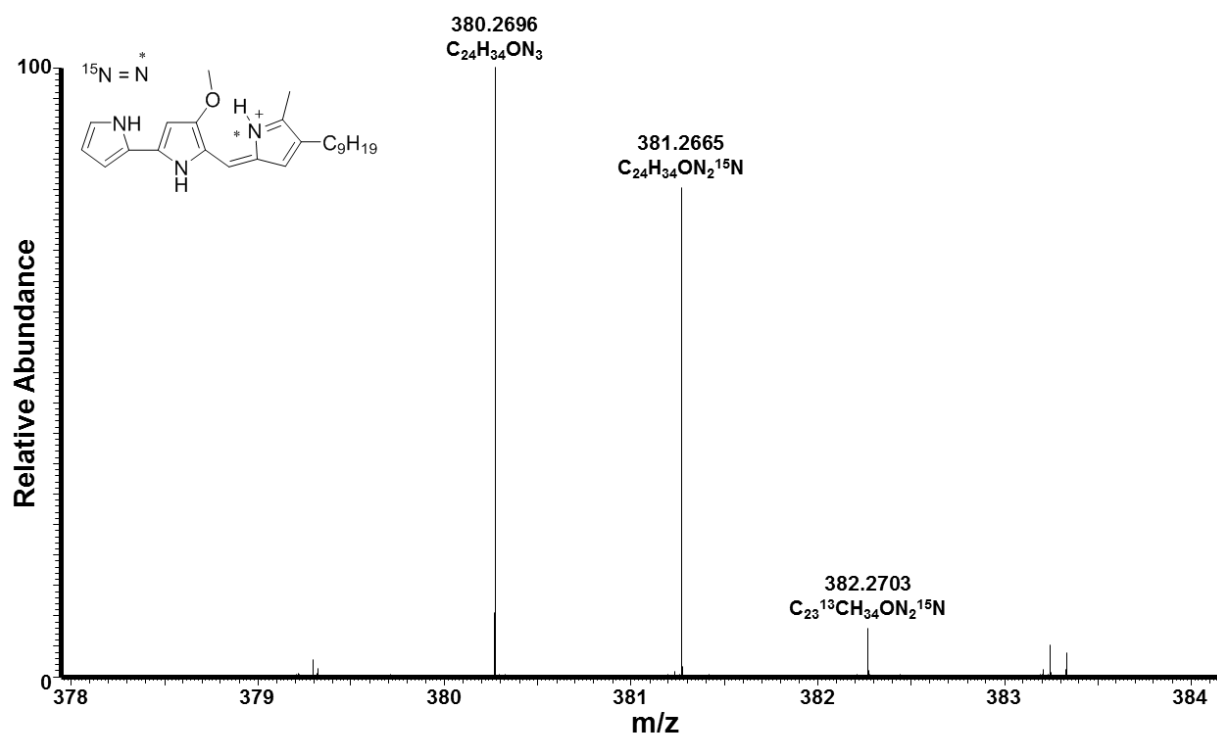


Abb. S103: HRMS-Spektrum von 2-Methyl-3-nonyl-Prodiginin mit eingebautem ^{15}N von $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ (Verbindung 7 $[\text{M}+\text{H}]^+$: m/z 381, $\text{C}_{24}\text{H}_{34}\text{N}_2^{15}\text{NO}$).

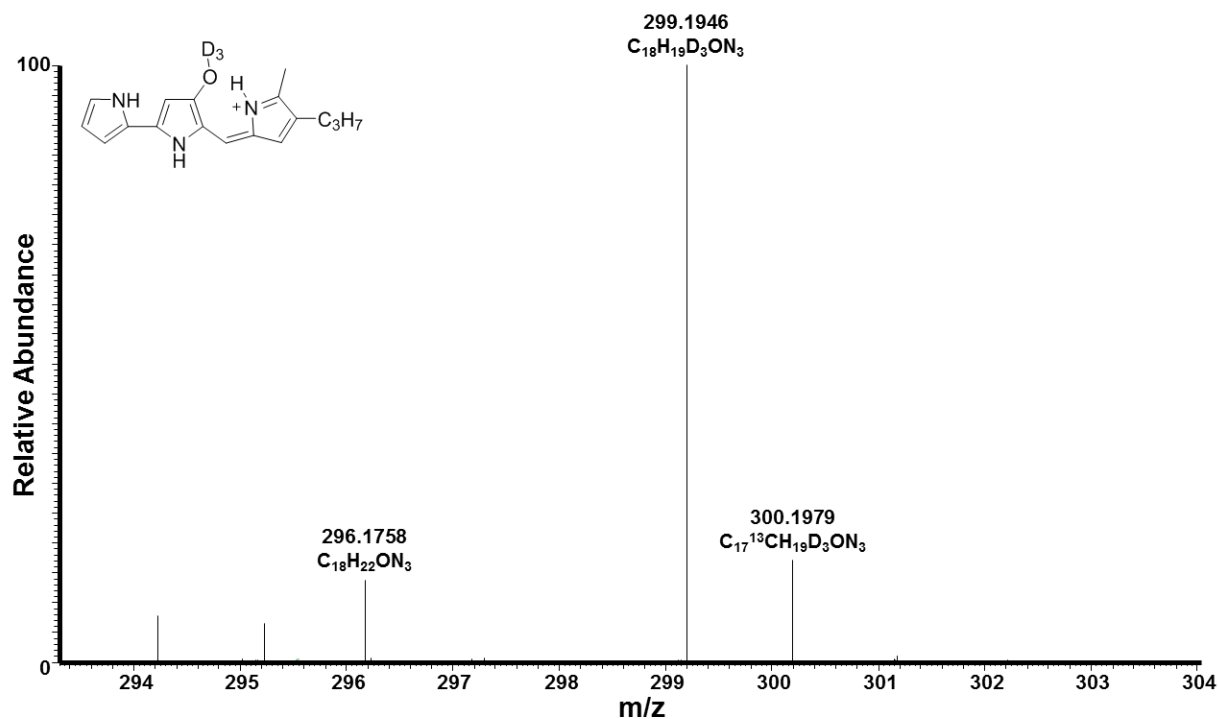


Abb. S104: HRMS-Spektrum von 2-Methyl-3-propyl-Prodiginin mit eingebauter Methyl- D_3 Gruppe von [Methyl- D_3]-L-Methionin (Verbindung 1 $[\text{M}+\text{H}]^+$: m/z 299, $\text{C}_{18}\text{H}_{19}\text{D}_3\text{N}_3\text{O}$).

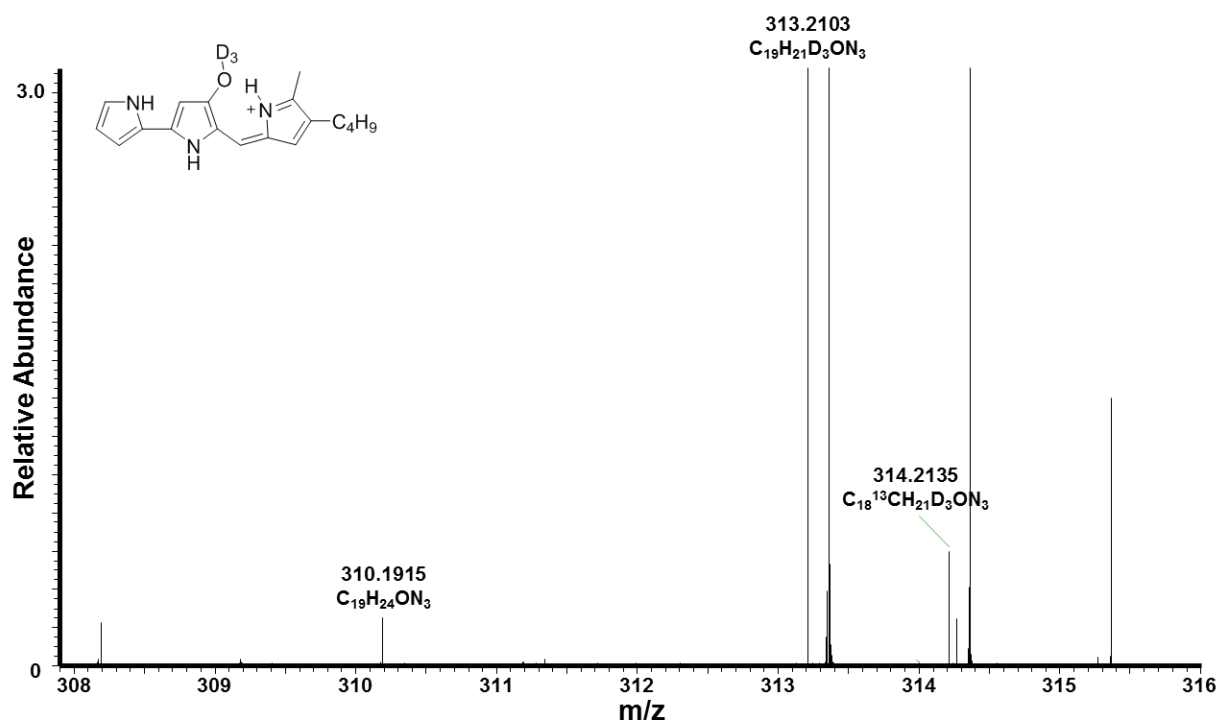


Abb. S105: HRMS-Spektrum von 2-Methyl-3-butyl-Prodiginin mit eingebauter Methyl-D₃ Gruppe von [Methyl-D₃]-L-Methionin (Verbindung 2 [$M+H$]⁺: m/z 313, $C_{19}H_{21}D_3N_3O$).

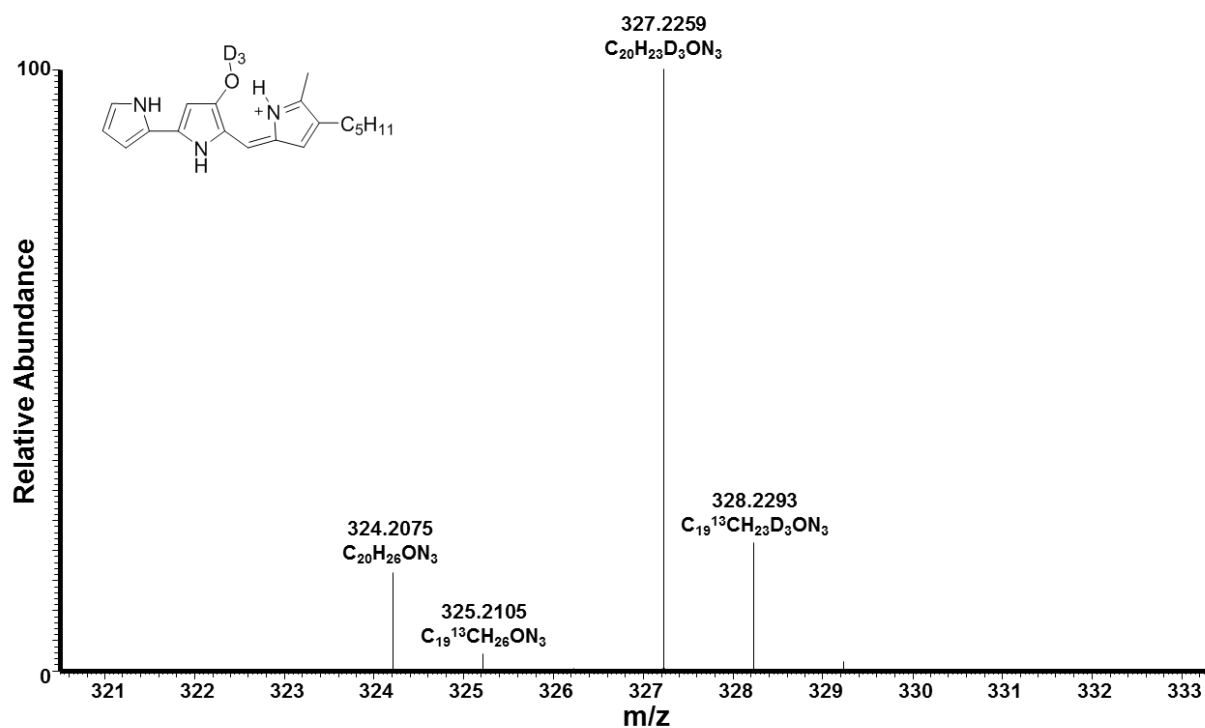


Abb. S106: HRMS-Spektrum von Prodigiosin mit eingebauter Methyl-D₃ Gruppe von [Methyl-D₃]-L-Methionin (Verbindung 3 [$M+H$]⁺: m/z 327, $C_{20}H_{23}D_3N_3O$).

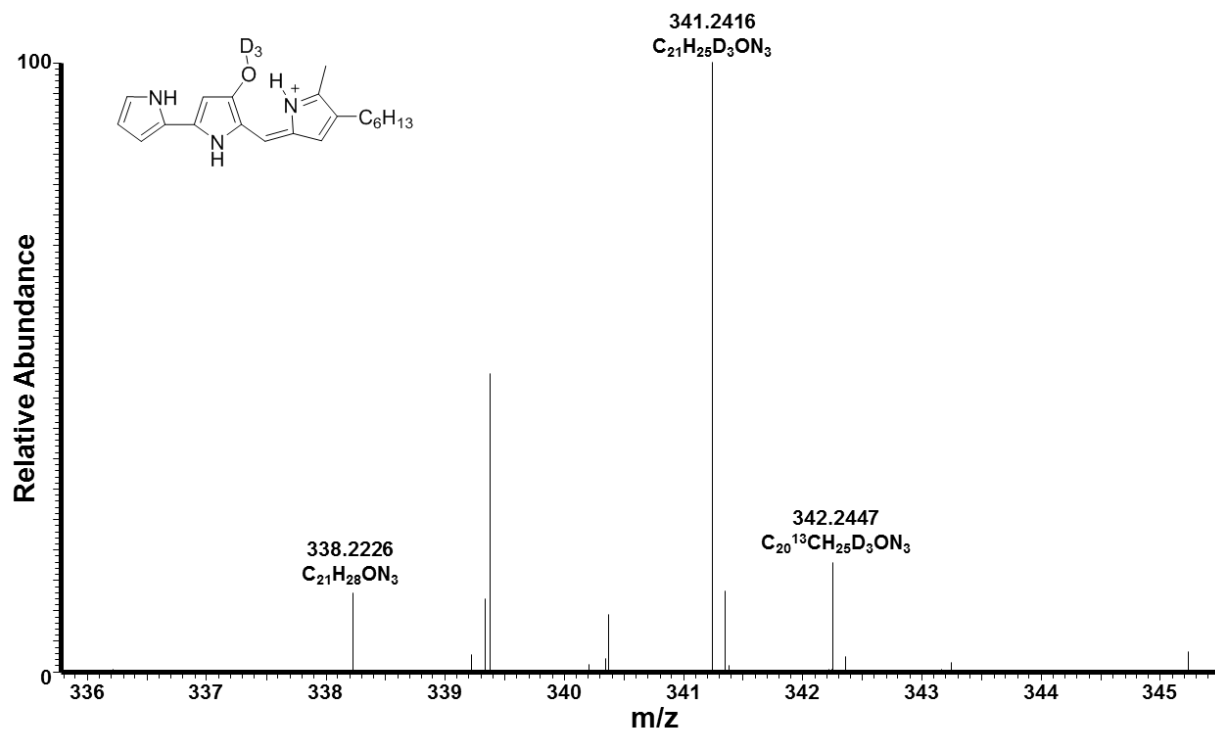


Abb. S107: HRMS-Spektrum von 2-Methyl-3-hexyl-Prodiginin mit eingebauter Methyl- D_3 Gruppe von [Methyl- D_3]-L-Methionin (Verbindung 4 $[M+H]^+$: m/z 341, $C_{21}H_{25}D_3N_3O$).

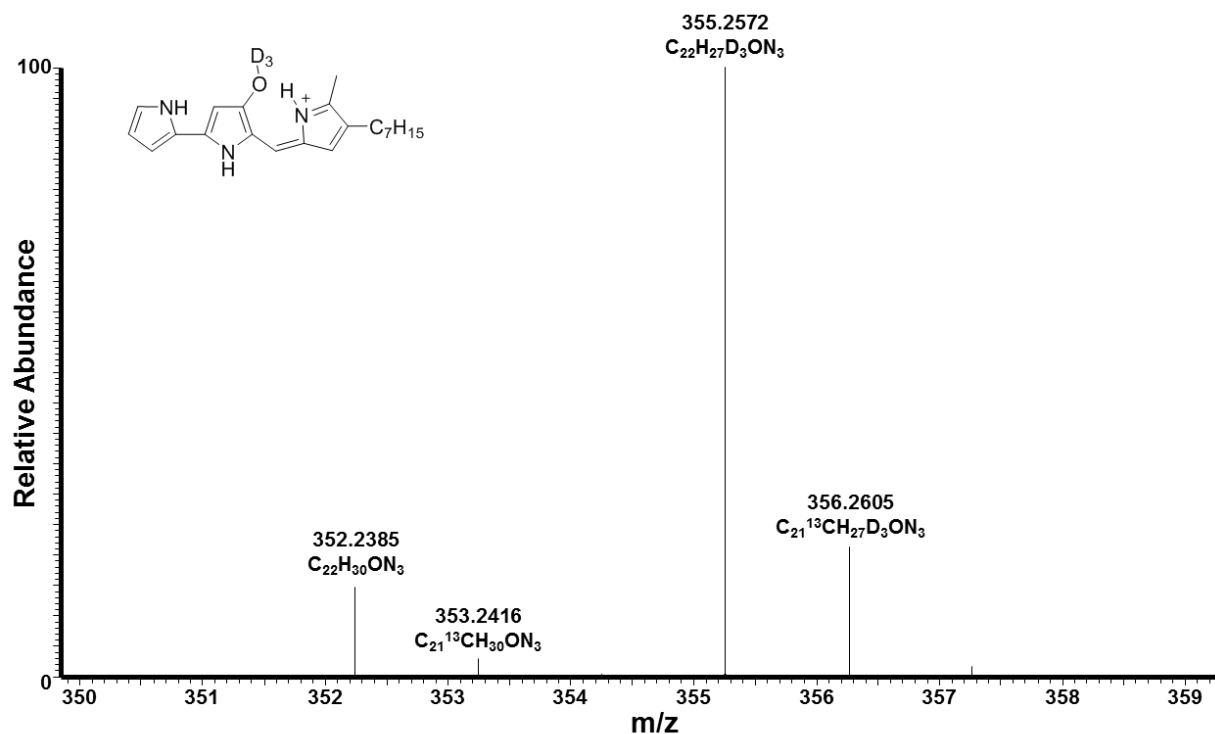


Abb. S108: HRMS-Spektrum von 2-Methyl-3-heptyl-Prodiginin mit eingebauter Methyl- D_3 Gruppe von [Methyl- D_3]-L-Methionin (Verbindung 5 $[M+H]^+$: m/z 355, $C_{22}H_{27}D_3N_3O$).

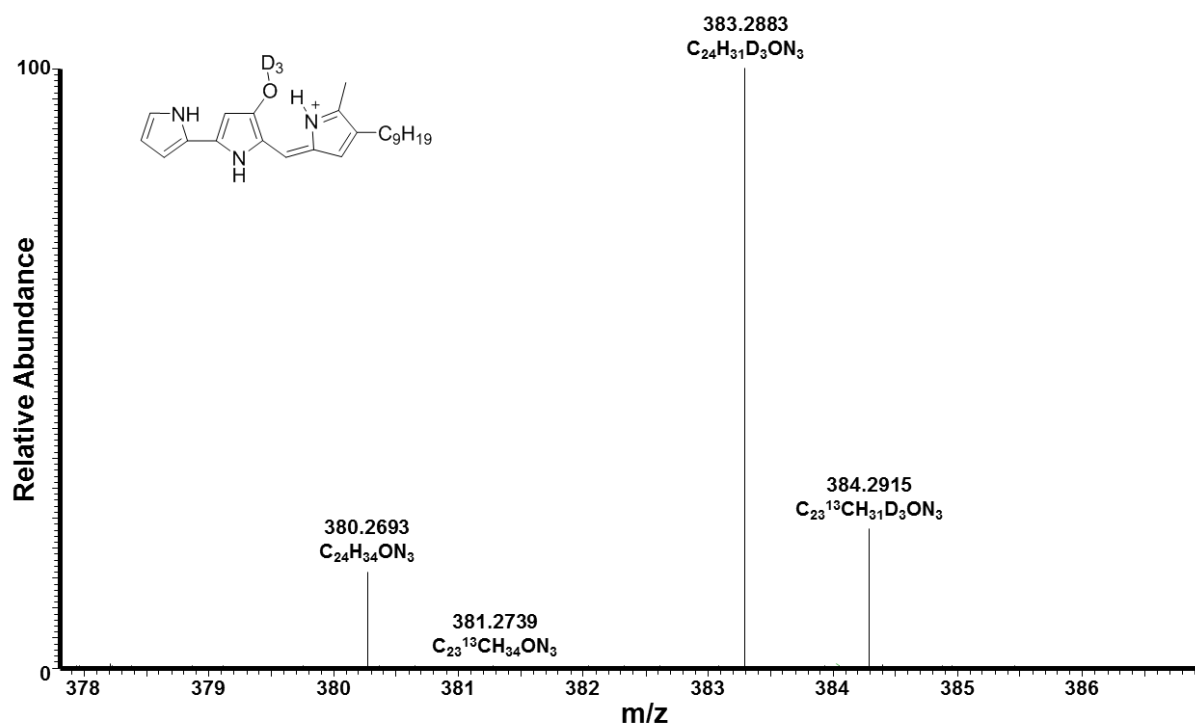


Abb. S109: HRMS-Spektrum von 2-Methyl-3-nonyl-Prodiginin mit eingebauter Methyl-D₃ Gruppe von [Methyl-D₃]-L-Methionin (Verbindung 7 $[M+H]^+$: m/z 383, $C_{24}H_{31}D_3N_3O$).

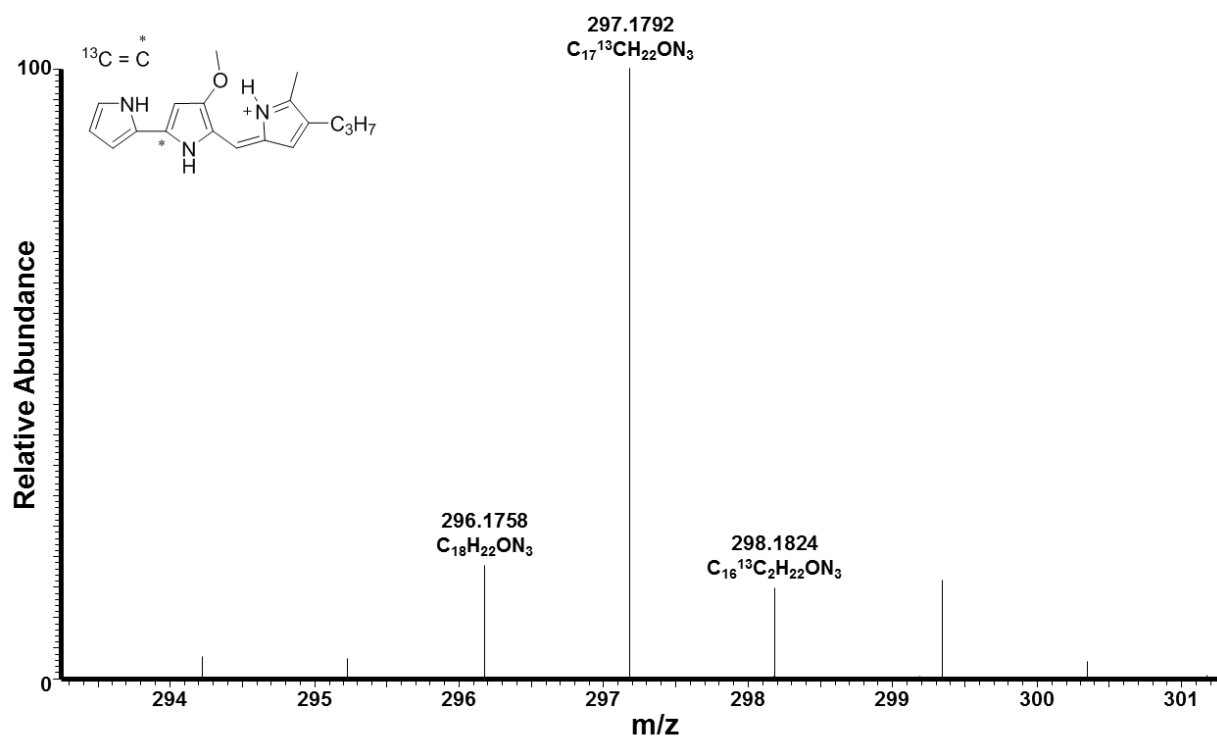


Abb. S110: HRMS-Spektrum von 2-Methyl-3-propyl-Prodiginin mit eingebautem $[1-^{13}C]$ -L-Prolin (Verbindung 1 $[M+H]^+$: m/z 297, $C_{17}^{13}CH_{22}N_3O$).

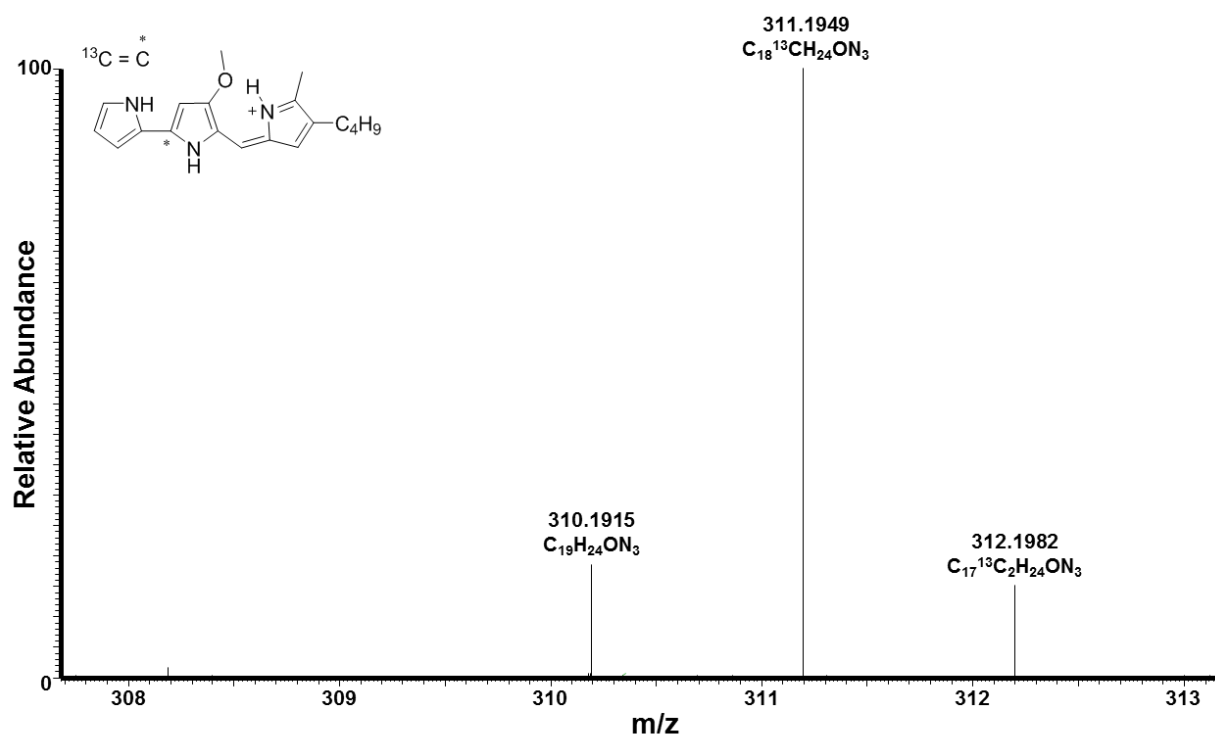


Abb. S111: HRMS-Spektrum von 2-Methyl-3-butyl-Prodiginin mit eingebautem [1-¹³C]-L-Prolin (Verbindung 2 [M+H]⁺: *m/z* 311, $C_{18}^{13}CH_{24}N_3O$).

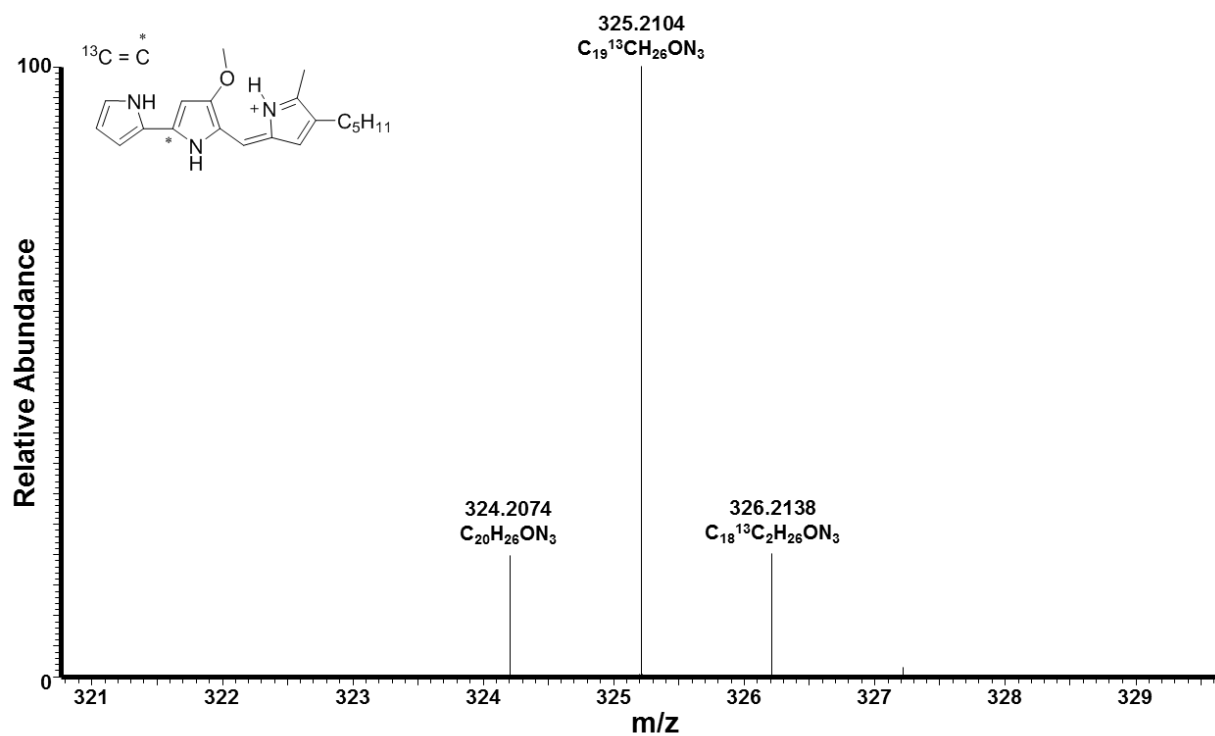


Abb. S112: HRMS-Spektrum von Prodigiosin mit eingebautem [1-¹³C]-L-Prolin (Verbindung 3 [M+H]⁺: *m/z* 325, $C_{19}^{13}CH_{26}N_3O$).

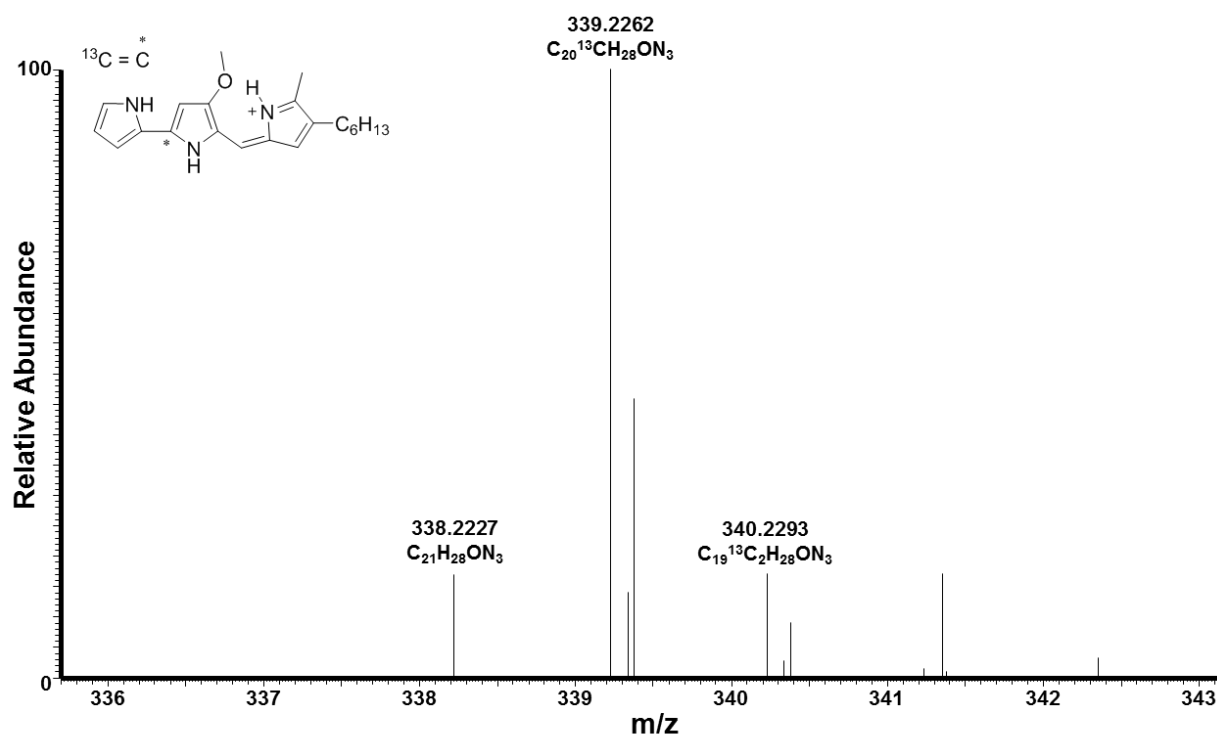


Abb. S113: HRMS-Spektrum von 2-Methyl-3-hexyl-Prodiginin mit eingebautem [1-¹³C]-L-Prolin (Verbindung 4 [M+H]⁺: m/z 339, $C_{20}^{13}CH_{28}N_3O$).

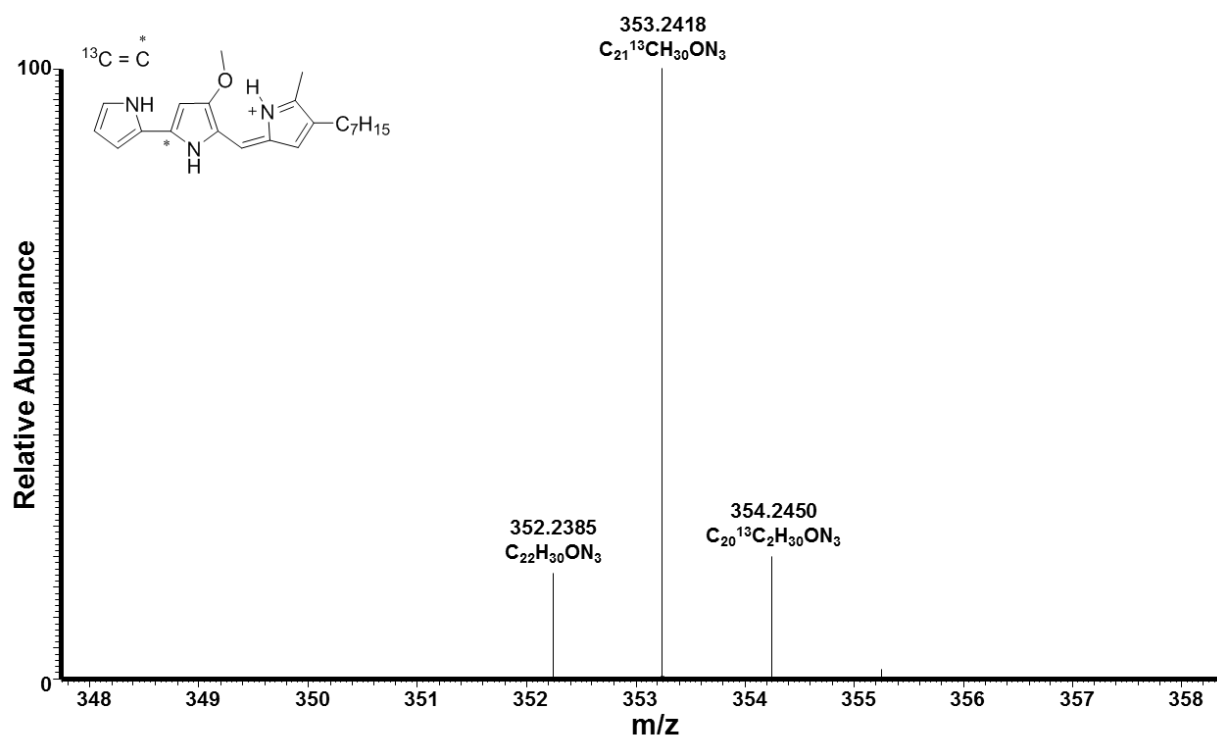


Abb. S114: HRMS-Spektrum von 2-Methyl-3-heptyl-Prodiginin mit eingebautem [1-¹³C]-L-Prolin (Verbindung 5 [M+H]⁺: m/z 353, $C_{21}^{13}CH_{30}N_3O$).

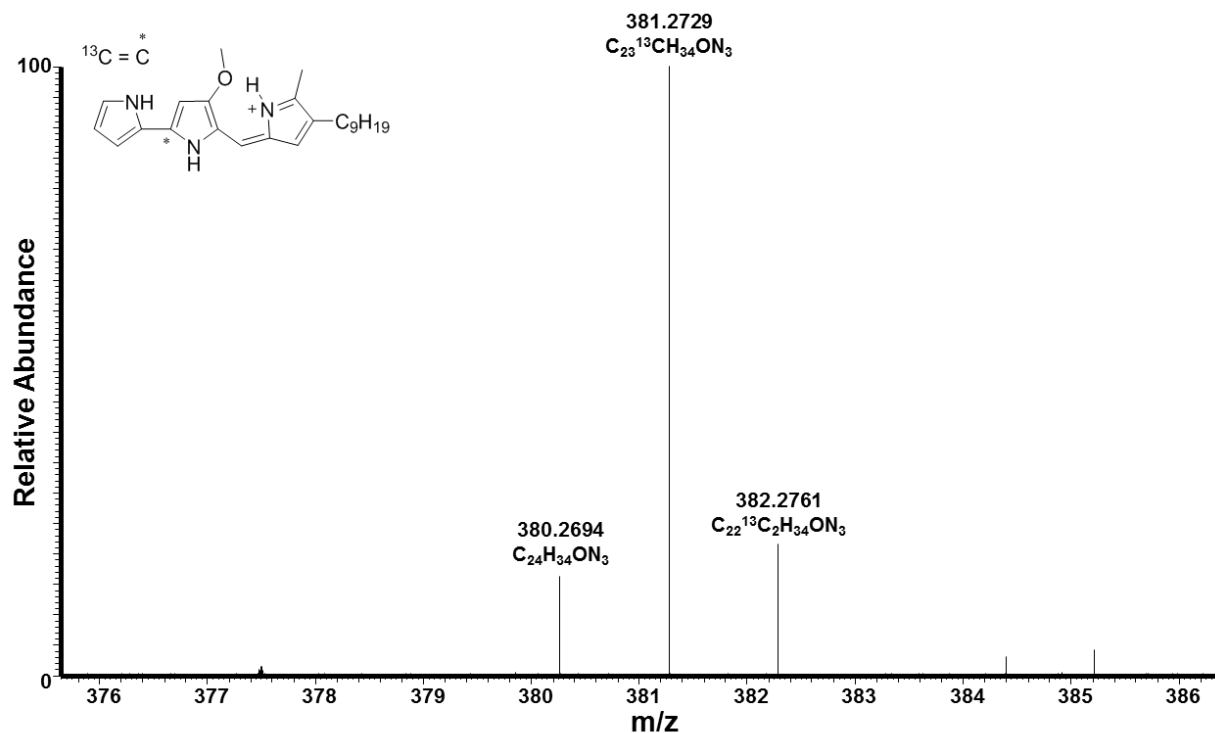


Abb. S115: HRMS-Spektrum von 2-Methyl-3-nonyl-Prodiginin mit eingebautem [1-¹³C]-L-Prolin (Verbindung 7 $[M+H]^+$: m/z 381, $C_{23}^{13}CH_{34}N_3O$).

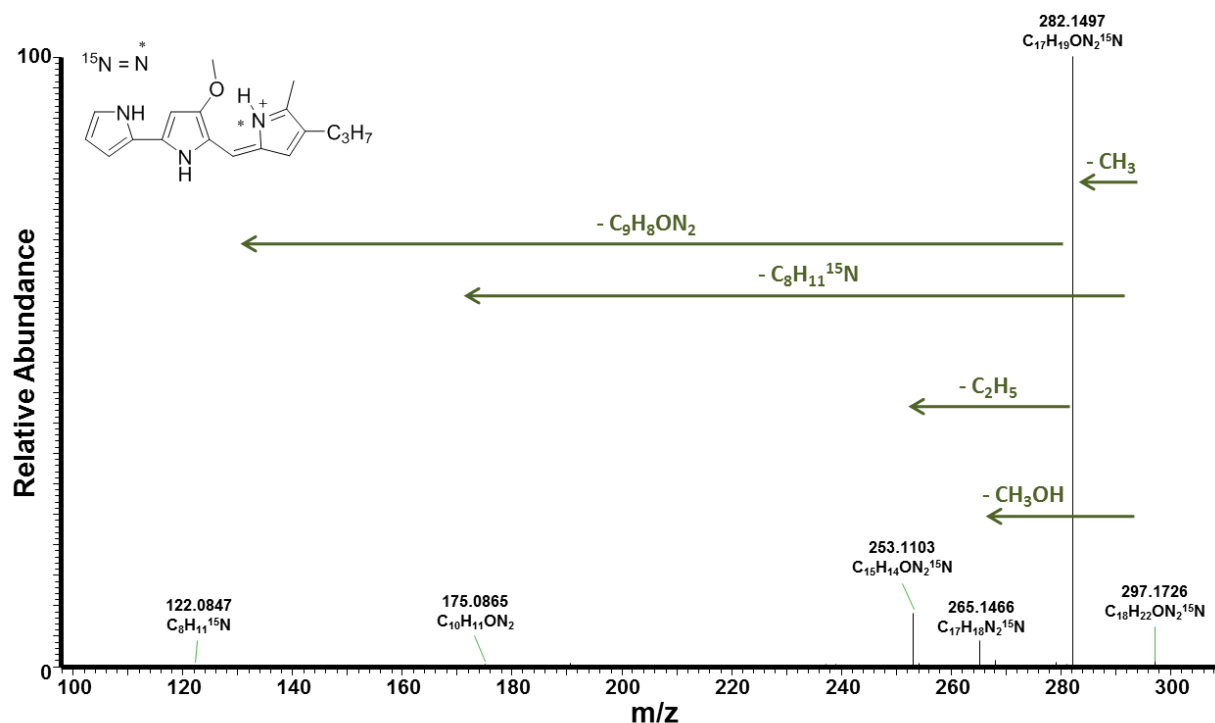


Abb. S116: HRMS²-Spektrum von 2-Methyl-3-propyl-Prodiginin mit eingebautem ¹⁵N von ¹⁵NH₄Cl (Verbindung 1 $[M+H]^+$: m/z 297, $C_{18}H_{22}N_2^{15}NO$).

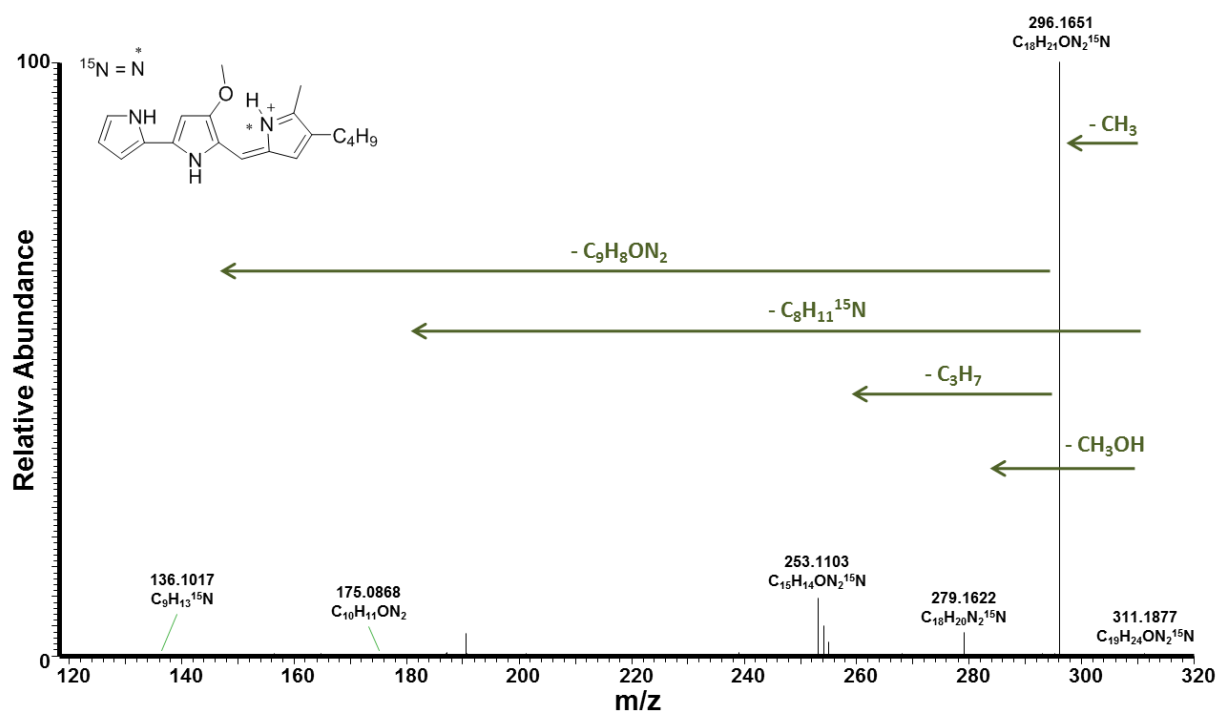


Abb. S117: HRMS²-Spektrum von 2-Methyl-3-butyl-Prodiginin mit eingebautem ^{15}N von $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ (Verbindung 2 $[\text{M}+\text{H}]^+$: m/z 311, $\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{N}_2^{15}\text{NO}$).

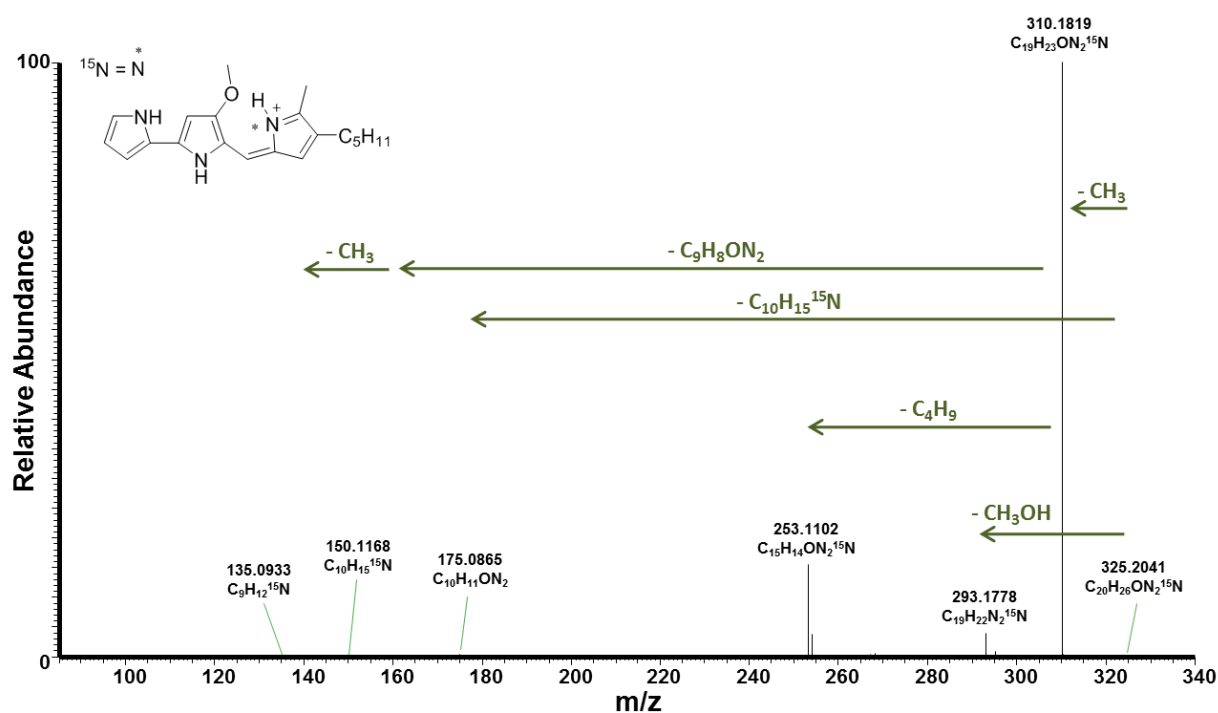


Abb. S118: HRMS²-Spektrum von Prodigiosin mit eingebautem ^{15}N von $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ (Verbindung 3 $[\text{M}+\text{H}]^+$: m/z 325, $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{N}_2^{15}\text{NO}$).

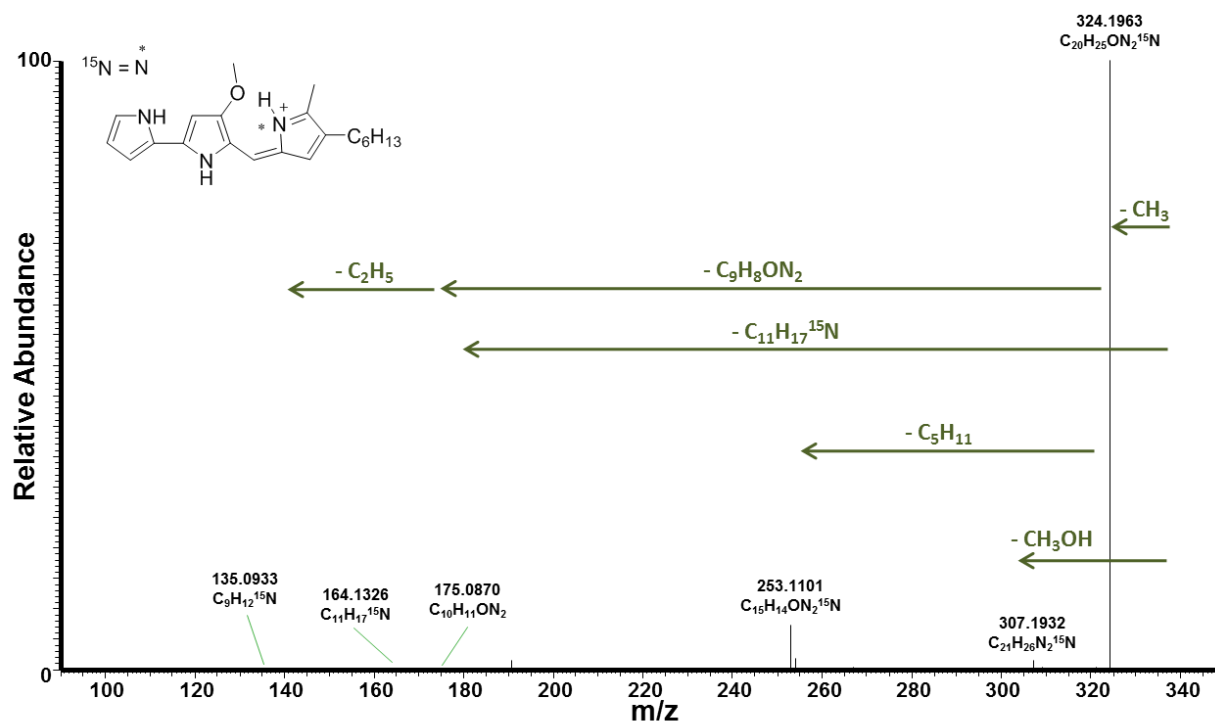


Abb. S119: HRMS²-Spektrum von 2-Methyl-3-hexyl-Prodiginin mit eingebautem ¹⁵N von ¹⁵NH₄Cl (Verbindung 4 [M+H]⁺: m/z 339, C₂₁H₂₈N₂¹⁵NO).

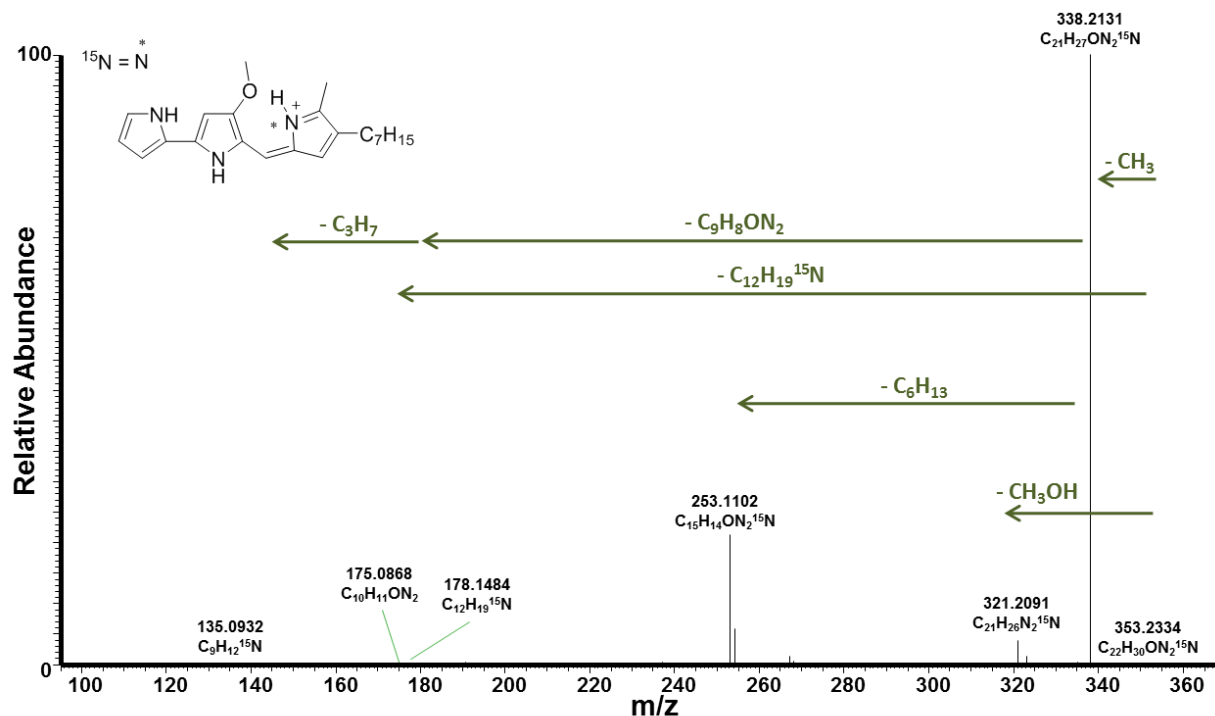


Abb. S120: HRMS²-Spektrum von 2-Methyl-3-heptyl-Prodiginin mit eingebautem ¹⁵N von ¹⁵NH₄Cl (Verbindung 5 [M+H]⁺: m/z 353, C₂₂H₃₀N₂¹⁵NO).

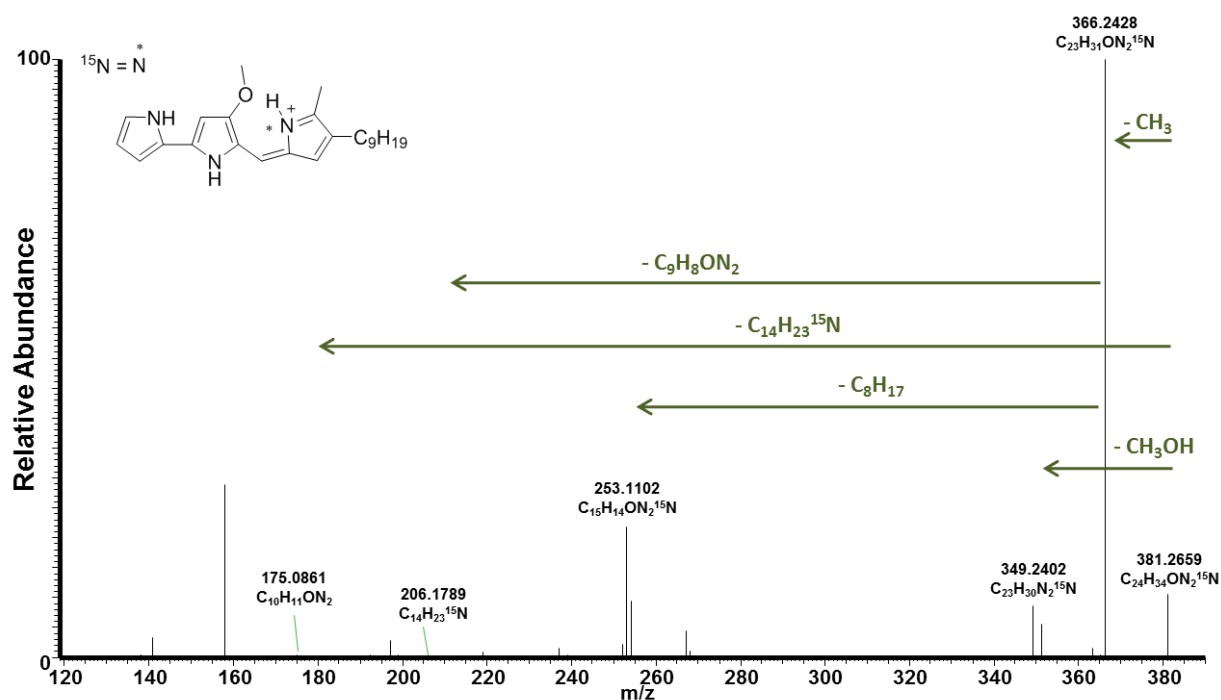


Abb. S121: HRMS²-Spektrum von 2-Methyl-3-nonyl-Prodiginin mit eingebautem ¹⁵N von ¹⁵NH₄Cl (Verbindung 7 [M+H]⁺: *m/z* 381, C₂₄H₃₄N₂¹⁵NO).

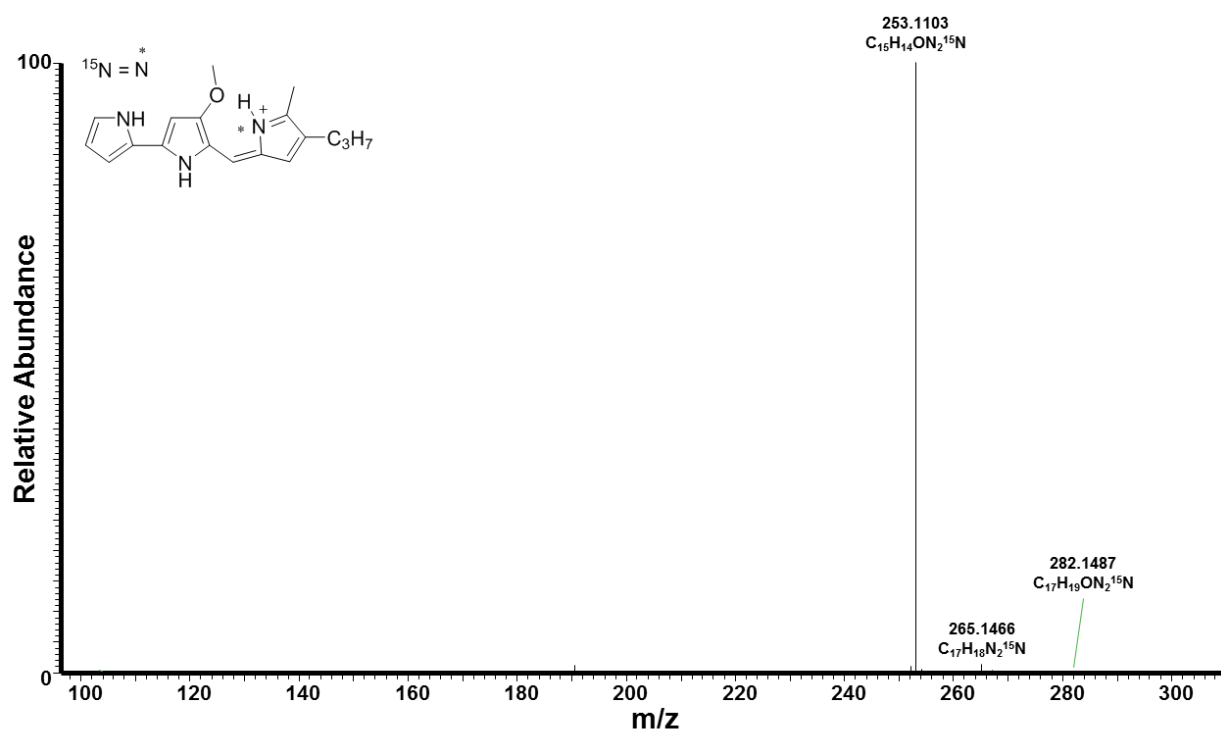


Abb. S122: HRMS³-Spektrum von 2-Methyl-3-propyl-Prodiginin mit eingebautem ¹⁵N von ¹⁵NH₄Cl (Verbindung 1 [M+H]⁺: *m/z* 297 via 272, C₁₈H₂₂N₂¹⁵NO).

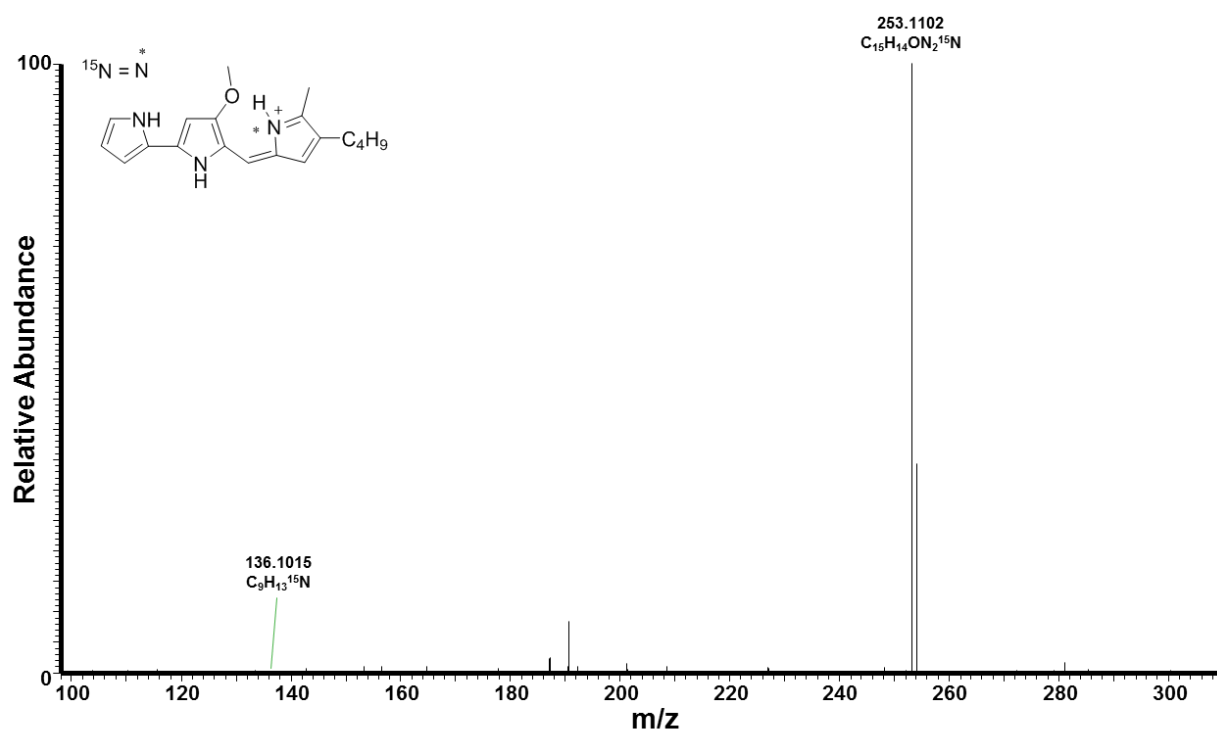


Abb. S123: HRMS³-Spektrum von 2-Methyl-3-butyl-Prodiginin mit eingebautem ¹⁵N von ¹⁵NH₄Cl (Verbindung 2 [M+H]⁺: m/z 311 via 296, C₁₉H₂₄N₂¹⁵NO).

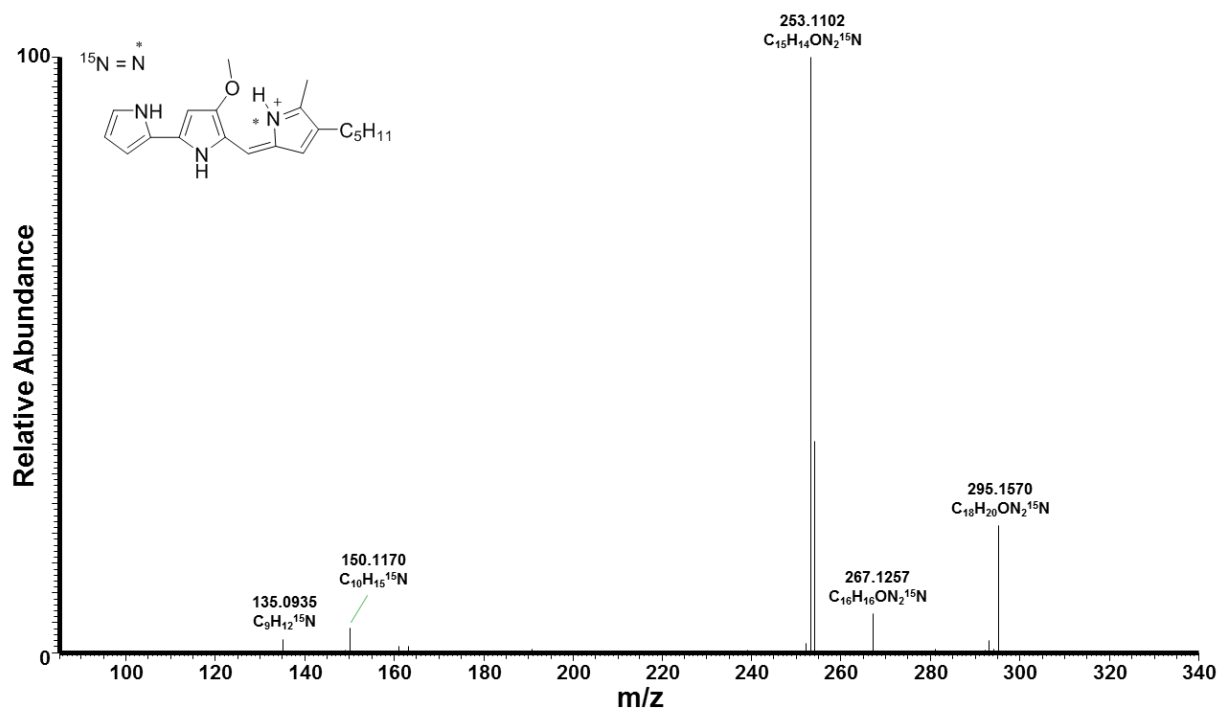


Abb. S124: HRMS³-Spektrum von Prodigiosin mit eingebautem ¹⁵N von ¹⁵NH₄Cl (Verbindung 3 [M+H]⁺: m/z 325 via 310, C₂₀H₂₆N₂¹⁵NO).

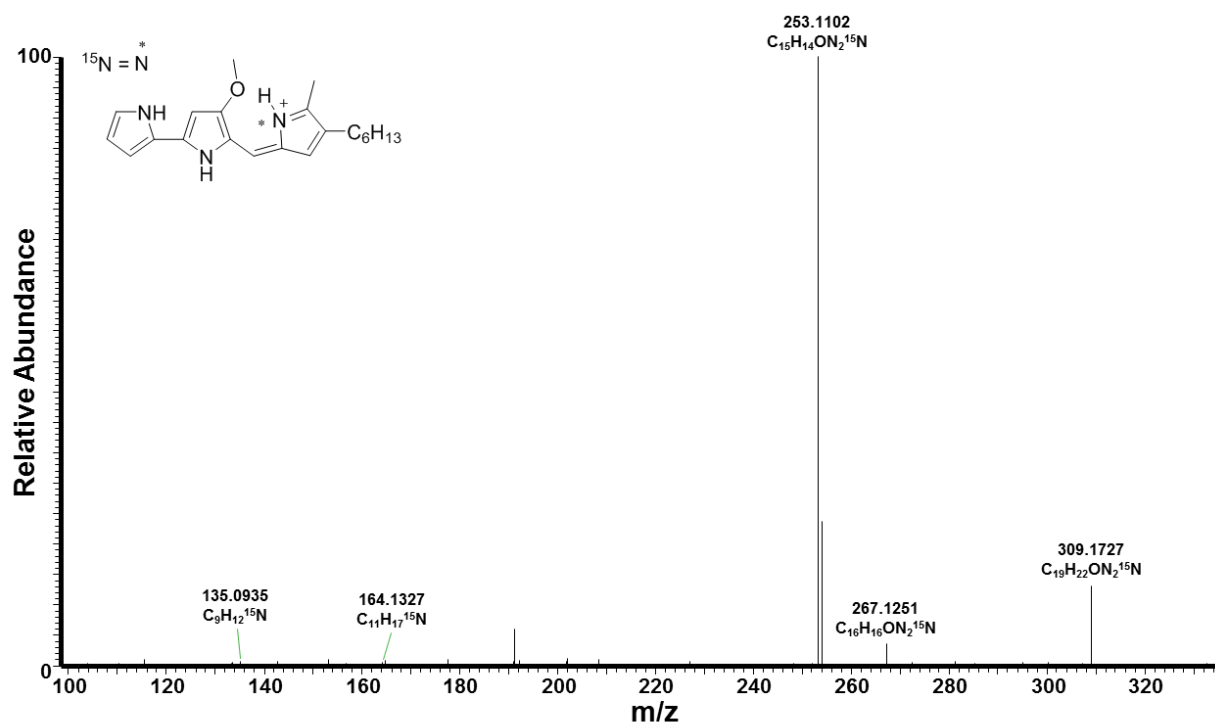


Abb. S125: HRMS³-Spektrum von 2-Methyl-3-hexyl-Prodiginin mit eingebautem ¹⁵N von ¹⁵NH₄Cl (Verbindung 4 [M+H]⁺: m/z 339 via 324, C₂₁H₂₈N₂¹⁵NO).

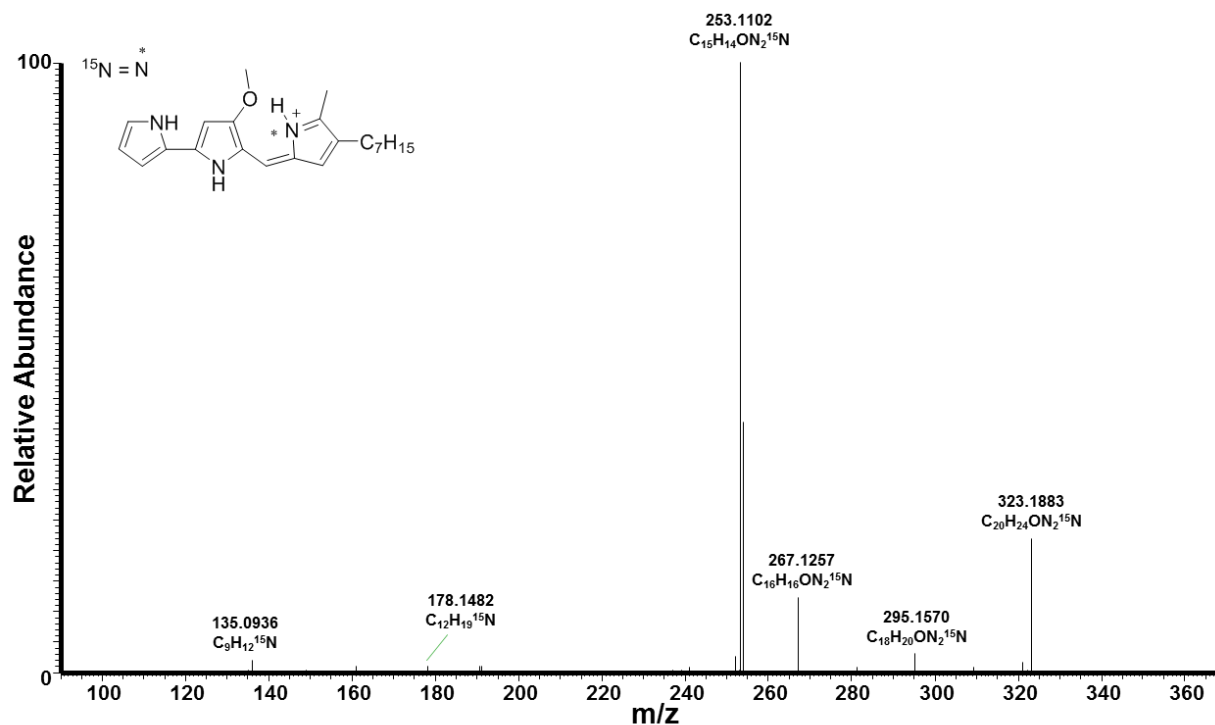


Abb. S126: HRMS³-Spektrum von 2-Methyl-3-heptyl-Prodiginin mit eingebautem ¹⁵N von ¹⁵NH₄Cl (Verbindung 5 [M+H]⁺: m/z 353 via 338, C₂₂H₃₀N₂¹⁵NO).

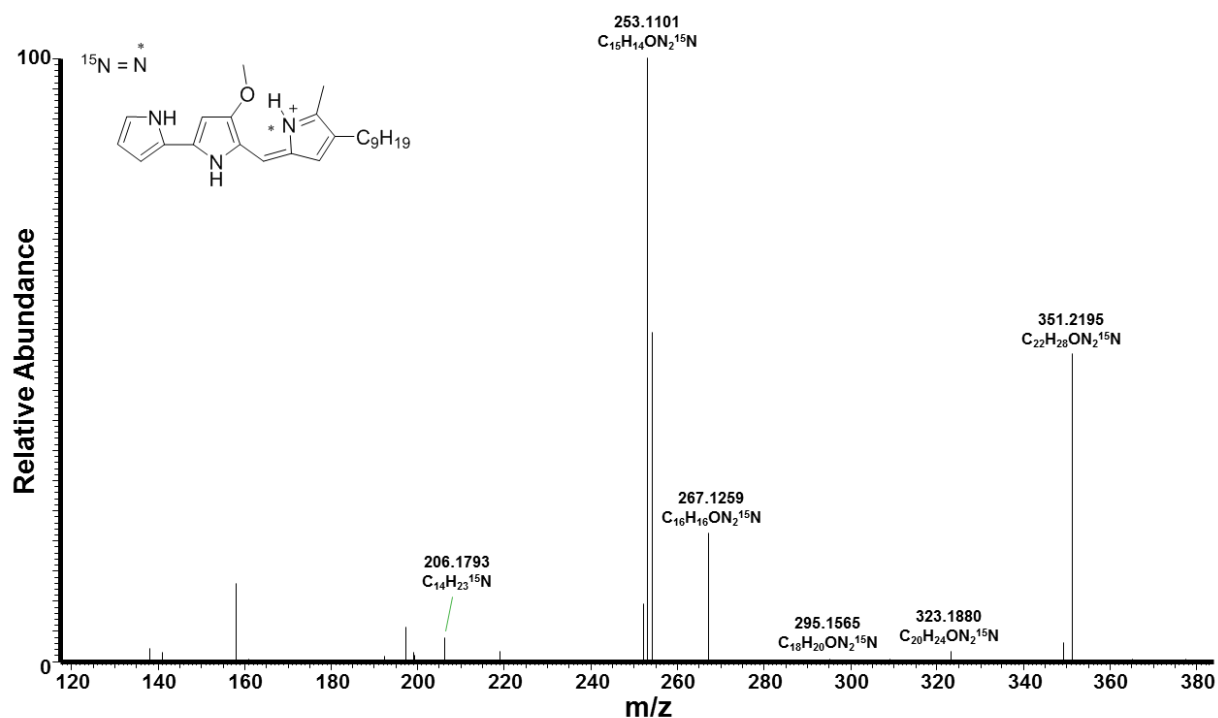


Abb. S127: HRMS³-Spektrum von 2-Methyl-3-nonyl-Prodiginin mit eingebautem ¹⁵N von ¹⁵NH₄Cl (Verbindung 7 [M+H]⁺: m/z 381 via 366, C₂₄H₃₄N₂¹⁵NO).

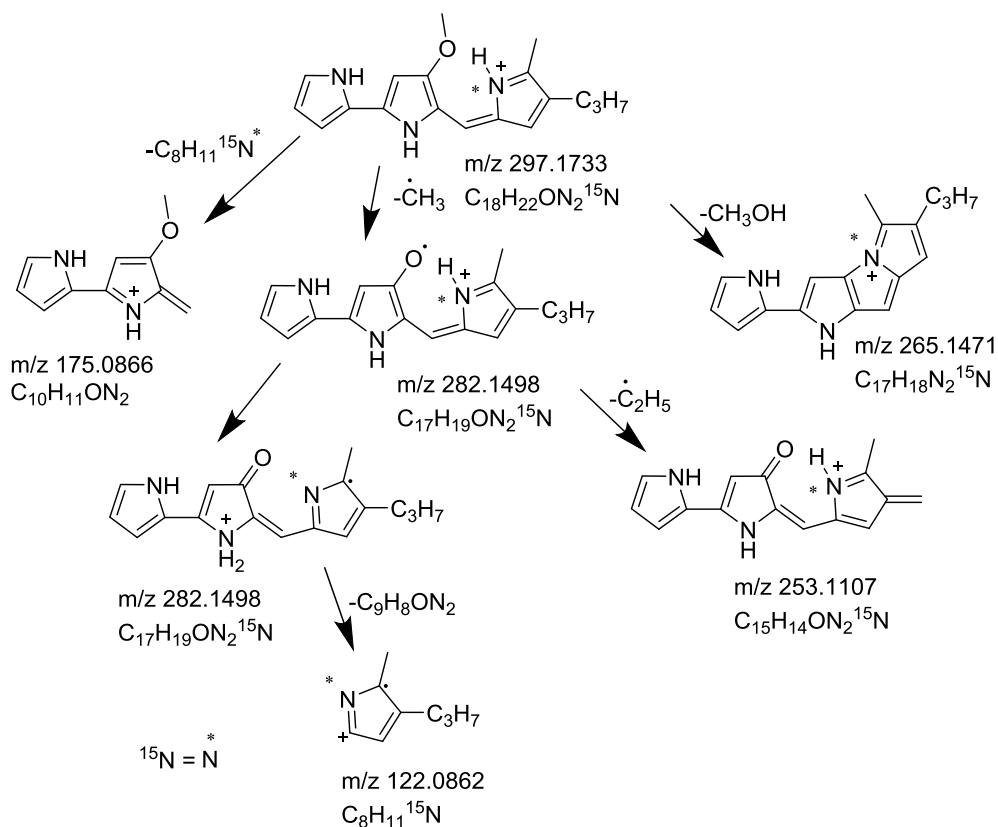


Abb. S128: Fragmentierungsweg von 2-Methyl-3-propyl-Prodiginin mit eingebautem ¹⁵N von ¹⁵NH₄Cl (Verbindung 1 [M+H]⁺: m/z 297, C₁₈H₂₂N₂¹⁵NO).

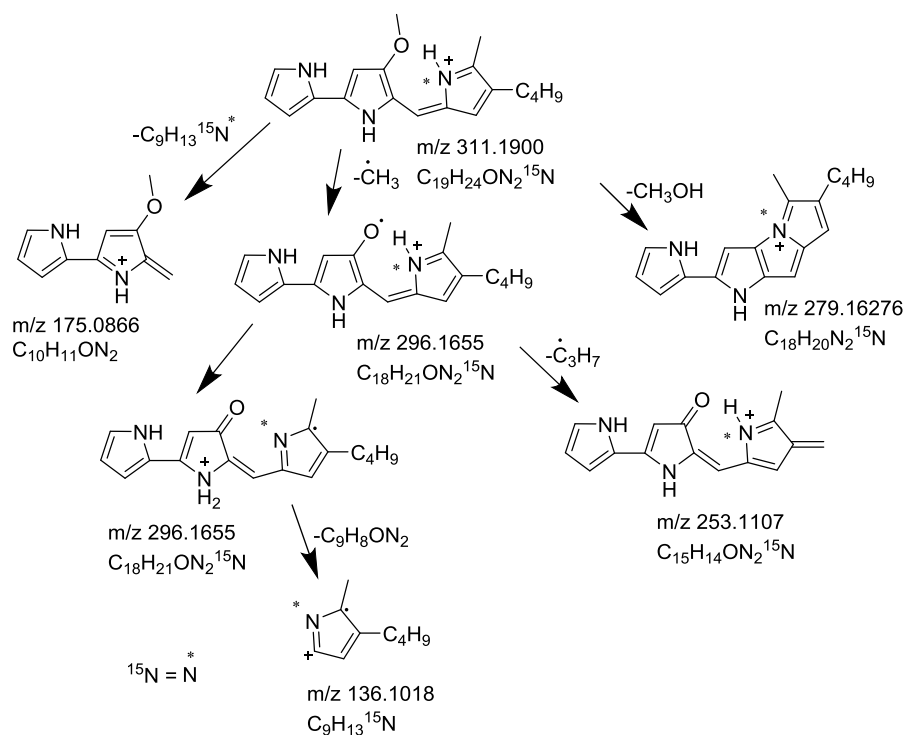


Abb. S129: Fragmentierungsweg von 2-Methyl-3-butyl-Prodiginin mit eingebautem ^{15}N von $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ (Verbindung 2 $[\text{M}+\text{H}]^+$: m/z 311, $\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{N}_2^{15}\text{NO}$).

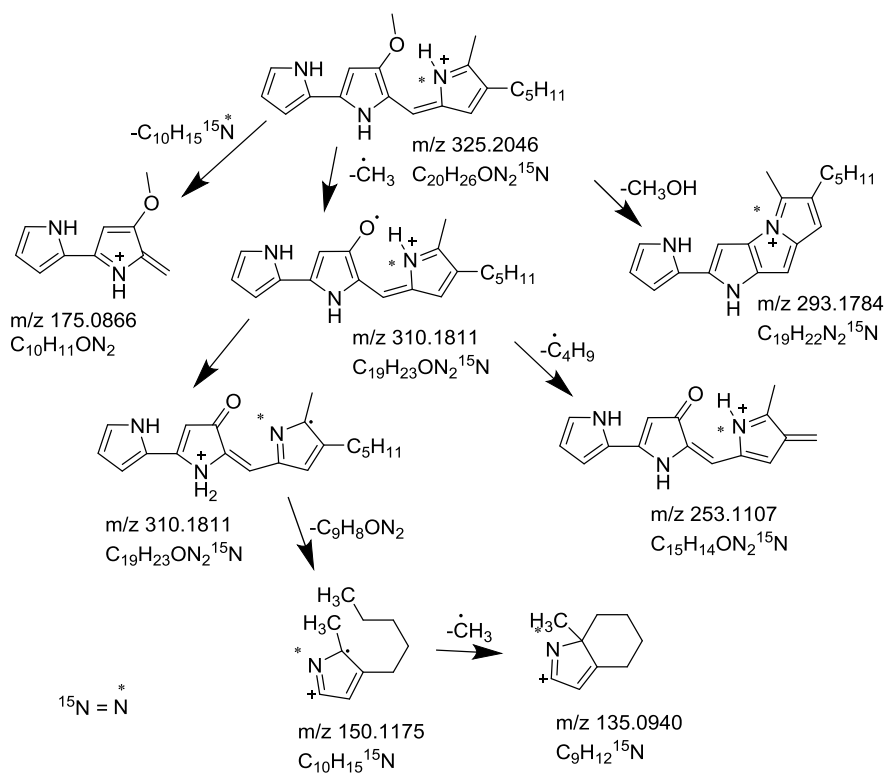


Abb. S130: Fragmentierungsweg von Prodigiosin mit eingebautem ^{15}N von $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ (Verbindung 3 $[\text{M}+\text{H}]^+$: m/z 325, $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{N}_2^{15}\text{NO}$).

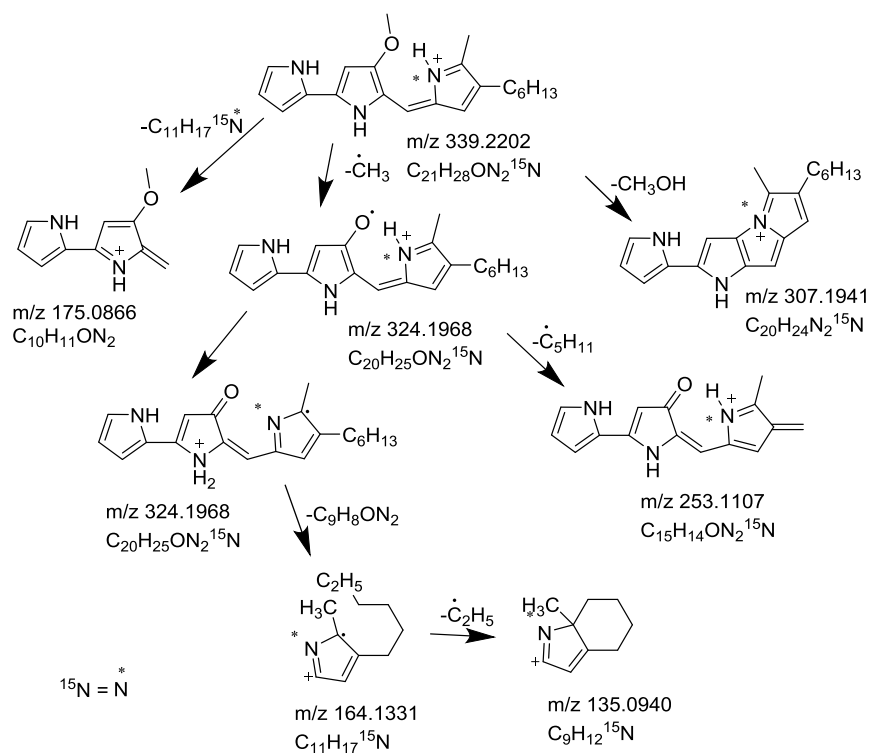


Abb. S131: Fragmentierungsweg von 2-Methyl-3-hexyl-Prodiginin mit eingebautem ^{15}N von $^{15}NH_4Cl$ (Verbindung 4 $[M+H]^+$: m/z 339, $C_{21}H_{28}N_2^{15}NO$).

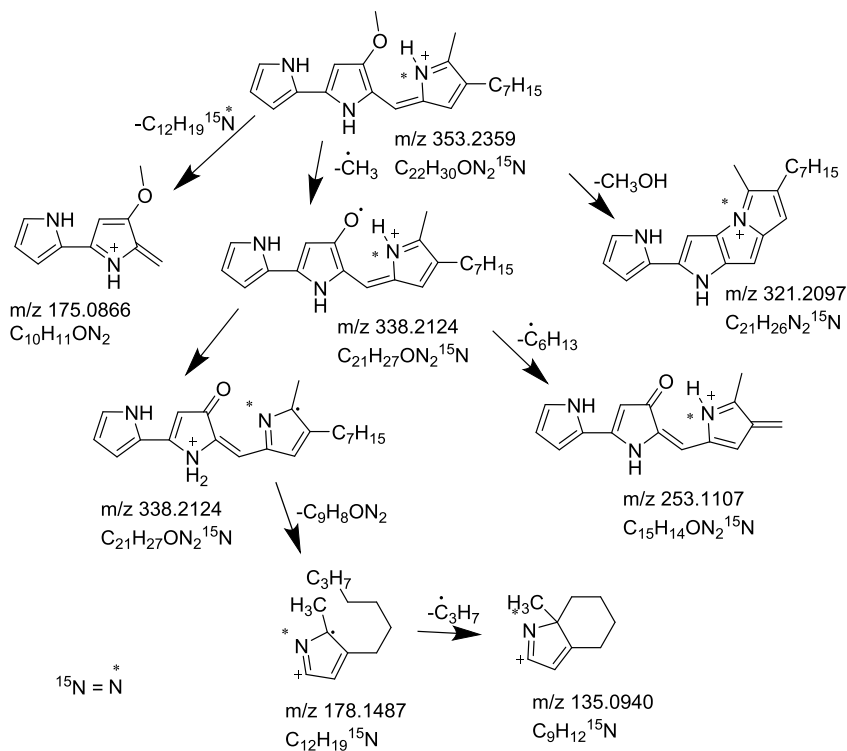


Abb. S132: Fragmentierungsweg von 2-Methyl-3-heptyl-Prodiginin mit eingebautem ^{15}N von $^{15}NH_4Cl$ (Verbindung 5 $[M+H]^+$: m/z 353, $C_{22}H_{30}N_2^{15}NO$).

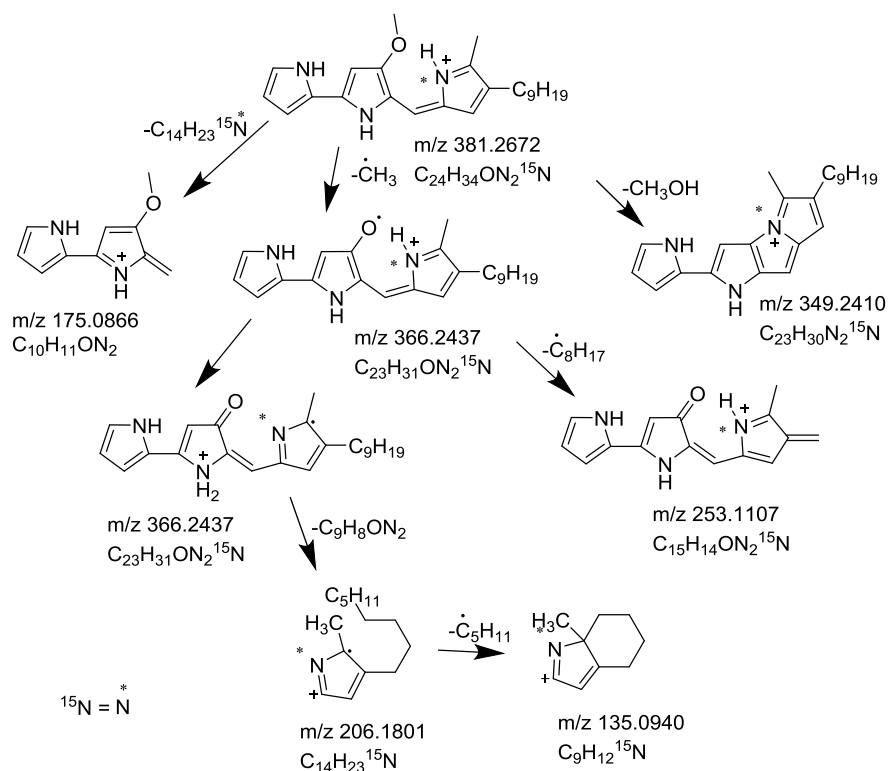


Abb. S133: Fragmentierungsweg von 2-Methyl-3-nonyl-Prodiginin mit eingebautem ^{15}N von $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ (Verbindung 7 $[\text{M}+\text{H}]^+$: m/z 381 via 366, $\text{C}_{24}\text{H}_{34}\text{N}_2^{15}\text{NO}$).

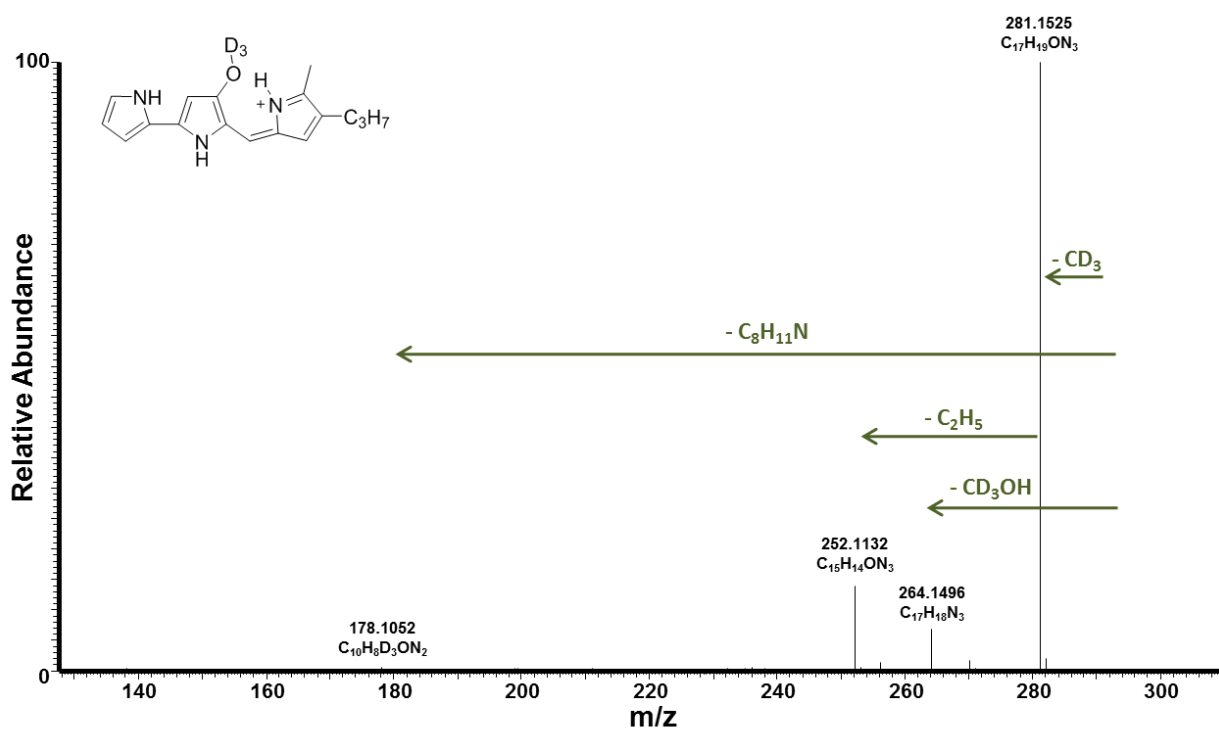


Abb. S134: HRMS²-Spektrum von 2-Methyl-3-propyl-Prodiginin mit eingebauter Methyl- D_3 Gruppe von [Methyl- D_3]-L-Methionin (Verbindung 1 $[\text{M}+\text{H}]^+$: m/z 299, $\text{C}_{18}\text{H}_{19}\text{D}_3\text{N}_3\text{O}$).

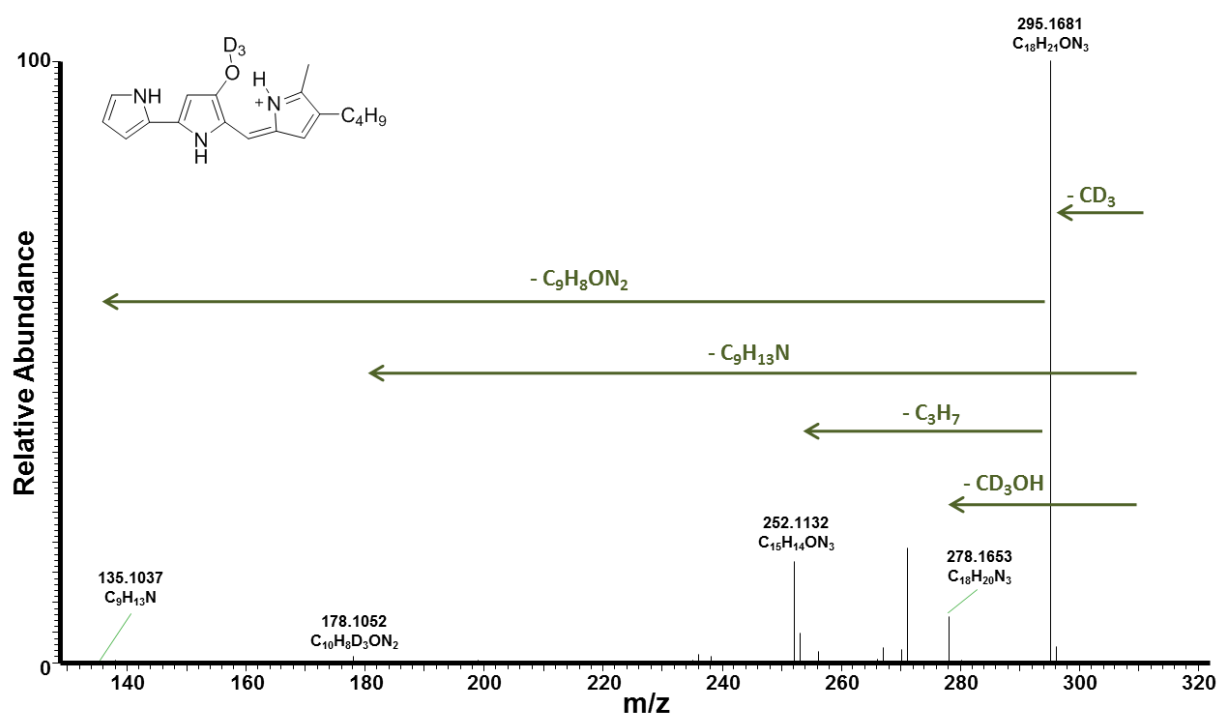


Abb. S135: HRMS²-Spektrum von 2-Methyl-3-butyl-Prodiginin mit eingebauter Methyl-D₃ Gruppe von [Methyl-D₃]-L-Methionin (Verbindung 2 [M+H]⁺: m/z 313, C₁₉H₂₁D₃N₃O).

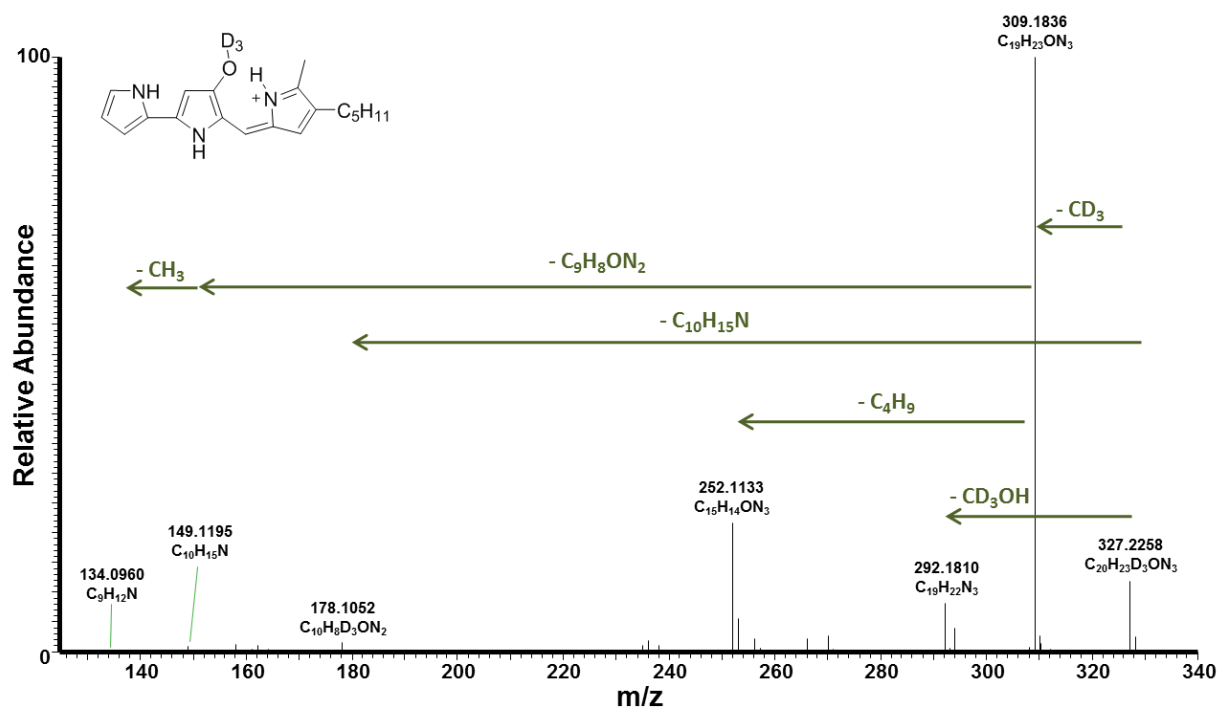


Abb. S136: HRMS²-Spektrum von Prodigiosin mit eingebauter Methyl-D₃ Gruppe von [Methyl-D₃]-L-Methionin (Verbindung 3 [M+H]⁺: m/z 327, C₂₀H₂₃D₃N₃O).

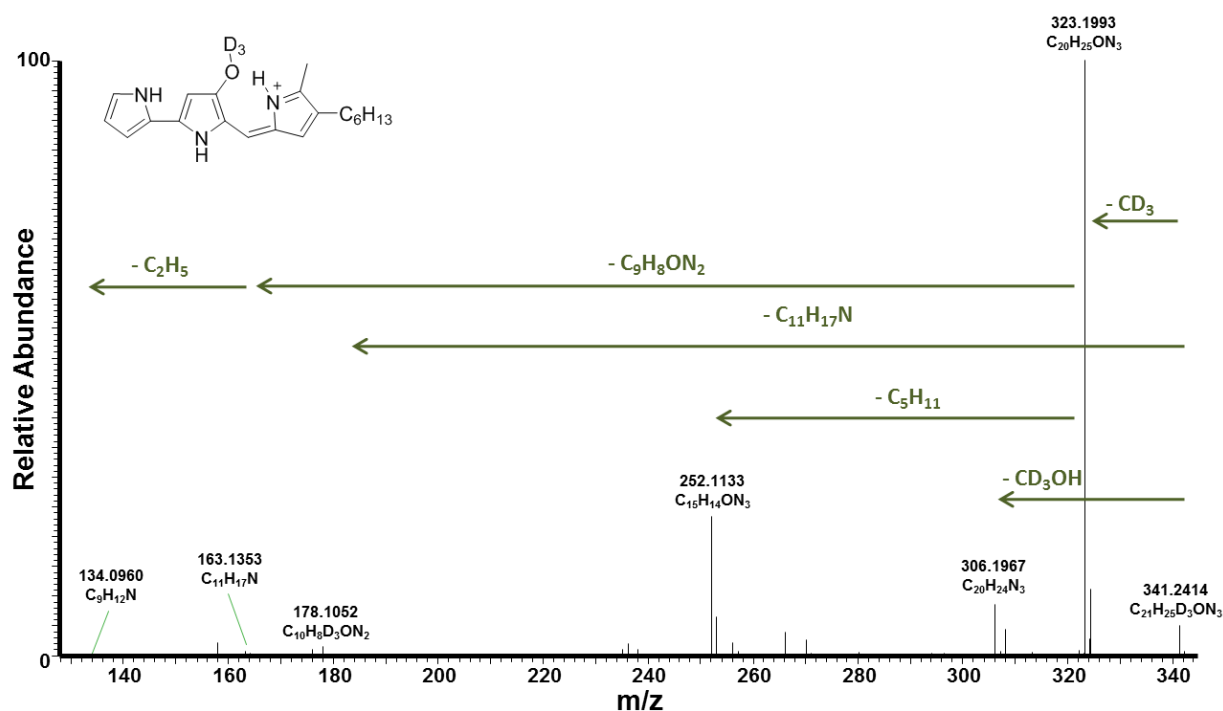


Abb. S137: HRMS²-Spektrum von 2-Methyl-3-hexyl-Prodiginin mit eingebauter Methyl-D₃ Gruppe von [Methyl-D₃]-L-Methionin (Verbindung **4** [M+H]⁺: m/z 341, C₂₁H₂₅D₃N₃O).

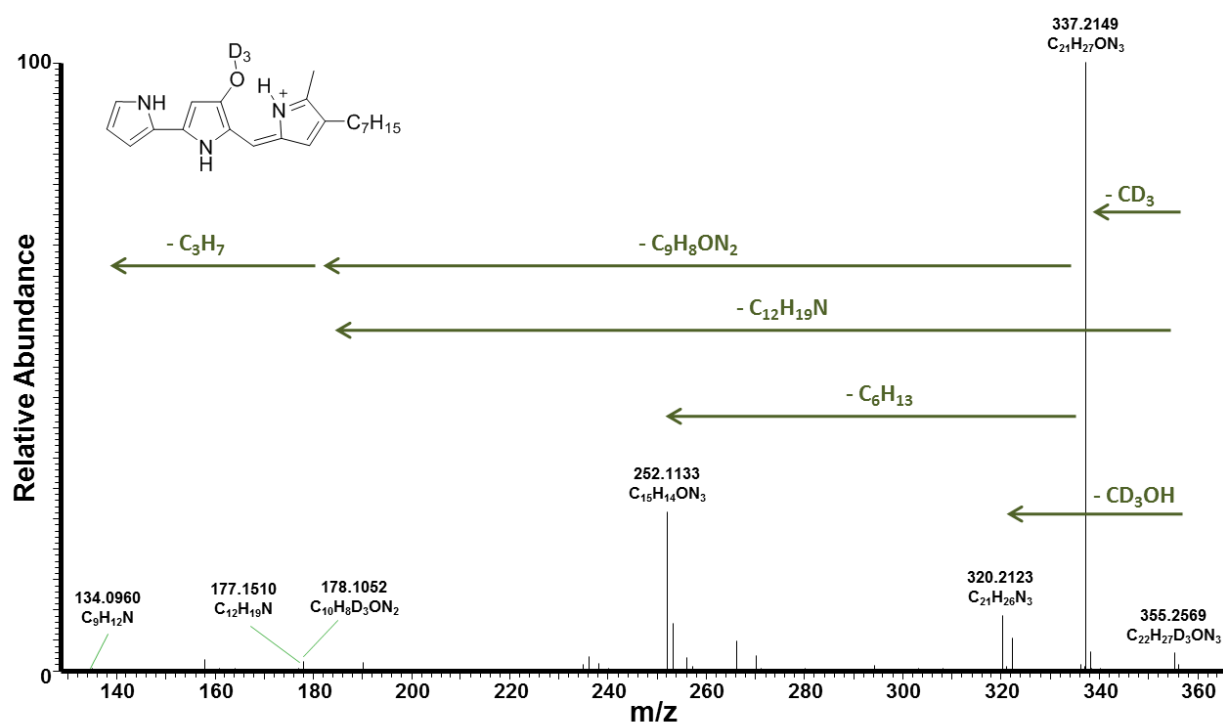


Abb. S138: HRMS²-Spektrum von 2-Methyl-3-heptyl-Prodiginin mit eingebauter Methyl-D₃ Gruppe von [Methyl-D₃]-L-Methionin (Verbindung **5** [M+H]⁺: m/z 355, C₂₂H₂₇D₃N₃O).

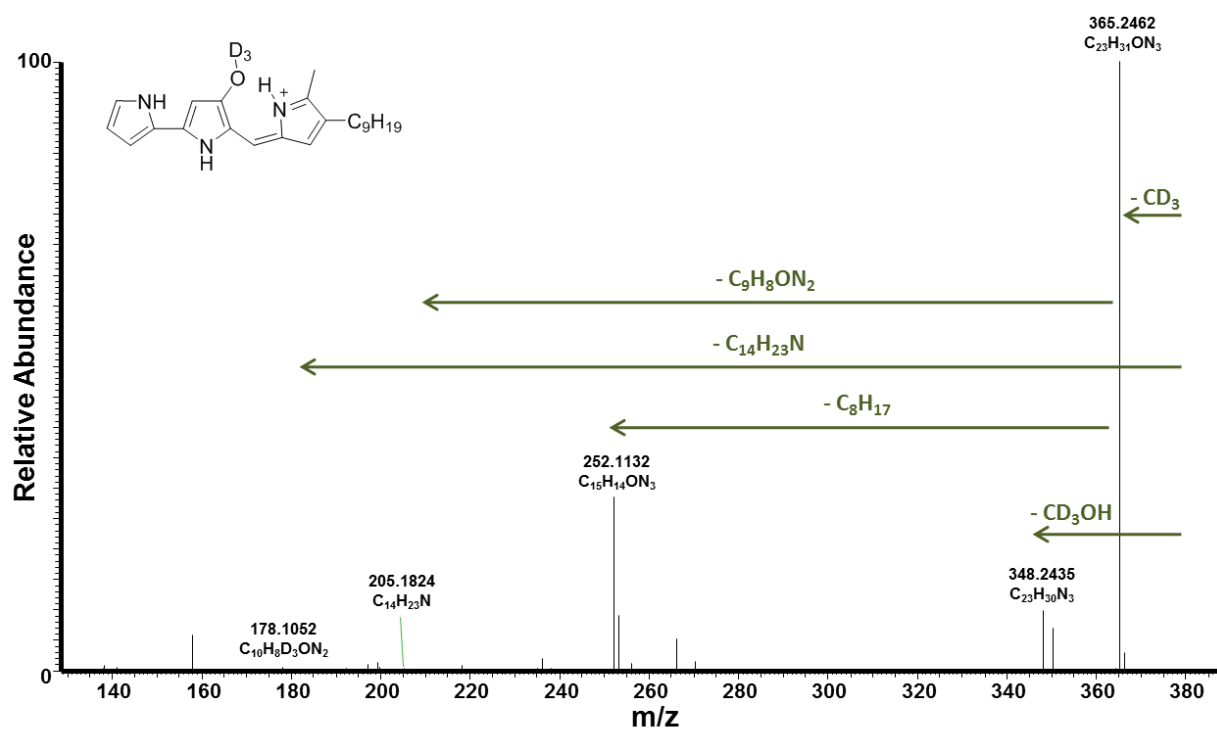


Abb. S139: HRMS²-Spektrum von 2-Methyl-3-nonyl-Prodiginin mit eingebauter Methyl-D₃ Gruppe von [Methyl-D₃]-L-Methionin (Verbindung 7 [$M+H$]⁺: m/z 383, $C_{24}H_{31}D_3N_3O$).

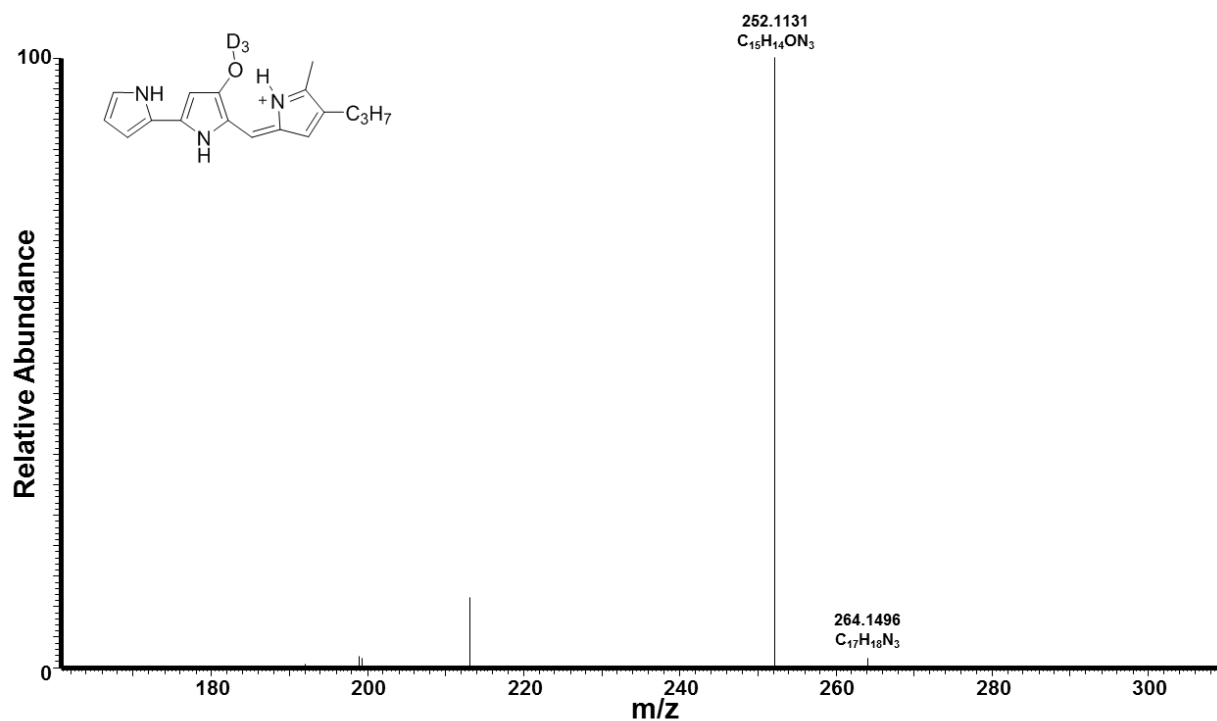


Abb. S140: HRMS³-Spektrum von 2-Methyl-3-propyl-Prodiginin mit eingebauter Methyl-D₃ Gruppe von [Methyl-D₃]-L-Methionin (Verbindung 1 [$M+H$]⁺: m/z 299 via 281, $C_{18}H_{19}D_3N_3O$).

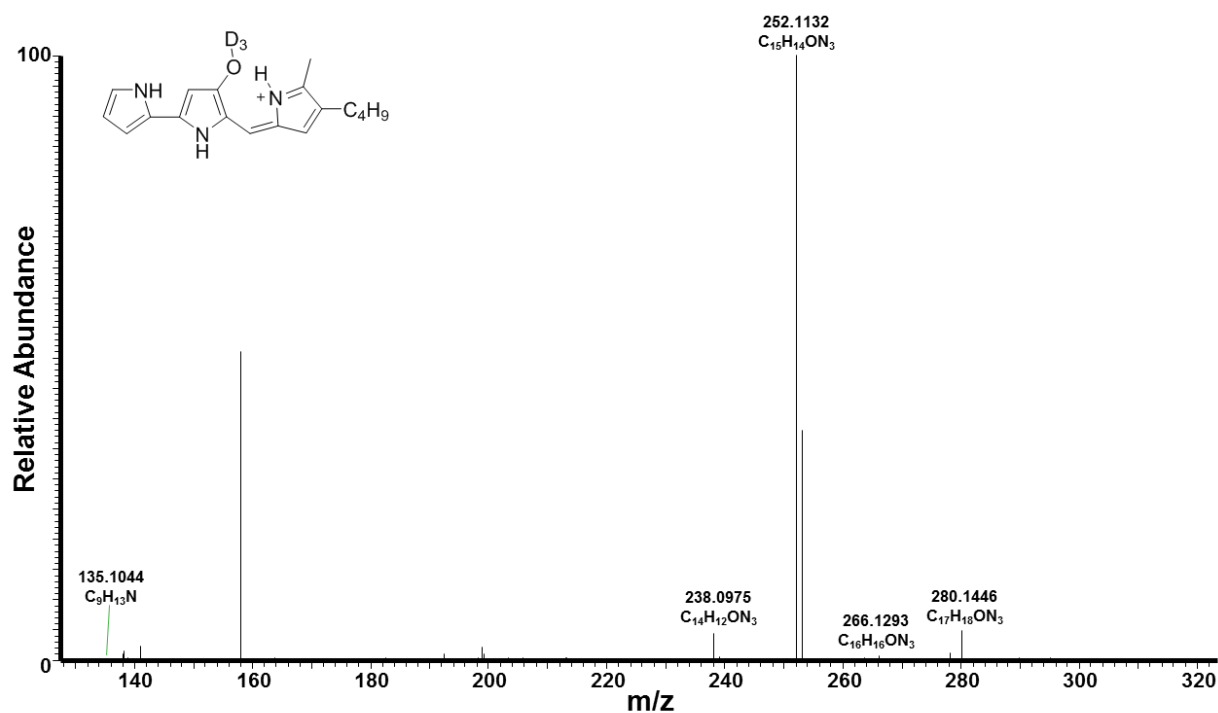


Abb. S141: HRMS³-Spektrum von 2-Methyl-3-butyl-Prodiginin mit eingebauter Methyl-D₃ Gruppe von [Methyl-D₃]-L-Methionin (Verbindung 2 [M+H]⁺: *m/z* 313 via 295, C₁₉H₂₁D₃N₃O).

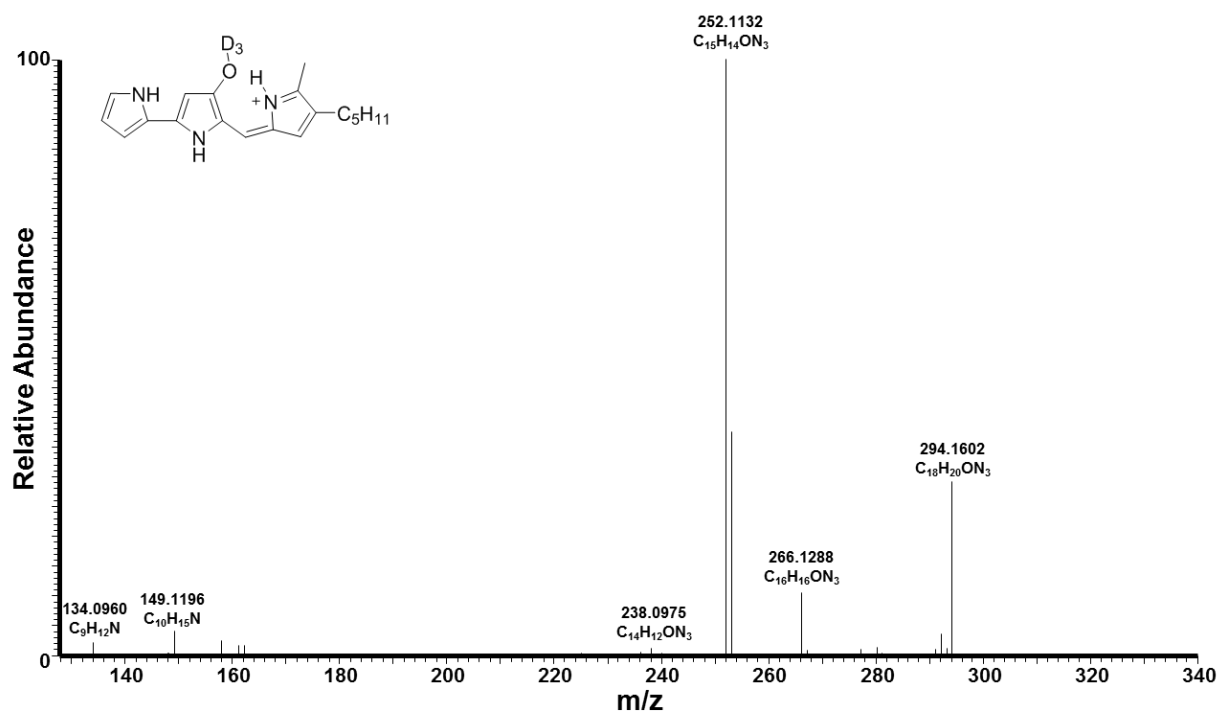


Abb. S142: HRMS³-Spektrum von Prodigiosin mit eingebauter Methyl-D₃ Gruppe von [Methyl-D₃]-L-Methionin (Verbindung 3 [M+H]⁺: *m/z* 327 via 309, C₂₀H₂₃D₃N₃O).

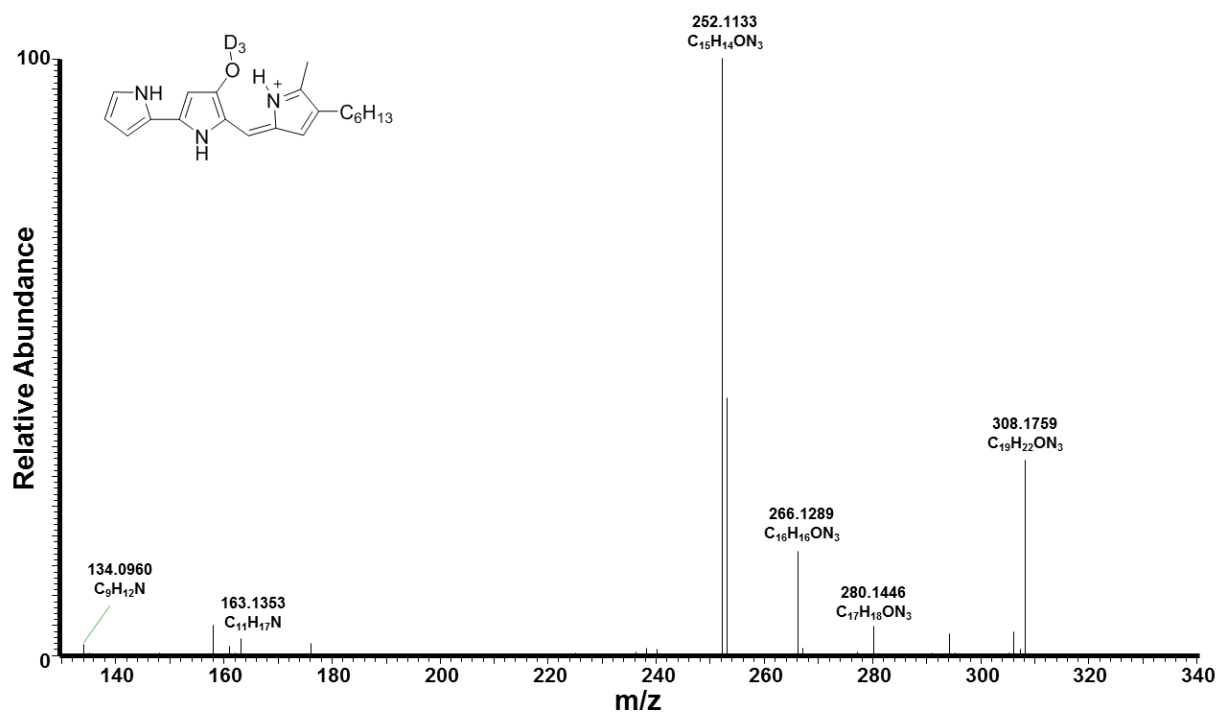


Abb S143: HRMS³-Spektrum von 2-Methyl-3-hexyl-Prodiginin mit eingebauter Methyl-D₃ Gruppe von [Methyl-D₃]-L-Methionin (Verbindung 4 [M+H]⁺: m/z 341 via 323, C₂₁H₂₅D₃N₃O).

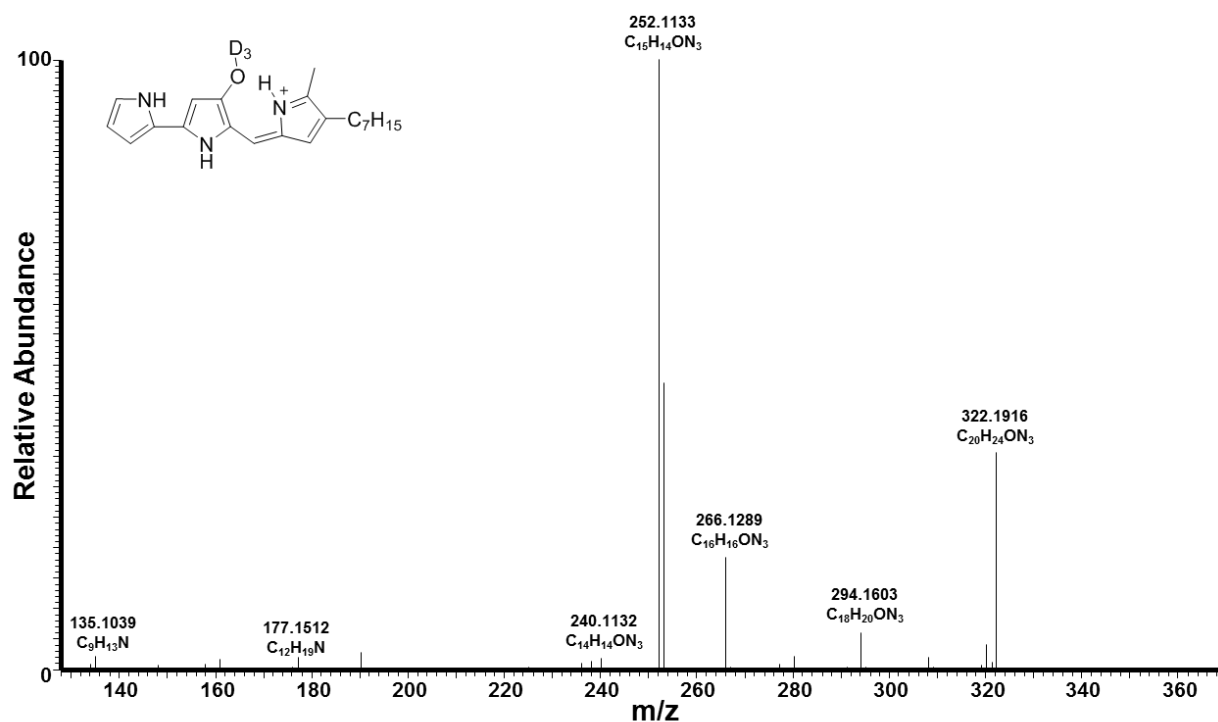


Abb. S144: HRMS³-Spektrum von 2-Methyl-3-heptyl-Prodiginin mit eingebauter Methyl-D₃ Gruppe von [Methyl-D₃]-L-Methionin (Verbindung 5 [M+H]⁺: m/z 355 via 337, C₂₂H₂₇D₃N₃O).

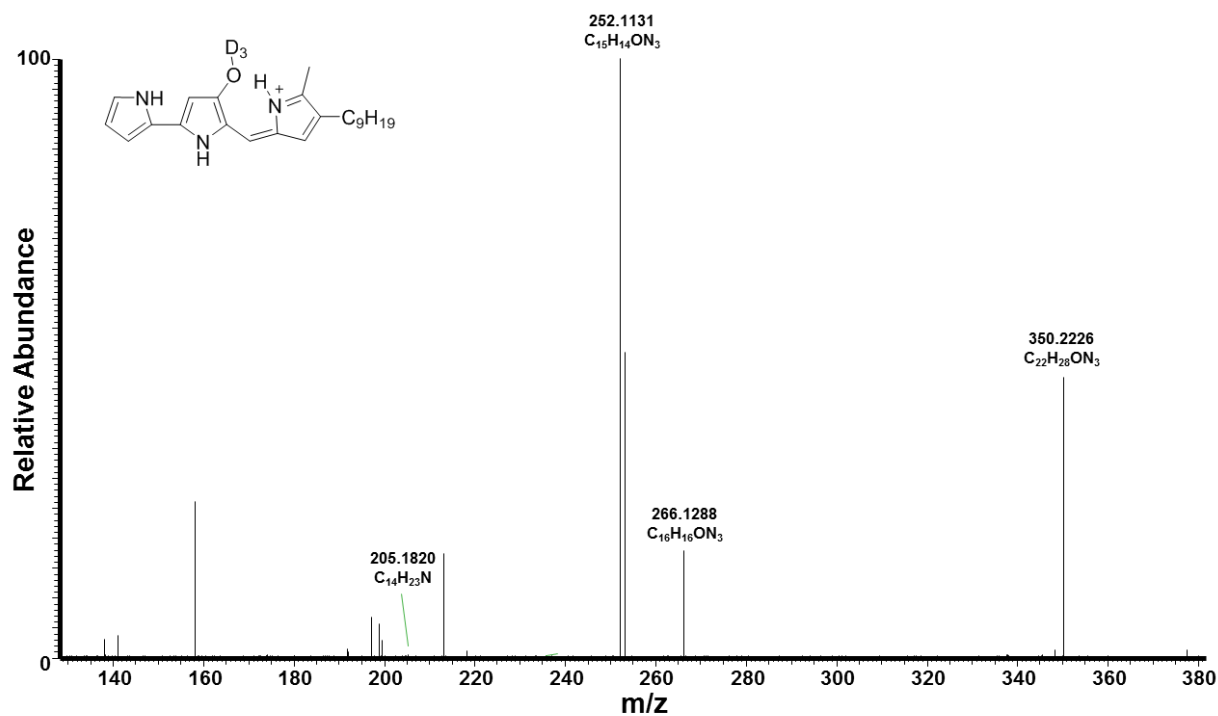


Abb. S145: HRMS³-Spektrum von 2-Methyl-3-nonyl-Prodiginin mit eingebauter Methyl-D₃ Gruppe von [Methyl-D₃]-L-Methionin (Verbindung 7 [M+H]⁺: m/z 383 via 366, C₂₄H₃₁D₃N₃O).

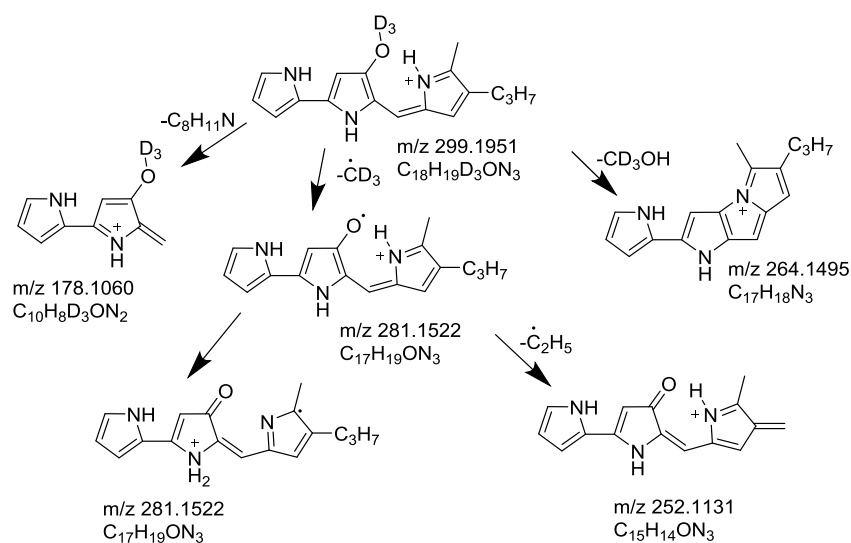


Abb. S146: Fragmentierungsweg von 2-Methyl-3-propyl-Prodiginin mit eingebauter Methyl-D₃ Gruppe von [Methyl-D₃]-L-Methionin (Verbindung 1 [M+H]⁺: m/z 299, C₁₈H₁₉D₃N₃O).

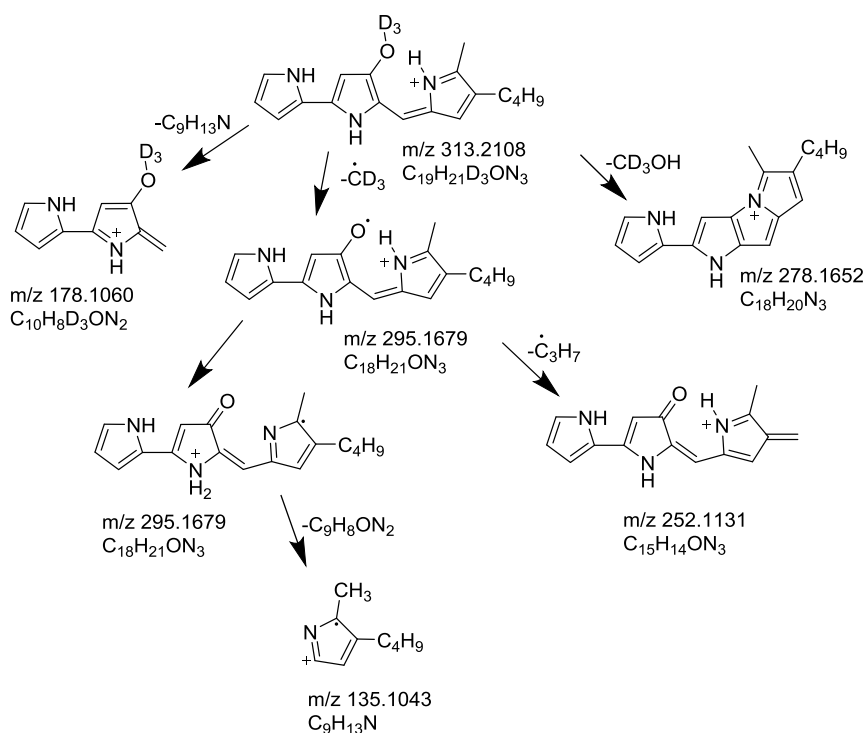


Abb. S147: Fragmentierungsweg von 2-Methyl-3-butyl-Prodiginin mit eingebauter Methyl-D₃ Gruppe von [Methyl-D₃]-L-Methionin (Verbindung 2 $[M+H]^+$: m/z 313, $C_{19}H_{21}D_3N_3O$).

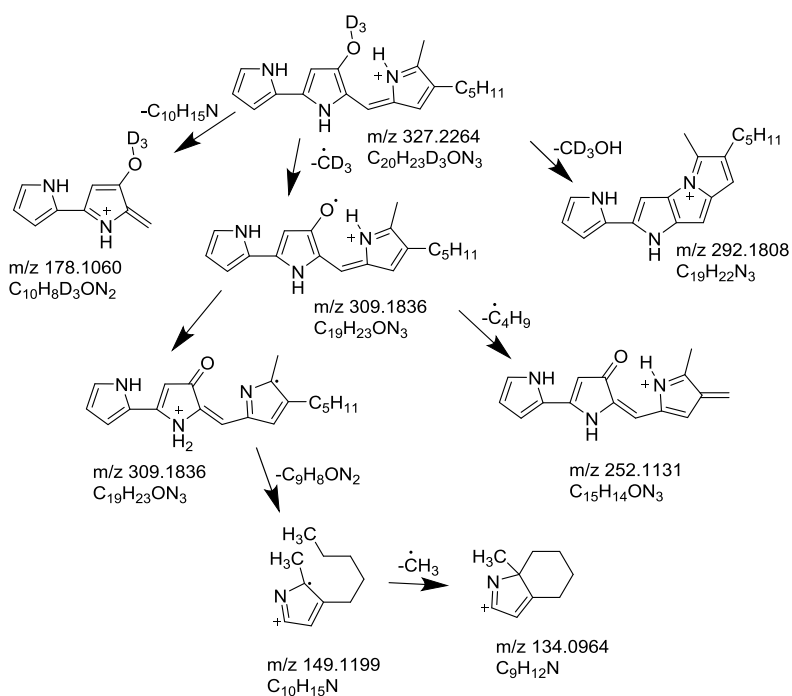


Abb. S148: Fragmentierungsweg von Prodigiosin mit eingebauter Methyl-D₃ Gruppe von [Methyl-D₃]-L-Methionin (Verbindung 3 $[M+H]^+$: m/z 327, $C_{20}H_{23}D_3N_3O$).

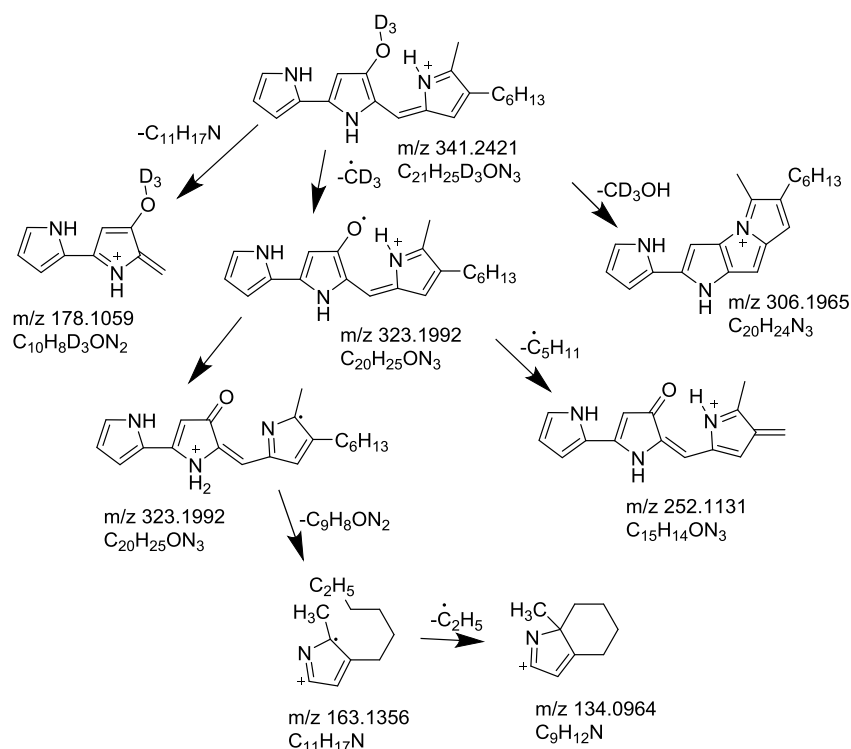


Abb. S149: Fragmentierungsweg von 2-Methyl-3-hexyl-Prodiginin mit eingebauter Methyl-D₃ Gruppe von [Methyl-D₃]-L-Methionin (Verbindung 4 [M+H]⁺: *m/z* 341, C₂₁H₂₅D₃N₃O).

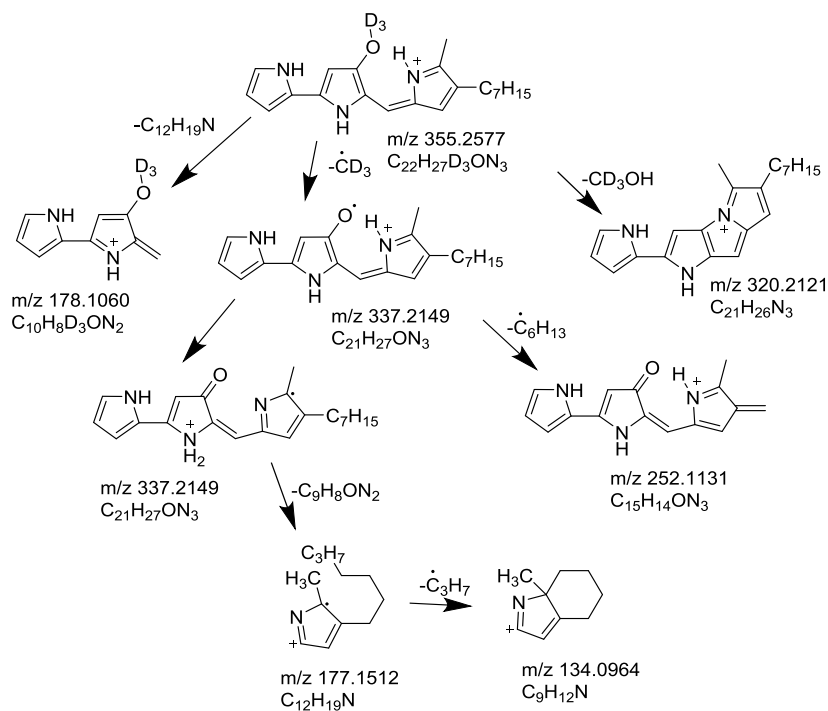


Abb. S150: Fragmentierungsweg von 2-Methyl-3-heptyl-Prodiginin mit eingebauter Methyl-D₃ Gruppe von [Methyl-D₃]-L-Methionin (Verbindung 5 [M+H]⁺: *m/z* 355, C₂₂H₂₇D₃N₃O).

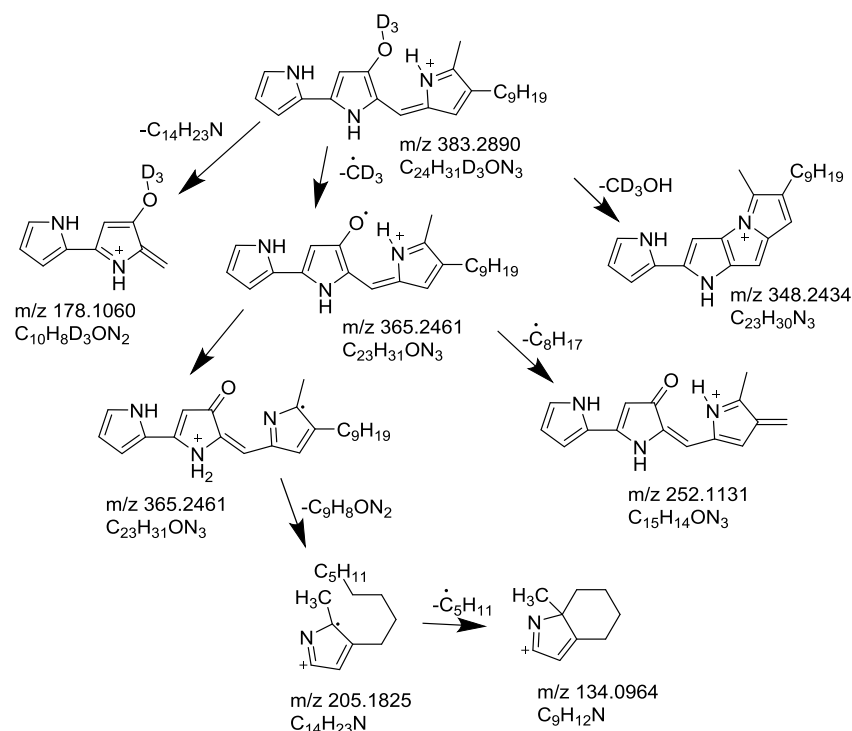


Abb. S151: Fragmentierungsweg von 2-Methyl-3-nonyl-Prodiginin mit eingebauter Methyl-D₃ Gruppe von [Methyl-D₃]-L-Methionin (Verbindung 7 $[M+H]^+$: m/z 383, $C_{24}H_{31}D_3N_3O$).

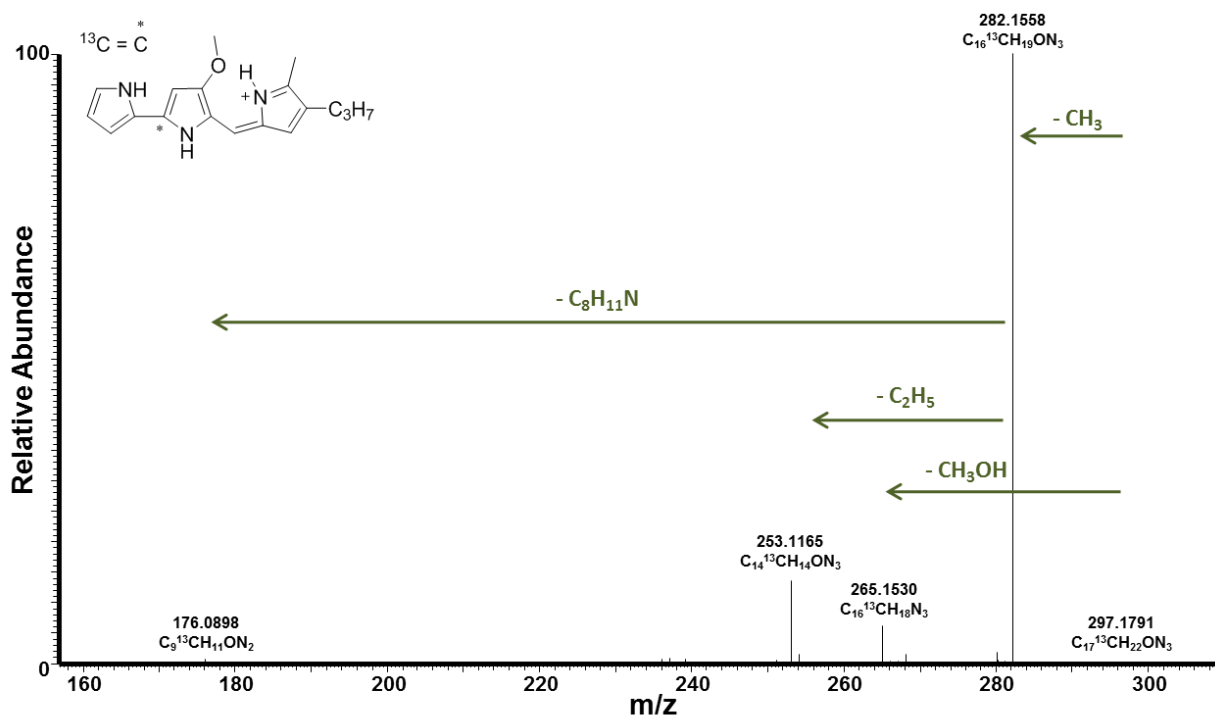


Abb. S152: HRMS²-Spektrum von 2-Methyl-3-propyl-Prodiginin mit eingebautem [1-¹³C]-L-Prolin (Verbindung 1 $[M+H]^+$: m/z 297, $C_{17}^{13}CH_{22}N_3O$).

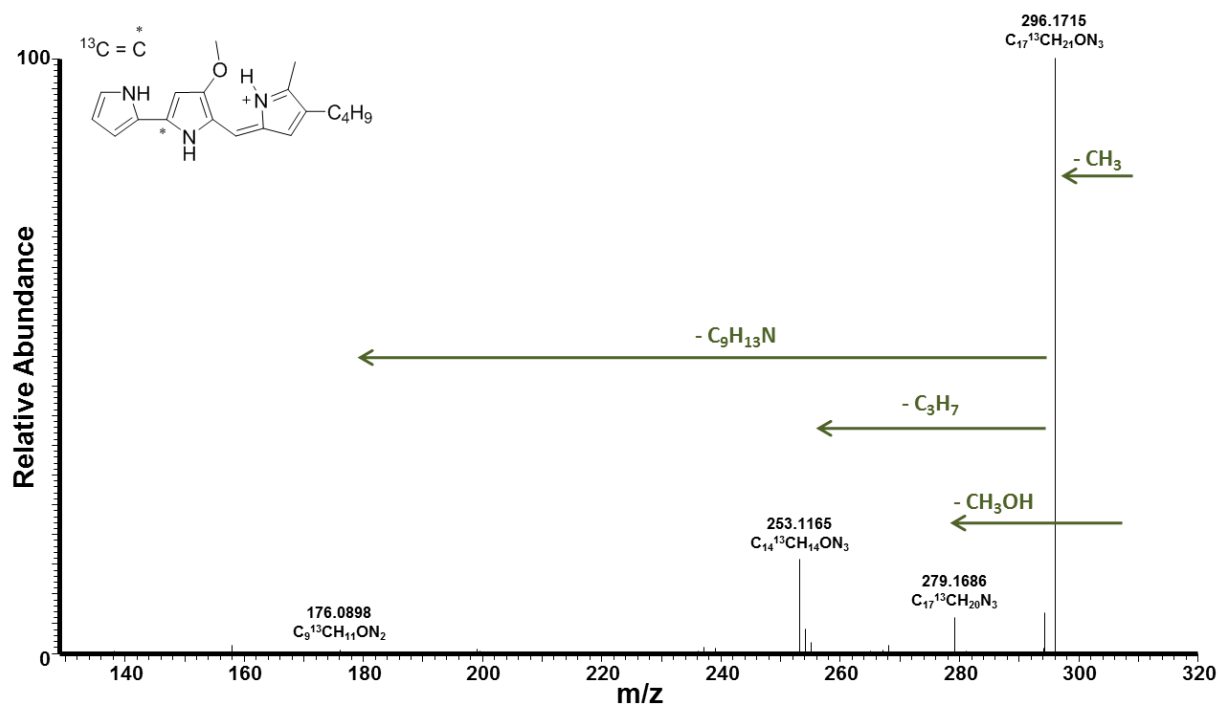


Abb. S153: HRMS²-Spektrum von 2-Methyl-3-butyl-Prodiginin mit eingebautem [1-¹³C]-L-Prolin (Verbindung 2 [M+H]⁺: m/z 311, $C_{18}^{13}CH_{24}N_3O$).

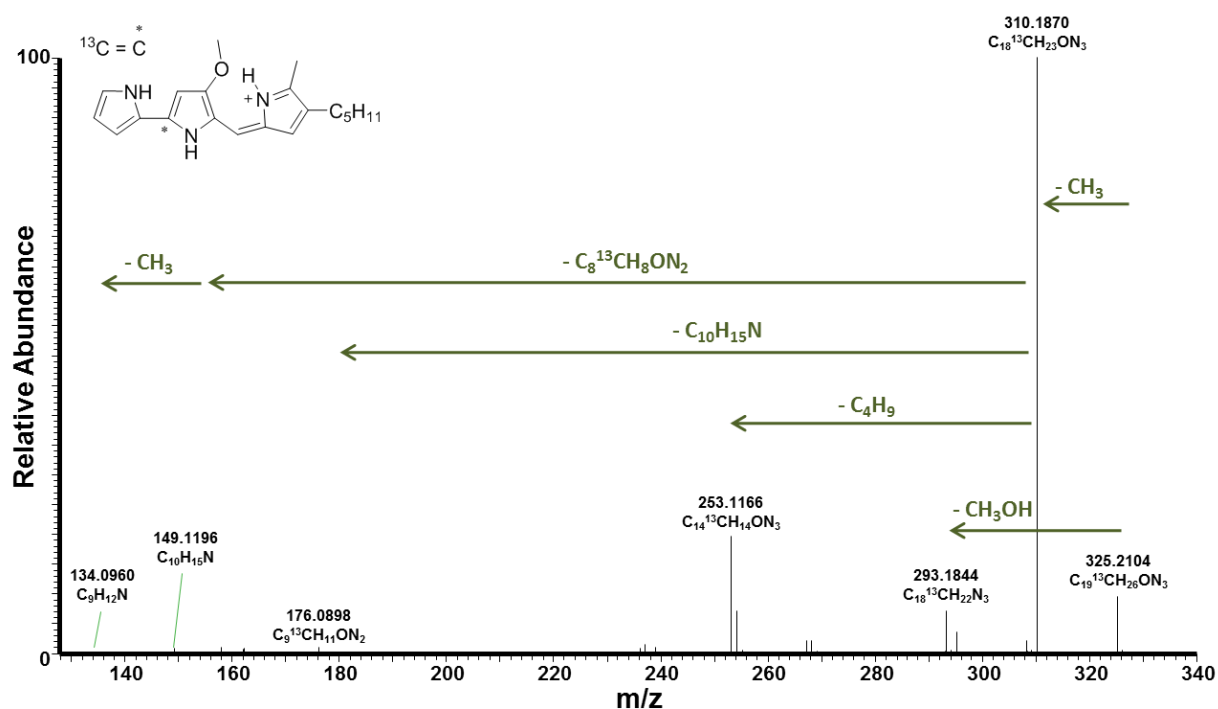


Abb. S154: HRMS²-Spektrum von Prodigiosin mit eingebautem [1-¹³C]-L-Prolin (Verbindung 3 [M+H]⁺: m/z 325, $C_{19}^{13}CH_{26}N_3O$).

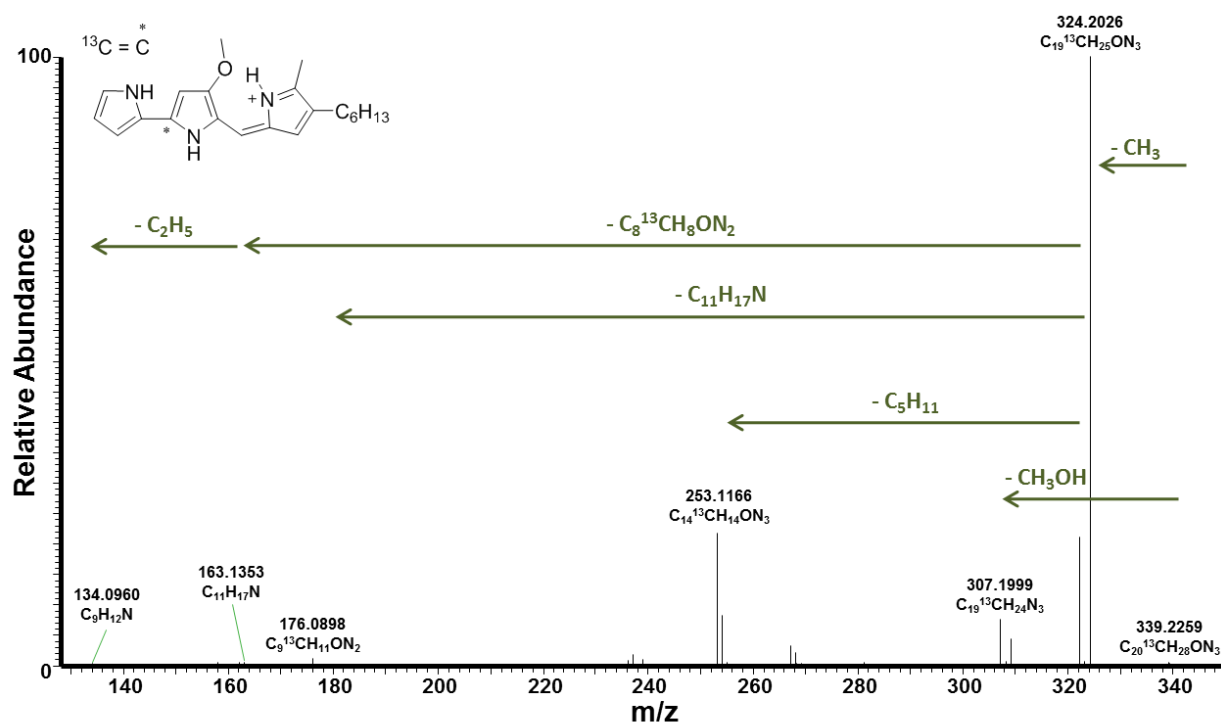


Abb. S155: HRMS²-Spektrum von 2-Methyl-3-hexyl-Prodiginin mit eingebautem [1-¹³C]-L-Prolin (Verbindung 4 [M+H]⁺: m/z 339, C₂₀¹³CH₂₈N₃O).

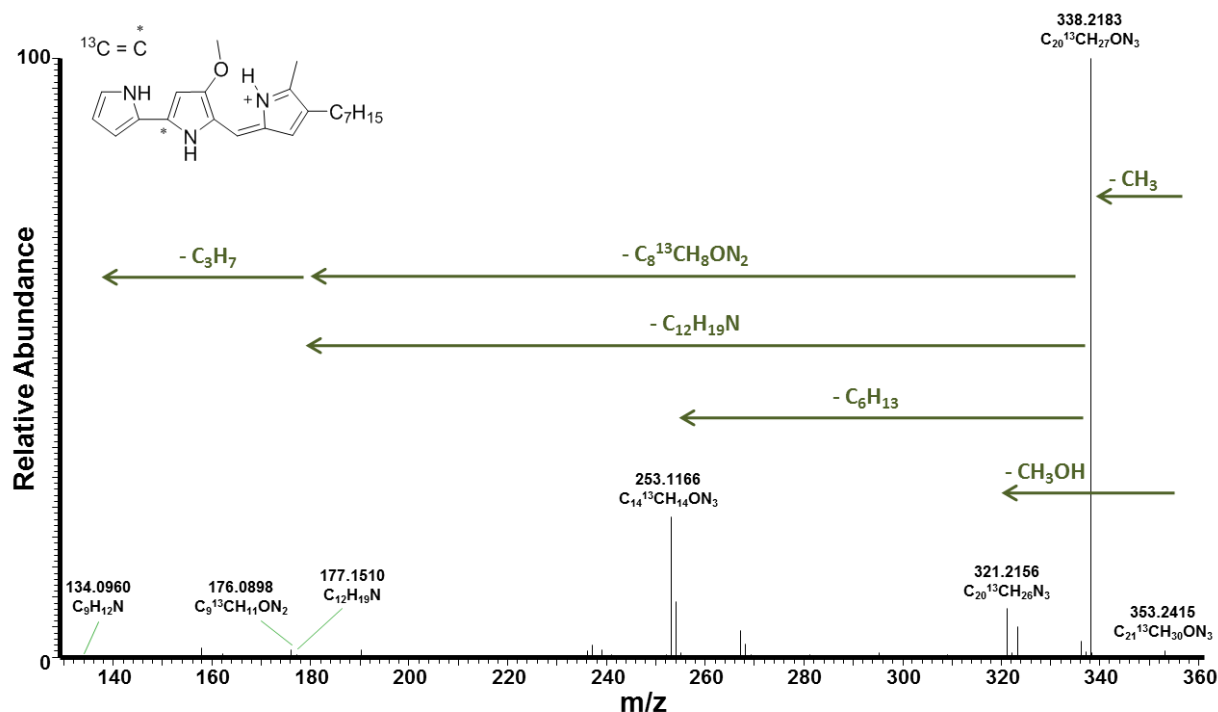


Abb. S156: HRMS²-Spektrum von 2-Methyl-3-heptyl-Prodiginin mit eingebautem [1-¹³C]-L-Prolin (Verbindung 5 [M+H]⁺: m/z 353, C₂₁¹³CH₃₀N₃O).

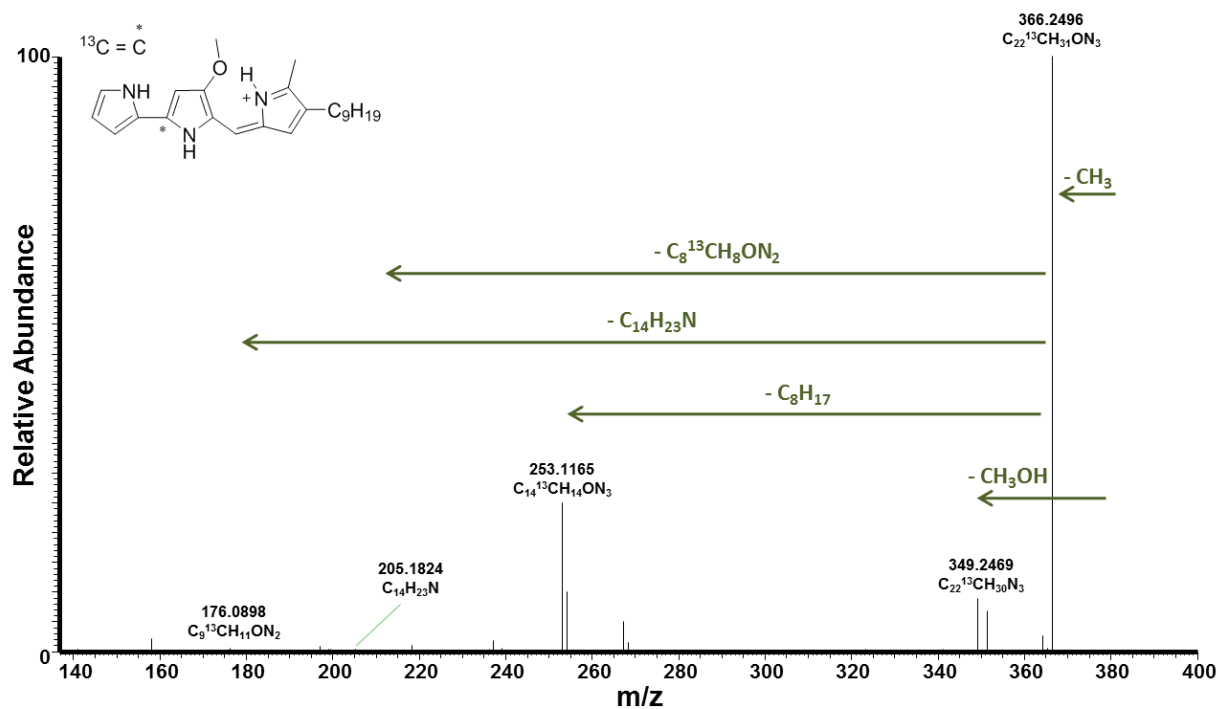


Abb. S157: HRMS²-Spektrum von 2-Methyl-3-nonyl-Prodiginin mit eingebautem [1-¹³C]-L-Prolin (Verbindung 7 $[M+H]^+$: m/z 381, $C_{23}^{13}CH_{34}N_3O$).

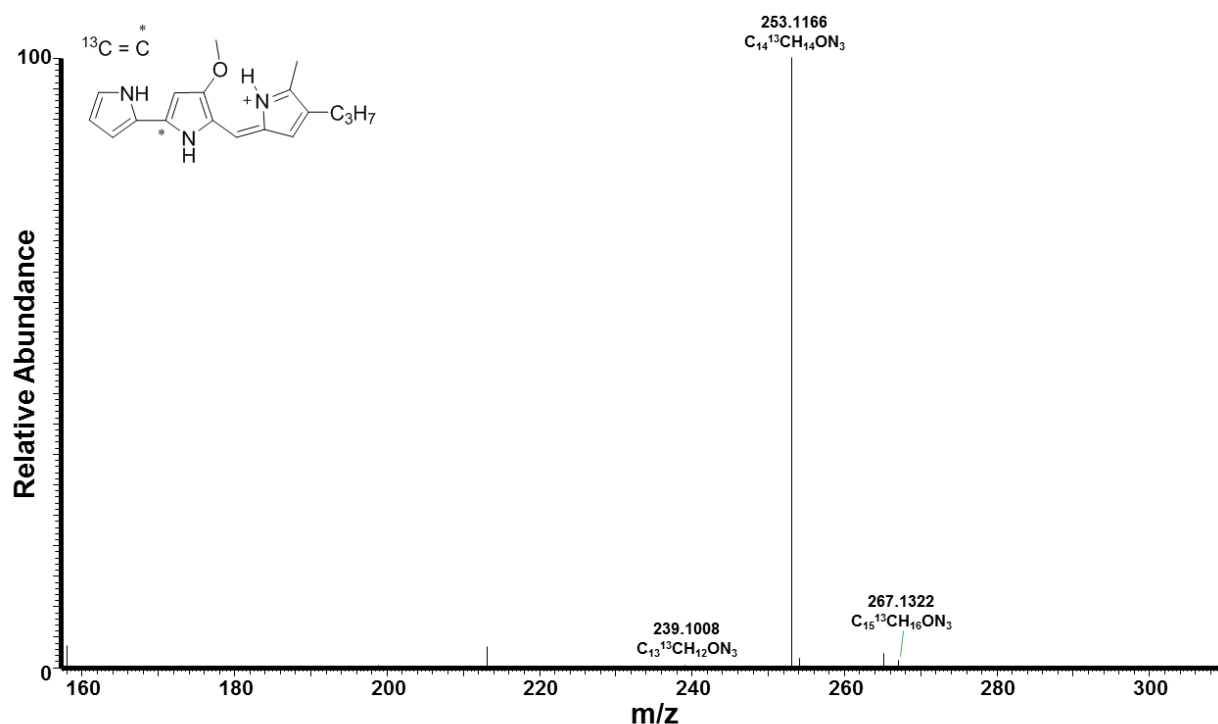


Abb. S158: HRMS³-Spektrum von 2-Methyl-3-propyl-Prodiginin mit eingebautem [1-¹³C]-L-Prolin (Verbindung 1 $[M+H]^+$: m/z 297 via 282, $C_{17}^{13}CH_{22}N_3O$).

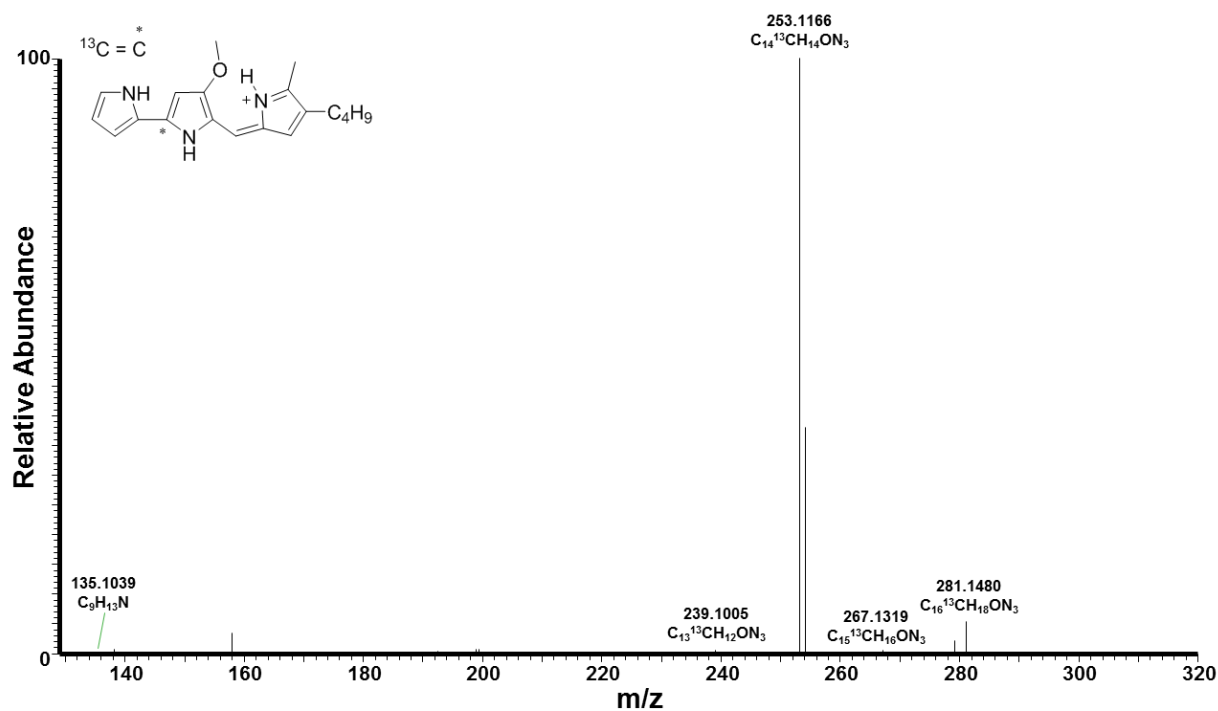


Abb. S159: HRMS³-Spektrum von 2-Methyl-3-butyl-Prodiginin mit eingebautem [1-¹³C]-L-Prolin (Verbindung 2 [M+H]⁺: m/z 311 via 296, C₁₈¹³CH₂₄N₃O).

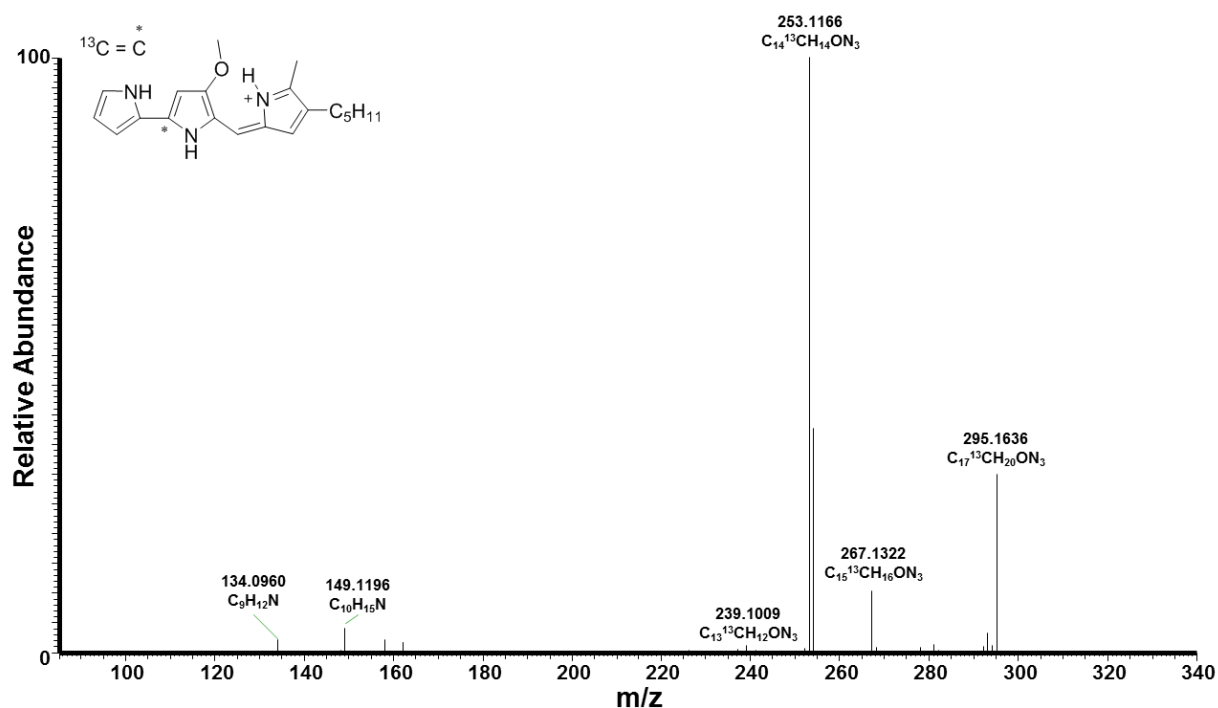


Abb. S160: HRMS³-Spektrum von Prodigiosin mit eingebautem [1-¹³C]-L-Prolin (Verbindung 3 [M+H]⁺: m/z 325 via 310, C₁₉¹³CH₂₆N₃O).

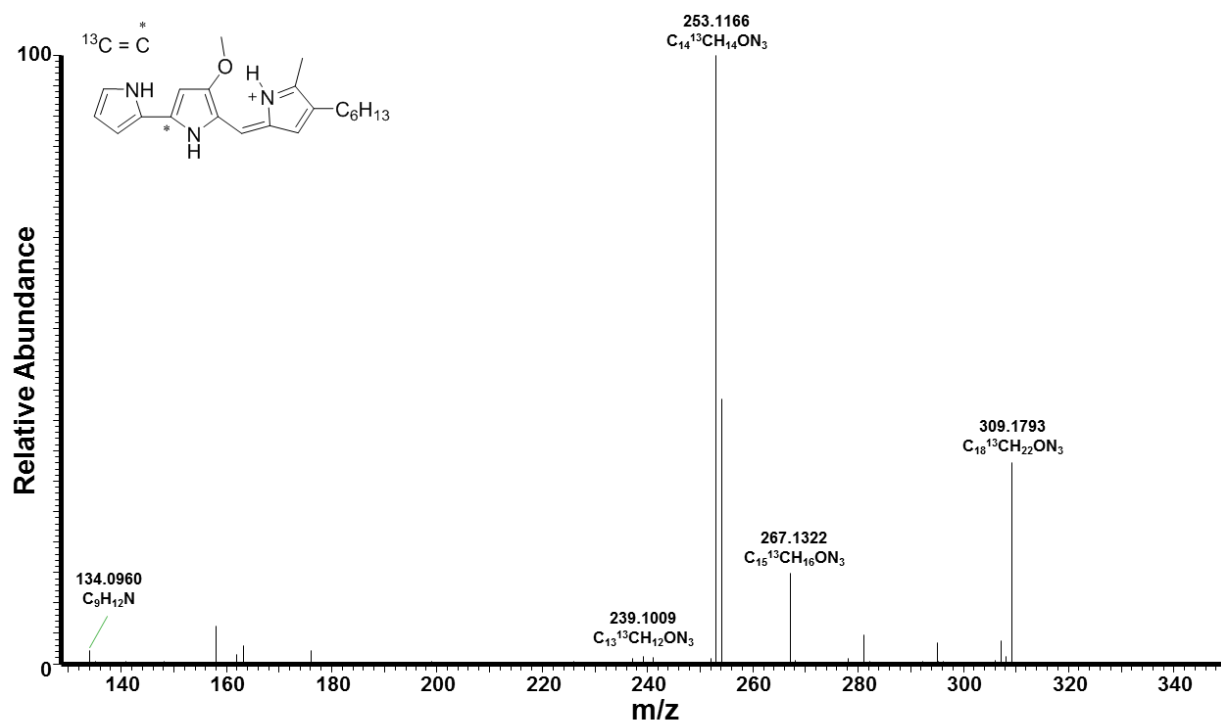


Abb. S161: HRMS³-Spektrum von 2-Methyl-3-hexyl-Prodiginin mit eingebautem [1-¹³C]-L-Prolin (Verbindung 4 [M+H]⁺: *m/z* 339 via 324, C₂₀¹³CH₂₈N₃O).

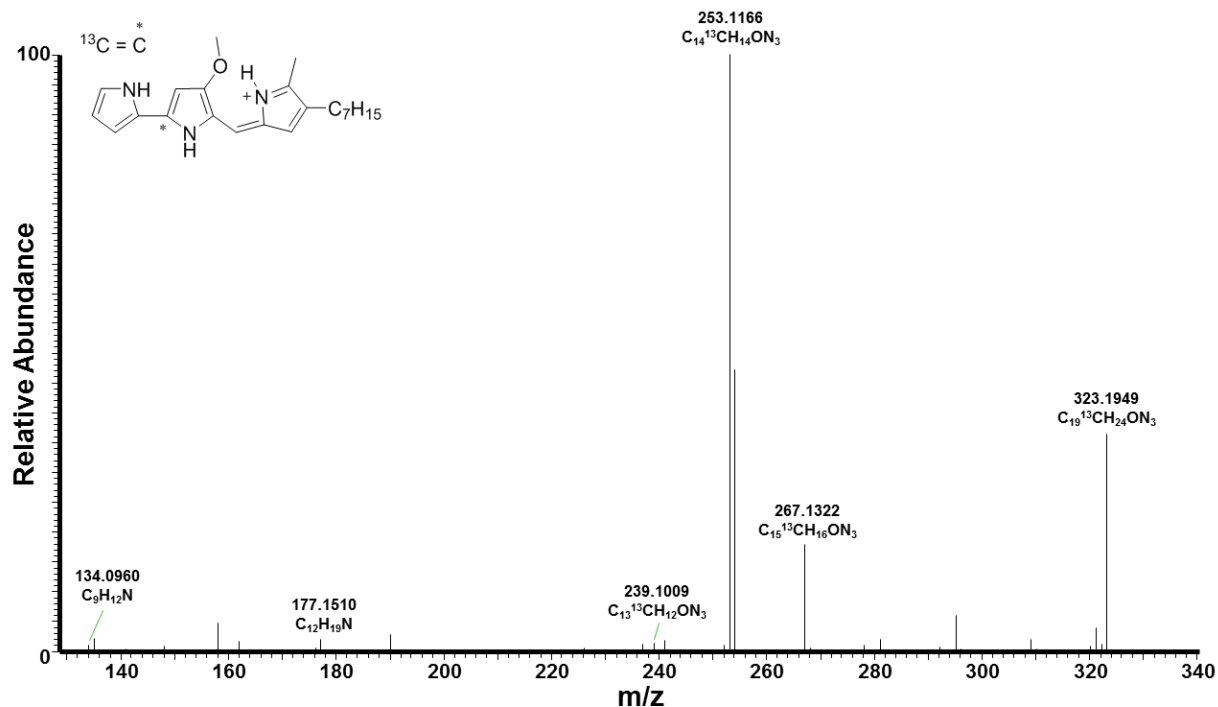


Abb. S162: HRMS³-Spektrum von 2-Methyl-3-heptyl-Prodiginin mit eingebautem [1-¹³C]-L-Prolin (Verbindung 5 [M+H]⁺: *m/z* 353 via 338, C₂₁¹³CH₃₀N₃O).

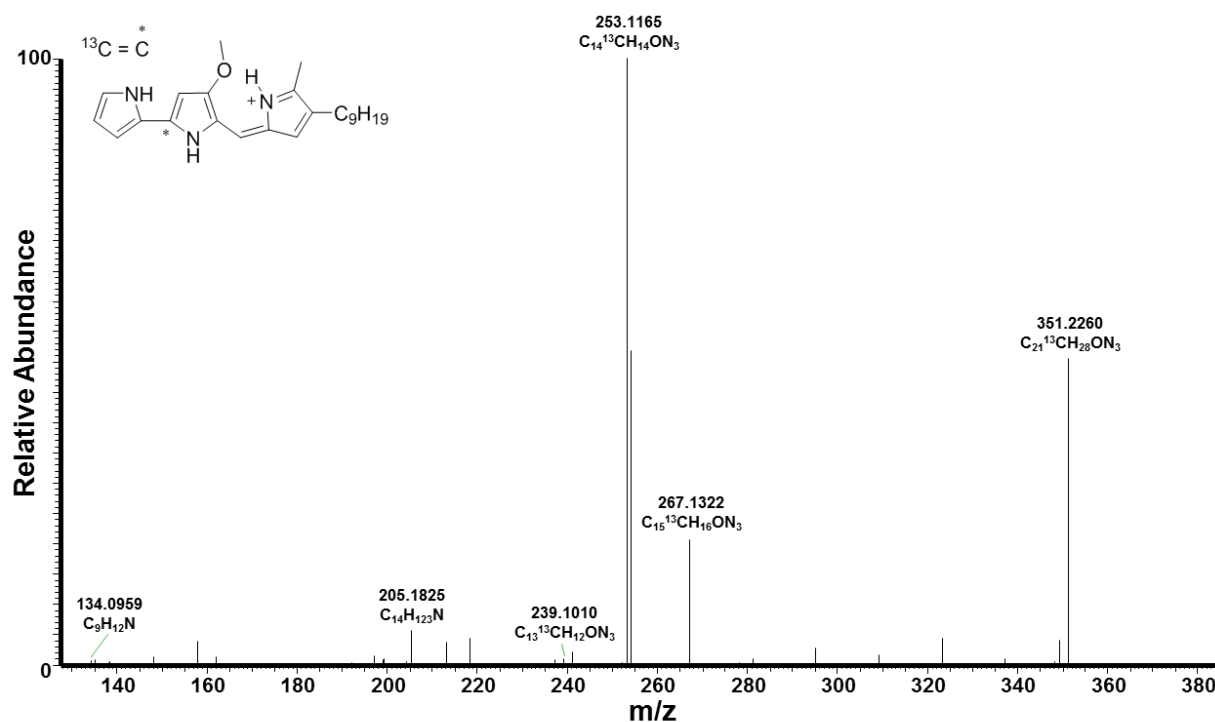


Abb. S163: HRMS³-Spektrum von 2-Methyl-3-nonyl-Prodiginin mit eingebautem [1-¹³C]-L-Prolin (Verbindung 7 [M+H]⁺: m/z 381 via 366, C₂₃¹³CH₃₄N₃O).

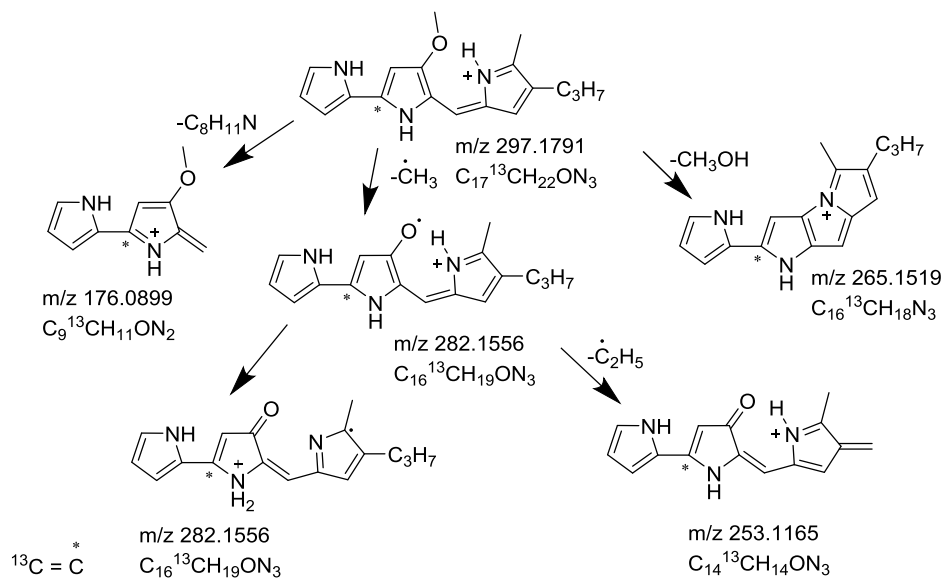


Abb. S164: Fragmentierungsweg von 2-Methyl-3-propyl-Prodiginin mit eingebautem [1-¹³C]-L-Prolin (Verbindung 1 [M+H]⁺: m/z 297, C₁₇¹³CH₂₂N₃O).

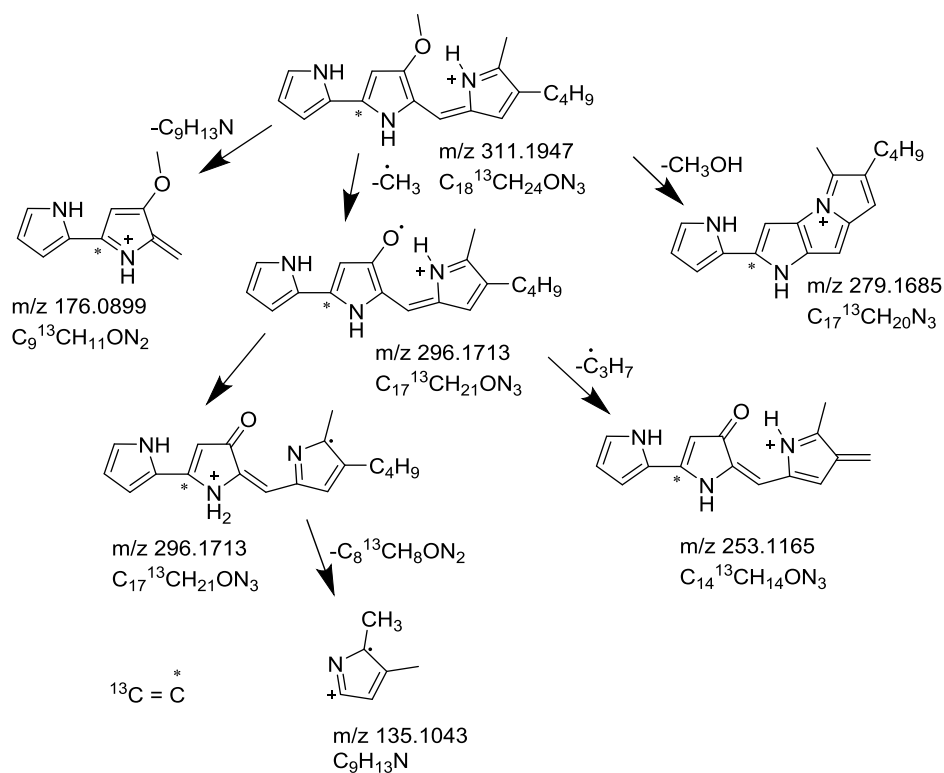


Abb. S165: Fragmentierungsweg von 2-Methyl-3-butyl-Prodiginin mit eingebautem $[1-^{13}\text{C}]$ -L-Prolin (Verbindung 2 $[\text{M}+\text{H}]^+$: m/z 311, $\text{C}_{18}^{13}\text{CH}_{24}\text{N}_3\text{O}$).

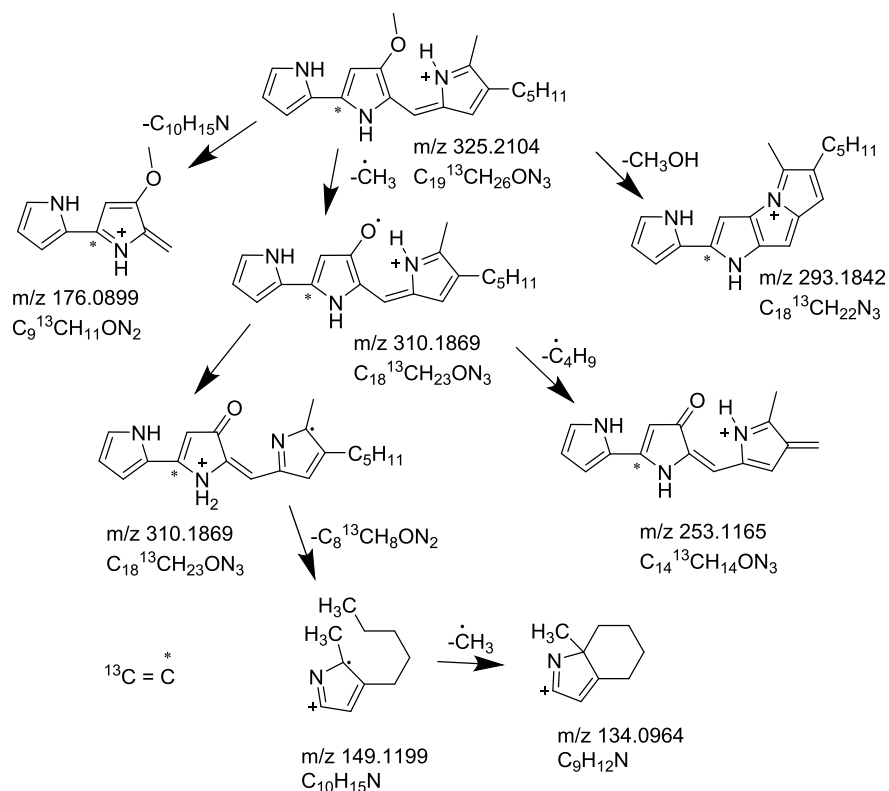


Abb. S166: Fragmentierungsweg von Prodiginosin mit eingebautem $[1-^{13}\text{C}]$ -L-Prolin (Verbindung 3 $[\text{M}+\text{H}]^+$: m/z 325, $\text{C}_{19}^{13}\text{CH}_{26}\text{N}_3\text{O}$).

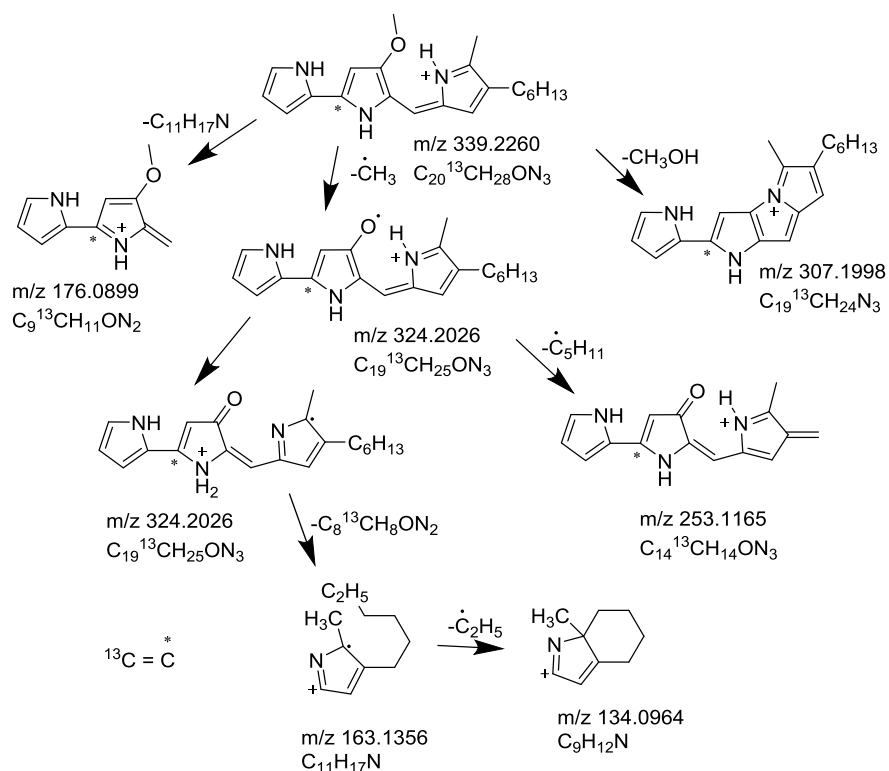


Abb. S167: Fragmentierungsweg von 2-Methyl-3-hexyl-Prodiginin mit eingebautem [1-¹³C]-L-Prolin (Verbindung 4 [M+H]⁺: m/z 339, $C_{20}^{13}CH_{28}N_3O$).

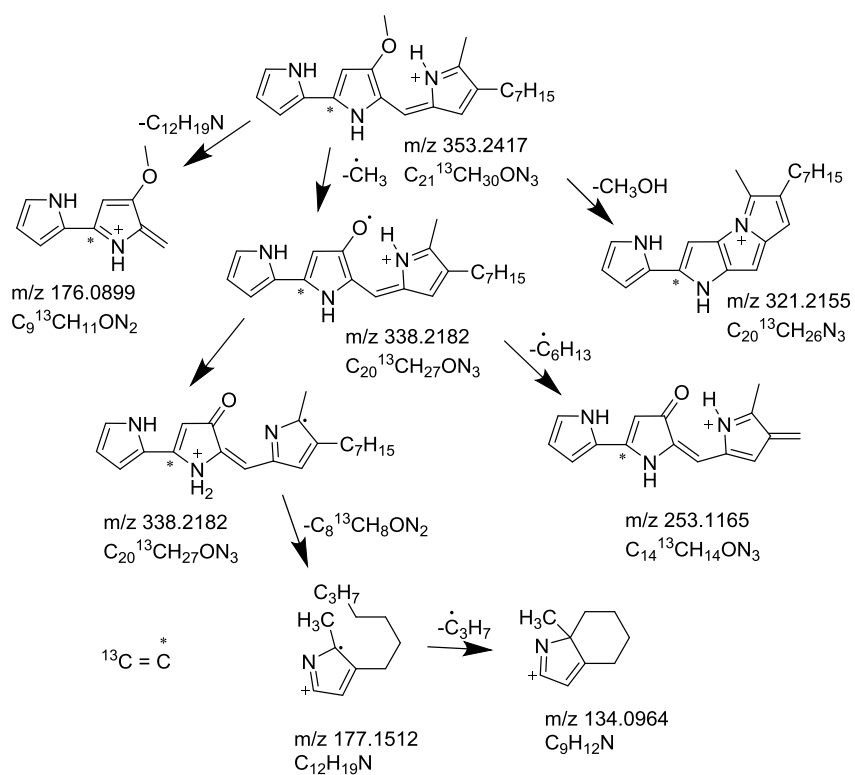


Abb. S168: Fragmentierungsweg von 2-Methyl-3-heptyl-Prodiginin mit eingebautem [1-¹³C]-L-Prolin (Verbindung 5 [M+H]⁺: m/z 353, $C_{21}^{13}CH_{30}N_3O$).

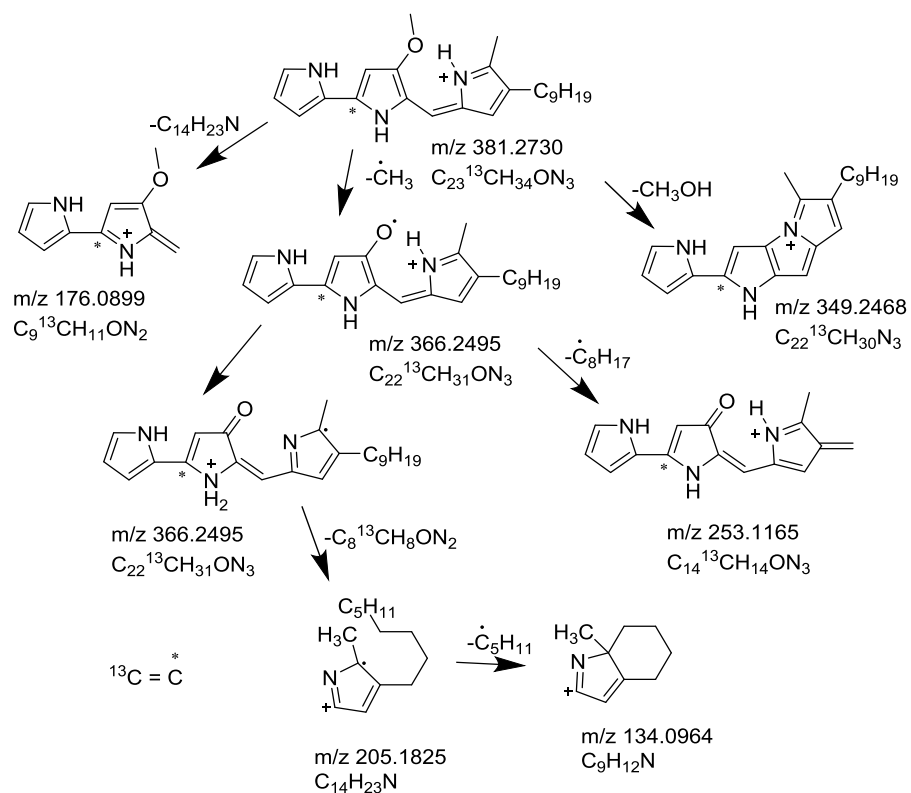


Abb. S169: Fragmentierungsweg von 2-Methyl-3-nonyl-Prodiginin mit eingebautem [1-¹³C]-L-Prolin (Verbindung 7 [M+H]⁺: m/z 381, C₂₃¹³CH₃₄N₃O).

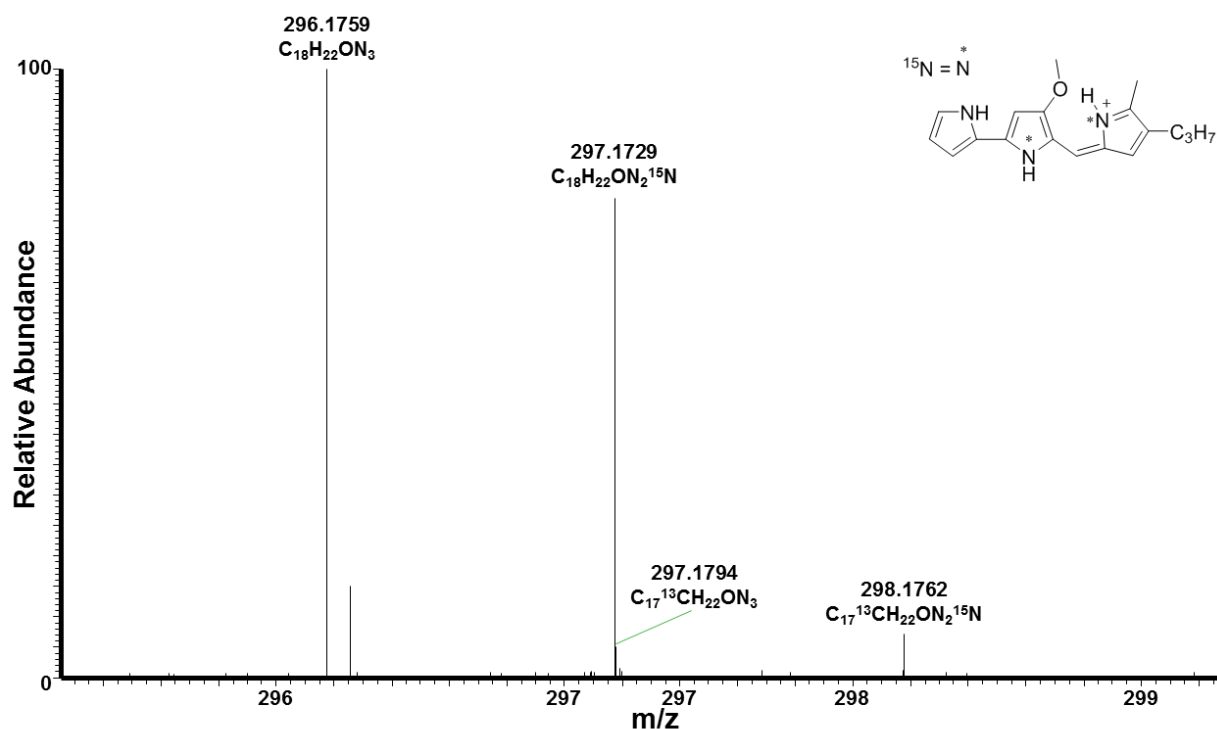


Abb. S170: HRMS-Spektrum von 2-Methyl-3-propyl-Prodiginin mit eingebautem ^{15}N von ^{15}N -L-Serin (Verbindung 1 $[\text{M}+\text{H}]^+$: m/z 296, $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{N}_3\text{O}$).

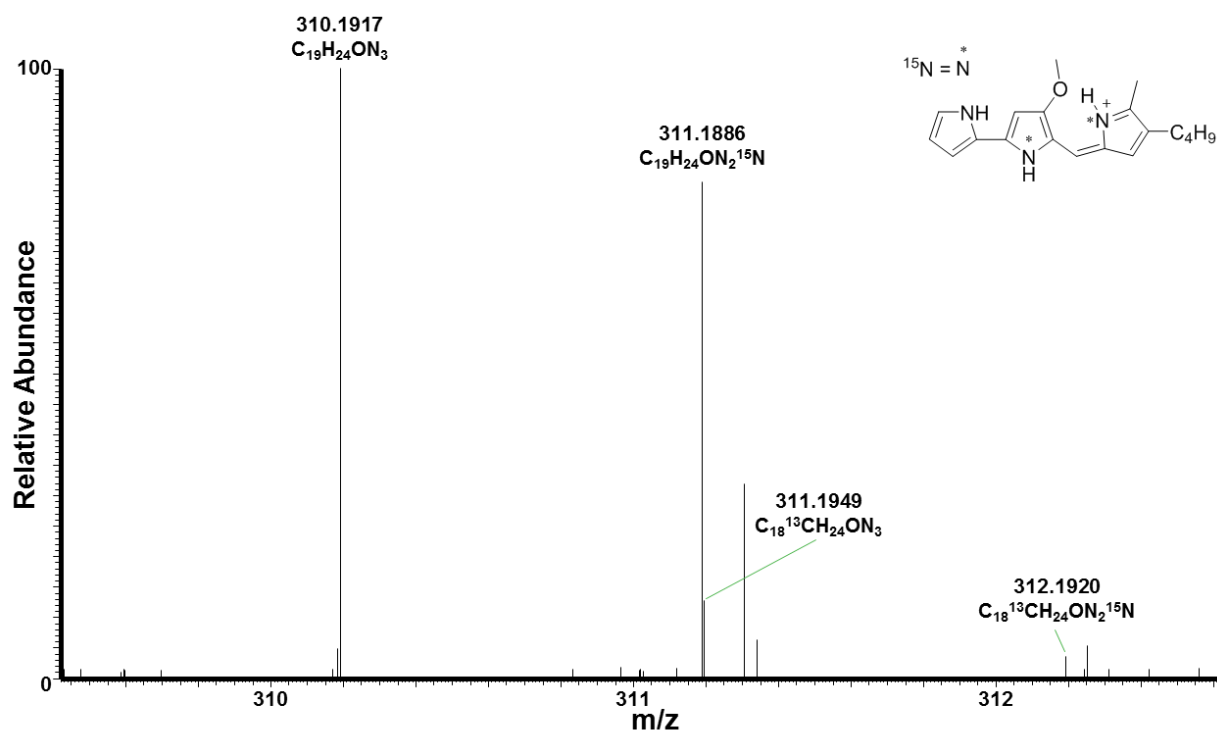


Abb. S171: HRMS-Spektrum von 2-Methyl-3-butyl-Prodiginin mit eingebautem ^{15}N von ^{15}N -L-Serin (Verbindung 2 $[\text{M}+\text{H}]^+$: m/z 310, $\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{N}_3\text{O}$).

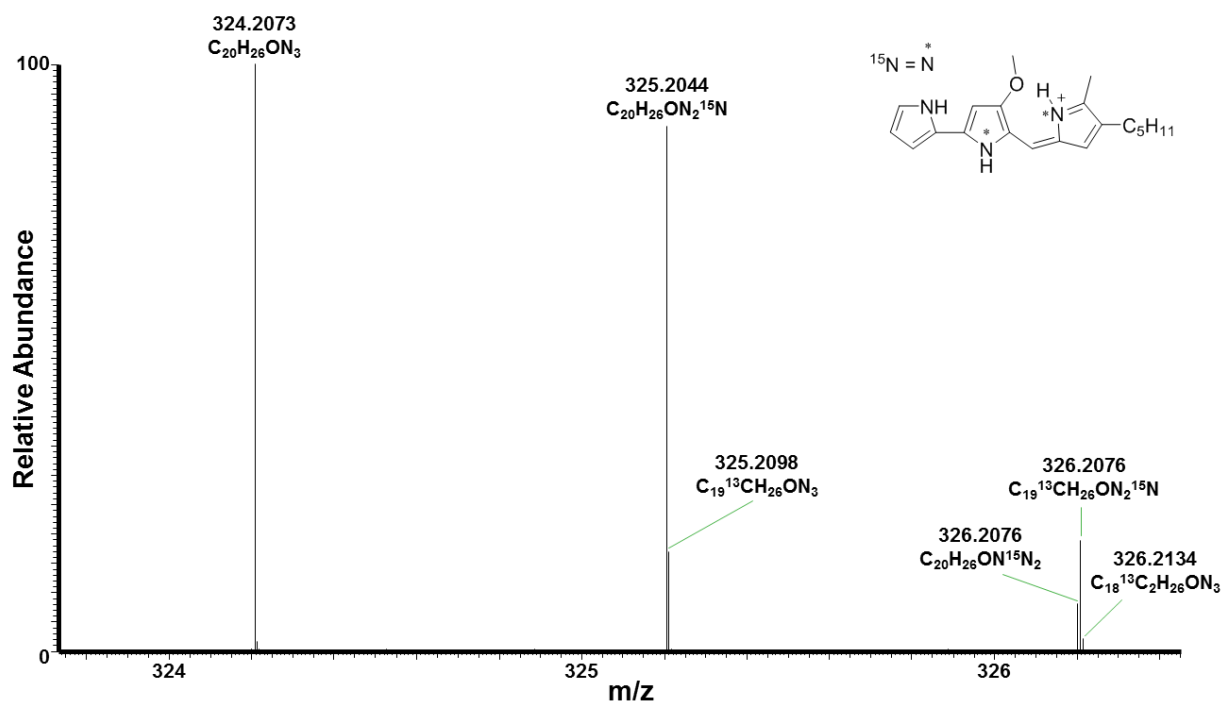


Abb. S172: HRMS-Spektrum von Prodigiosin mit eingebautem ^{15}N von ^{15}N -L-Serin (Verbindung **3** $[\text{M}+\text{H}]^+$: m/z 324, $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{N}_3\text{O}$).

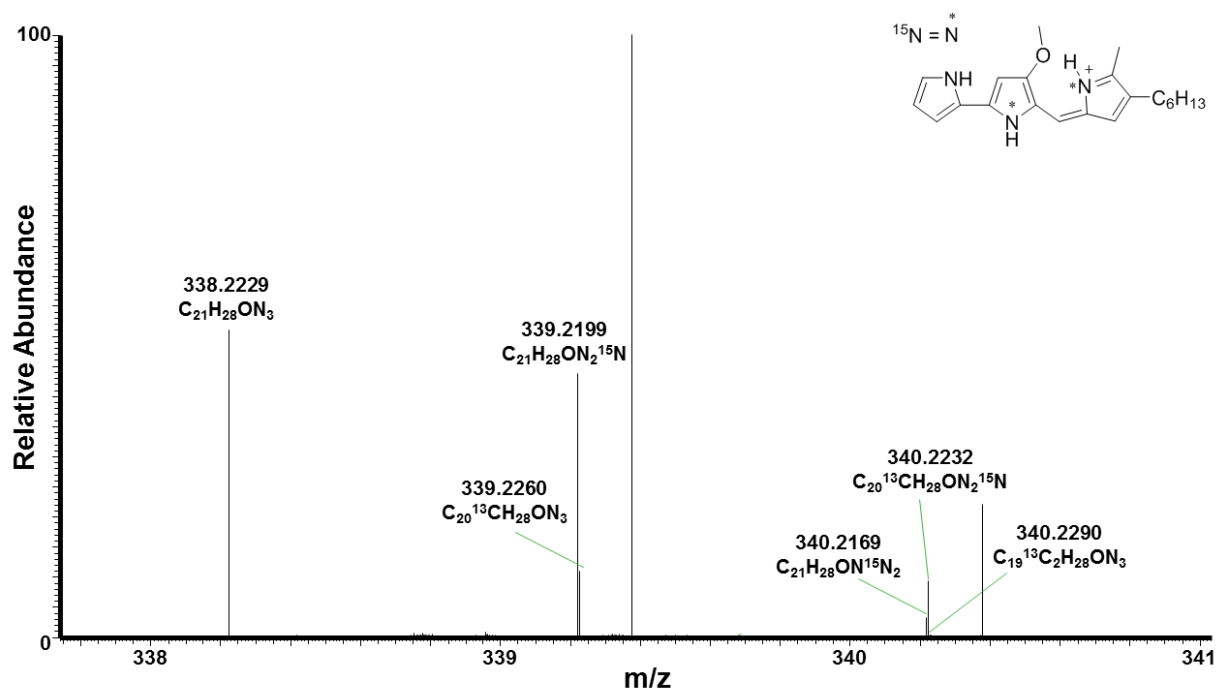


Abb. S173: HRMS-Spektrum von 2-Methyl-3-hexyl-Prodiginin mit eingebautem ^{15}N von ^{15}N -L-Serin (Verbindung **4** $[\text{M}+\text{H}]^+$: m/z 338, $\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{N}_3\text{O}$).

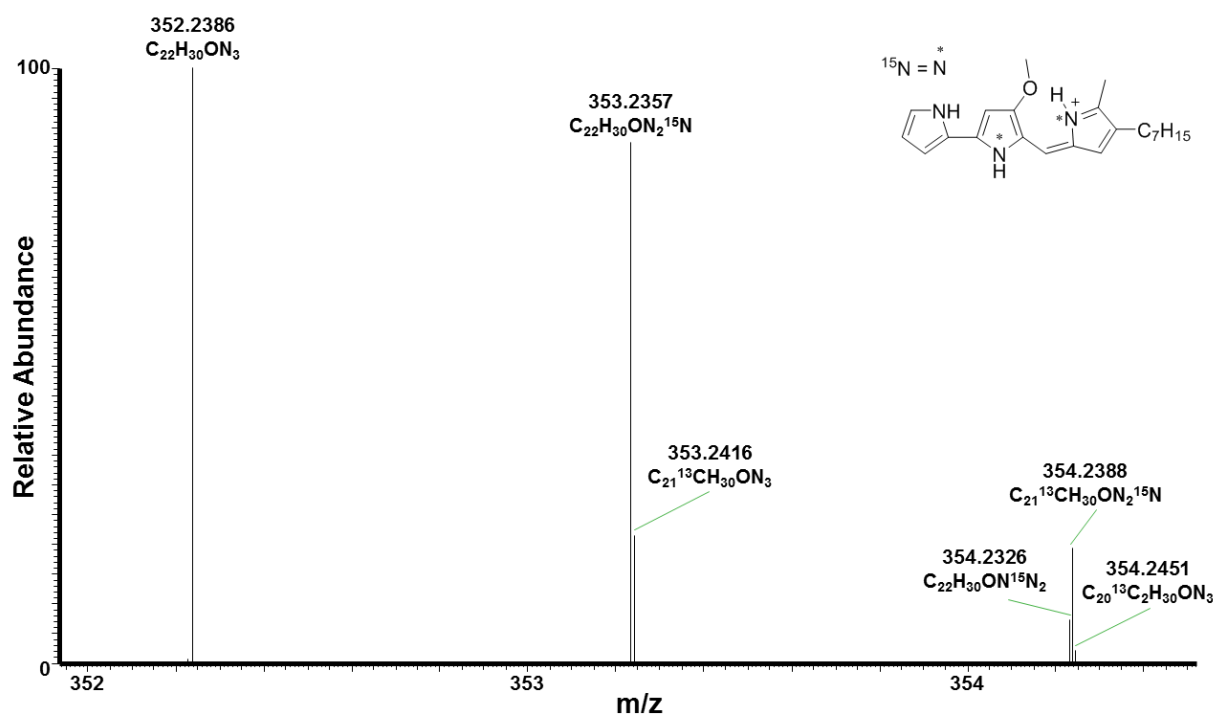


Abb. S174: HRMS-Spektrum von 2-Methyl-3-heptyl-Prodiginin mit eingebautem ^{15}N von ^{15}N -L-Serin (Verbindung 5 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$: m/z 352, $\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{N}_3\text{O}$).

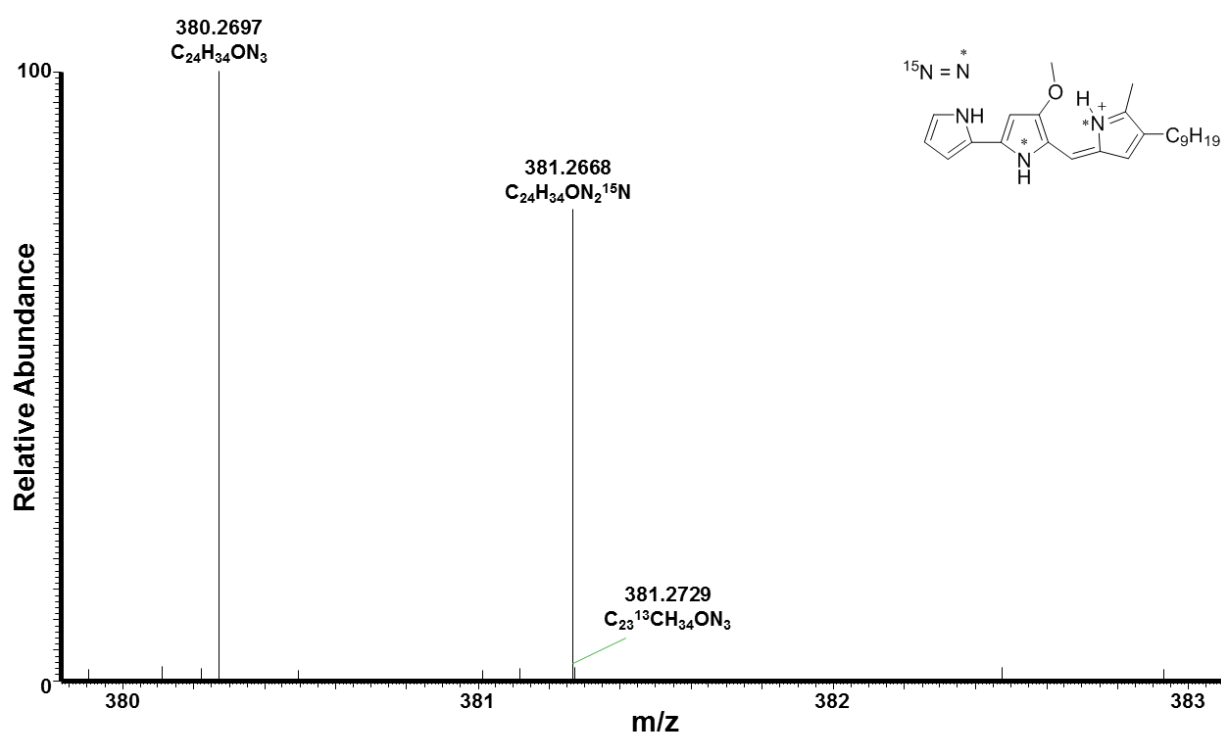


Abb. S175: HRMS-Spektrum von 2-Methyl-3-nonyl-Prodiginin mit eingebautem ^{15}N von ^{15}N -L-Serin (Verbindung 7 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$: m/z 380, $\text{C}_{24}\text{H}_{34}\text{N}_3\text{O}$).

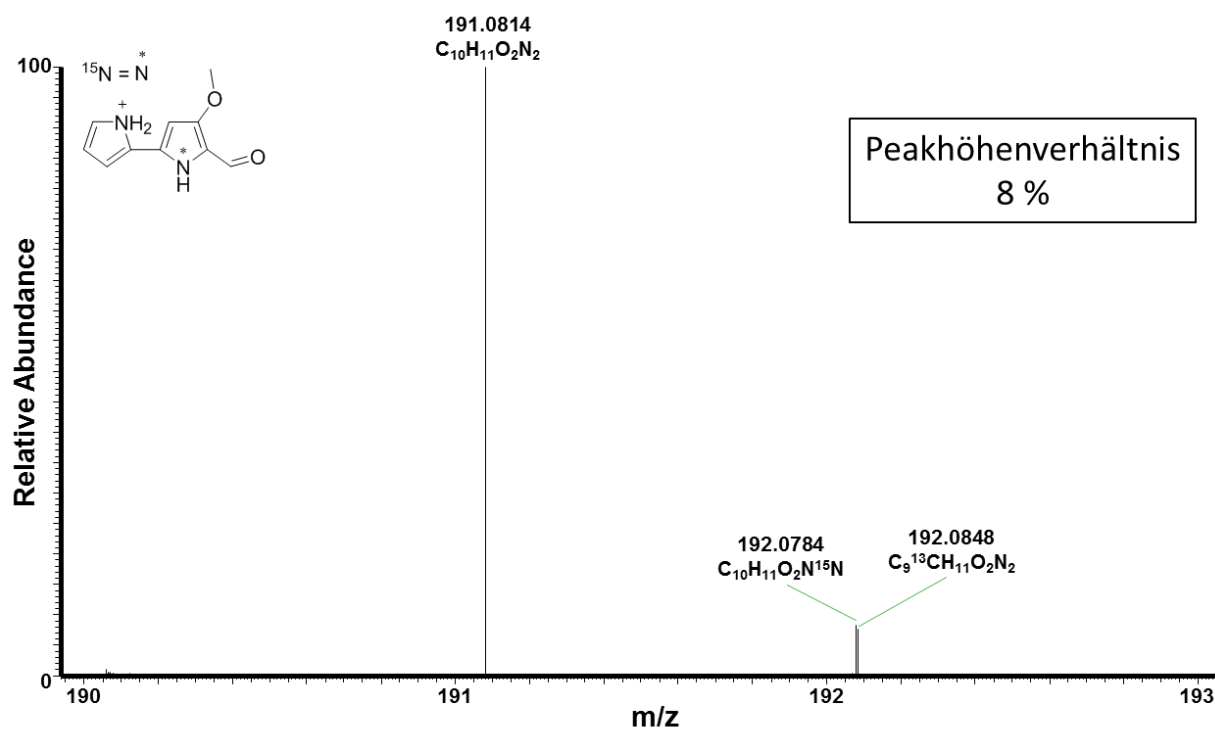


Abb. S176: HRMS-Spektrum von 4-Methoxy-2,2'-bipyrrol-5-carbaldehyd (MBC) mit eingebautem ^{15}N von ^{15}N -L-Serin (Verbindung **8** $[\text{M}+\text{H}]^+$: m/z 192, $\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{N}^{15}\text{NO}_2$).

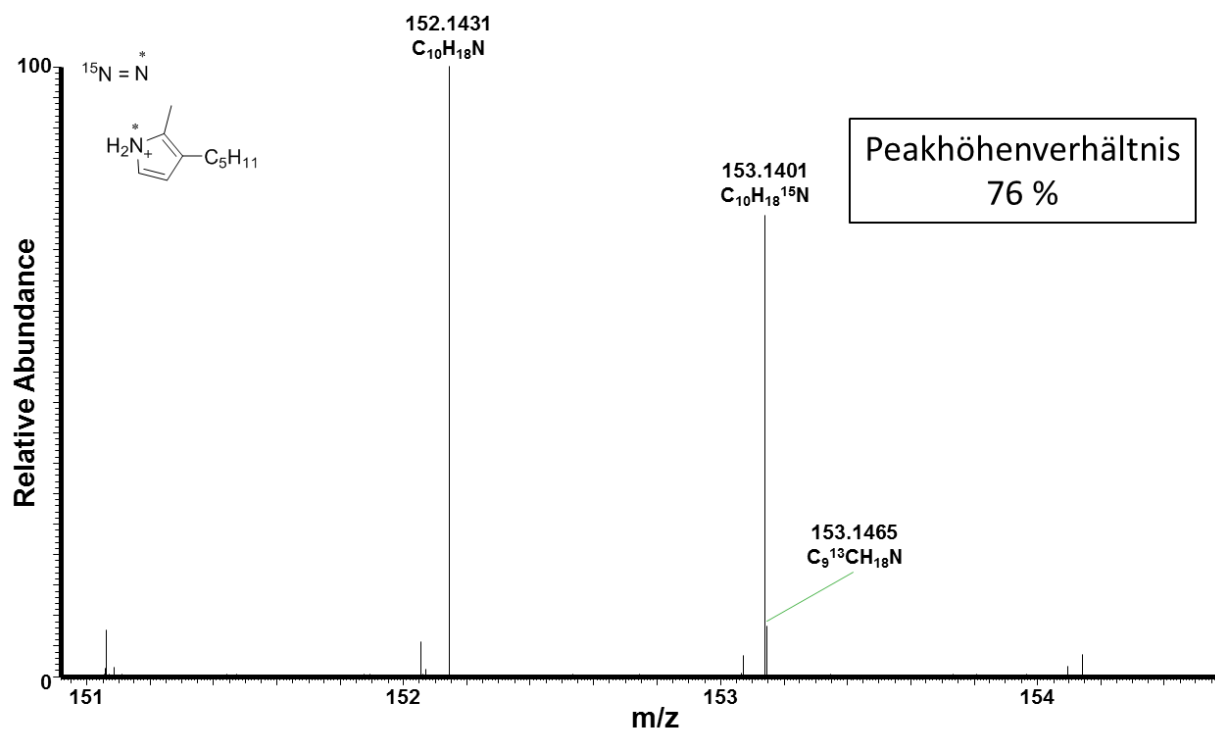


Abb. S177: HRMS-Spektrum von 2-Methyl-3-ampylpyrrol (MAP) mit eingebautem ^{15}N von ^{15}N -L-Serin (Verbindung **9** $[\text{M}+\text{H}]^+$: m/z 153, $\text{C}_{10}\text{H}_{18}^{15}\text{N}$).

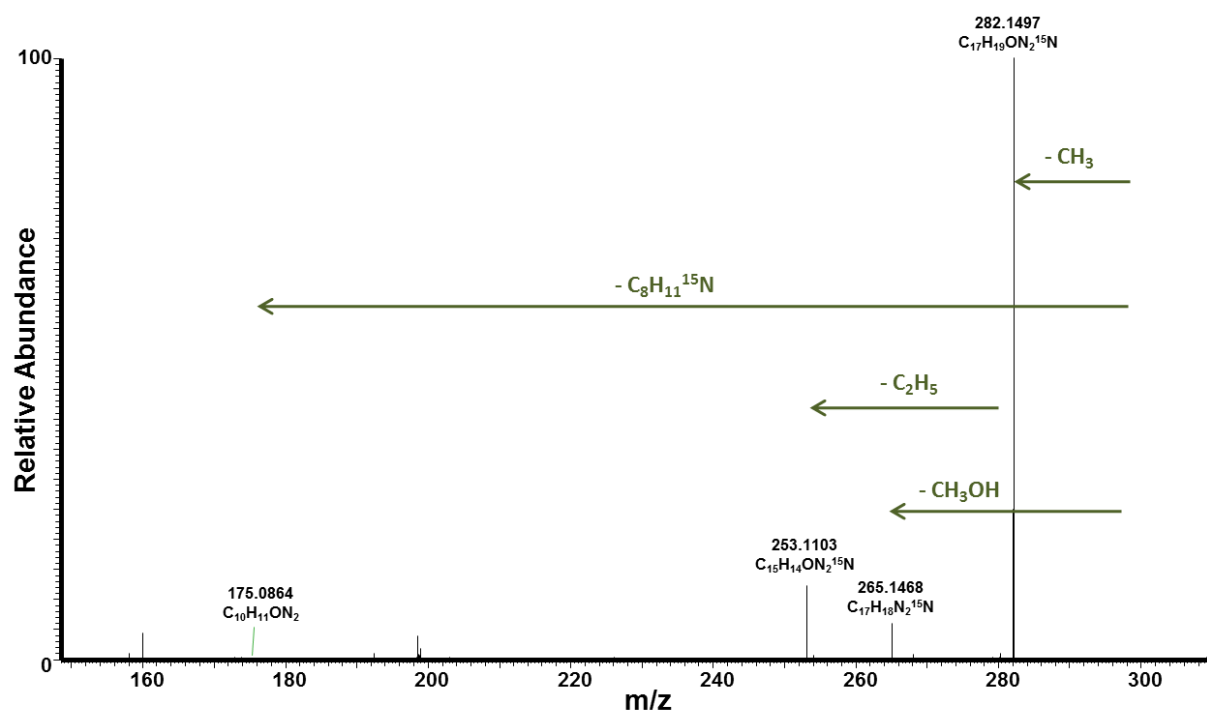


Abb S178: HRMS²-Spektrum von 2-Methyl-3-propyl-Prodiginin mit eingebautem ¹⁵N von ¹⁵N-L-Serin (Verbindung 1 $[M+H]^+$: *m/z* 297, $C_{18}H_{22}N_2^{15}NO$).

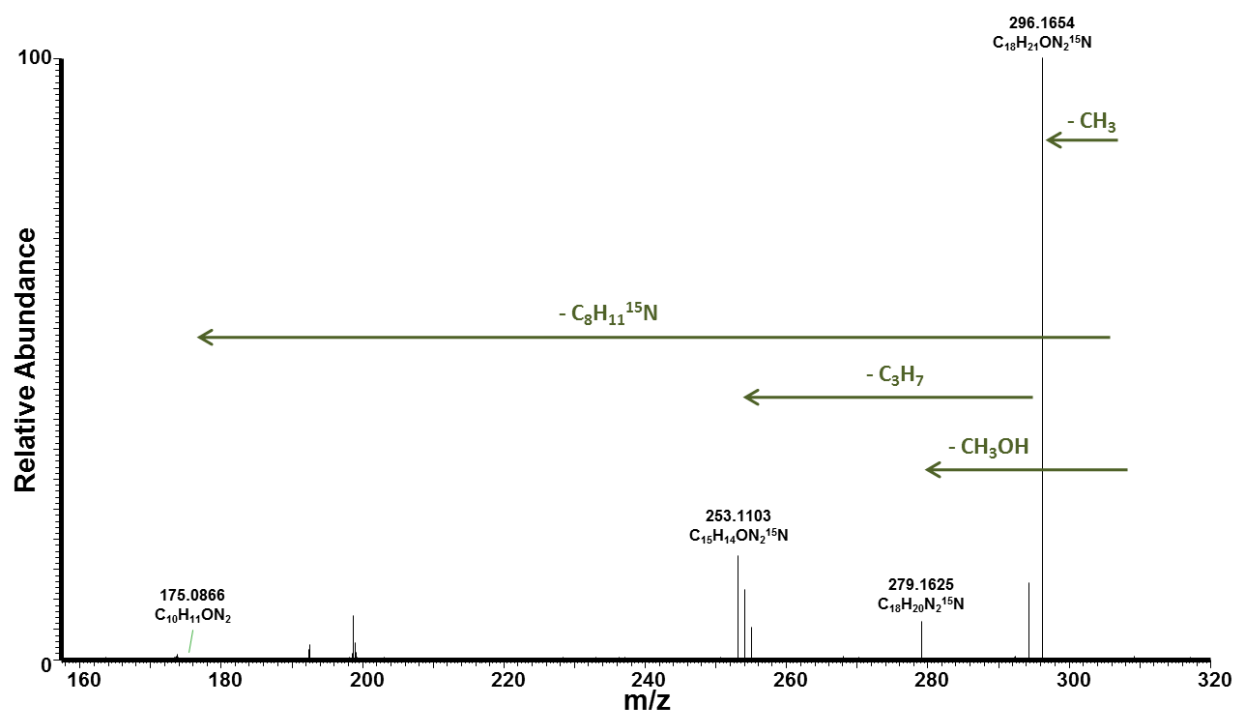


Abb. S179: HRMS²-Spektrum von 2-Methyl-3-butyl-Prodiginin mit eingebautem ¹⁵N von ¹⁵N-L-Serin (Verbindung 2 $[M+H]^+$: *m/z* 311, $C_{19}H_{24}N_2^{15}NO$).

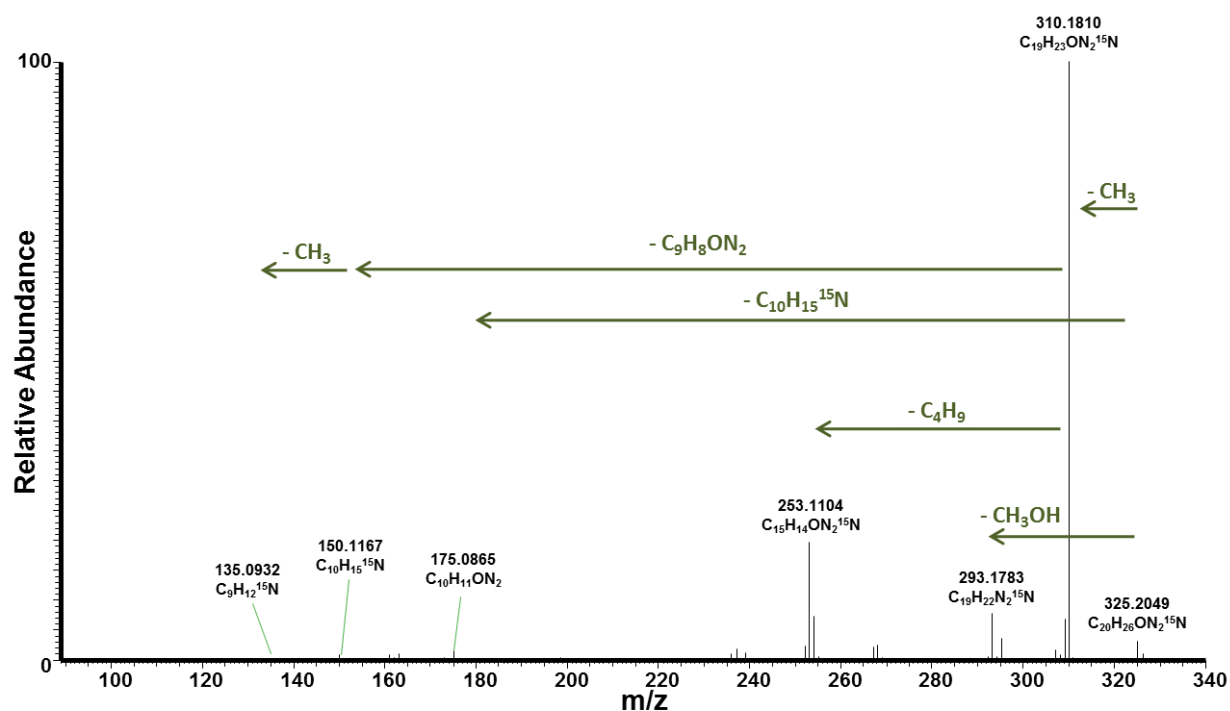


Abb. S180: HRMS²-Spektrum von Prodigiosin mit eingebautem ¹⁵N von ¹⁵N-L-Serin (Verbindung 3 [M+H]⁺: m/z 325, $C_{20}H_{26}N_2^{15}NO$).

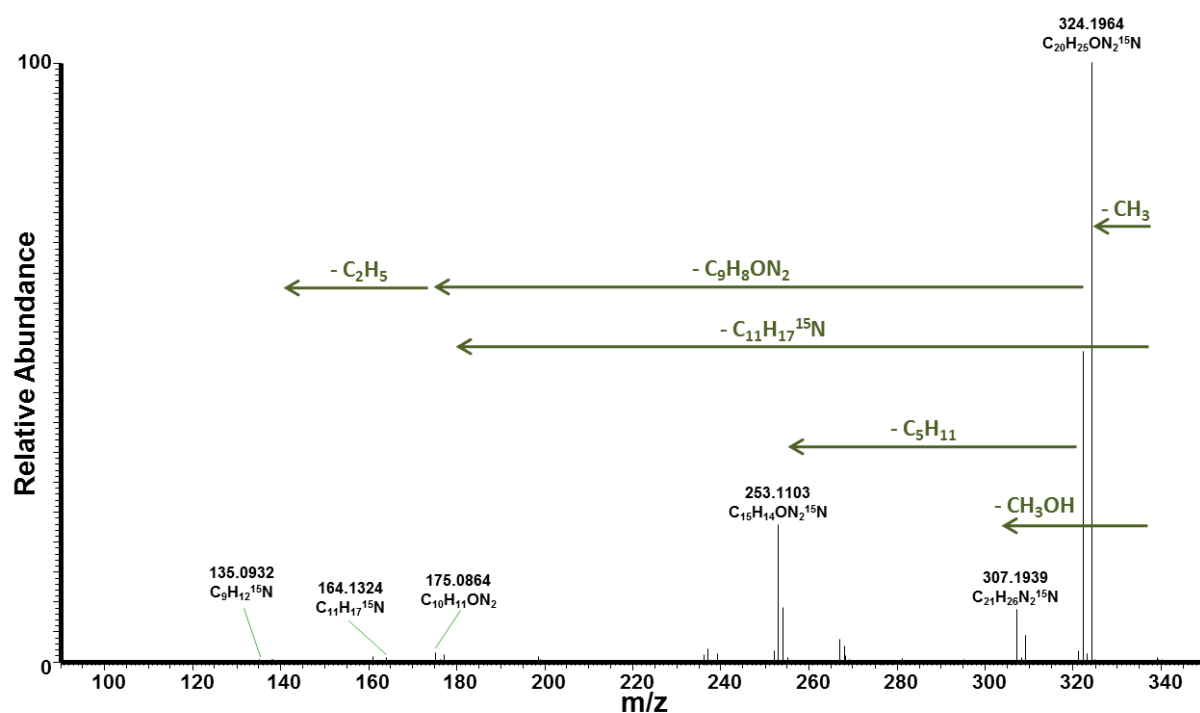


Abb. S181: HRMS²-Spektrum von 2-Methyl-3-hexyl-Prodiginin mit eingebautem ¹⁵N von ¹⁵N-L-Serin (Verbindung 4 [M+H]⁺: m/z 339, $C_{21}H_{28}N_2^{15}NO$).

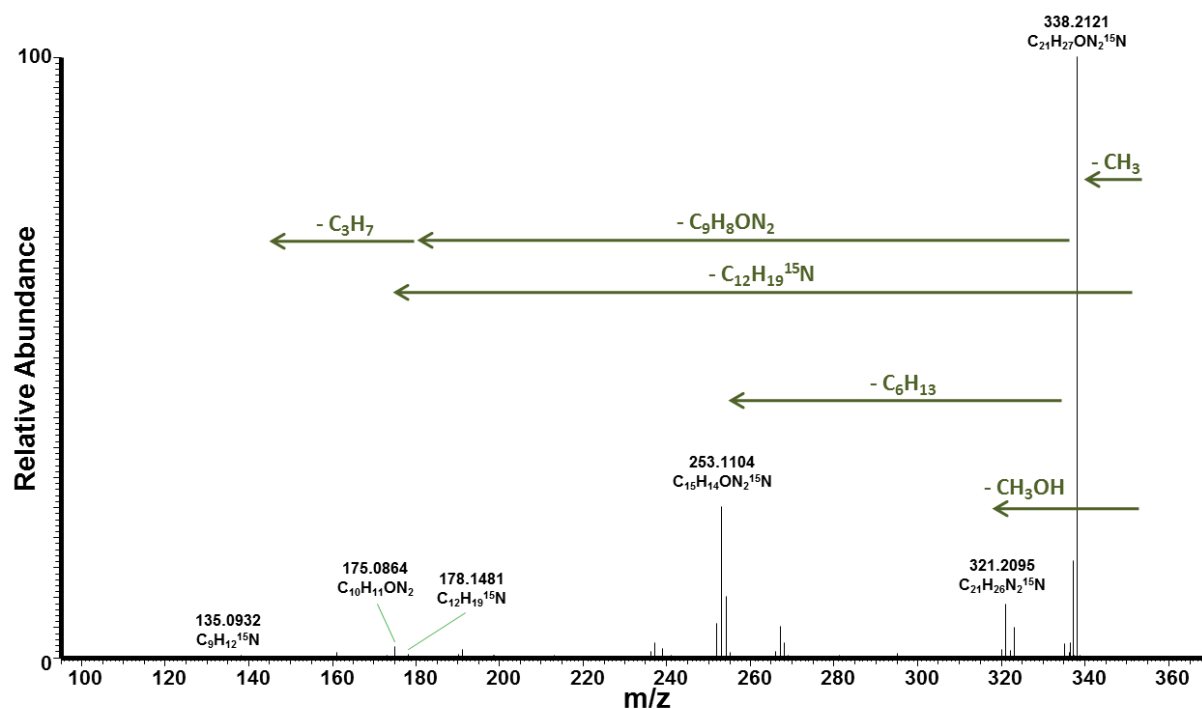


Abb. S182: HRMS²-Spektrum von 2-Methyl-3-heptyl-Prodiginin mit eingebautem ¹⁵N von ¹⁵N-L-Serin (Verbindung **5** [M+H]⁺: m/z 353, C₂₂H₃₀N₂¹⁵NO).

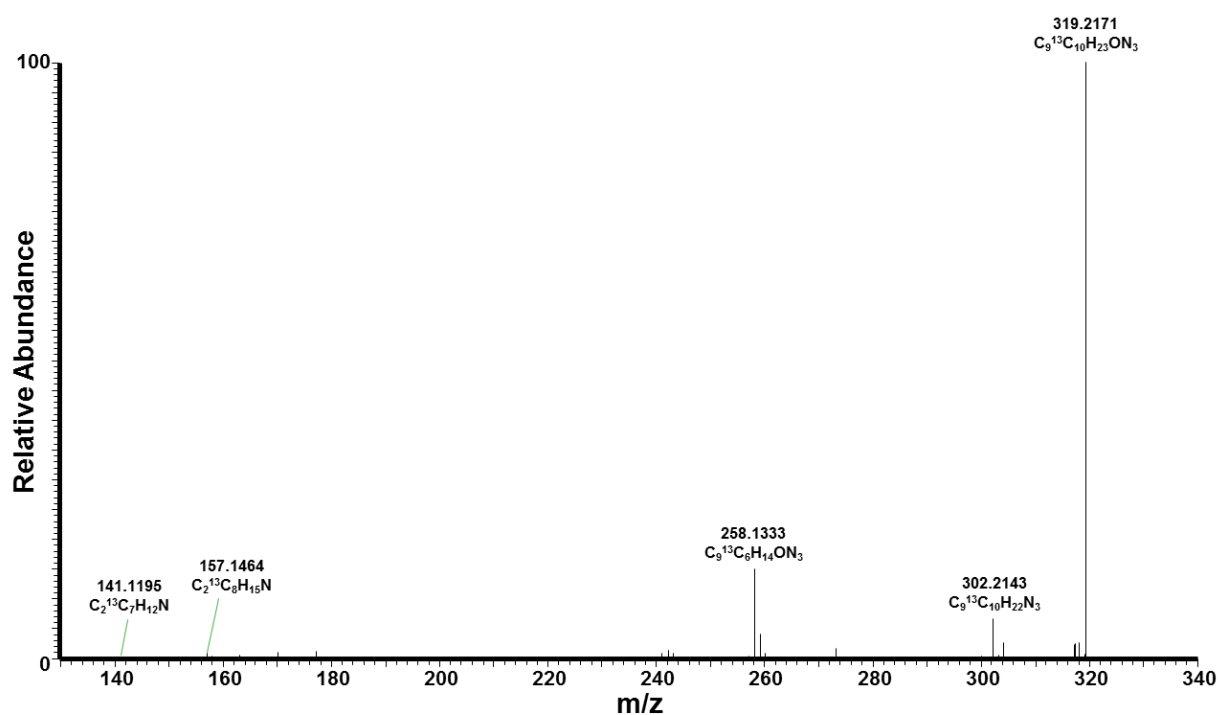


Abb. S183: HRMS²-Spektrum von Prodigosin mit 5 eingebauten [1,2-¹³C₂]-Acetateinheiten (Verbindung **3** [M+H]⁺: m/z 334, C₁₀¹³C₁₀H₂₆N₃O).

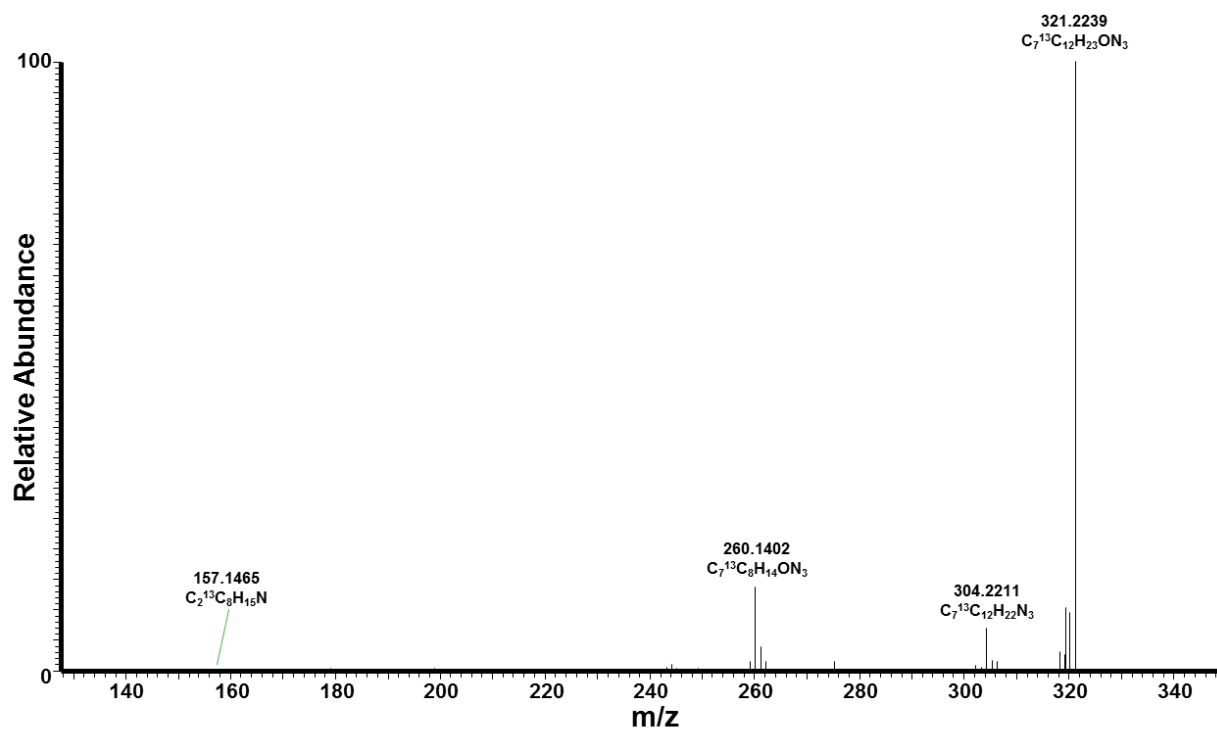


Abb. S184: HRMS²-Spektrum von Prodigiosin mit 6 eingebauten [1,2-¹³C₂]-Acetateinheiten (Verbindung 3 [M+H]⁺: *m/z* 336, C₈¹³C₁₂H₂₆N₃O).

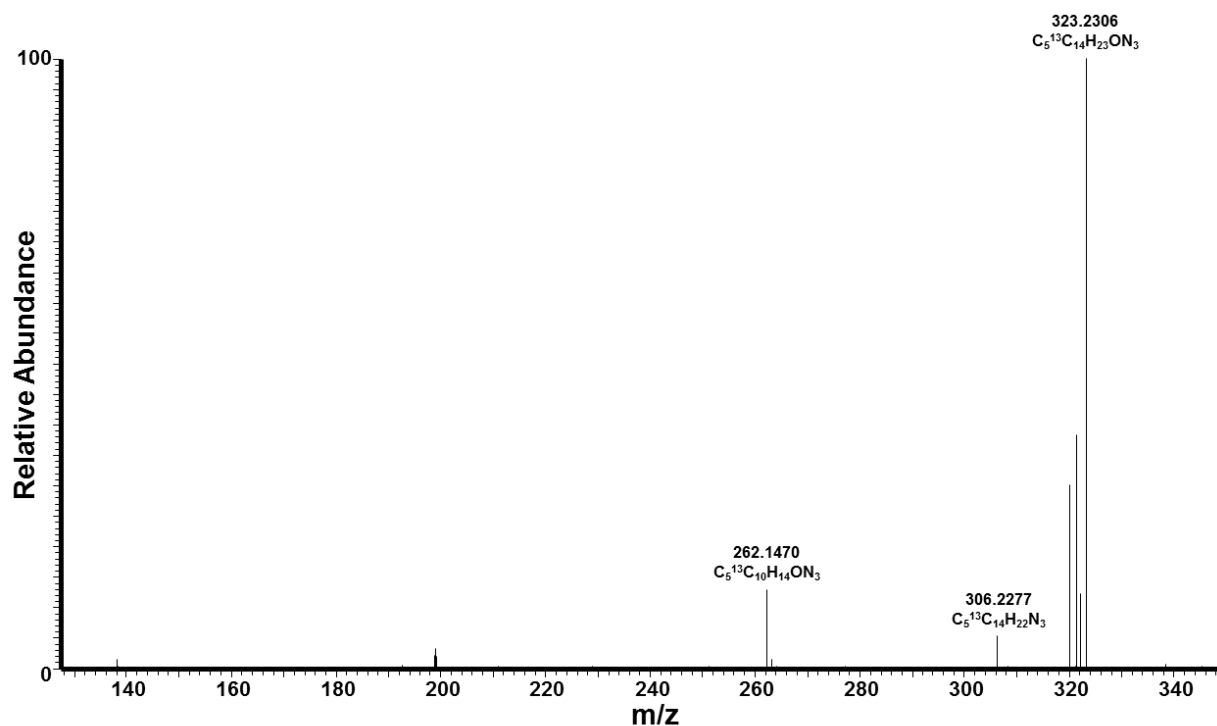


Abb. S185: HRMS²-Spektrum von Prodigiosin mit 7 eingebauten [1,2-¹³C₂]-Acetateinheiten (Verbindung 3 [M+H]⁺: *m/z* 338, C₆¹³C₁₄H₂₆N₃O).

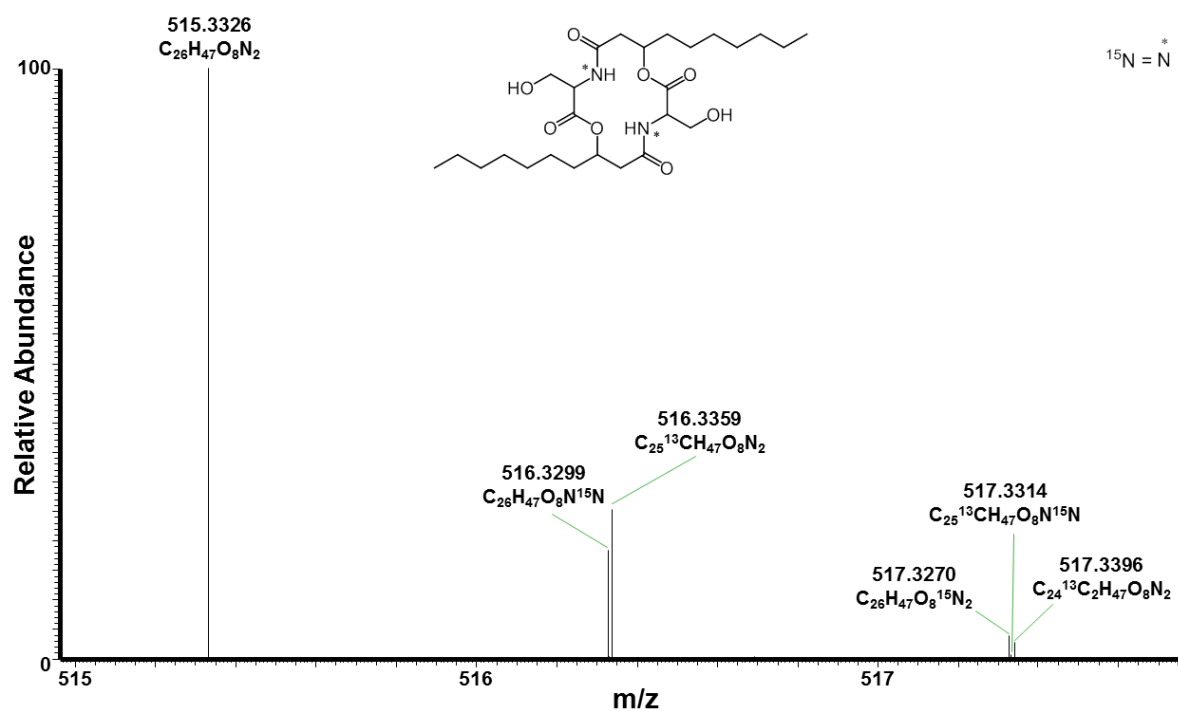


Abb. S186: HRMS-Spektrum von Serrawettin W1 / Serratamolide C₁₀+C₁₀ mit eingebautem ¹⁵N-L-Serin aus Nährlösung mit 2 mg/mL ¹⁵N-L-Serin (Verbindung **10** [M+H]⁺: m/z 515, C₂₆H₄₇N₂O₈).

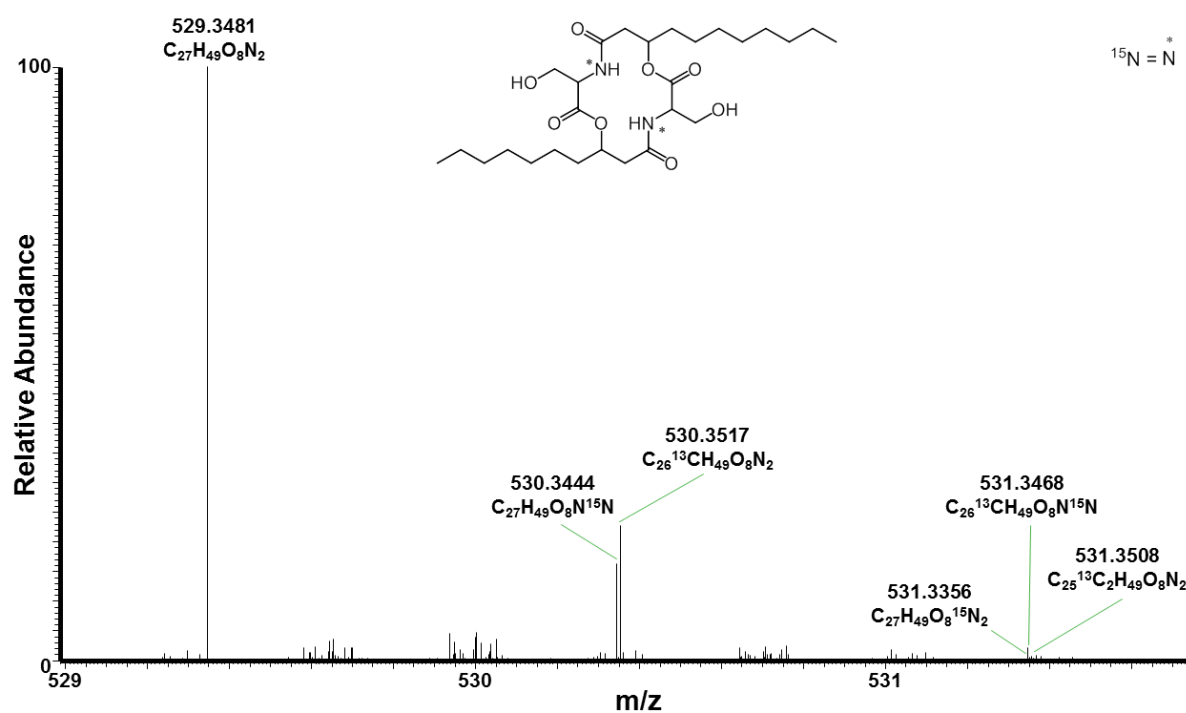


Abb. S187: HRMS-Spektrum von Serratamolide C₁₀+C₁₁ mit eingebautem ¹⁵N-L-Serin aus Nährlösung mit 2 mg/mL ¹⁵N-L-Serin (Verbindung **11** [M+H]⁺: m/z 529, C₂₇H₄₉N₂O₈).

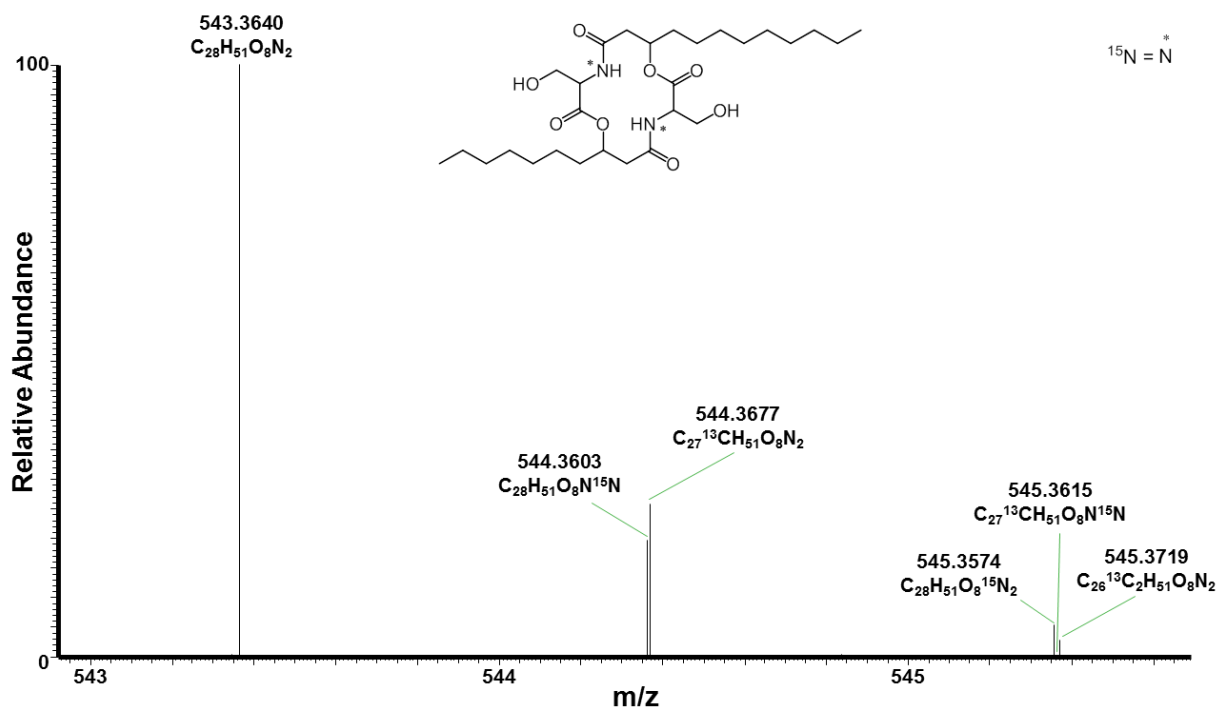


Abb. S188: HRMS-Spektrum von Serratamolid $C_{10}+C_{12}$ mit eingebautem ^{15}N -L-Serin aus Nährlösung mit 2 mg/mL ^{15}N -L-Serin (Verbindung **12** $[M+H]^+$: m/z 543, $C_{28}H_{51}N_2O_8$).

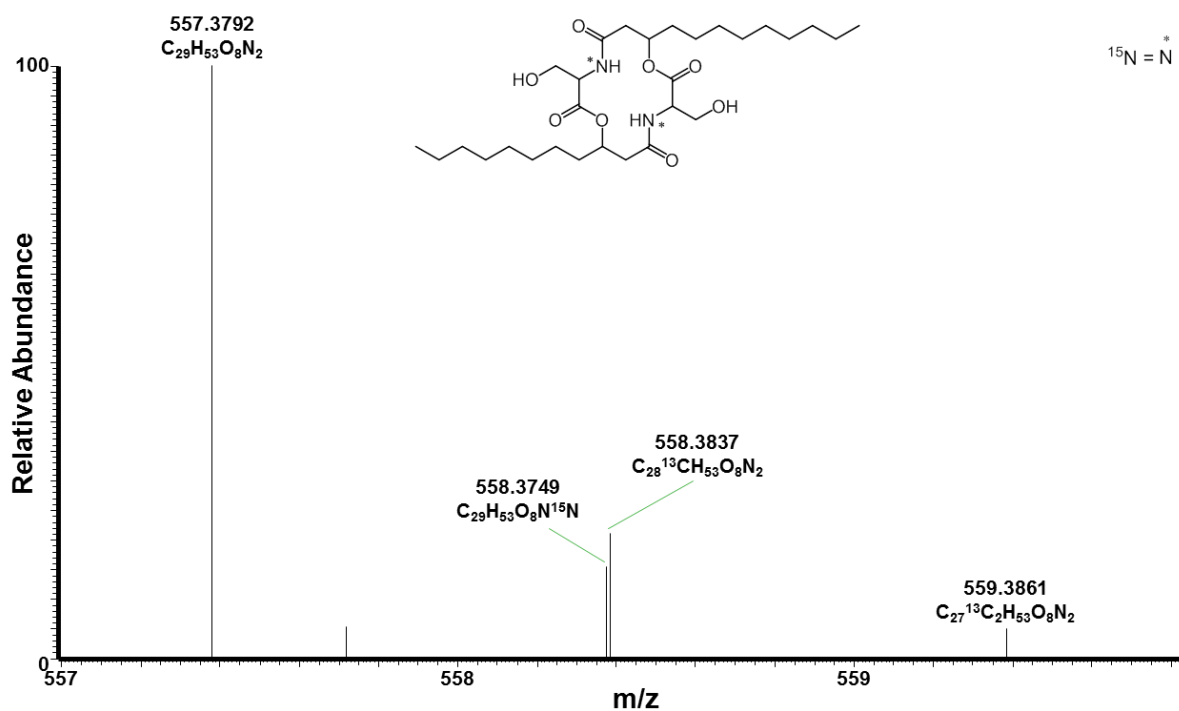


Abb. S189: HRMS-Spektrum von Serratamolid $C_{11}+C_{12}$ mit eingebautem ^{15}N -L-Serin aus Nährlösung mit 2 mg/mL ^{15}N -L-Serin (Verbindung **13** $[M+H]^+$: m/z 557, $C_{29}H_{53}N_2O_8$).

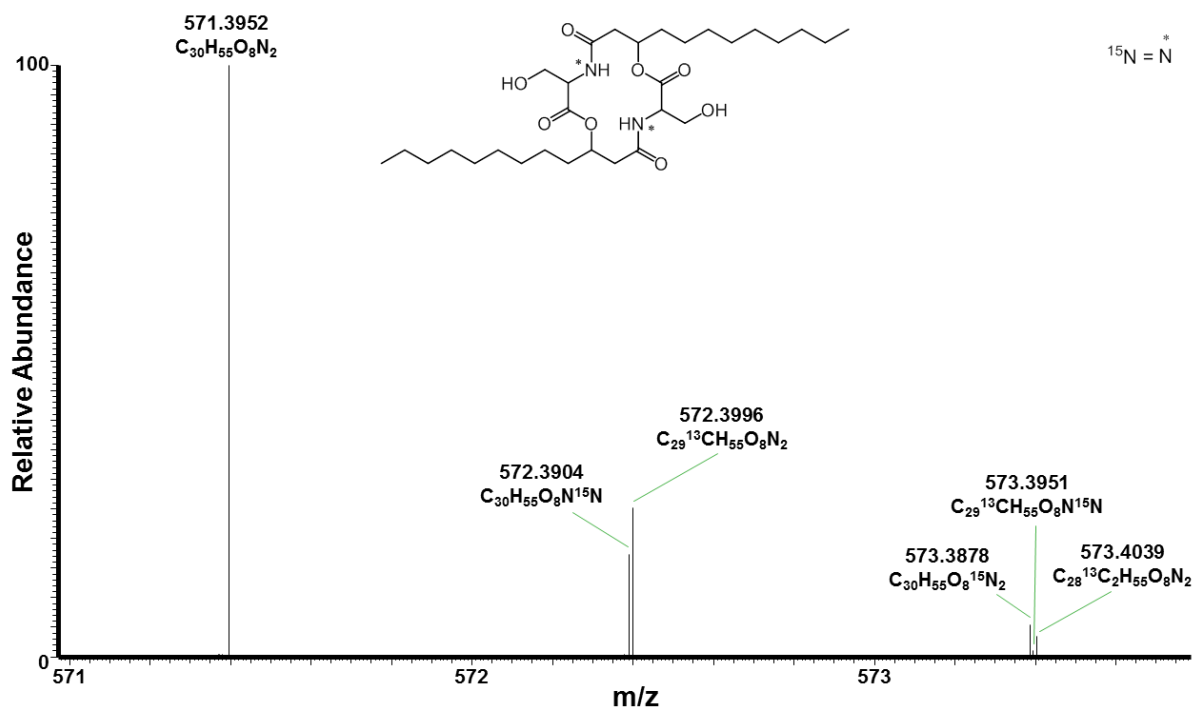


Abb. S190: HRMS-Spektrum von Serratamolide $C_{12}+C_{12}$ mit eingebautem ^{15}N -L-Serin aus Nährlösung mit 2 mg/mL ^{15}N -L-Serin (Verbindung **14** $[M+H]^+$: m/z 571, $C_{30}H_{55}N_2O_8$).

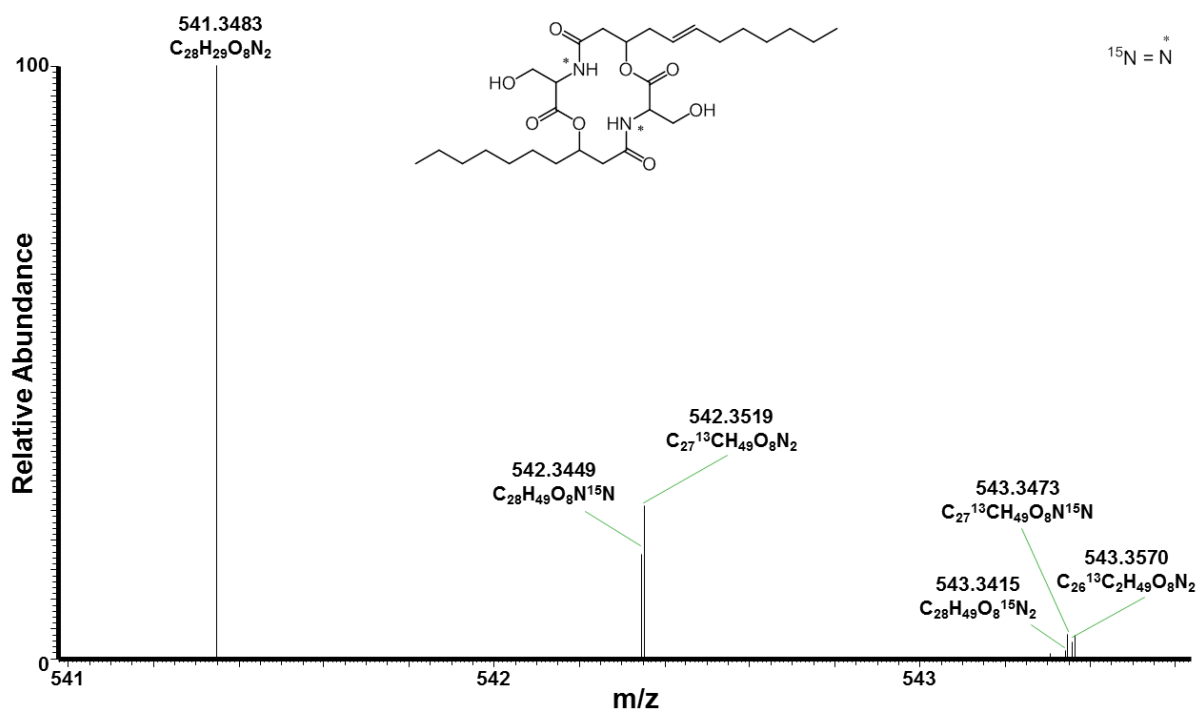


Abb. S191: HRMS-Spektrum von Serratamolide $C_{10}+C_{12:1}$ mit eingebautem ^{15}N -L-Serin aus Nährlösung mit 2 mg/mL ^{15}N -L-Serin (Verbindung **17** $[M+H]^+$: m/z 541, $C_{28}H_{49}N_2O_8$).

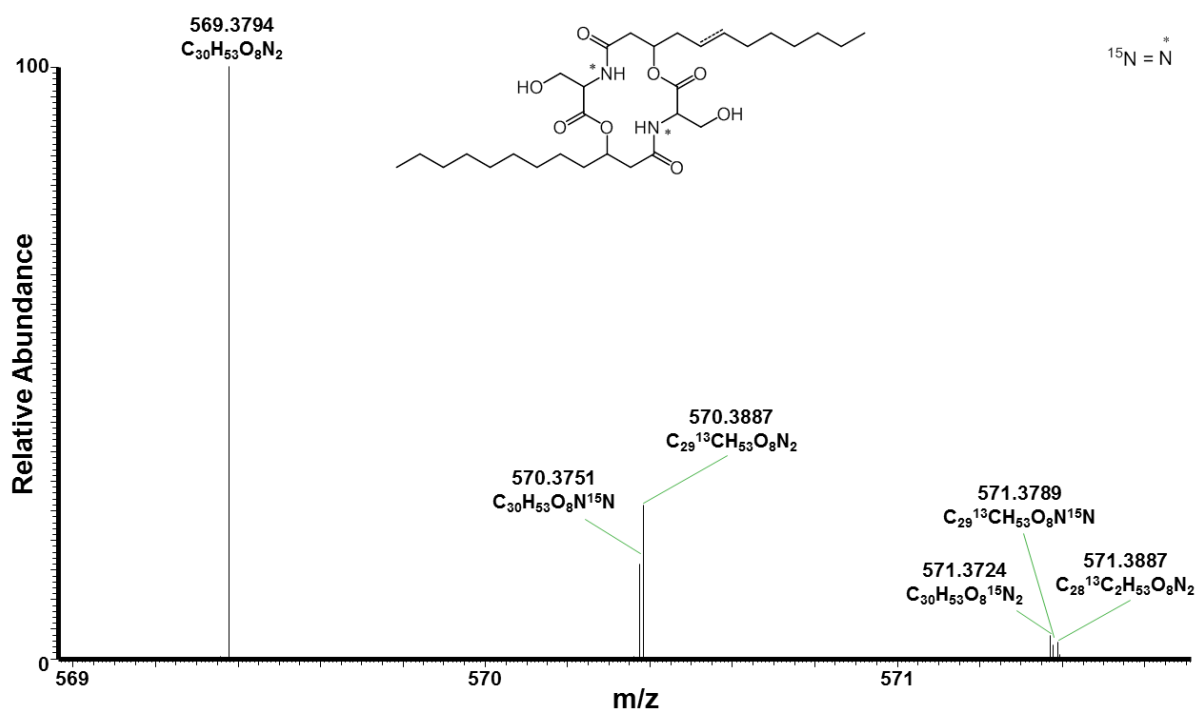


Abb. S192: HRMS-Spektrum von Serratamolide $C_{12}+C_{12:1}$ mit eingebautem ^{15}N -L-Serin aus Nährlösung mit 2 mg/mL ^{15}N -L-Serin (Verbindung **19** $[M+H]^+$: m/z 569, $C_{30}H_{53}N_2O_8$).

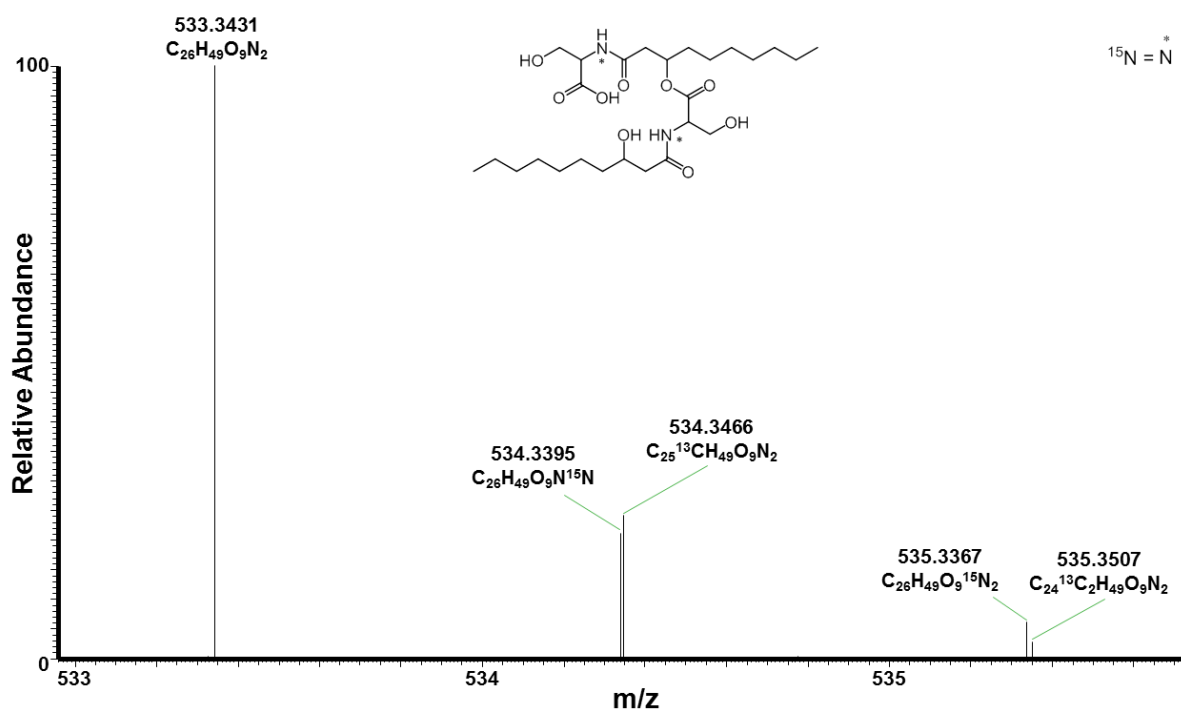


Abb. S193: HRMS-Spektrum von Serratamolide $C_{10}+C_{10}$ mit eingebautem ^{15}N -L-Serin aus Nährlösung mit 2 mg/mL ^{15}N -L-Serin (Verbindung **20** $[M+H]^+$: m/z 533, $C_{26}H_{49}N_2O_9$).

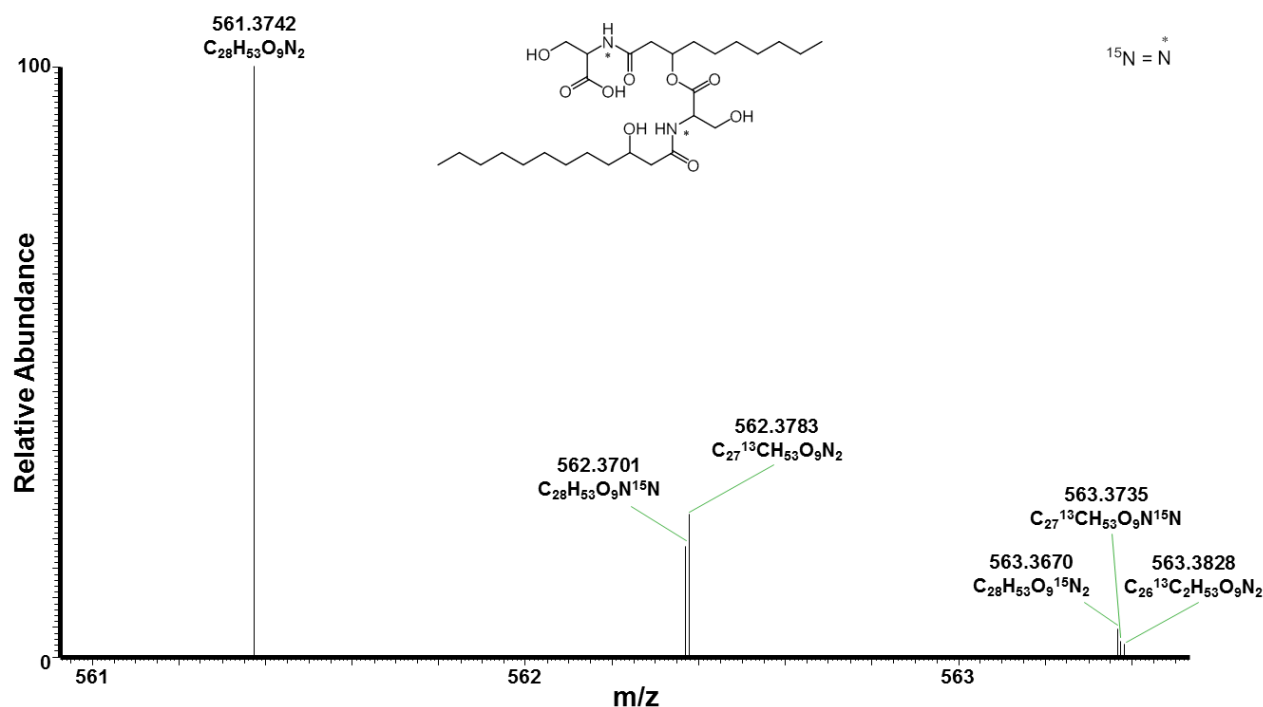


Abb. S194: HRMS-Spektrum von Serratamolide C₁₀+C₁₂ mit eingebautem ¹⁵N-L-Serin aus Nährlösung mit 2 mg/mL ¹⁵N-L-Serin (Verbindung **22** [M+H]⁺: *m/z* 561, C₂₈H₅₃N₂O₉).

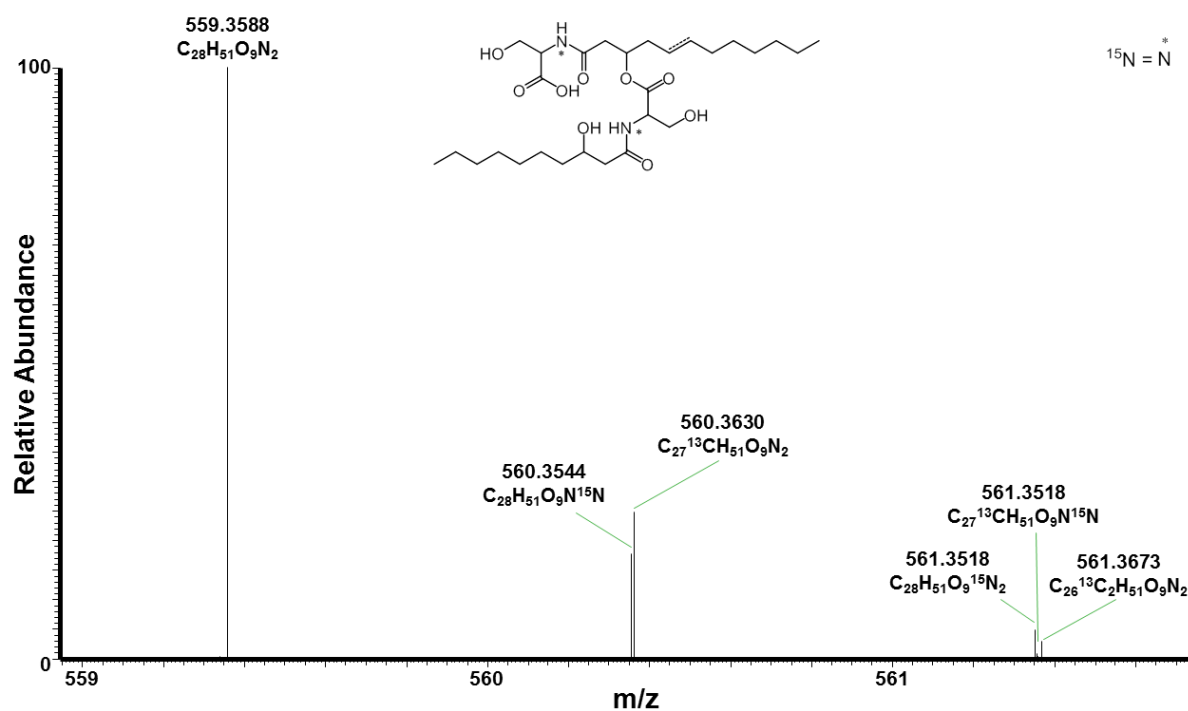


Abb. S195: HRMS-Spektrum von Serratamolide C₁₀+C_{12:1} mit eingebautem ¹⁵N-L-Serin aus Nährlösung mit 2 mg/mL ¹⁵N-L-Serin (Verbindung **23** [M+H]⁺: *m/z* 559, C₂₈H₅₁N₂O₉).

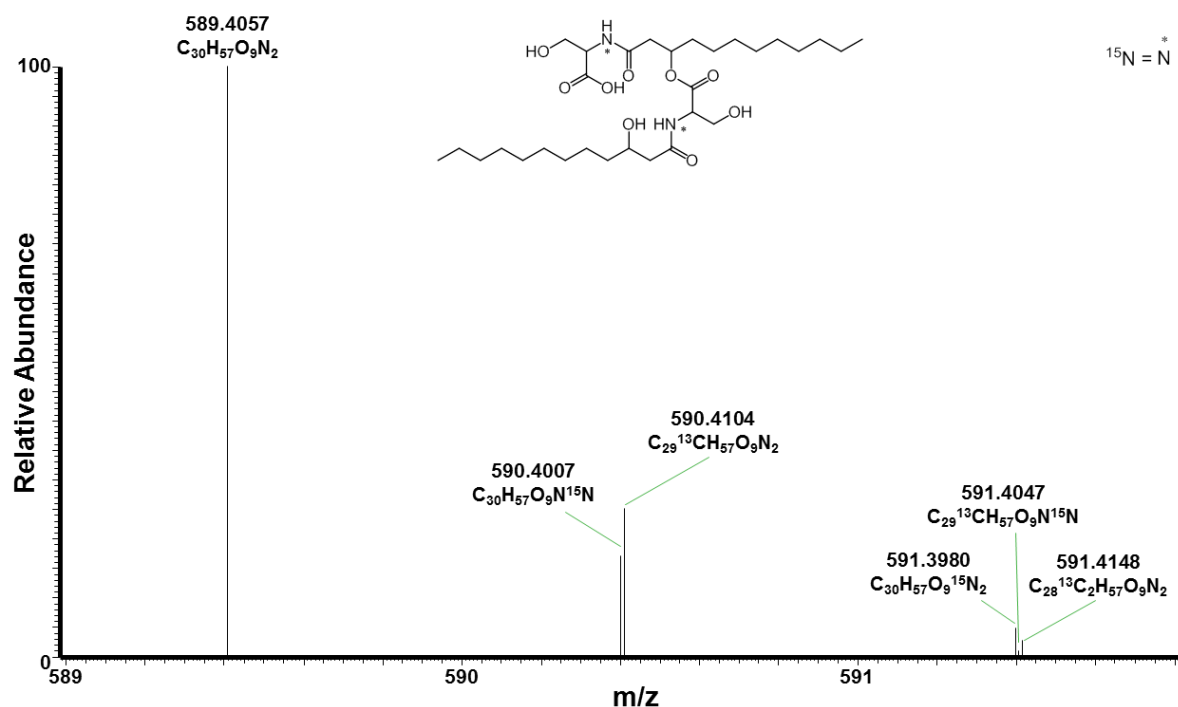


Abb. S196: HRMS-Spektrum von Serratamolide $C_{12}+C_{12}$ mit eingebautem ^{15}N -L-Serin aus Nährlösung mit 2 mg/mL ^{15}N -L-Serin (Verbindung **26** $[M+H]^+$: m/z 589, $C_{30}H_{57}N_2O_9$).

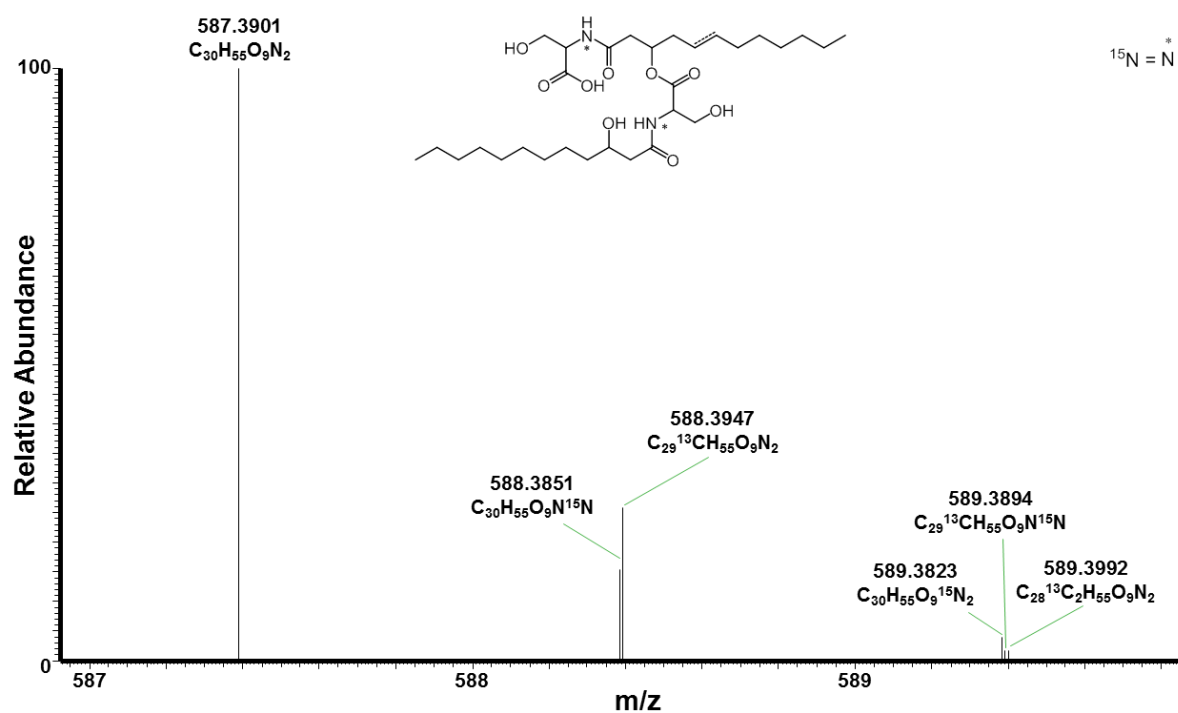


Abb. S197: HRMS-Spektrum von Serratamolide $C_{12}+C_{12:1}$ mit eingebautem ^{15}N -L-Serin aus Nährlösung mit 2 mg/mL ^{15}N -L-Serin (Verbindung **29** $[M+H]^+$: m/z 587, $C_{30}H_{55}N_2O_9$).

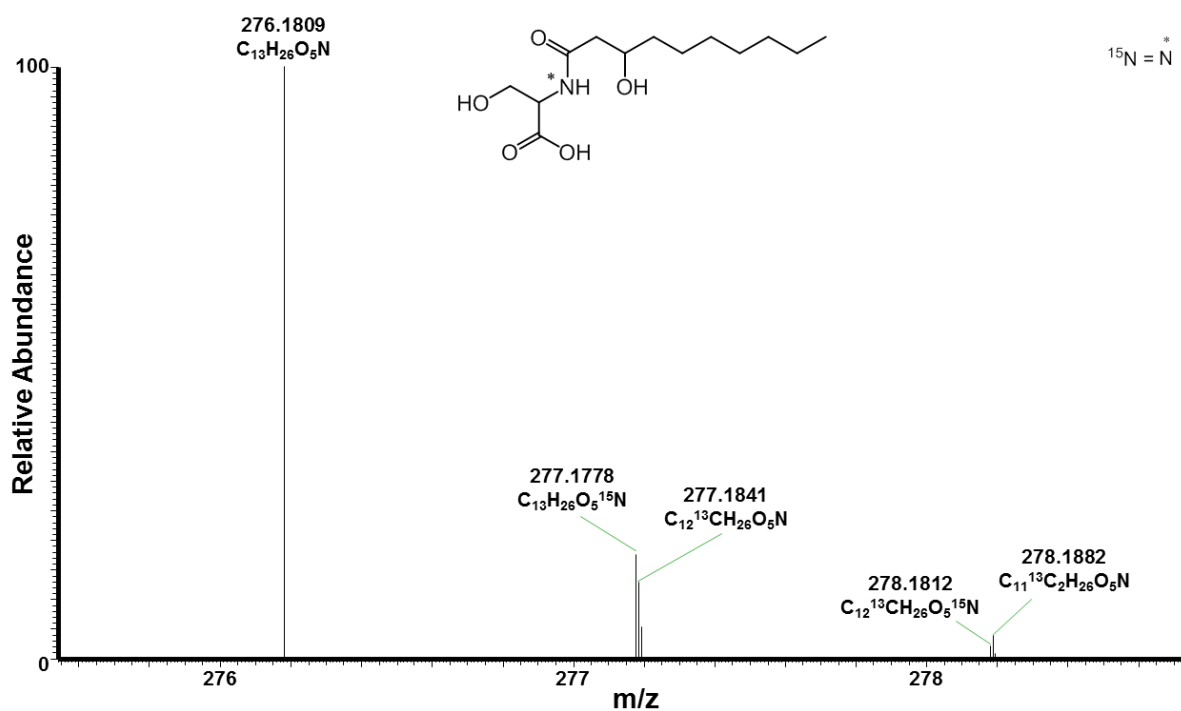


Abb. S198: HRMS-Spektrum von Serratamsäure mit eingebautem ^{15}N -L-Serin aus Nährlösung mit 2 mg/mL ^{15}N -L-Serin (N-(D-3-Hydroxydecanoyl)-L-Serin, Verbindung **31** $[\text{M}+\text{H}]^+$: m/z 276, $\text{C}_{13}\text{H}_{26}\text{NO}_5$).

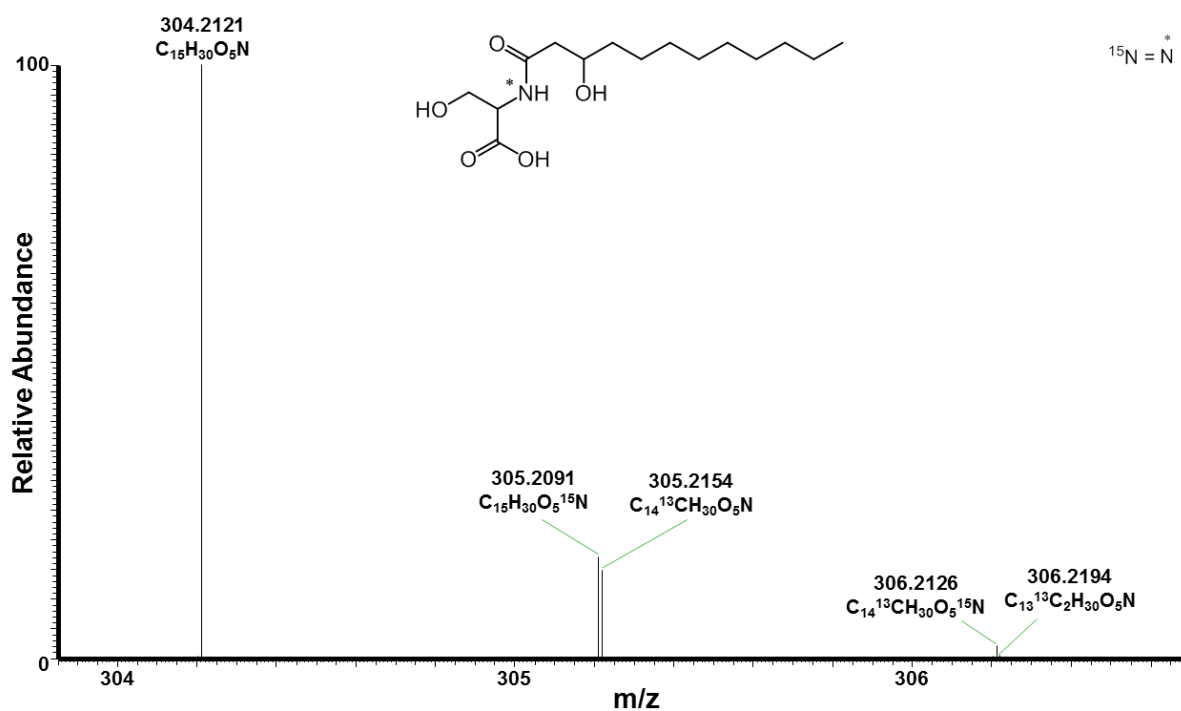


Abb. S199: HRMS-Spektrum von Serratamsäure-Derivat mit eingebautem ^{15}N -L-Serin aus Nährlösung mit 2 mg/mL ^{15}N -L-Serin (Verbindung **32** $[\text{M}+\text{H}]^+$: m/z 304, $\text{C}_{15}\text{H}_{30}\text{NO}_5$).

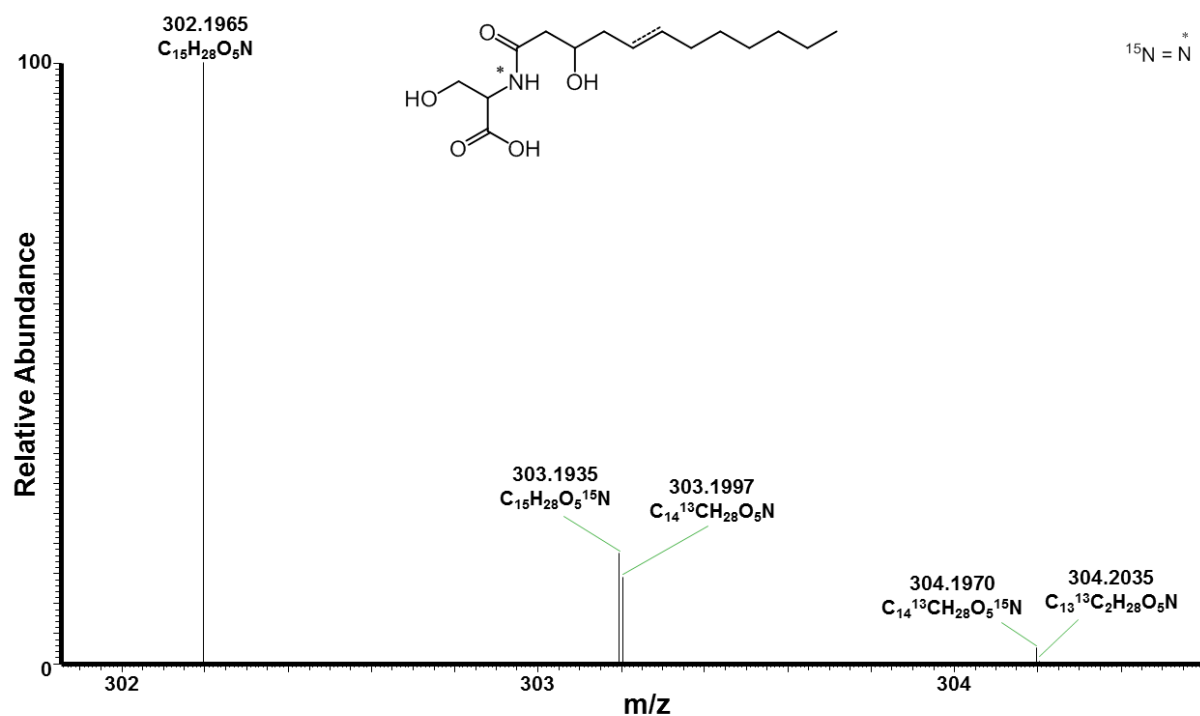


Abb. S200: HRMS-Spektrum von Serratamsäure-Derivat mit Doppelbindung mit eingebautem ^{15}N -L-Serin aus Nährlösung mit 2 mg/mL ^{15}N -L-Serin (Verbindung **33** $[\text{M}+\text{H}]^+$: m/z 302, $\text{C}_{15}\text{H}_{28}\text{NO}_5$).

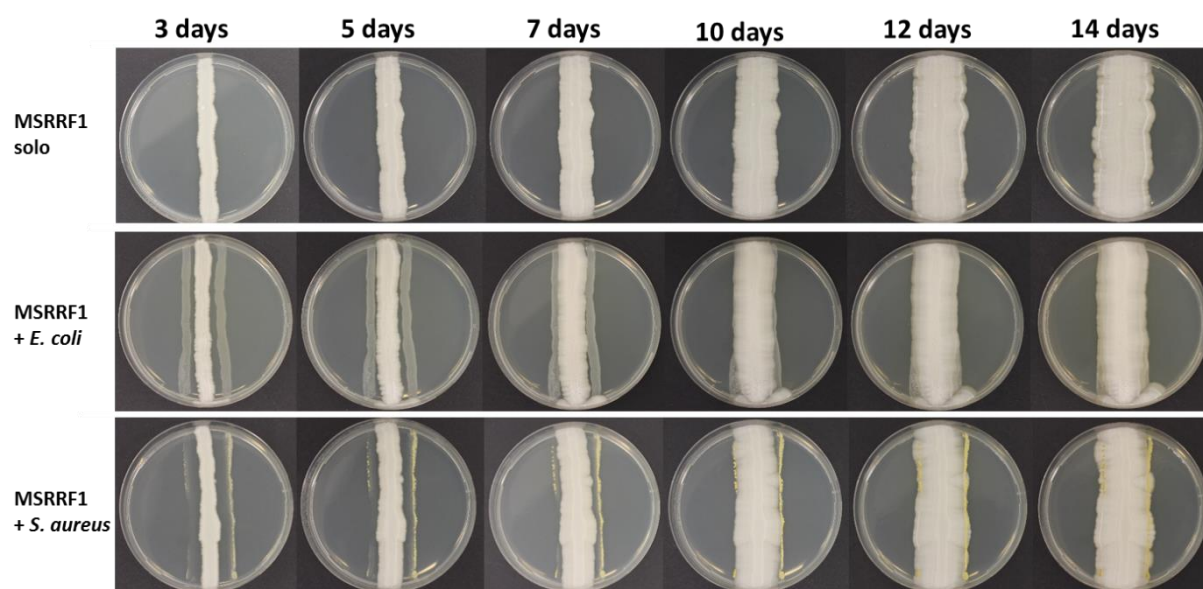


Abb. S201: Konfrontationsassay von Pilzendophyt *Pichia* spp. gegen *S. aureus* (DSM 799) und *E. coli* (DSM 682).

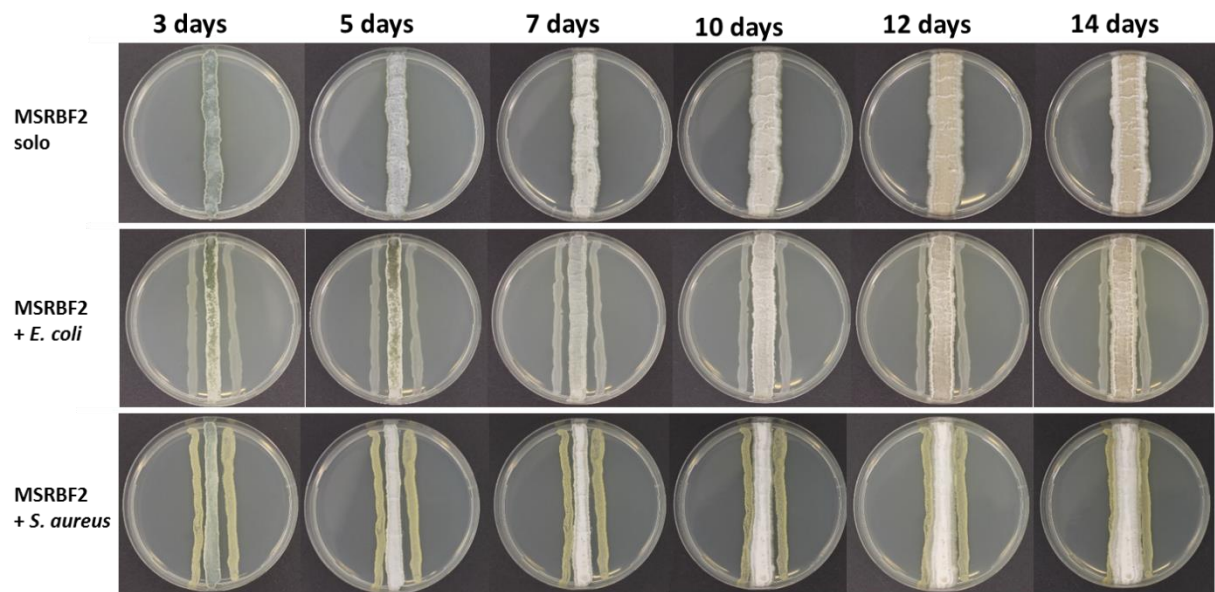


Abb. S202: Konfrontationsassay von Pilzendorphyt *A. caesiellus* gegen *S. aureus* (DSM 799) und *E. coli* (DSM 682).

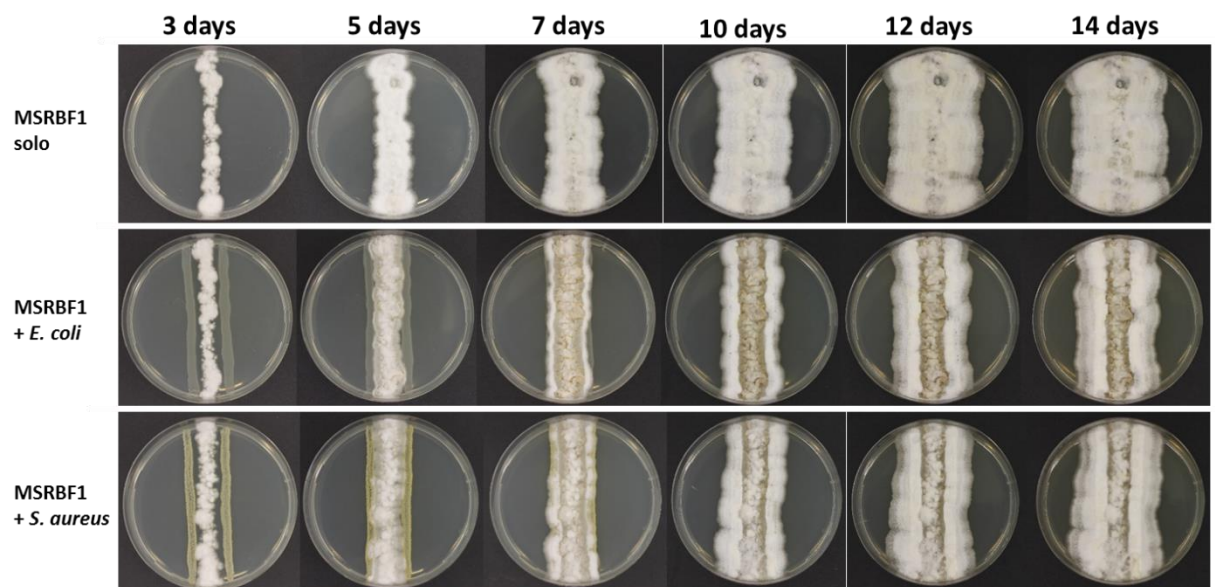


Abb. S203: Konfrontationsassay von Pilzendorphyt *P. virgatula* gegen *S. aureus* (DSM 799) und *E. coli* (DSM 682).

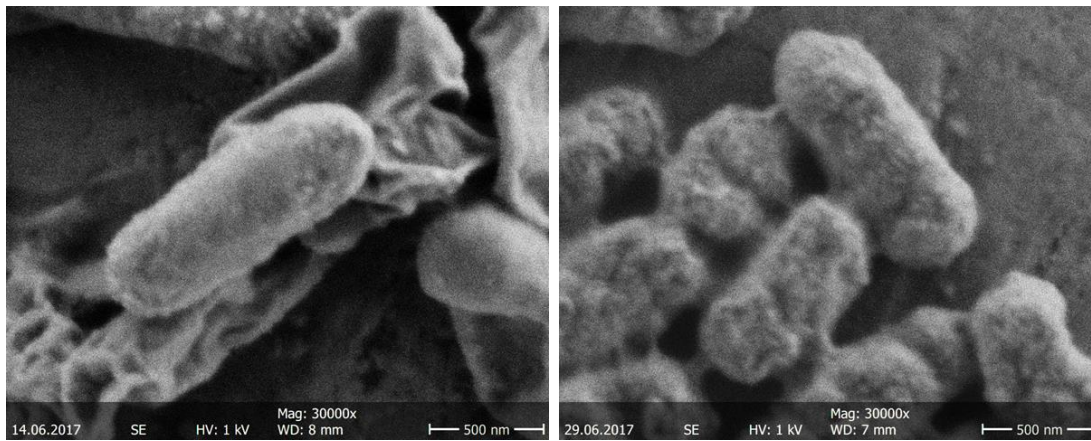


Abb. S204: Rasterelektronenmikroskopie-Bilder von endophytischem *S. marcescens* MSRBB2.

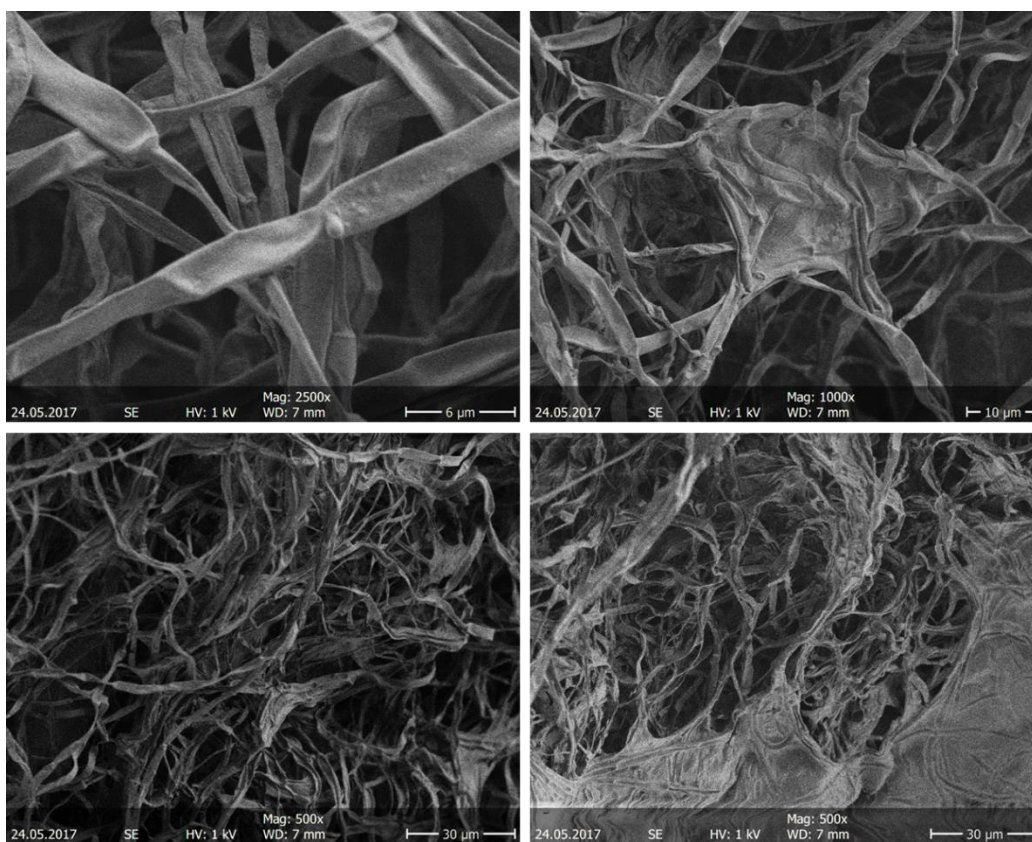


Abb. S205: Rasterelektronenmikroskopie-Bilder von endophytischem *P. virgatula*.

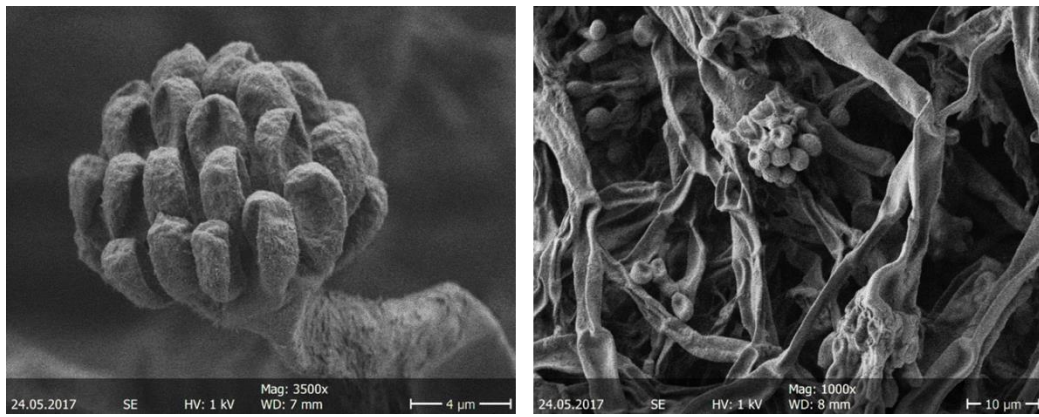


Abb. S206: Rasterelektronenmikroskopie-Bilder (1) von endophytischem *A. caesiellus*.

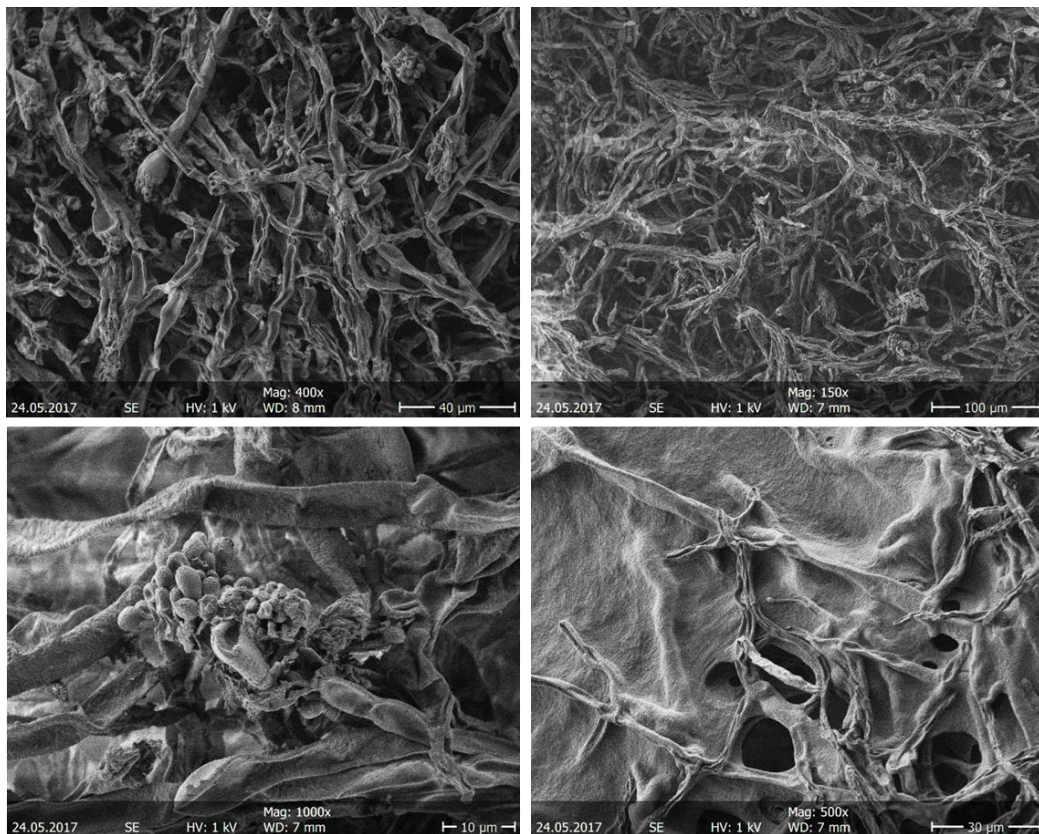


Abb. S207: Rasterelektronenmikroskopie-Bilder (2) von endophytischem *A. caesiellus*.

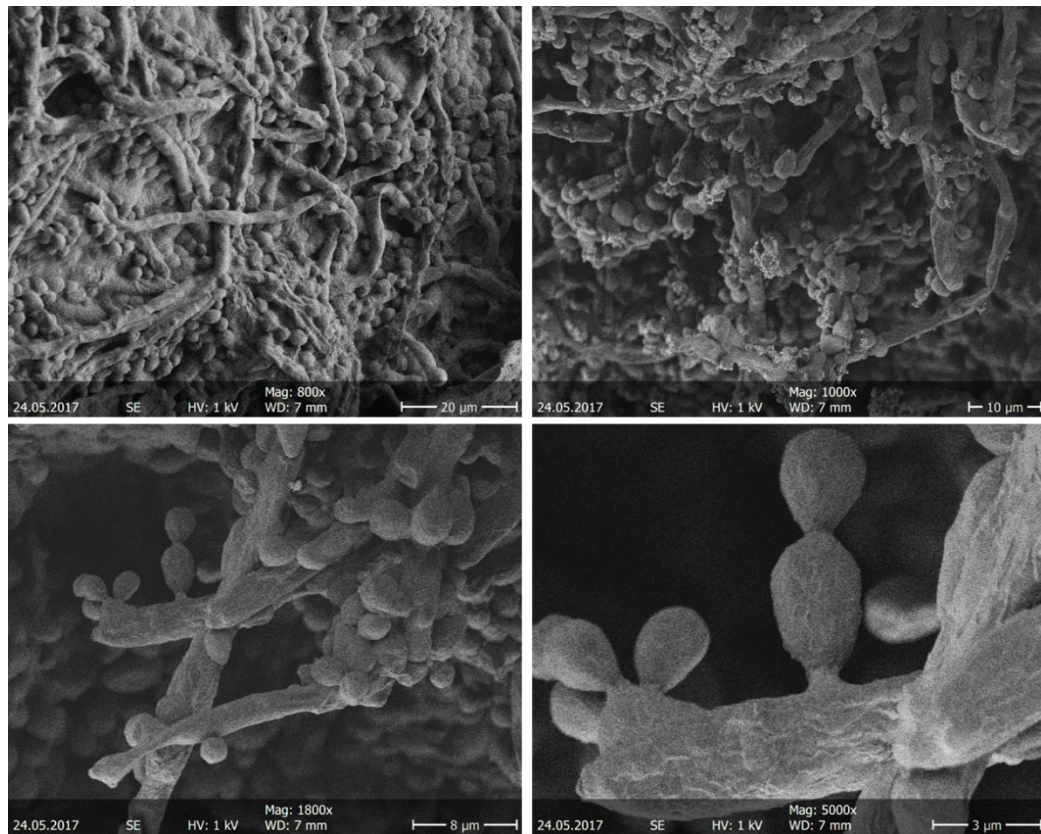


Abb. S208: Rasterelektronenmikroskopie-Bilder (1) von endophytischer *Pichia* spp.

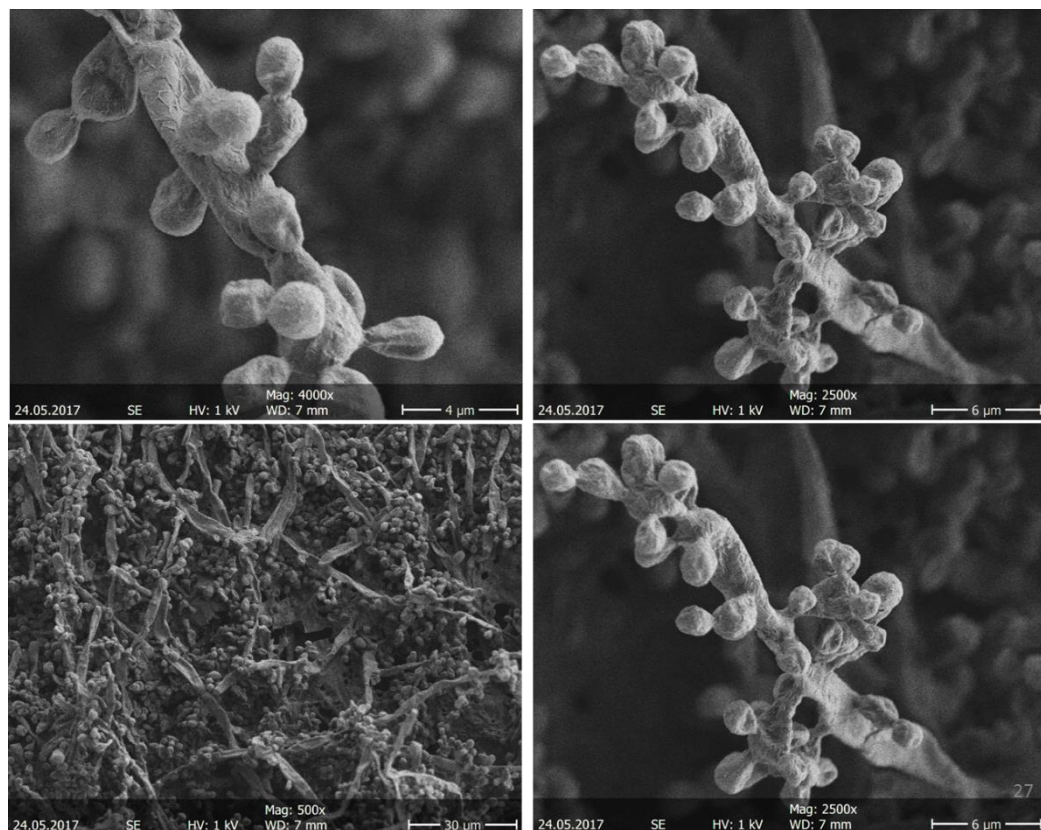


Abb. S209: Rasterelektronenmikroskopie-Bilder (2) von endophytischer *Pichia* spp.

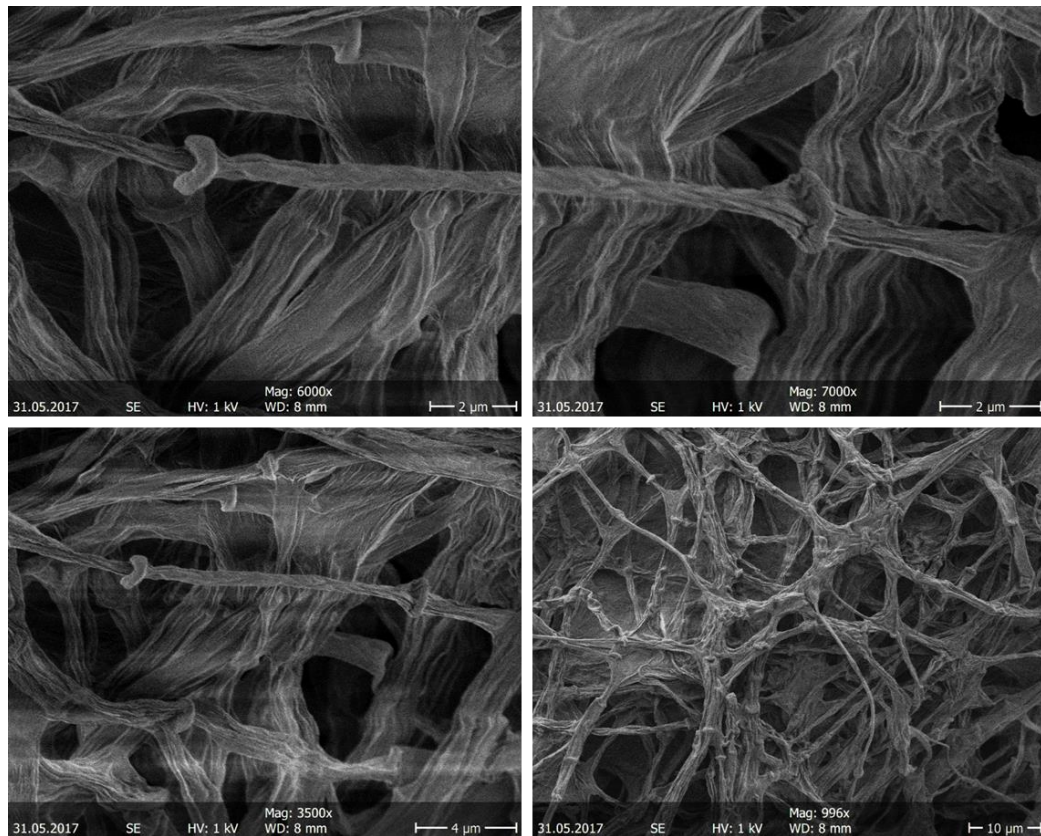


Abb. S210: Rasterelektronenmikroskopie-Bilder (1) der Co-Kultivierung von endophytem *P. virgatula* und *S. marcescens* MSRBB2.

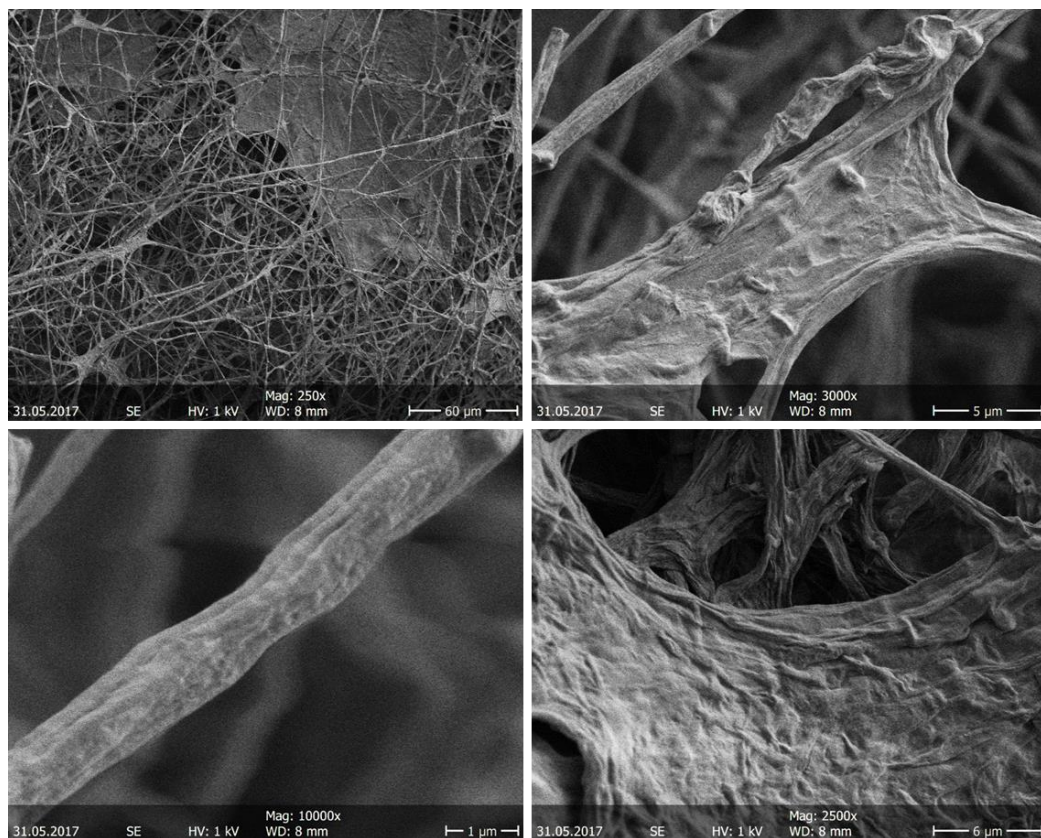


Abb. S211: Rasterelektronenmikroskopie-Bilder (2) der Co-Kultivierung von endophytem *P. virgatula* und *S. marcescens* MSRBB2.

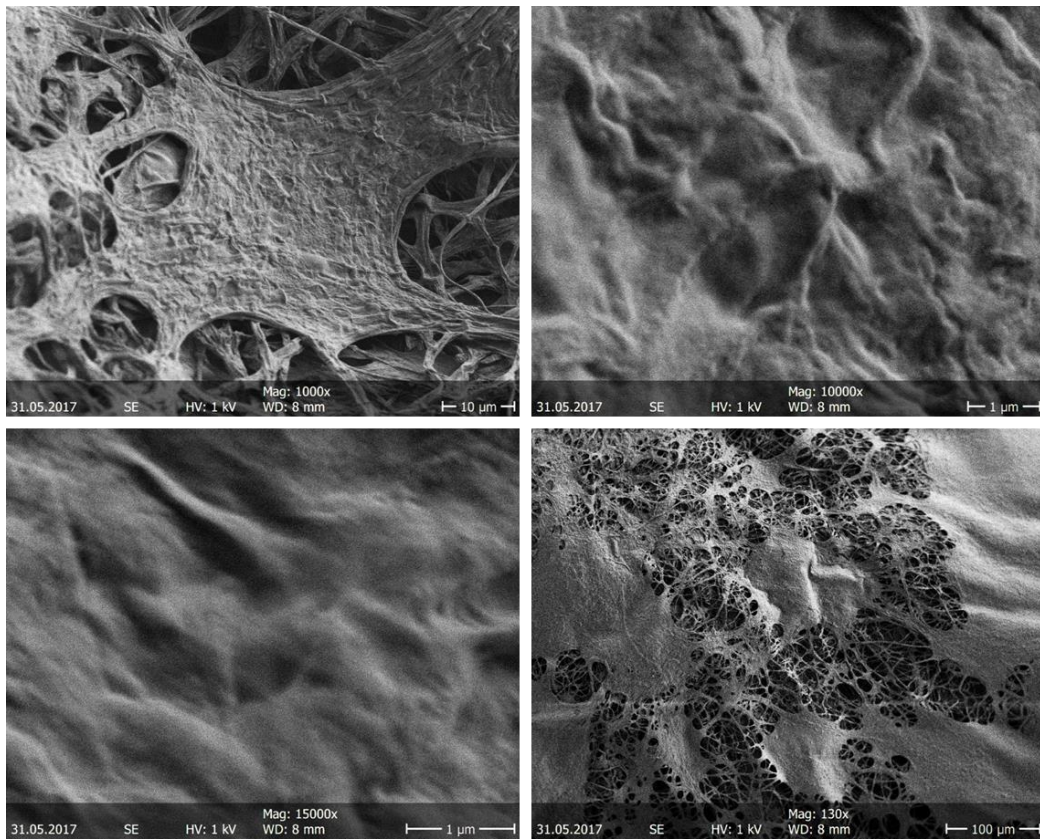


Abb. S212: Rasterelektronenmikroskopie-Bilder (3) der Co-Kultivierung von endophytem *P. virgata* und *S. marcescens* MSRBB2.

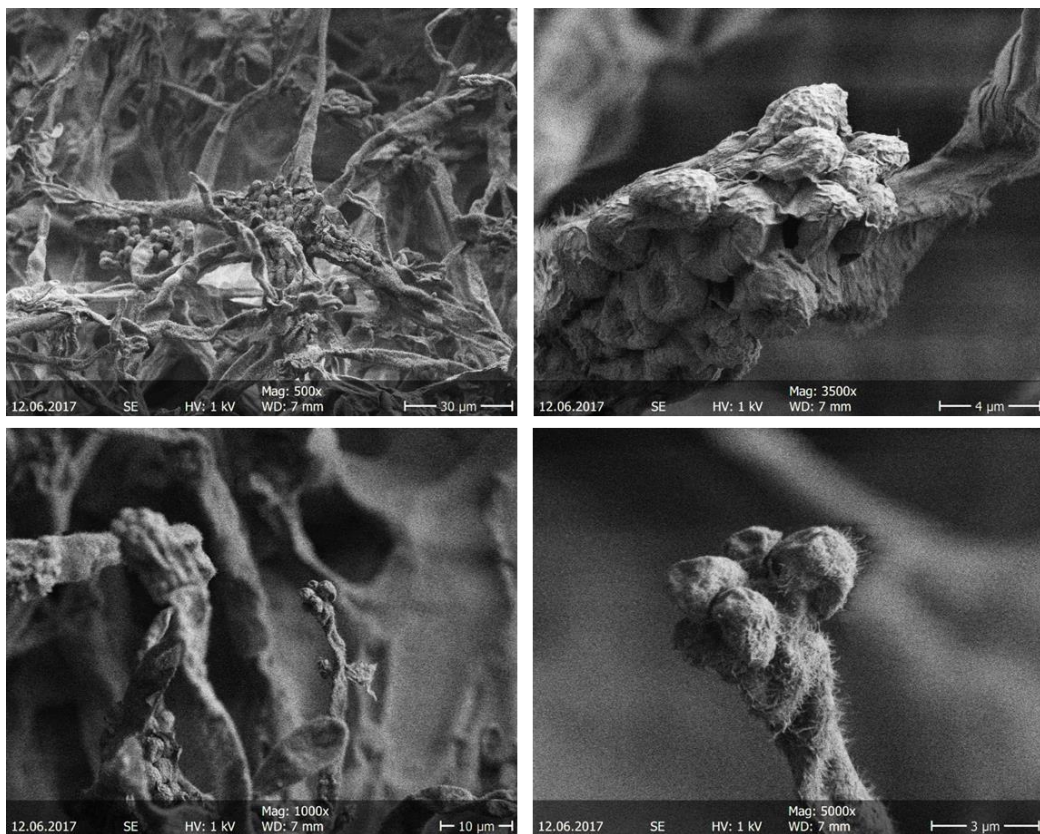


Abb. S213: Rasterelektronenmikroskopie-Bilder (1) der Co-Kultivierung von endophytem *A. caesiellus* und *S. marcescens* MSRBB2.

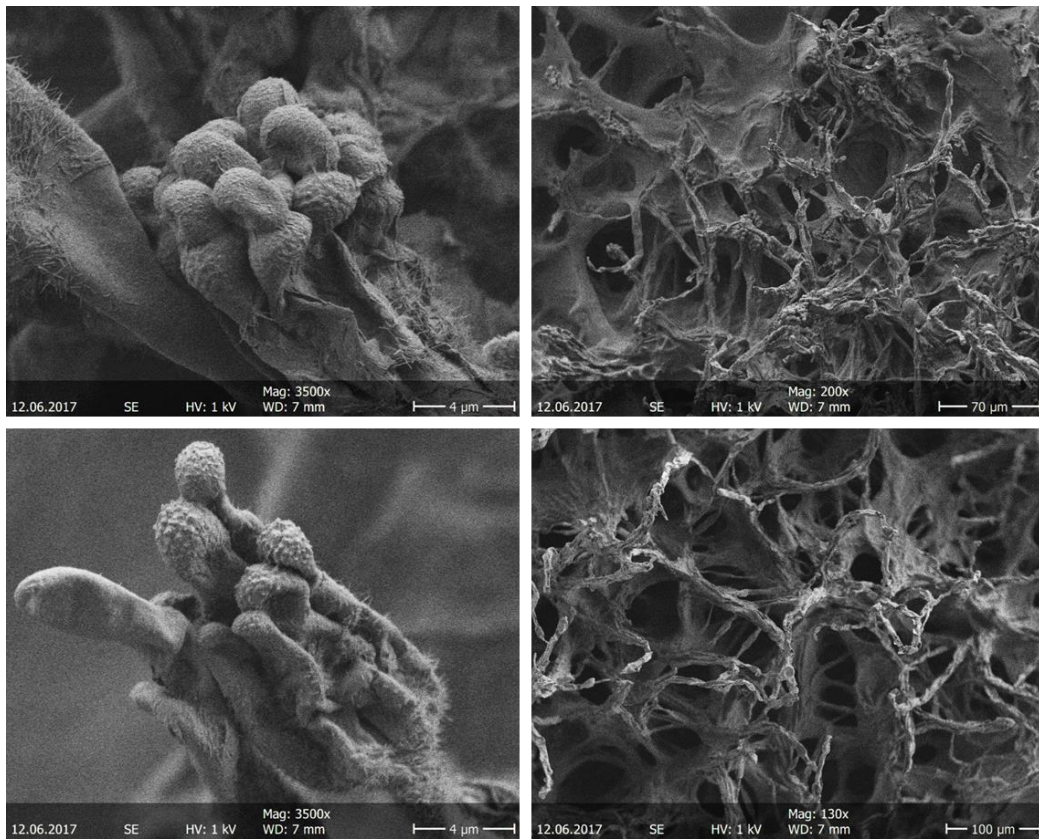


Abb. S214: Rasterelektronenmikroskopie-Bilder (2) der Co-Kultivierung von endophytem *A. caesiellus* und *S. marcescens* MSRBB2.

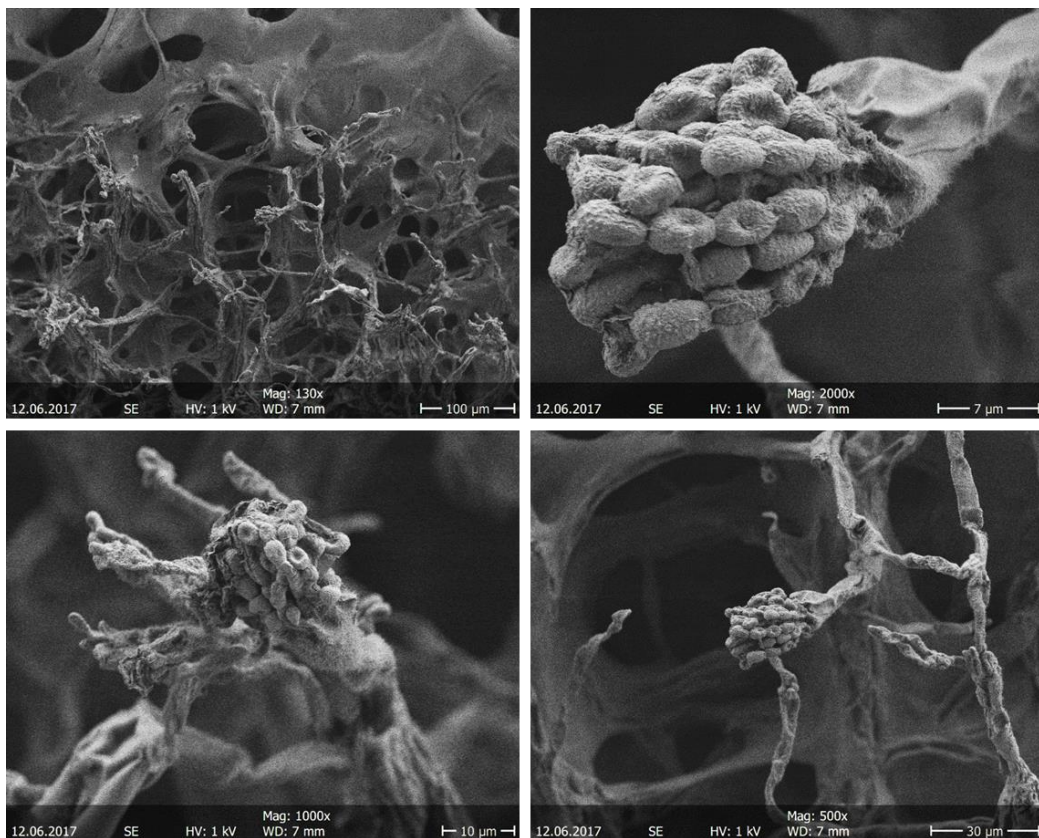


Abb. S215: Rasterelektronenmikroskopie-Bilder (3) der Co-Kultivierung von endophytem *A. caesiellus* und *S. marcescens* MSRBB2.

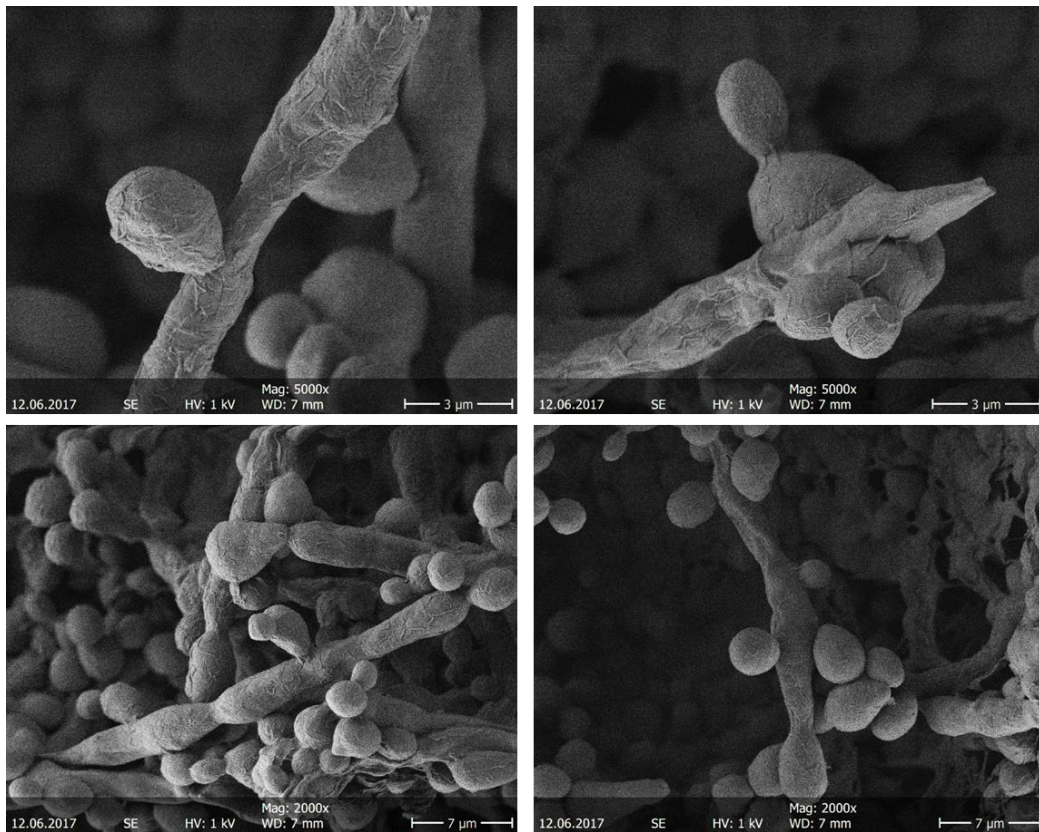


Abb. S216: Rasterelektronenmikroskopie-Bilder (1) der Co-Kultivierung von endophytischer *Pichia* spp. und *S. marcescens* MSRBB2.

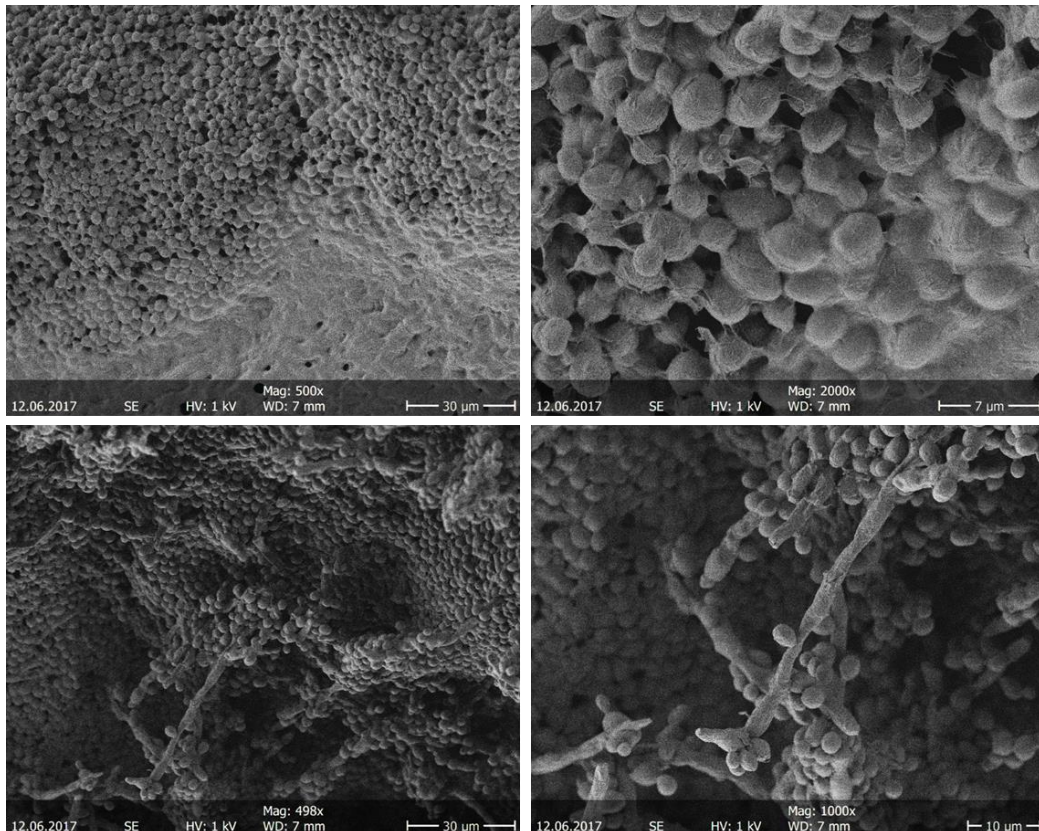


Abb. S217: Rasterelektronenmikroskopie-Bilder (2) der Co-Kultivierung von endophytischer *Pichia* spp. und *S. marcescens* MSRBB2.

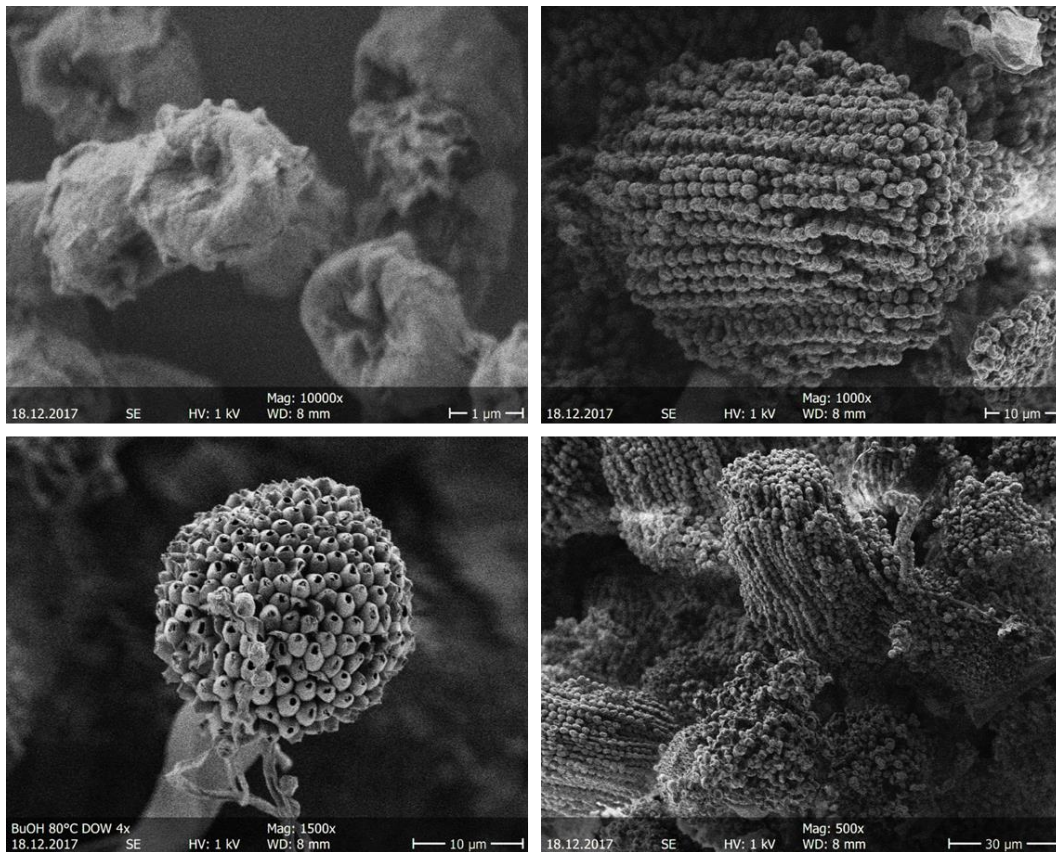


Abb. S218: Rasterelektronenmikroskopie-Bilder von *Aspergillus fumigatus* (DSM 21023).

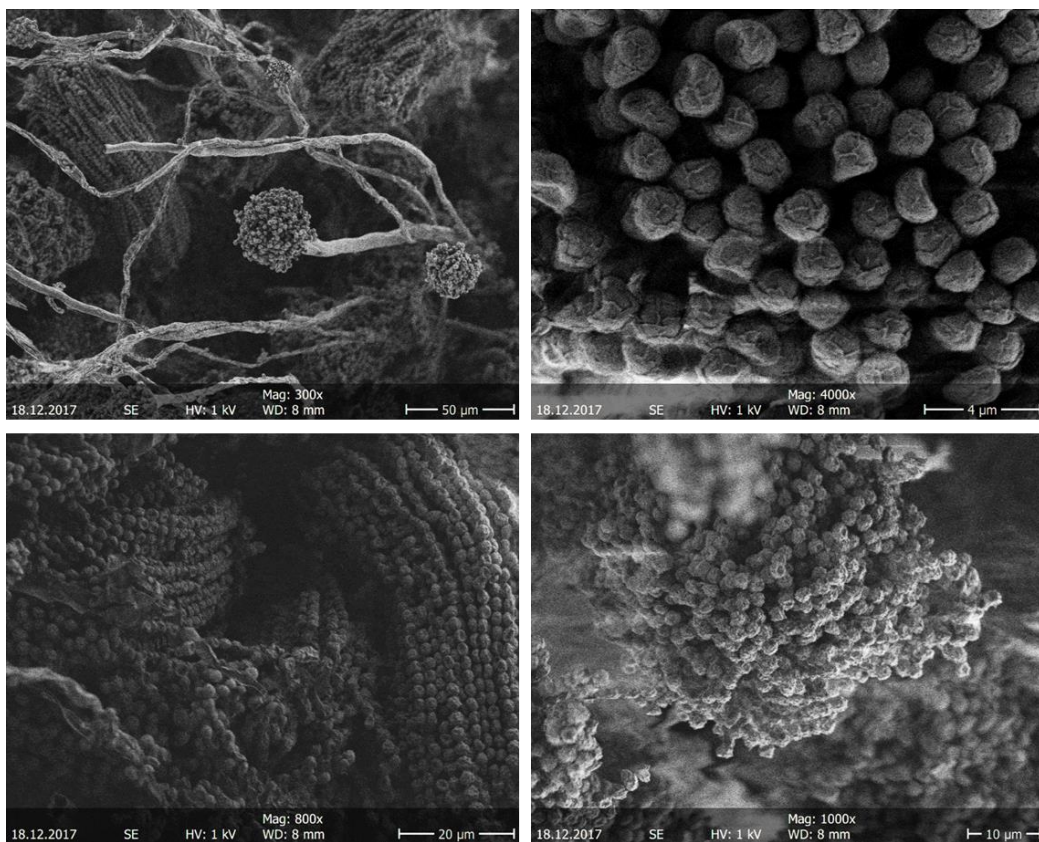


Abb. S219: Rasterelektronenmikroskopie-Bilder der Co-Kultivierung von *S. marcescens* MSRBB2 und *Aspergillus fumigatus* (DSM 21023).

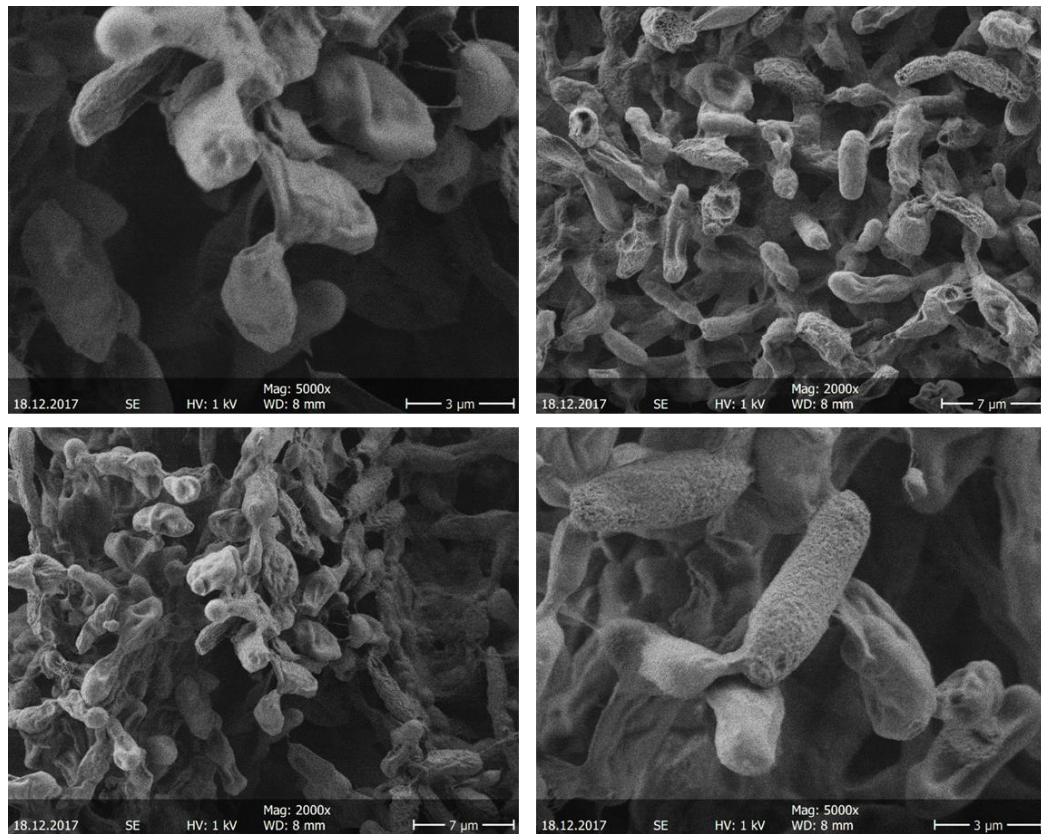


Abb. S220: Rasterelektronenmikroskopie-Bilder von *Pichia membranifaciens* (DSM 70366).

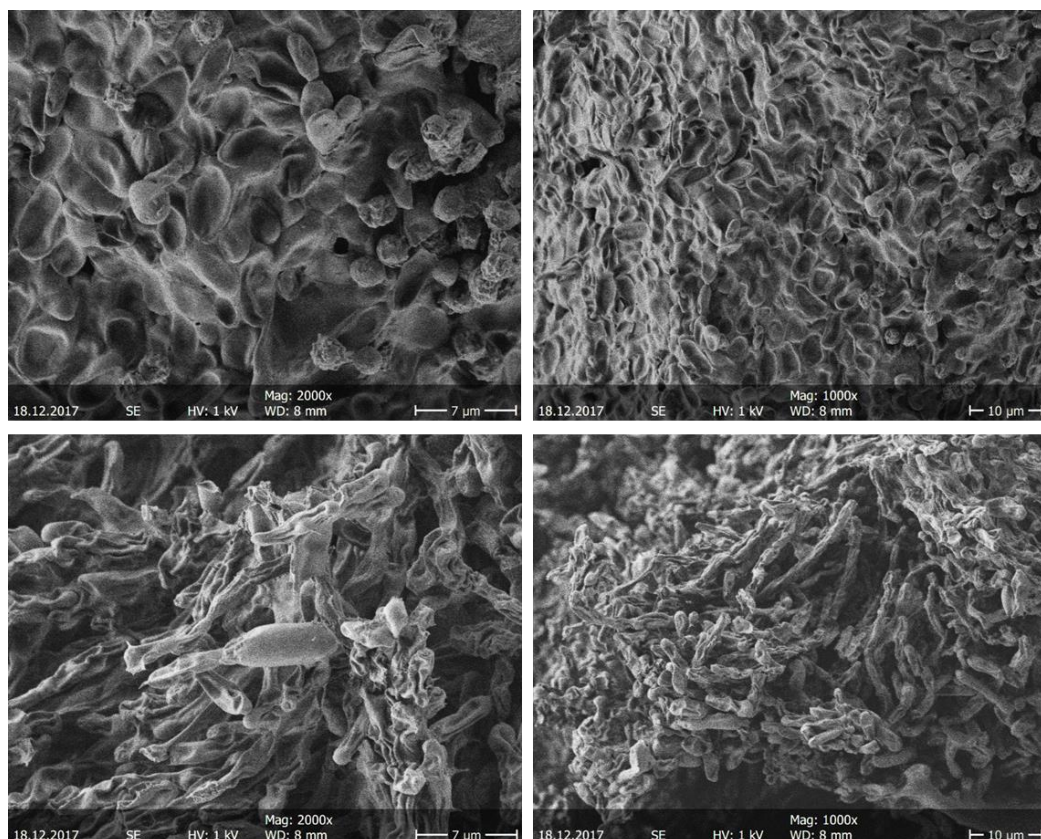


Abb. S221: Rasterelektronenmikroskopie-Bilder der Co-Kultivierung von *S. marcescens* MSRBB2 und *Pichia membranifaciens* (DSM 70366).

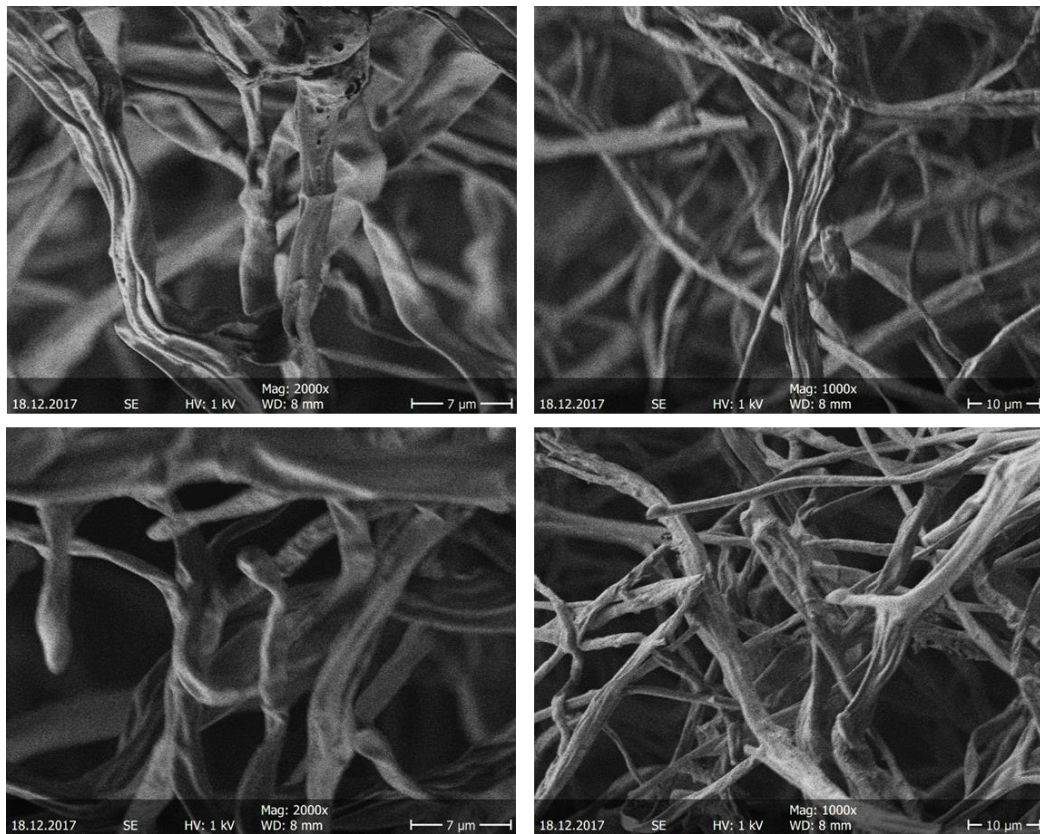


Abb. S222: Rasterelektronenmikroskopie-Bilder von *Pestalotiopsis versicolor* (DSM 62887).

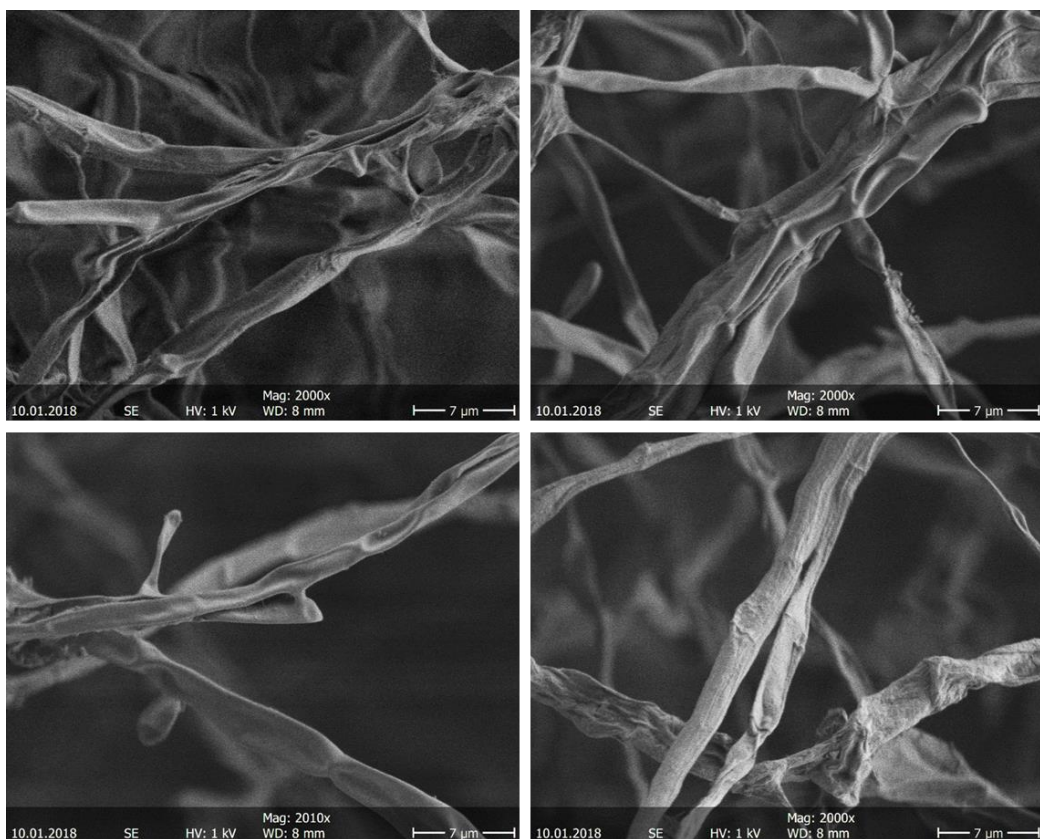


Abb. S223: Rasterelektronenmikroskopie-Bilder der Co-Kultivierung von *S. marcescens* MSRBB2 und *Pestalotiopsis versicolor* (DSM 62887).

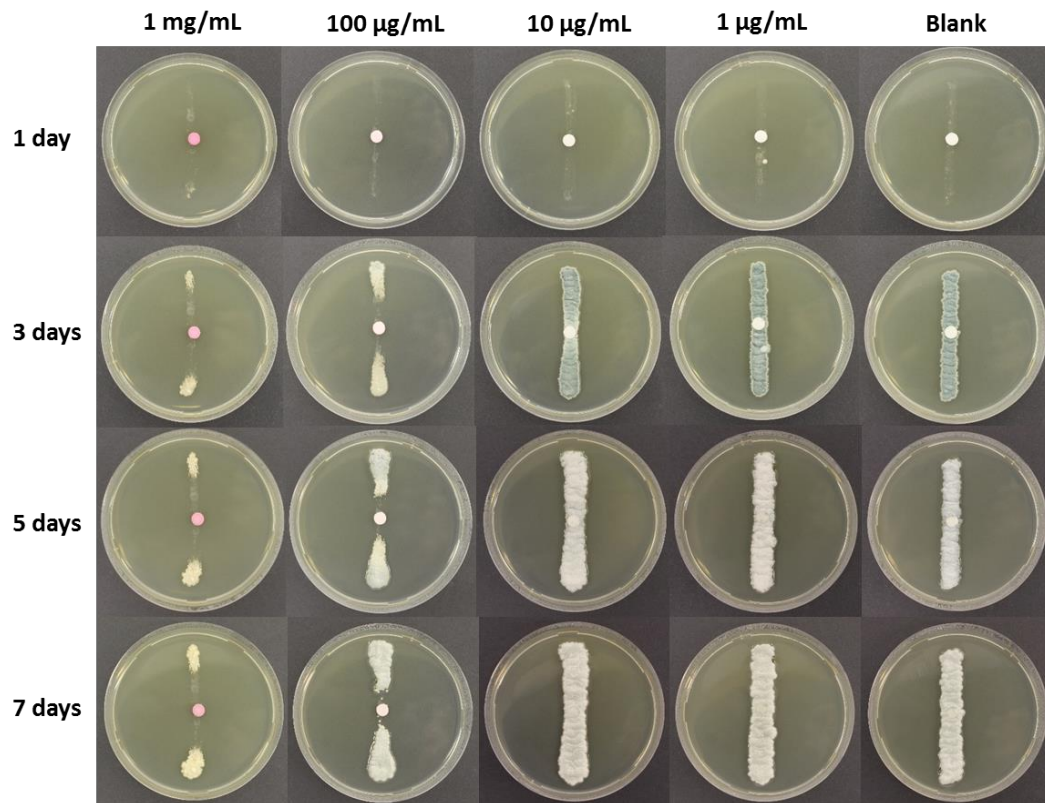


Abb. S224: Dosis- und zeitabhängiges Disc-Assay von Prodigiosin gegen *A. caesiellus* (Linienform).

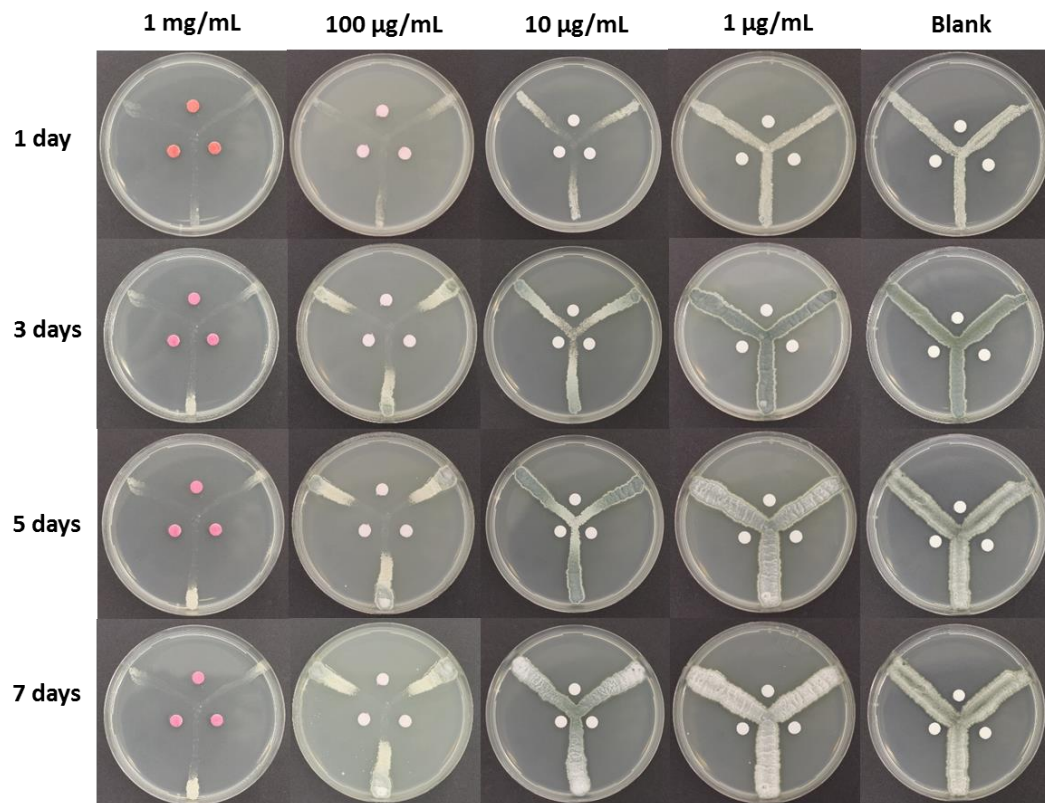


Abb. S225: Dosis- und zeitabhängiges Disc-Assay von Prodigiosin gegen *A. caesiellus* (Y-Form).

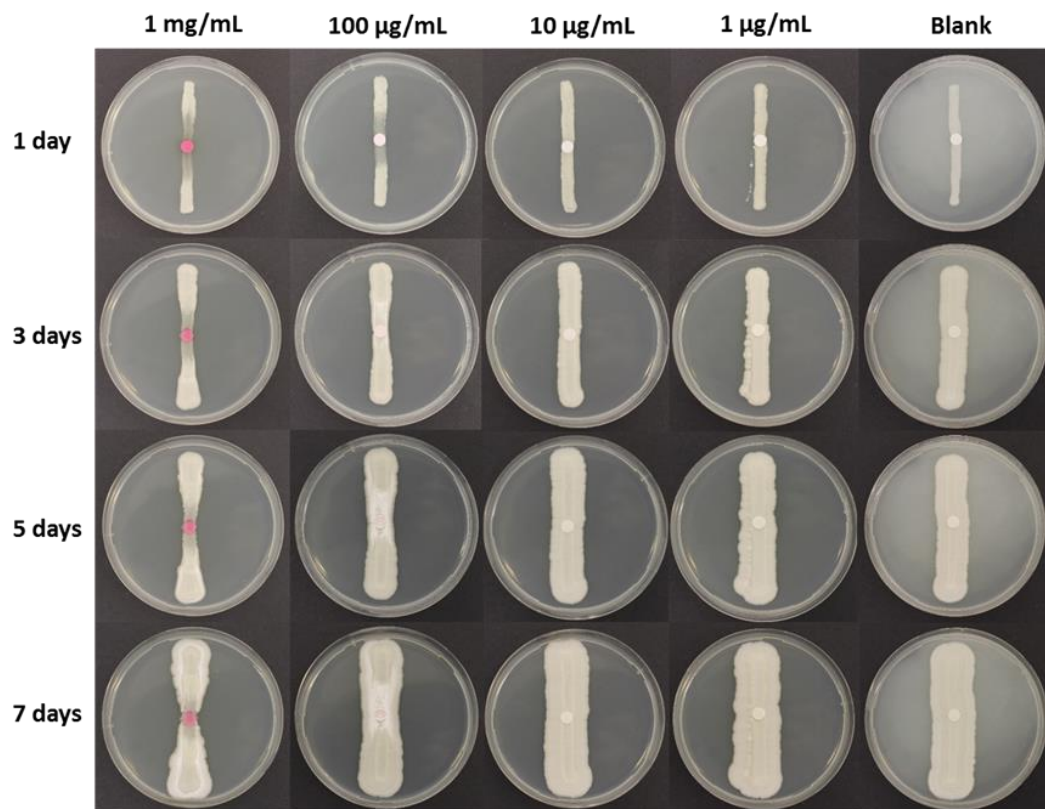


Abb. S226: Dosis- und zeitabhängiges Disc-Assay von Prodigiosin gegen *Pichia* spp. (Linienform).

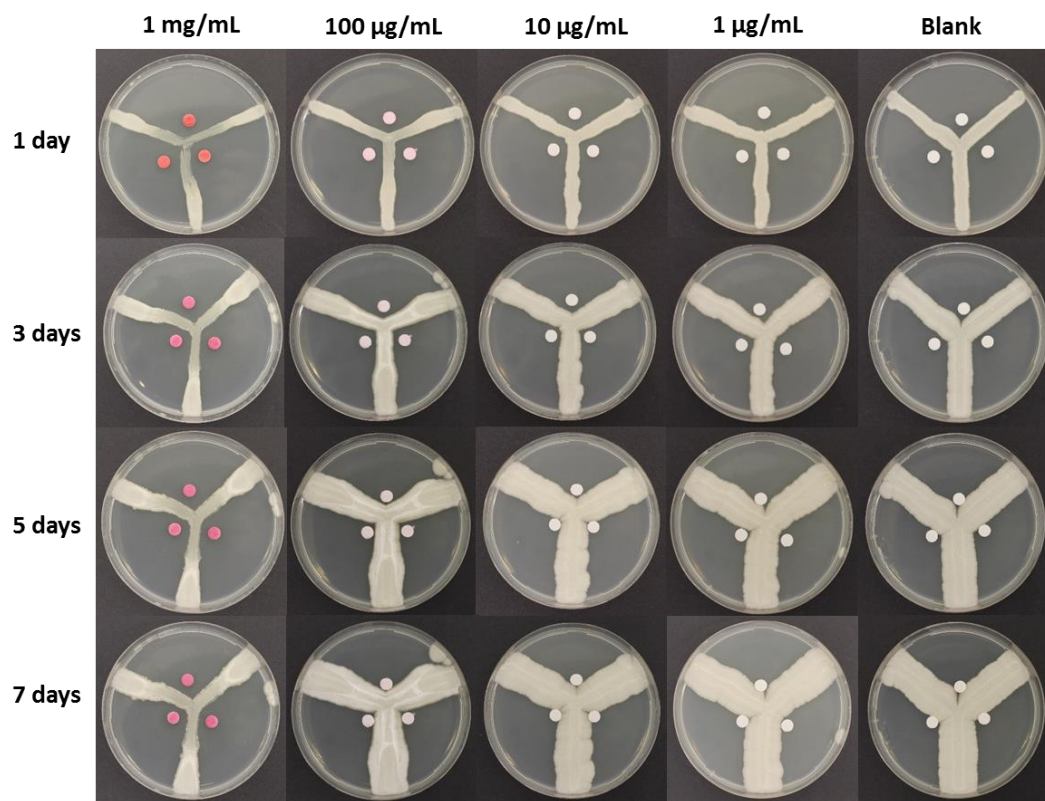


Abb. S227: Dosis- und zeitabhängiges Disc-Assay von Prodigiosin gegen *Pichia* spp. (Y-Form).

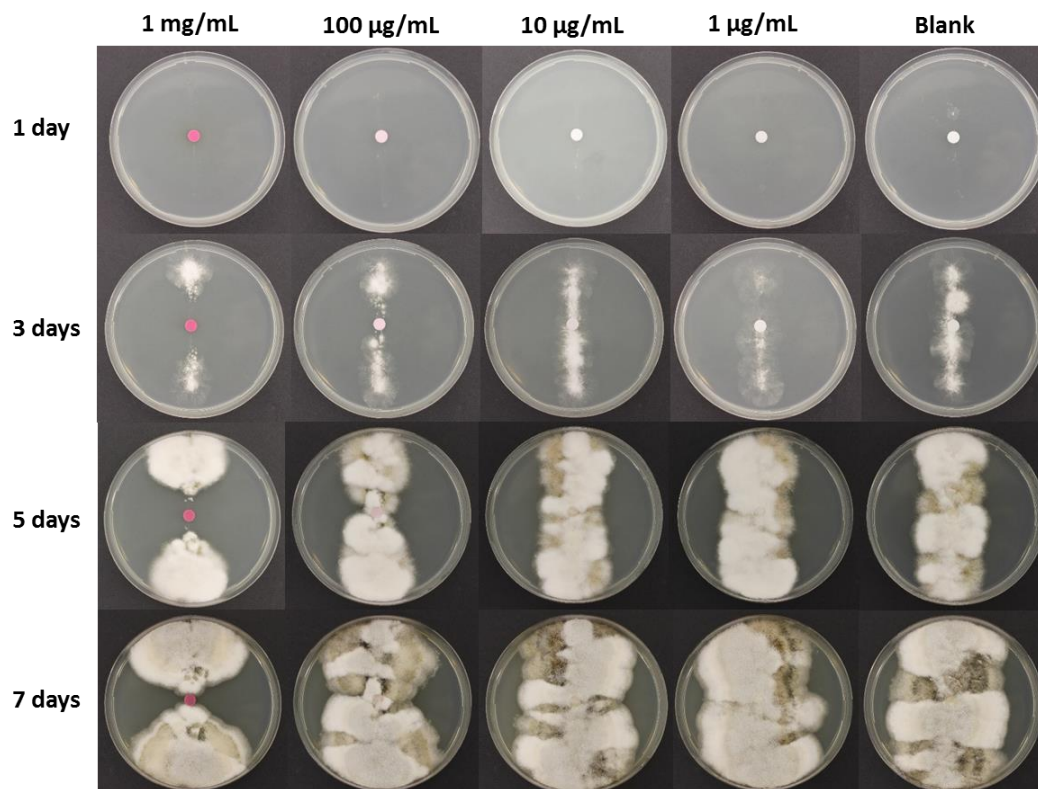


Abb. S228: Dosis- und zeitabhängiges Disc-Assay von Prodigiosin gegen *P. virgatula* (Linienform).

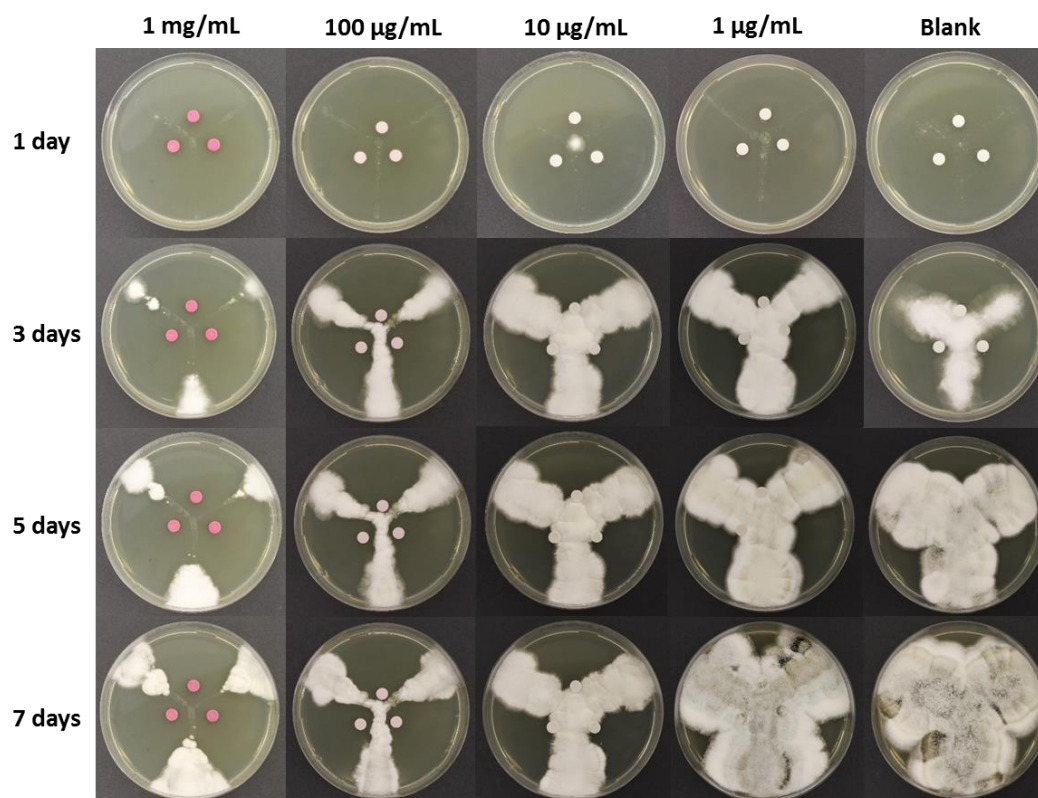


Abb. S229: Dosis- und zeitabhängiges Disc-Assay von Prodigiosin gegen *P. virgatula* (Y-Form).

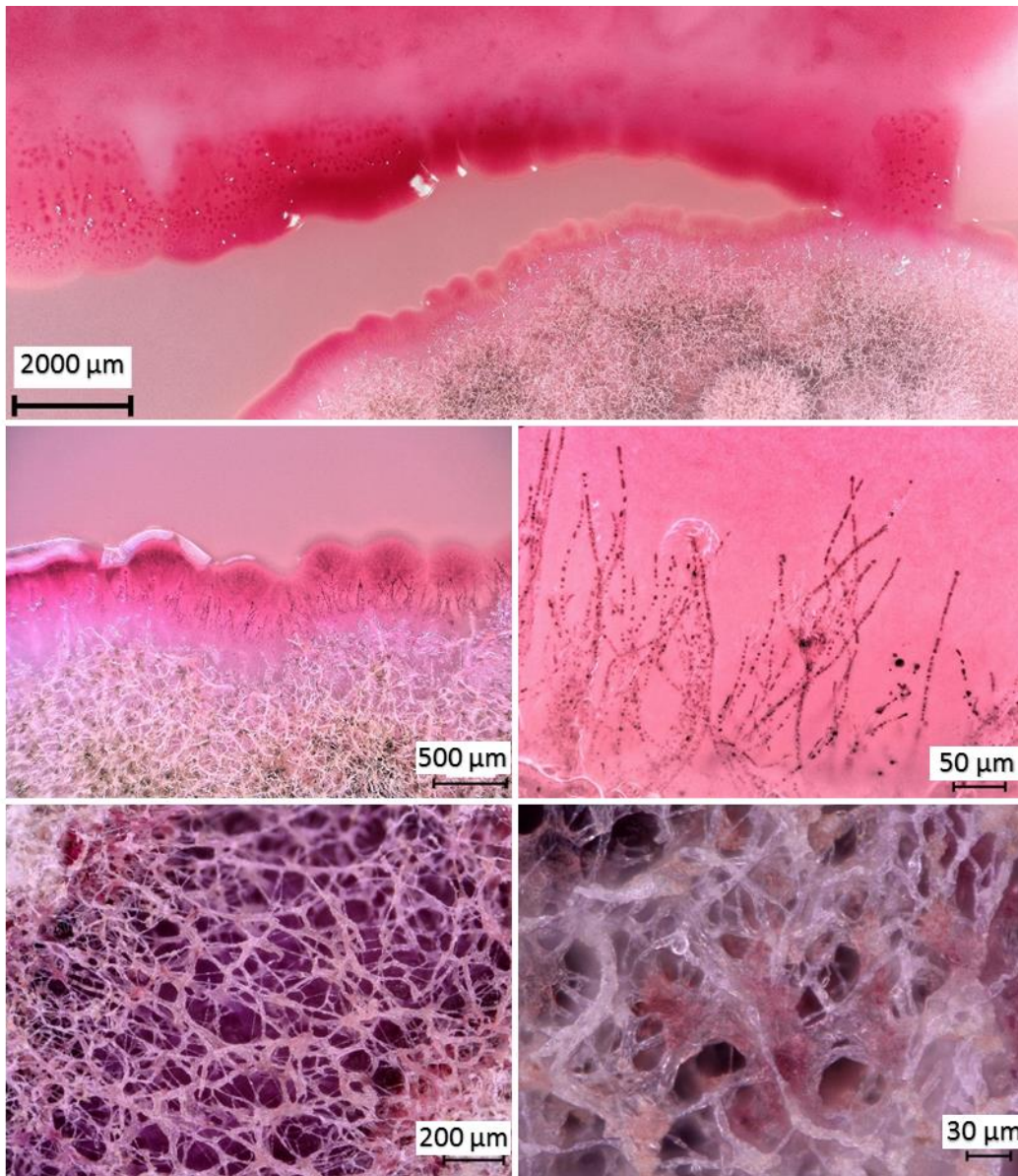


Abb. S230: Mikroskopische Bilder der Kolonisierung von Pilzendophyt *A. caesiellus* (Hyphen/Myzel des Pilzes überwachsen) durch *S. marcescens*. MSRBB2.

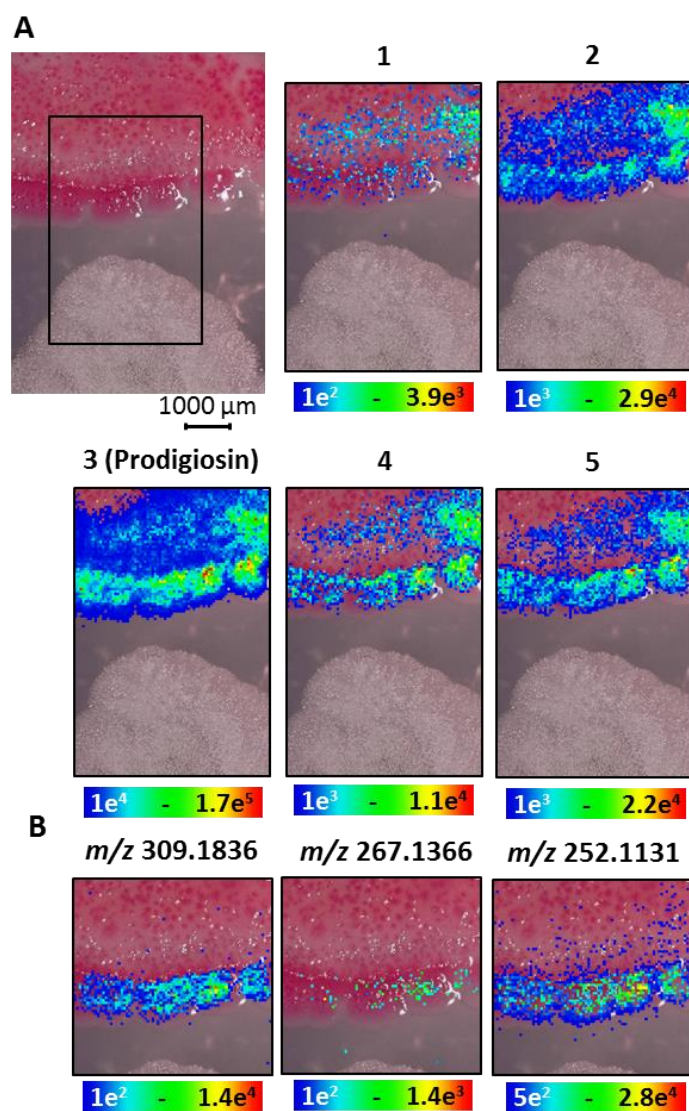


Abb. S231: MALDI-imaging-HRMS zeigt die örtliche Verteilung von Prodigininen (A, **1-5**, $[M+H]^+ \pm 2$ ppm) in der Co-Kultivierung von *S. marcescens* MSRBB2 und *A. caesiellus* nach 3 Tagen. Optisches Bild mit eingezeichnetem Messbereich. Charakteristische Fragmente von MALDI-imaging-HRMS² von Prodigiosin (B, **3**, $[M+H]^+ \pm 3$ ppm).

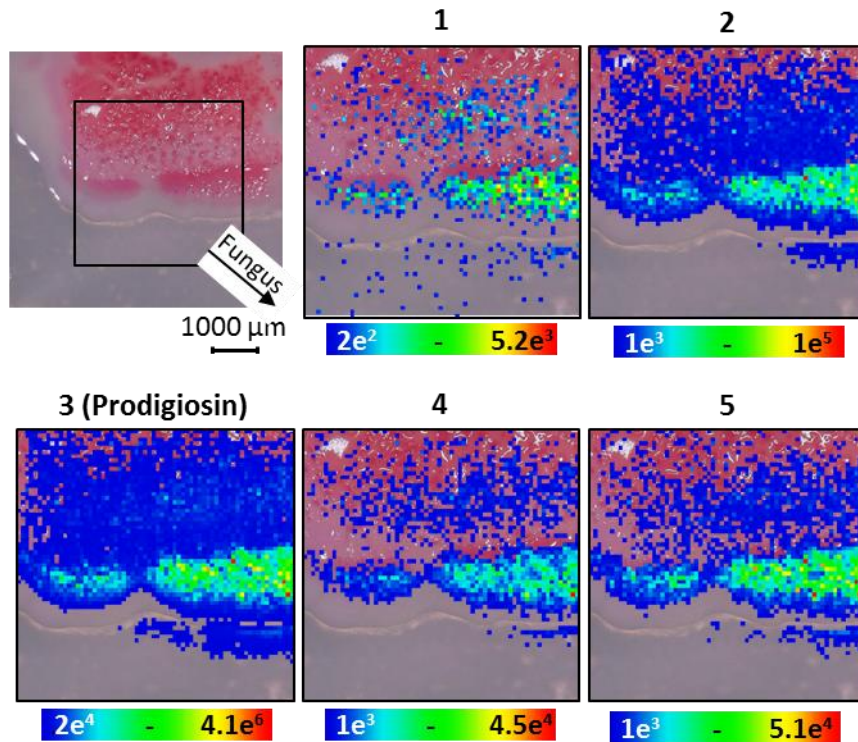


Abb. S232: MALDI-imaging-HRMS zeigt die örtliche Verteilung von Prodigininen (A, 1-5, $[M+H]^+ \pm 2$ ppm) in der Co-Kultivierung von *S. marcescens*, MSRBB2 und *A. caesiellus* nach 3 Tagen. Optisches Bild mit eingezeichnetem Messbereich.

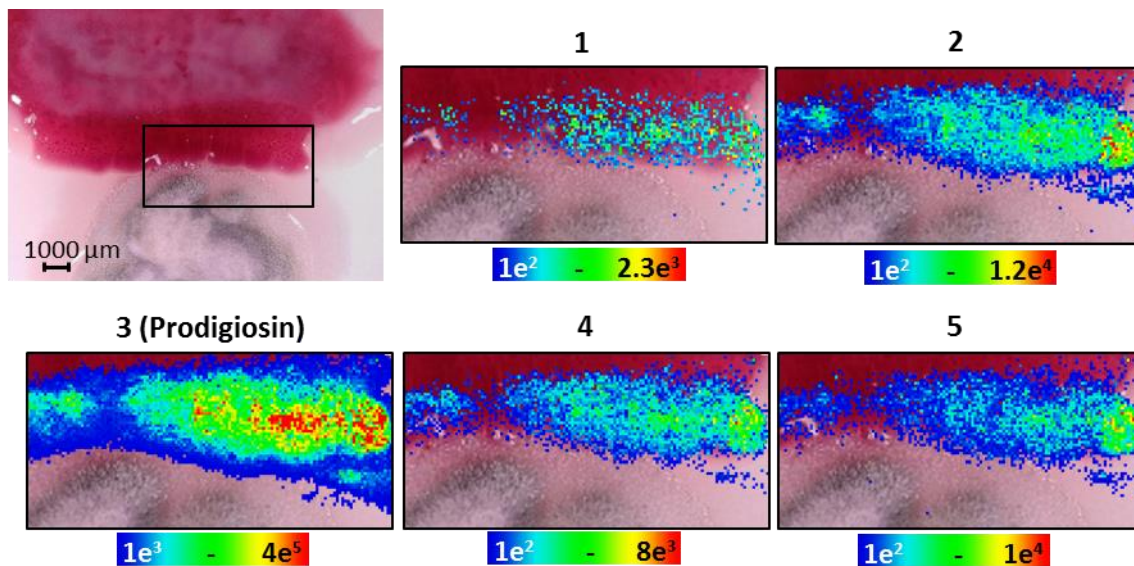


Abb. S233: MALDI-imaging-HRMS zeigt die örtliche Verteilung von Prodigininen (A, 1-5, $[M+H]^+ \pm 2$ ppm) in der Co-Kultivierung von *S. marcescens*, MSRBB2 und *A. caesiellus* nach 5 Tagen. Optisches Bild mit eingezeichnetem Messbereich.

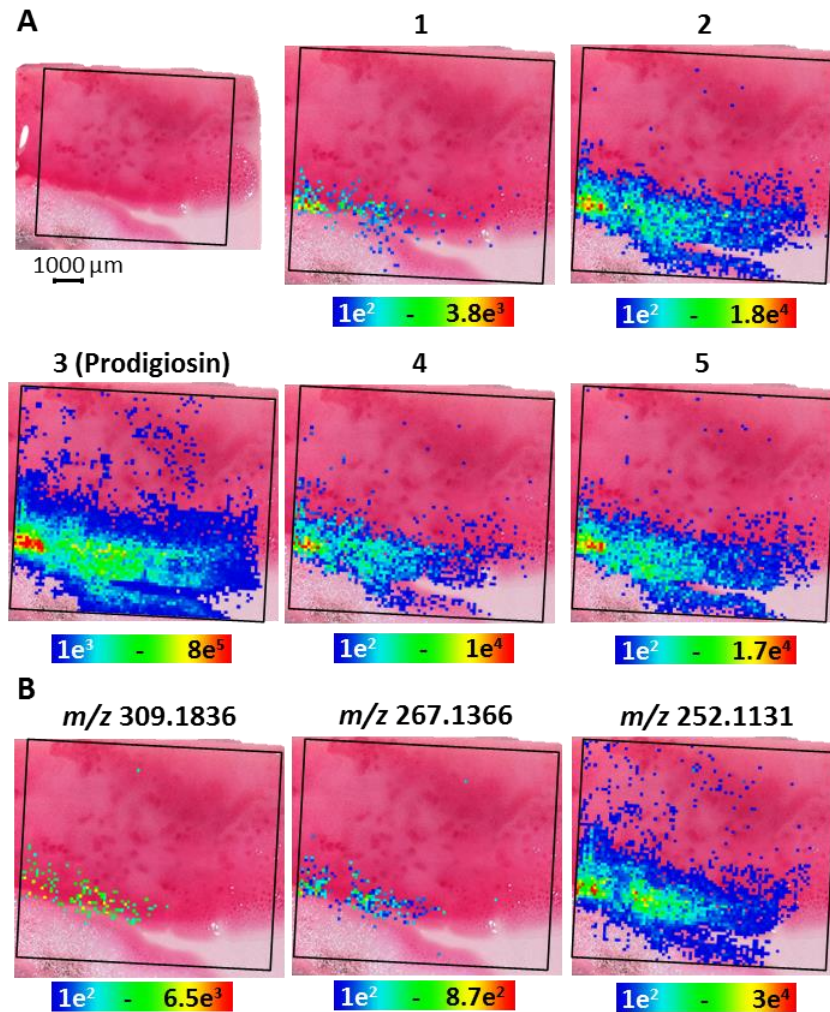


Abb. S234: MALDI-imaging-HRMS zeigt die örtliche Verteilung von Prodigininen (A, **1-5**, $[M+H]^+ \pm 2$ ppm) in der Co-Kultivierung von *S. marcescens* MSRBB2 und *A. caesiellus* nach 7 Tagen. Optisches Bild mit eingezeichnetem Messbereich. Charakteristische Fragmente von MALDI-imaging-HRMS² von Prodigiosin (B, **3**, $[M+H]^+ \pm 3$ ppm).

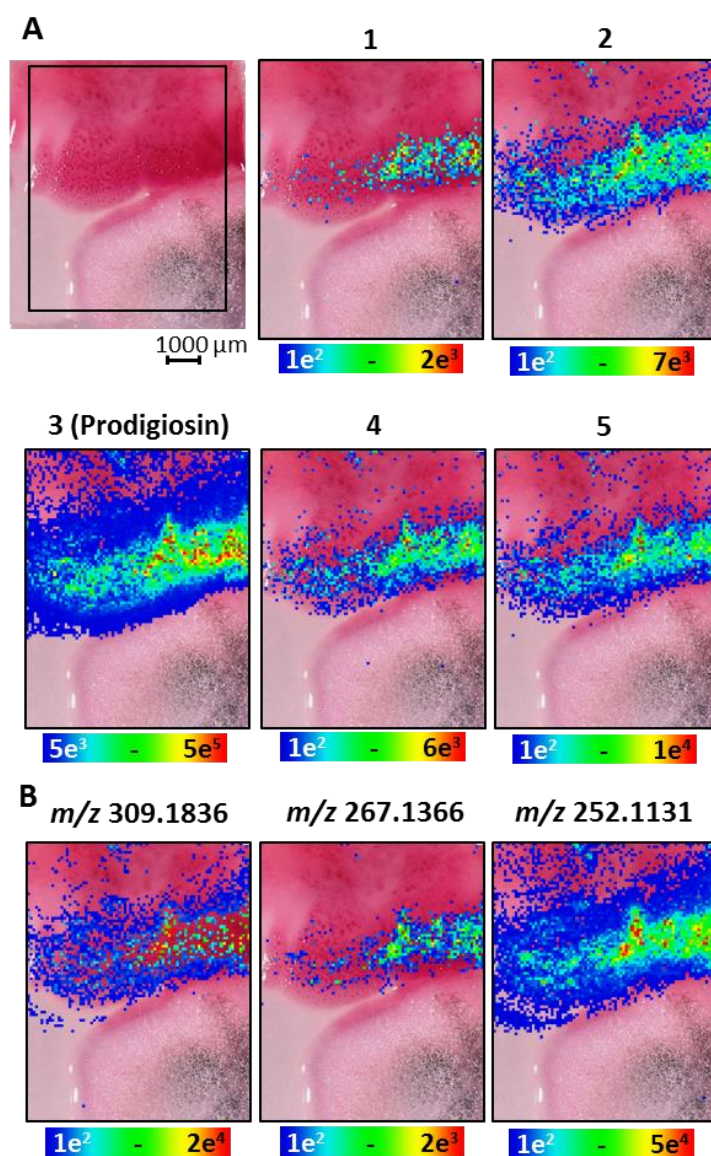


Abb. S235: MALDI-imaging-HRMS zeigt die örtliche Verteilung von Prodigininen (A, **1-5**, $[M+H]^+ \pm 2$ ppm) in der Co-Kultivierung von *S. marcescens* MSRBB2 und *A. caesiellus* nach 7 Tagen. Optisches Bild mit eingezeichnetem Messbereich. Charakteristische Fragmente von MALDI-imaging-HRMS² von Prodigiosin (B, **3**, $[M+H]^+ \pm 3$ ppm).

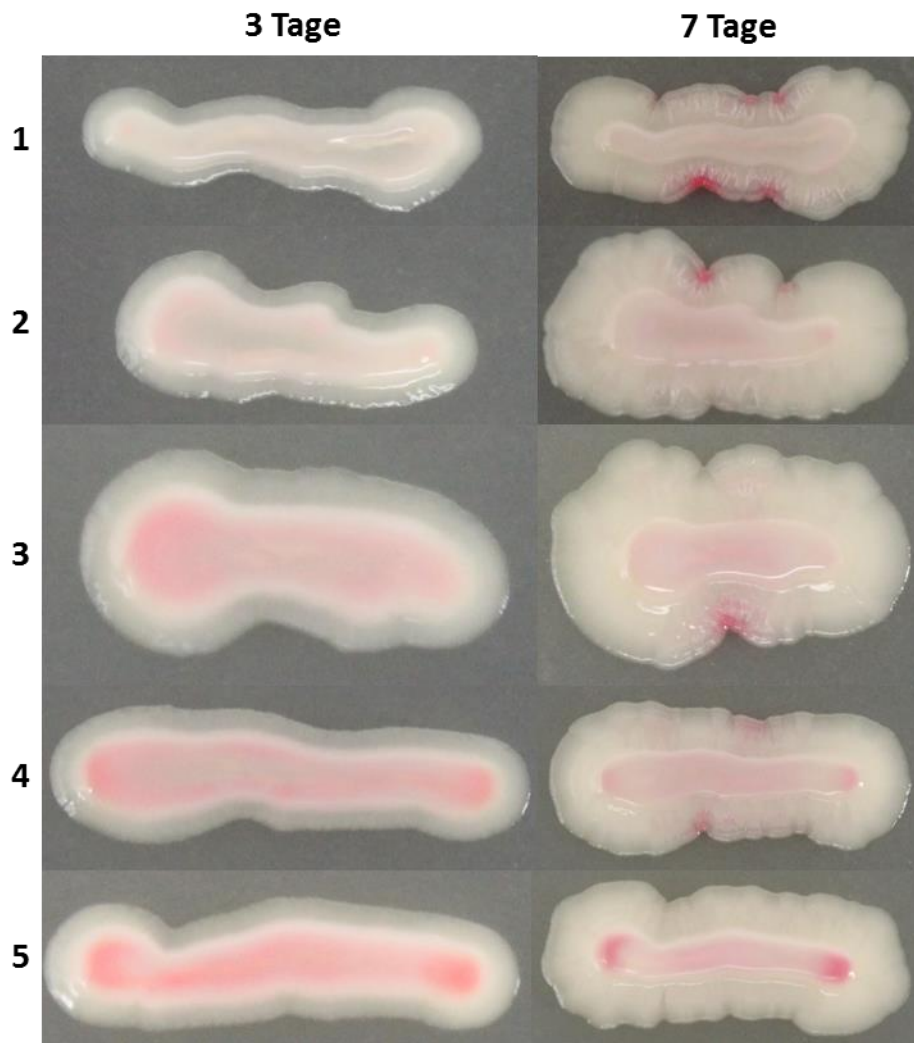


Abb. S236: Bilder der Monokultivierung von *S. marcescens* MSRBB2 (Kontrolle).

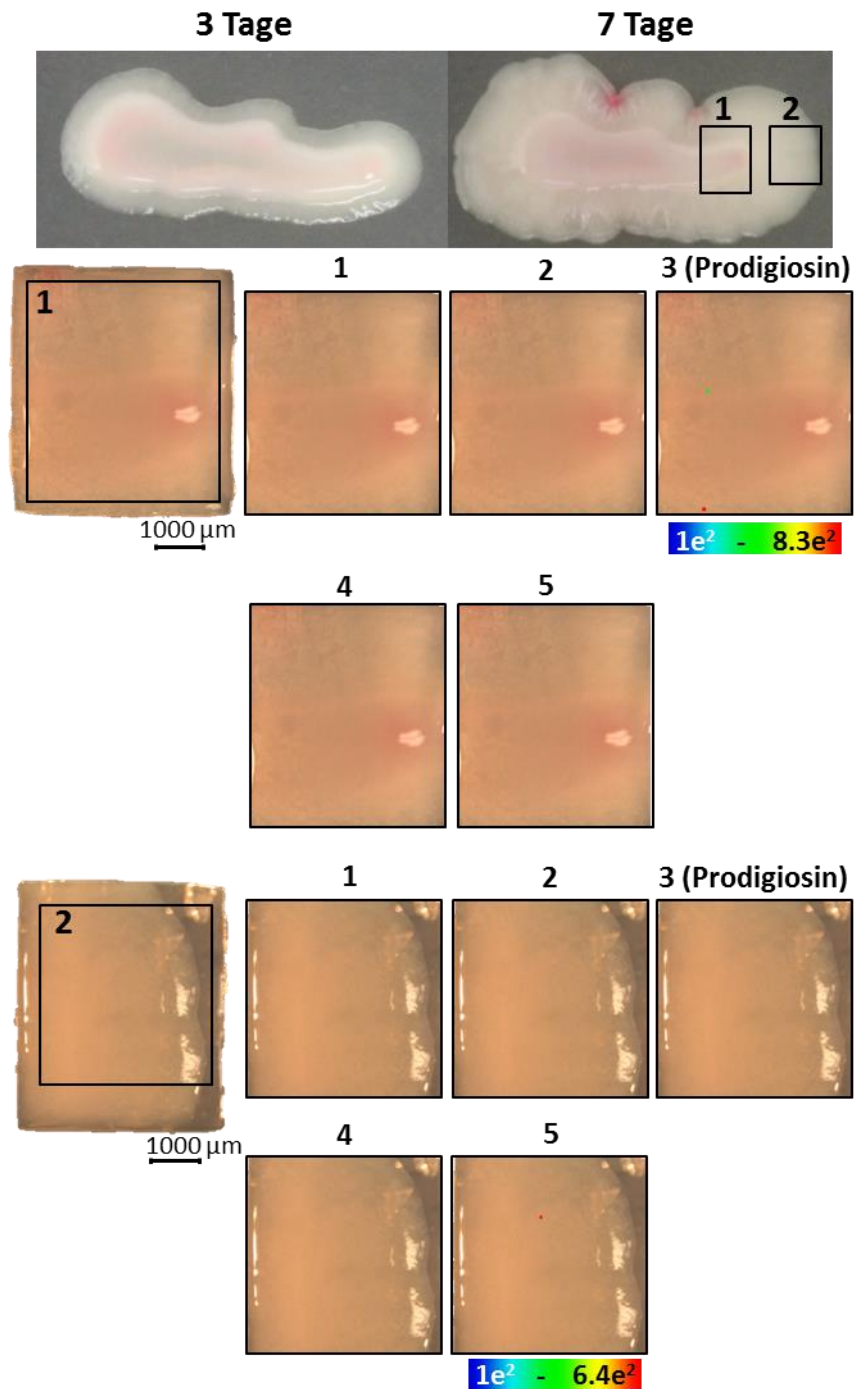


Abb. S237: MALDI-imaging-HRMS zeigt die Abwesenheit von Prodigininen (A, 1-5, $[M+H]^+ \pm 2$ ppm) in der Monokultivierung von *S. marcescens*. MSRBB2 nach 7 Tagen (Kontrolle). Optisches Bild mit eingezeichnetem Messbereich.

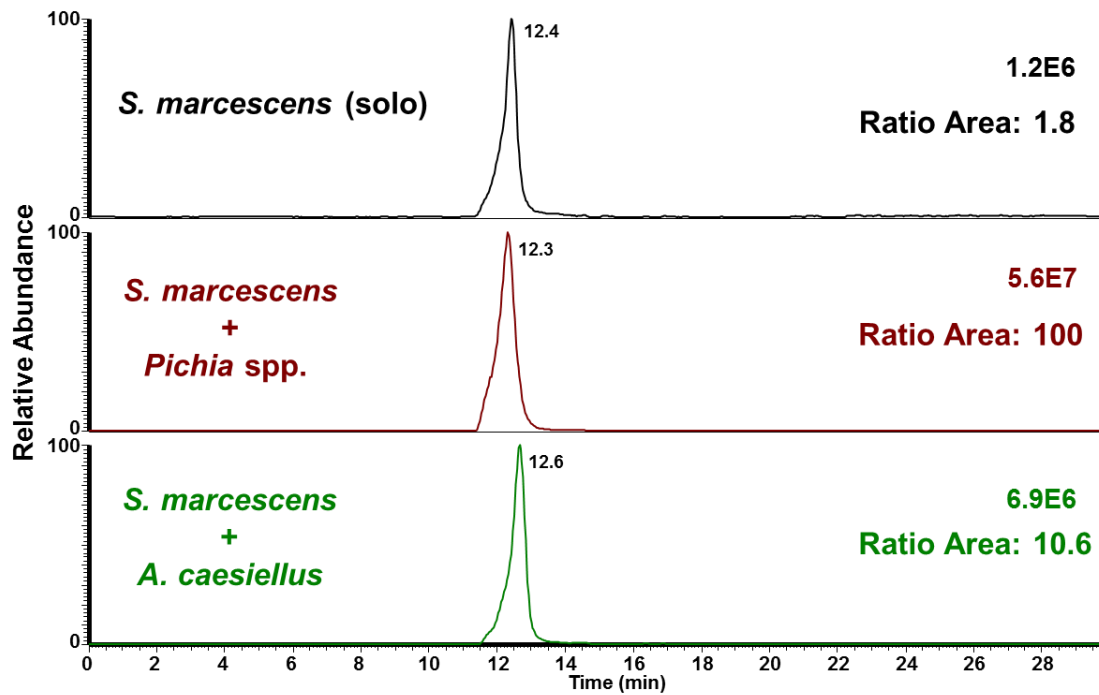


Abb. S238: HPLC-HRMS Vergleich von Prodigiosin (extrahierte Ionenchromatogramme, $[M+H]^+ \pm 2$ ppm) produziert von *S. marcescens* MSRBB2 in Monokultivierungen und Co-Kultivierungen mit Pilzendophyten *A. caesiellus* und *Pichia* spp. (jeweils 5 Petrischalen) nach 7 Tagen Inkubation.

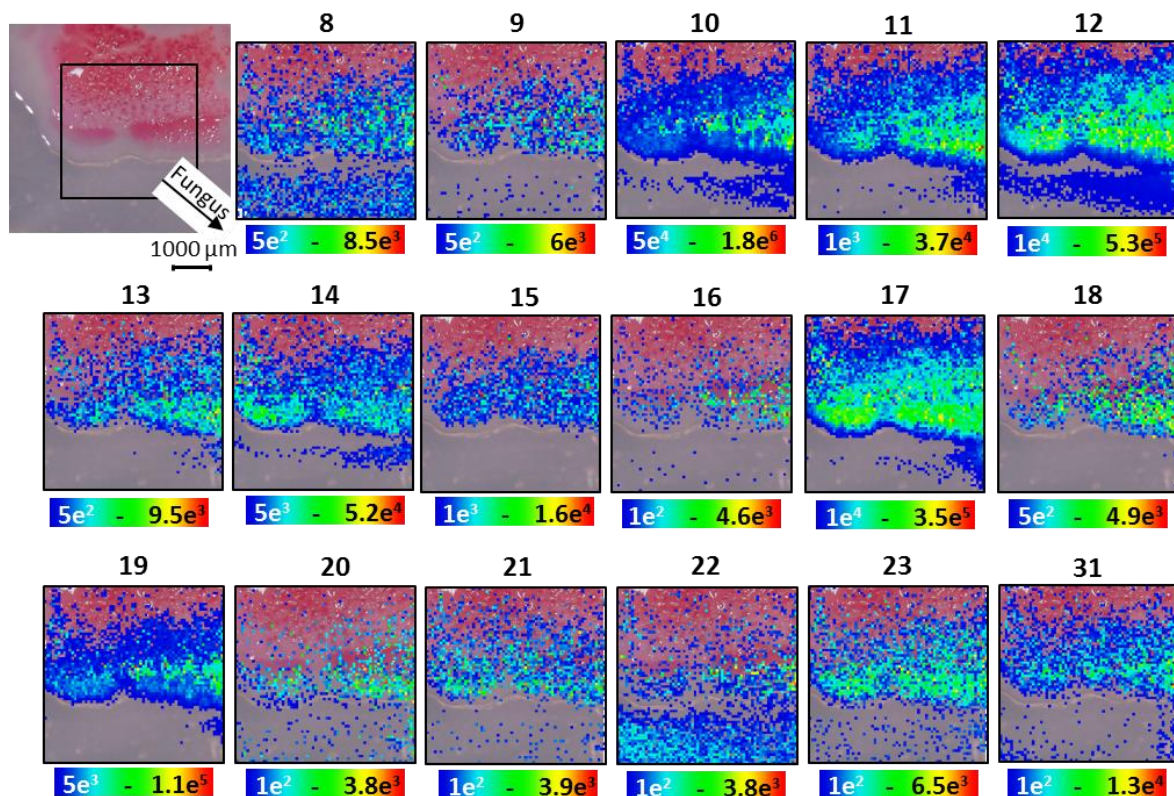


Abb S239: MALDI-imaging-HRMS zeigt die örtliche Verteilung von Serratamoliden (8-31, $[M+H]^+ \pm 2$ ppm) in der Co-Kultivierung von *S. marcescens* MSRBB2 und *A. caesiellus* nach 3 Tagen. Optisches Bild mit eingezeichnetem Messbereich.

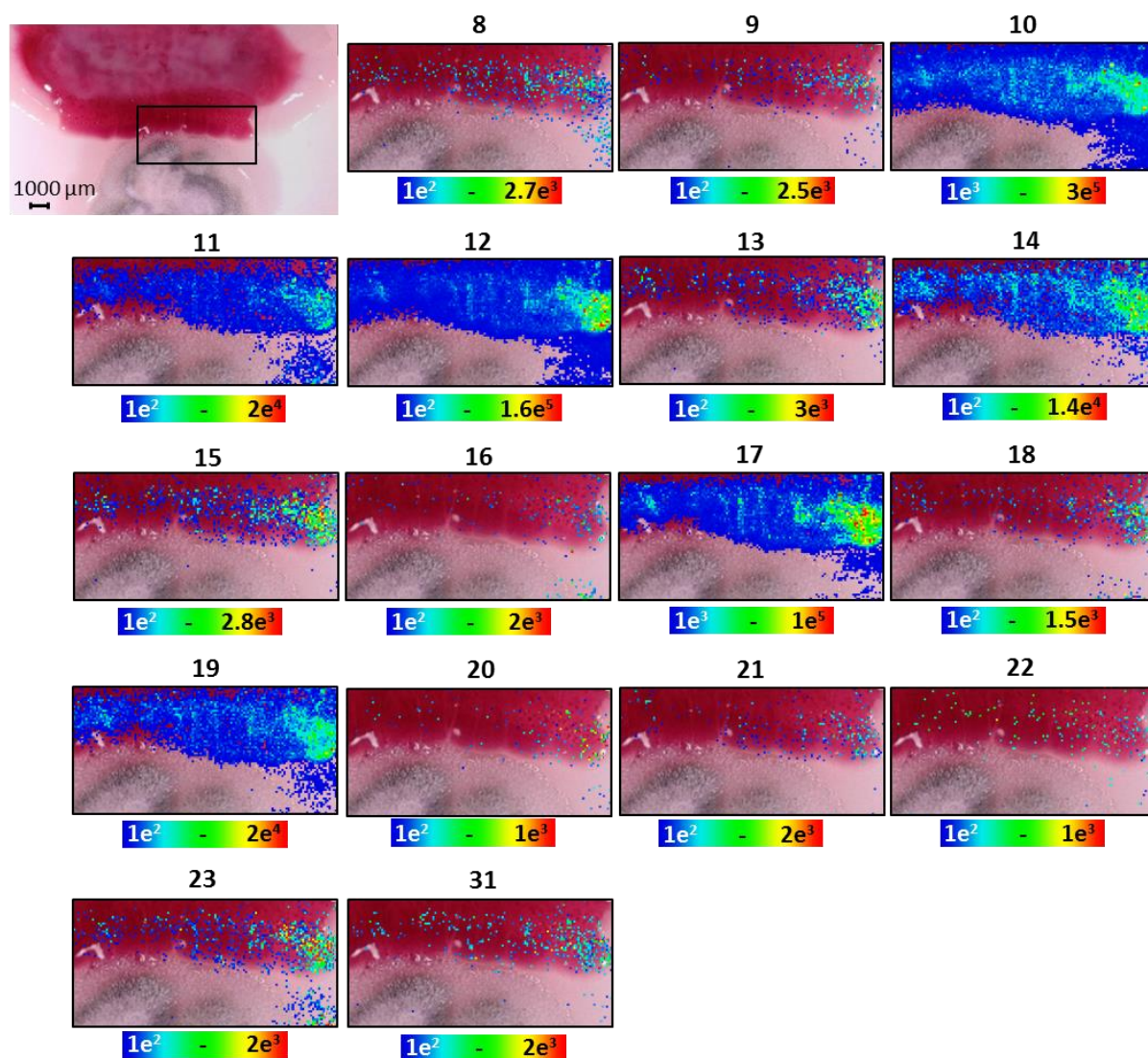


Abb. S240: MALDI-imaging-HRMS zeigt die örtliche Verteilung von Serratamoliden (**8-31**, $[M+H]^+ \pm 2$ ppm) in der Co-Kultivierung von *S. marcescens*, MSRBB2 und *A. caesiellus* nach 5 Tagen. Optisches Bild mit eingezeichnetem Messbereich.

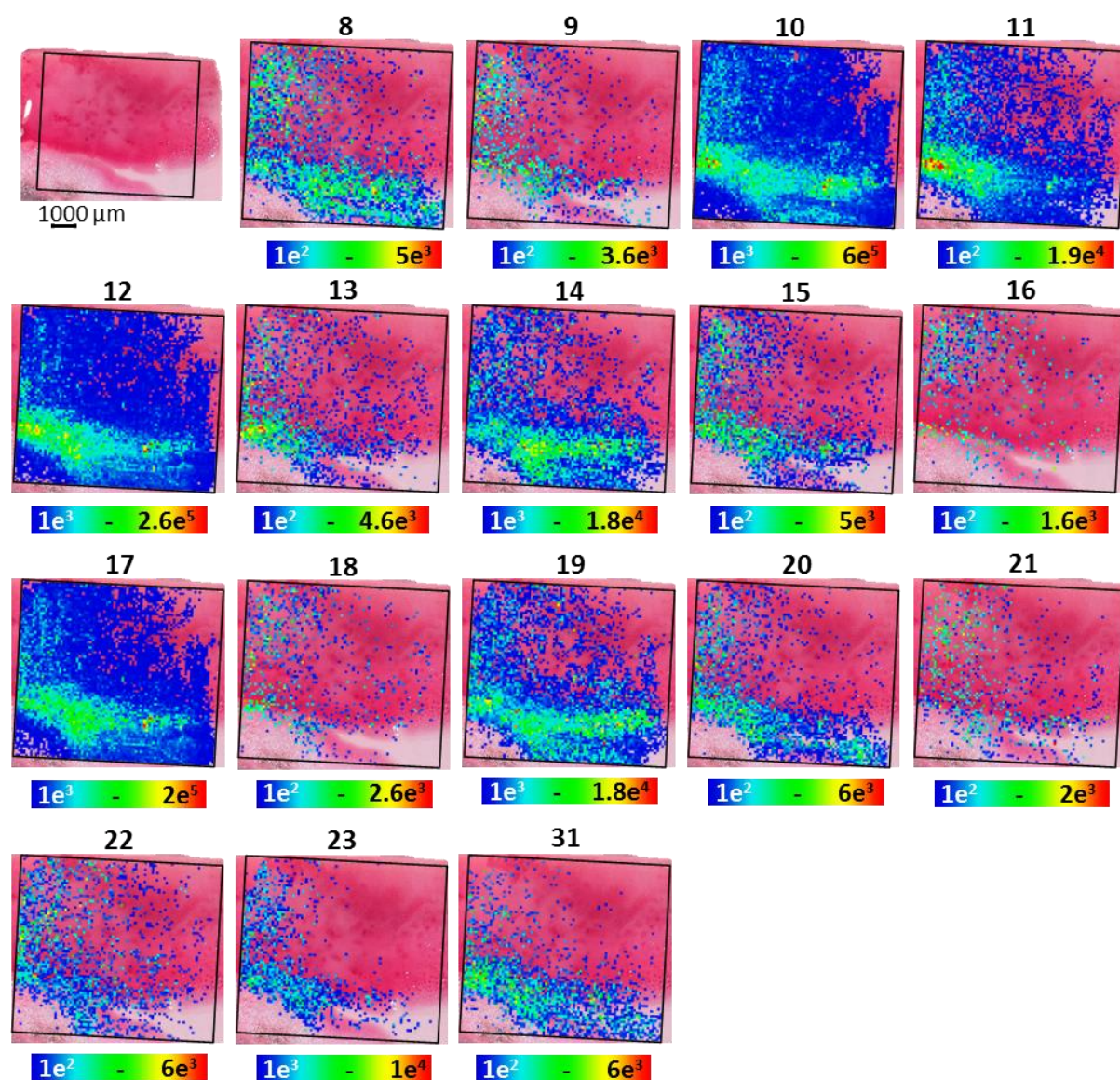


Abb. S241: MALDI-imaging-HRMS zeigt die örtliche Verteilung von Serratamoliden (**8-31**, $[\text{M}+\text{H}]^+ \pm 2$ ppm) in der Co-Kultivierung von *S. marcescens*, MSRBB2 und *A. caesiellus* nach 7 Tagen. Optisches Bild mit eingezeichnetem Messbereich.

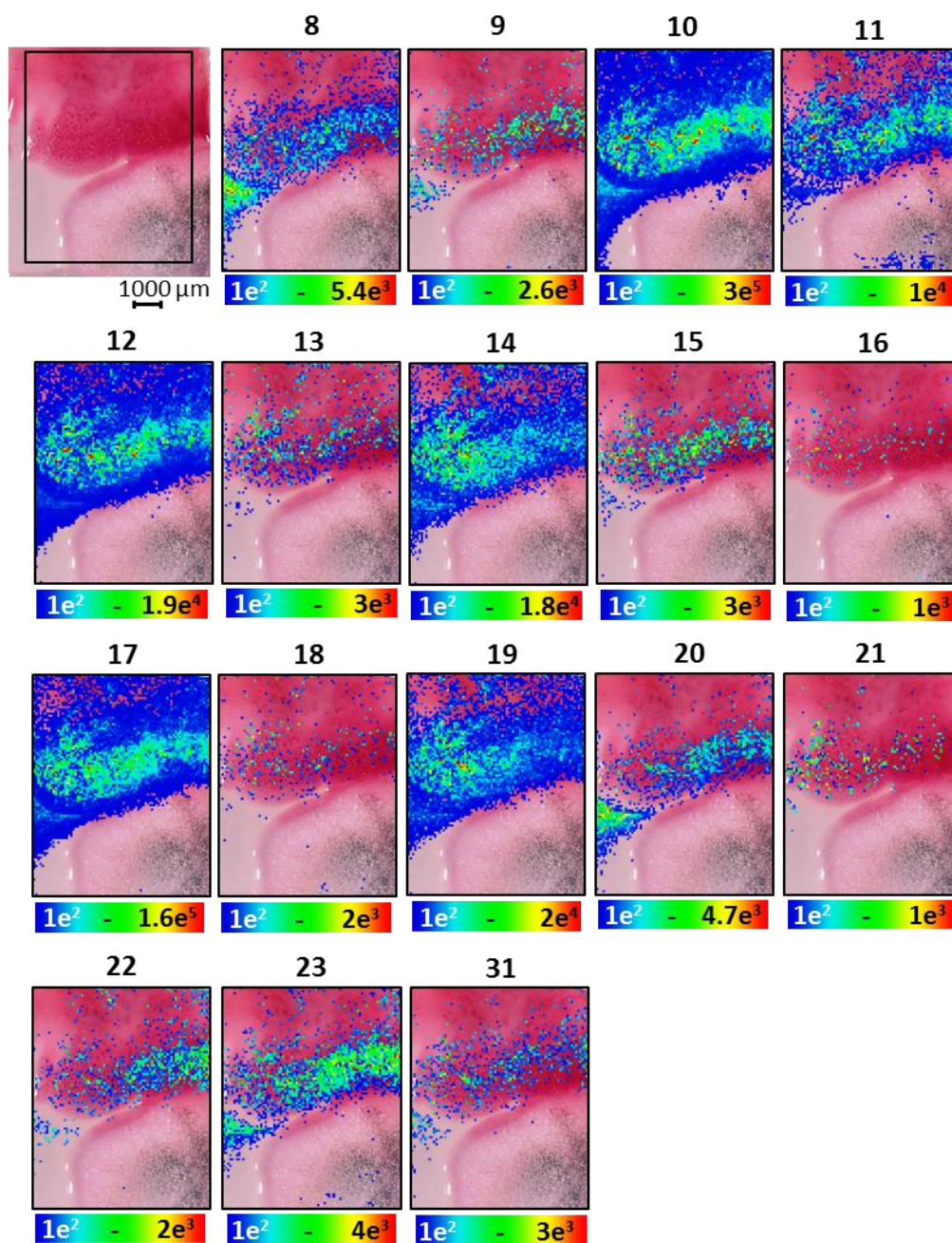


Abb. S242: MALDI-imaging-HRMS zeigt die örtliche Verteilung von Serratamoliden (8-31, $[M+H]^+ \pm 2$ ppm) in der Co-Kultivierung von *S. marcescens* MSRBB2 und *A. caesiellus* nach 7 Tagen. Optisches Bild mit eingezeichnetem Messbereich.

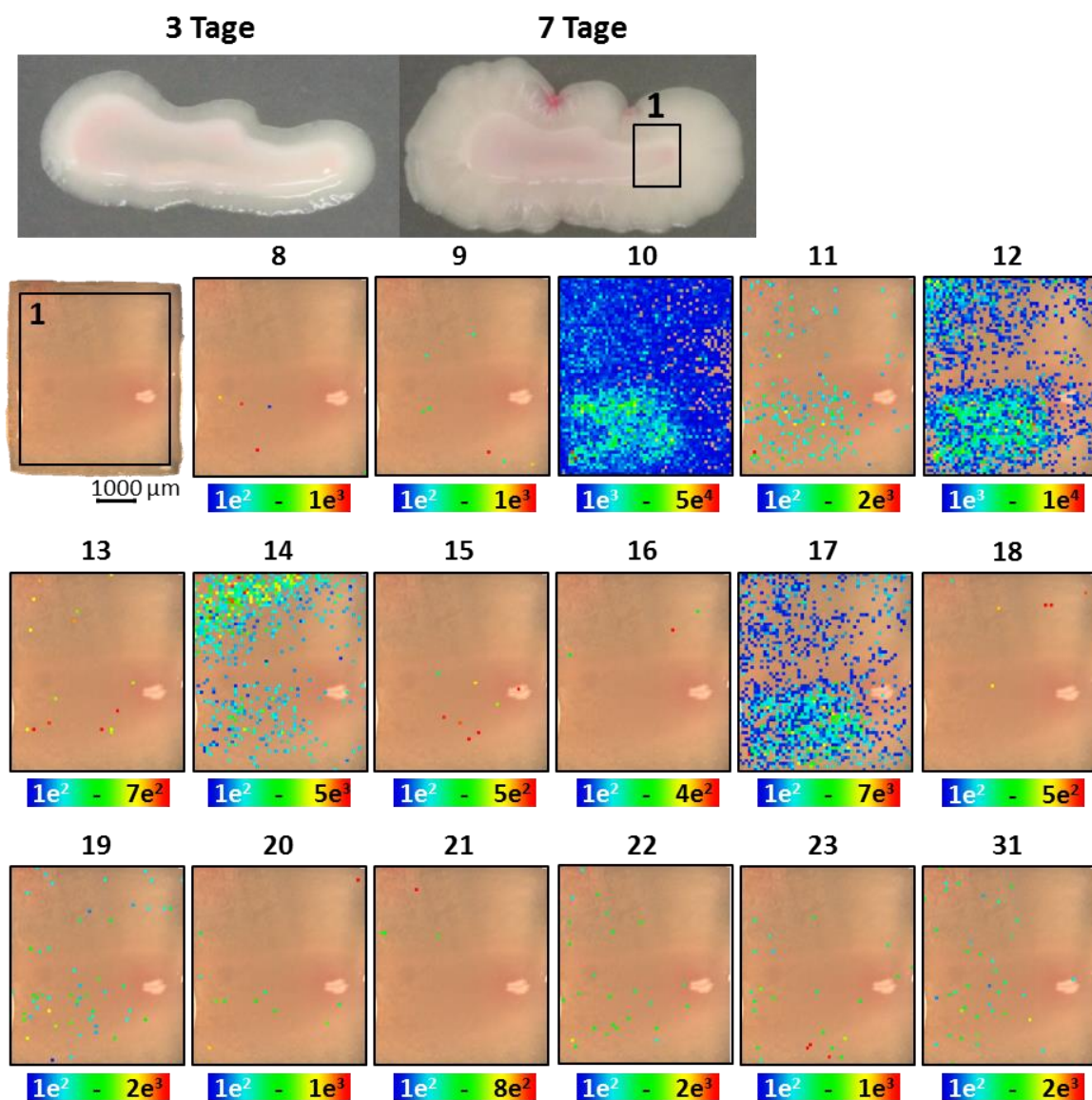


Abb. S243: MALDI-imaging-HRMS zeigt die örtliche Verteilung von Serratamoliden (8-31, $[\text{M}+\text{H}]^+ \pm 2$ ppm) in der Monokultivierung von *S. marcescens*. MSRBB2 nach 7 Tagen (Kontrolle 1). Optisches Bild mit eingezeichnetem Messbereich.

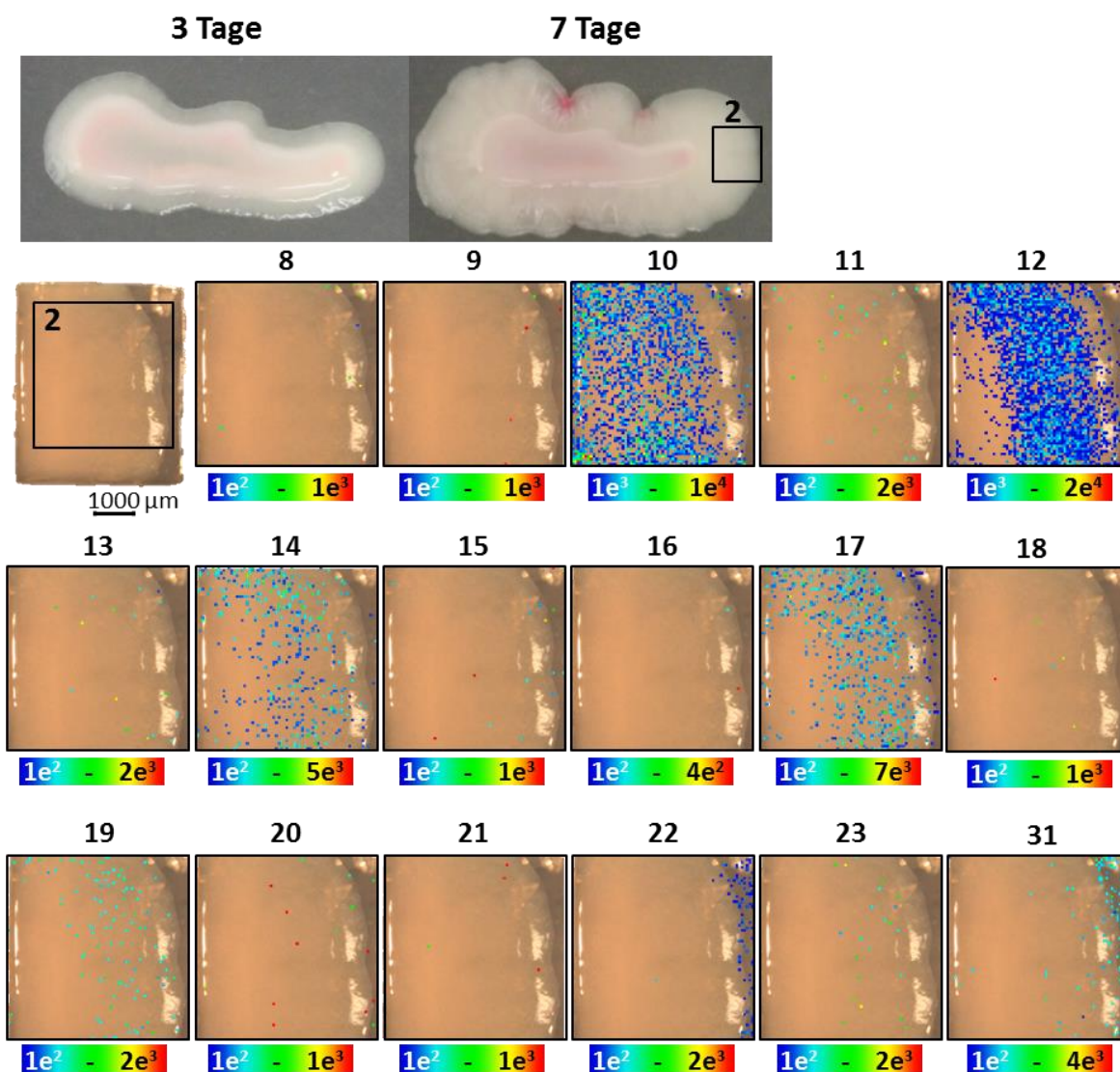


Abb. S244: MALDI-imaging-HRMS zeigt die örtliche Verteilung von Serratomoliden (8-31, $[M+H]^+ \pm 2$ ppm) in der Monokultivierung von *S. marcescens*. MSRBB2 nach 7 Tagen (Kontrolle 2). Optisches Bild mit eingezeichnetem Messbereich.

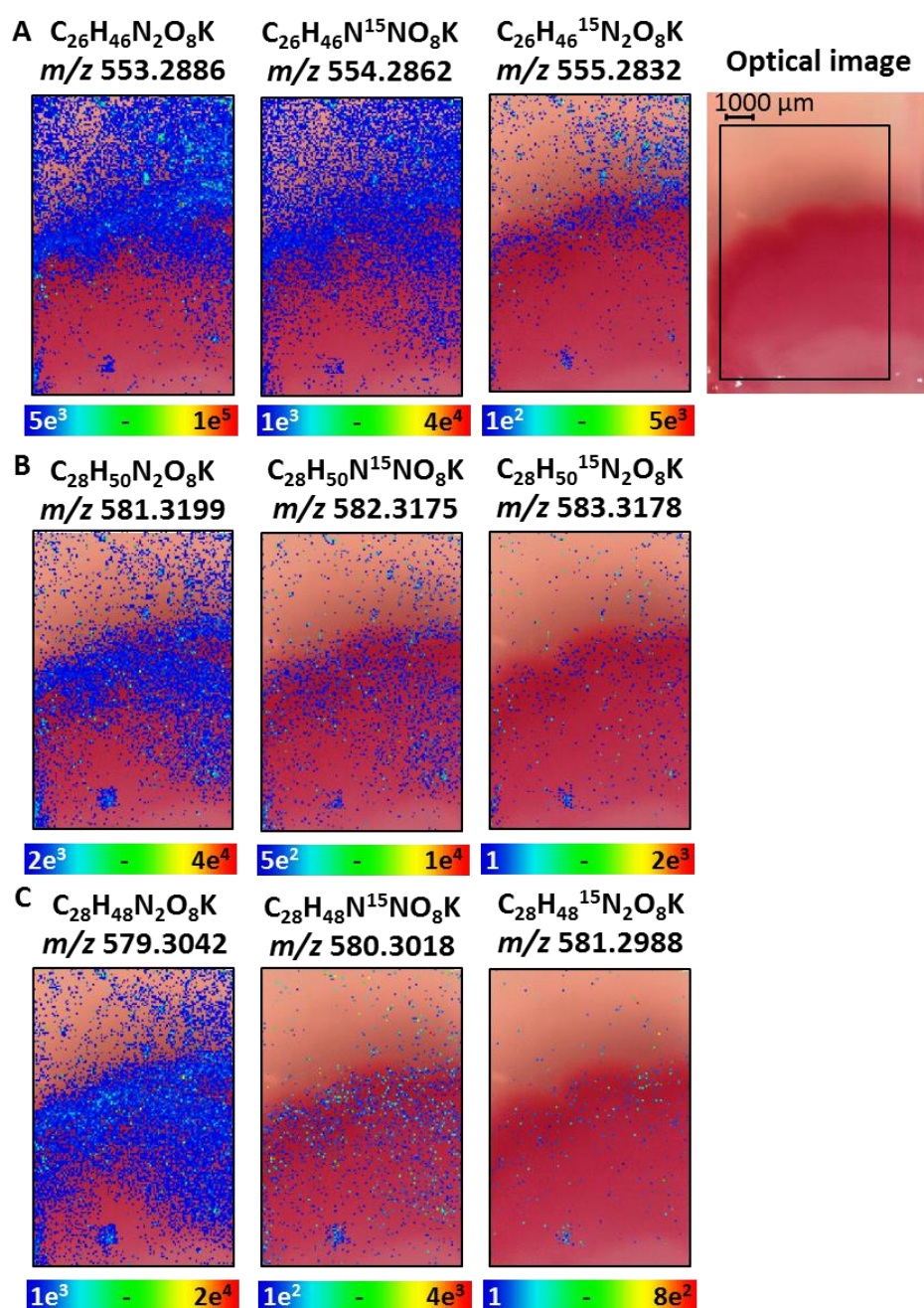


Abb. S245: MALDI-imaging-HRMS von Serratamoliden (A: Serrawettin W1 (**10**); B: $C_{10}+C_{12}$ (**12**); C: $C_{10}+C_{12:1}$ (**16**)) produziert von *S. marcescens* MSRBB2 auf Kartoffel-Dextrose-Agar mit zugegebenem $[^{15}N]$ -L-Serin (1 mg/mL). Optische Bilder mit eingezeichnetem Messbereich und Visualisierung der örtlichen Verteilung von unmarkierten Serratamoliden und einmaligem und zweimaligem Einbau von $[^{15}N]$ -L-Serin ($[M+K]^+ \pm 3$ ppm).

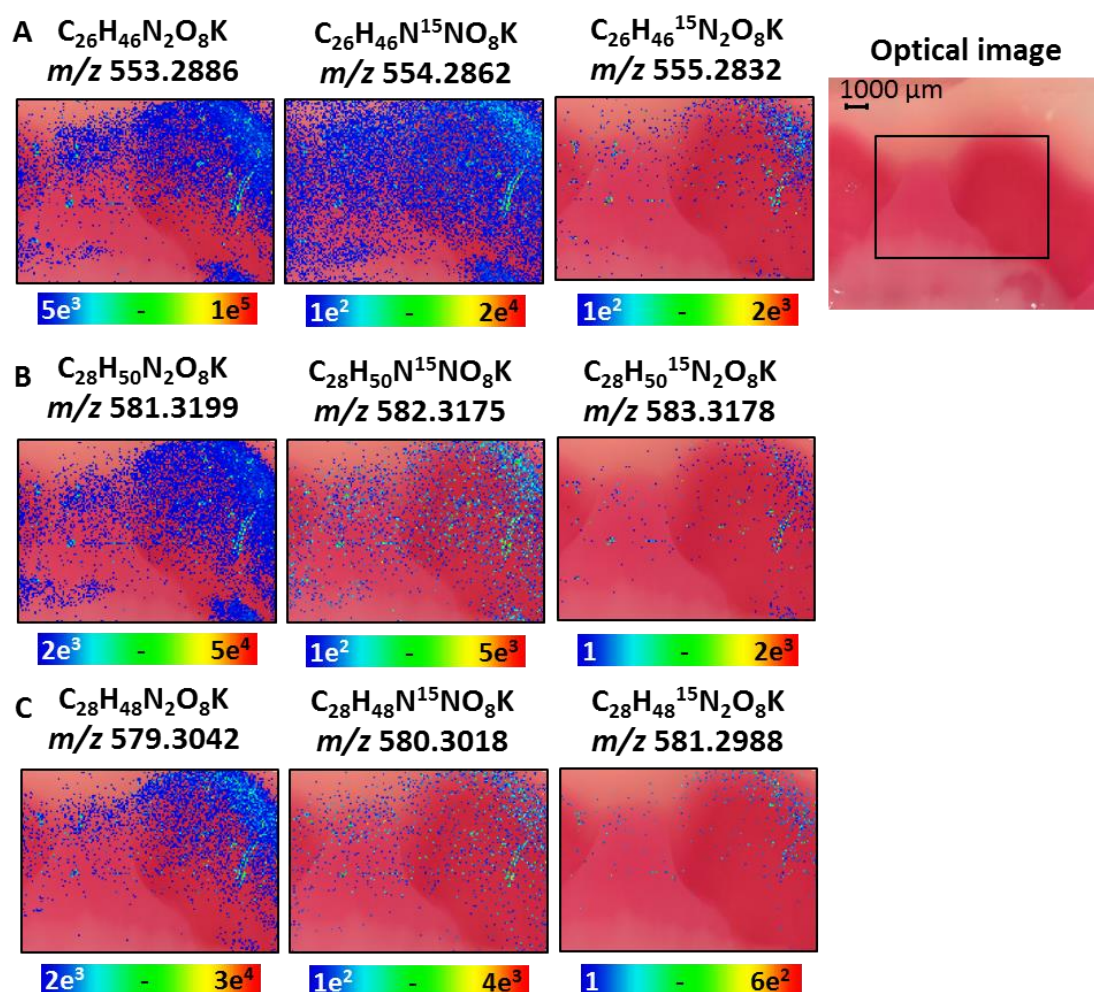


Abb. S246: MALDI-imaging-HRMS von Serratamoliden (A: Serrawettin W1 (**10**); B: $C_{10}+C_{12}$ (**12**); C: $C_{10}+C_{12:1}$ (**16**)) produziert von *S. marcescens* MSRBB2 auf Kartoffel-Dextrose-Agar mit zugegebenem $[^{15}N]$ -L-Serin (1 mg/mL). Optische Bilder mit eingezeichnetem Messbereich und Visualisierung der örtlichen Verteilung von unmarkierten Serratamoliden und einmaligem und zweimaligem Einbau von $[^{15}N]$ -L-Serin ($[M+K]^+ \pm 3$ ppm).

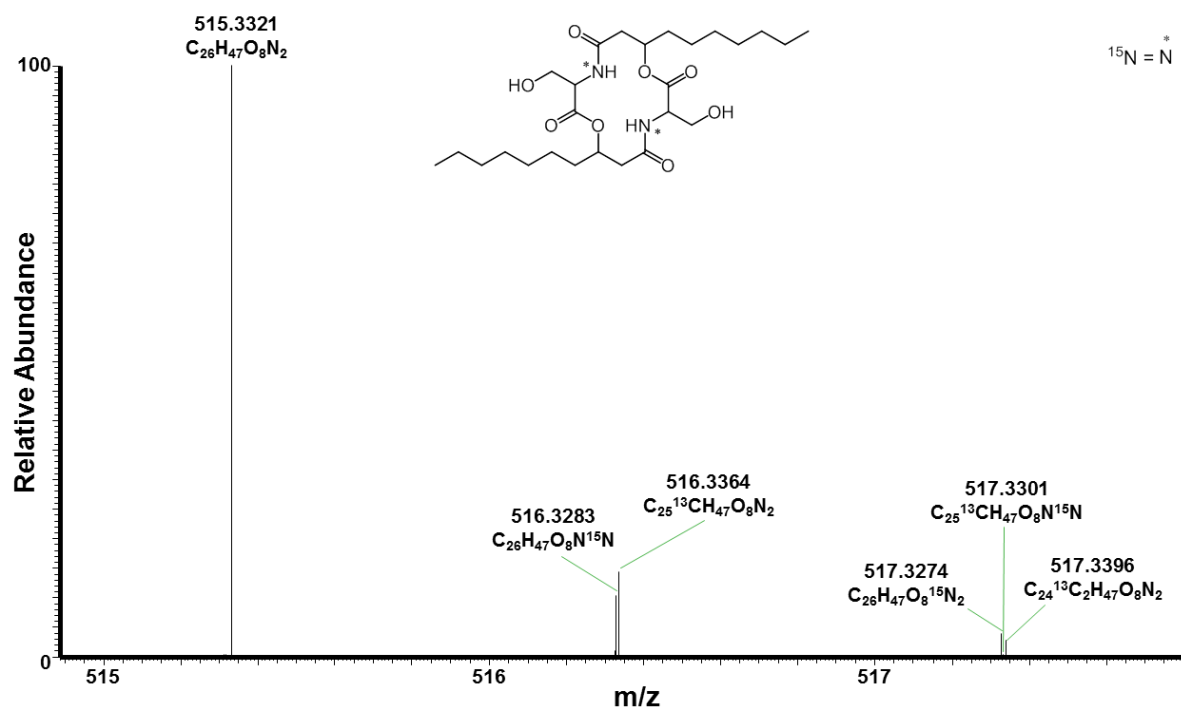


Abb. S247: HRMS-Spektrum von Serrawettin W1 / Serratamolide C₁₀+C₁₀ mit eingebautem ¹⁵N-L-Serin von markiertem Nähragar (Verbindung **10** [M+H]⁺: m/z 515, C₂₆H₄₇N₂O₈).

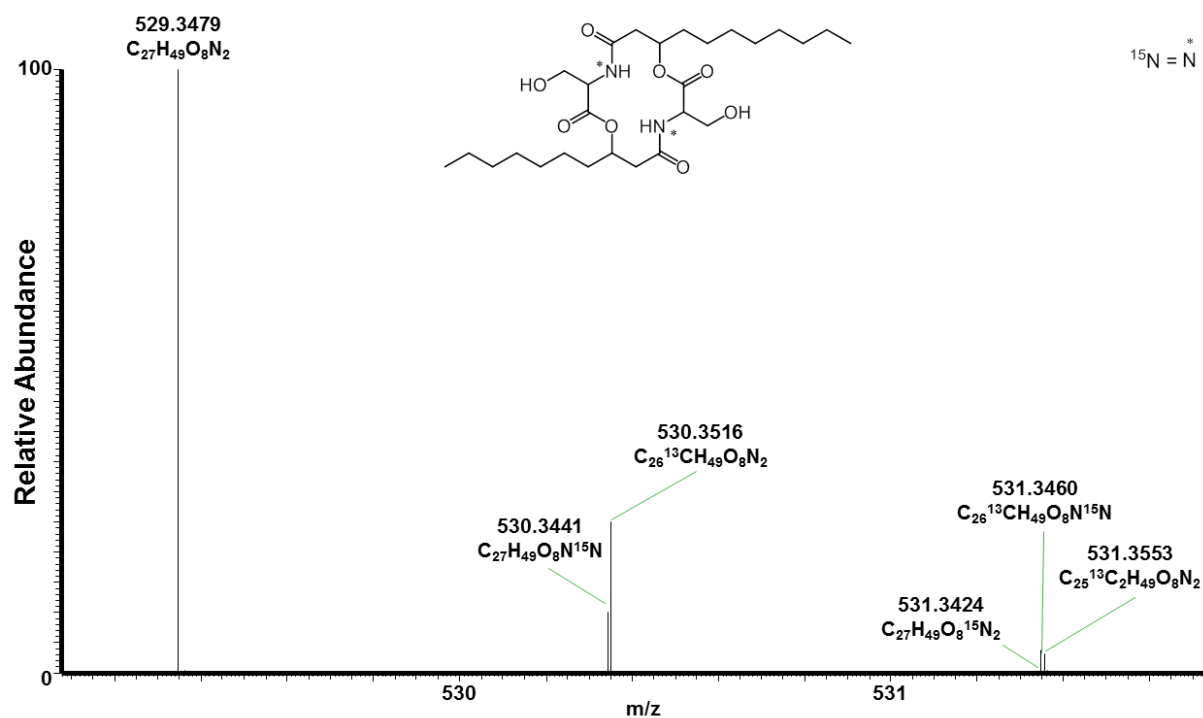


Abb. S248: HRMS-Spektrum von Serratamolide C₁₀+C₁₁ mit eingebautem ¹⁵N-L-Serin von markiertem Nähragar (Verbindung **11** [M+H]⁺: m/z 529, C₂₇H₄₉N₂O₈).

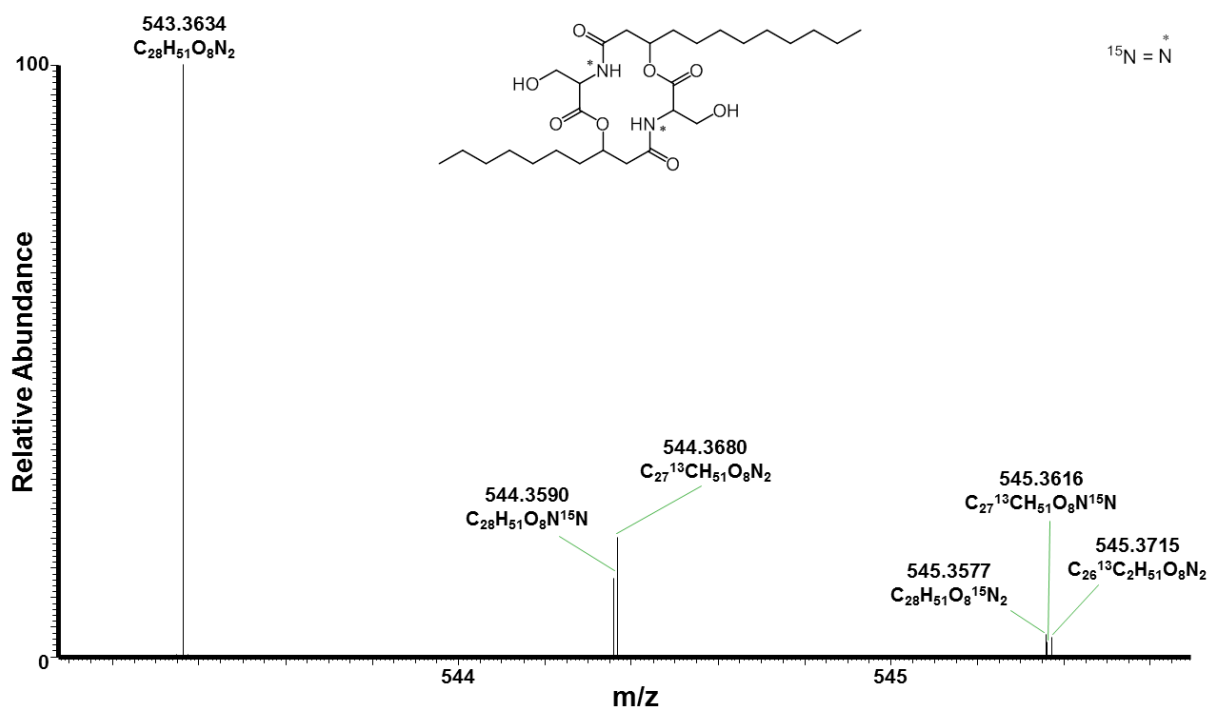


Abb. S249: HRMS-Spektrum von Serratamolide $C_{10}+C_{12}$ mit eingebautem ^{15}N -L-Serin von markiertem Nähragar (Verbindung **12** $[M+H]^+$: m/z 543, $C_{28}H_{51}N_2O_8$).

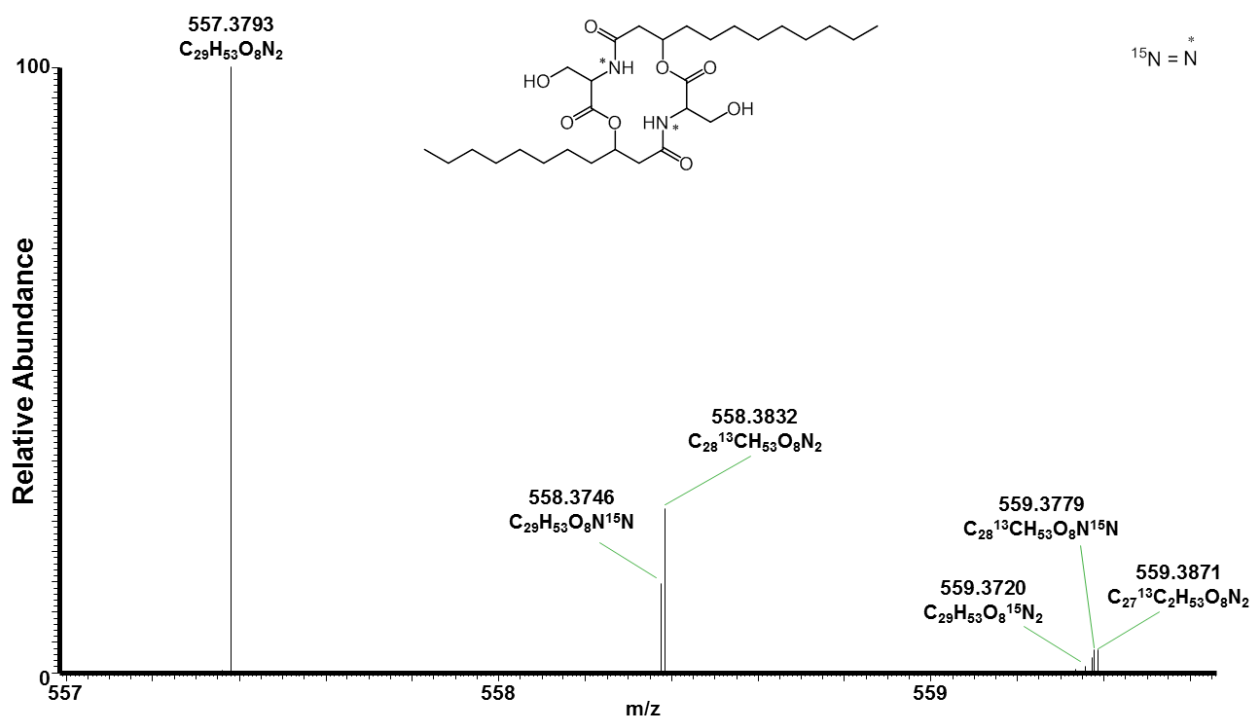


Abb. S250: HRMS-Spektrum von Serratamolide $C_{11}+C_{12}$ mit eingebautem ^{15}N -L-Serin von markiertem Nähragar (Verbindung **13** $[M+H]^+$: m/z 557, $C_{29}H_{53}N_2O_8$).

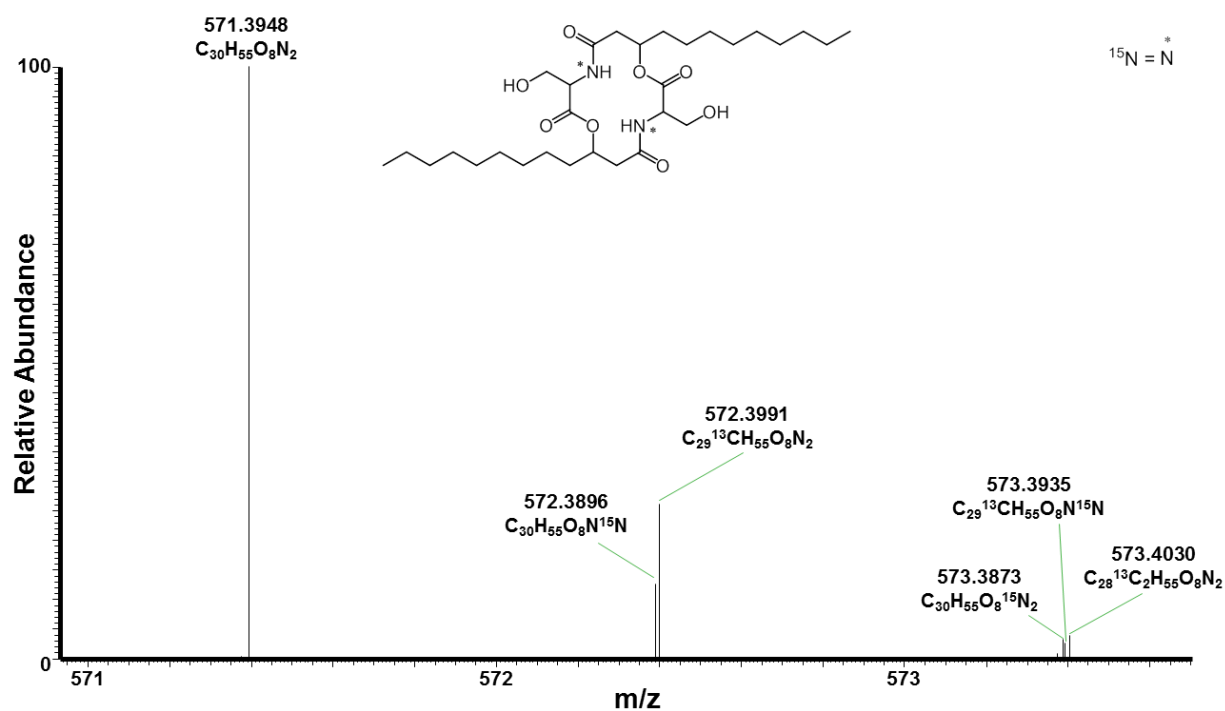


Abb. S251: HRMS-Spektrum von Serratamolid $C_{12}+C_{12}$ mit eingebautem ^{15}N -L-Serin von markiertem Nähragar (Verbindung **14** $[M+H]^+$: m/z 571, $C_{30}H_{55}N_2O_8$).

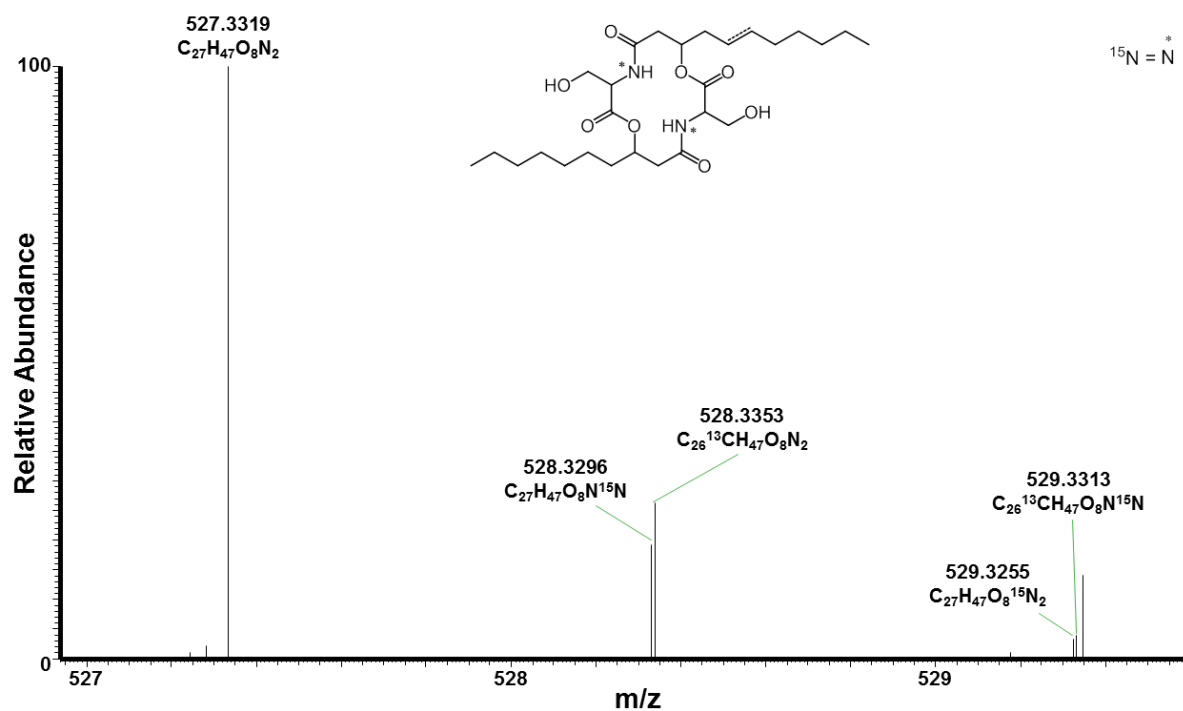


Abb. S252: HRMS-Spektrum von Serratamolid $C_{10}+C_{11:1}$ mit eingebautem ^{15}N -L-Serin von markiertem Nähragar (Verbindung **16** $[M+H]^+$: m/z 527, $C_{27}H_{47}N_2O_8$).

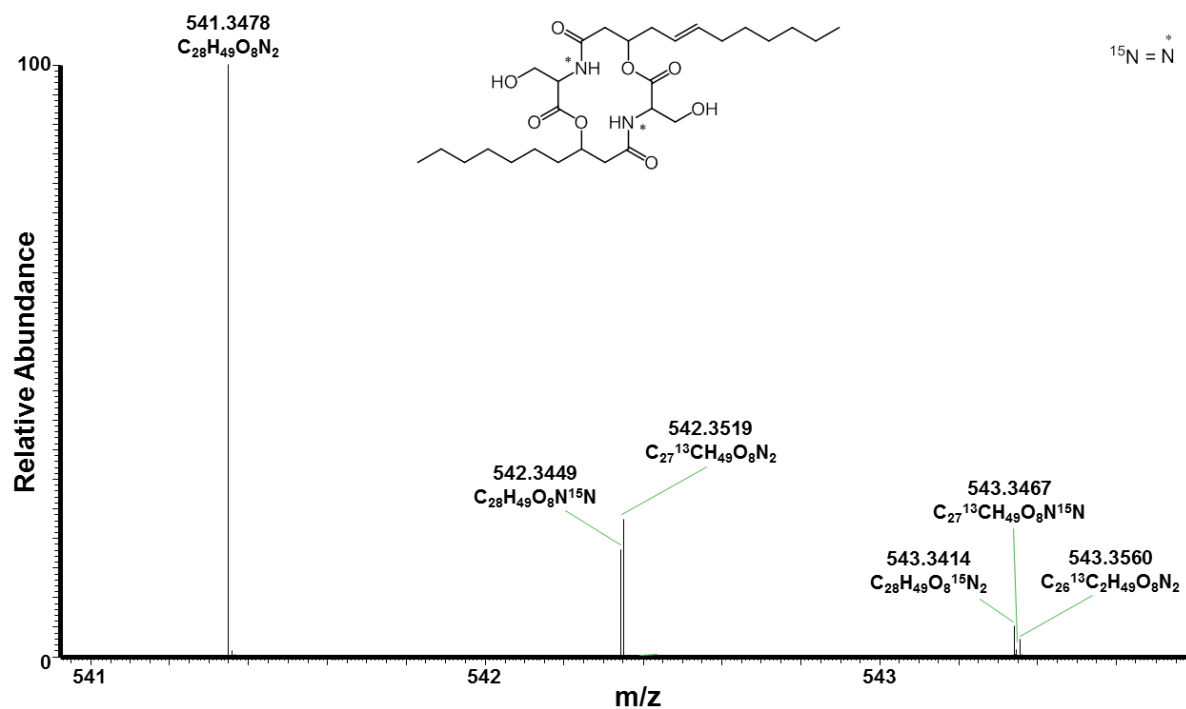


Abb. S253: HRMS-Spektrum von Serratamolide $C_{10}+C_{12:1}$ mit eingebautem ^{15}N -L-Serin von markiertem Nähragar (Verbindung **17** $[M+H]^+$: m/z 541, $C_{28}H_{49}N_2O_8$).

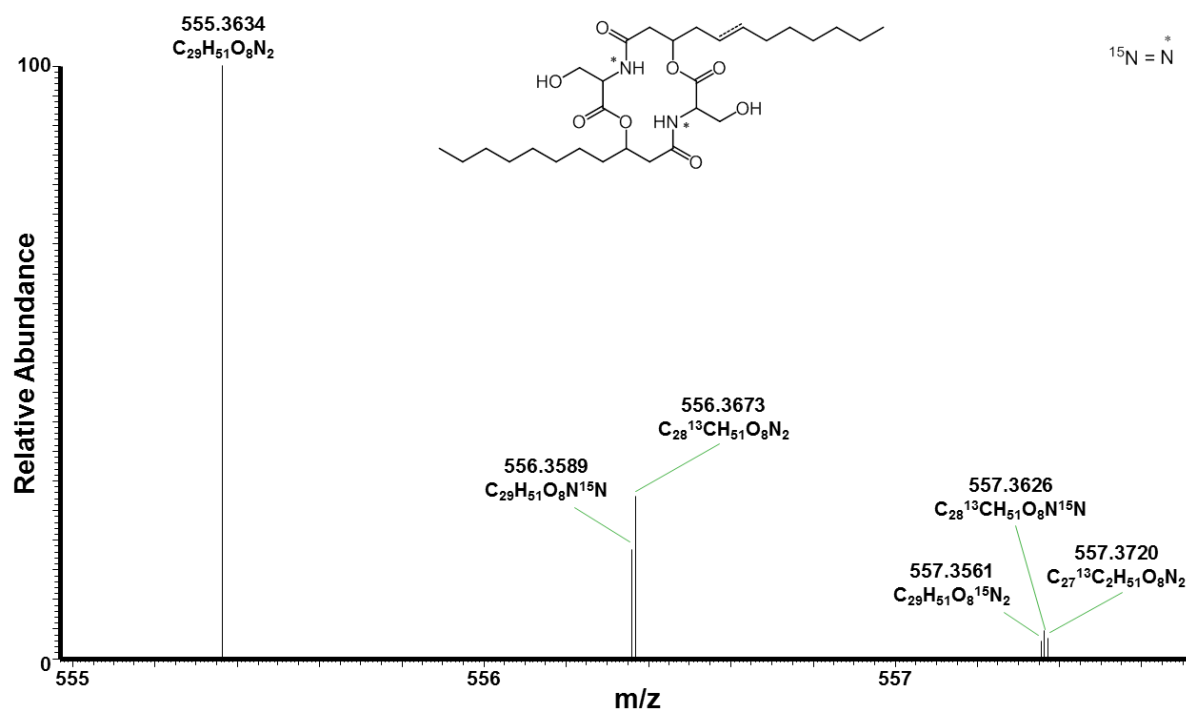


Abb. S254: HRMS-Spektrum von Serratamolide $C_{11}+C_{12:1}$ mit eingebautem ^{15}N -L-Serin von markiertem Nähragar (Verbindung **18** $[M+H]^+$: m/z 555, $C_{29}H_{51}N_2O_8$).

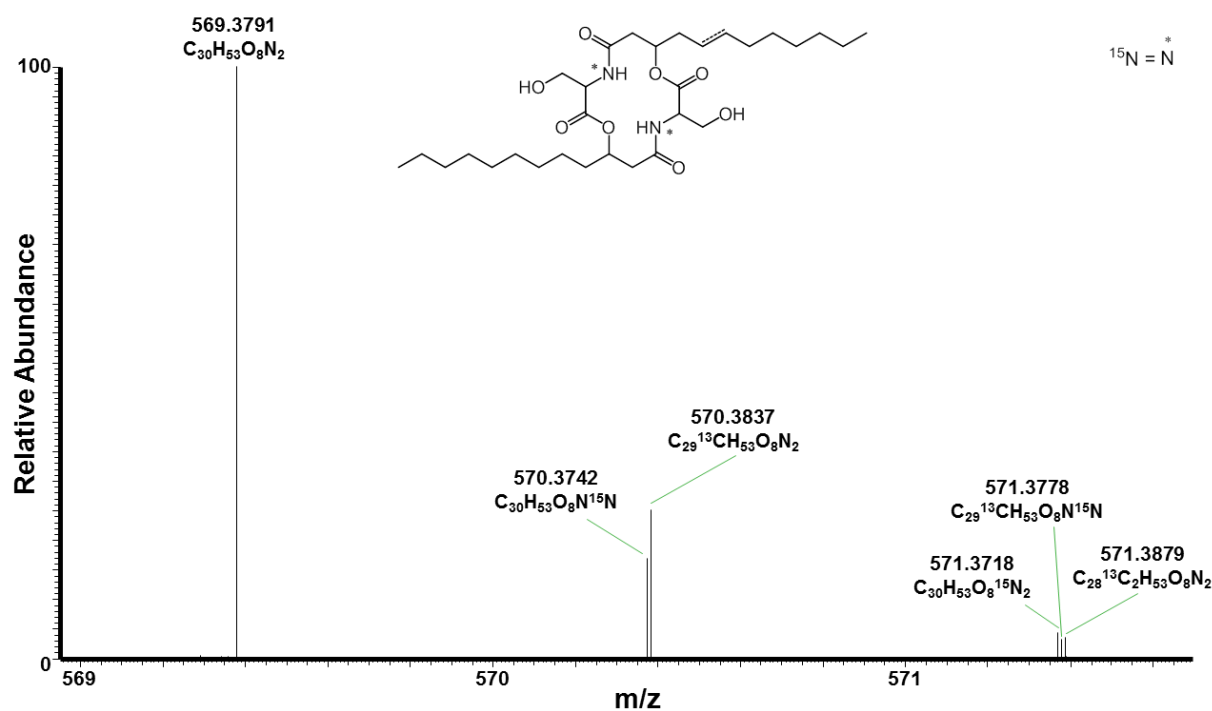


Abb. S255: HRMS-Spektrum von Serratamolid $C_{12}+C_{12:1}$ mit eingebautem ^{15}N -L-Serin von markiertem Nähragar (Verbindung **19** $[\text{M}+\text{H}]^+$: m/z 569, $\text{C}_{30}\text{H}_{53}\text{N}_2\text{O}_8$).

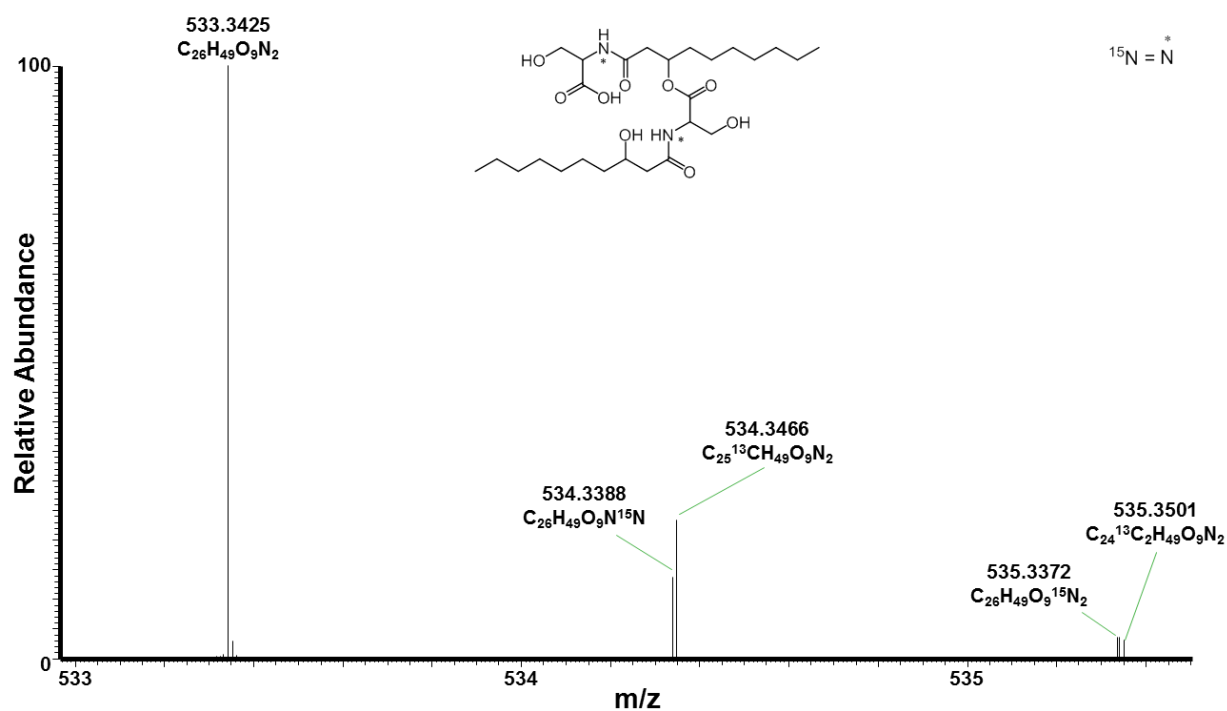


Abb. S256: HRMS-Spektrum von Serratamolid $C_{10}+C_{10}$ mit eingebautem ^{15}N -L-Serin von markiertem Nähragar (geöffnete Ringstruktur, Verbindung **20** $[\text{M}+\text{H}]^+$: m/z 533, $\text{C}_{26}\text{H}_{49}\text{N}_2\text{O}_9$).

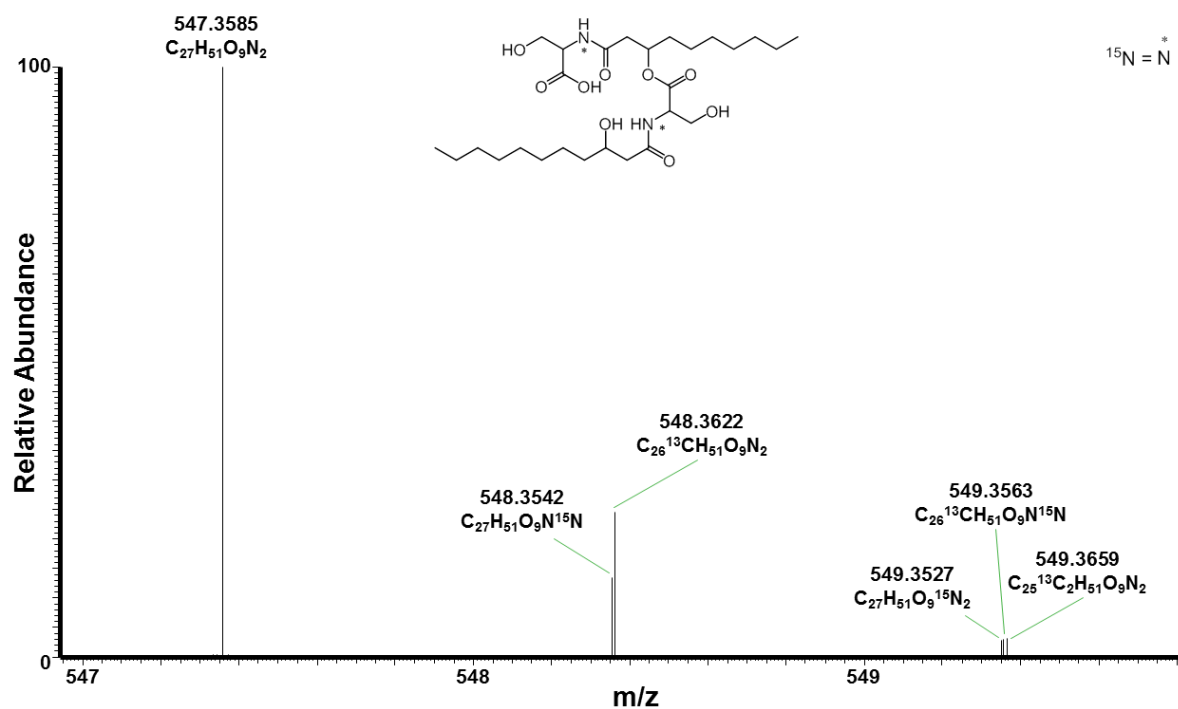


Abb. S257: HRMS-Spektrum von Serratamolid $C_{10}+C_{11}$ mit eingebautem ^{15}N -L-Serin von markiertem Nähragar (geöffnete Ringstruktur, Verbindung **21** $[M+H]^+$: m/z 547, $C_{27}H_{51}N_2O_9$).

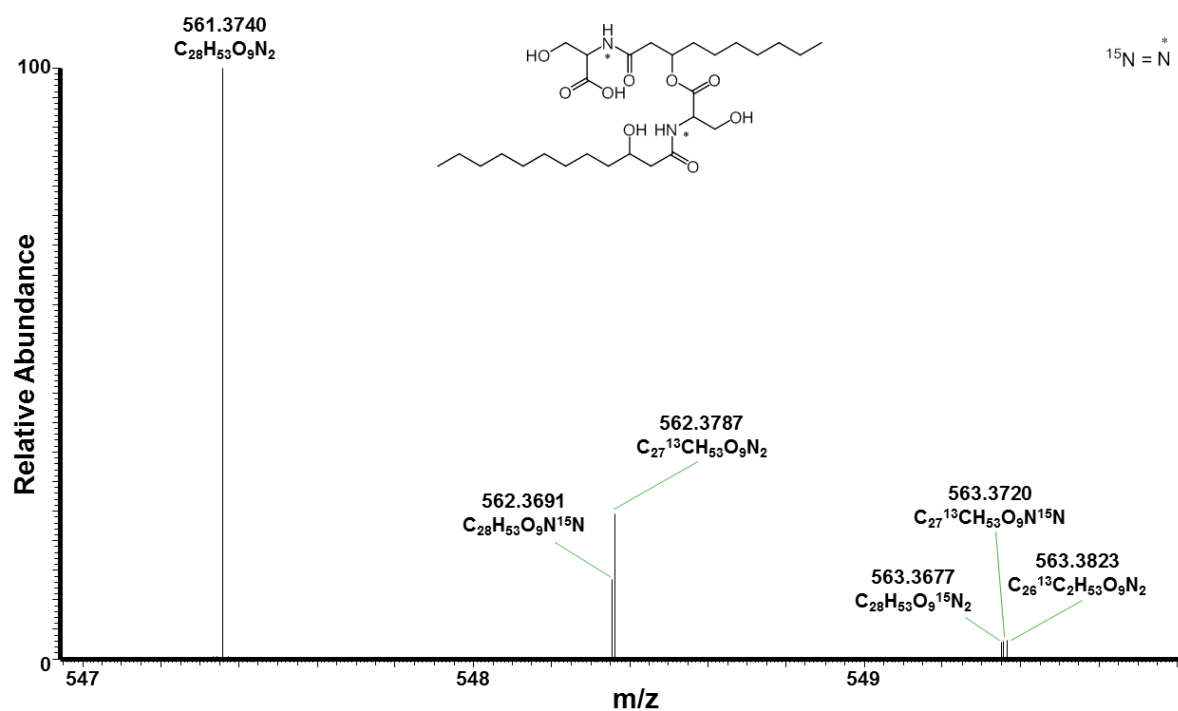


Abb. S258: HRMS-Spektrum von Serratamolid $C_{10}+C_{12}$ mit eingebautem ^{15}N -L-Serin von markiertem Nähragar (geöffnete Ringstruktur, Verbindung **22** $[M+H]^+$: m/z 561, $C_{28}H_{53}N_2O_9$).

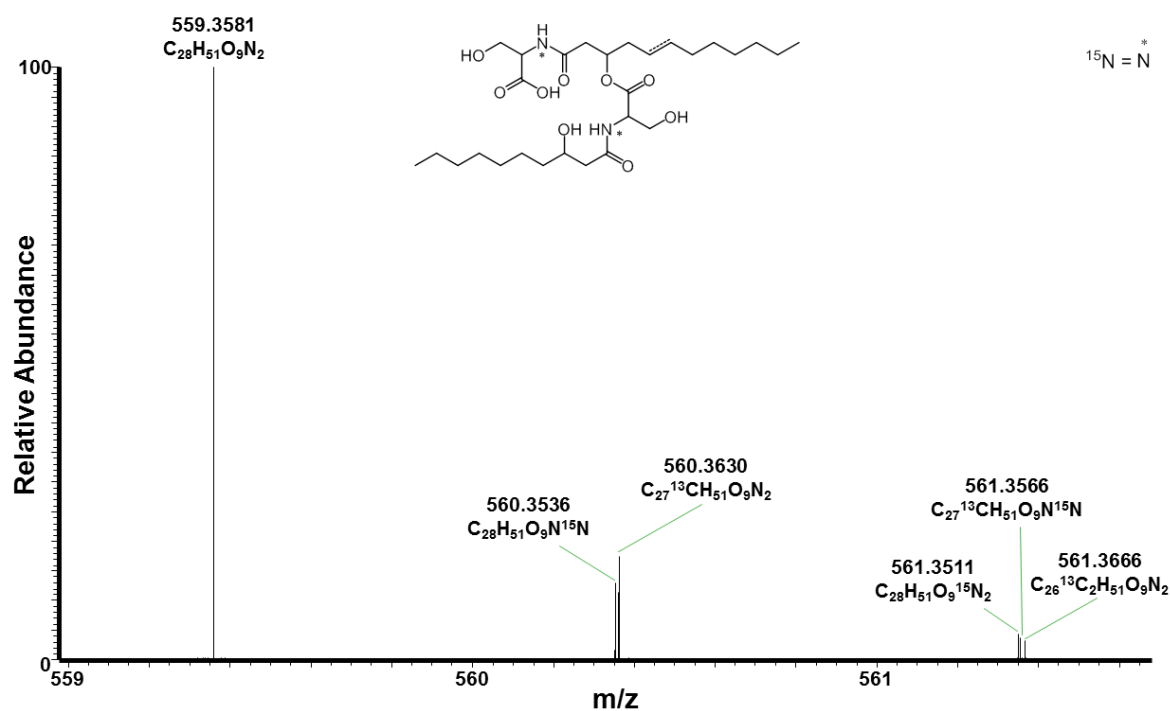


Abb. S259: HRMS-Spektrum von Serratamolide $C_{10}+C_{12:1}$ mit eingebautem ^{15}N -L-Serin von markiertem Nähragar (geöffnete Ringstruktur, Verbindung **23** $[M+H]^+$: m/z 559, $C_{28}H_{51}N_2O_9$).

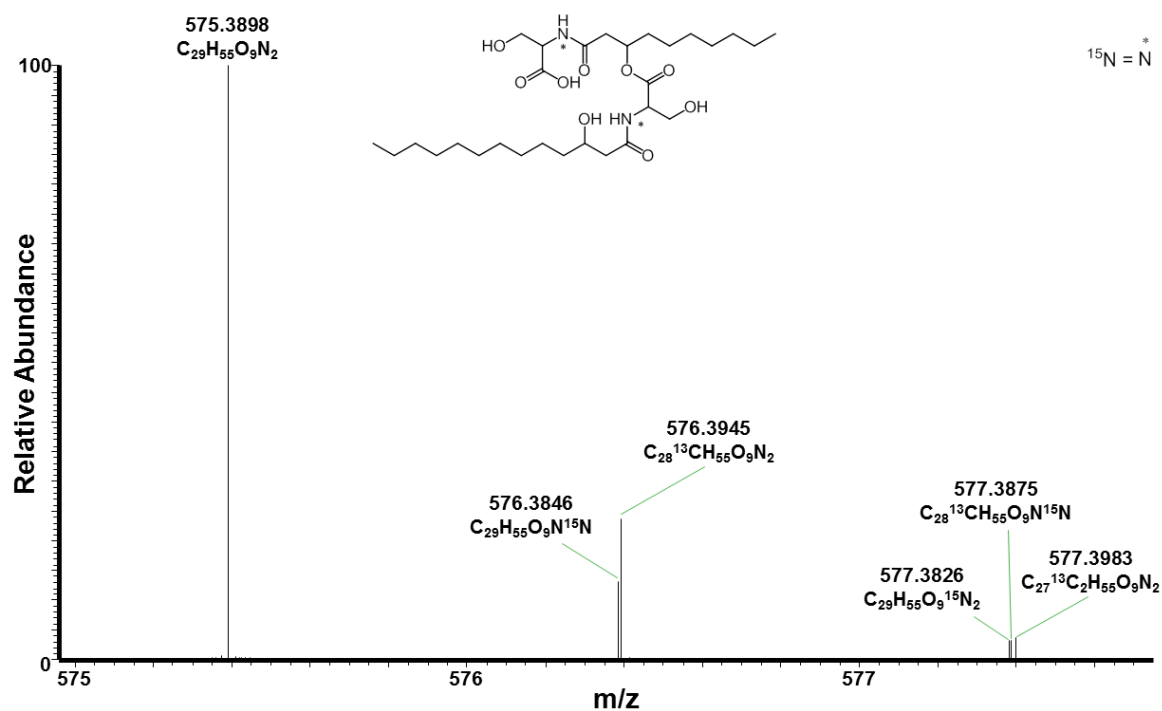


Abb. S260: HRMS-Spektrum von Serratamolide $C_{10}+C_{13}$ mit eingebautem ^{15}N -L-Serin von markiertem Nähragar (geöffnete Ringstruktur, Verbindung **25** $[M+H]^+$: m/z 575, $C_{29}H_{55}N_2O_9$).

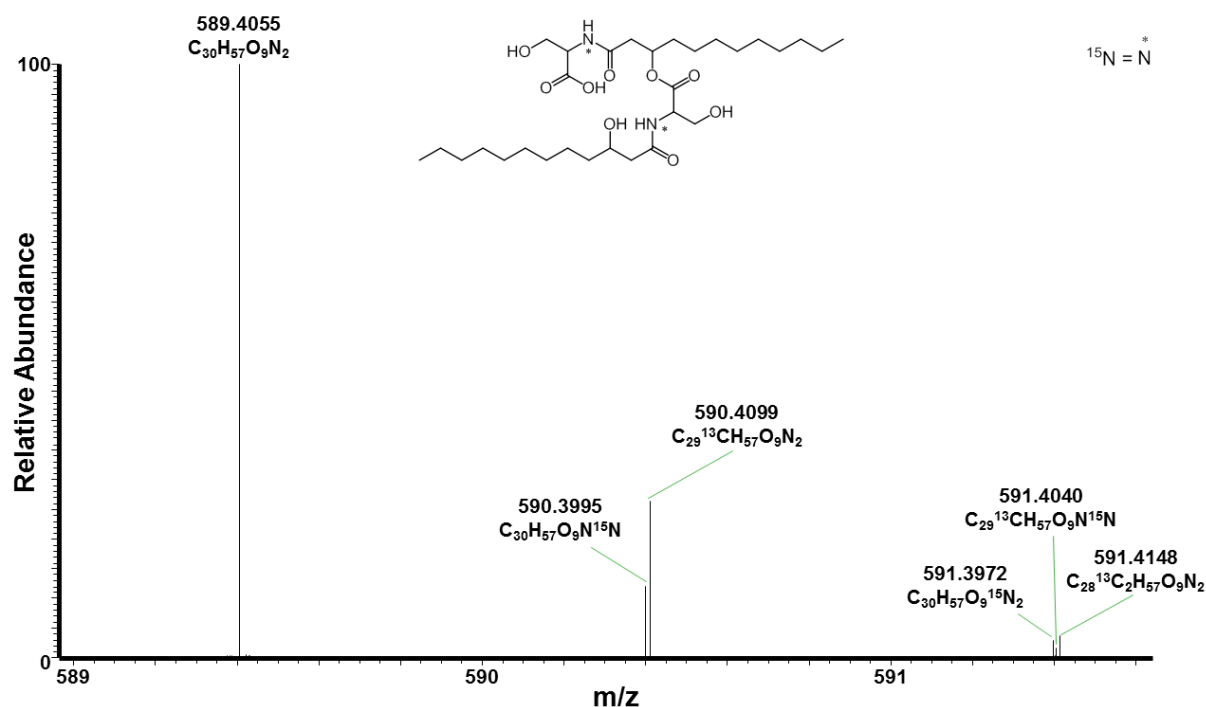


Abb. S261: HRMS-Spektrum von Serratamolide $C_{12}+C_{12}$ mit eingebautem ^{15}N -L-Serin von markiertem Nähragar (geöffnete Ringstruktur, Verbindung **26** $[\text{M}+\text{H}]^+$: m/z 589, $\text{C}_{30}\text{H}_{57}\text{N}_2\text{O}_9$).

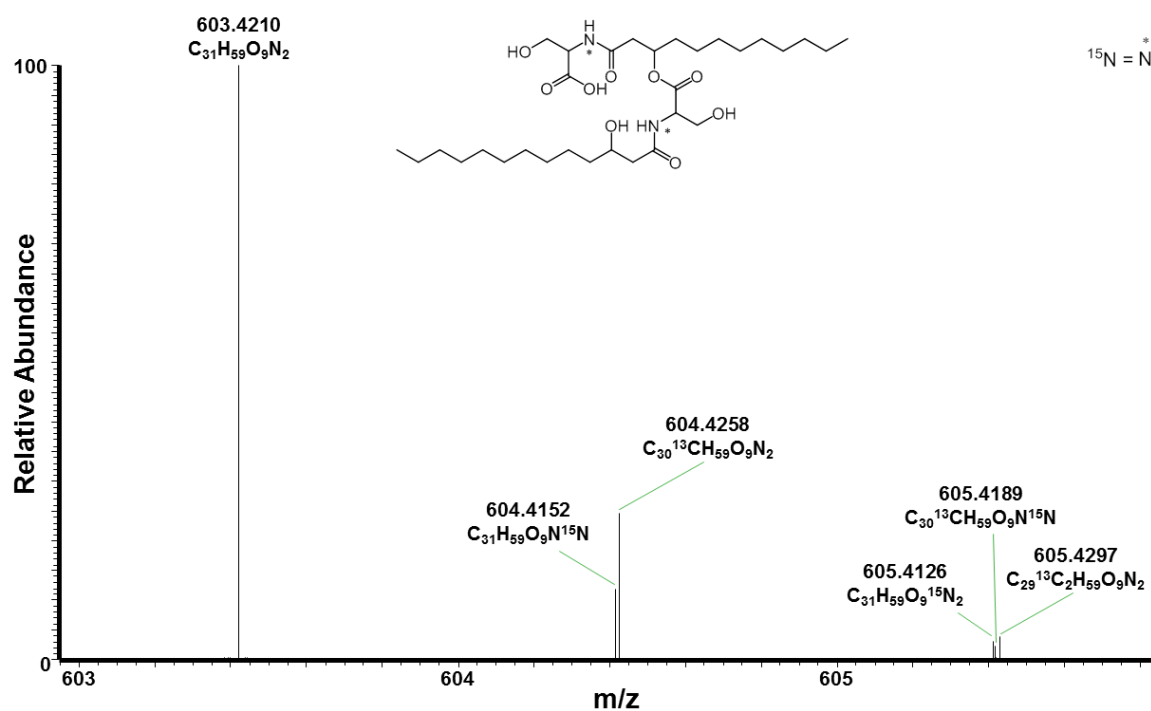


Abb. S262: HRMS-Spektrum von Serratamolide $C_{12}+C_{13}$ mit eingebautem ^{15}N -L-Serin von markiertem Nähragar (geöffnete Ringstruktur, Verbindung **27** $[\text{M}+\text{H}]^+$: m/z 603, $\text{C}_{31}\text{H}_{59}\text{N}_2\text{O}_9$).

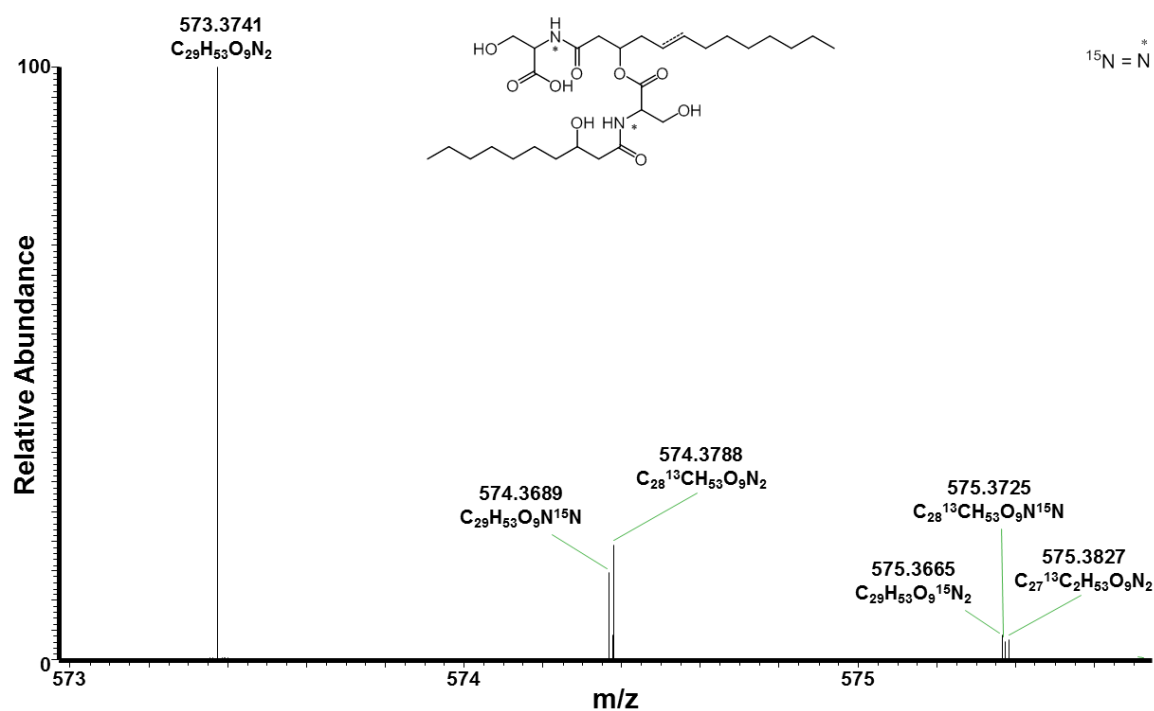


Abb. S263: HRMS-Spektrum von Serratamolide $C_{10}+C_{13:1}$ mit eingebautem ^{15}N -L-Serin von markiertem Nähragar (geöffnete Ringstruktur, Verbindung **28** $[M+H]^+$: m/z 573, $C_{29}H_{53}N_2O_9$).

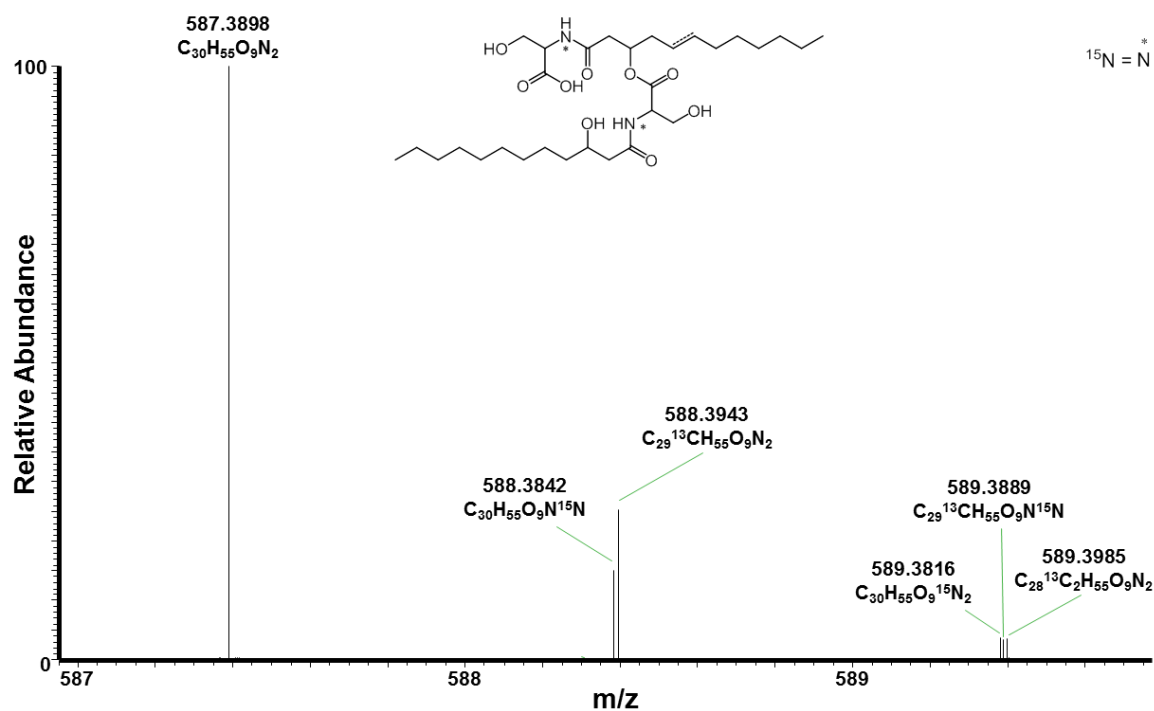


Abb. S264: HRMS-Spektrum von Serratamolide $C_{12}+C_{12:1}$ mit eingebautem ^{15}N -L-Serin von markiertem Nähragar (geöffnete Ringstruktur, Verbindung **29** $[M+H]^+$: m/z 587, $C_{30}H_{55}N_2O_9$).

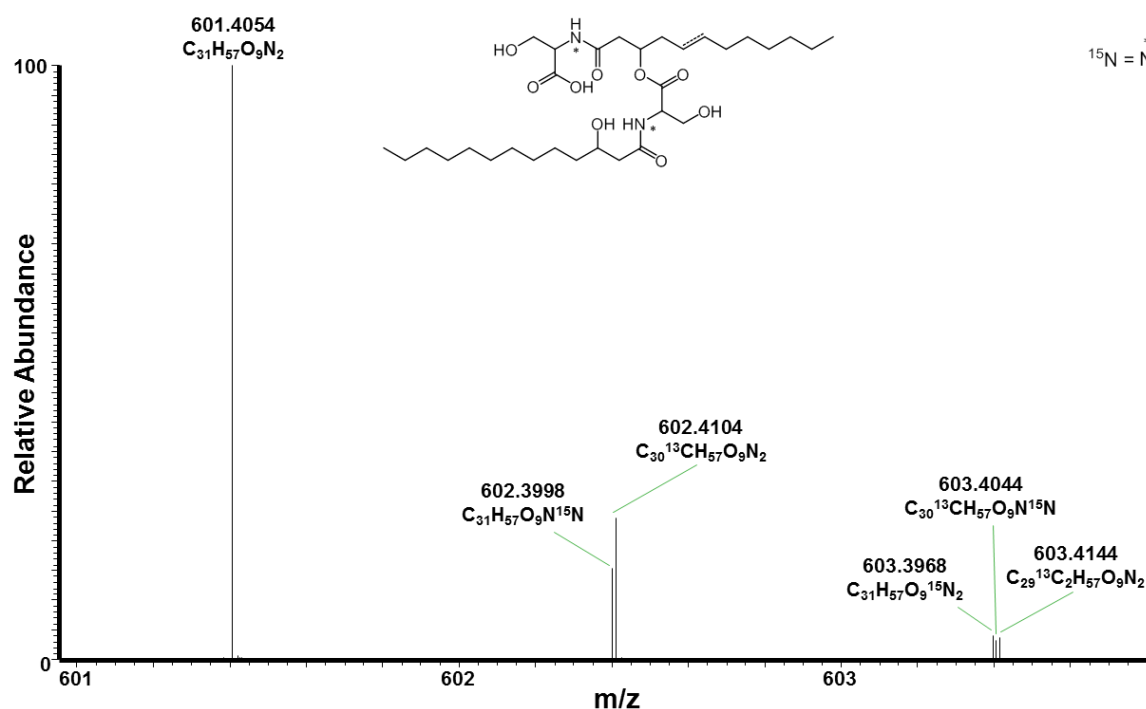


Abb. S265: HRMS-Spektrum von Serratamolid $C_{13}+C_{12:1}$ mit eingebautem ^{15}N -L-Serin von markiertem Nähragar (geöffnete Ringstruktur, Verbindung **30** $[M+H]^+$: m/z 601, $C_{31}H_{57}N_2O_9$).

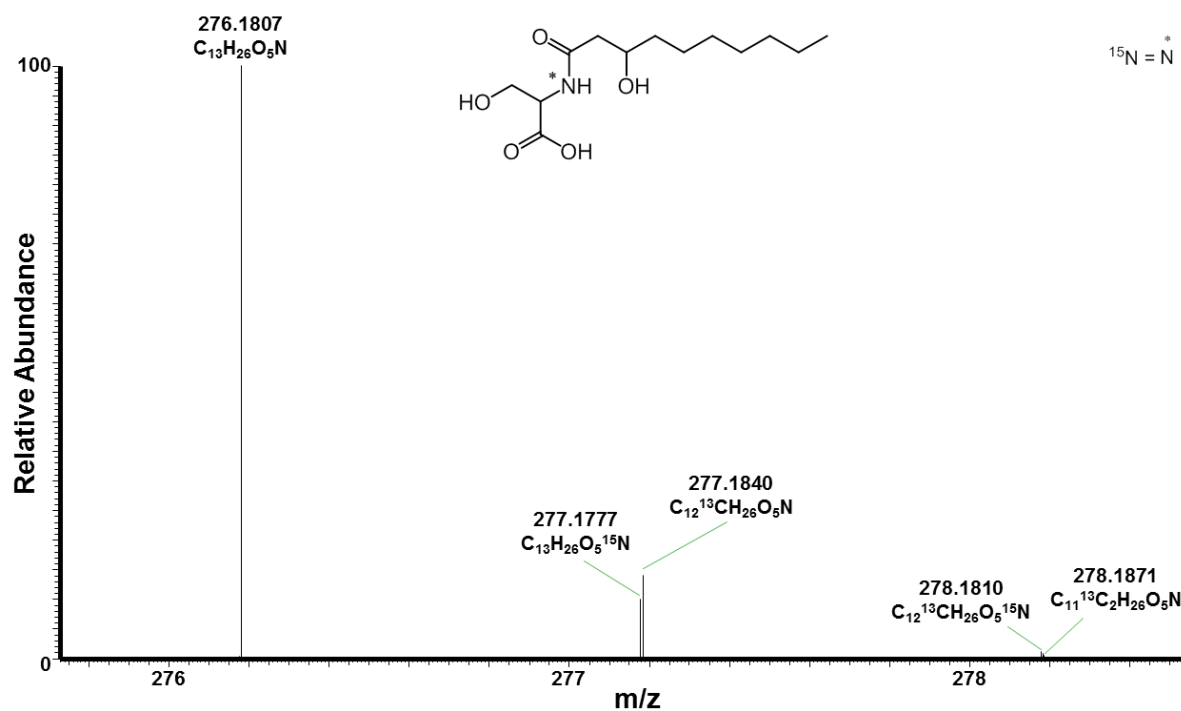


Abb. S266: HRMS-Spektrum von Serratamsäure mit eingebautem ^{15}N -L-Serin von markiertem Nähragar ((N-(D-3-Hydroxydecanoyl)-L-Serin, Verbindung **31** $[M+H]^+$: m/z 276, $C_{13}H_{26}NO_5$).

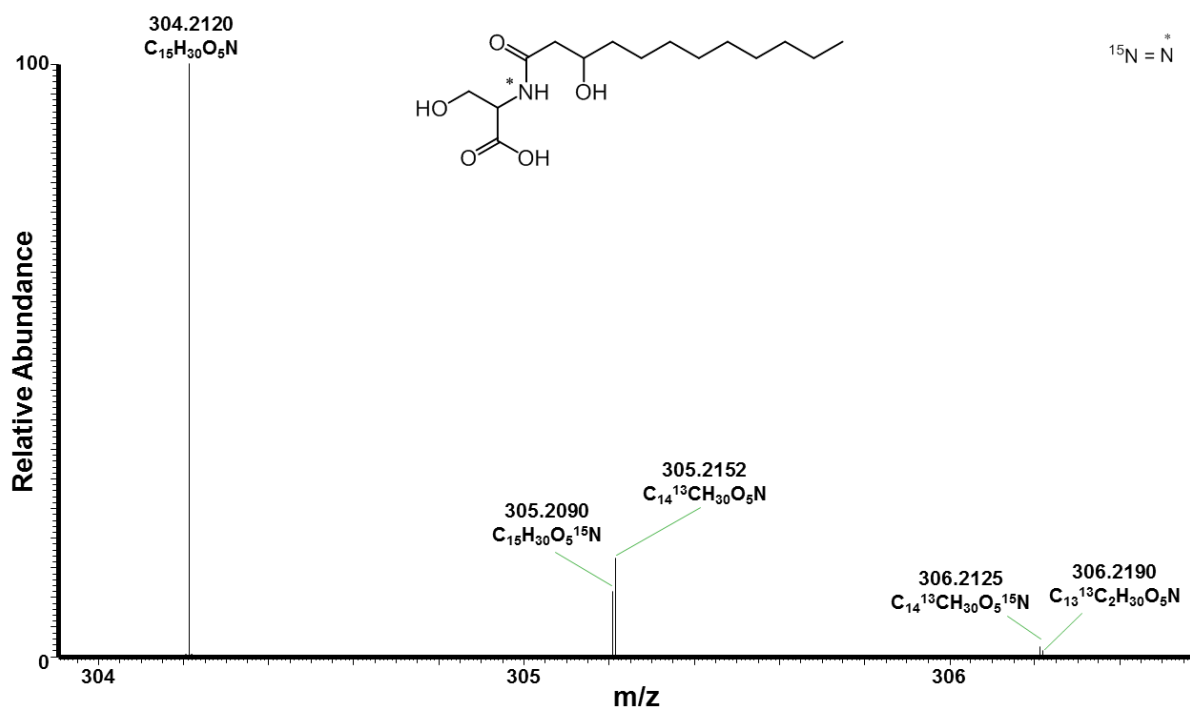


Abb. S267: HRMS-Spektrum von Serratamsäure-Derivat mit eingebautem ^{15}N -L-Serin von markiertem Nähragar (Verbindung **32** $[\text{M}+\text{H}]^+$: m/z 304, $\text{C}_{15}\text{H}_{30}\text{NO}_5$).

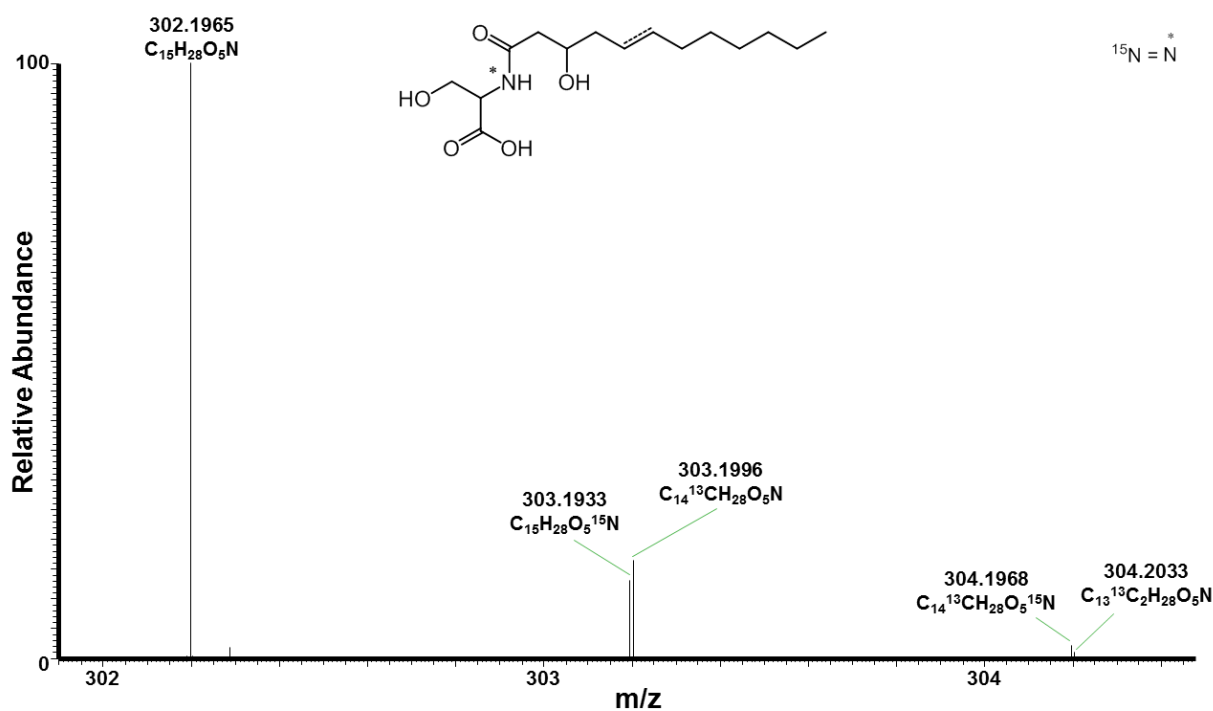


Abb. S268: HRMS-Spektrum von Serratamsäure-Derivat mit Doppelbindung mit eingebautem ^{15}N -L-Serin von markiertem Nähragar (Verbindung **33** $[\text{M}+\text{H}]^+$: m/z 302, $\text{C}_{15}\text{H}_{28}\text{NO}_5$).

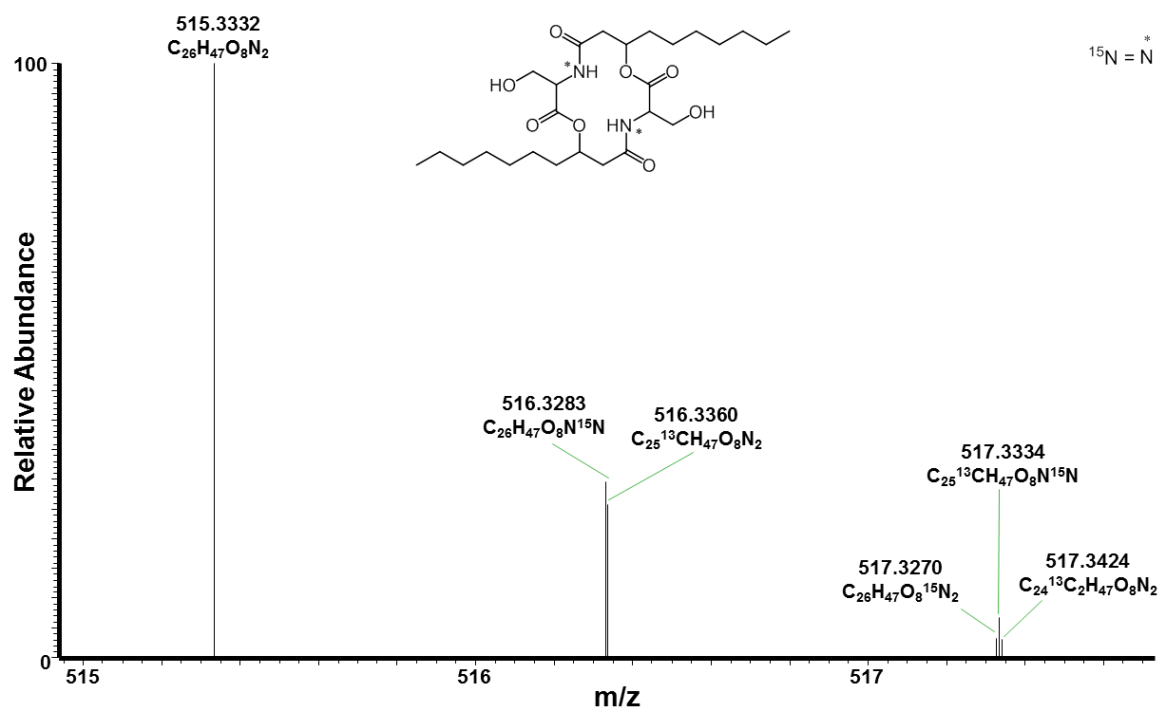


Abb. S269: HRMS-Spektrum von Serrawettin W1 / Serratamolide $C_{10}+C_{10}$ mit eingebautem ^{15}N -L-Serin von markiertem Kartoffel-Dextrose-Agar (Verbindung **10** $[M+H]^+$: m/z 515, $C_{26}H_{47}N_2O_8$).

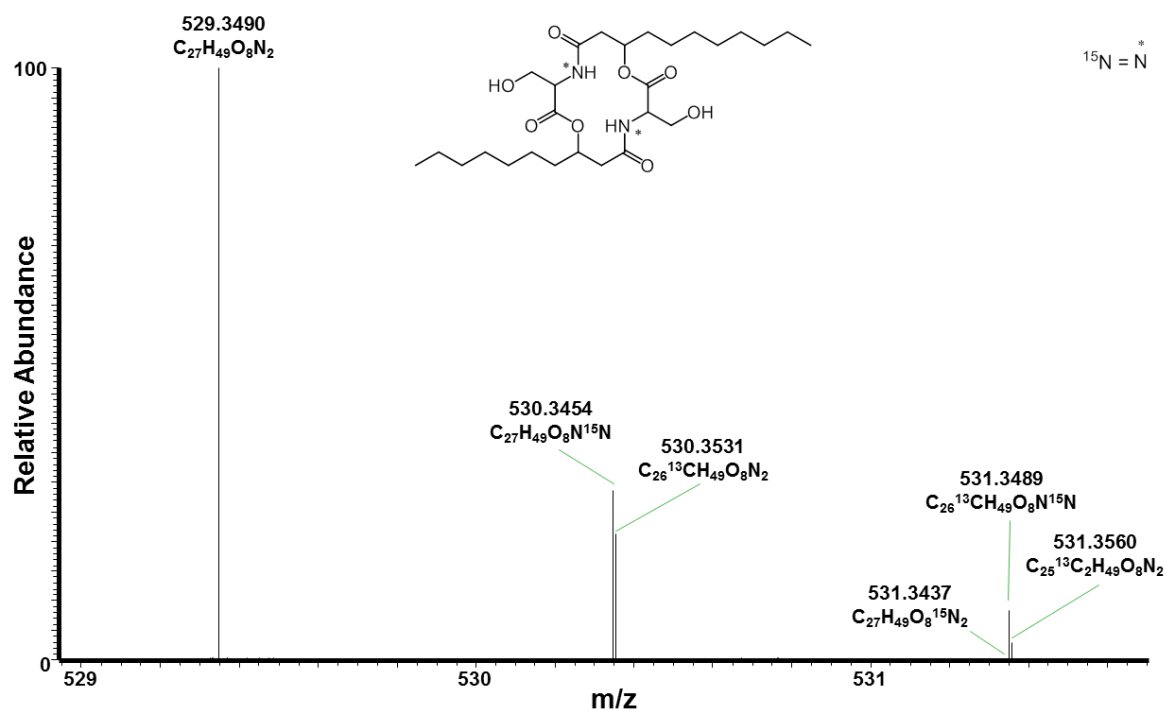


Abb. S270: HRMS-Spektrum von Serratamolide $C_{10}+C_{11}$ mit eingebautem ^{15}N -L-Serin von markiertem Kartoffel-Dextrose-Agar (Verbindung **11** $[M+H]^+$: m/z 529, $C_{27}H_{49}N_2O_8$).

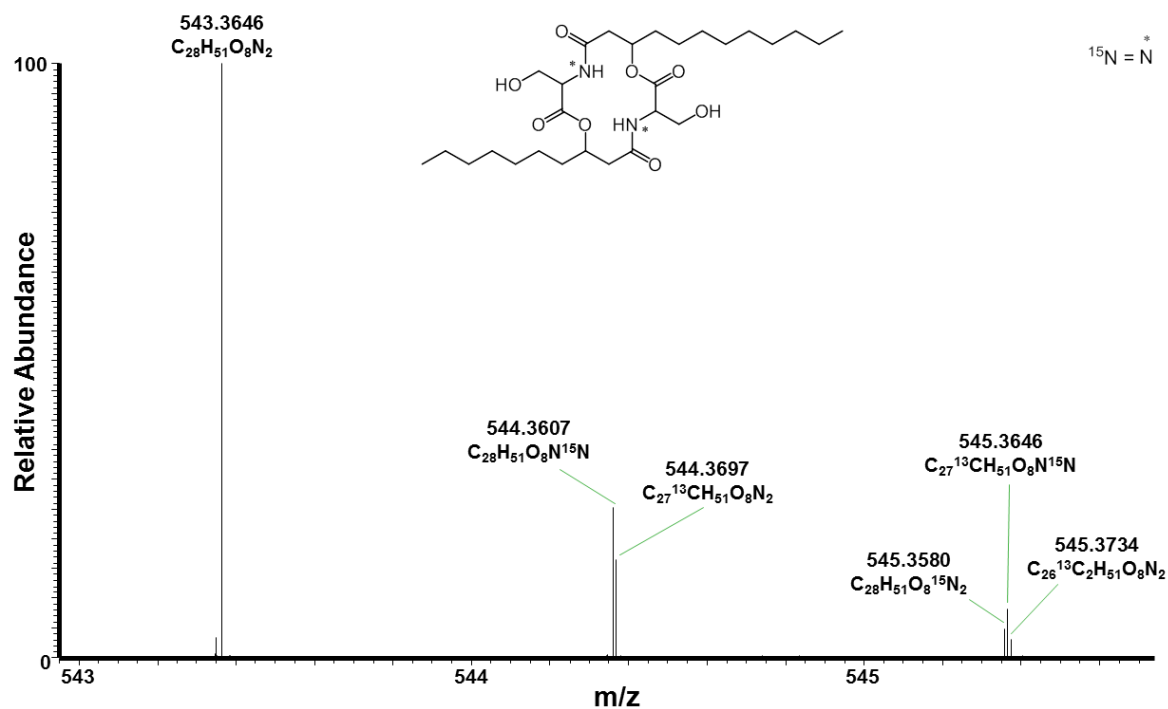


Abb. S271: HRMS-Spektrum von Serratamolide $C_{10}+C_{12}$ mit eingebautem ^{15}N -L-Serin von markiertem Kartoffel-Dextrose-Agar (Verbindung **12** $[M+H]^+$: m/z 543, $C_{28}H_{51}N_2O_8$).

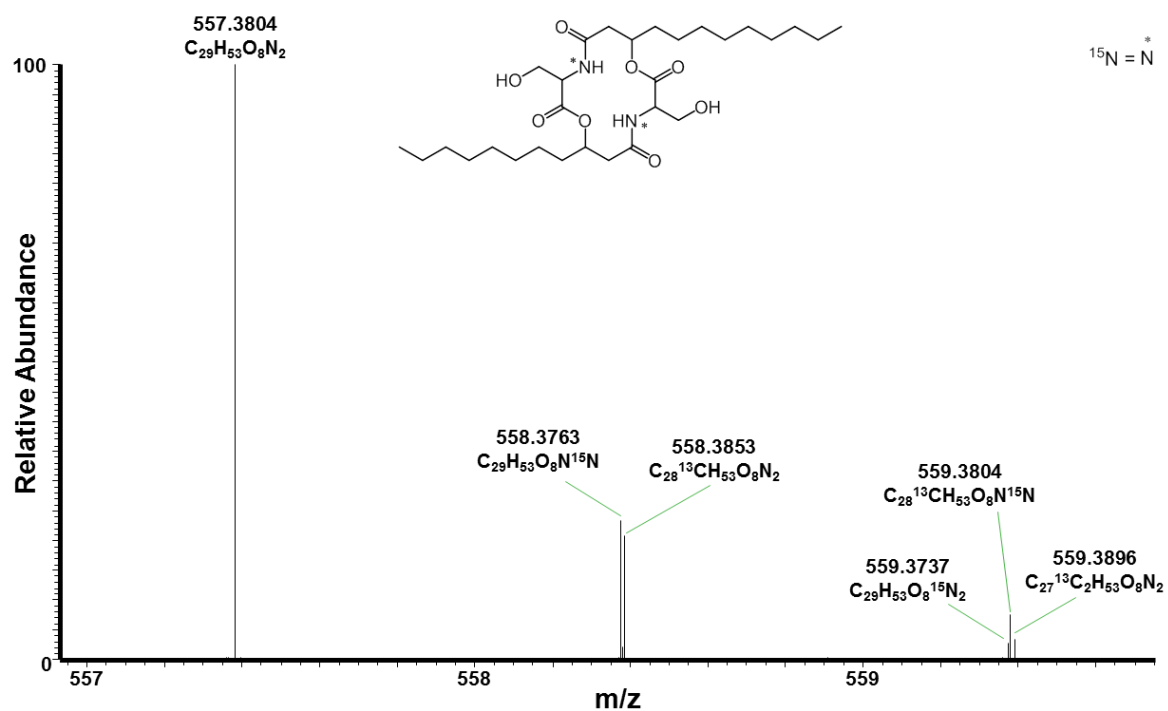


Abb. S272: HRMS-Spektrum von Serratamolide $C_{11}+C_{12}$ mit eingebautem ^{15}N -L-Serin von markiertem Kartoffel-Dextrose-Agar (Verbindung **13** $[M+H]^+$: m/z 557, $C_{29}H_{53}N_2O_8$).

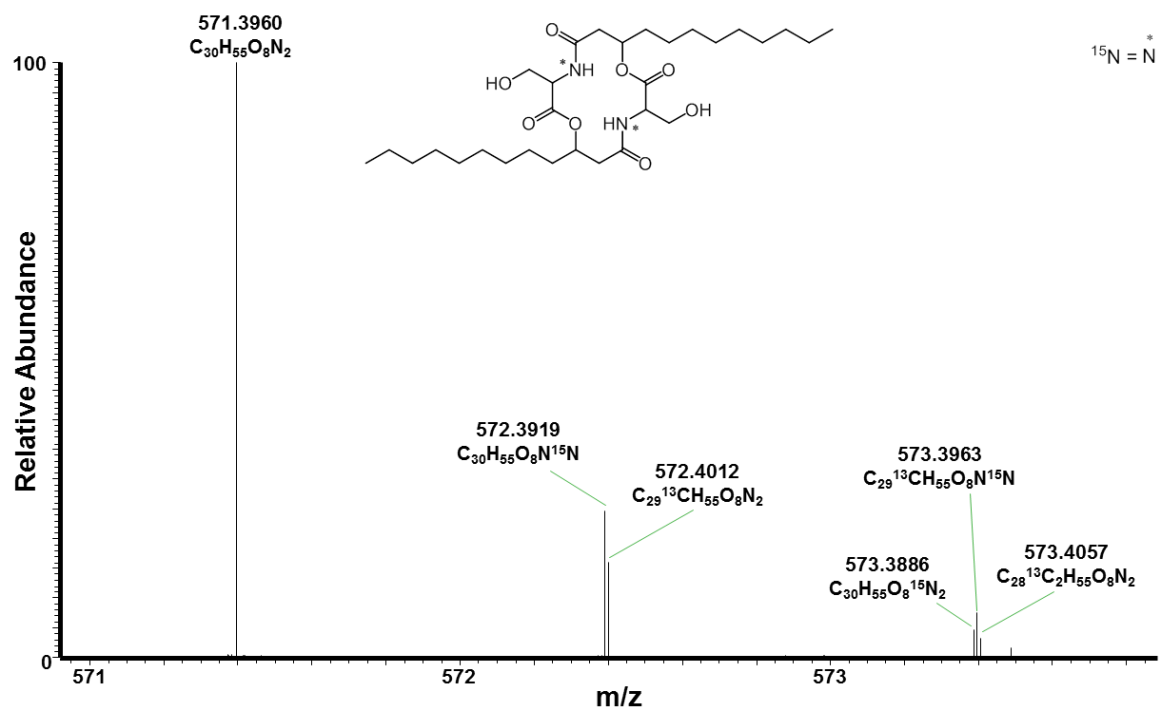


Abb. S273: HRMS-Spektrum von Serratamolide $C_{12}+C_{12}$ mit eingebautem ^{15}N -L-Serin von markiertem Kartoffel-Dextrose-Agar (Verbindung **14** $[M+H]^+$: m/z 571, $C_{30}H_{55}N_2O_8$).

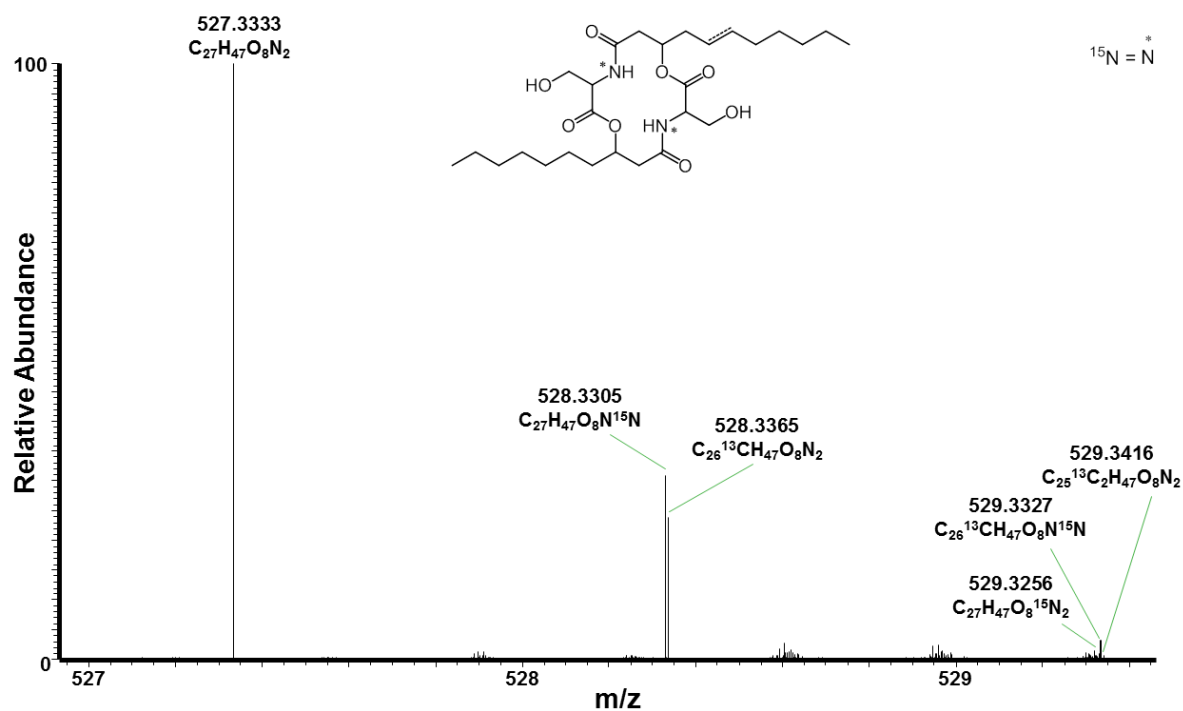


Abb. S274: HRMS-Spektrum von Serratamolide $C_{10}+C_{11:1}$ mit eingebautem ^{15}N -L-Serin von markiertem Kartoffel-Dextrose-Agar (Verbindung **16** $[M+H]^+$: m/z 527, $C_{27}H_{47}N_2O_8$).

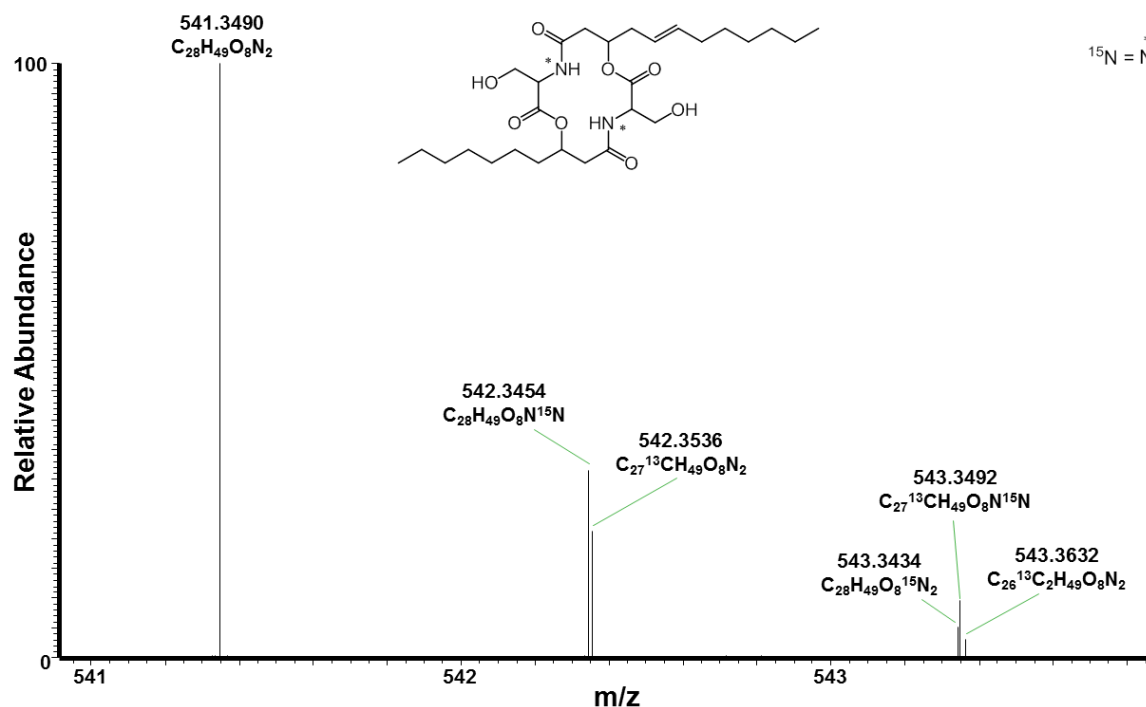


Abb. S275: HRMS-Spektrum von Serratamolide $C_{10}+C_{12:1}$ mit eingebautem ^{15}N -L-Serin von markiertem Kartoffel-Dextrose-Agar (Verbindung **17** $[M+H]^+$: m/z 541, $C_{28}H_{49}N_2O_8$).

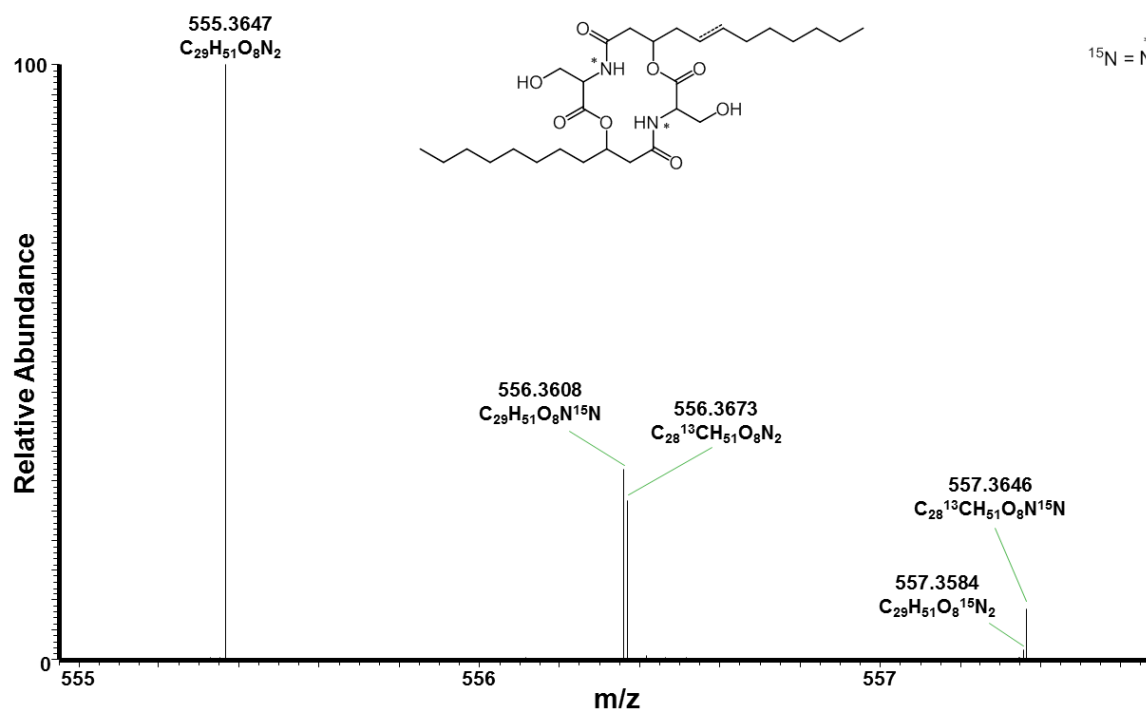


Abb. S276: HRMS-Spektrum von Serratamolide $C_{11}+C_{12:1}$ mit eingebautem ^{15}N -L-Serin von markiertem Kartoffel-Dextrose-Agar (Verbindung **18** $[M+H]^+$: m/z 555, $C_{29}H_{51}N_2O_8$).

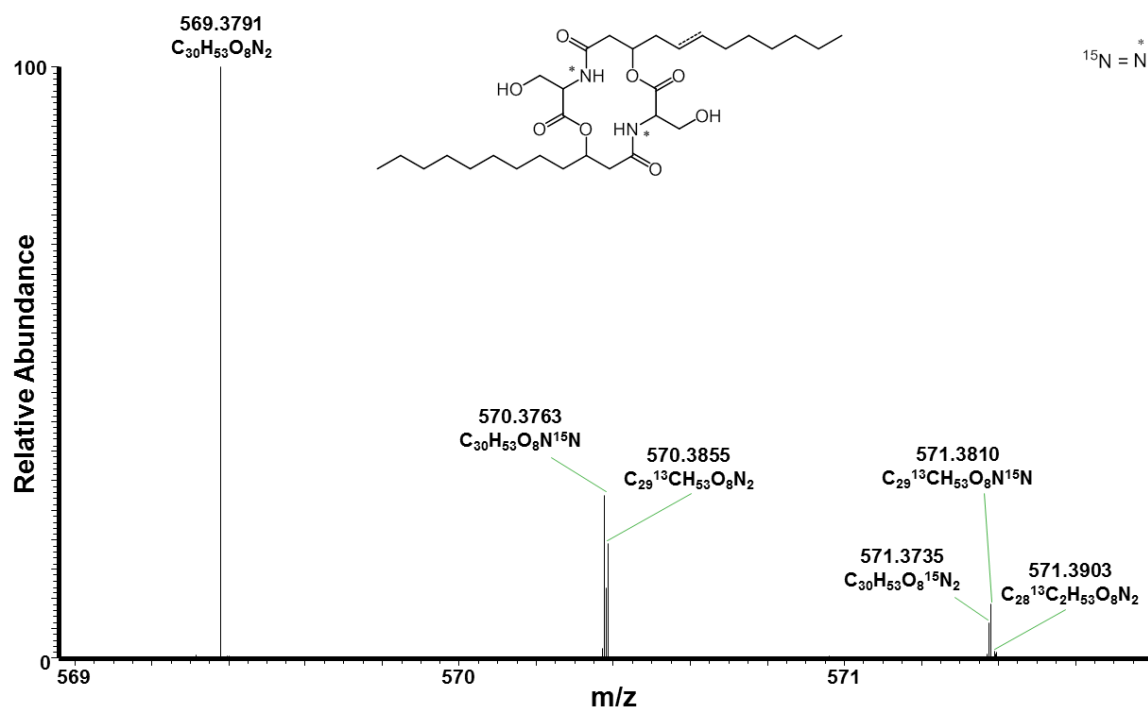


Abb. S277: HRMS-Spektrum von Serratamolide $C_{12}+C_{12:1}$ mit eingebautem ^{15}N -L-Serin von markiertem Kartoffel-Dextrose-Agar (Verbindung **19** $[M+H]^+$: m/z 569, $C_{30}H_{53}N_2O_8$).

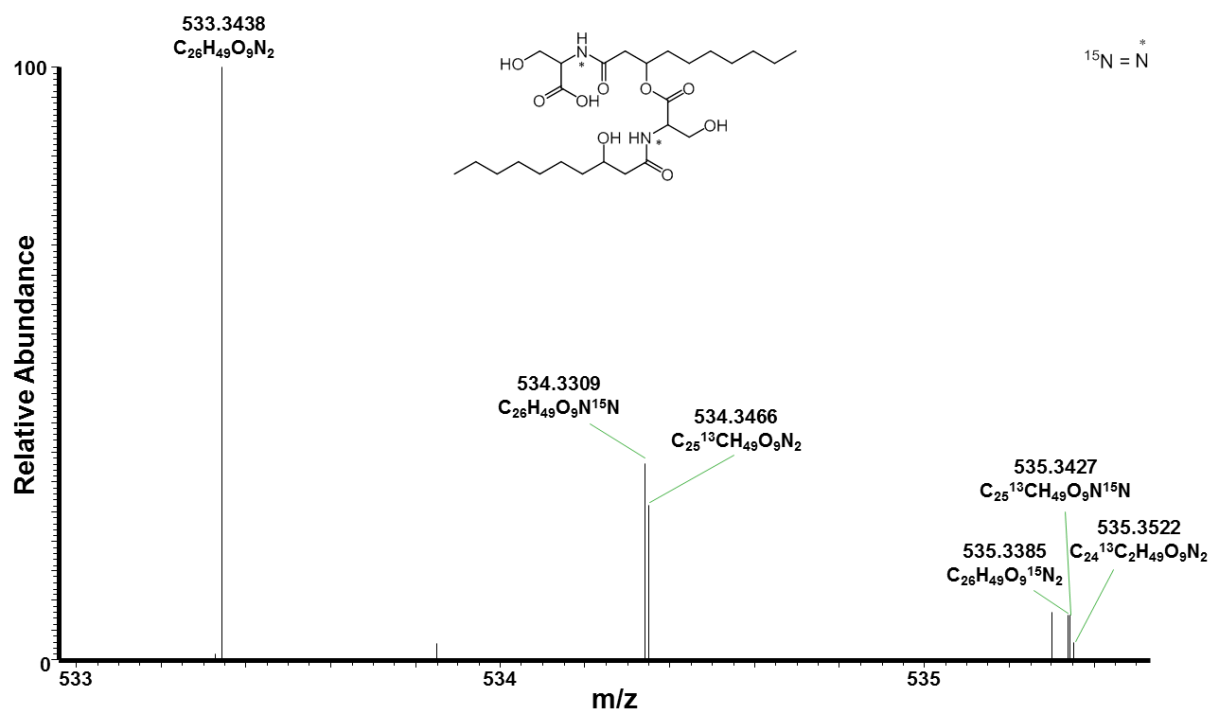


Abb. S278: HRMS-Spektrum von Serratamolide $C_{10}+C_{10}$ mit eingebautem ^{15}N -L-Serin von markiertem Kartoffel-Dextrose-Agar (Verbindung **20** $[M+H]^+$: m/z 533, $C_{26}H_{49}N_2O_9$).

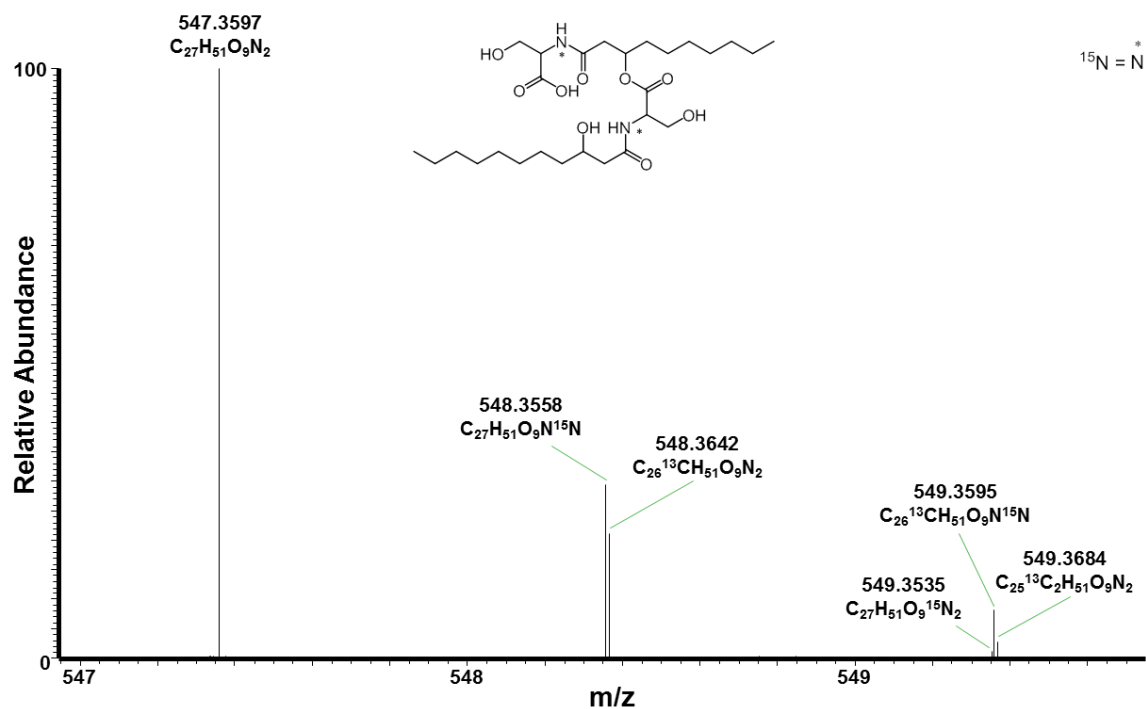


Abb. S279: HRMS-Spektrum von Serratamolide $C_{10}+C_{11}$ mit eingebautem ^{15}N -L-Serin von markiertem Kartoffel-Dextrose-Agar (Verbindung **21** $[M+H]^+$: m/z 547, $C_{27}H_{51}N_2O_9$).

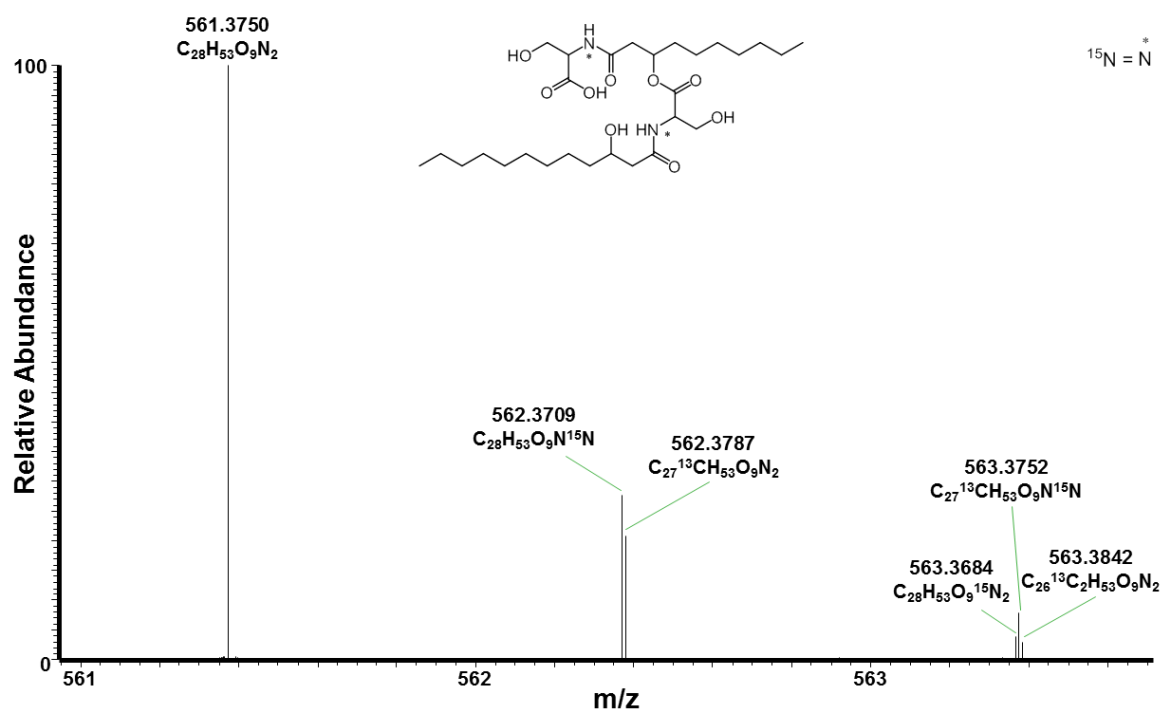


Abb. S280: HRMS-Spektrum von Serratamolide $C_{10}+C_{12}$ mit eingebautem ^{15}N -L-Serin von markiertem Kartoffel-Dextrose-Agar (Verbindung **22** $[M+H]^+$: m/z 561, $C_{28}H_{53}N_2O_9$).

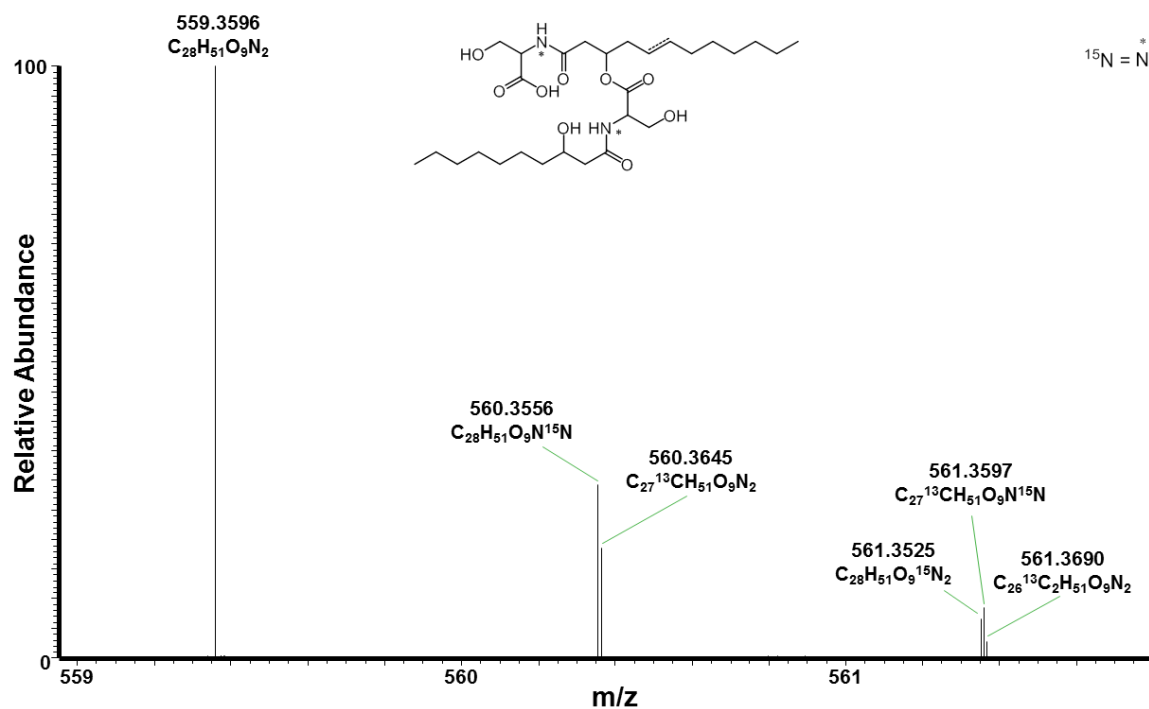


Abb. S281: HRMS-Spektrum von Serratamolide $C_{10}+C_{12:1}$ mit eingebautem ^{15}N -L-Serin von markiertem Kartoffel-Dextrose-Agar (Verbindung **23** $[M+H]^+$: m/z 559, $C_{28}H_{51}N_2O_9$).

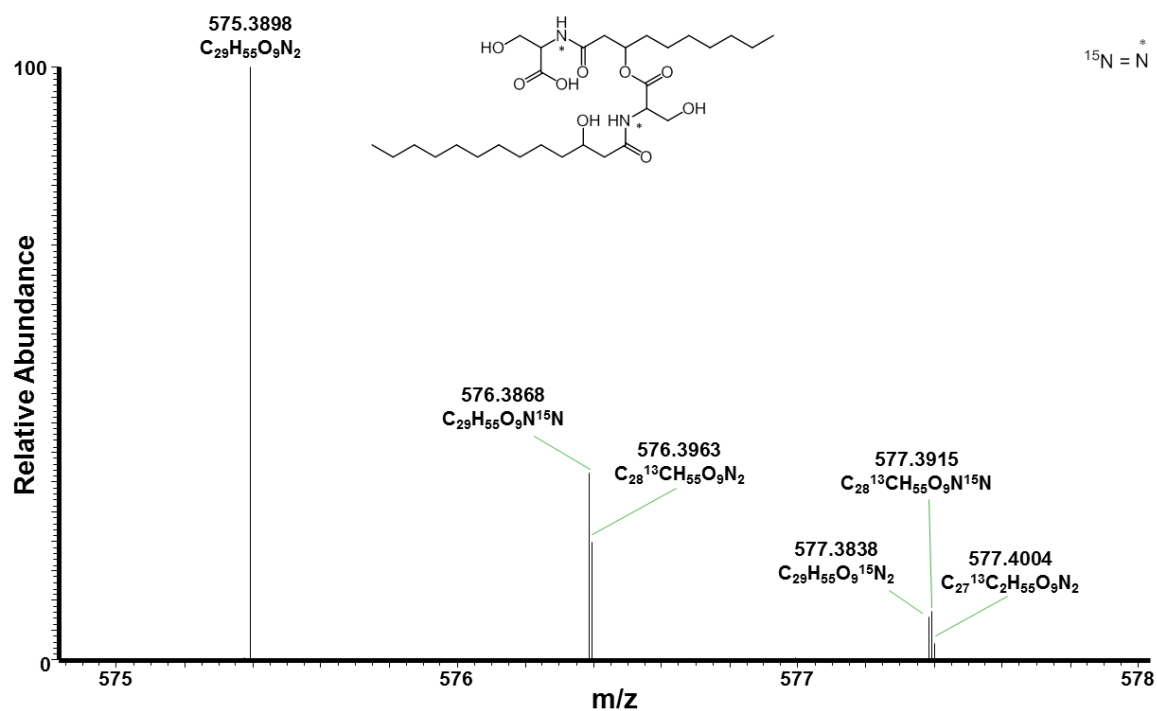


Abb. S282: HRMS-Spektrum von Serratamolide $C_{10}+C_{13}$ mit eingebautem ^{15}N -L-Serin von markiertem Kartoffel-Dextrose-Agar (Verbindung **25** $[M+H]^+$: m/z 575, $C_{29}H_{55}N_2O_9$).

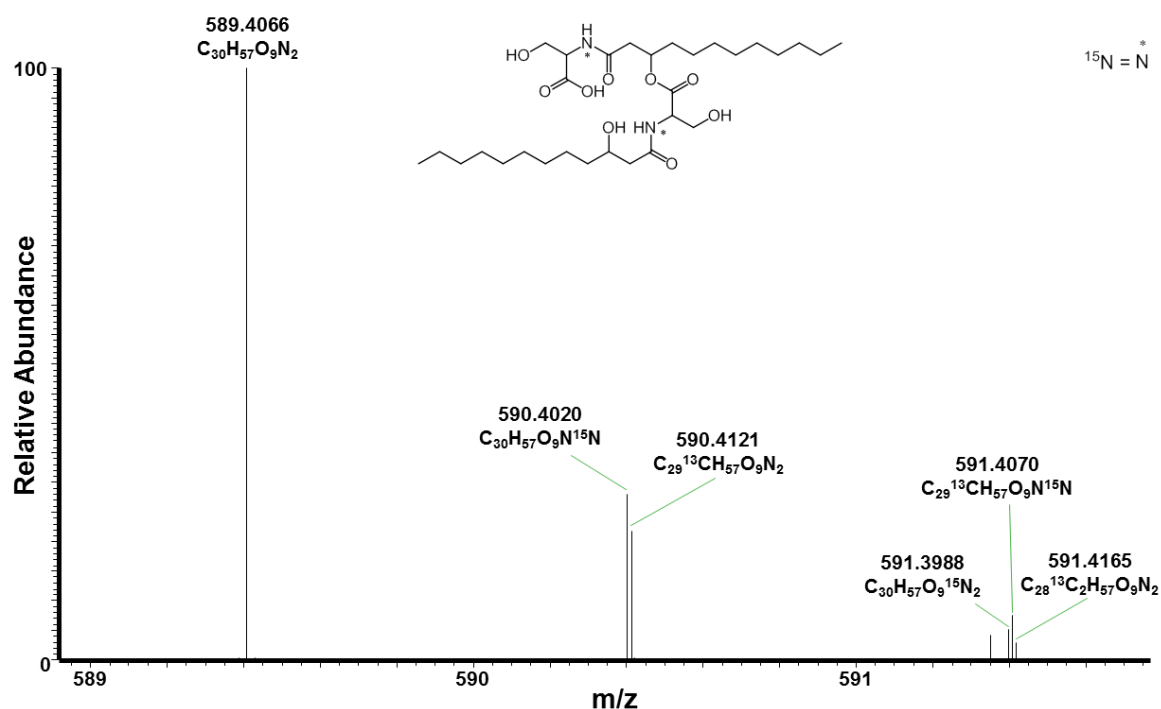


Abb. S283: HRMS-Spektrum von Serratamolide $C_{12}+C_{12}$ mit eingebautem ^{15}N -L-Serin von markiertem Kartoffel-Dextrose-Agar (Verbindung **26** $[\text{M}+\text{H}]^+$: m/z 589, $\text{C}_{30}\text{H}_{57}\text{N}_2\text{O}_9$).

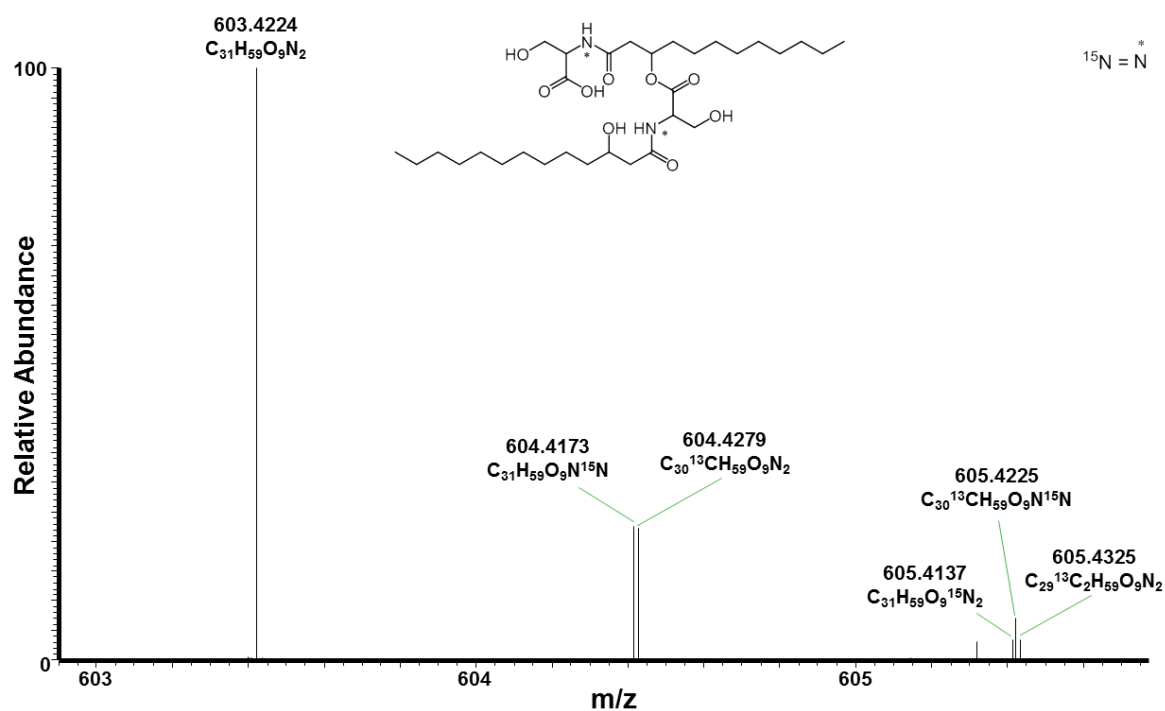


Abb. S284: HRMS-Spektrum von Serratamolide $C_{12}+$ mit eingebautem ^{15}N -L-Serin von markiertem Kartoffel-Dextrose-Agar (Verbindung **27** $[\text{M}+\text{H}]^+$: m/z 603, $\text{C}_{31}\text{H}_{59}\text{N}_2\text{O}_9$).

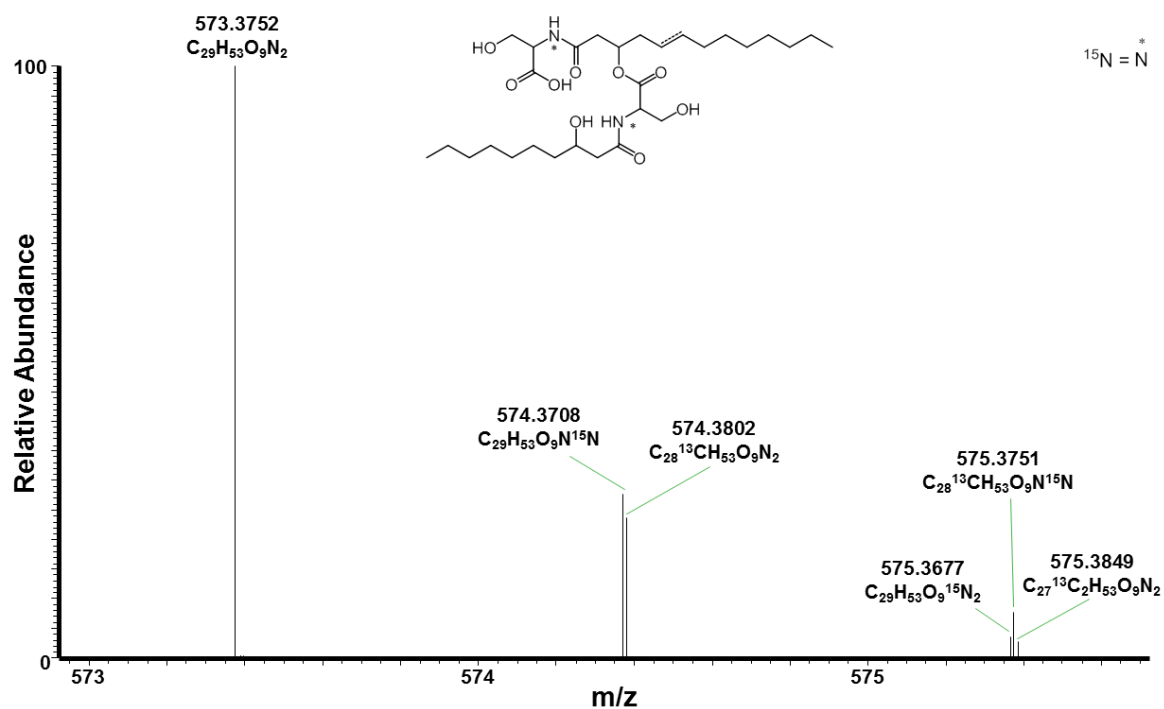


Abb. S285: HRMS-Spektrum von Serratamolide $C_{10}+C_{13:1}$ mit eingebautem ^{15}N -L-Serin von markiertem Kartoffel-Dextrose-Agar (Verbindung **28** $[M+H]^+$: m/z 573, $C_{29}H_{53}N_2O_9$).

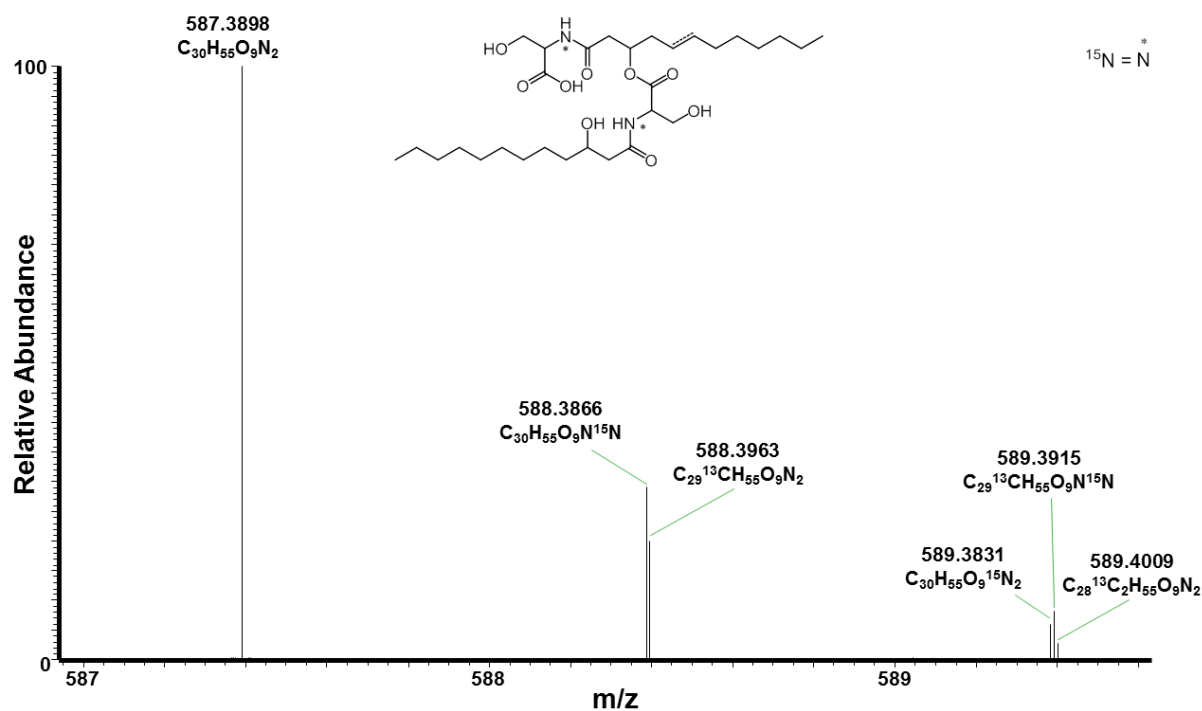


Abb. S286: HRMS-Spektrum von Serratamolide $C_{12}+C_{12:1}$ mit eingebautem ^{15}N -L-Serin von markiertem Kartoffel-Dextrose-Agar (Verbindung **29** $[M+H]^+$: m/z 587, $C_{30}H_{55}N_2O_9$).

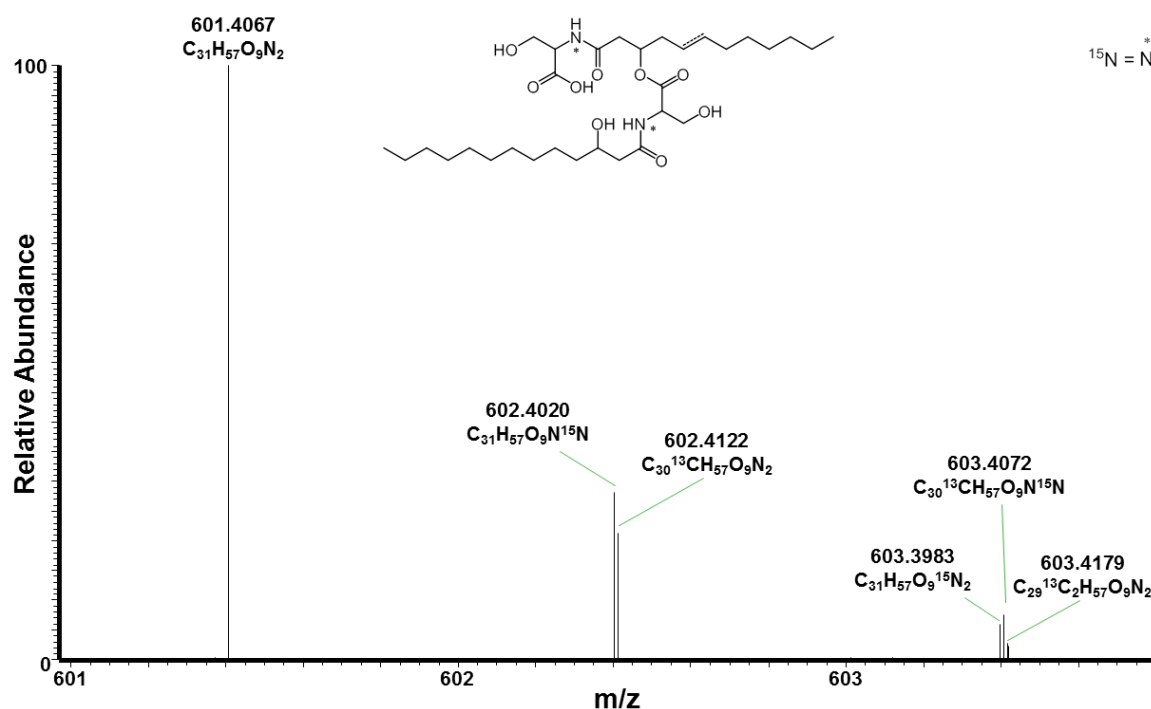


Abb. S287: HRMS-Spektrum von Serratamolid $C_{13}+C_{12:1}$ mit eingebautem ^{15}N -L-Serin von markiertem Kartoffel-Dextrose-Agar (Verbindung **30** $[M+H]^+$: m/z 601, $C_{31}H_{57}N_2O_9$).

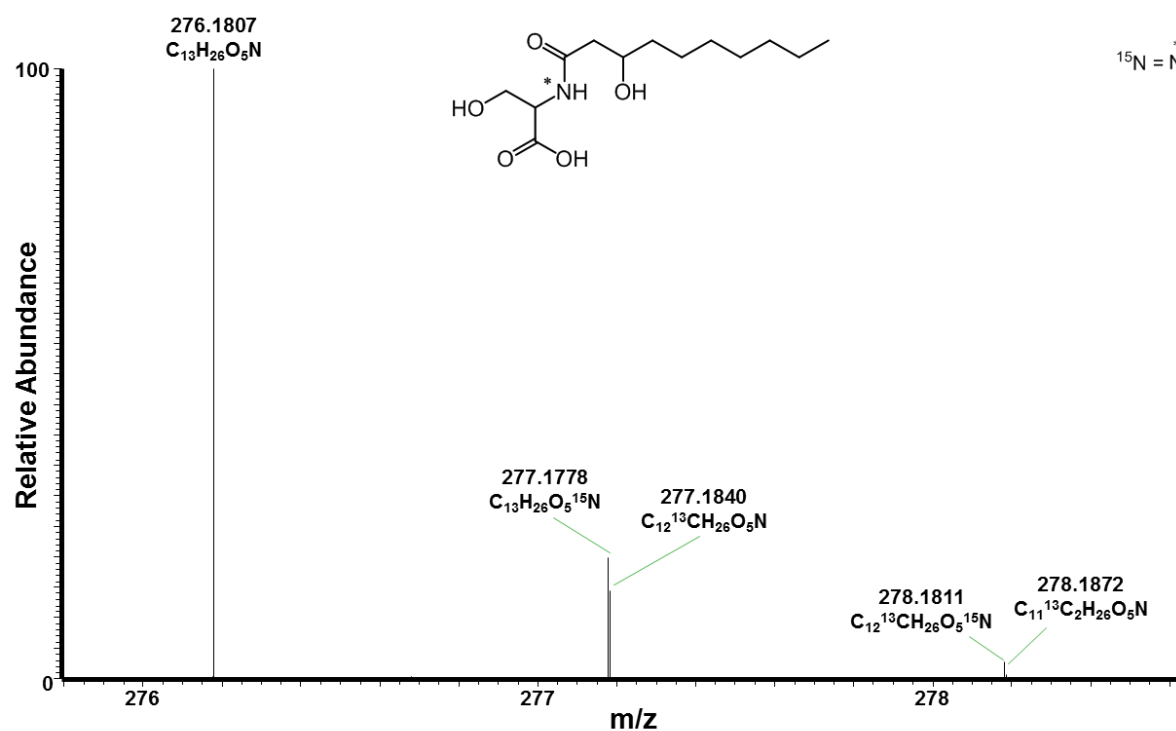


Abb. S288: HRMS-Spektrum von Serratamsäure mit eingebautem ^{15}N -L-Serin von markiertem Kartoffel-Dextrose-Agar (N-(D-3-Hydroxydecanoyl)-L-Serin, Verbindung **31** $[M+H]^+$: m/z 276, $C_{13}H_{26}NO_5$).

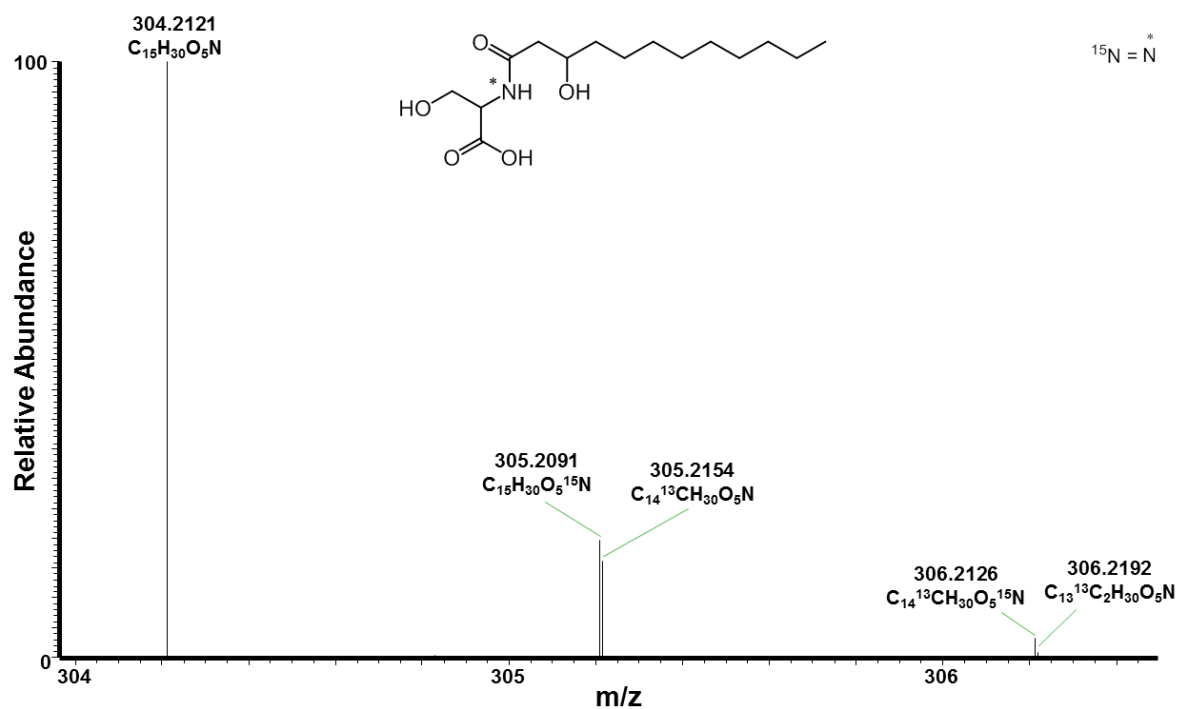


Abb. S289: HRMS-Spektrum von Serratamsäure-Derivat mit eingebautem ^{15}N -L-Serin von markiertem Kartoffel-Dextrose-Agar (Verbindung **32** $[M+H]^+$: m/z 304, $C_{15}H_{30}NO_5$).

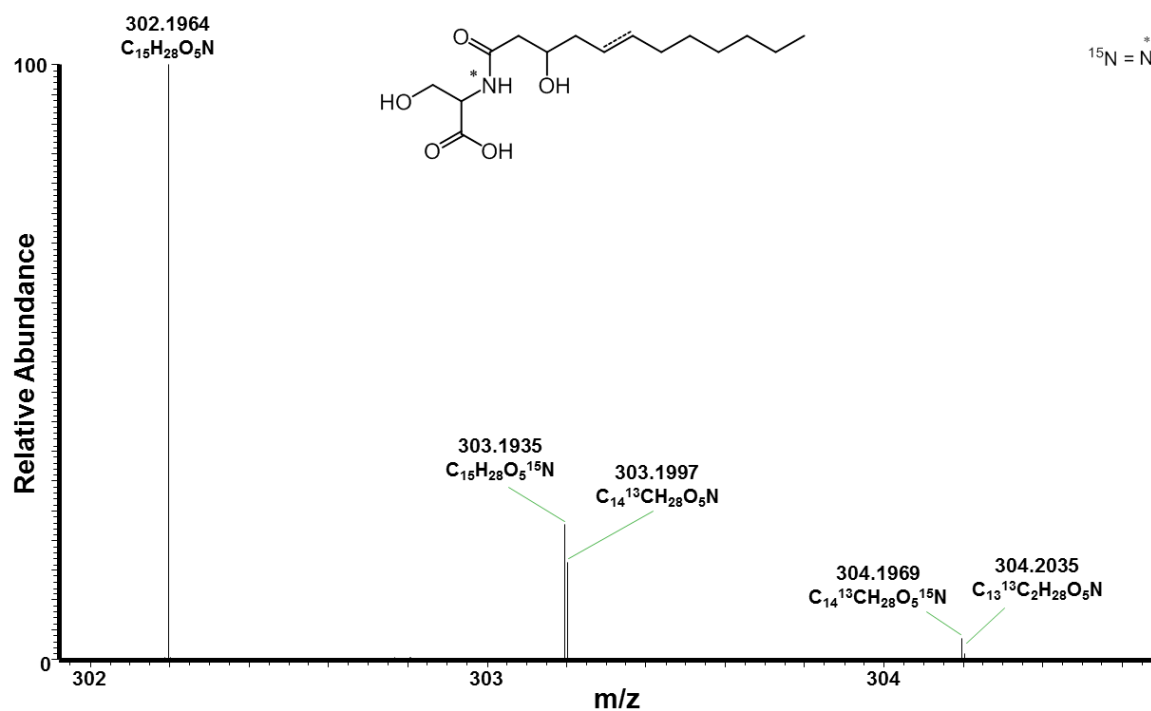


Abb. S290: HRMS-Spektrum von Serratamsäure-Derivat mit Doppelbindung mit eingebautem ^{15}N -L-Serin von markiertem Kartoffel-Dextrose-Agar (Verbindung **33** $[M+H]^+$: m/z 302, $C_{15}H_{28}NO_5$).

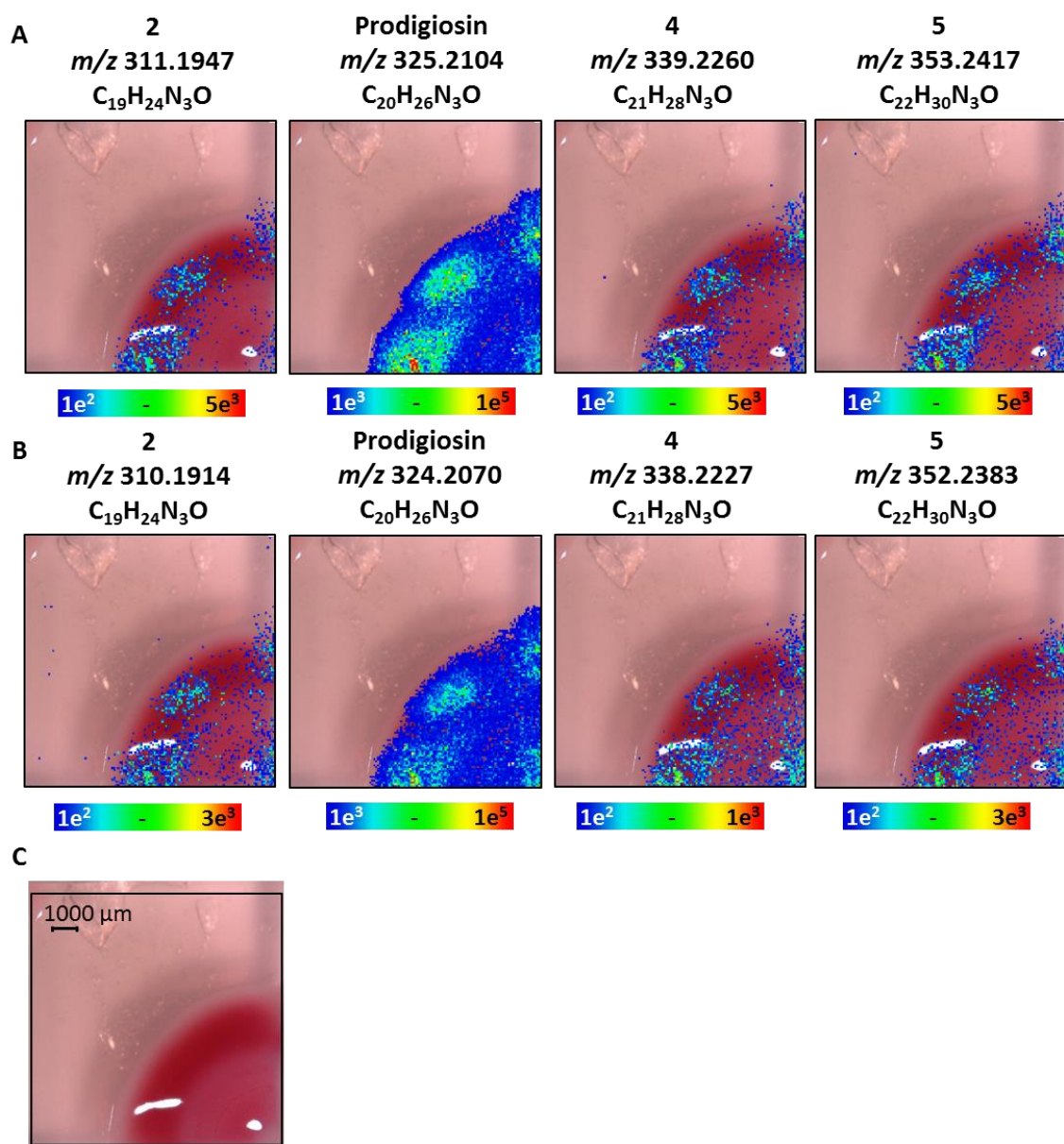


Abb. S291: MALDI-imaging-HRMS von *S. marcescens* MSRBB2 inkubiert auf Kartoffel-Dextrose-Agar mit zugegebenem $[1-^{13}C]$ -L-Prolin (1 mg/mL). Optisches Bild mit eingezeichnetem Messbereich (C) und Visualisierung der örtlichen Verteilung von markierten (A) und unmarkierten (B) Prodigininen ($[M+H]^+ \pm 2$ ppm).

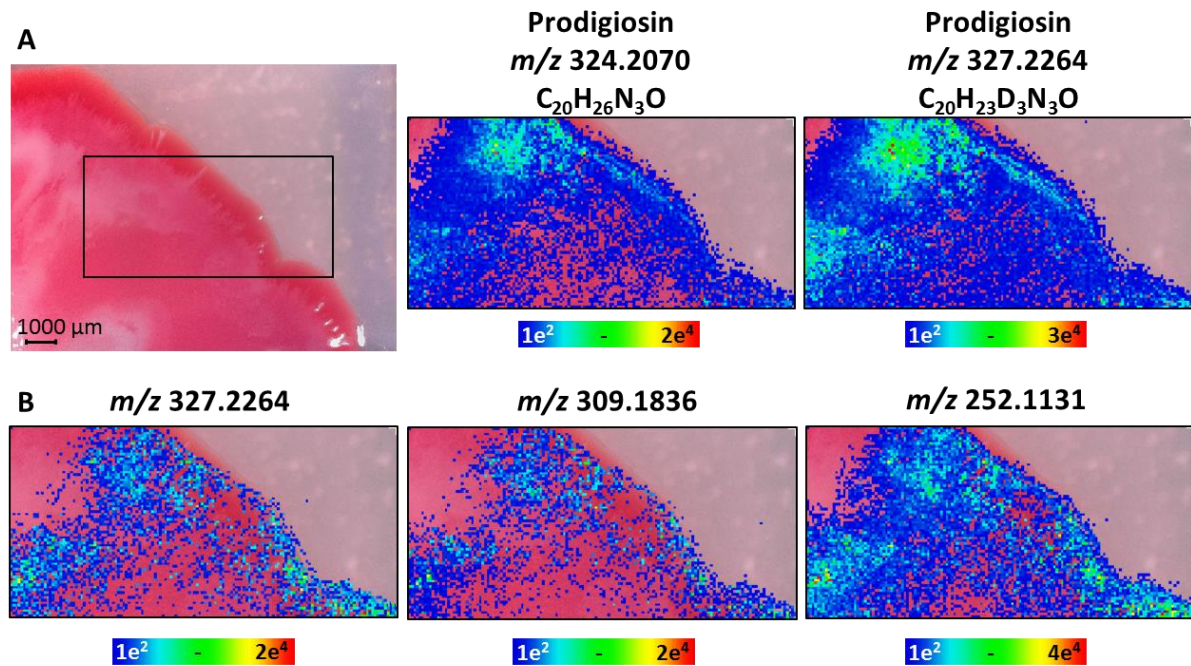


Abb. S292: MALDI-imaging-HRMS von *S. marcescens* MSRBB2 inkubiert auf Nähragar mit zugegebenem [Methyl- D_3]-L-Methionin (1 mg/mL). Optisches Bild mit eingezeichnetem Messbereich und Visualisierung der örtlichen Verteilung von markiertem und unmarkiertem Prodigiosin ($[M+H]^+ \pm 2$ ppm, (A)). Charakteristische Fragmente von MALDI-imaging-HRMS² von markiertem Prodigiosin $C_{20}H_{23}D_3N_3O$ ($[M+H]^+ \pm 3$ ppm, (B)).

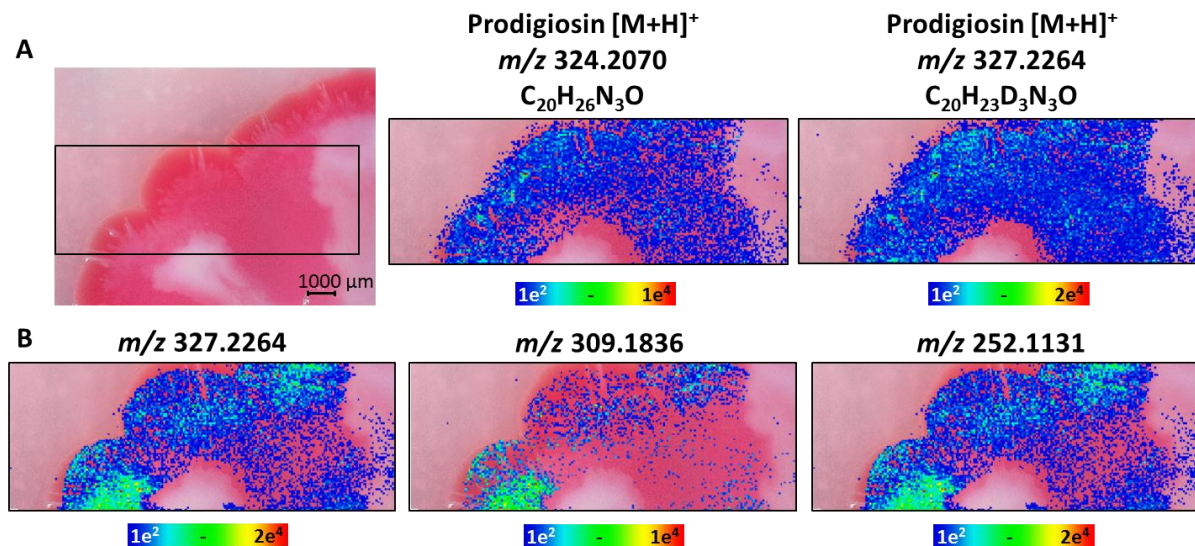


Abb. S293: MALDI-imaging-HRMS von *S. marcescens* MSRBB2 inkubiert auf Nähragar mit zugegebenem [Methyl- D_3]-L-Methionin (1 mg/mL). Optisches Bild mit eingezeichnetem Messbereich und Visualisierung der örtlichen Verteilung von markiertem und unmarkiertem Prodigiosin ($[M+H]^+ \pm 2$ ppm, (A)). Charakteristische Fragmente von MALDI-imaging-HRMS² von markiertem Prodigiosin $C_{20}H_{23}D_3N_3O$ ($[M+H]^+ \pm 3$ ppm, (B)).

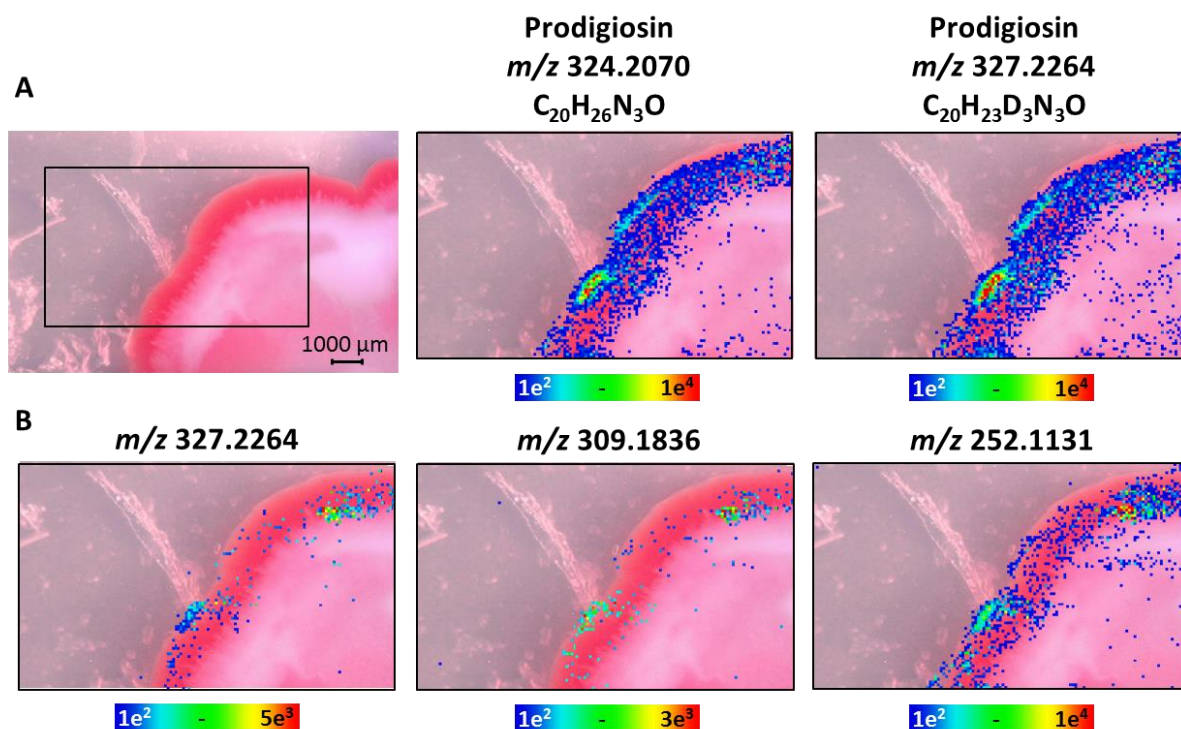
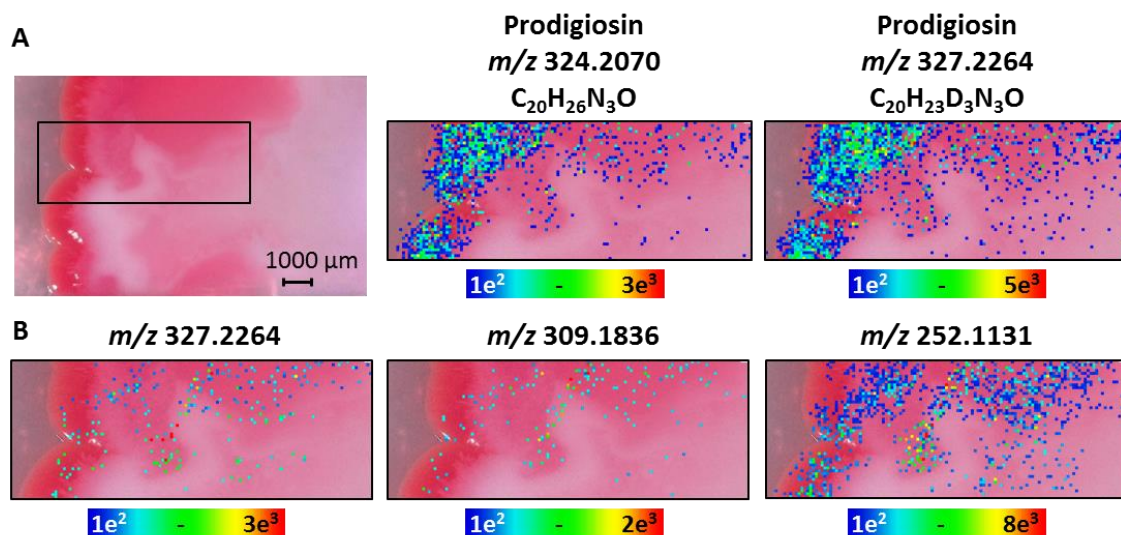
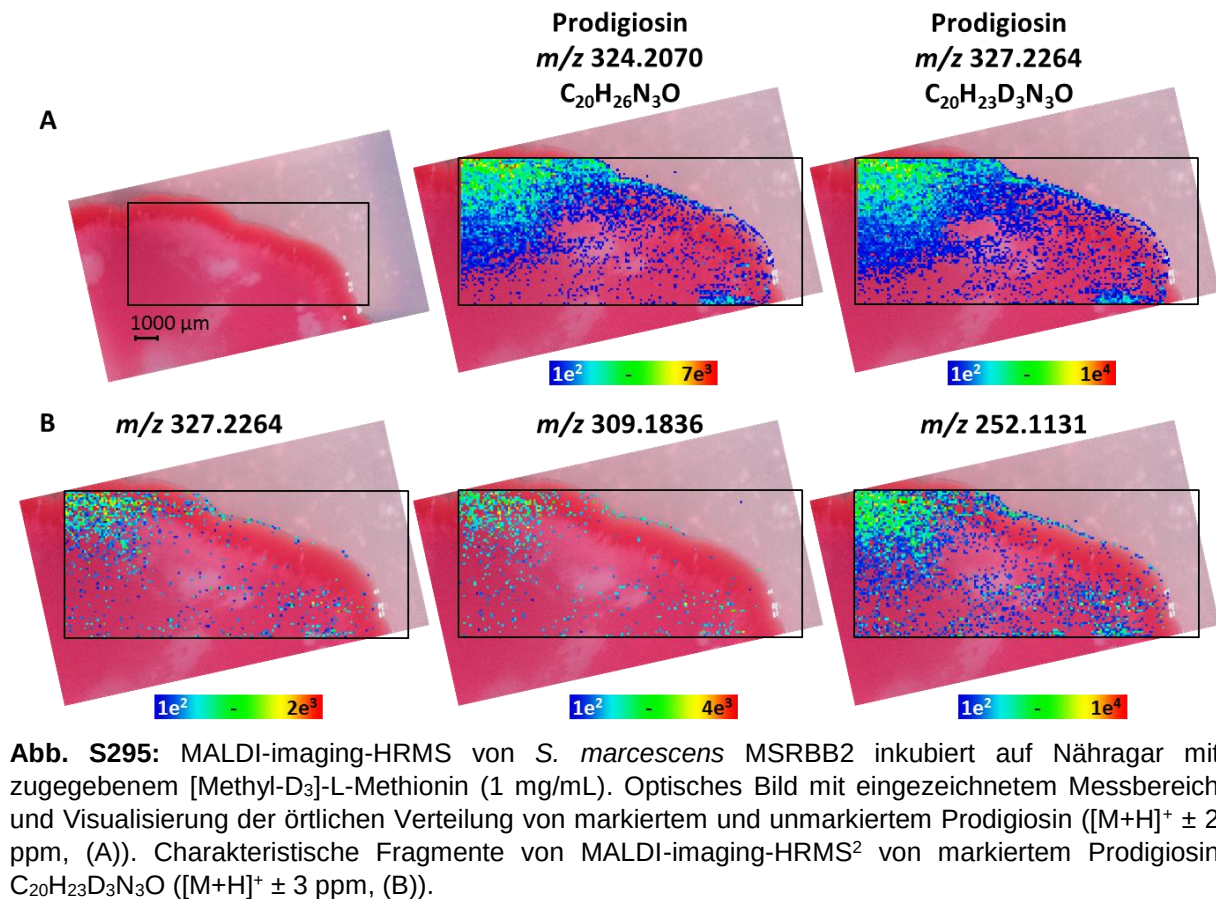


Abb. S294: MALDI-imaging-HRMS von *S. marcescens* MSRBB2 inkubiert auf Nähragar mit zugegebenem [Methyl- D_3]-L-Methionin (1 mg/mL). Optisches Bild mit eingezeichnetem Messbereich und Visualisierung der örtlichen Verteilung von markiertem und unmarkiertem Prodigiosin ($[\text{M}+\text{H}]^+ \pm 2$ ppm, (A)). Charakteristische Fragmente von MALDI-imaging-HRMS² von markiertem Prodigiosin $\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{D}_3\text{N}_3\text{O}$ ($[\text{M}+\text{H}]^+ \pm 3$ ppm, (B)).



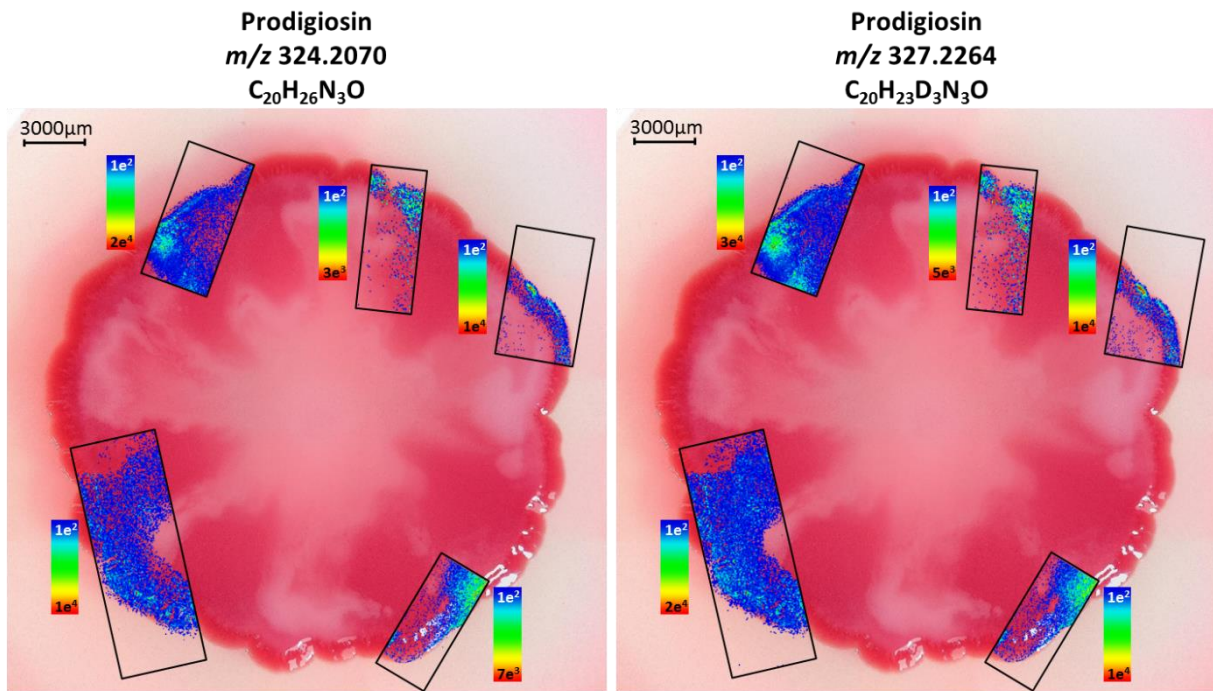


Abb. S297: MALDI-imaging-HRMS von *S. marcescens* MSRBB2 inkubiert auf Nähragar mit zugegebenem [Methyl-D₃]-L-Methionin (1 mg/mL). Optische Bilder mit eingezeichnetem Messbereich und Visualisierung der örtlichen Verteilung von markiertem und unmarkiertem Prodigiosin ($[M+H]^+ \pm 2$ ppm)

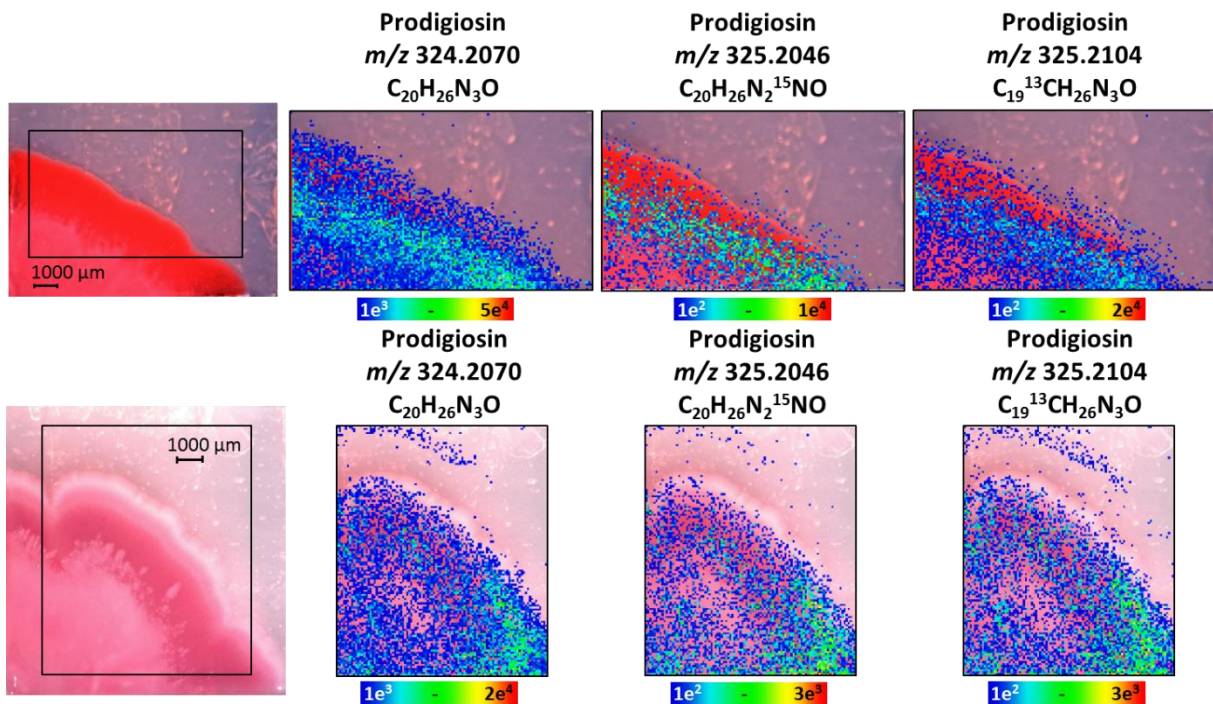


Abb. S298: MALDI-imaging-HRMS von *S. marcescens* MSRBB2 inkubiert auf Nähragar mit zugegebenem ¹⁵NH₄Cl (1 mg/mL). Optische Bilder mit eingezeichnetem Messbereich und Visualisierung der örtlichen Verteilung von markiertem und unmarkiertem Prodigiosin sowie der natürlichen ¹³C monoisotopischen Masse ($[M+H]^+ \pm 2$ ppm).

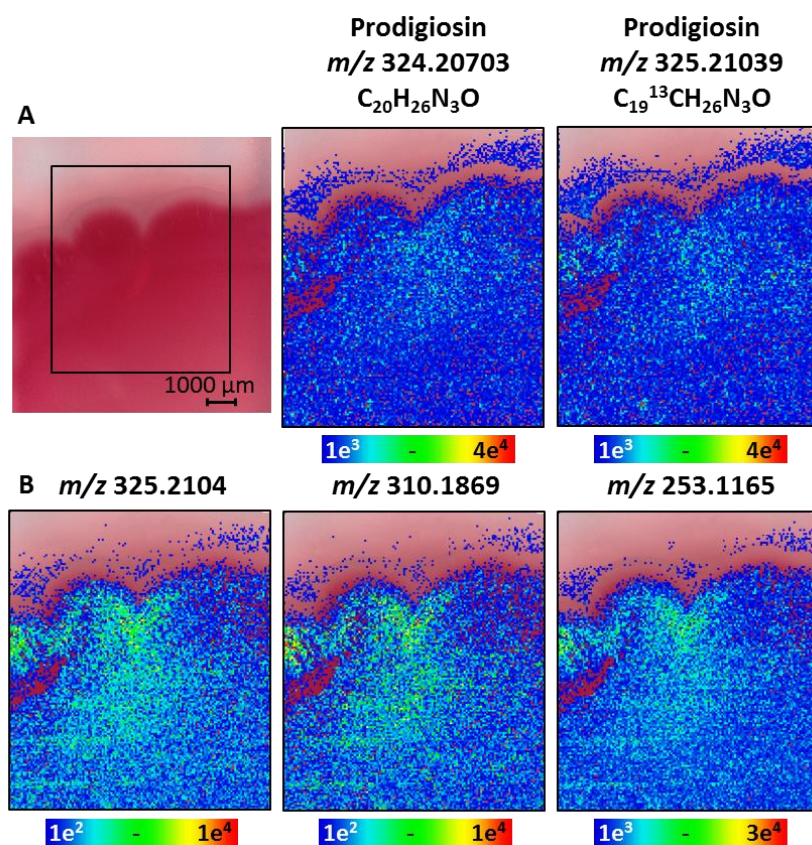


Abb. S299: MALDI-imaging-HRMS von *S. marcescens* MSRBB2 inkubiert auf Nähragar mit zugegebenem $[1\text{-}^{13}\text{C}]$ -L-Prolin (1 mg/mL). Optisches Bild mit eingezeichnetem Messbereich und Visualisierung der örtlichen Verteilung von markiertem und unmarkiertem Prodigiosin ($[\text{M}+\text{H}]^+ \pm 2$ ppm, (A)). Charakteristische Fragmente von MALDI-imaging-HRMS² von markiertem Prodigiosin $\text{C}_{19}^{13}\text{CH}_{23}\text{N}_3\text{O}$ ($[\text{M}+\text{H}]^+ \pm 3$ ppm, (B)).

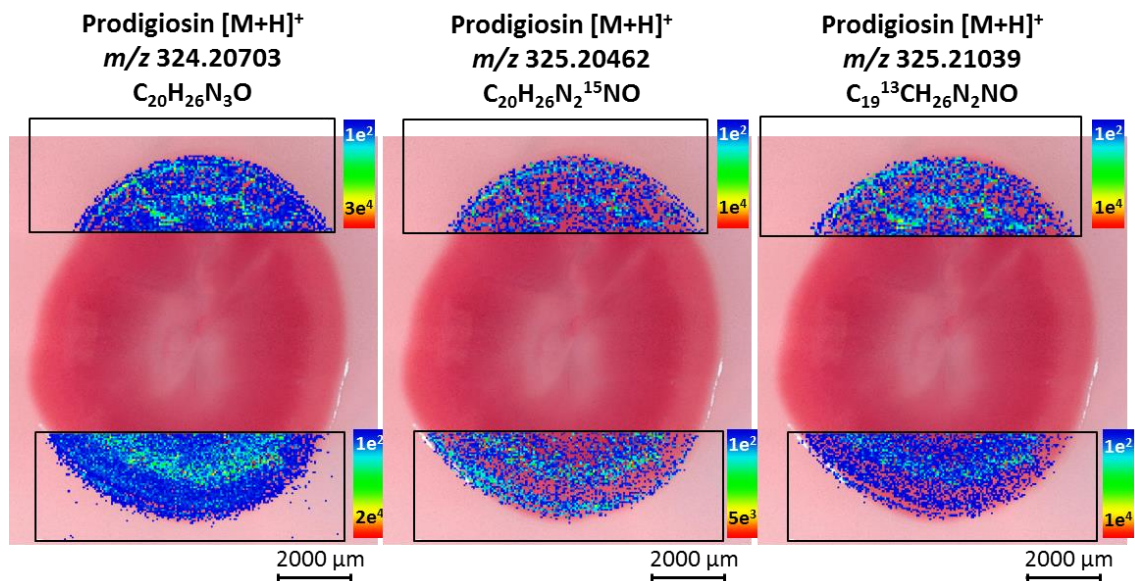


Abb. S300: MALDI-imaging-HRMS von *S. marcescens* MSRBB2 inkubiert auf Nähragar mit zugegebenem $[^{15}\text{N}]$ -L-Serin (1 mg/mL). Optisches Bild mit eingezeichnetem Messbereich und Visualisierung der örtlichen Verteilung von markiertem und unmarkiertem Prodigiosin sowie der natürlichen ^{13}C monoisotopischen Masse ($[M+H]^+ \pm 2$ ppm).

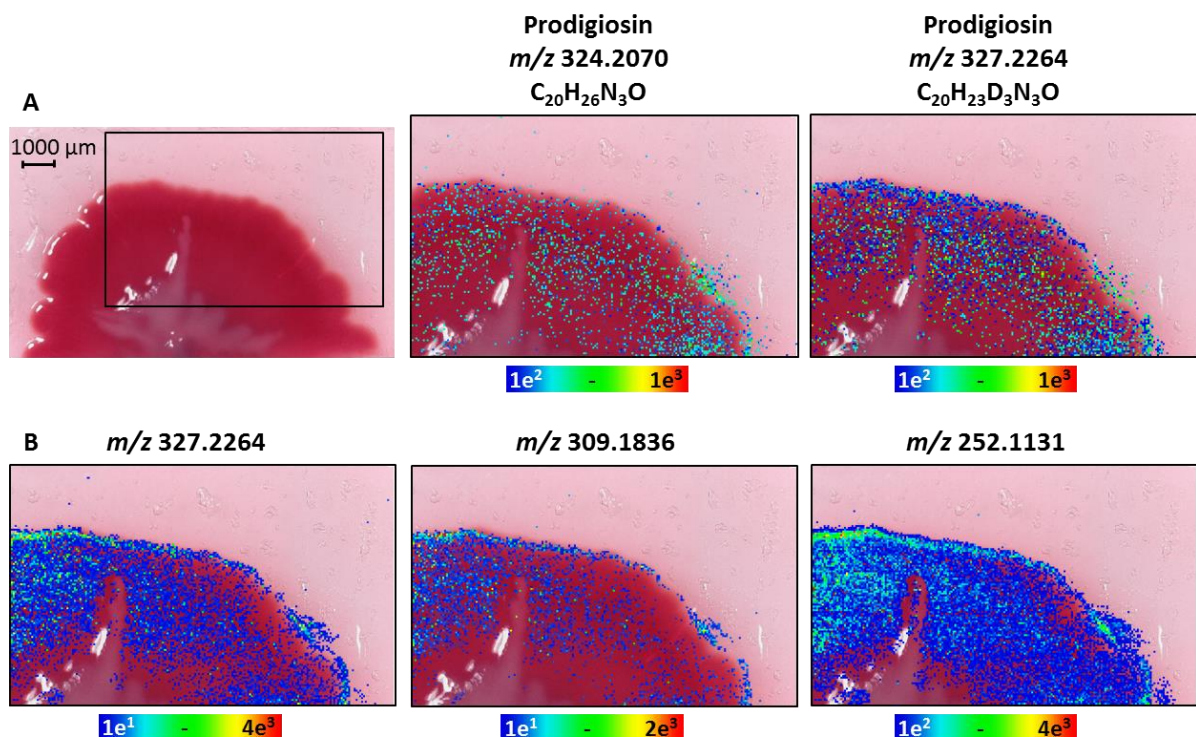


Abb. S301: MALDI-imaging-HRMS von *S. marcescens* MSRBB2 inkubiert auf Nähragar mit zugegebenem $[\text{Methyl-}^{13}\text{C}_3]$ -L-Methionin (0.5 mg/mL). Optisches Bild mit eingezeichnetem Messbereich und Visualisierung der örtlichen Verteilung von markiertem und unmarkiertem Prodigiosin ($[M+H]^+ \pm 2$ ppm, (A)). Charakteristische Fragmente von MALDI-imaging-HRMS² von markiertem Prodigiosin $\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{D}_3\text{N}_3\text{O}$ ($[M+H]^+ \pm 3$ ppm, (B)).

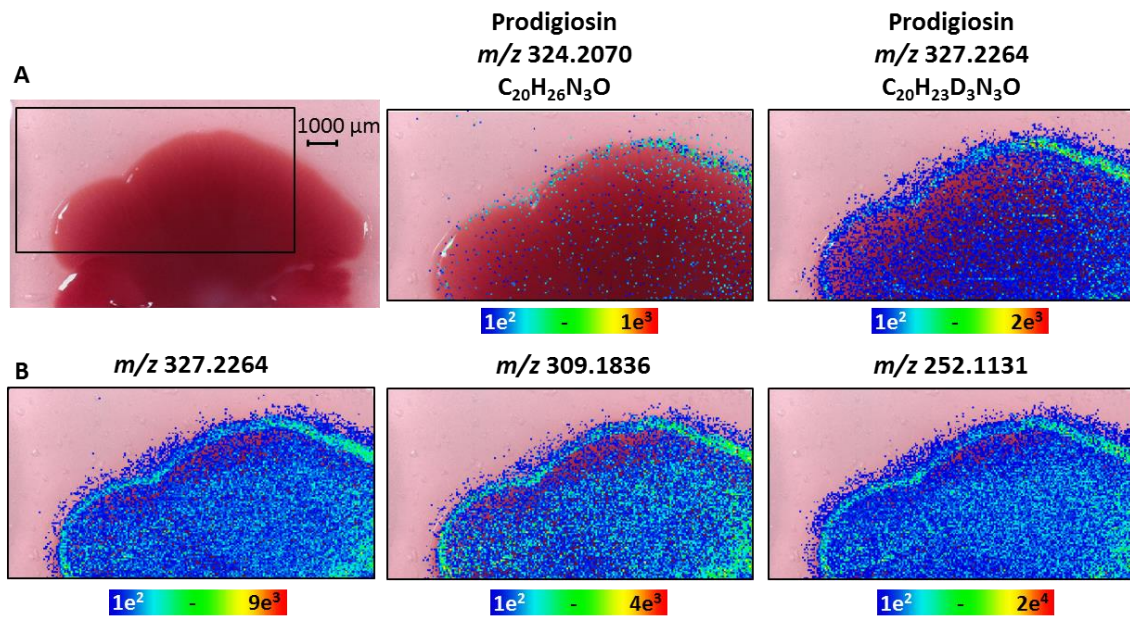


Abb. S302: MALDI-imaging-HRMS von *S. marcescens* MSRBB2 inkubiert auf Nähragar mit zugegebenem [Methyl- D_3]-L-Methionin (0.5 mg/mL). Optisches Bild mit eingezeichnetem Messbereich und Visualisierung der örtlichen Verteilung von markiertem und unmarkiertem Prodigiosin ($[M+H]^+ \pm 2$ ppm, (A)). Charakteristische Fragmente von MALDI-imaging-HRMS² von markiertem Prodigiosin $C_{20}H_{23}D_3N_3O$ ($[M+H]^+ \pm 3$ ppm, (B)).

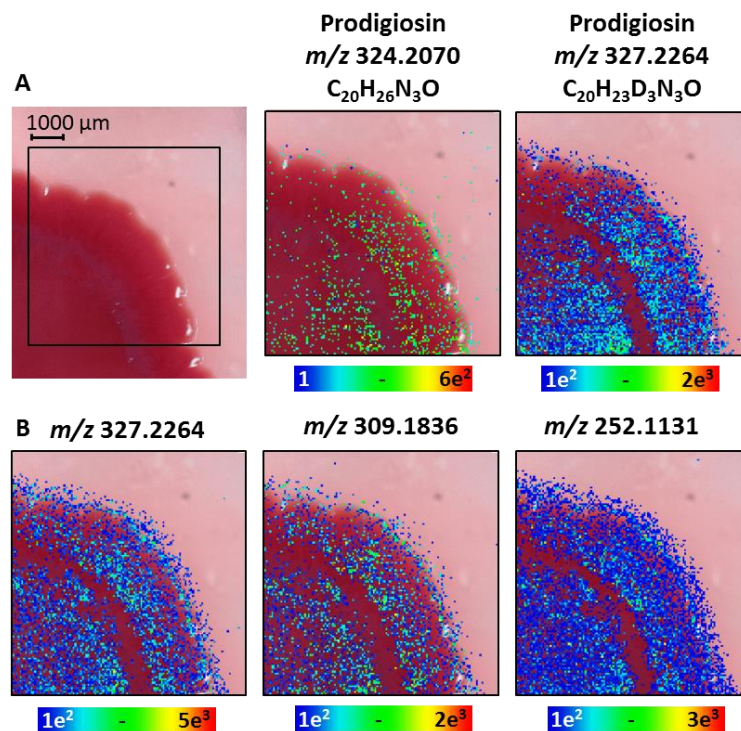


Abb. S303: MALDI-imaging-HRMS von *S. marcescens* MSRBB2 inkubiert auf Nähragar mit zugegebenem [Methyl- D_3]-L-Methionin (2 mg/mL). Optisches Bild mit eingezeichnetem Messbereich und Visualisierung der örtlichen Verteilung von markiertem und unmarkiertem Prodigiosin ($[M+H]^+ \pm 2$ ppm, (A)). Charakteristische Fragmente von MALDI-imaging-HRMS² von markiertem Prodigiosin $C_{20}H_{23}D_3N_3O$ ($[M+H]^+ \pm 3$ ppm, (B)).

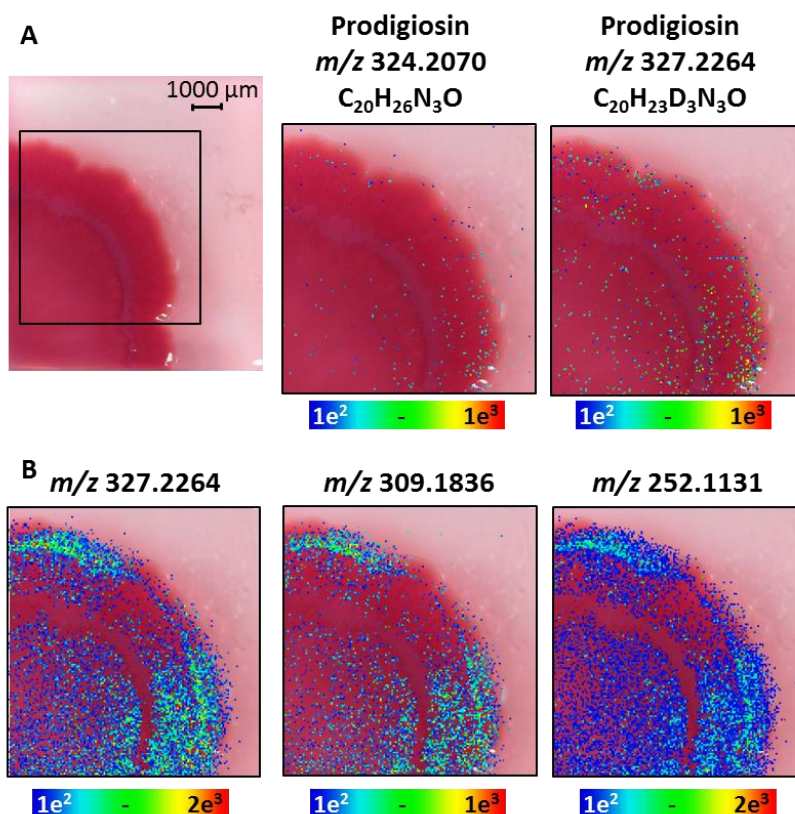


Abb. S304: MALDI-imaging-HRMS von *S. marcescens* MSRBB2 inkubiert auf Nähragar mit zugegebenem $[\text{Methyl-D}_3]\text{-L-Methionin}$ (2 mg/mL). Optisches Bild mit eingezeichnetem Messbereich und Visualisierung der örtlichen Verteilung von markiertem und unmarkiertem Prodigiosin ($[\text{M}+\text{H}]^+ \pm 2$ ppm, (A)). Charakteristische Fragmente von MALDI-imaging-HRMS² von markiertem Prodigiosin $\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{D}_3\text{N}_3\text{O}$ ($[\text{M}+\text{H}]^+ \pm 3$ ppm, (B)).

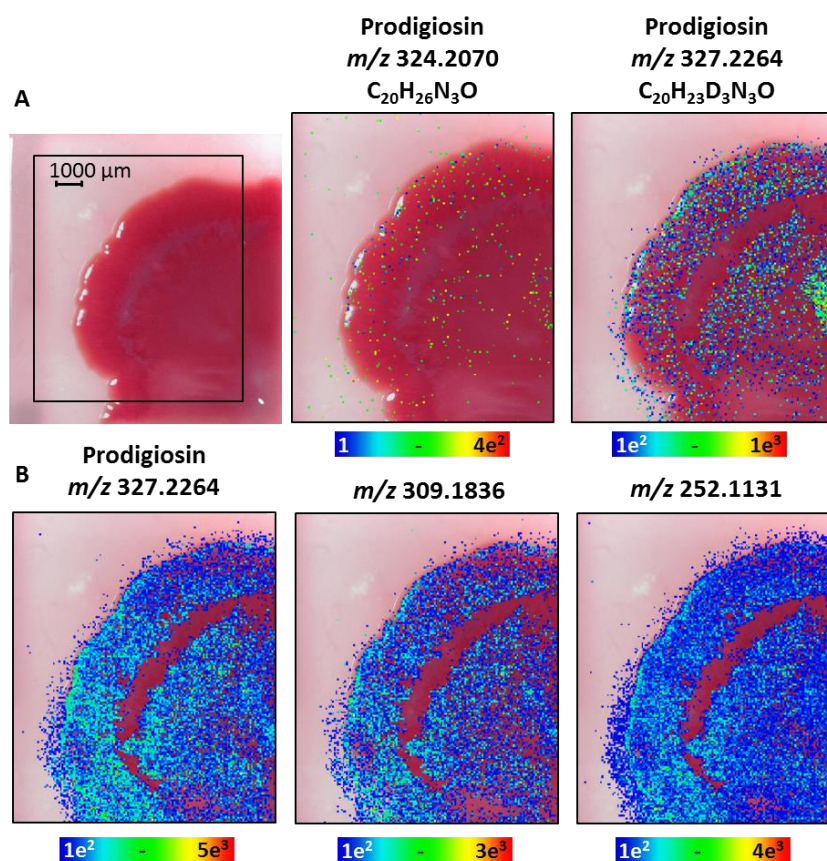


Abb. S305: MALDI-imaging-HRMS von *S. marcescens* MSRBB2 inkubiert auf Nähragar mit zugegebenem [Methyl- D_3]-L-Methionin (2 mg/mL). Optische Bilder mit eingezeichnetem Messbereich und Visualisierung der örtlichen Verteilung von markiertem und unmarkiertem Prodigiosin ($[\text{M}+\text{H}]^+ \pm 2$ ppm, (A)). Charakteristische Fragmente von MALDI-imaging-HRMS² von markiertem Prodigiosin $\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{D}_3\text{N}_3\text{O}$ ($[\text{M}+\text{H}]^+ \pm 3$ ppm, (B)).

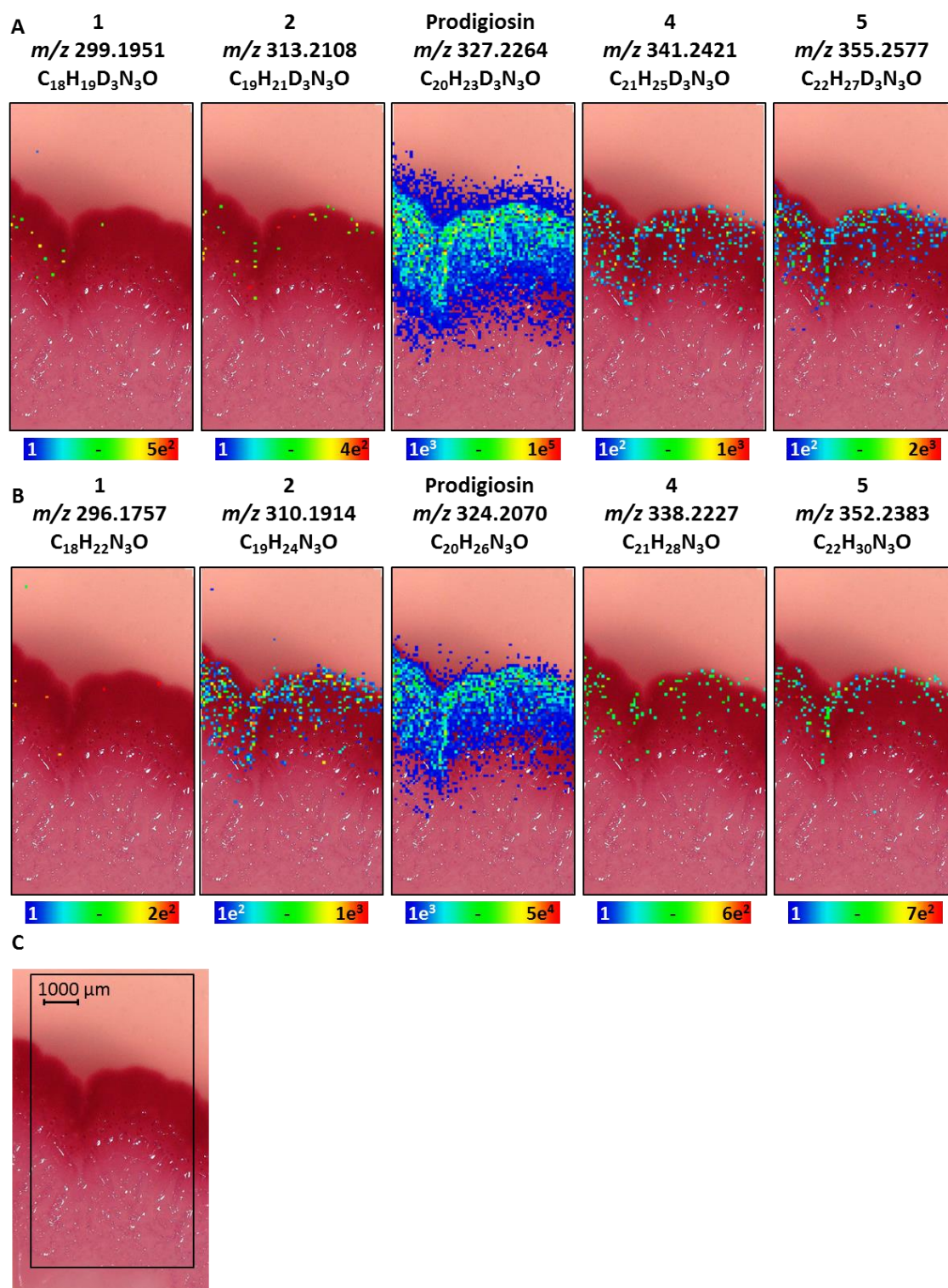


Abb. S306: MALDI-imaging-HRMS von *S. marcescens* MSRBB2 inkubiert auf Kartoffel-Dextrose-Agar mit zugegebenem [Methyl-D₃]-L-Methionin (1 mg/mL). Optisches Bild mit eingezeichnetem Messbereich (C) und Visualisierung der örtlichen Verteilung von markierten (A) und unmarkierten (B) Prodigininen ($[M+H]^+ \pm 2$ ppm).

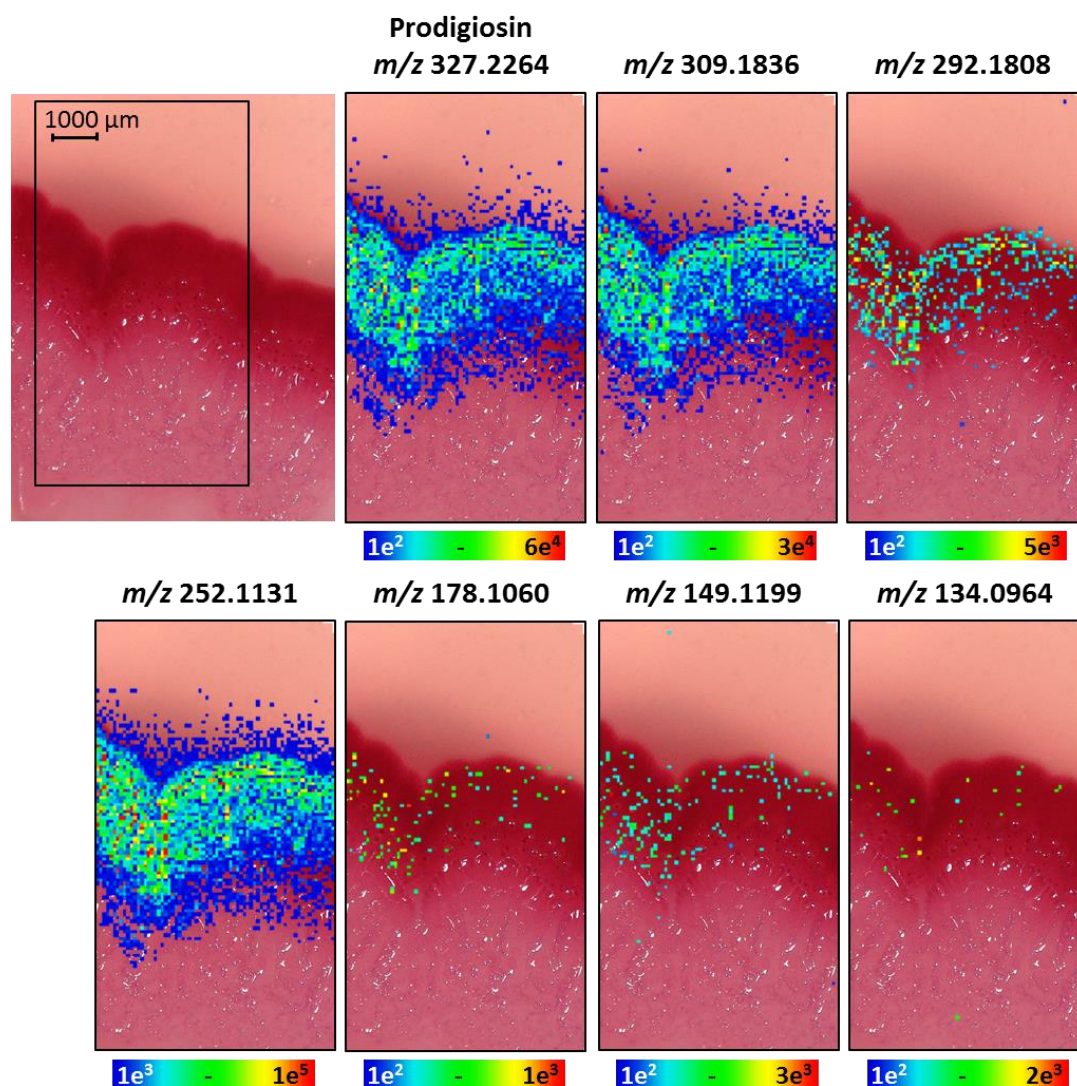


Abb. S307: MALDI-imaging-HRMS² von markiertem Prodigiosin $\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{D}_3\text{N}_3\text{O}$ ($[\text{M}+\text{H}]^+ \pm 3 \text{ ppm}$), produziert von *S. marcescens* MSRBB2 inkubiert auf Kartoffel-Dextrose-Agar mit zugegebenem [Methyl-D₃]-L-Methionin (1 mg/mL). Optische Bilder mit eingezeichnetem Messbereich und Visualisierung der örtlichen Verteilung der charakteristischen Fragmente.

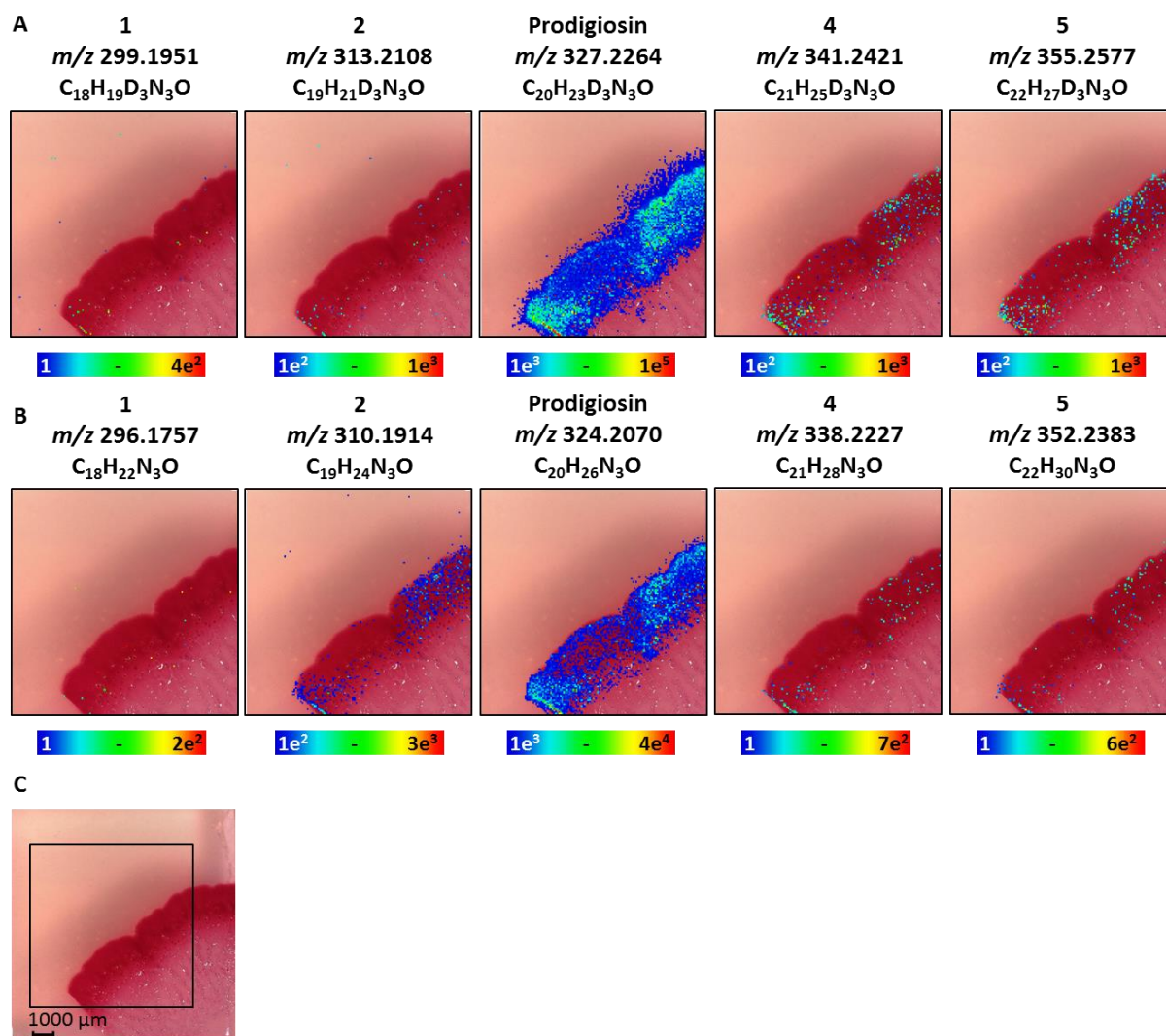


Abb. S308: MALDI-imaging-HRMS von *S. marcescens* MSRBB2 inkubiert auf Kartoffel-Dextrose-Agar mit zugegebenem [Methyl-D₃]-L-Methionin (1 mg/mL). Optisches Bild mit eingezeichnetem Messbereich (C) und Visualisierung der örtlichen Verteilung von markierten (A) und unmarkierten (B) Prodigininen ($[M+H]^+ \pm 2$ ppm).

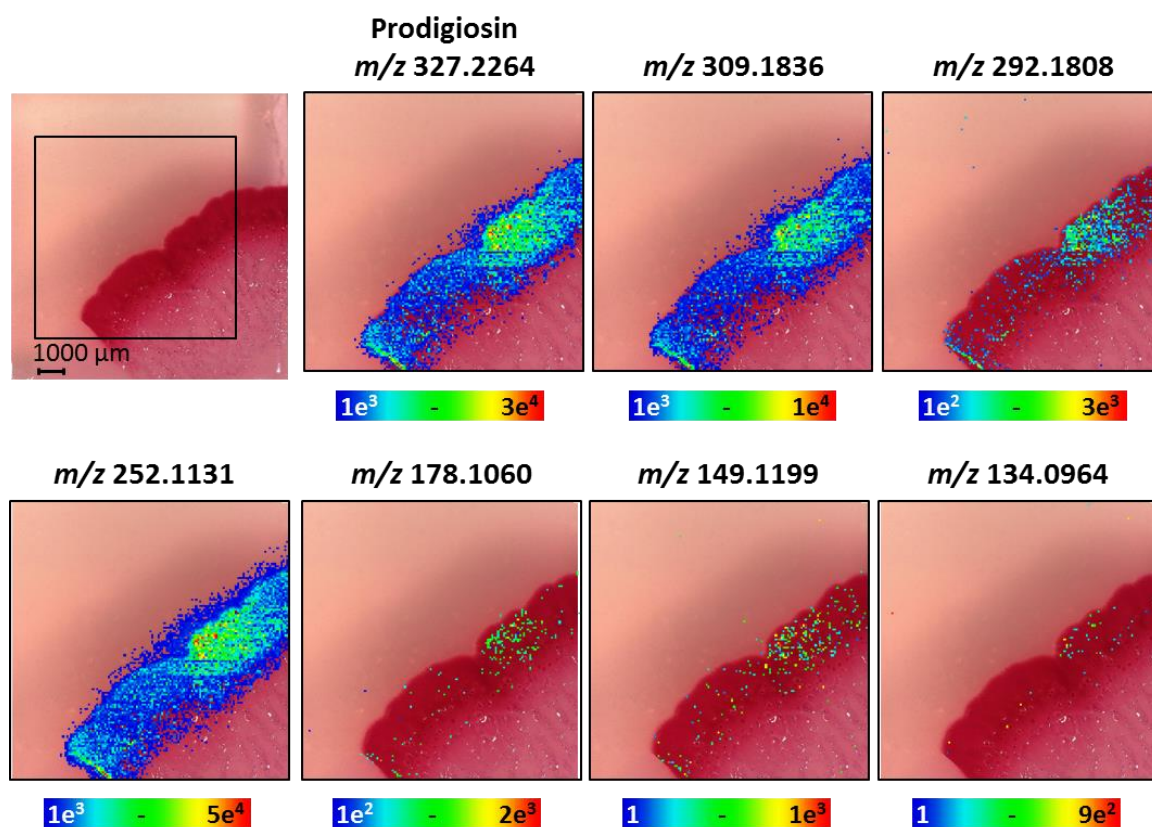


Abb. S309: MALDI-imaging-HRMS² von markiertem Prodigiosin $\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{D}_3\text{N}_3\text{O}$ ($[\text{M}+\text{H}]^+ \pm 3$ ppm), produziert von *S. marcescens* MSRBB2 inkubiert auf Kartoffel-Dextrose-Agar mit zugegebenem [Methyl-D₃]-L-Methionin (1 mg/mL). Optisches Bild mit eingezeichnetem Messbereich und Visualisierung der örtlichen Verteilung der charakteristischen Fragmente.

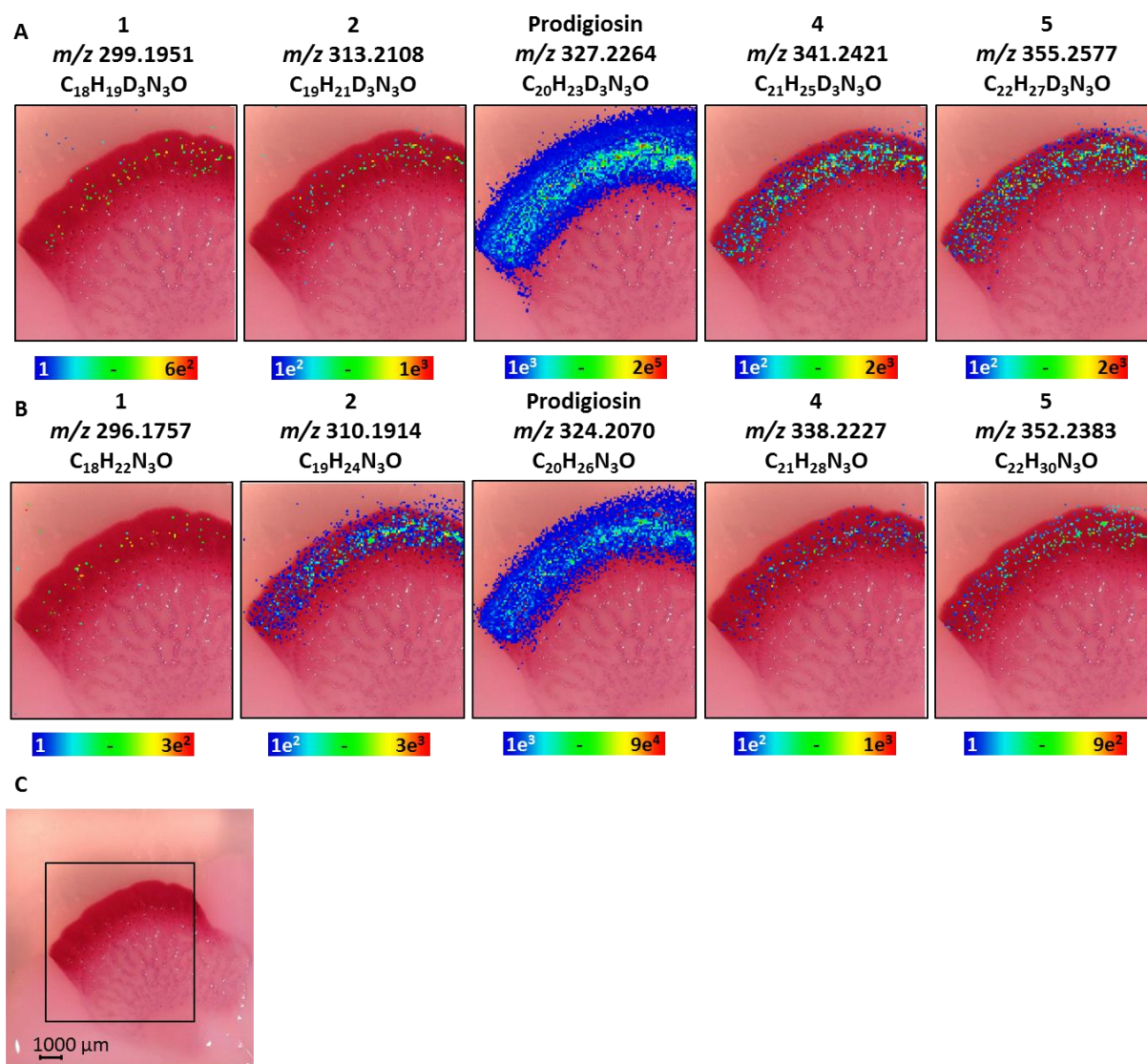


Abb. S310: MALDI-imaging-HRMS von *S. marcescens* MSRBB2 inkubiert auf Kartoffel-Dextrose-Agar mit zugegebenem [Methyl- D_3]-L-Methionin (1 mg/mL). Optisches Bild mit eingezeichnetem Messbereich (C) und Visualisierung der örtlichen Verteilung von markierten (A) und unmarkierten (B) Prodigininen ($[M+H]^+ \pm 2$ ppm).

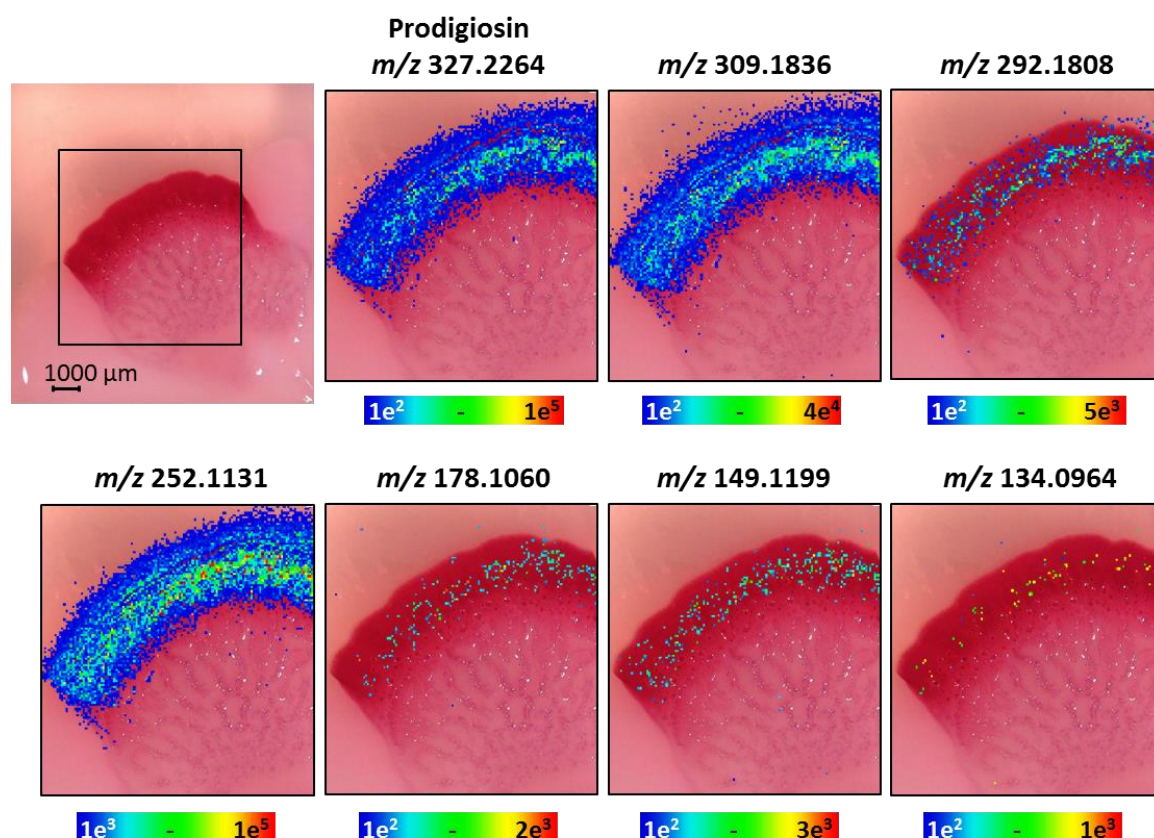


Abb. S311: MALDI-imaging-HRMS² von markiertem Prodigiosin $\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{D}_3\text{N}_3\text{O}$ ($[\text{M}+\text{H}]^+ \pm 3 \text{ ppm}$), produziert von *S. marcescens* MSRBB2 inkubiert auf Kartoffel-Dextrose-Agar mit zugegebenem [Methyl- D_3]-L-Methionin (1 mg/mL). Optisches Bild mit eingezeichnetem Messbereich und Visualisierung der örtlichen Verteilung der charakteristischen Fragmente.

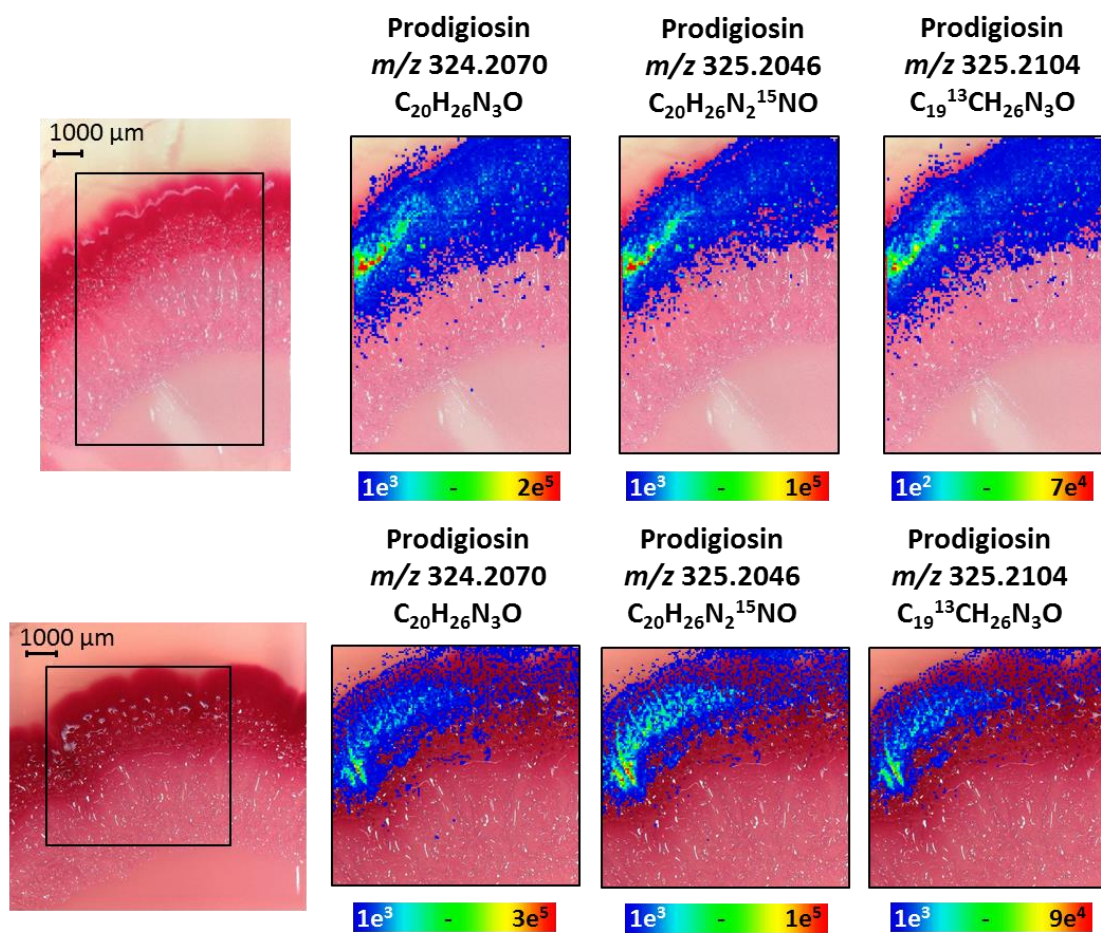


Abb. S312: MALDI-imaging-HRMS von *S. marcescens* MSRBB2 inkubiert auf Kartoffel-Dextrose-Agar mit zugegebenem $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ (1 mg/mL). Optische Bilder mit eingezeichnetem Messbereich und Visualisierung der örtlichen Verteilung von markiertem und unmarkiertem Prodigiosin sowie der natürlichen ^{13}C monoisotopischen Masse ($[\text{M}+\text{H}]^+ \pm 2$ ppm).

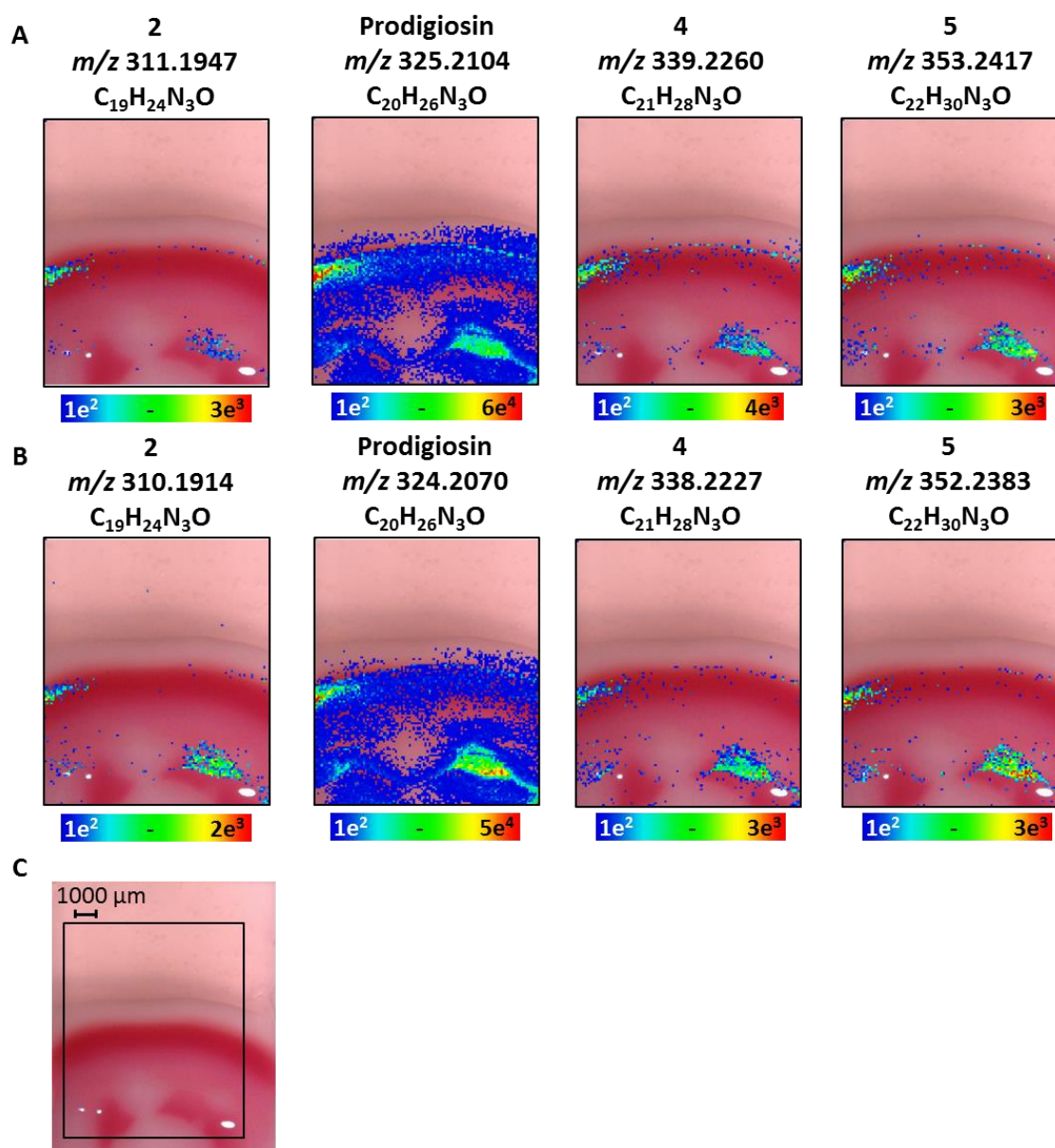


Abb. S313: MALDI-imaging-HRMS von *S. marcescens* MSRBB2 inkubiert auf Kartoffel-Dextrose-Agar mit zugegebenem $[1-^{13}C]$ -L-Prolin (1 mg/mL). Optisches Bild mit eingezeichnetem Messbereich (C) und Visualisierung der örtlichen Verteilung von markierten (A) und unmarkierten (B) Prodigininen ($[M+H]^+ \pm 2$ ppm).

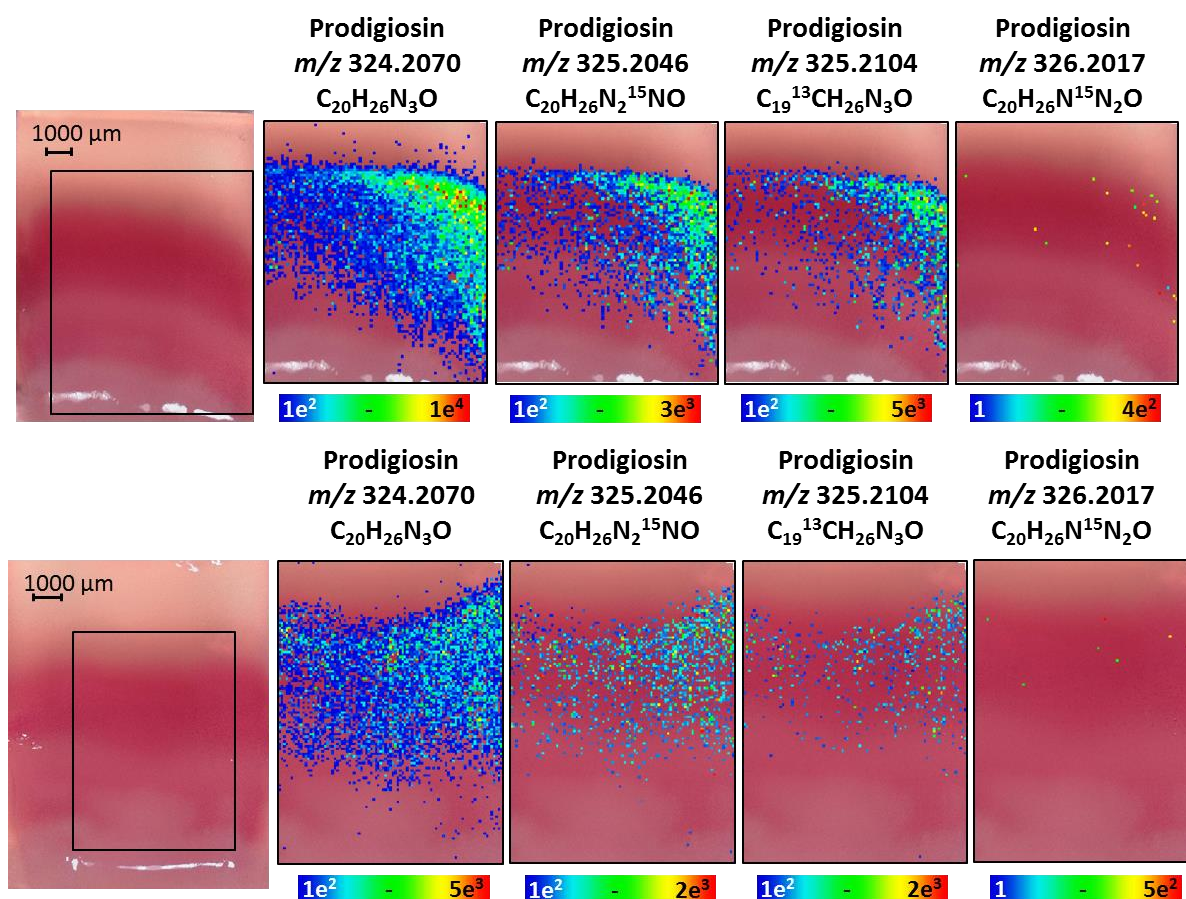


Abb. S314: MALDI-imaging-HRMS von *S. marcescens* MSRBB2 inkubiert auf Kartoffel-Dextrose-Agar mit zugegebenem ^{15}N -L-Serin (1 mg/mL). Optische Bilder mit eingezeichnetem Messbereich und Visualisierung der örtlichen Verteilung von markiertem ($1\times^{15}\text{N}$ & $2\times^{15}\text{N}$) und unmarkiertem Prodigiosin sowie der natürlichen ^{13}C monoisotopischen Masse ($[\text{M}+\text{H}]^+ \pm 2$ ppm).

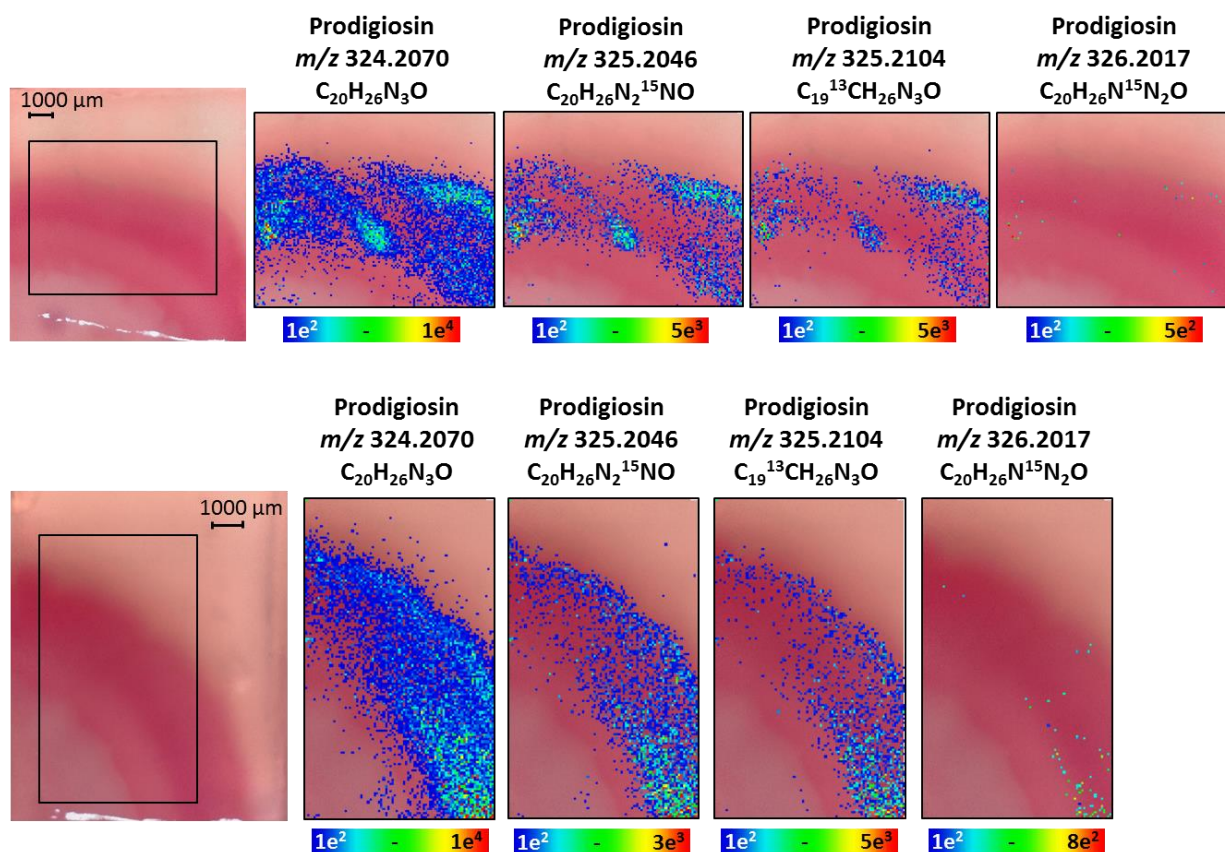


Abb. S315: MALDI-imaging-HRMS von *S. marcescens* MSRBB2 inkubiert auf Kartoffel-Dextrose-Agar mit zugegebenem $[^{15}N]$ -L-Serin (1 mg/mL). Optische Bilder mit eingezeichnetem Messbereich und Visualisierung der örtlichen Verteilung von markiertem ($1 \times ^{15}N$ & $2 \times ^{15}N$) und unmarkiertem Prodigiosin sowie der natürlichen ^{13}C monoisotopischen Masse ($[M+H]^+ \pm 2$ ppm).

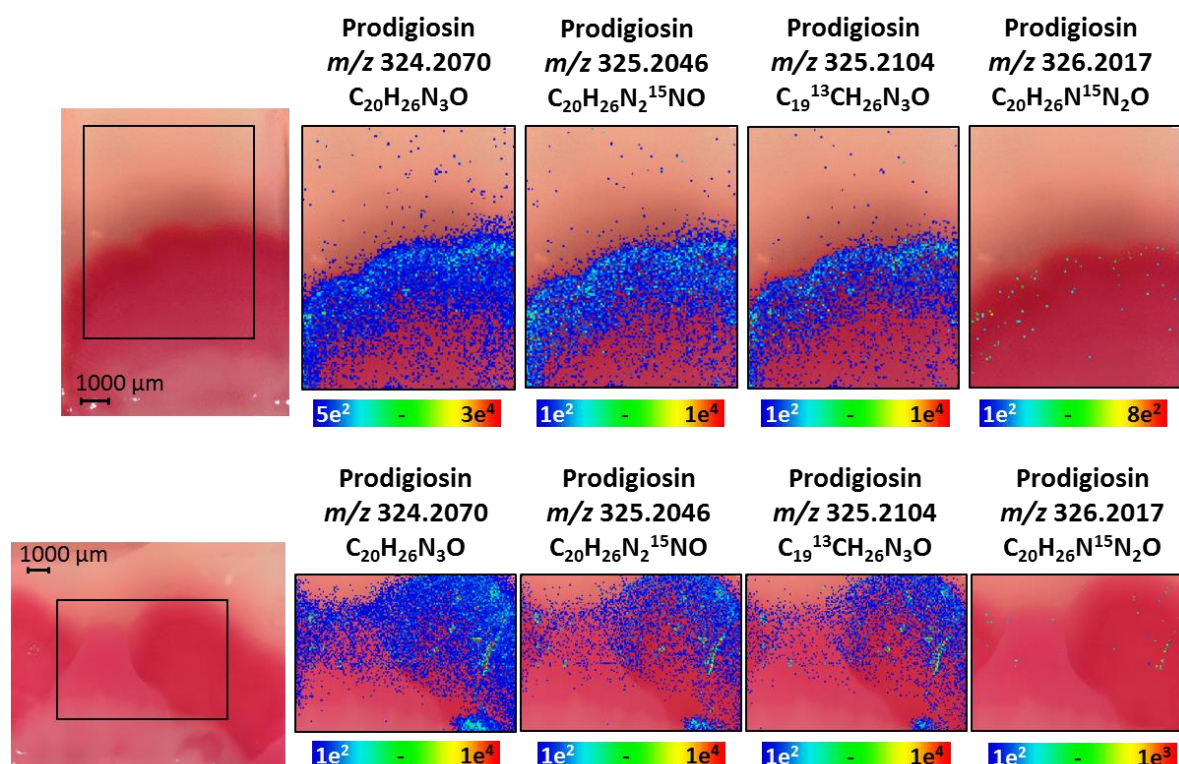


Abb. S316: MALDI-imaging-HRMS von *S. marcescens* MSRBB2 inkubiert auf Kartoffel-Dextrose-Agar mit zugegebenem $[^{15}N]$ -L-Serin (1 mg/mL). Optische Bilder mit eingezeichnetem Messbereich und Visualisierung der örtlichen Verteilung von markiertem ($1x^{15}N$ & $2x^{15}N$) und unmarkiertem Prodigiosin sowie der natürlichen ^{13}C monoisotopischen Masse ($[M+H]^+ \pm 2$ ppm).

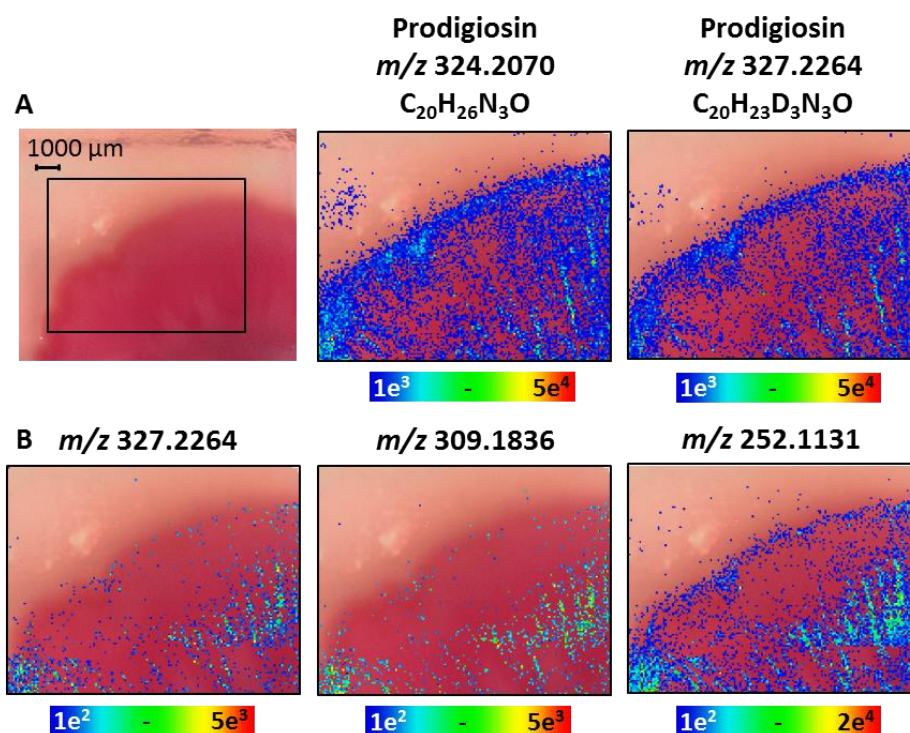


Abb. S317: MALDI-imaging-HRMS von *S. marcescens* MSRBB2 inkubiert auf Kartoffel-Dextrose-Agar mit zugegebenem [Methyl- D_3]-L-Methionin (0.5 mg/mL). Optisches Bild mit eingezeichnetem Messbereich und Visualisierung der örtlichen Verteilung von markiertem und unmarkiertem Prodigiosin ($[\text{M}+\text{H}]^+ \pm 2$ ppm, (A)). Charakteristische Fragmente von MALDI-imaging-HRMS² von markiertem Prodigiosin $\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{D}_3\text{N}_3\text{O}$ ($[\text{M}+\text{H}]^+ \pm 3$ ppm, (B)).

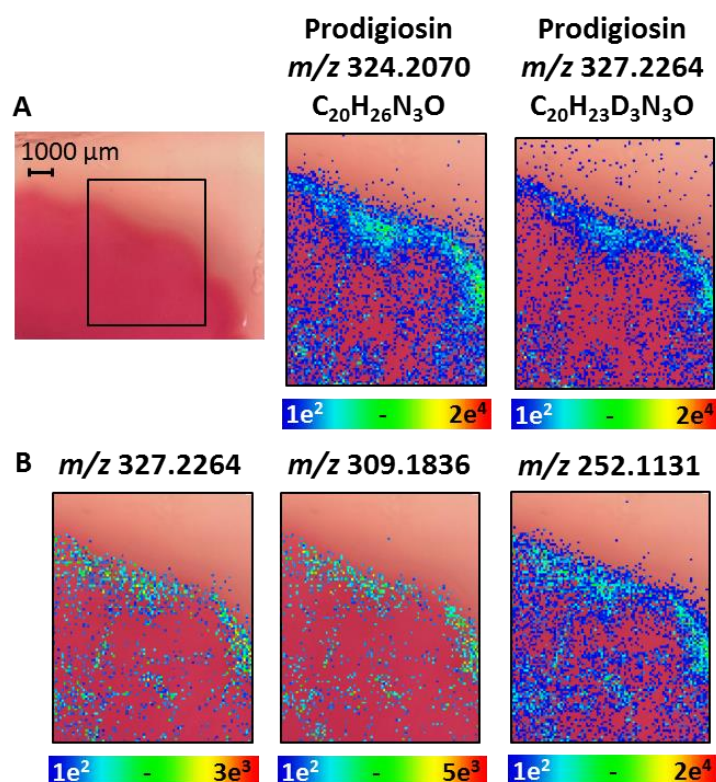


Abb. S318: MALDI-imaging-HRMS von *S. marcescens* MSRBB2 inkubiert auf Kartoffel-Dextrose-Agar mit zugegebenem [Methyl- D_3]-L-Methionin (0.5 mg/mL). Optisches Bild mit eingezeichnetem Messbereich und Visualisierung der örtlichen Verteilung von markiertem und unmarkiertem Prodigiosin ($[\text{M}+\text{H}]^+ \pm 2$ ppm, (A)). Charakteristische Fragmente von MALDI-imaging-HRMS² von markiertem Prodigiosin $\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{D}_3\text{N}_3\text{O}$ ($[\text{M}+\text{H}]^+ \pm 3$ ppm, (B)).

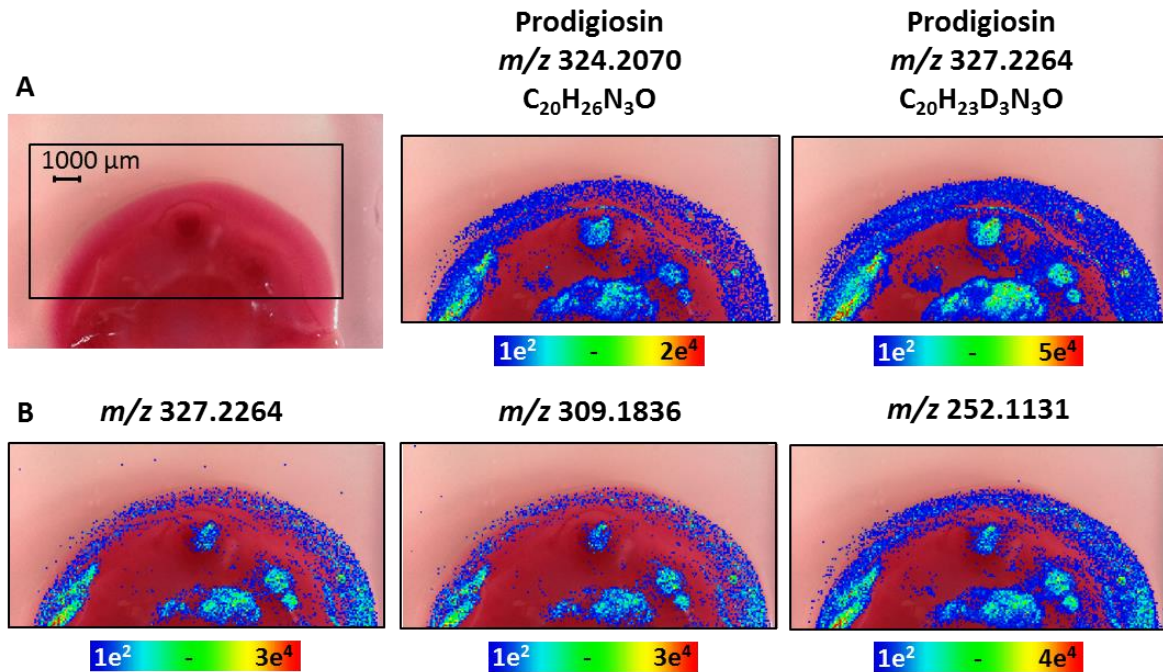


Abb. S319: MALDI-imaging-HRMS von *S. marcescens* MSRBB2 inkubiert auf Kartoffel-Dextrose-Agar mit zugegebenem [Methyl- D_3]-L-Methionin (2 mg/mL). Optisches Bild mit eingezeichnetem Messbereich und Visualisierung der örtlichen Verteilung von markiertem und unmarkiertem Prodigiosin ($[M+H]^+ \pm 2$ ppm, (A)). Charakteristische Fragmente von MALDI-imaging-HRMS² von markiertem Prodigiosin $C_{20}H_{23}D_3N_3O$ ($[M+H]^+ \pm 3$ ppm, (B)).

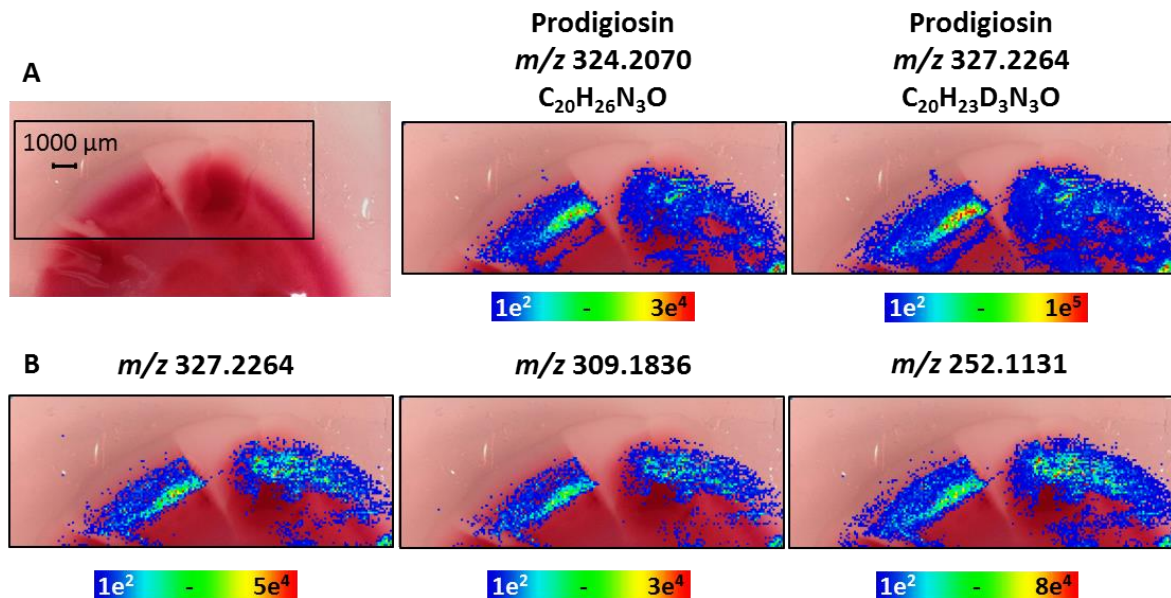


Abb. S320: MALDI-imaging-HRMS von *S. marcescens* MSRBB2 inkubiert auf Kartoffel-Dextrose-Agar mit zugegebenem [Methyl- D_3]-L-Methionin (2 mg/mL). Optisches Bild mit eingezeichnetem Messbereich und Visualisierung der örtlichen Verteilung von markiertem und unmarkiertem Prodigiosin ($[M+H]^+ \pm 2$ ppm, (A)). Charakteristische Fragmente von MALDI-imaging-HRMS² von markiertem Prodigiosin $C_{20}H_{23}D_3N_3O$ ($[M+H]^+ \pm 3$ ppm, (B)).

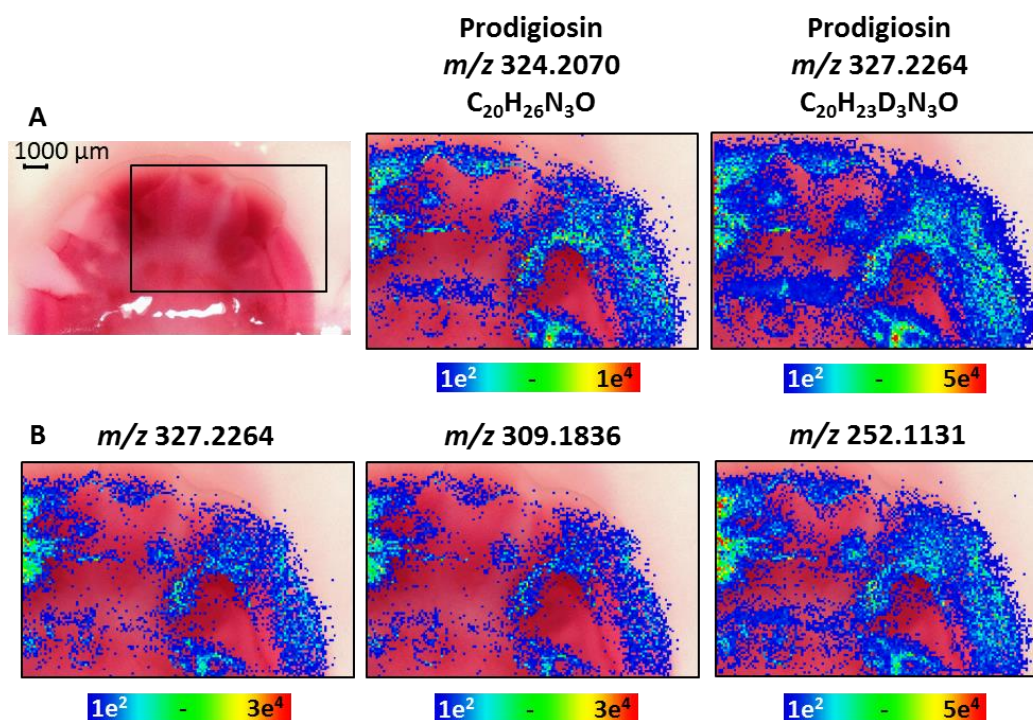


Abb. S321: MALDI-imaging-HRMS von *S. marcescens* MSRBB2 inkubiert auf Kartoffel-Dextrose-Agar mit zugegebenem [Methyl- D_3]-L-Methionin (2 mg/mL). Optisches Bild mit eingezeichnetem Messbereich und Visualisierung der örtlichen Verteilung von markiertem und unmarkiertem Prodigiosin ($[\text{M}+\text{H}]^+ \pm 2$ ppm, (A)). Charakteristische Fragmente von MALDI-imaging-HRMS² von markiertem Prodigiosin $\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{D}_3\text{N}_3\text{O}$ ($[\text{M}+\text{H}]^+ \pm 3$ ppm, (B)).

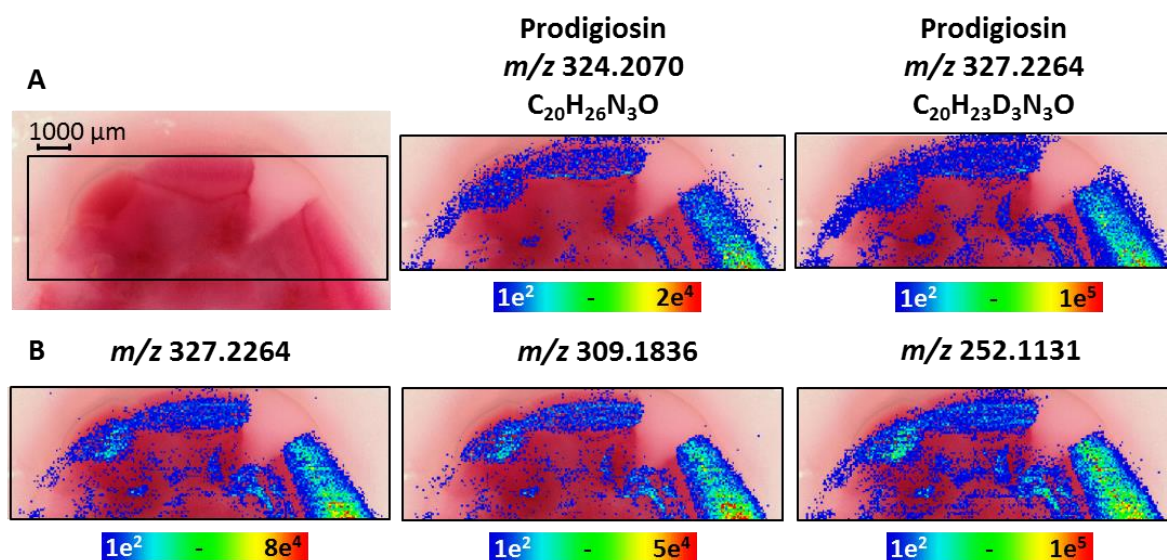


Abb. S322: MALDI-imaging-HRMS von *S. marcescens* MSRBB2 inkubiert auf Kartoffel-Dextrose-Agar mit zugegebenem [Methyl- D_3]-L-Methionin (2 mg/mL). Optisches Bild mit eingezeichnetem Messbereich und Visualisierung der örtlichen Verteilung von markiertem und unmarkiertem Prodigiosin ($[\text{M}+\text{H}]^+ \pm 2$ ppm, (A)). Charakteristische Fragmente von MALDI-imaging-HRMS² von markiertem Prodigiosin $\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{D}_3\text{N}_3\text{O}$ ($[\text{M}+\text{H}]^+ \pm 3$ ppm, (B)).

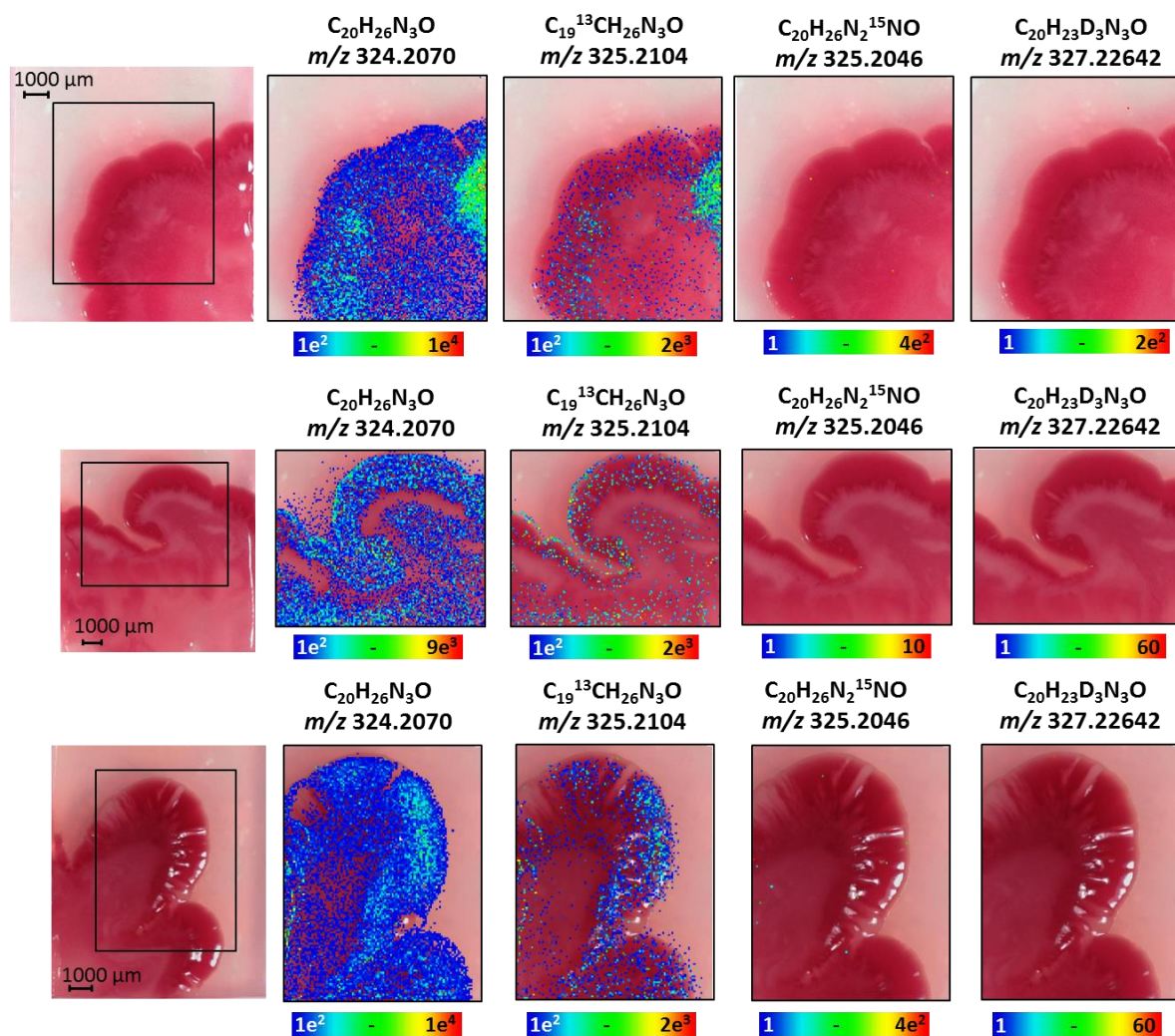


Abb. S323: MALDI-imaging-HRMS von *S. marcescens* MSRBB2 inkubiert auf Nähragar ohne Zusatz von markierten Vorläufer-Molekülen (Kontrolle). Optische Bilder mit eingezeichnetem Messbereich und Visualisierung der örtlichen Verteilung Prodigiosin ($[M+H]^+ \pm 2$ ppm). Dargestellt sind die Varianten der Markierungsstudie (C₂₀H₂₆N₂¹⁵NO, C₁₉¹³CH₂₆N₃O, C₂₀H₂₃D₃N₃O) sowie die monoisotopische Masse (C₂₀H₂₆N₃O).

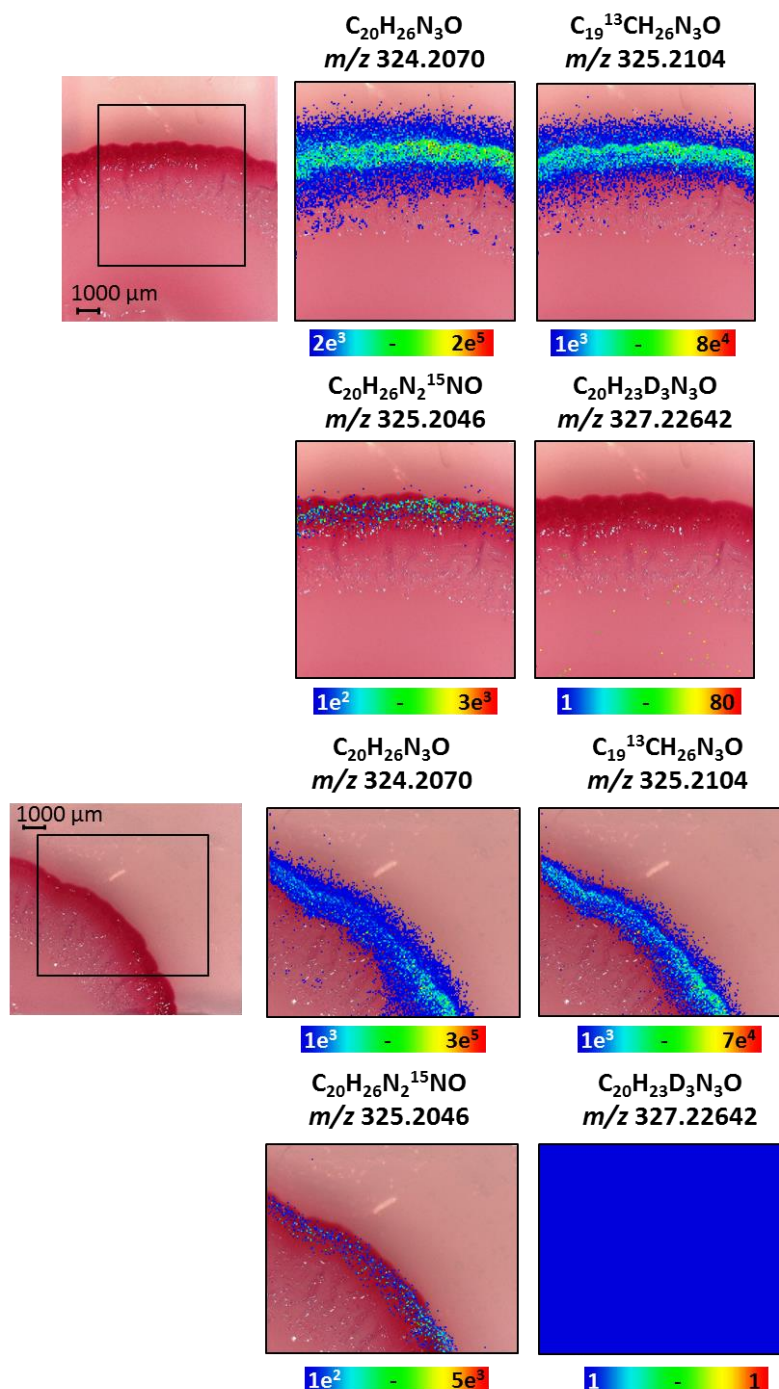


Abb. S324: MALDI-imaging-HRMS von *S. marcescens* MSRBB2 inkubiert auf Kartoffel-Dextrose-Agar ohne Zusatz von markierten Vorläufer-Molekülen (Kontrolle). Optische Bilder mit eingezeichnetem Messbereich und Visualisierung der örtlichen Verteilung Prodigiosin ($[M+H]^+ \pm 2$ ppm). Dargestellt sind die Varianten der Markierungsstudie ($C_{20}H_{26}N_2^{15}NO$, $C_{19}^{13}CH_{26}N_3O$, $C_{20}H_{23}D_3N_3O$) sowie die monoisotopische Masse ($C_{20}H_{26}N_3O$).

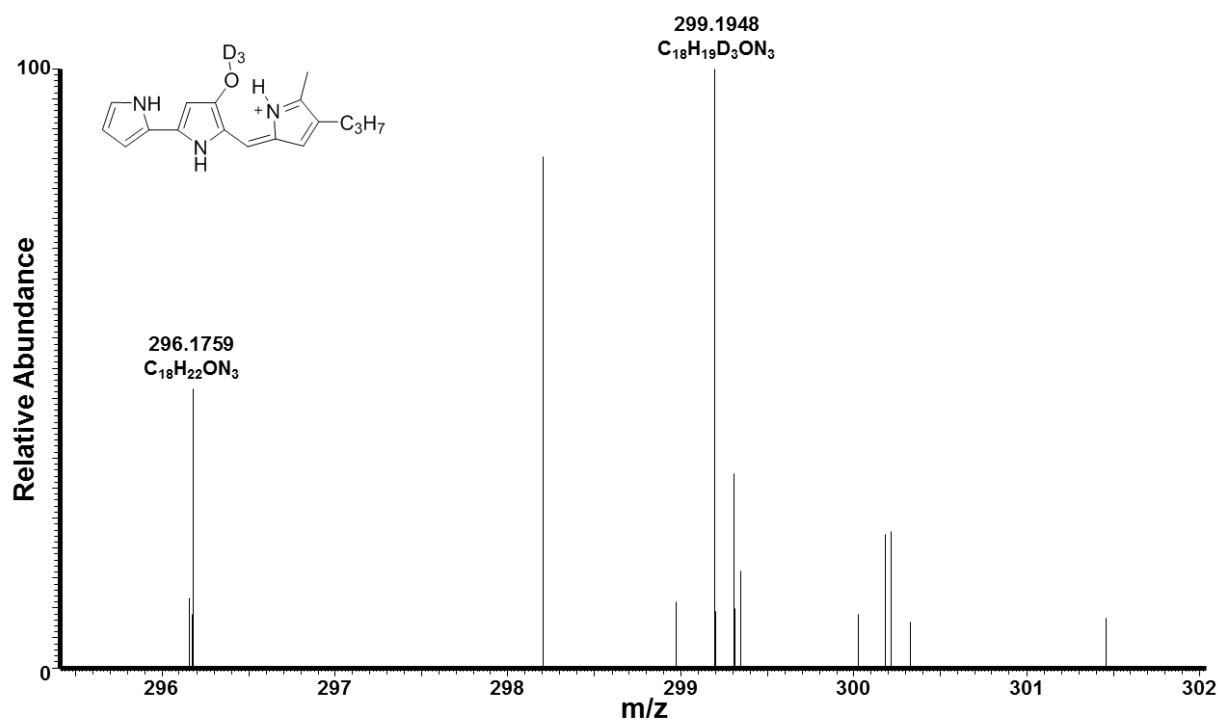


Abb. S325: HRMS-Spektrum von 2-Methyl-3-propyl-Prodiginin mit eingebauter Methyl-D₃ Gruppe von Nähragar mit 1 mg/mL [Methyl-D₃]-L-Methionin (Verbindung **1** $[M+H]^+$: m/z 299, $C_{18}H_{19}D_3N_3O$).

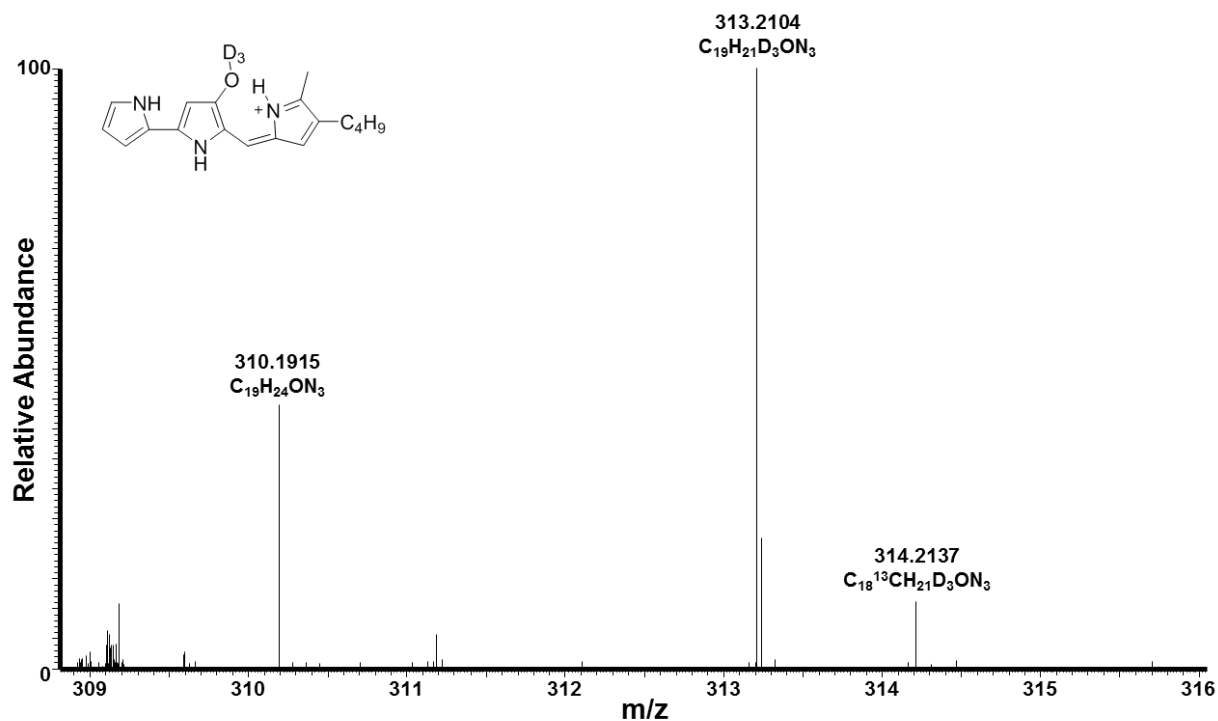


Abb. S326: HRMS-Spektrum von 2-Methyl-3-butyl-Prodiginin mit eingebauter Methyl-D₃ Gruppe von Nähragar mit 1 mg/mL [Methyl-D₃]-L-Methionin (Verbindung **2** $[M+H]^+$: m/z 313, $C_{19}H_{21}D_3N_3O$).

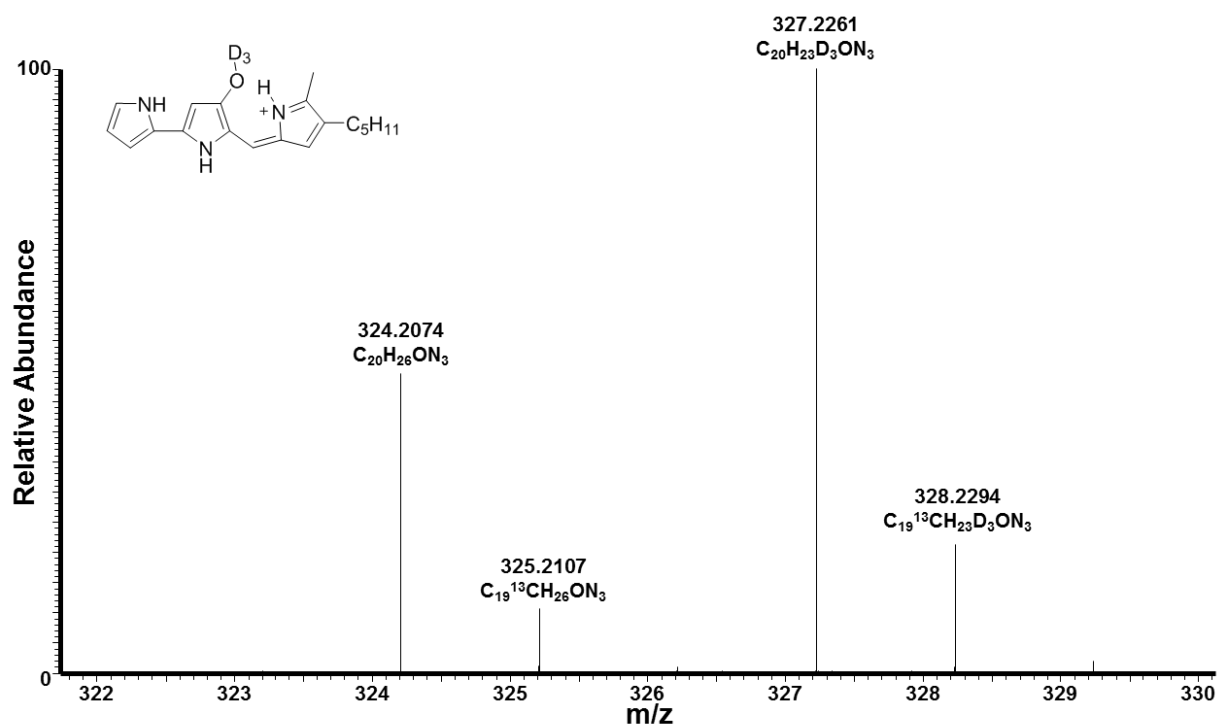


Abb. S327: HRMS-Spektrum von Prodigiosin mit eingebauter Methyl-D₃ Gruppe von Nähragar mit 1 mg/mL [Methyl-D₃]-L-Methionin (Verbindung **3** $[M+H]^+$: *m/z* 327, $C_{20}H_{23}D_3N_3O$).

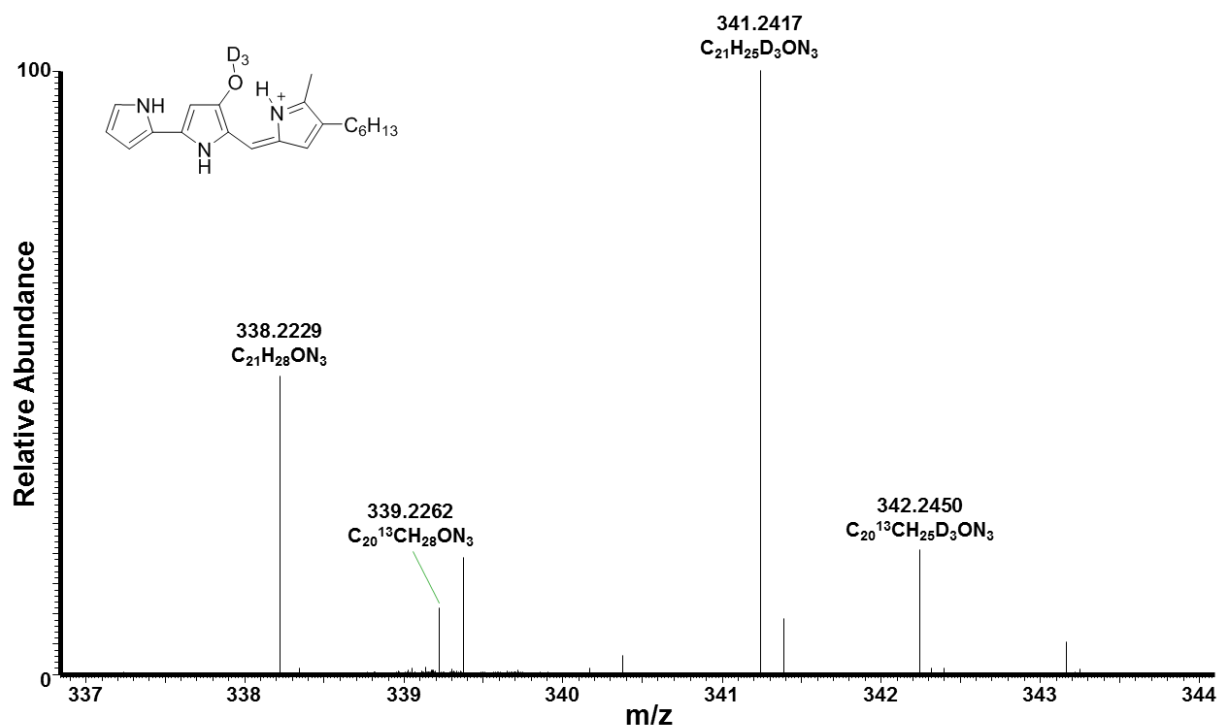


Abb. S328: HRMS-Spektrum von 2-Methyl-3-hexyl-Prodiginin mit eingebauter Methyl-D₃ Gruppe von Nähragar mit 1 mg/mL [Methyl-D₃]-L-Methionin (Verbindung **4** $[M+H]^+$: *m/z* 341, $C_{21}H_{25}D_3N_3O$).

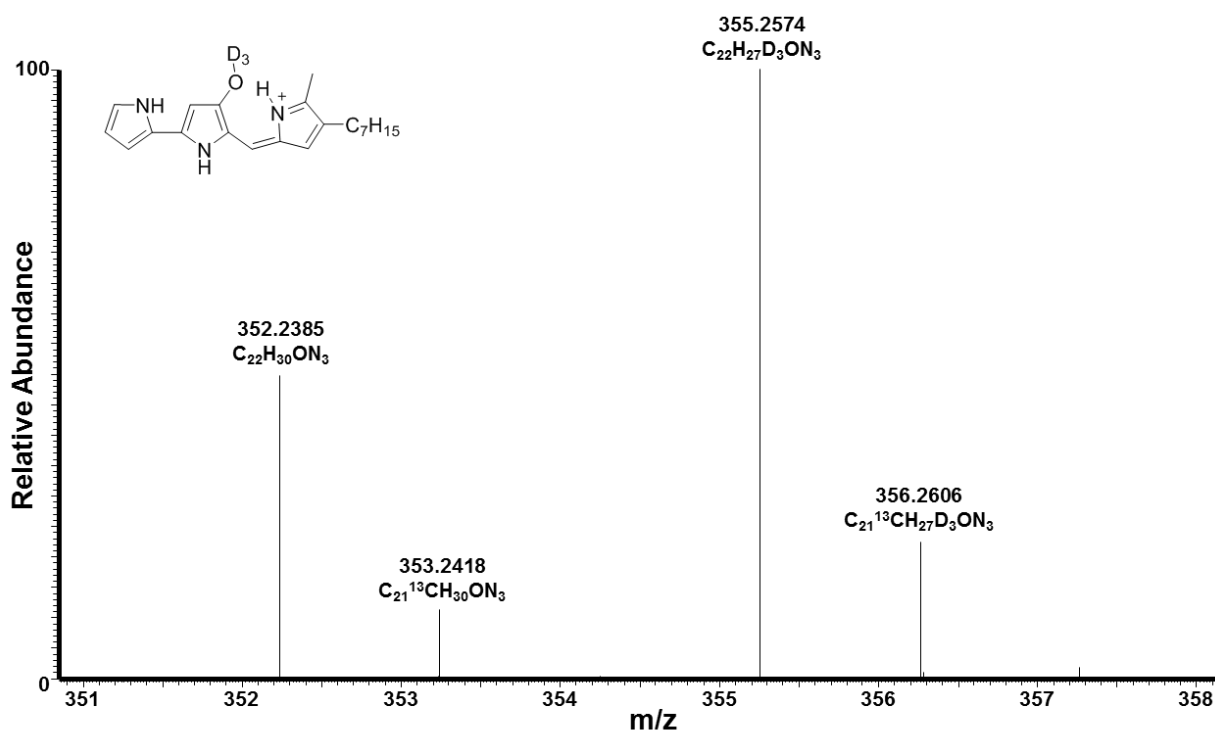


Abb. S329: HRMS-Spektrum von 2-Methyl-3-heptyl-Prodiginin mit eingebauter Methyl-D₃ Gruppe von Nähragar mit 1 mg/mL [Methyl-D₃]-L-Methionin (Verbindung 5 $[M+H]^+$: m/z 355, $C_{22}H_{27}D_3N_3O$).

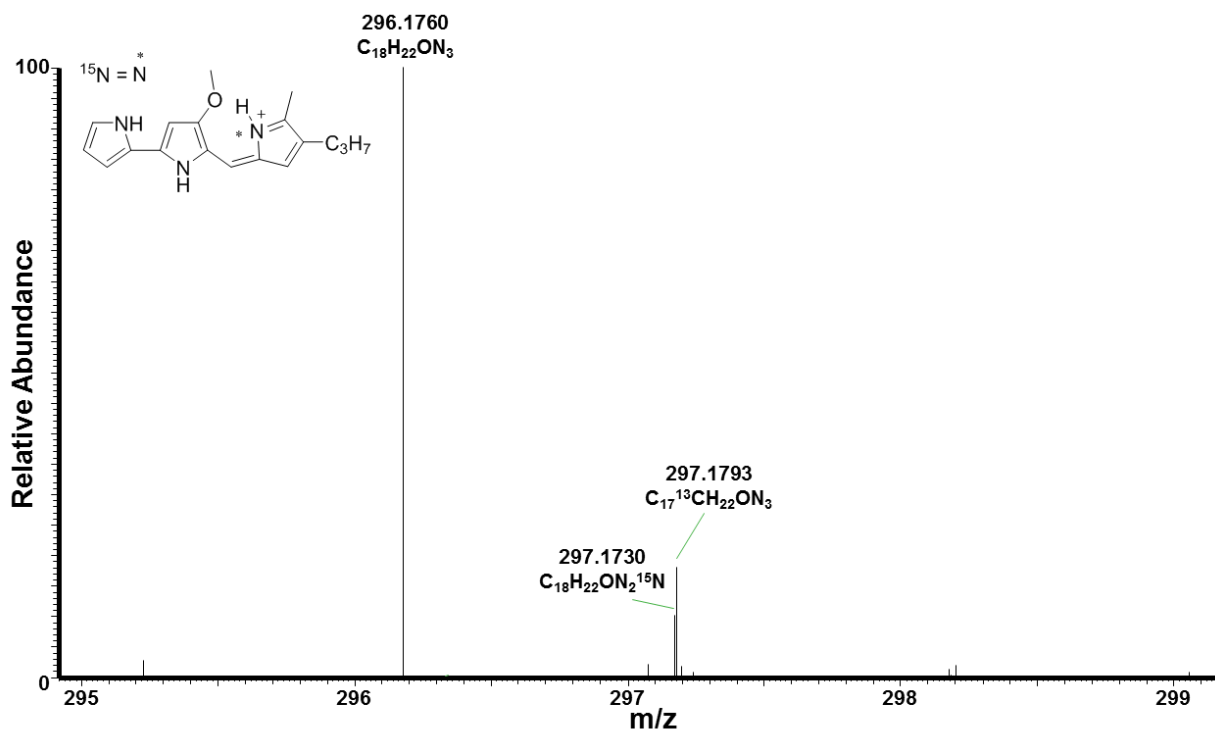


Abb. S330: HRMS-Spektrum von 2-Methyl-3-propyl-Prodiginin mit eingebautem ¹⁵N von Nähragar mit 1 mg/mL ¹⁵NH₄Cl (Verbindung 1 $[M+H]^+$: m/z 297, $C_{18}H_{22}N_2^{15}NO$).

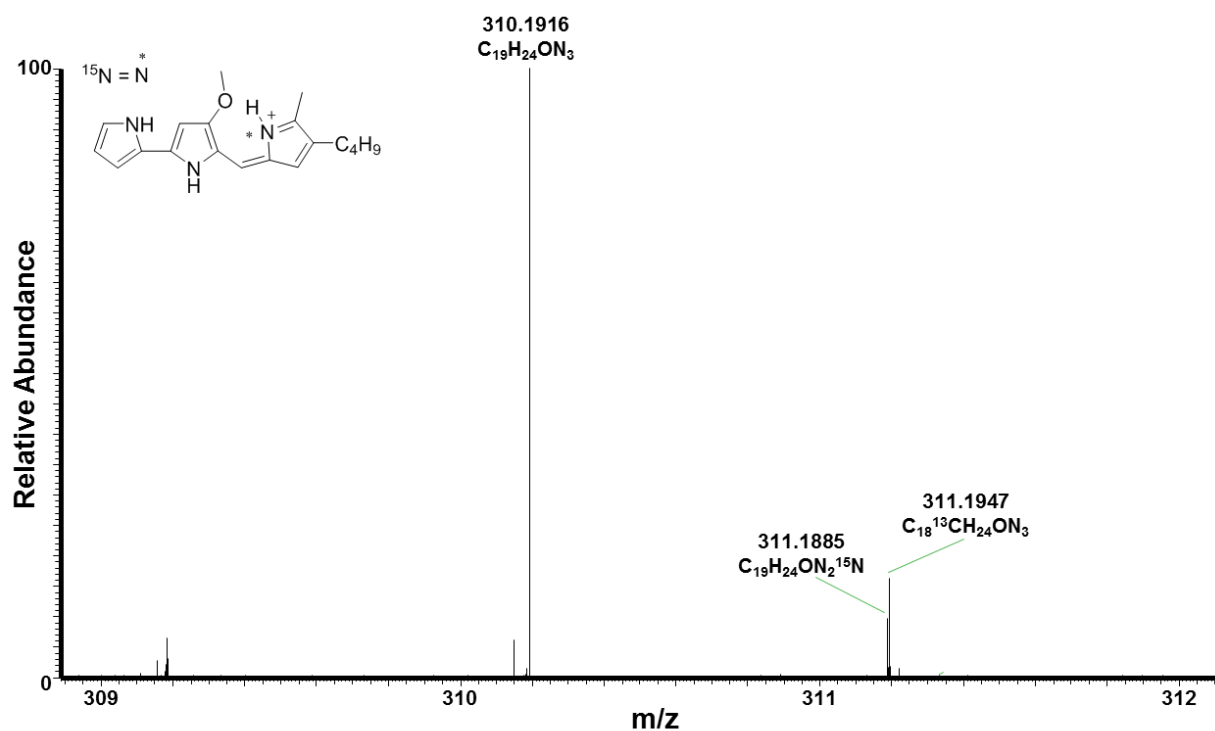


Abb. S331: HRMS-Spektrum von 2-Methyl-3-butyl-Prodiginin mit eingebautem ^{15}N von Nähragar mit 1 mg/mL $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ (Verbindung 2 $[\text{M}+\text{H}]^+$: m/z 311, $\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{N}_2^{15}\text{NO}$).

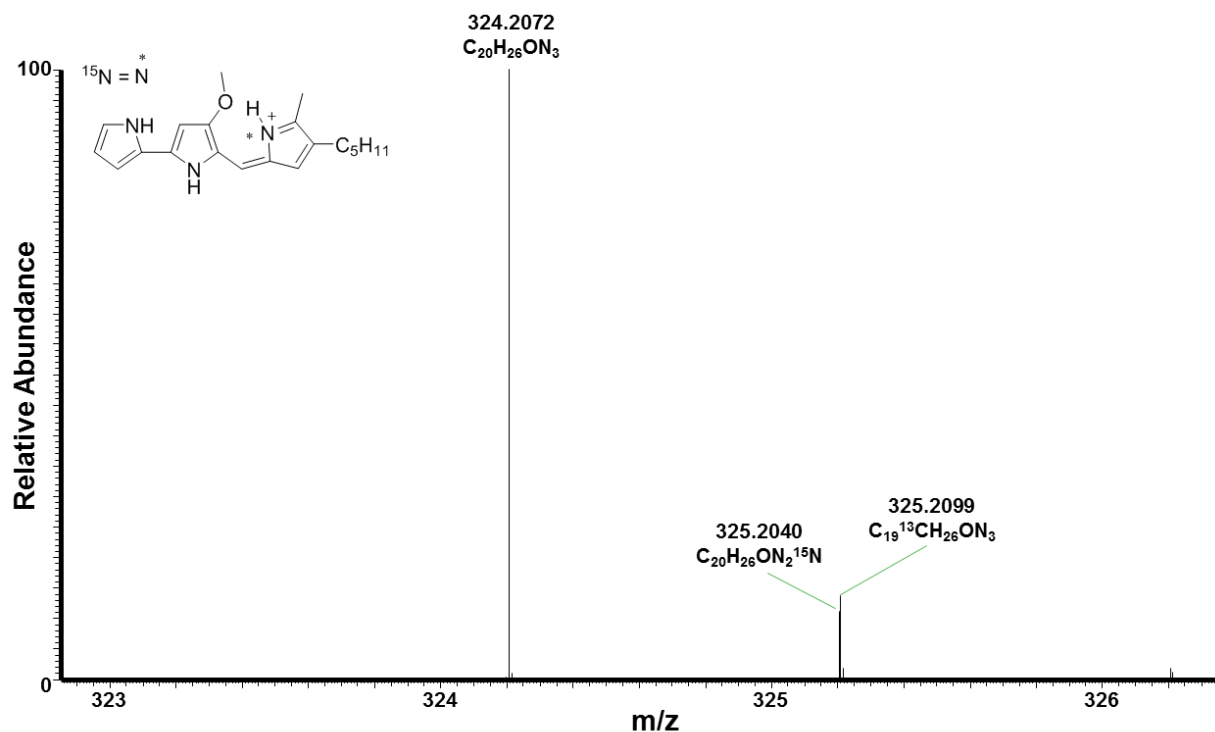


Abb. S332: HRMS-Spektrum von Prodigiosin mit eingebautem ^{15}N von Nähragar mit 1 mg/mL $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ (Verbindung 3 $[\text{M}+\text{H}]^+$: m/z 325, $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{N}_2^{15}\text{NO}$).

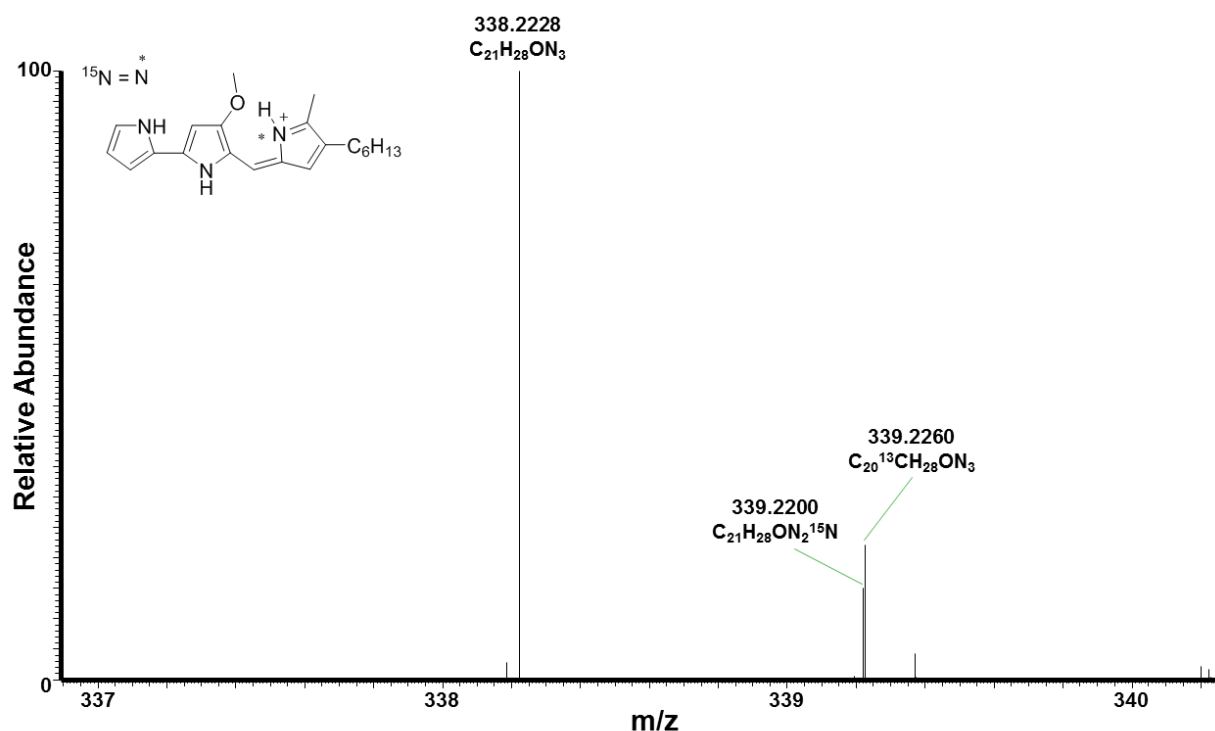


Abb. S333: HRMS-Spektrum von 2-Methyl-3-hexyl-Prodiginin mit eingebautem ^{15}N von Nähragar mit 1 mg/mL $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ (Verbindung 4 $[\text{M}+\text{H}]^+$: m/z 339, $\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{N}_2^{15}\text{NO}$).

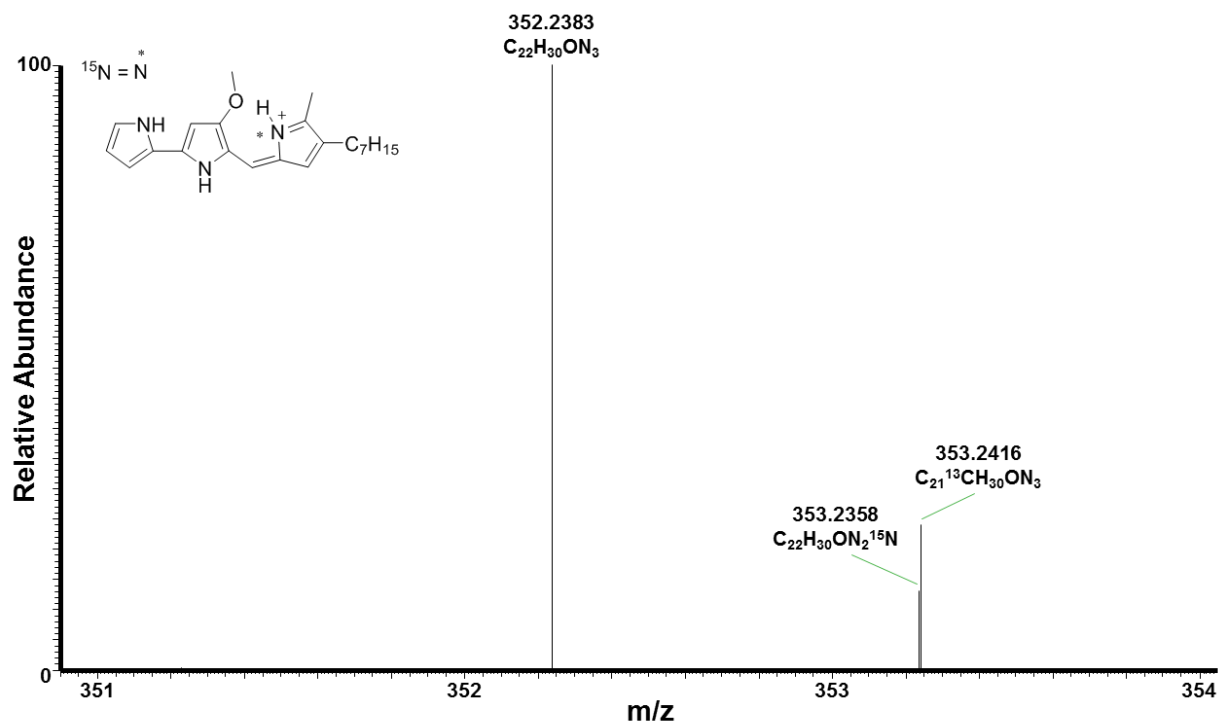


Abb. S334: HRMS-Spektrum von 2-Methyl-3-heptyl-Prodiginin mit eingebautem ^{15}N von Nähragar mit 1 mg/mL $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ (Verbindung 5 $[\text{M}+\text{H}]^+$: m/z 353, $\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{N}_2^{15}\text{NO}$).

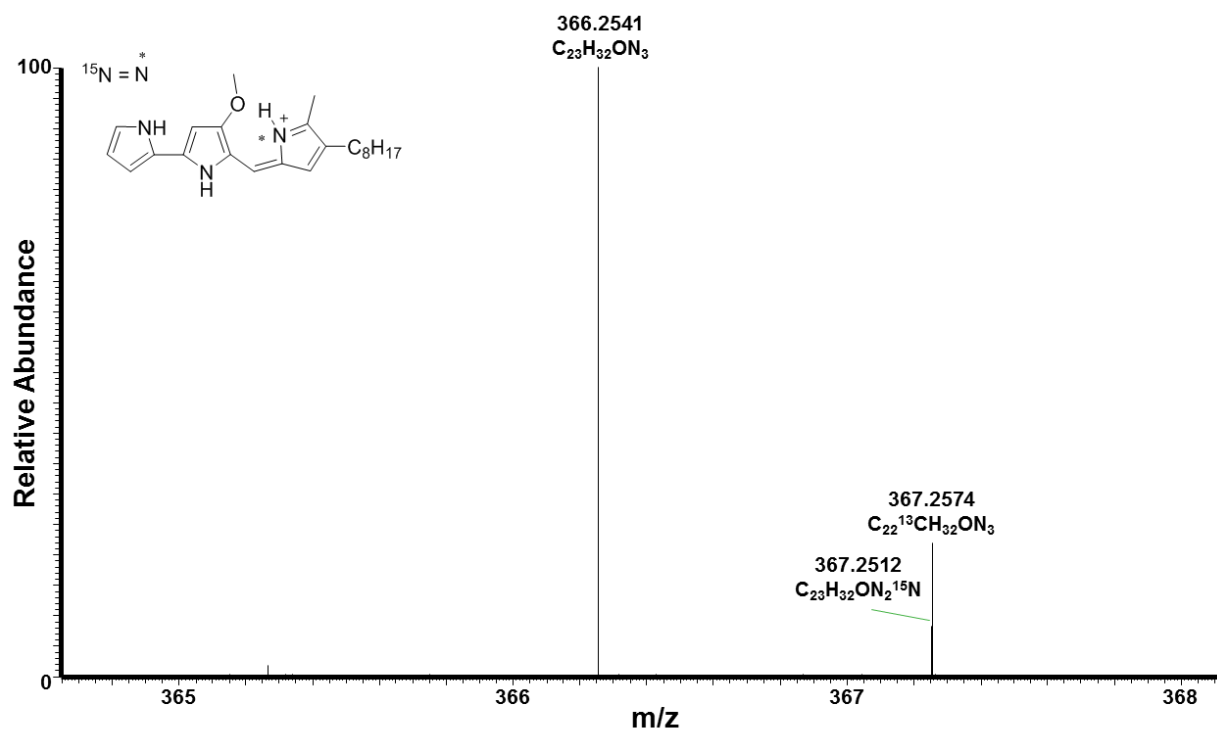


Abb. S335: HRMS-Spektrum von 2-Methyl-3-octyl-Prodiginin mit eingebautem ^{15}N von Nähragar mit 1 mg/mL $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ (Verbindung 6 $[\text{M}+\text{H}]^+$: m/z 367, $\text{C}_{23}\text{H}_{32}\text{N}_2^{15}\text{NO}$).

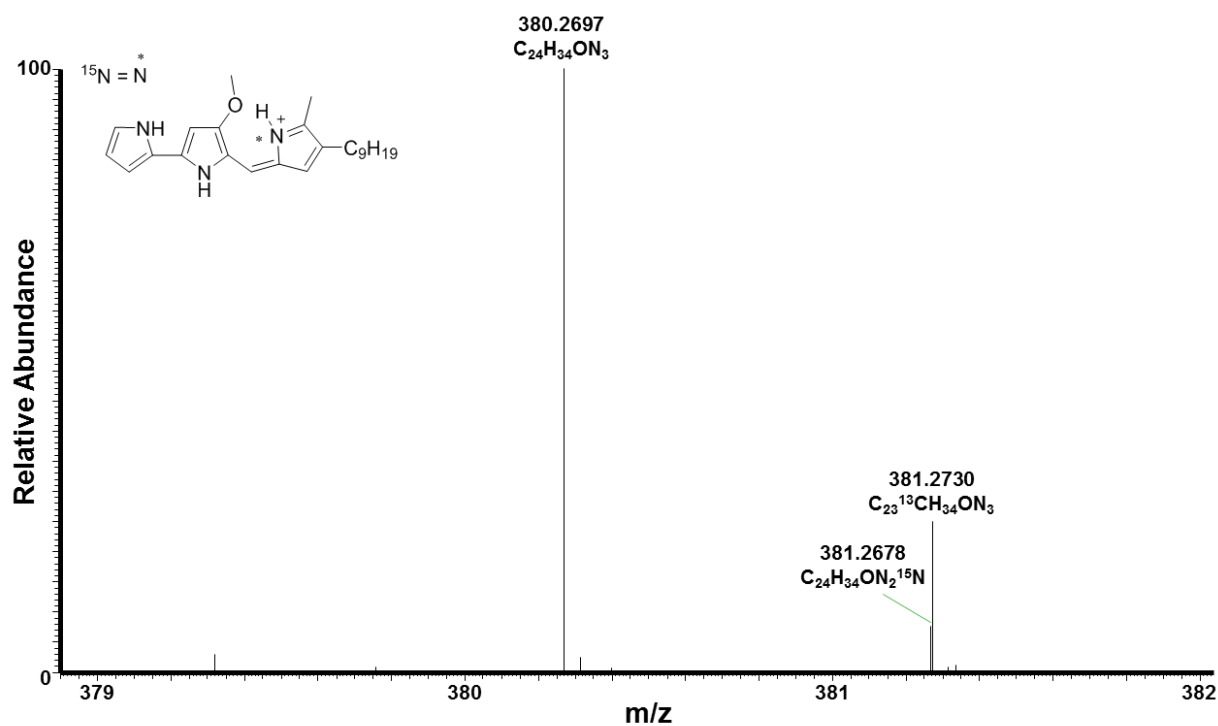


Abb. S336: HRMS-Spektrum von 2-Methyl-3-nonyl-Prodiginin mit eingebautem ^{15}N von Nähragar mit 1 mg/mL $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ (Verbindung 7 $[\text{M}+\text{H}]^+$: m/z 381, $\text{C}_{24}\text{H}_{34}\text{N}_2^{15}\text{NO}$).

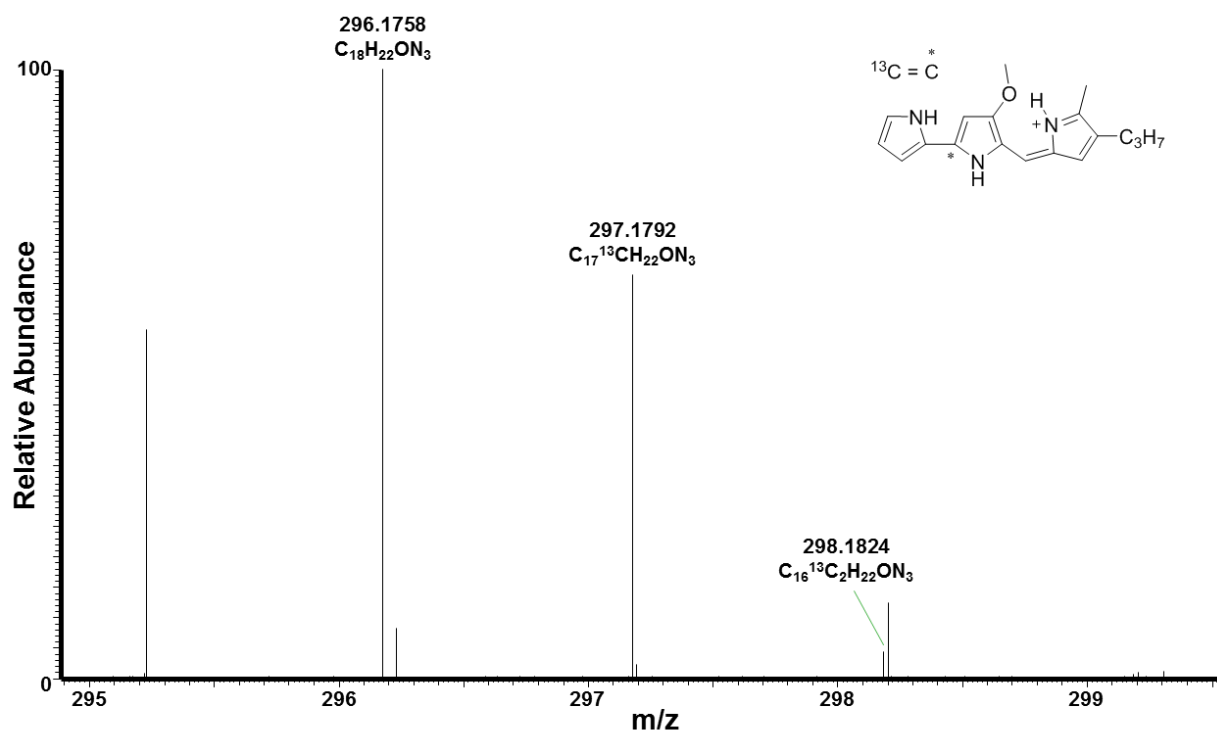


Abb. S337: HRMS-Spektrum von 2-Methyl-3-propyl-Prodiginin mit eingebautem [1-¹³C]-L-Prolin von Nähragar mit 1 mg/mL [1-¹³C]-L-Prolin (Verbindung 1 [M+H]⁺: m/z 297, $C_{17}^{13}CH_{22}N_3O$).

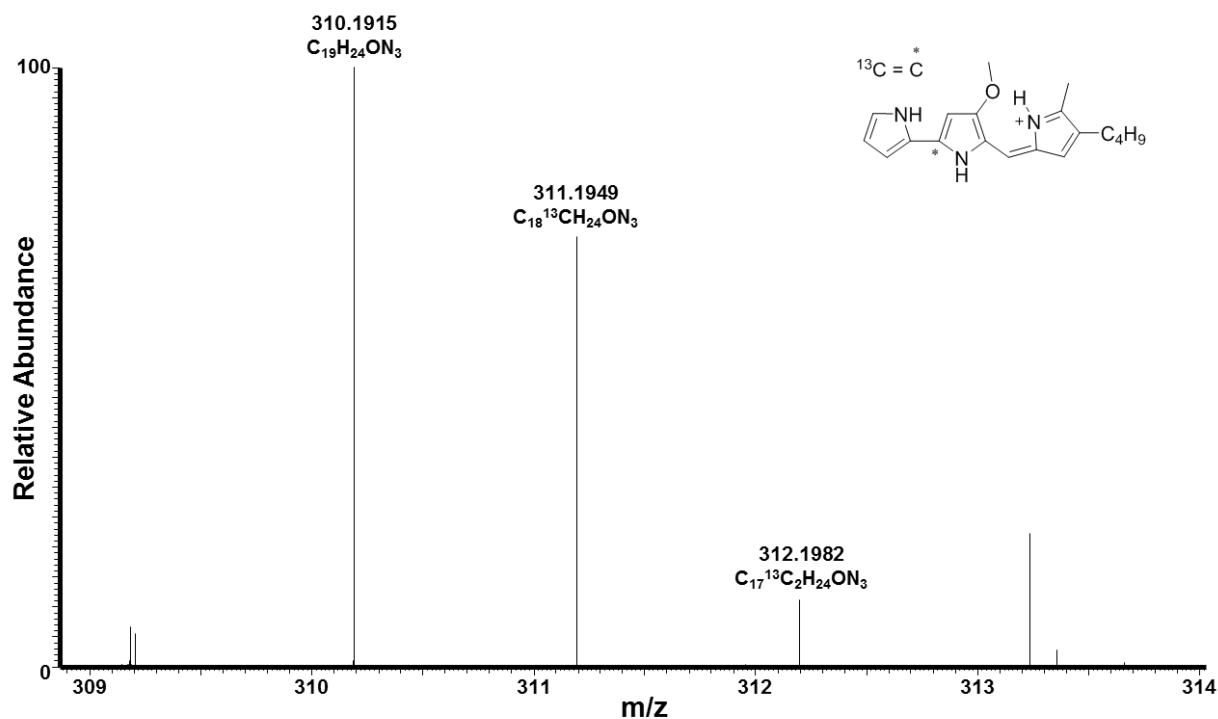


Abb. S338: HRMS-Spektrum von 2-Methyl-3-butyl-Prodiginin mit eingebautem [1-¹³C]-L-Prolin von Nähragar mit 1 mg/mL [1-¹³C]-L-Prolin (Verbindung 2 [M+H]⁺: m/z 311, $C_{18}^{13}CH_{24}N_3O$).

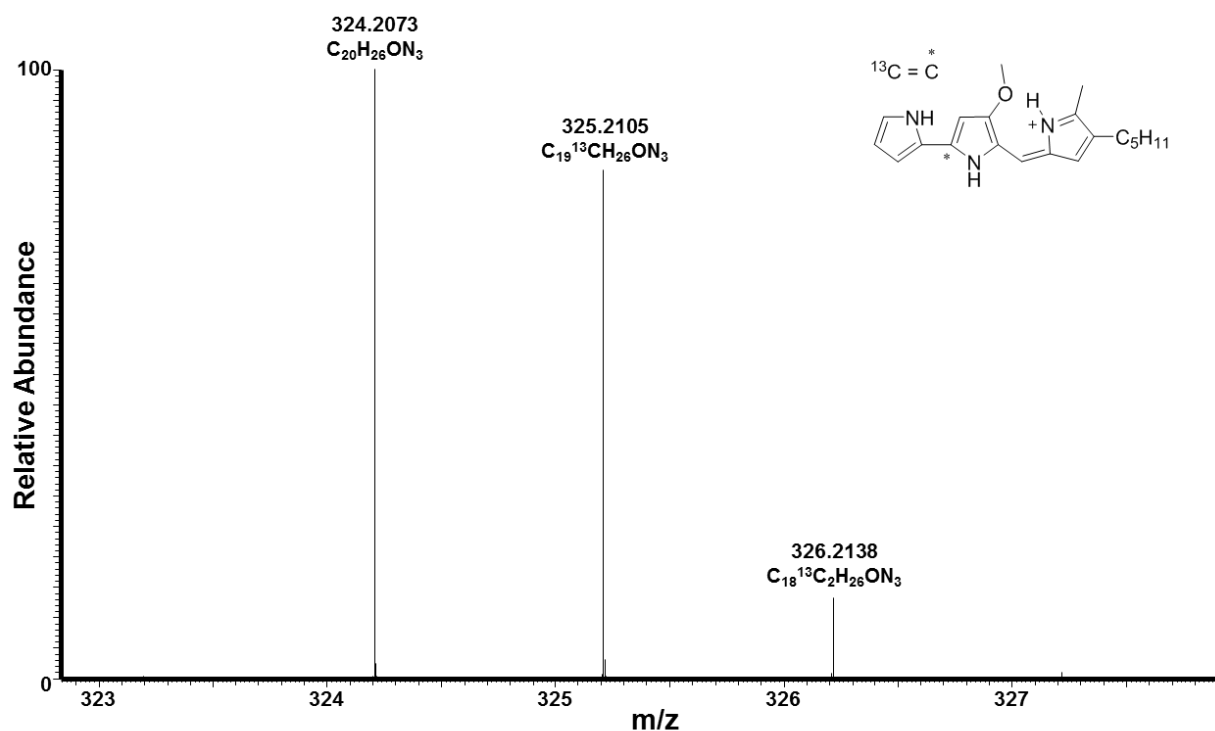


Abb. S339: HRMS-Spektrum von Prodigiosin mit eingebautem $[1-^{13}\text{C}]$ -L-Prolin von Nähragar mit 1 mg/mL $[1-^{13}\text{C}]$ -L-Prolin (Verbindung 3 $[\text{M}+\text{H}]^+$: m/z 325, $\text{C}_{19}^{13}\text{CH}_{26}\text{N}_3\text{O}$).

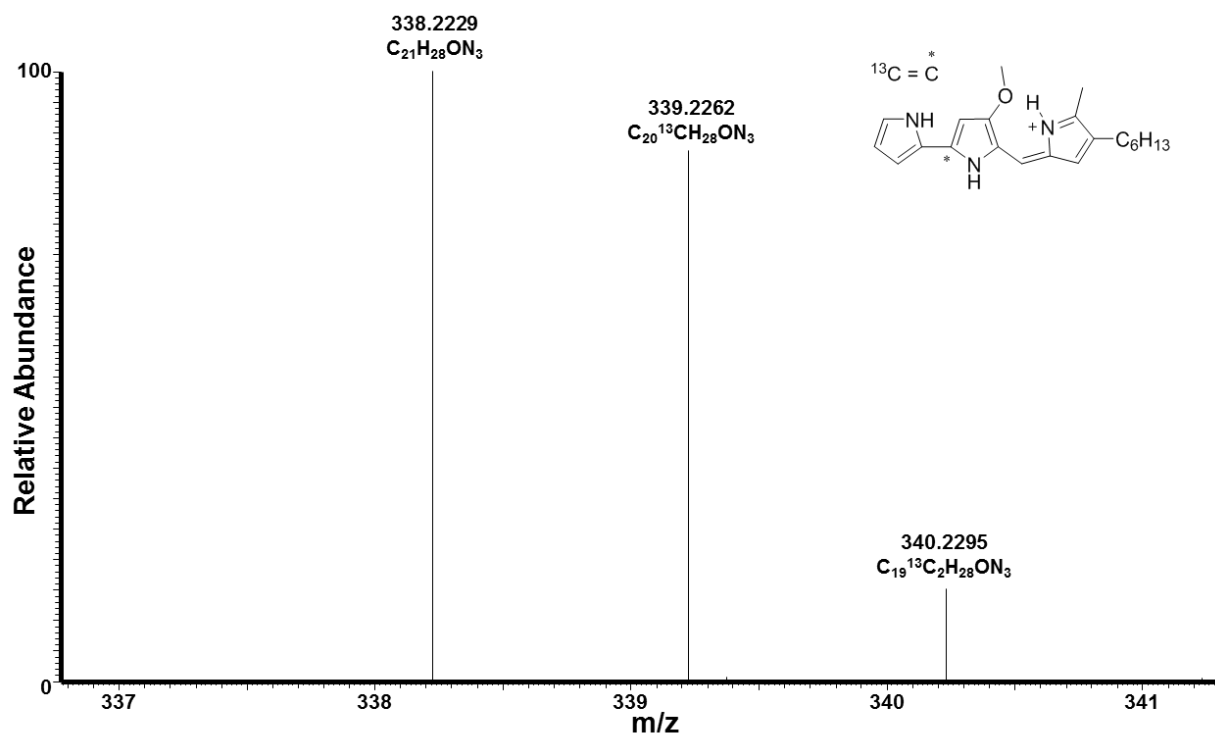


Abb. S340: HRMS-Spektrum von 2-Methyl-3-hexyl-Prodiginin mit eingebautem $[1-^{13}\text{C}]$ -L-Prolin von Nähragar mit 1 mg/mL $[1-^{13}\text{C}]$ -L-Prolin (Verbindung 4 $[\text{M}+\text{H}]^+$: m/z 339, $\text{C}_{20}^{13}\text{CH}_{28}\text{N}_3\text{O}$).

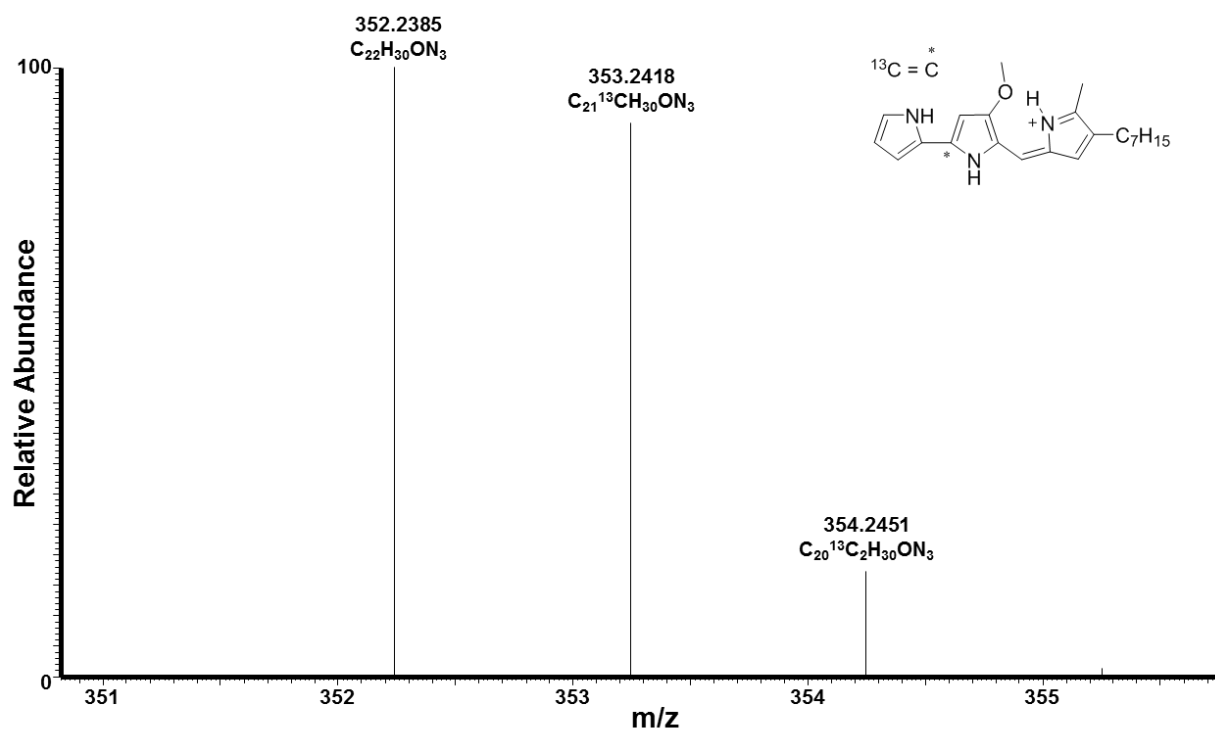


Abb. S341: HRMS-Spektrum von 2-Methyl-3-heptyl-Prodiginin mit eingebautem [1-¹³C]-L-Prolin von Nähragar mit 1 mg/mL [1-¹³C]-L-Prolin (Verbindung **5** $[M+H]^+$: m/z 353, $C_{21}^{13}CH_{30}N_3O$).

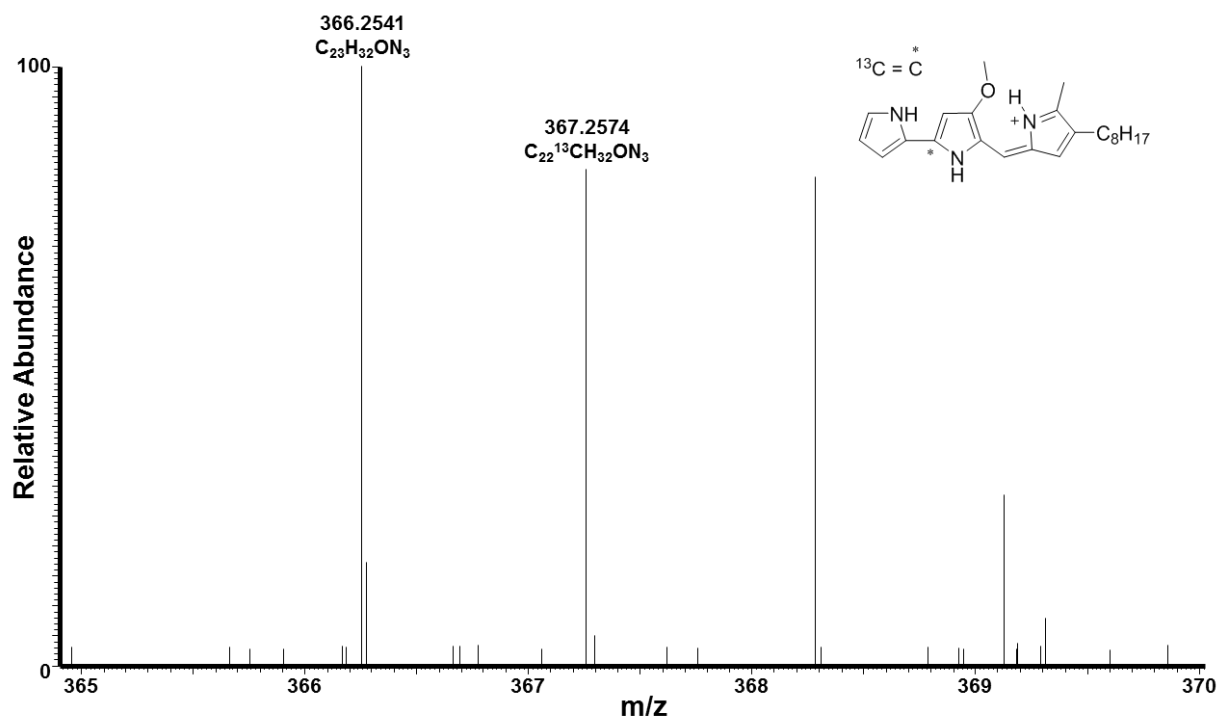


Abb. S342: HRMS-Spektrum von 2-Methyl-3-octyl-Prodiginin mit eingebautem [1-¹³C]-L-Prolin von Nähragar mit 1 mg/mL [1-¹³C]-L-Prolin (Verbindung **6** $[M+H]^+$: m/z 367, $C_{22}^{13}CH_{32}N_3O$).

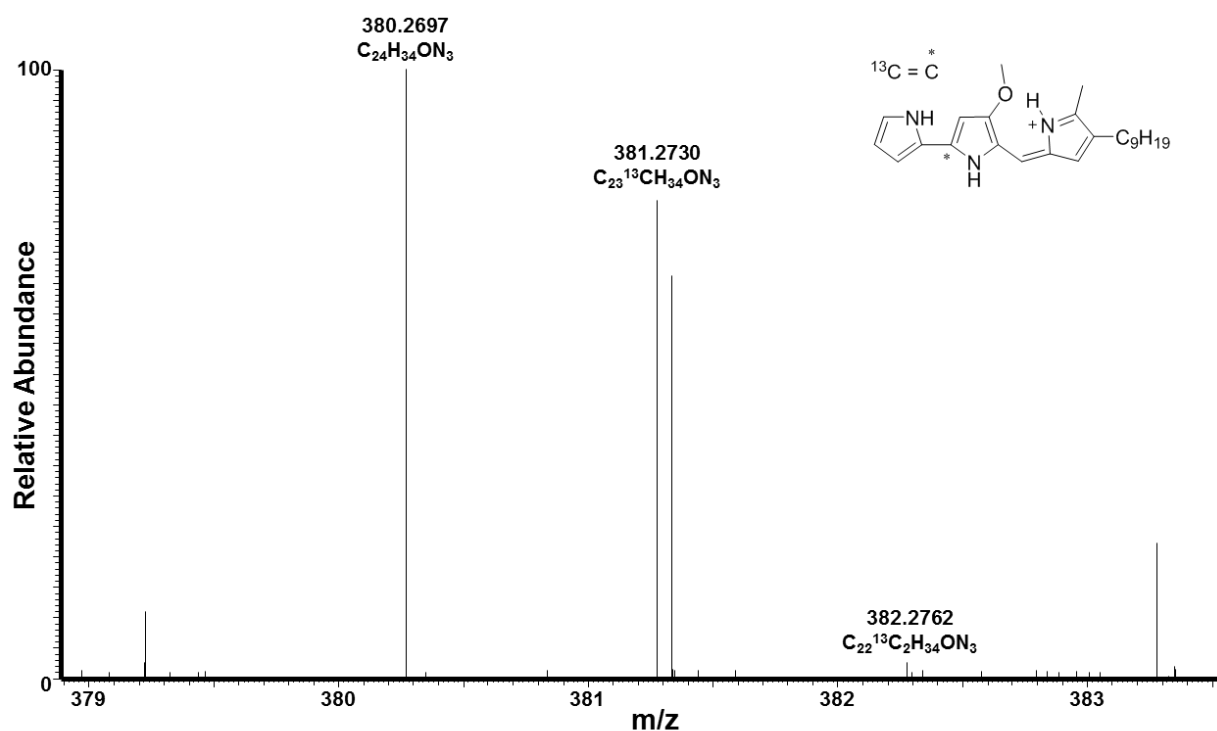


Abb. S343: HRMS-Spektrum von 2-Methyl-3-nonyl-Prodiginin mit eingebautem [1-¹³C]-L-Prolin von Nähragar mit 1 mg/mL [1-¹³C]-L-Prolin (Verbindung 7 [$M+H$]⁺: m/z 381, $C_{23}^{13}CH_{34}N_3O$).

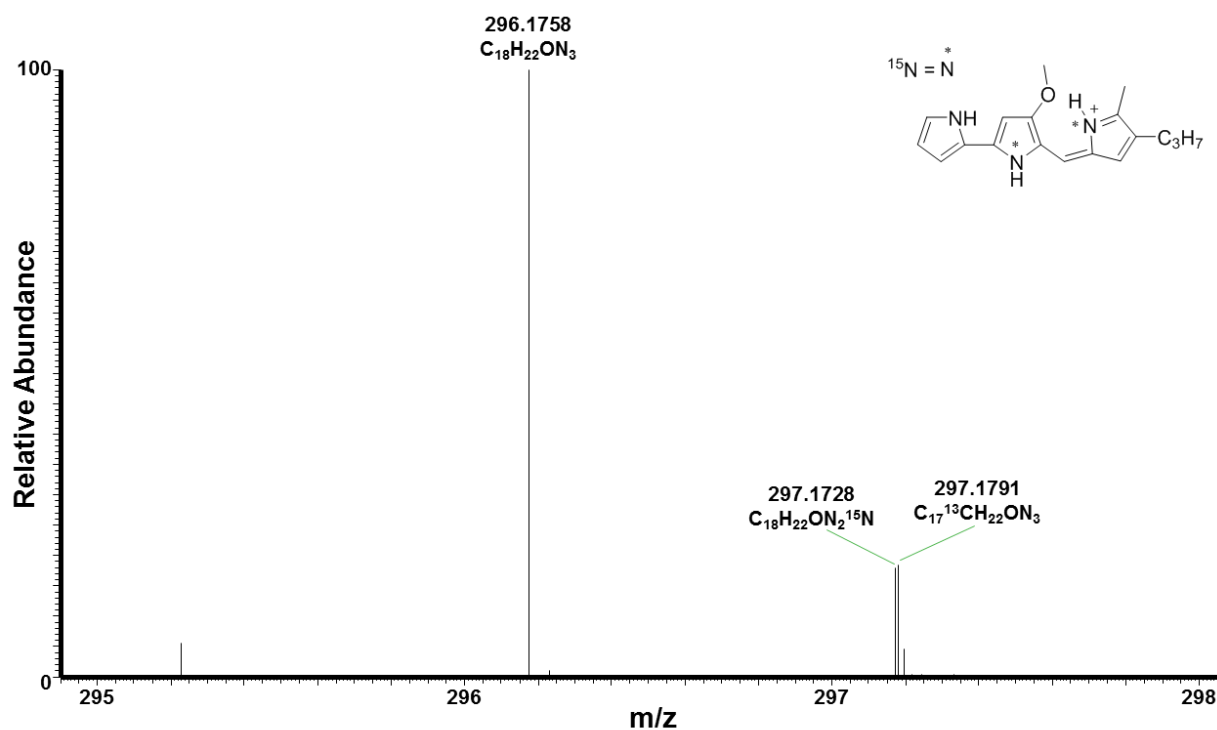


Abb. S344: HRMS-Spektrum von 2-Methyl-3-propyl-Prodiginin mit eingebautem [¹⁵N]-L-Serin von Nähragar mit 1 mg/mL [¹⁵N]-L-Serin (Verbindung 1 [$M+H$]⁺: m/z 296, $C_{18}H_{22}N_3O$).

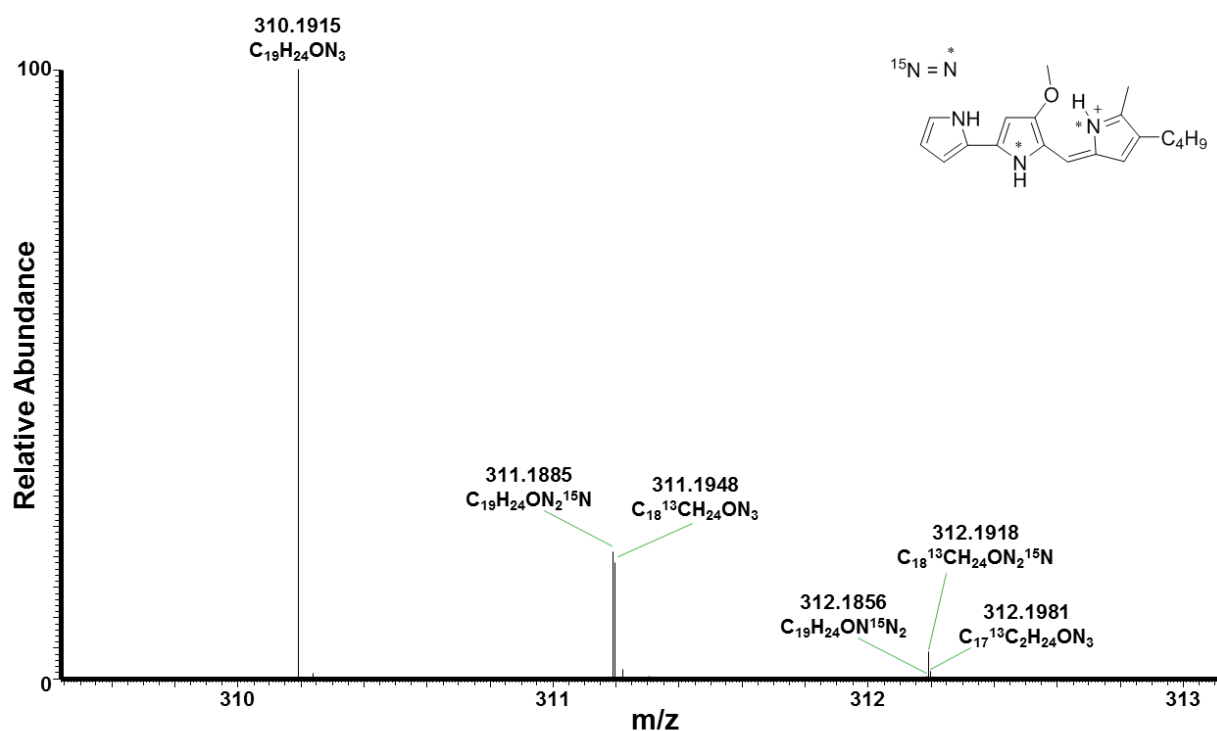


Abb. S345: HRMS-Spektrum von 2-Methyl-3-butyl-Prodiginin mit eingebautem $[^{15}\text{N}]$ -L-Serin von Nähragar mit 1 mg/mL $[^{15}\text{N}]$ -L-Serin (Verbindung 2 $[\text{M}+\text{H}]^+$: m/z 310, $\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{N}_3\text{O}$).

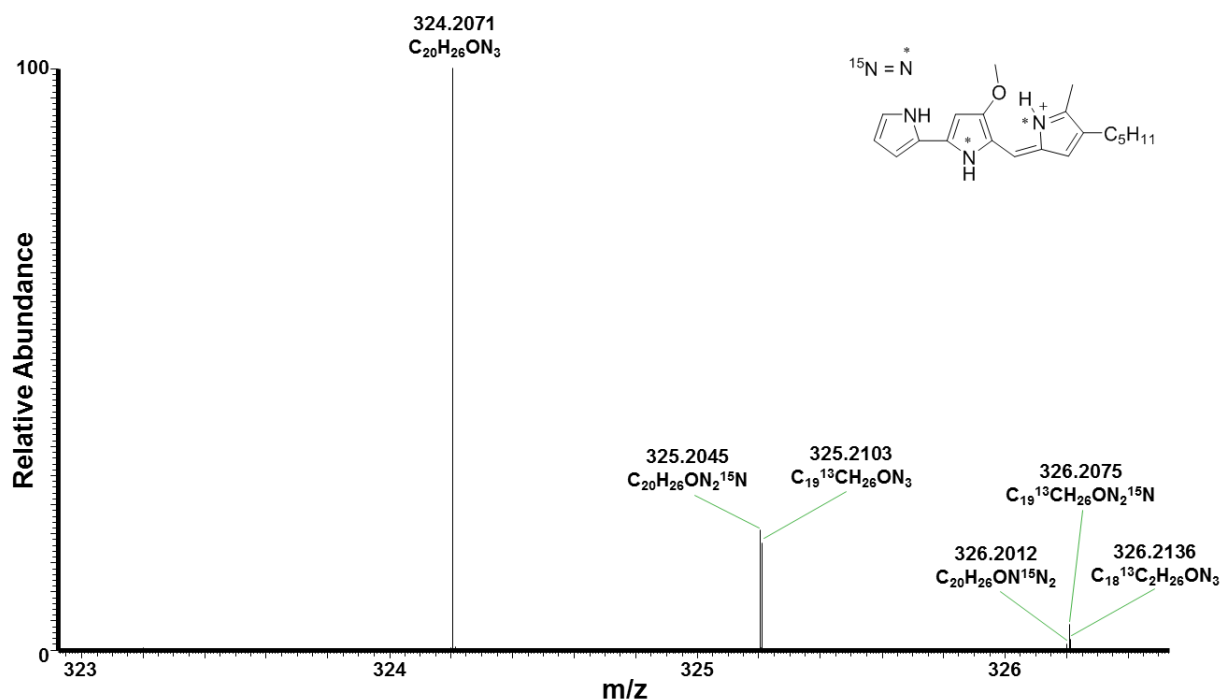


Abb. S346: HRMS-Spektrum von Prodigiosin mit eingebautem $[^{15}\text{N}]$ -L-Serin von Nähragar mit 1 mg/mL $[^{15}\text{N}]$ -L-Serin (Verbindung 3 $[\text{M}+\text{H}]^+$: m/z 324, $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{N}_3\text{O}$).

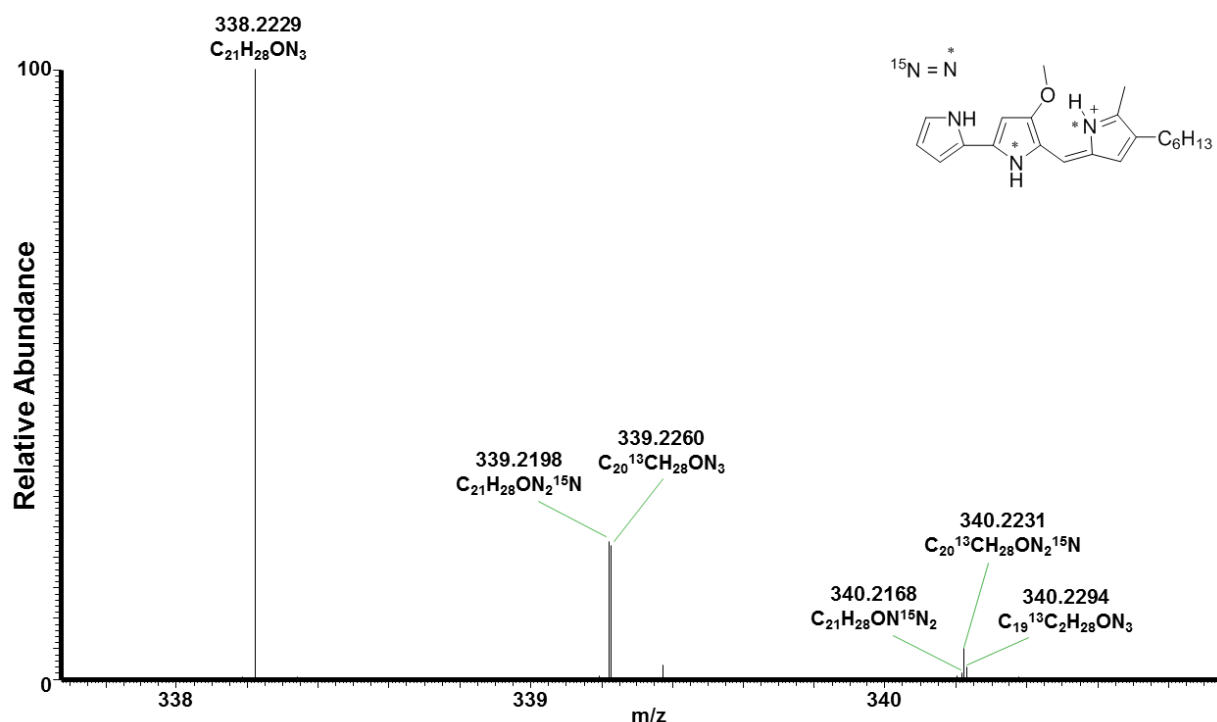


Abb. S347: HRMS-Spektrum von 2-Methyl-3-hexyl-Prodiginin mit eingebautem $[^{15}\text{N}]$ -L-Serin von Nähragar mit 1 mg/mL $[^{15}\text{N}]$ -L-Serin (Verbindung 4 $[\text{M}+\text{H}]^+$: m/z 338, $\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{N}_3\text{O}$).

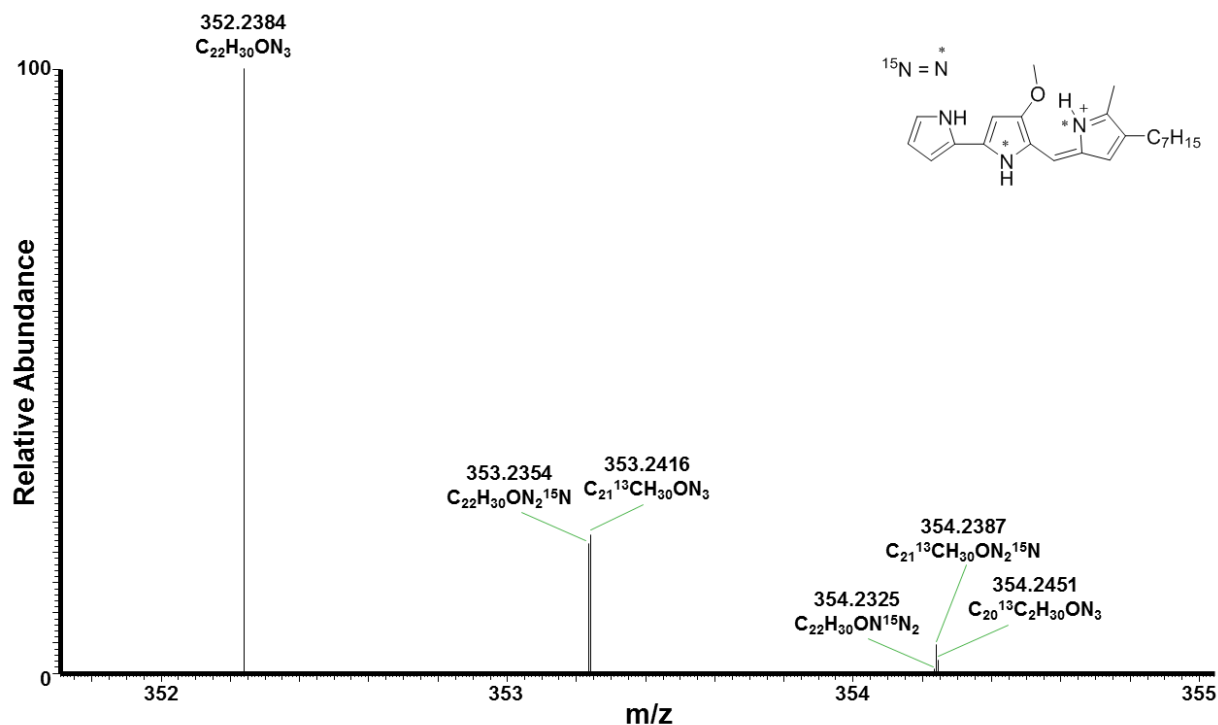


Abb. S348: HRMS-Spektrum von 2-Methyl-3-heptyl-Prodiginin mit eingebautem $[^{15}\text{N}]$ -L-Serin von Nähragar mit 1 mg/mL $[^{15}\text{N}]$ -L-Serin (Verbindung 5 $[\text{M}+\text{H}]^+$: m/z 352, $\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{N}_3\text{O}$).

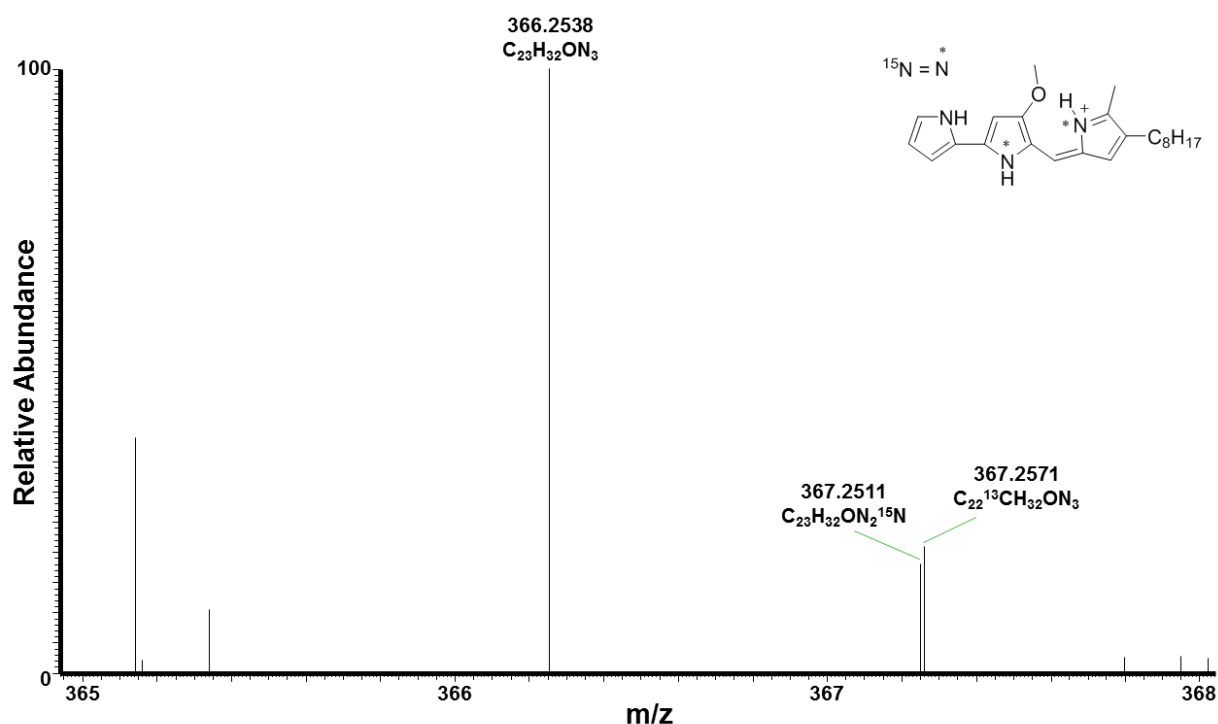


Abb. S349: HRMS-Spektrum von 2-Methyl-3-octyl-Prodiginin mit eingebautem $[^{15}\text{N}]$ -L-Serin von Nähragar mit 1 mg/mL $[^{15}\text{N}]$ -L-Serin (Verbindung 6 $[\text{M}+\text{H}]^+$: m/z 366, $\text{C}_{23}\text{H}_{32}\text{N}_3\text{O}$).

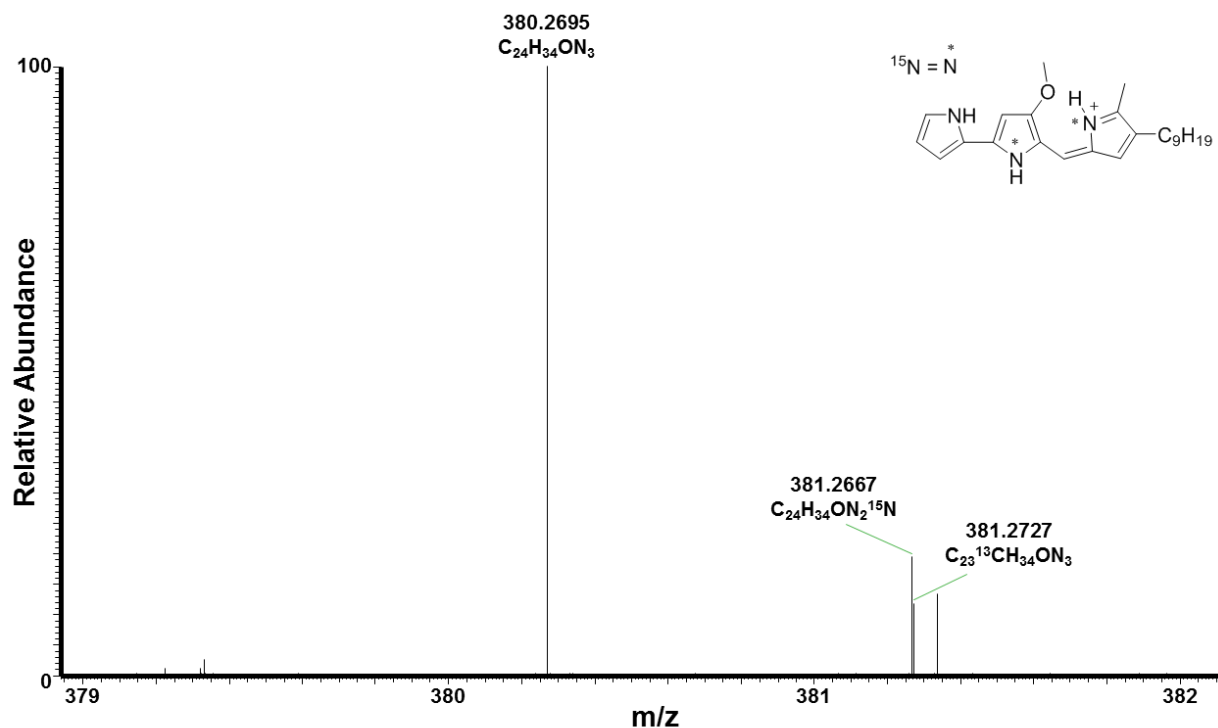


Abb. S350: HRMS-Spektrum von 2-Methyl-3-nonyl-Prodiginin mit eingebautem $[^{15}\text{N}]$ -L-Serin von Nähragar mit 1 mg/mL $[^{15}\text{N}]$ -L-Serin (Verbindung 7 $[\text{M}+\text{H}]^+$: m/z 380, $\text{C}_{24}\text{H}_{34}\text{N}_3\text{O}$).

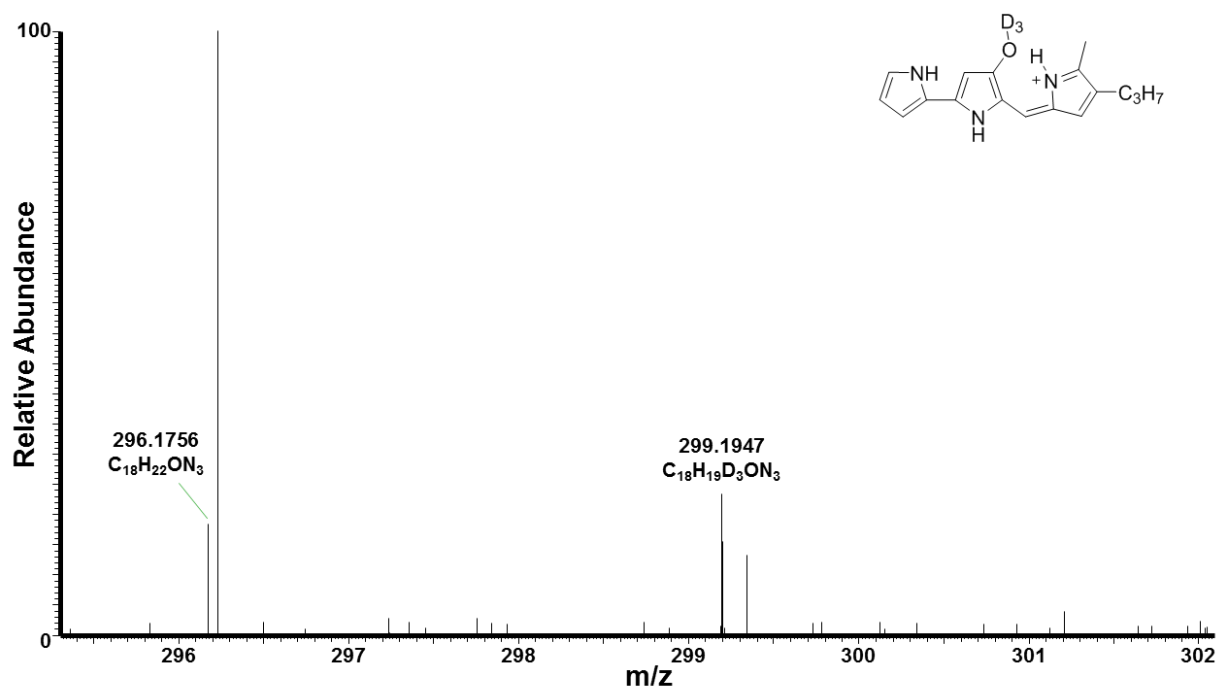


Abb. S351: HRMS-Spektrum von 2-Methyl-3-propyl-Prodiginin mit eingebauter Methyl-D₃ Gruppe von Nähragar mit 0.5 mg/mL [Methyl-D₃]-L-Methionin (Verbindung 1 $[M+H]^+$: m/z 299, $C_{18}H_{19}D_3N_3O$).

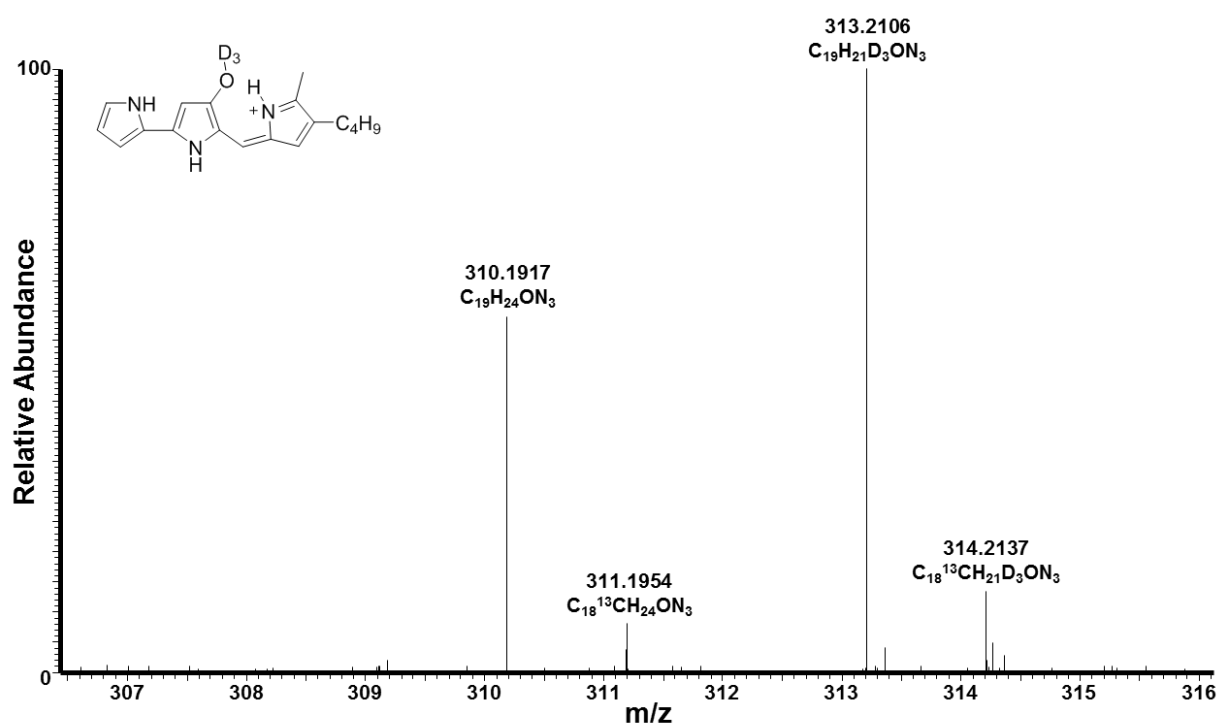


Abb. S352: HRMS-Spektrum von 2-Methyl-3-butyl-Prodiginin mit eingebauter Methyl-D₃ Gruppe von Nähragar mit 0.5 mg/mL [Methyl-D₃]-L-Methionin (Verbindung 2 $[M+H]^+$: m/z 313, $C_{19}H_{21}D_3N_3O$).

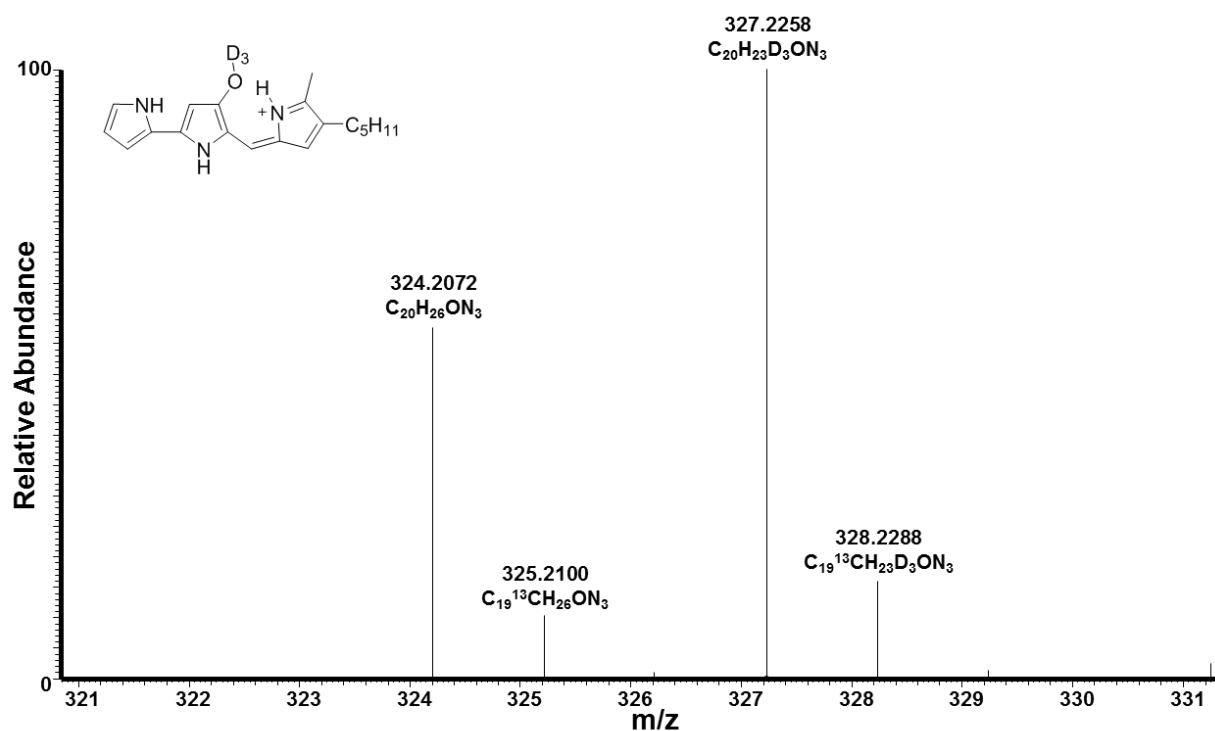


Abb. S353: HRMS-Spektrum von Prodigiosin mit eingebauter Methyl-D₃ Gruppe von Nähragar mit 0.5 mg/mL [Methyl-D₃]-L-Methionin (Verbindung **3** [M+H]⁺: *m/z* 327, C₂₀H₂₃D₃N₃O).

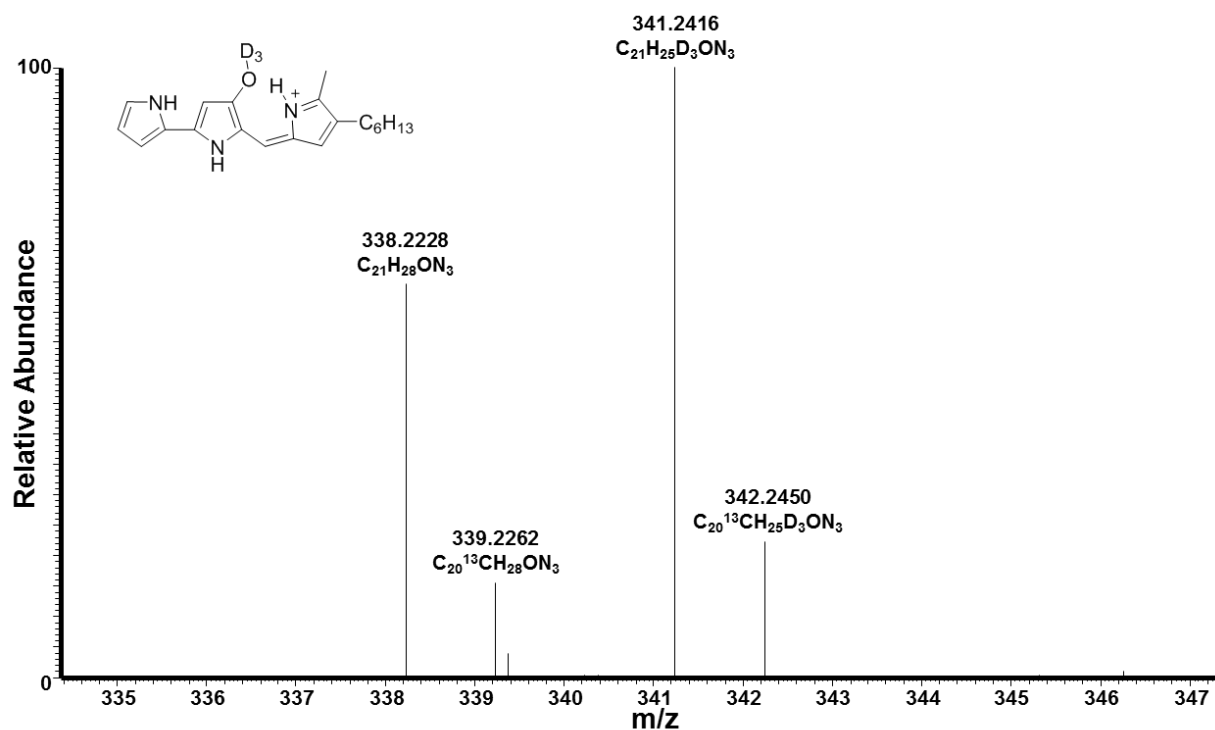


Abb. S354: HRMS-Spektrum von 2-Methyl-3-hexyl-Prodiginin mit eingebauter Methyl-D₃ Gruppe von Nähragar mit 0.5 mg/mL [Methyl-D₃]-L-Methionin (Verbindung **4** [M+H]⁺: *m/z* 341, C₂₁H₂₅D₃N₃O).

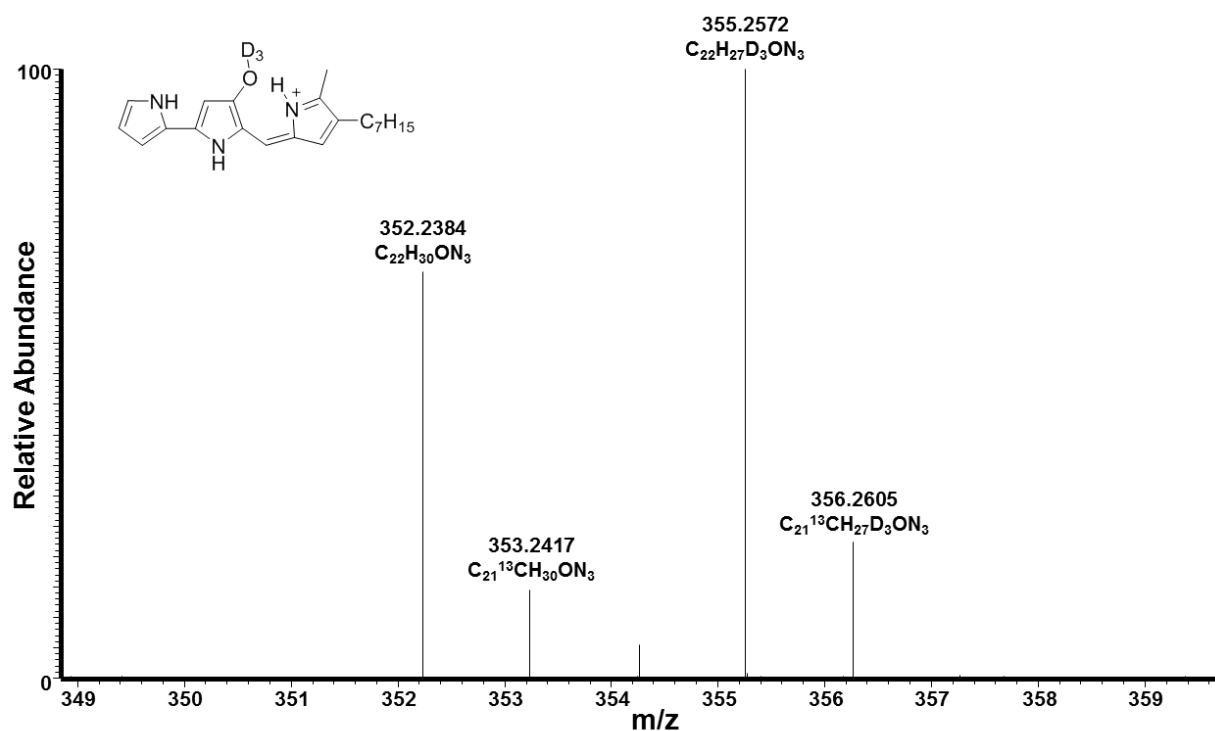


Abb. S355: HRMS-Spektrum von 2-Methyl-3-heptyl-Prodiginin mit eingebauter Methyl-D₃ Gruppe von Nähragar mit 0.5 mg/mL [Methyl-D₃]-L-Methionin (Verbindung **5** $[M+H]^+$: m/z 355, $C_{22}H_{27}D_3N_3O$).

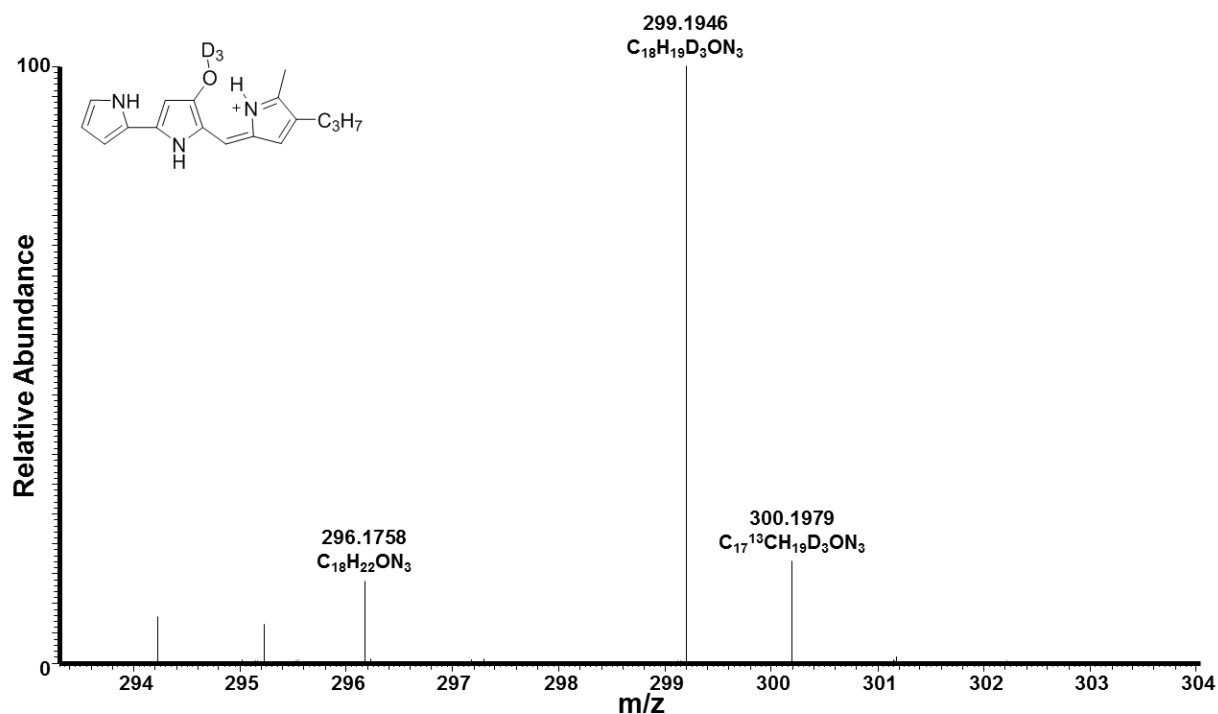


Abb. S356: HRMS-Spektrum von 2-Methyl-3-propyl-Prodiginin mit eingebauter Methyl-D₃ Gruppe von Nähragar mit 2 mg/mL [Methyl-D₃]-L-Methionin (Verbindung **1** $[M+H]^+$: m/z 299, $C_{18}H_{19}D_3N_3O$).

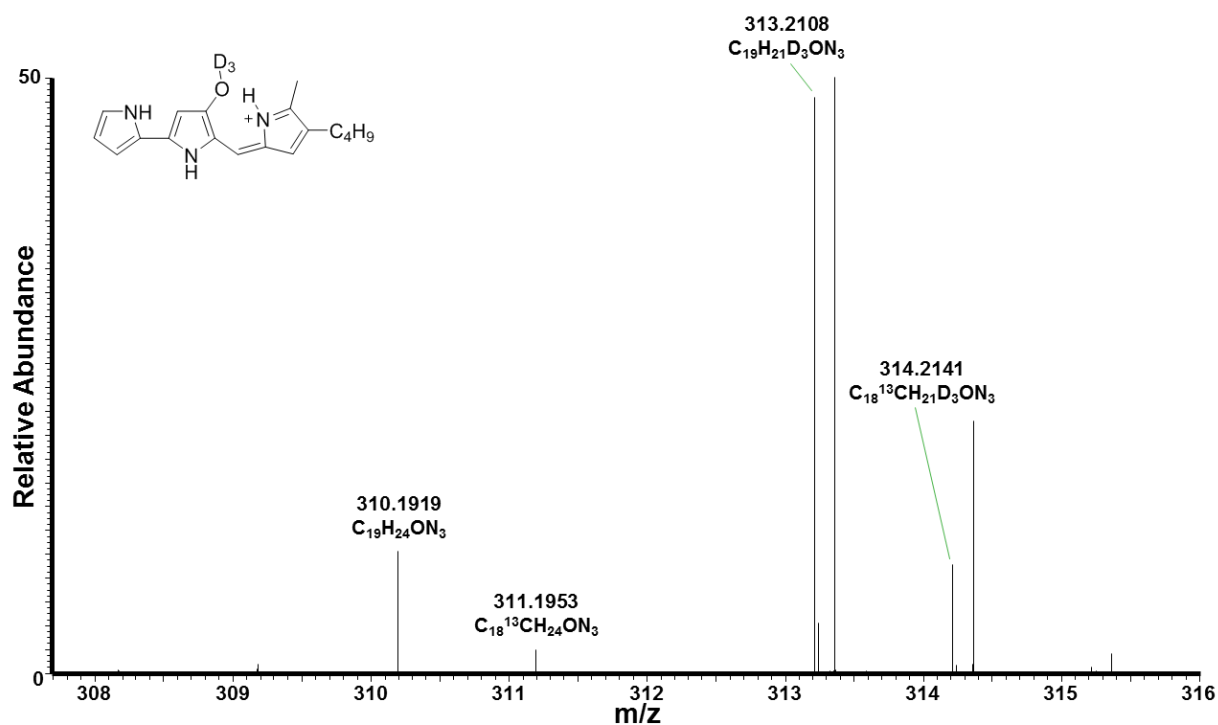


Abb. S357: HRMS-Spektrum von 2-Methyl-3-butyl-Prodiginin mit eingebauter Methyl-D₃ Gruppe von Nähragar mit 2 mg/mL [Methyl-D₃]-L-Methionin (Verbindung 2 [M+H]⁺: *m/z* 313, C₁₉H₂₁D₃N₃O).

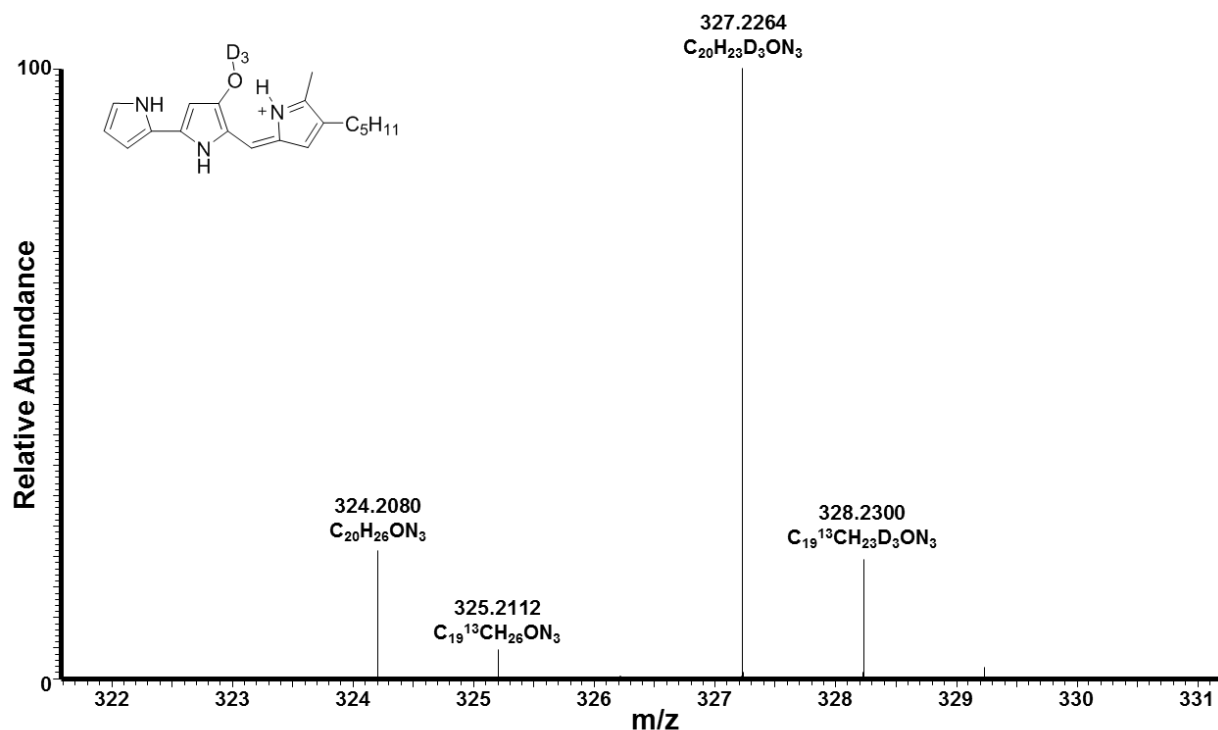


Abb. S358: HRMS-Spektrum von Prodigiosin mit eingebauter Methyl-D₃ Gruppe von Nähragar mit 2 mg/mL [Methyl-D₃]-L-Methionin (Verbindung 3 [M+H]⁺: *m/z* 327, C₂₀H₂₃D₃N₃O).

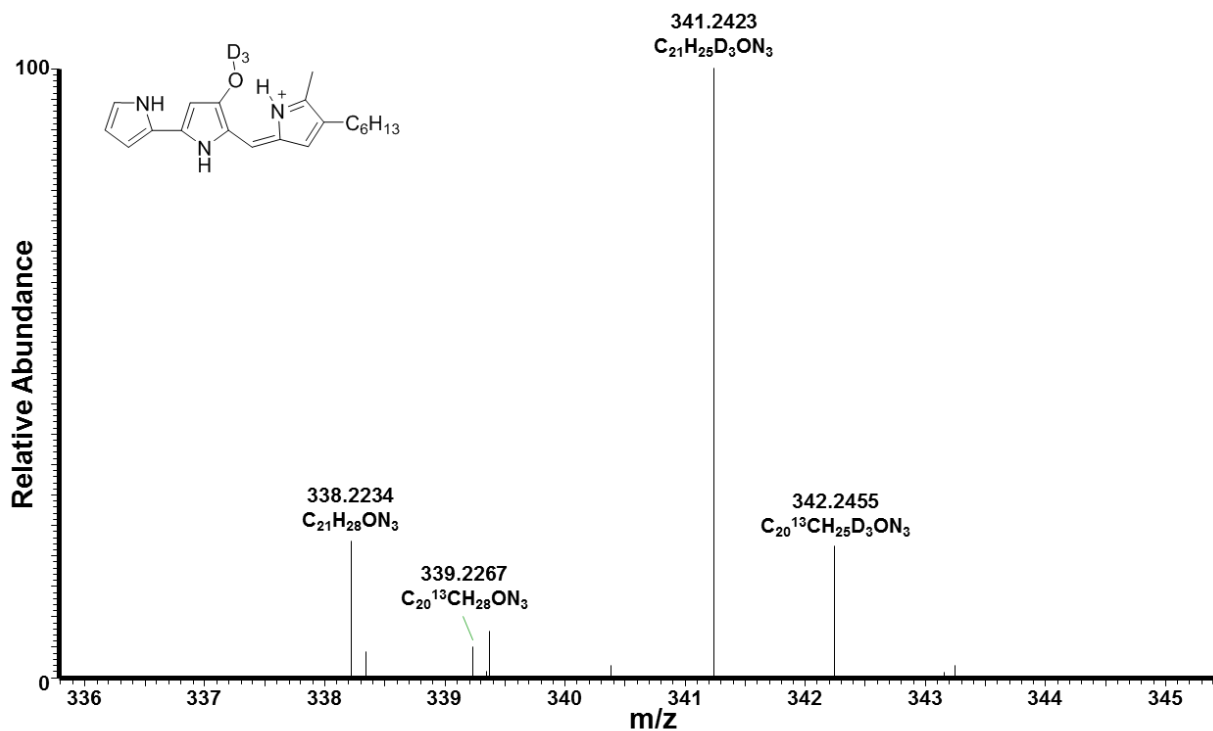


Abb. S359: HRMS-Spektrum von 2-Methyl-3-hexyl-Prodiginin mit eingebauter Methyl-D₃ Gruppe von Nähragar mit 2 mg/mL [Methyl-D₃]-L-Methionin (Verbindung 4 $[M+H]^+$: m/z 341, $C_{21}H_{25}D_3N_3O$).

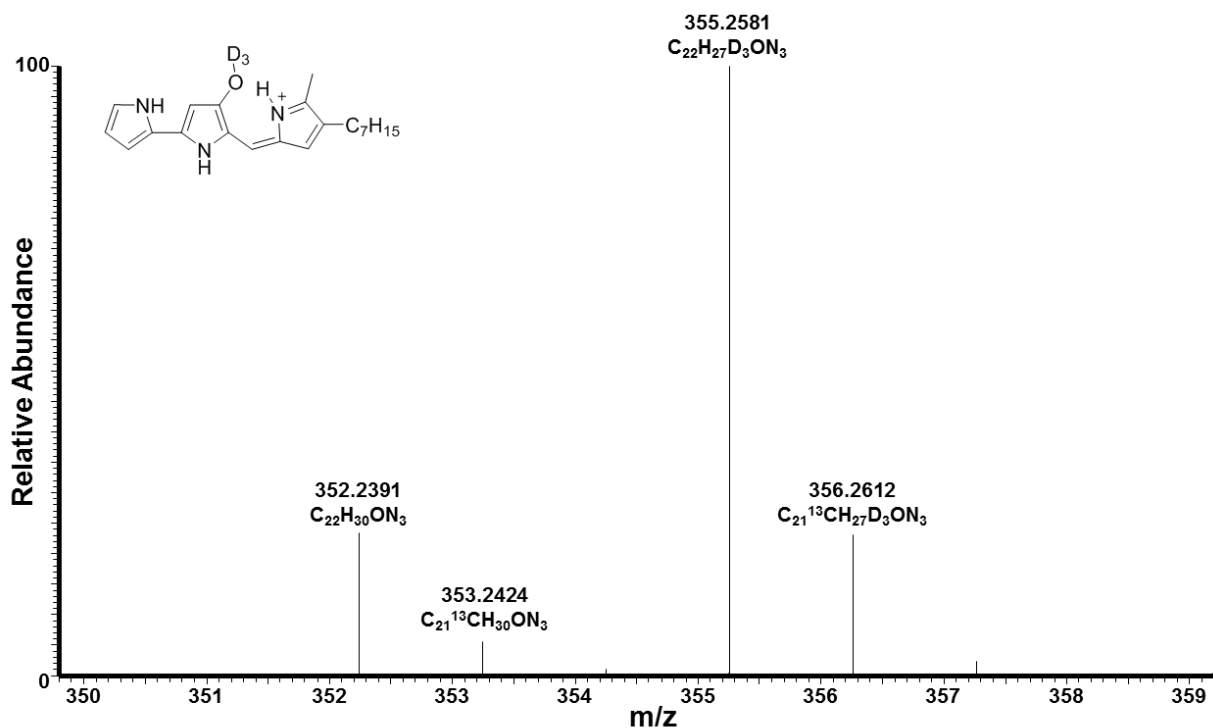


Abb. S360: HRMS-Spektrum von 2-Methyl-3-heptyl-Prodiginin mit eingebauter Methyl-D₃ Gruppe von Nähragar mit 2 mg/mL [Methyl-D₃]-L-Methionin (Verbindung 5 $[M+H]^+$: m/z 355, $C_{22}H_{27}D_3N_3O$).

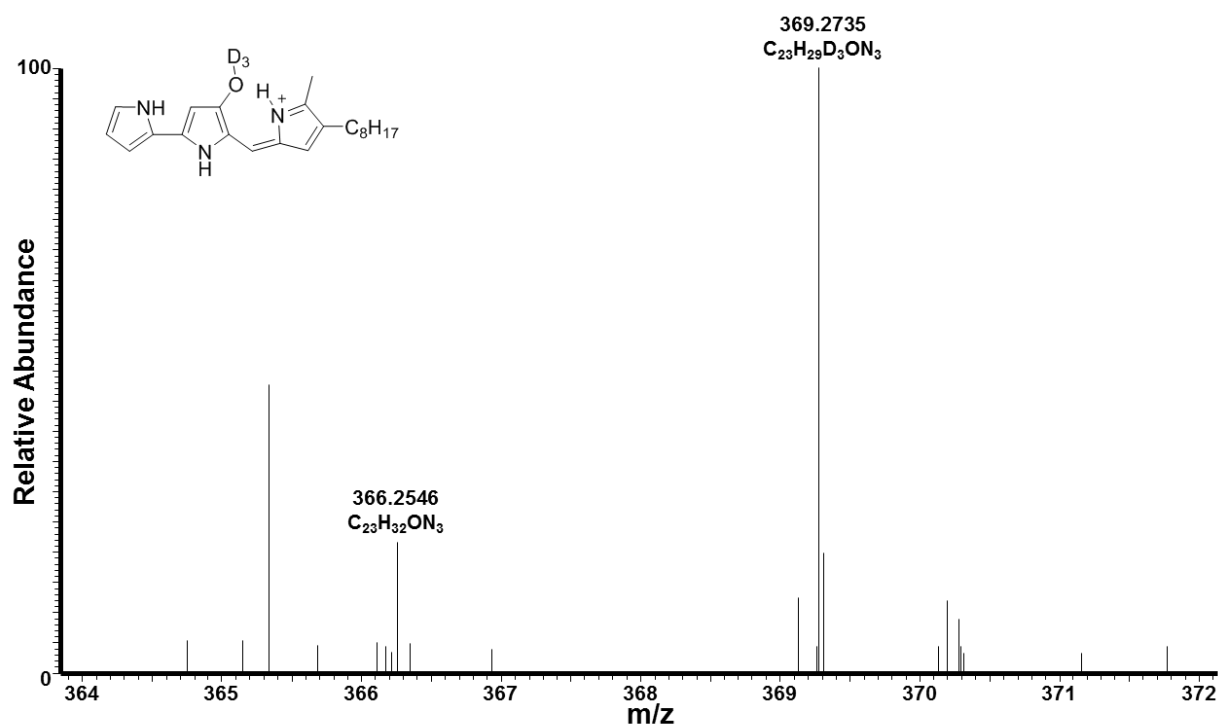


Abb. S361: HRMS-Spektrum von 2-Methyl-3-octyl-Prodiginin mit eingebauter Methyl-D₃ Gruppe von Nähragar mit 2 mg/mL [Methyl-D₃]-L-Methionin (Verbindung 6 $[M+H]^+$: m/z 369, $C_{23}H_{29}D_3N_3O$).

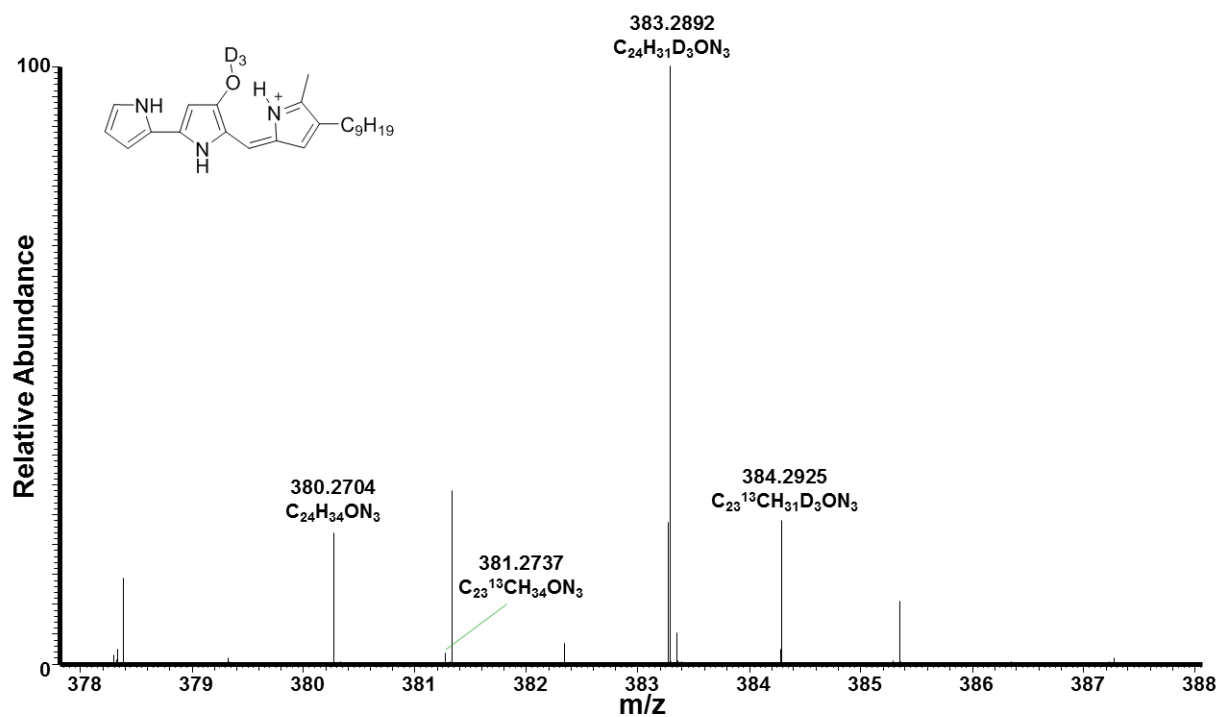


Abb. S362: HRMS-Spektrum von 2-Methyl-3-nonyl-Prodiginin mit eingebauter Methyl-D₃ Gruppe von Nähragar mit 2 mg/mL [Methyl-D₃]-L-Methionin (Verbindung 7 $[M+H]^+$: m/z 383, $C_{24}H_{31}D_3N_3O$).

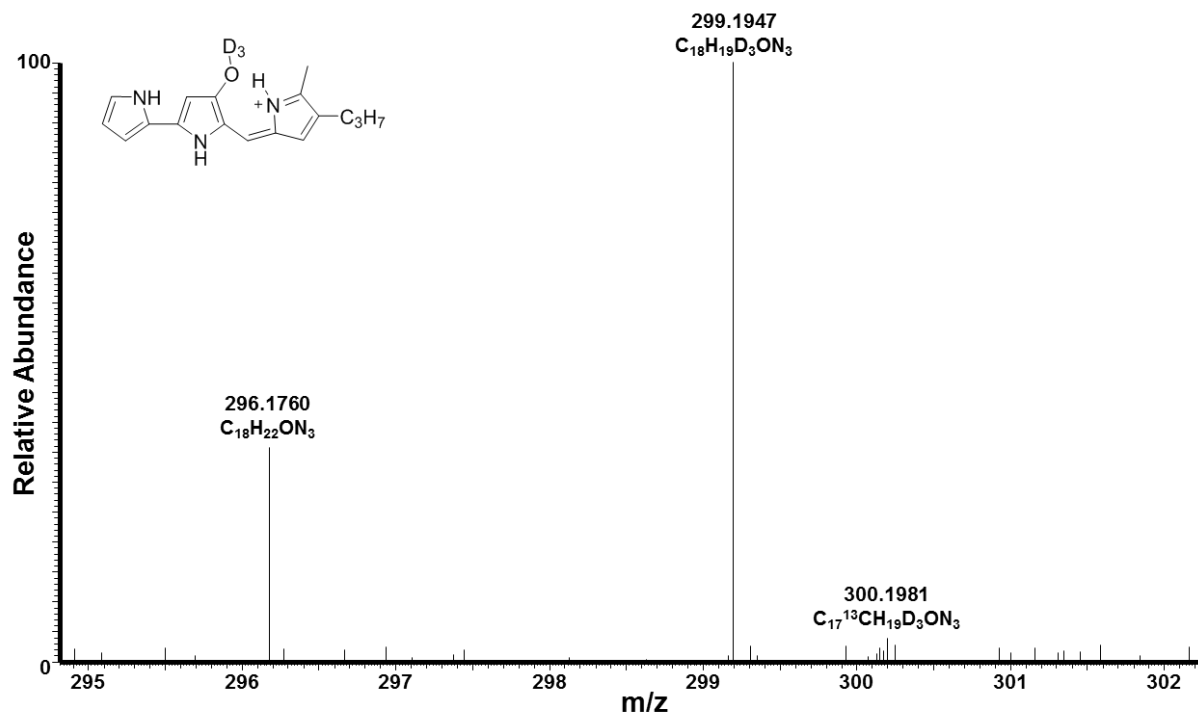


Abb. S363: HRMS-Spektrum von 2-Methyl-3-propyl-Prodiginin mit eingebauter Methyl-D₃ Gruppe von Kartoffel-Dextrose-Agar mit 1 mg/mL [Methyl-D₃]-L-Methionin (Verbindung **1** $[M+H]^+$: m/z 299, $C_{18}H_{19}D_3N_3O$).

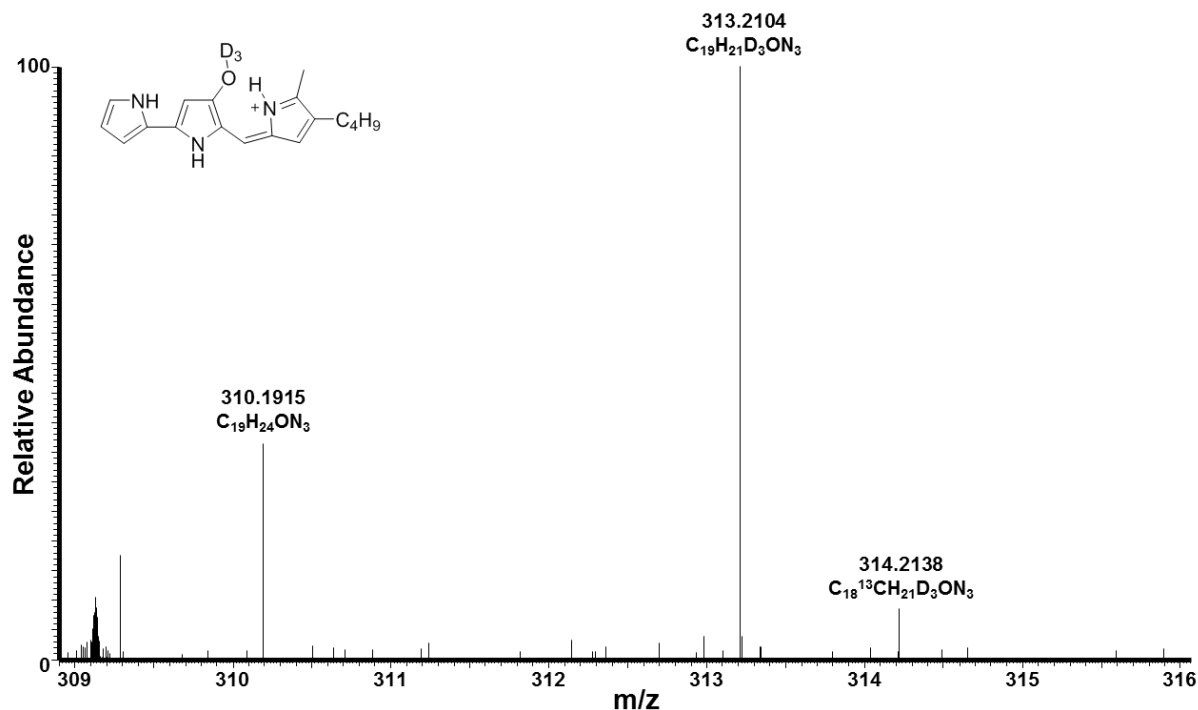


Abb. S364: HRMS-Spektrum von 2-Methyl-3-butyl-Prodiginin mit eingebauter Methyl-D₃ Gruppe von Kartoffel-Dextrose-Agar mit 1 mg/mL [Methyl-D₃]-L-Methionin (Verbindung **2** $[M+H]^+$: m/z 313, $C_{19}H_{21}D_3N_3O$).

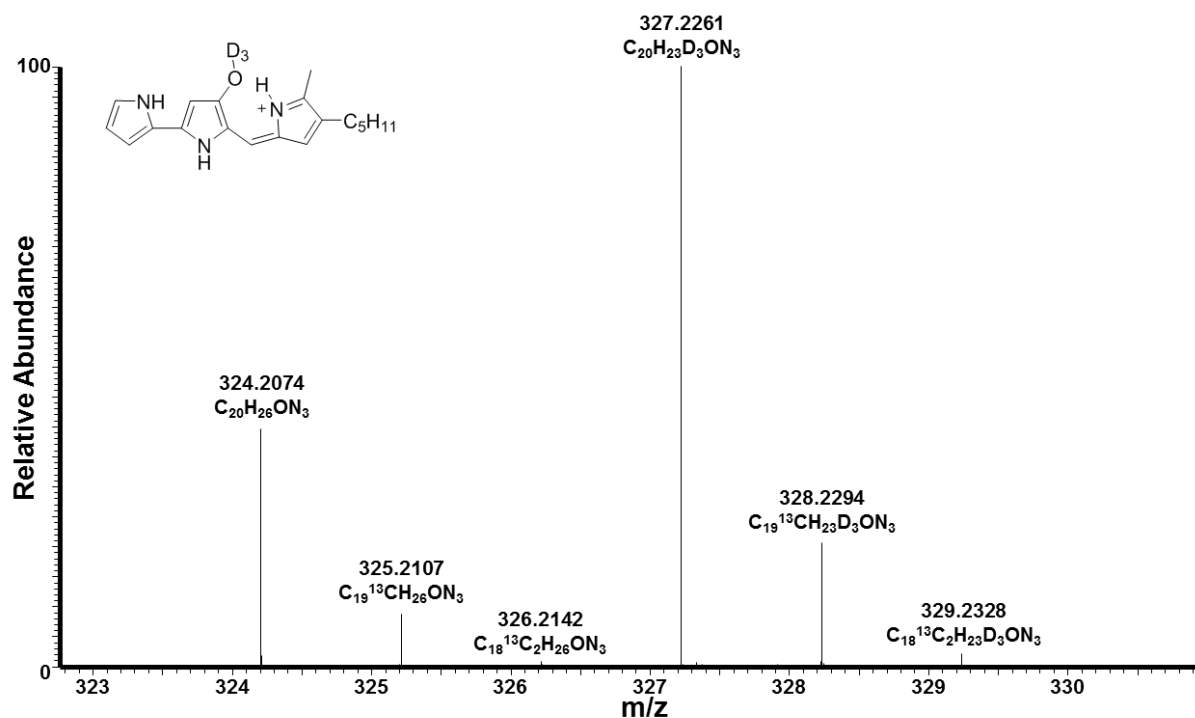


Abb. S365: HRMS-Spektrum von Prodigiosin mit eingebauter Methyl-D₃ Gruppe von Kartoffel-Dextrose-Agar mit 1 mg/mL [Methyl-D₃]-L-Methionin (Verbindung **3** [M+H]⁺: *m/z* 327, C₂₀H₂₃D₃N₃O).

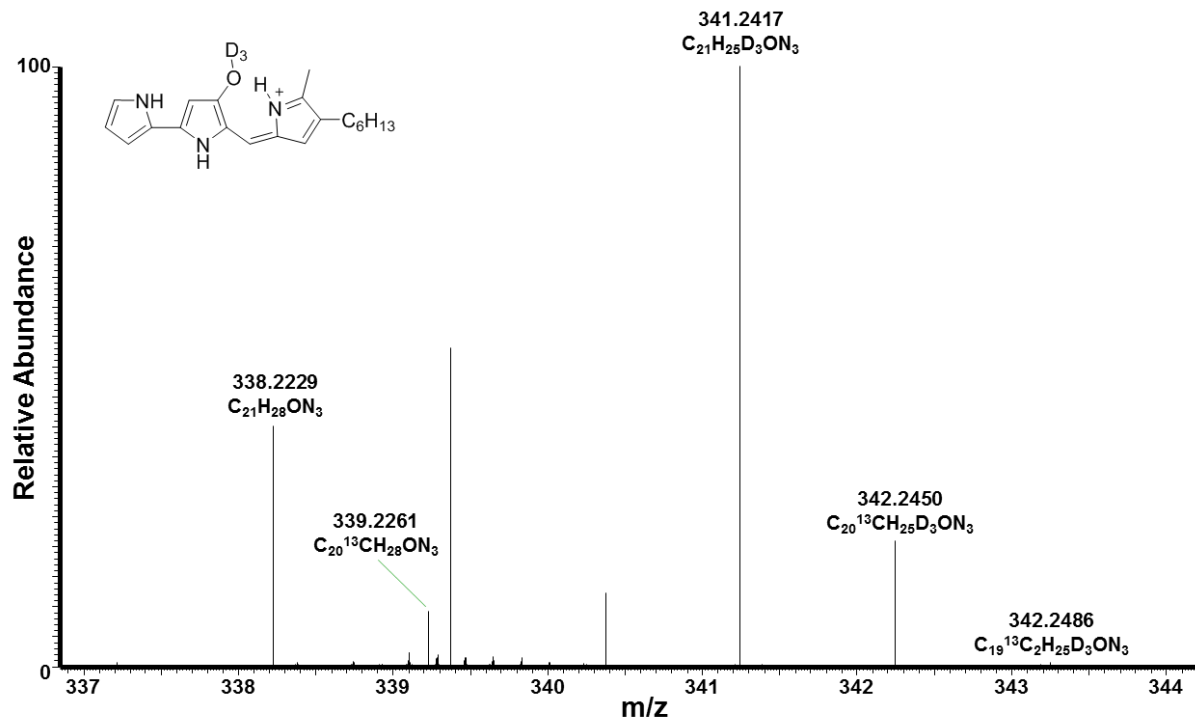


Abb. S366: HRMS-Spektrum von 2-Methyl-3-hexyl-Prodiginin mit eingebauter Methyl-D₃ Gruppe von Kartoffel-Dextrose-Agar mit 1 mg/mL [Methyl-D₃]-L-Methionin (Verbindung **4** [M+H]⁺: *m/z* 341, C₂₁H₂₅D₃N₃O).

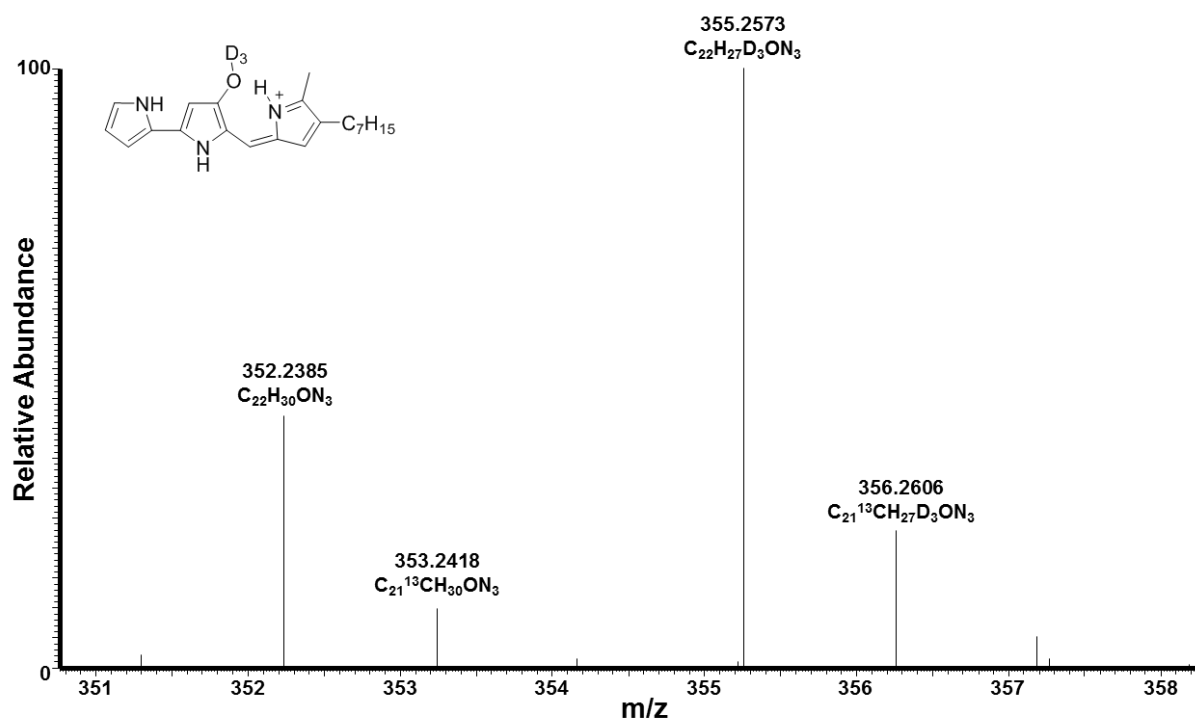


Abb. S367: HRMS-Spektrum von 2-Methyl-3-heptyl-Prodiginin mit eingebauter Methyl-D₃ Gruppe von Kartoffel-Dextrose-Agar mit 1 mg/mL [Methyl-D₃]-L-Methionin (Verbindung **5** [$M+H$]⁺: m/z 355, $C_{22}H_{27}D_3N_3O$).

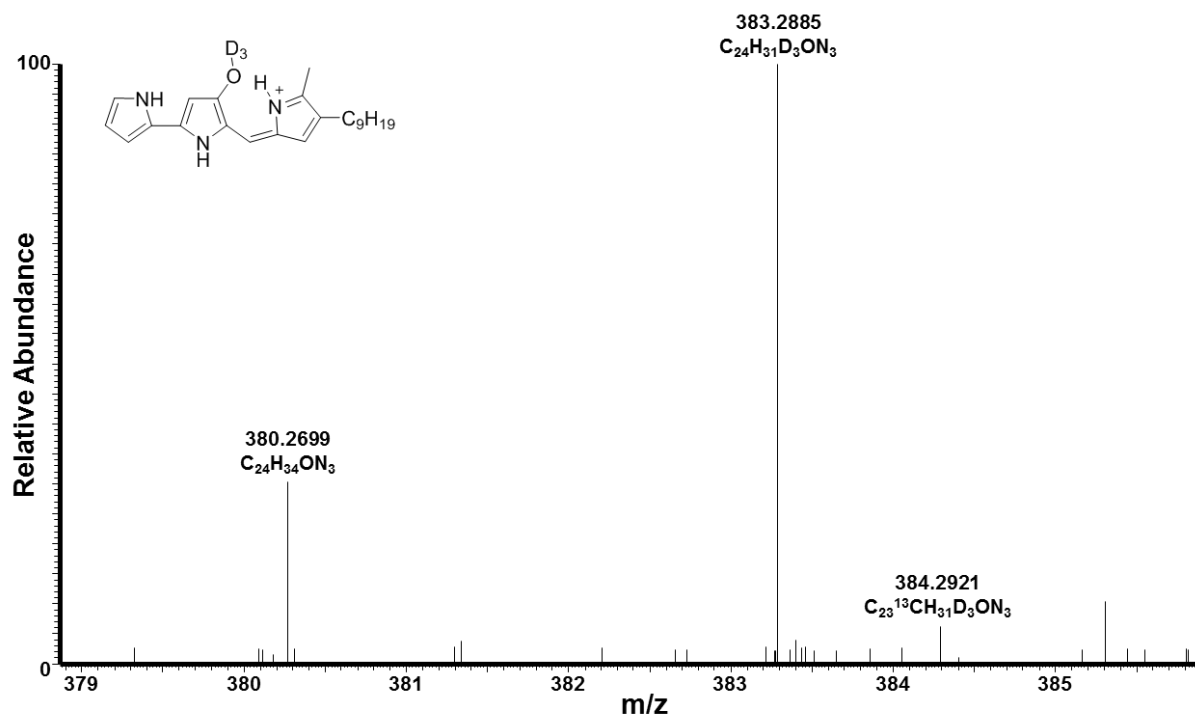


Abb. S368: HRMS-Spektrum von 2-Methyl-3-nonyl-Prodiginin mit eingebauter Methyl-D₃ Gruppe von Kartoffel-Dextrose-Agar mit 1 mg/mL [Methyl-D₃]-L-Methionin (Verbindung **7** [$M+H$]⁺: m/z 383, $C_{24}H_{31}D_3N_3O$).

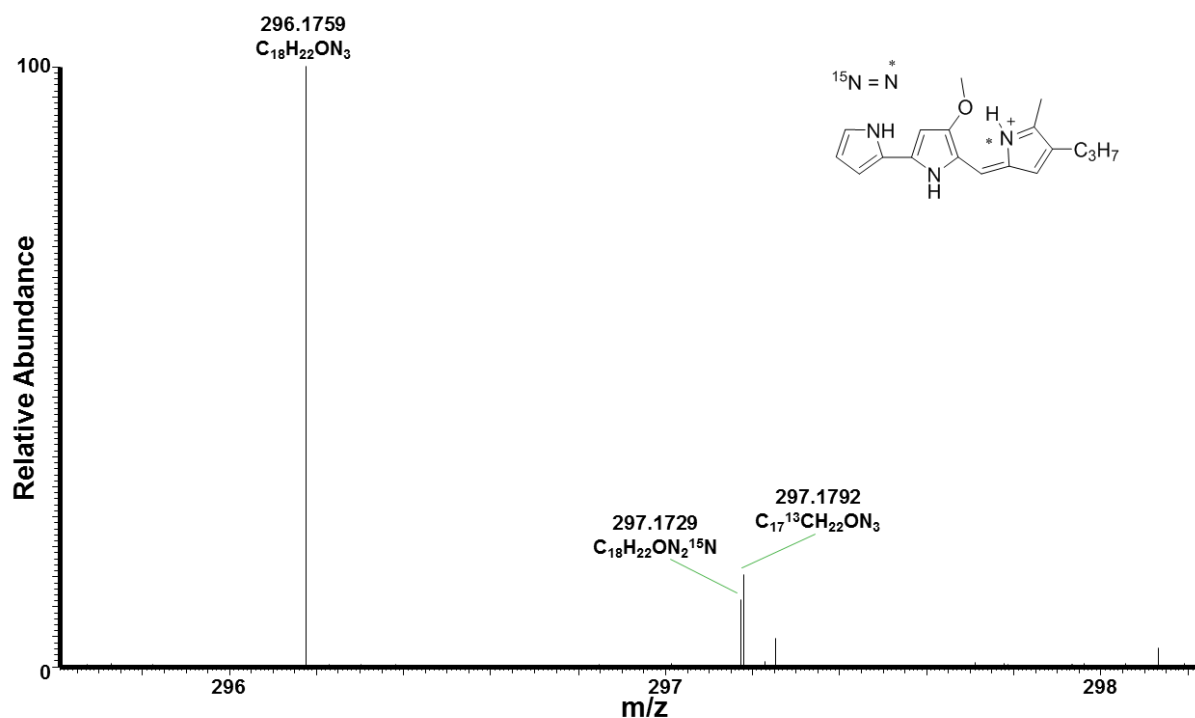


Abb. S369: HRMS-Spektrum von 2-Methyl-3-propyl-Prodiginin mit eingebautem ^{15}N von Kartoffel-Dextrose-Agar mit 1 mg/mL $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ (Verbindung 1 $[\text{M}+\text{H}]^+$: m/z 297, $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{N}_2^{15}\text{NO}$).

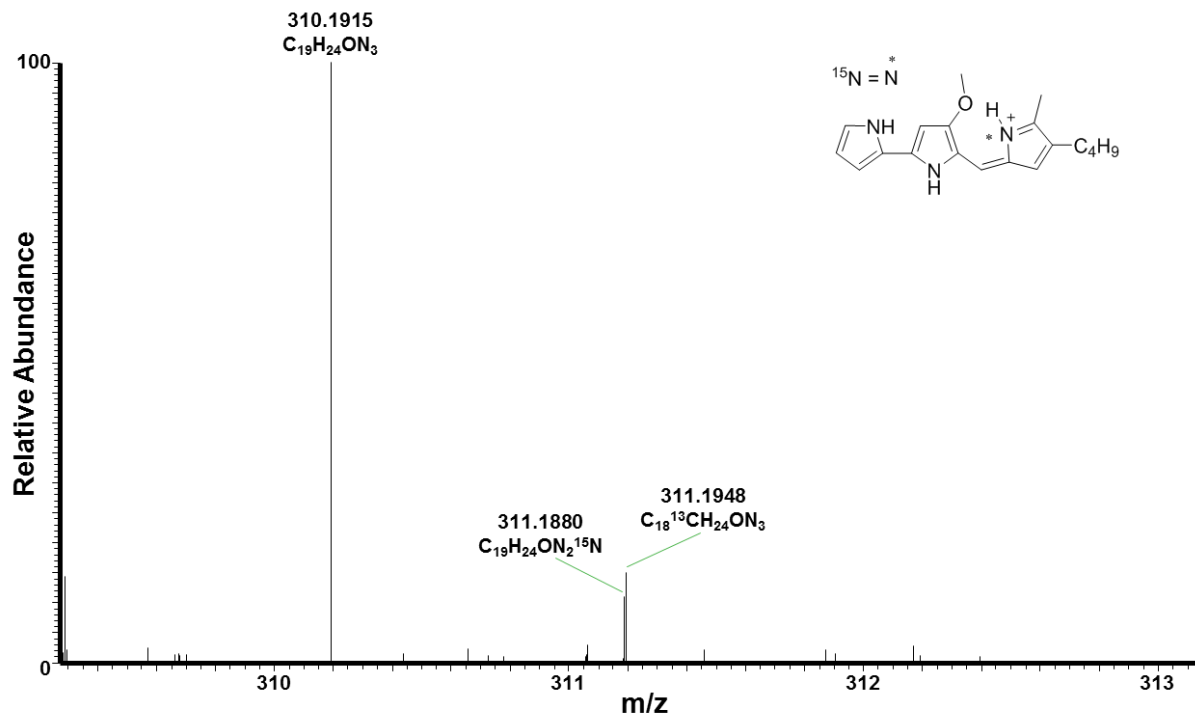


Abb. S370: HRMS-Spektrum von 2-Methyl-3-butyl-Prodiginin mit eingebautem ^{15}N von Kartoffel-Dextrose-Agar mit 1 mg/mL $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ (Verbindung 2 $[\text{M}+\text{H}]^+$: m/z 311, $\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{N}_2^{15}\text{NO}$).

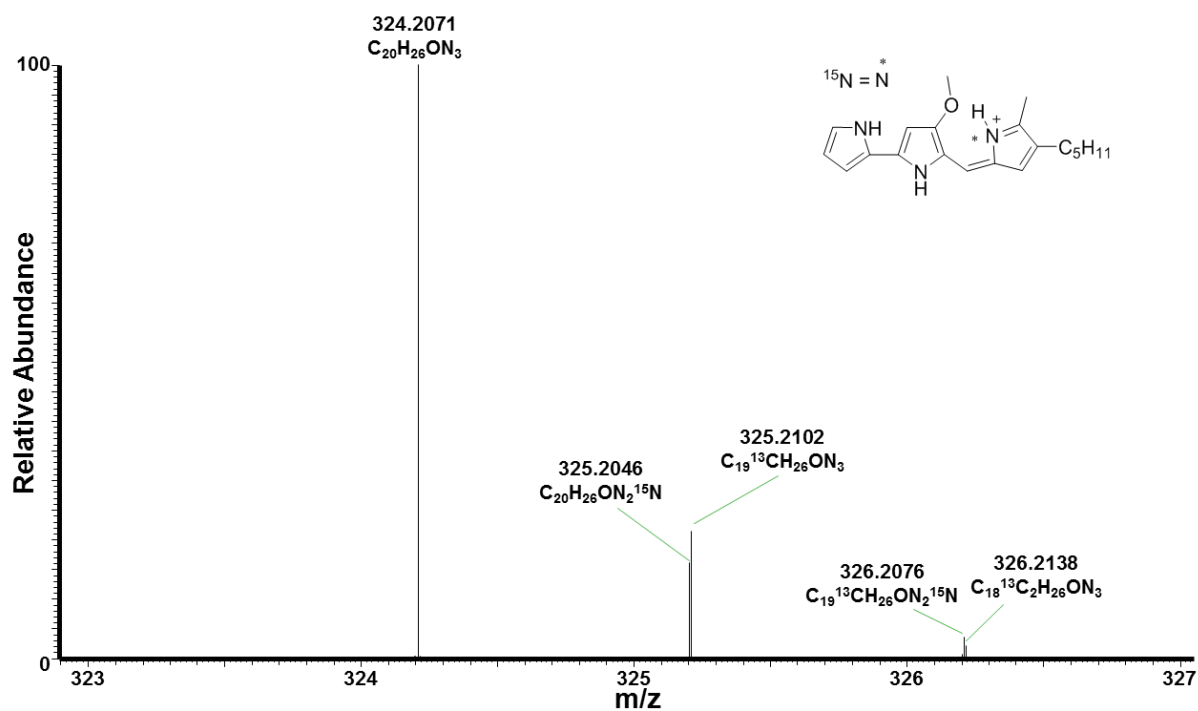


Abb. S371: HRMS-Spektrum von Prodigiosin mit eingebautem ^{15}N von Kartoffel-Dextrose-Agar mit 1 mg/mL $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ (Verbindung 3 $[\text{M}+\text{H}]^+$: m/z 325, $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{N}_2^{15}\text{NO}$).

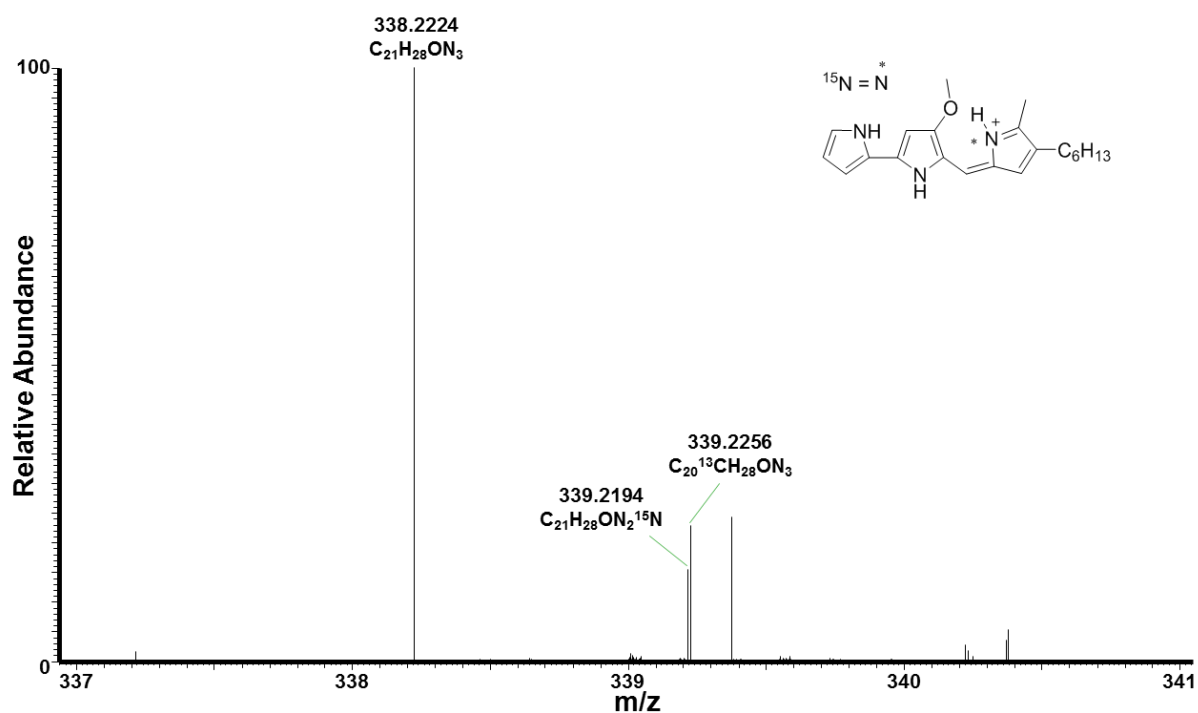


Abb. S372: HRMS-Spektrum von 2-Methyl-3-hexyl-Prodiginin mit eingebautem ^{15}N von Kartoffel-Dextrose-Agar mit 1 mg/mL $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ (Verbindung 4 $[\text{M}+\text{H}]^+$: m/z 339, $\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{N}_2^{15}\text{NO}$).

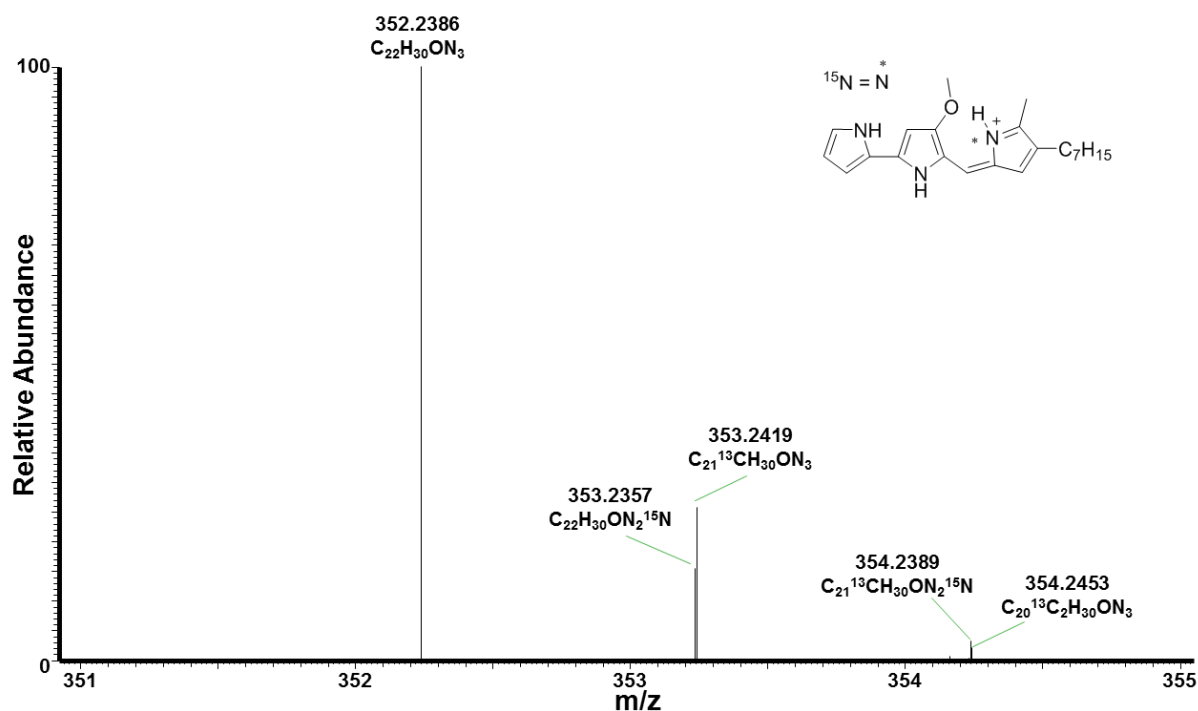


Abb. S373: HRMS-Spektrum von 2-Methyl-3-heptyl-Prodiginin mit eingebautem ^{15}N von Kartoffel-Dextrose-Agar mit 1 mg/mL $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ (Verbindung 5 $[\text{M}+\text{H}]^+$: m/z 353, $\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{N}_2^{15}\text{NO}$).

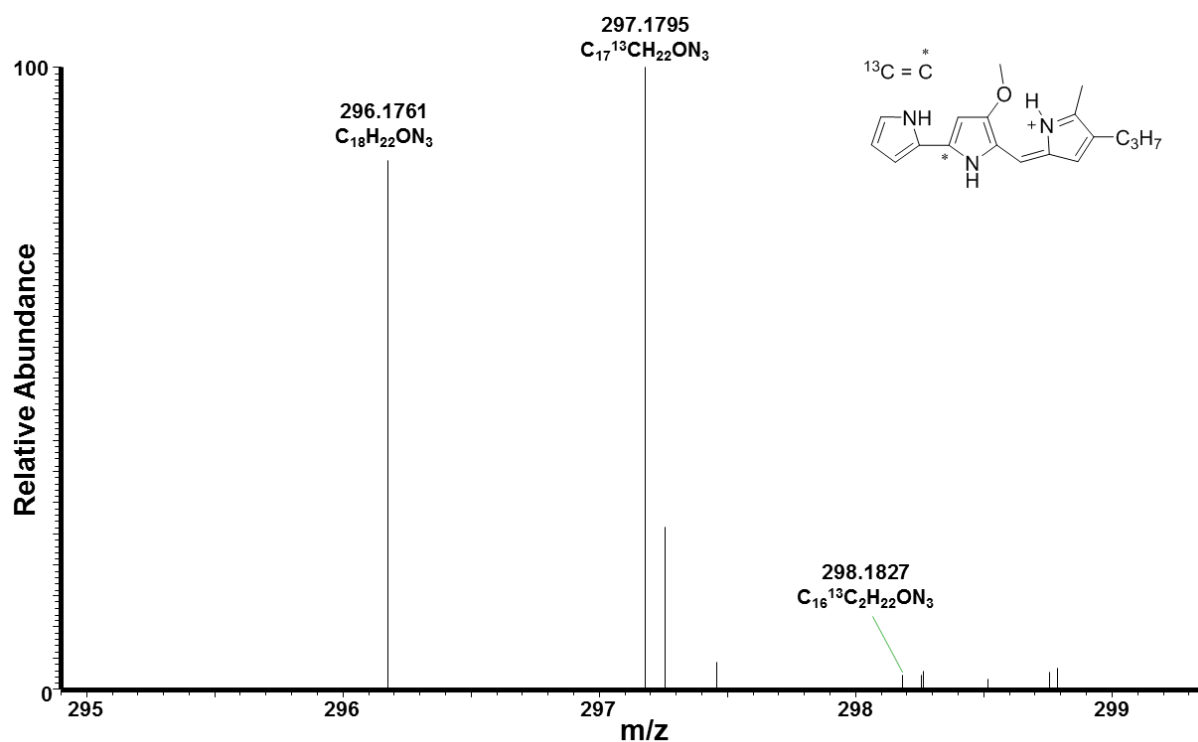


Abb. S374: HRMS-Spektrum von 2-Methyl-3-propyl-Prodiginin mit eingebautem $[1-^{13}\text{C}]$ -L-Prolin von Kartoffel-Dextrose-Agar mit 1 mg/mL $[1-^{13}\text{C}]$ -L-Prolin (Verbindung 1 $[\text{M}+\text{H}]^+$: m/z 297, $\text{C}_{17}^{13}\text{CH}_{22}\text{N}_3\text{O}$).

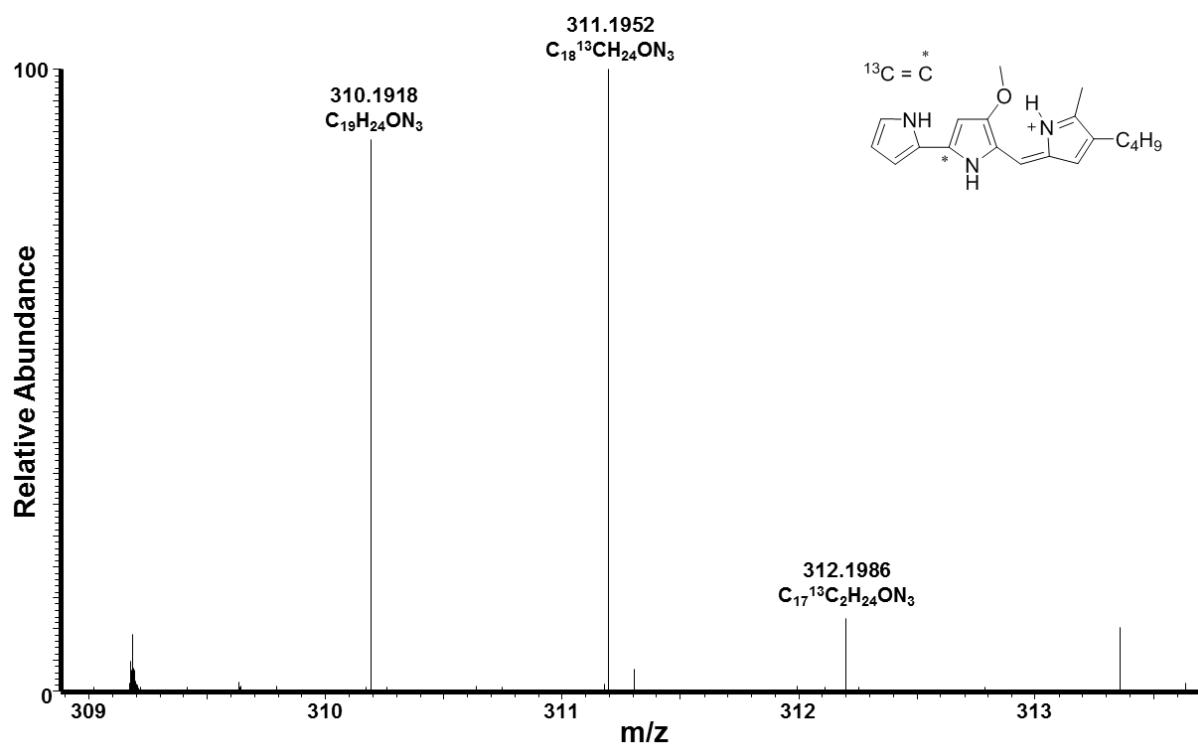


Abb. S375: HRMS-Spektrum von 2-Methyl-3-butyl-Prodiginin mit eingebautem [1-¹³C]-L-Prolin von Kartoffel-Dextrose-Agar mit 1 mg/mL [1-¹³C]-L-Prolin (Verbindung 2 [$M+H$]⁺: m/z 311, $C_{18}^{13}CH_{24}N_3O$).

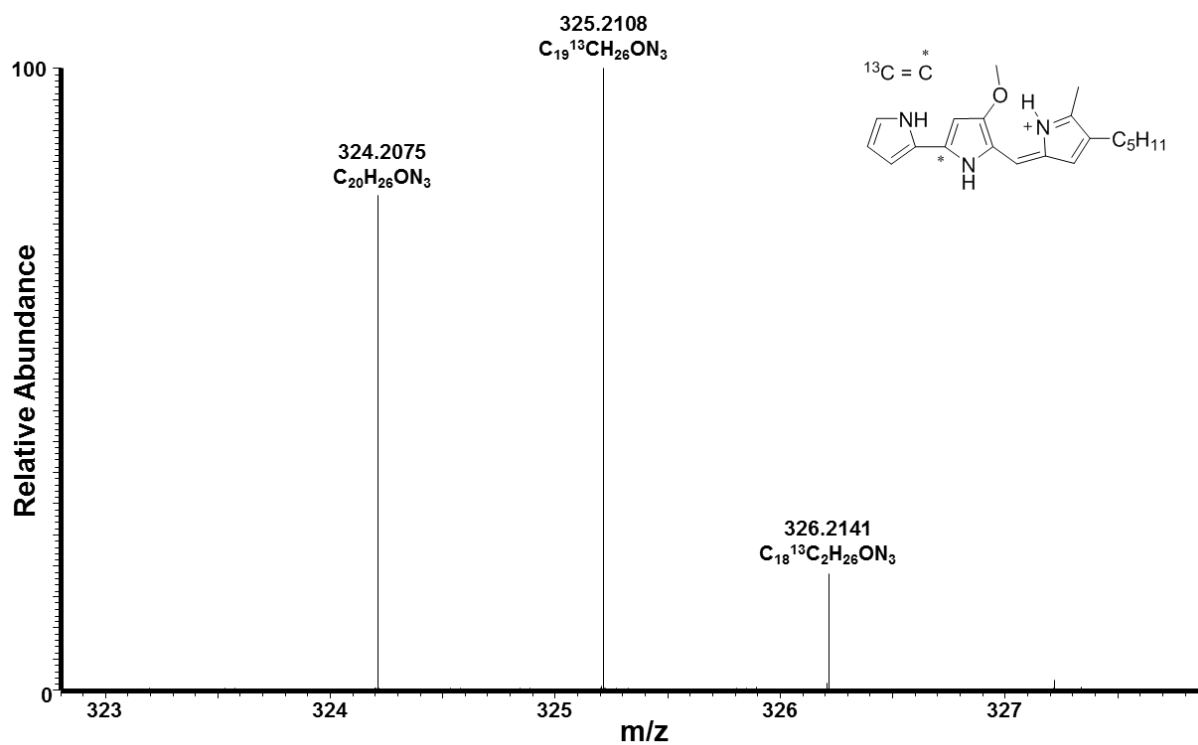


Abb. S376: HRMS-Spektrum von Prodigiosin mit eingebautem [1-¹³C]-L-Prolin von Kartoffel-Dextrose-Agar mit 1 mg/mL [1-¹³C]-L-Prolin (Verbindung 3 [$M+H$]⁺: m/z 325, $C_{19}^{13}CH_{26}N_3O$).

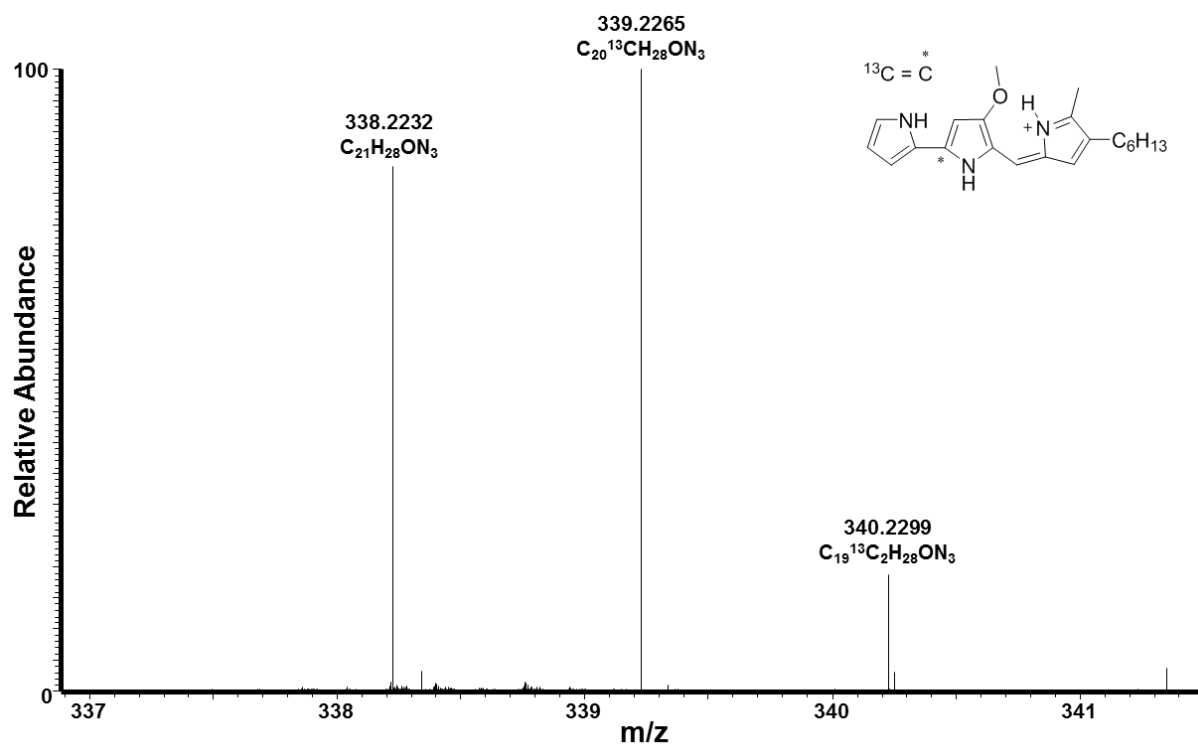


Abb. S377: HRMS-Spektrum von 2-Methyl-3-hexyl-Prodiginin mit eingebautem [1-¹³C]-L-Prolin von Kartoffel-Dextrose-Agar mit 1 mg/mL [1-¹³C]-L-Prolin (Verbindung 4 [M+H]⁺: m/z 339, $C_{20}^{13}CH_{28}N_3O$).

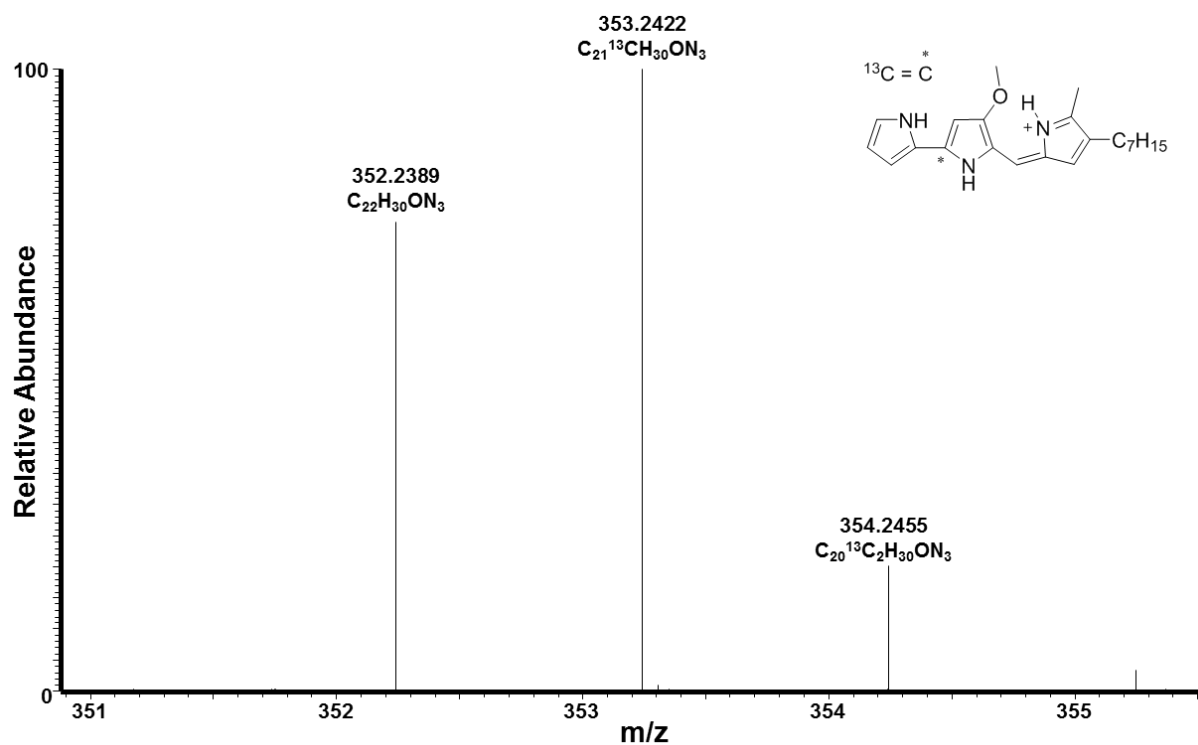


Abb. S378: HRMS-Spektrum von 2-Methyl-3-heptyl-Prodiginin mit eingebautem [1-¹³C]-L-Prolin von Kartoffel-Dextrose-Agar mit 1 mg/mL [1-¹³C]-L-Prolin (Verbindung 5 [M+H]⁺: m/z 353, $C_{21}^{13}CH_{30}N_3O$).

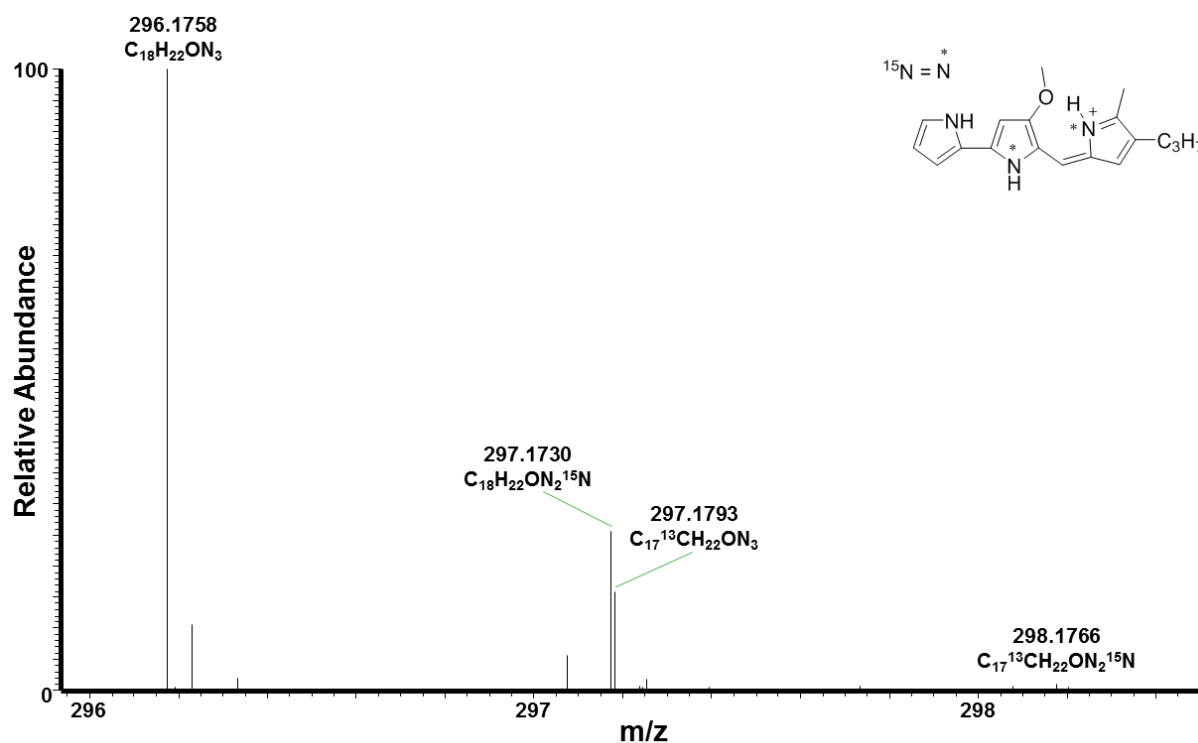


Abb. S379: HRMS-Spektrum von 2-Methyl-3-propyl-Prodiginin mit eingebautem $[^{15}\text{N}]$ -L-Serin von Kartoffel-Dextrose-Agar mit 1 mg/mL $[^{15}\text{N}]$ -L-Serin (Verbindung 1 $[\text{M}+\text{H}]^+$: m/z 296, $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{N}_3\text{O}$).

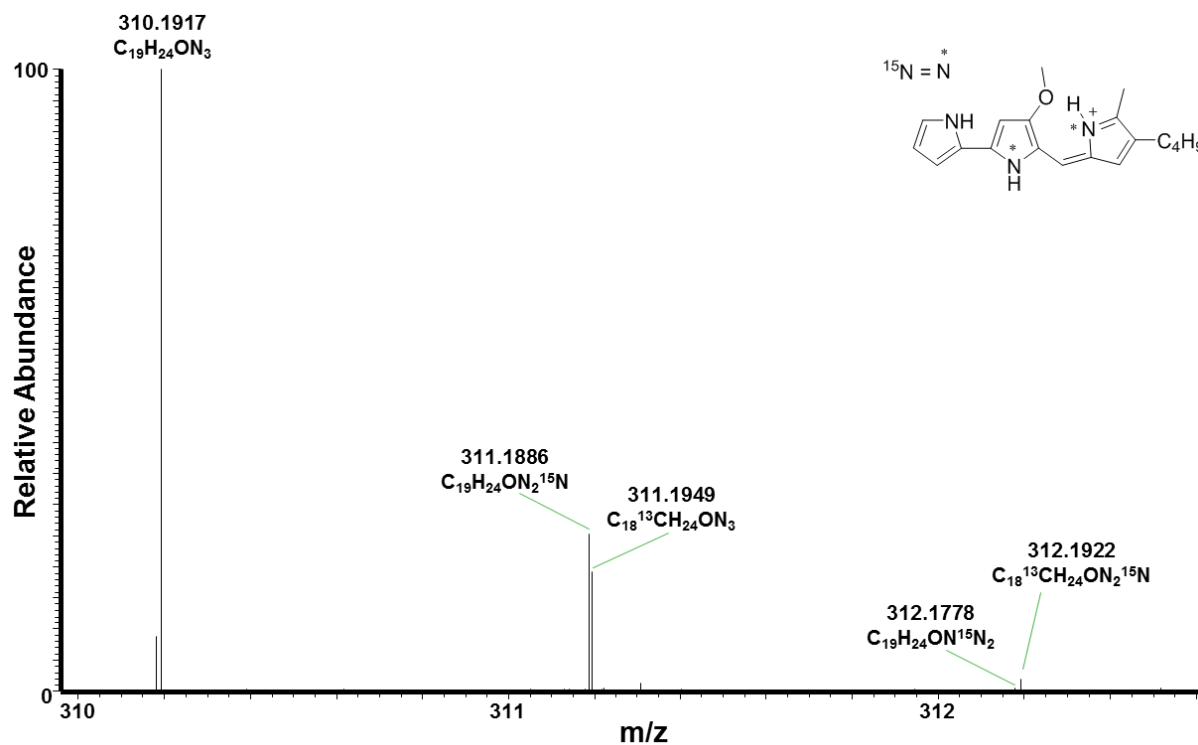


Abb. S380: HRMS-Spektrum von 2-Methyl-3-butyl-Prodiginin mit eingebautem $[^{15}\text{N}]$ -L-Serin von Kartoffel-Dextrose-Agar mit 1 mg/mL $[^{15}\text{N}]$ -L-Serin (Verbindung 2 $[\text{M}+\text{H}]^+$: m/z 310, $\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{N}_3\text{O}$).

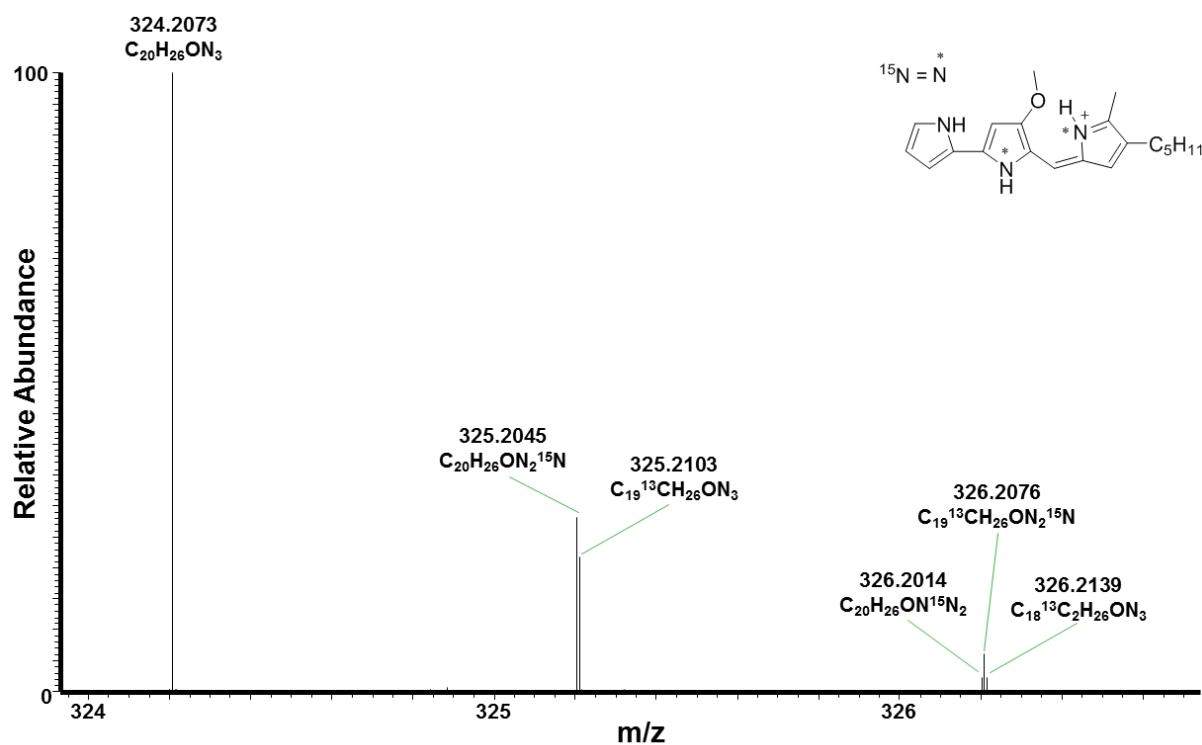


Abb. S381: HRMS-Spektrum von Prodigiosin mit eingebautem ^{15}N -L-Serin von Kartoffel-Dextrose-Agar mit 1 mg/mL ^{15}N -L-Serin (Verbindung 3 $[\text{M}+\text{H}]^+$: m/z 324, $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{N}_3\text{O}$).

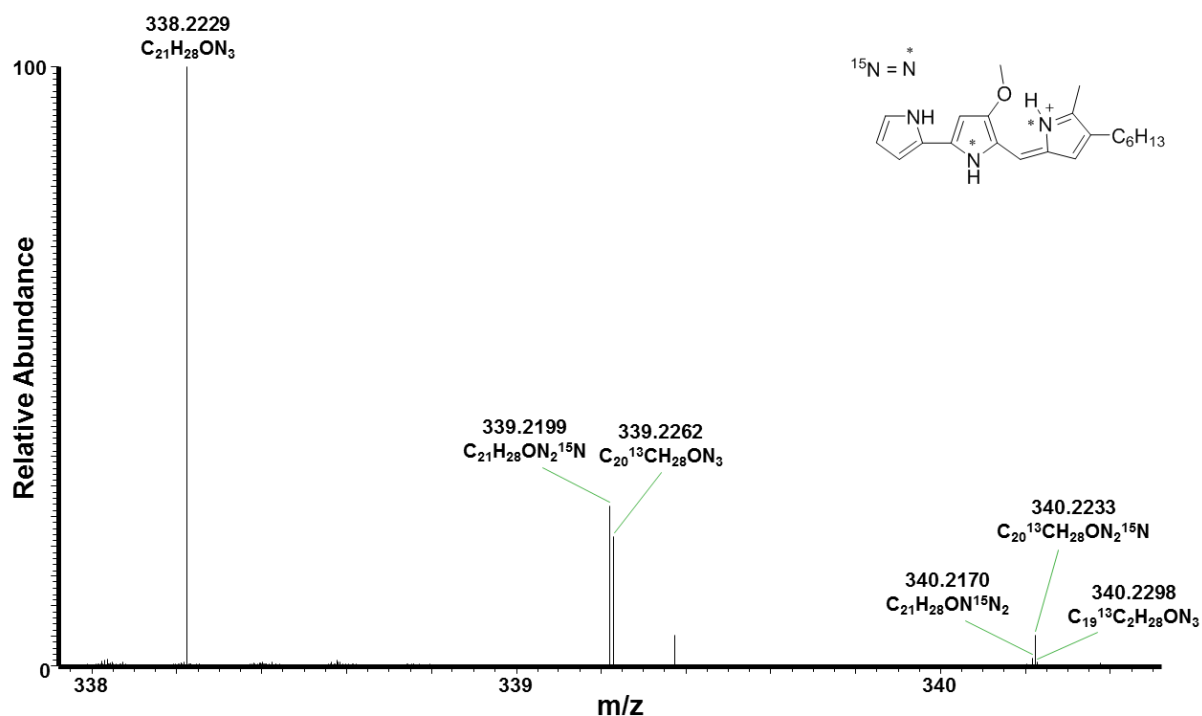


Abb. S382: HRMS-Spektrum von 2-Methyl-3-hexyl-Prodiginin mit eingebautem ^{15}N -L-Serin von Kartoffel-Dextrose-Agar mit 1 mg/mL ^{15}N -L-Serin (Verbindung 4 $[\text{M}+\text{H}]^+$: m/z 338, $\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{N}_3\text{O}$).

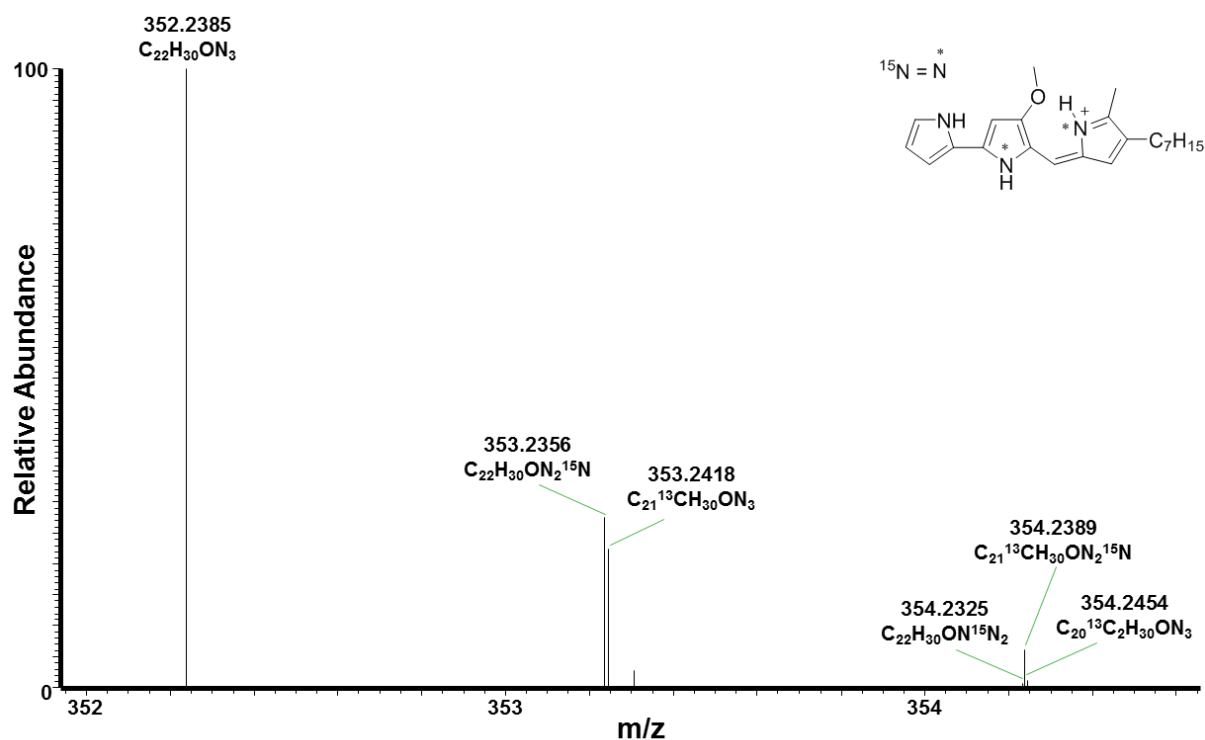


Abb. S383: HRMS-Spektrum von 2-Methyl-3-heptyl-Prodiginin mit eingebautem $[^{15}\text{N}]$ -L-Serin von Kartoffel-Dextrose-Agar mit 1 mg/mL $[^{15}\text{N}]$ -L-Serin (Verbindung 5 $[\text{M}+\text{H}]^+$: m/z 352, $\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{N}_3\text{O}$).

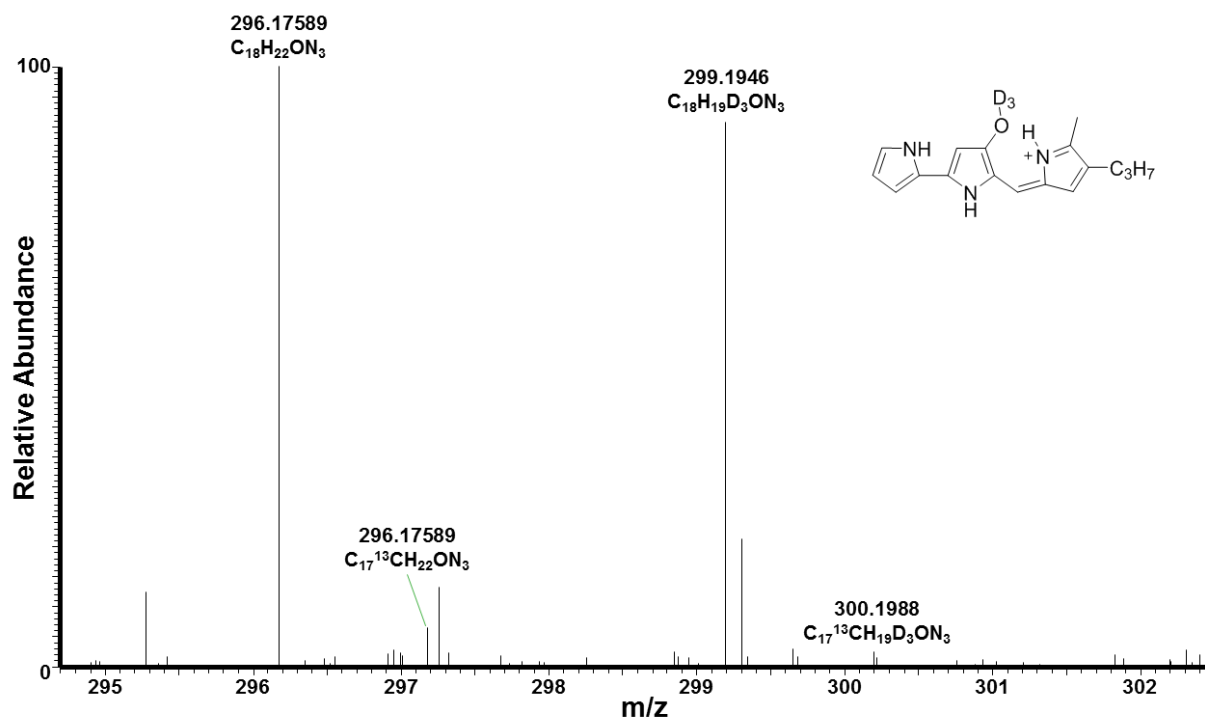


Abb. S384: HRMS-Spektrum von 2-Methyl-3-propyl-Prodiginin mit eingebauter Methyl- D_3 Gruppe von Kartoffel-Dextrose-Agar mit 0.5 mg/mL [Methyl- D_3]-L-Methionin (Verbindung 1 $[\text{M}+\text{H}]^+$: m/z 299, $\text{C}_{18}\text{H}_{19}\text{D}_3\text{N}_3\text{O}$).

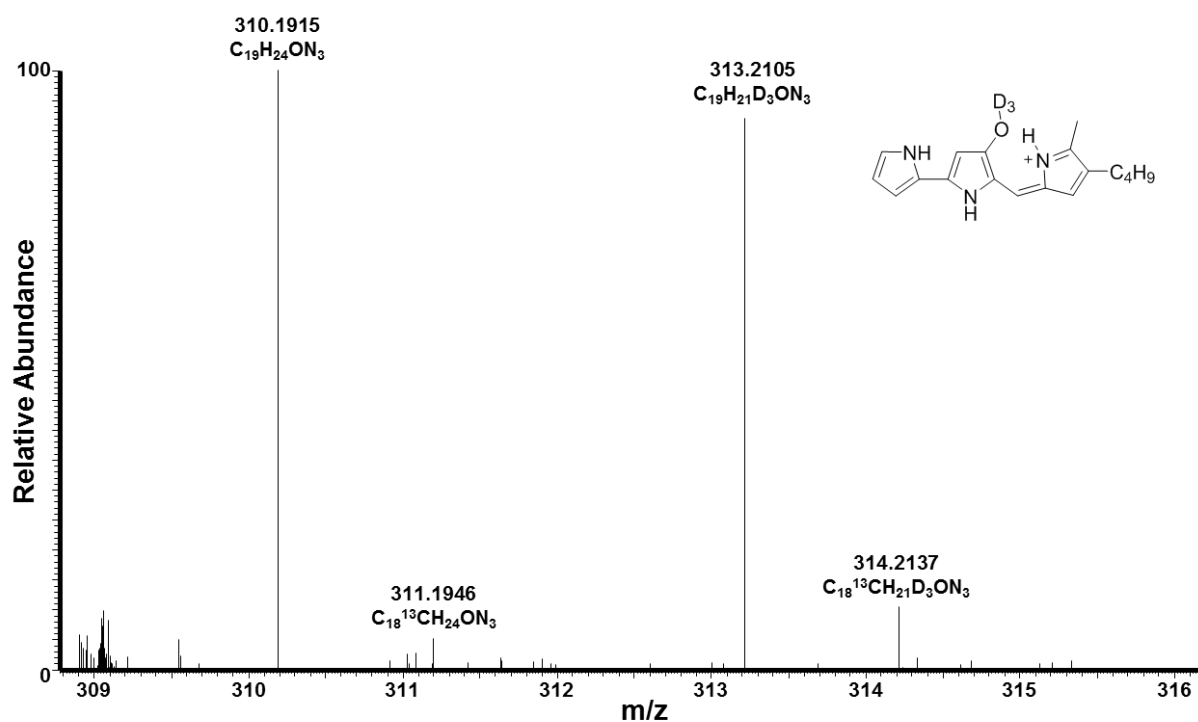


Abb. S385: HRMS-Spektrum von 2-Methyl-3-butyl-Prodiginin mit eingebauter Methyl-D₃ Gruppe von Kartoffel-Dextrose-Agar mit 0.5 mg/mL [Methyl-D₃]-L-Methionin (Verbindung 2 $[M+H]^+$: m/z 313, $C_{19}H_{21}D_3N_3O$).

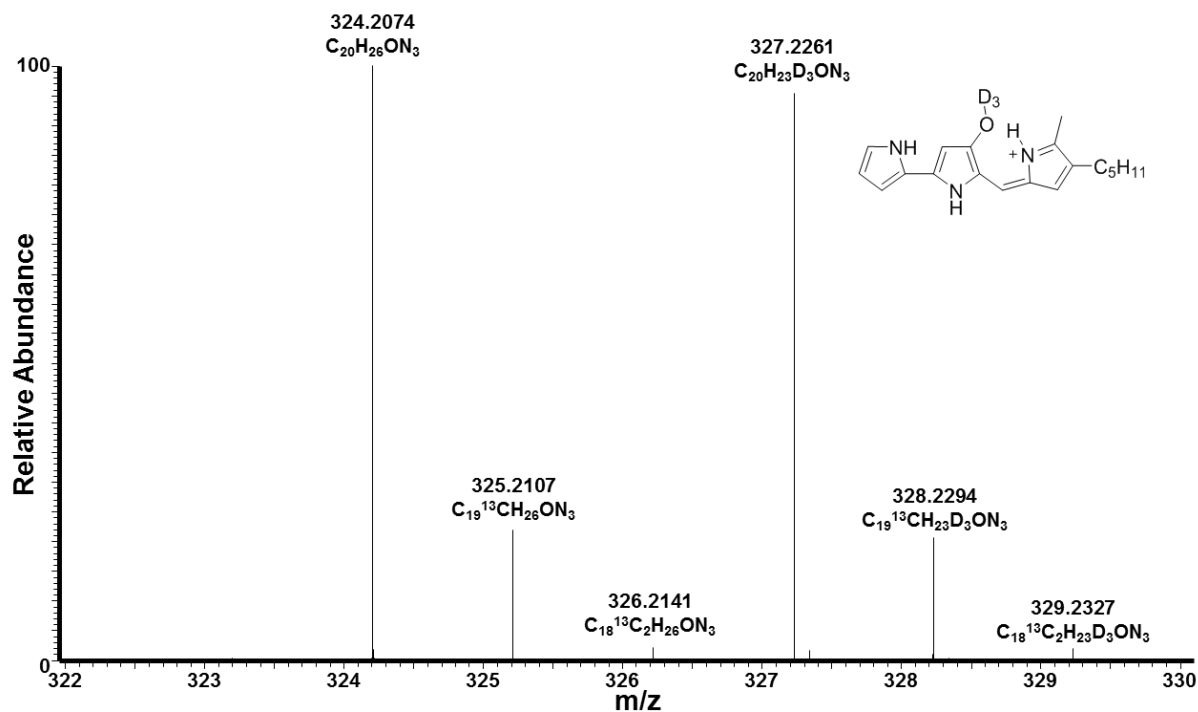


Abb. S386: HRMS-Spektrum von Prodigiosin mit eingebauter Methyl-D₃ Gruppe von Kartoffel-Dextrose-Agar mit 0.5 mg/mL [Methyl-D₃]-L-Methionin (Verbindung 3 $[M+H]^+$: m/z 327, $C_{20}H_{23}D_3N_3O$).

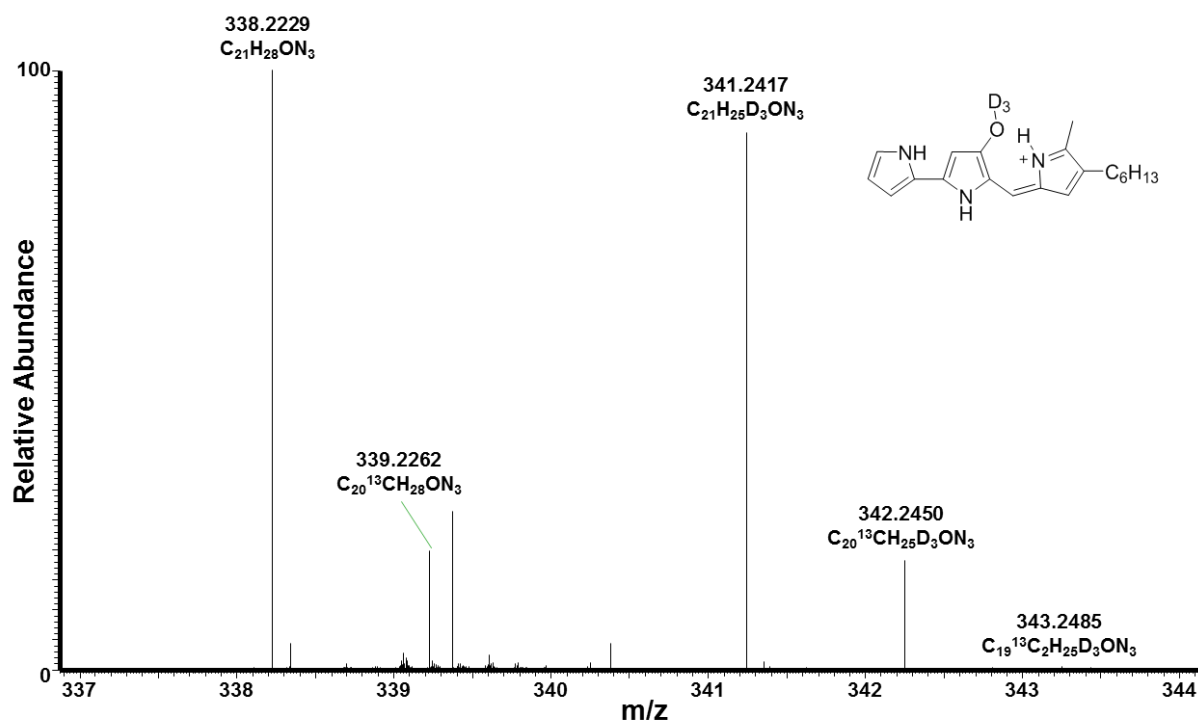


Abb. S387: HRMS-Spektrum von 2-Methyl-3-hexyl-Prodiginin mit eingebauter Methyl- D_3 Gruppe von Kartoffel-Dextrose-Agar mit 0.5 mg/mL [Methyl- D_3]-L-Methionin (Verbindung 4 $[M+H]^+$: m/z 341, $C_{21}H_{25}D_3N_3O$).

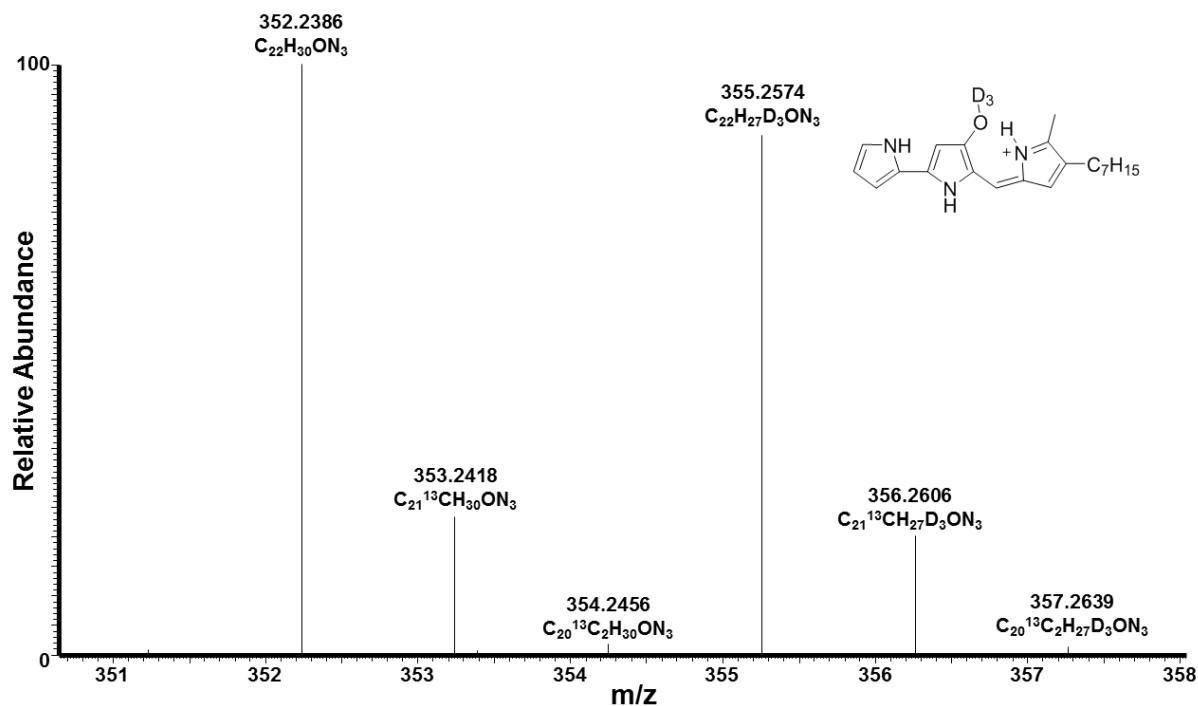


Abb. S388: HRMS-Spektrum von 2-Methyl-3-heptyl-Prodiginin mit eingebauter Methyl- D_3 Gruppe von Kartoffel-Dextrose-Agar mit 0.5 mg/mL [Methyl- D_3]-L-Methionin (Verbindung 5 $[M+H]^+$: m/z 355, $C_{22}H_{27}D_3N_3O$).

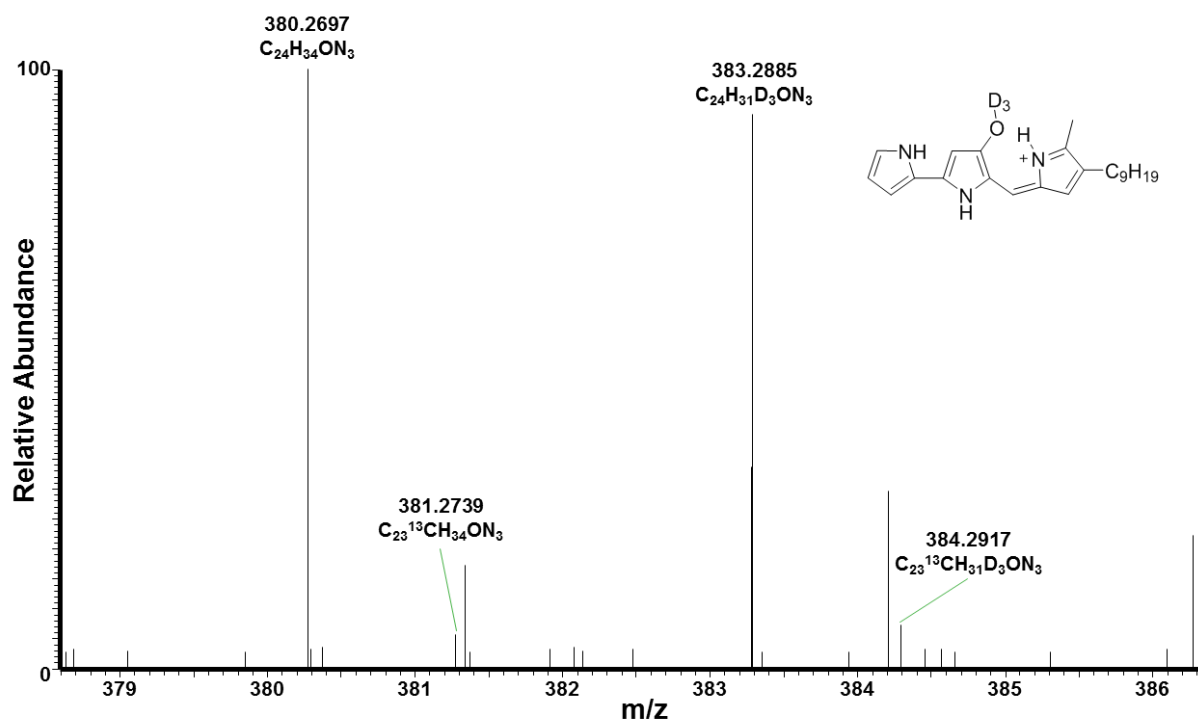


Abb. S389: HRMS-Spektrum von 2-Methyl-3-nonyl-Prodiginin mit eingebauter Methyl-D₃ Gruppe von Kartoffel-Dextrose-Agar mit 0.5 mg/mL [Methyl-D₃]-L-Methionin (Verbindung **7** $[M+H]^+$: m/z 383, $C_{24}H_{31}D_3N_3O$).

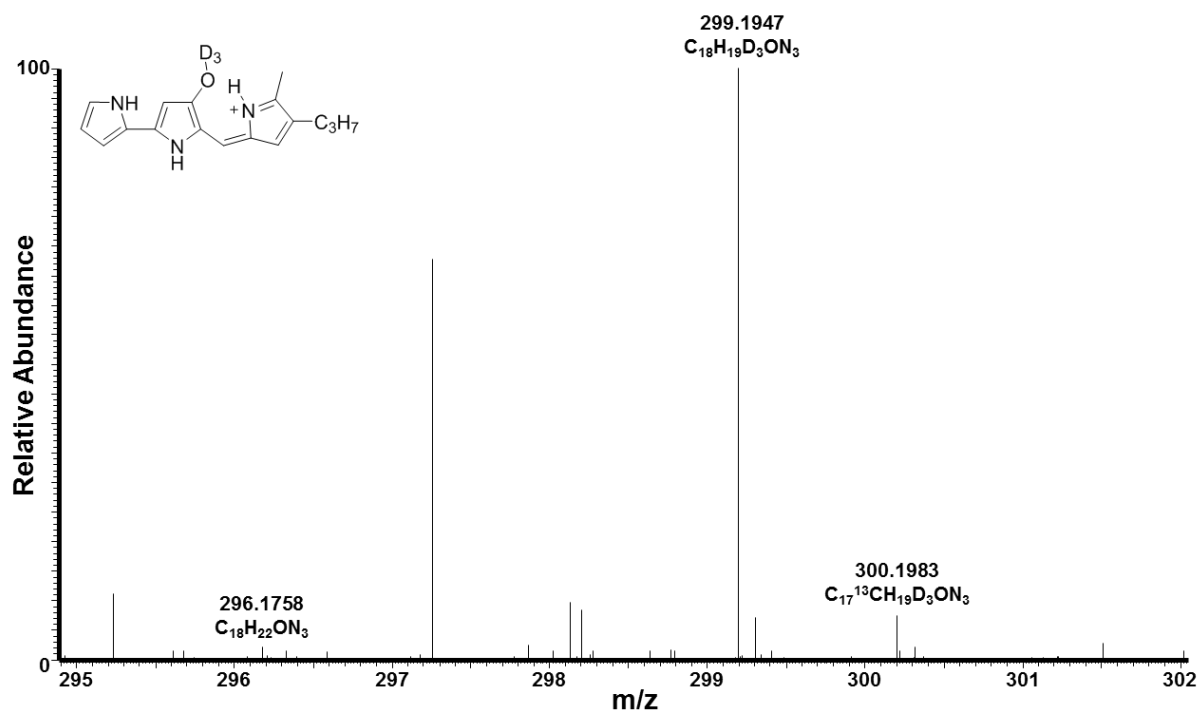


Abb. S390: HRMS-Spektrum von 2-Methyl-3-propyl-Prodiginin mit eingebauter Methyl-D₃ Gruppe von Kartoffel-Dextrose-Agar mit 2 mg/mL [Methyl-D₃]-L-Methionin (Verbindung **1** $[M+H]^+$: m/z 299, $C_{18}H_{19}D_3N_3O$).

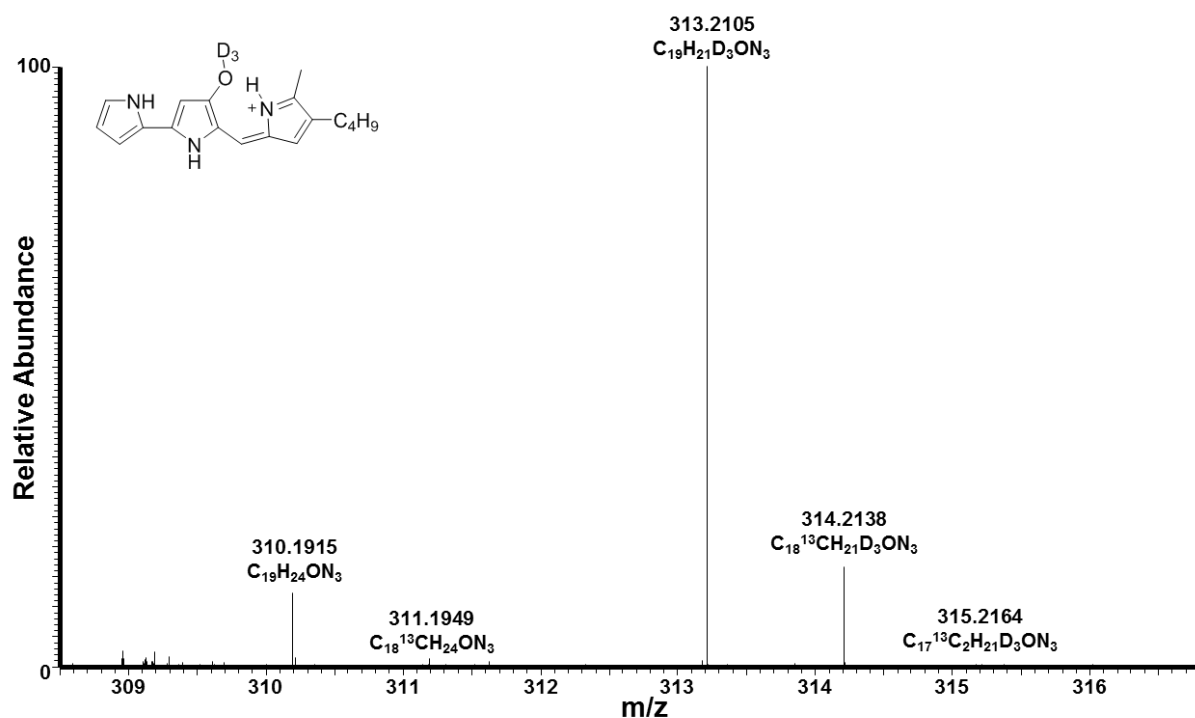


Abb. S391: HRMS-Spektrum von 2-Methyl-3-butyl-Prodiginin mit eingebauter Methyl-D₃ Gruppe von Kartoffel-Dextrose-Agar mit 2 mg/mL [Methyl-D₃]-L-Methionin (Verbindung **2** [$M+H$]⁺: m/z 313, $C_{19}H_{21}D_3N_3O$).

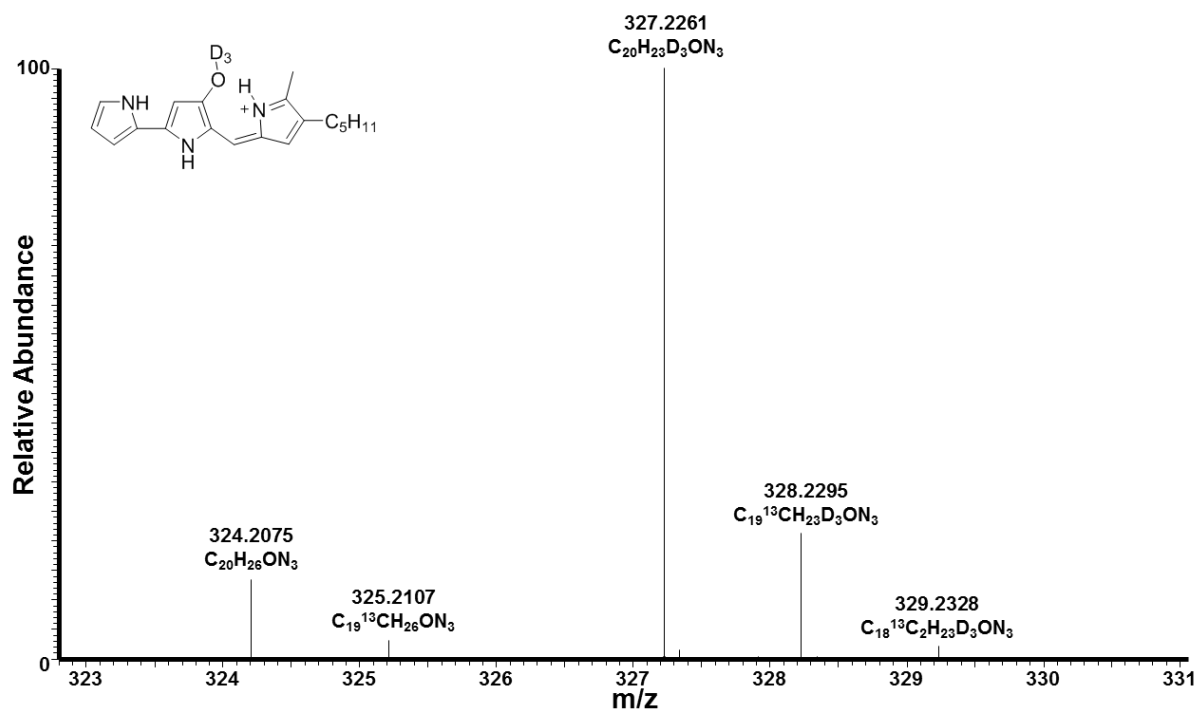


Abb. S392: HRMS-Spektrum von Prodigiosin mit eingebauter Methyl-D₃ Gruppe von Kartoffel-Dextrose-Agar mit 2 mg/mL [Methyl-D₃]-L-Methionin (Verbindung **3** [$M+H$]⁺: m/z 327, $C_{20}H_{23}D_3N_3O$).

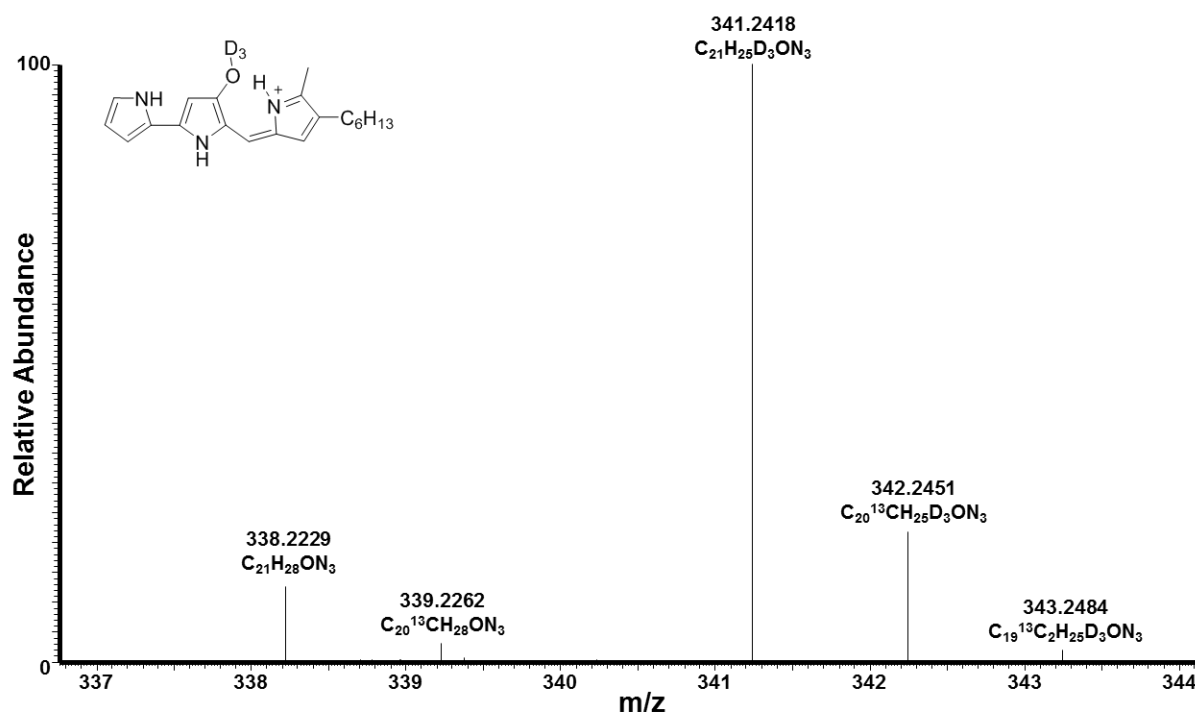


Abb. S393: HRMS-Spektrum von 2-Methyl-3-hexyl-Prodiginin mit eingebauter Methyl-D₃ Gruppe von Kartoffel-Dextrose-Agar mit 2 mg/mL [Methyl-D₃]-L-Methionin (Verbindung 4 $[M+H]^+$: m/z 341, $C_{21}H_{25}D_3N_3O$).

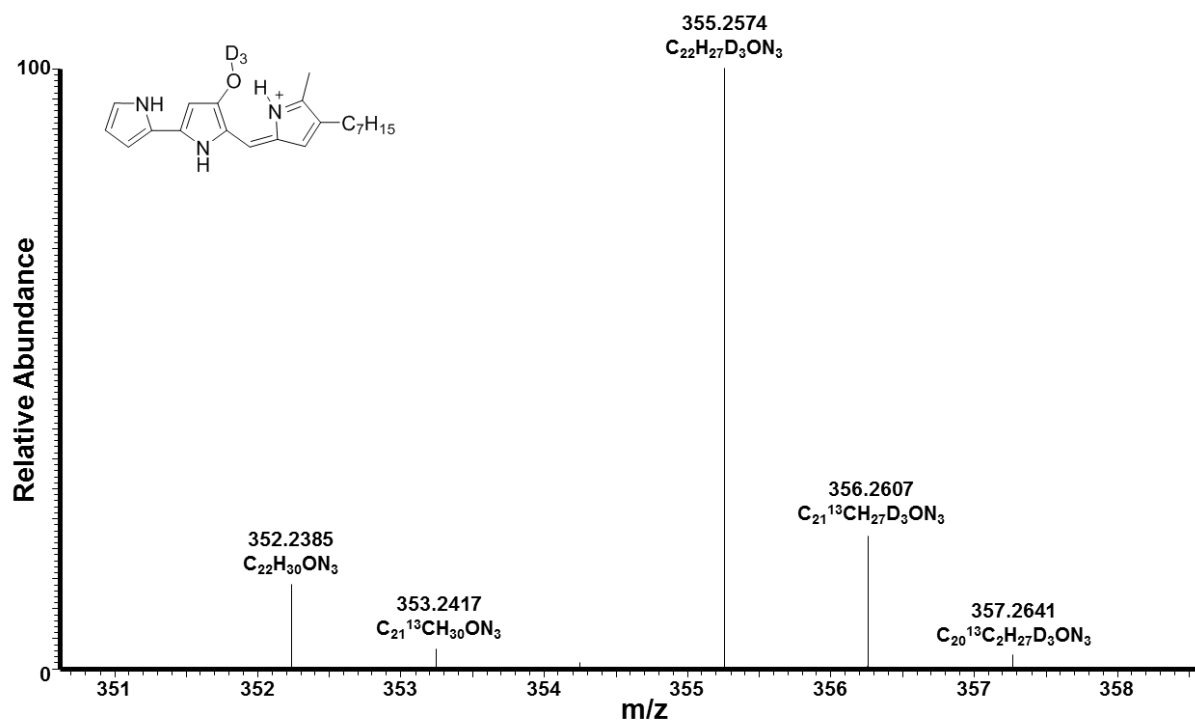


Abb. S394: HRMS-Spektrum von 2-Methyl-3-heptyl-Prodiginin mit eingebauter Methyl-D₃ Gruppe von Kartoffel-Dextrose-Agar mit 2 mg/mL [Methyl-D₃]-L-Methionin (Verbindung 5 $[M+H]^+$: m/z 355, $C_{22}H_{27}D_3N_3O$).

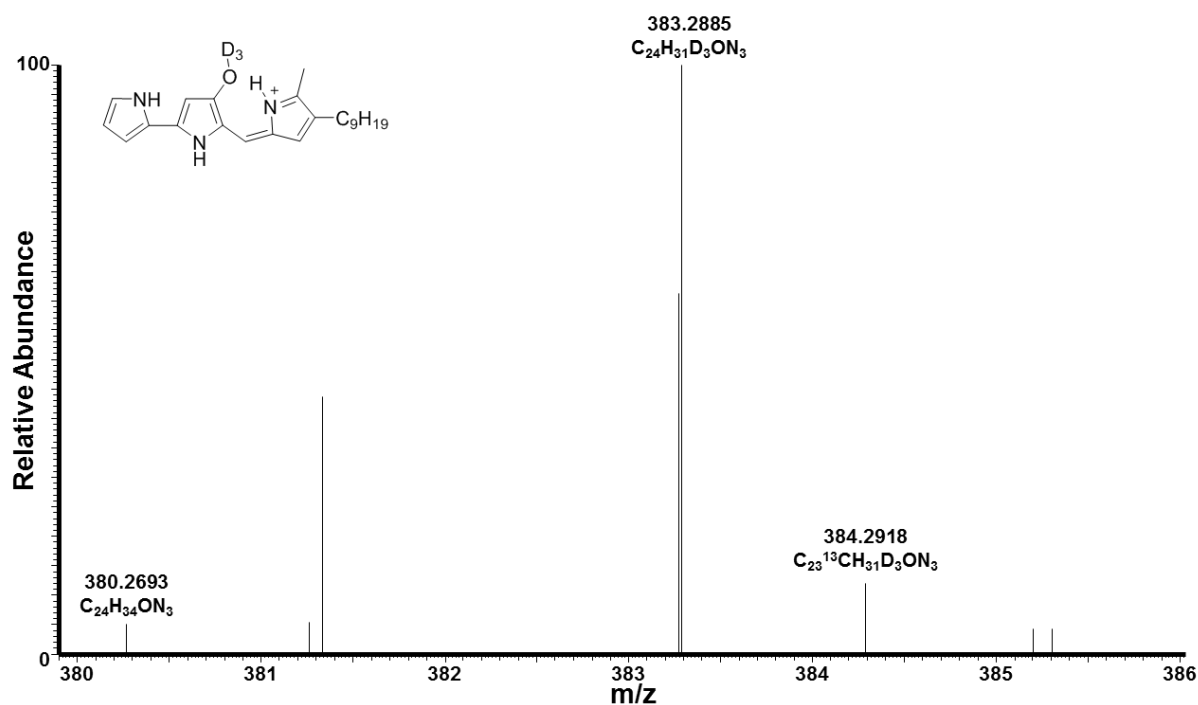


Abb. S395: HRMS-Spektrum von 2-Methyl-3-nonyl-Prodiginin mit eingebauter Methyl-D₃ Gruppe von Kartoffel-Dextrose-Agar mit 2 mg/mL [Methyl-D₃]-L-Methionin (Verbindung **7** [M+H]⁺: *m/z* 383, C₂₄H₃₁D₃N₃O).

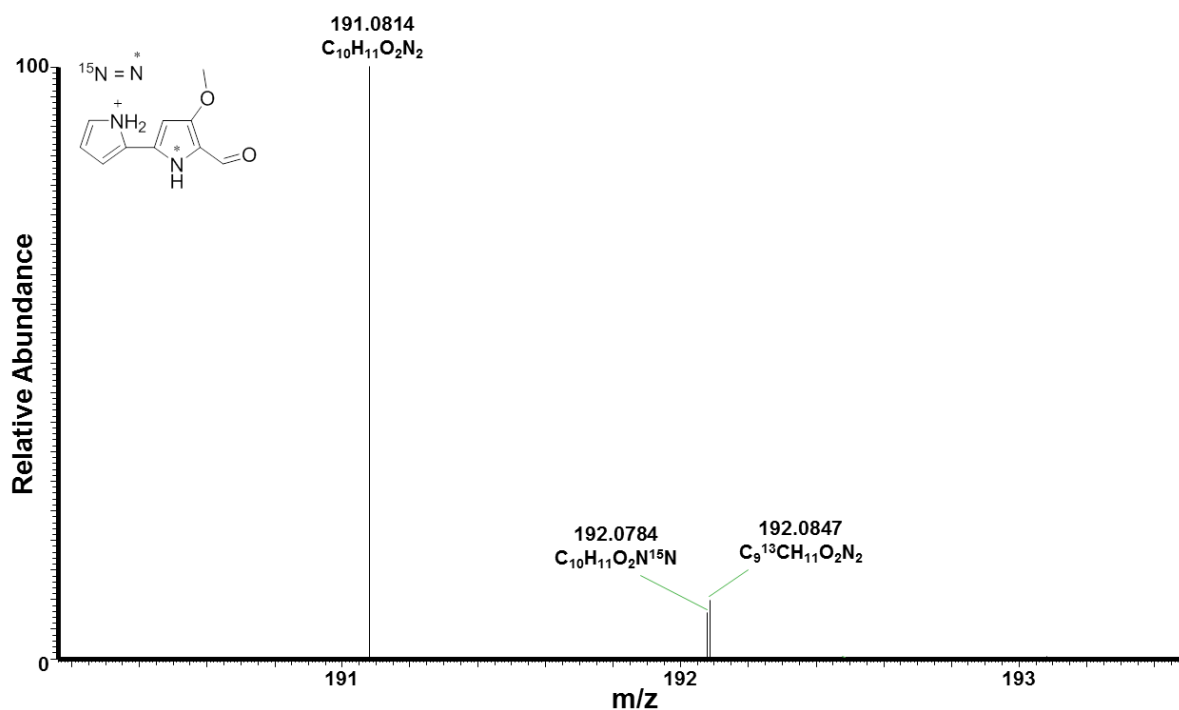


Abb. S396: HRMS-Spektrum von 4-Methoxy-2,2'-bipyrrrol-5-carbaldehyd (MBC) mit eingebautem [¹⁵N]-L-Serin von Nähragar mit 1 mg/mL [¹⁵N]-L-Serin (Verbindung **8** [M+H]⁺: *m/z* 192, C₁₀H₁₁N¹⁵NO₂).

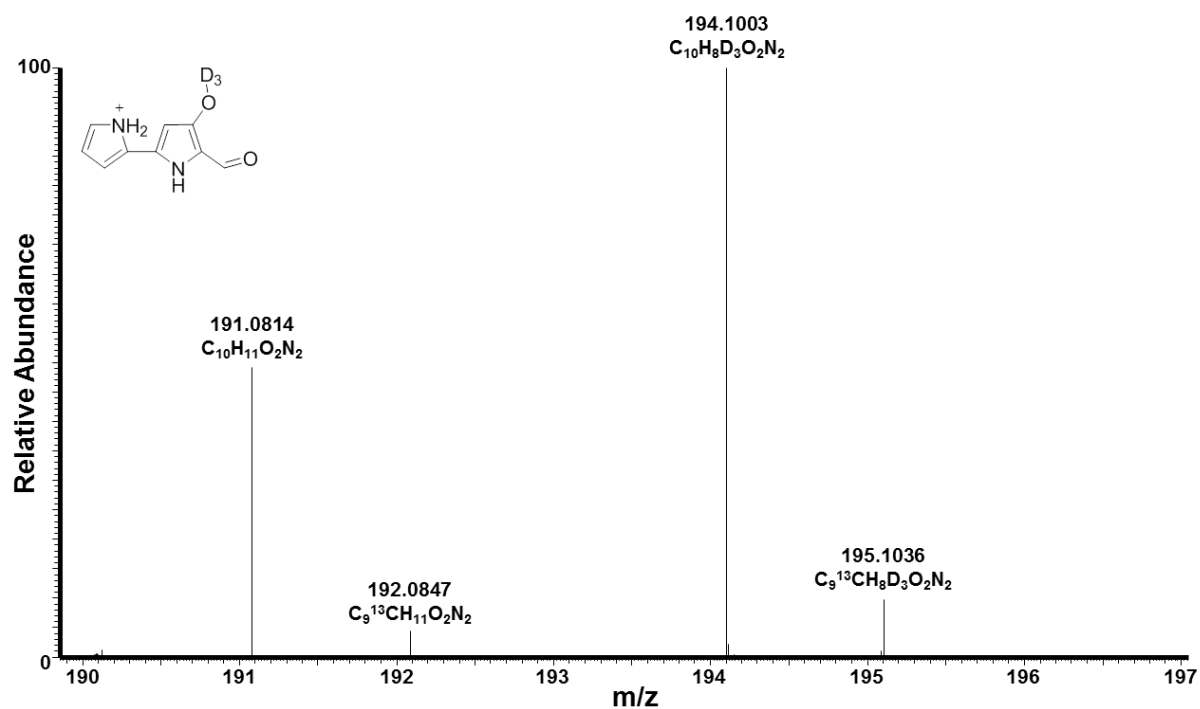


Abb. S397: HRMS-Spektrum von 4-Methoxy-2,2'-bipyrrol-5-carbaldehyd (MBC) mit eingebauter Methyl-D₃ Gruppe von Nähragar mit 1 mg/mL [Methyl-D₃]-L-Methionin (Verbindung **8** $[M+H]^+$: *m/z* 194, $C_{10}H_8D_3N_2O_2$).

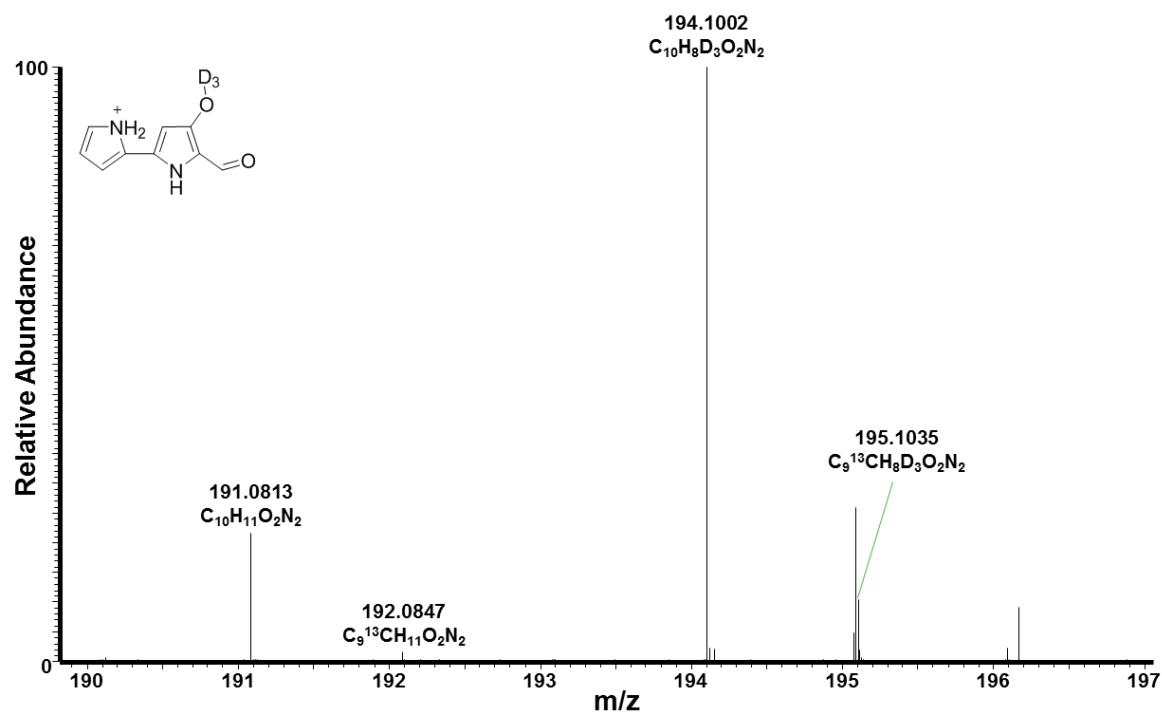


Abb. S398: HRMS-Spektrum von 4-Methoxy-2,2'-bipyrrol-5-carbaldehyd (MBC) mit eingebauter Methyl-D₃ Gruppe von Nähragar mit 2 mg/mL [Methyl-D₃]-L-Methionin (Verbindung **8** $[M+H]^+$: *m/z* 194, $C_{10}H_8D_3N_2O_2$).

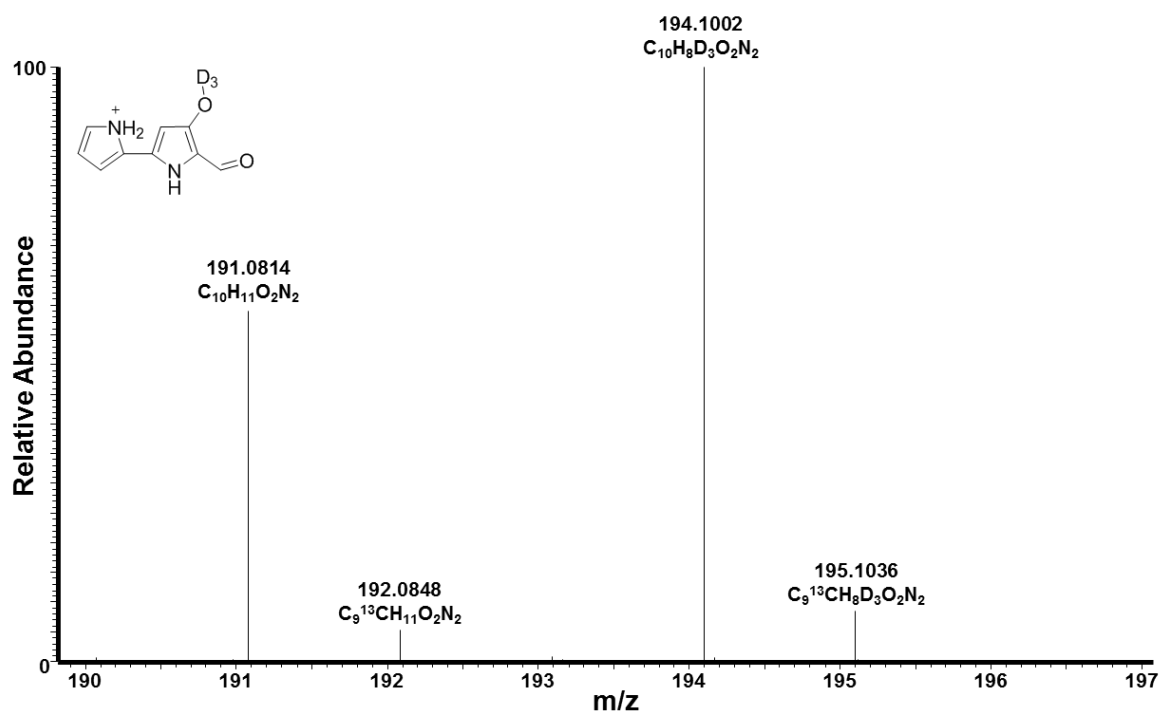


Abb. S399: HRMS-Spektrum von 4-Methoxy-2,2'-bipyrrol-5-carbaldehyd (MBC) mit eingebauter Methyl-D₃ Gruppe von Nähragar mit 0.5 mg/mL [Methyl-D₃]-L-Methionin (Verbindung **8** $[M+H]^+$: m/z 194, $C_{10}H_8D_3N_2O_2$).

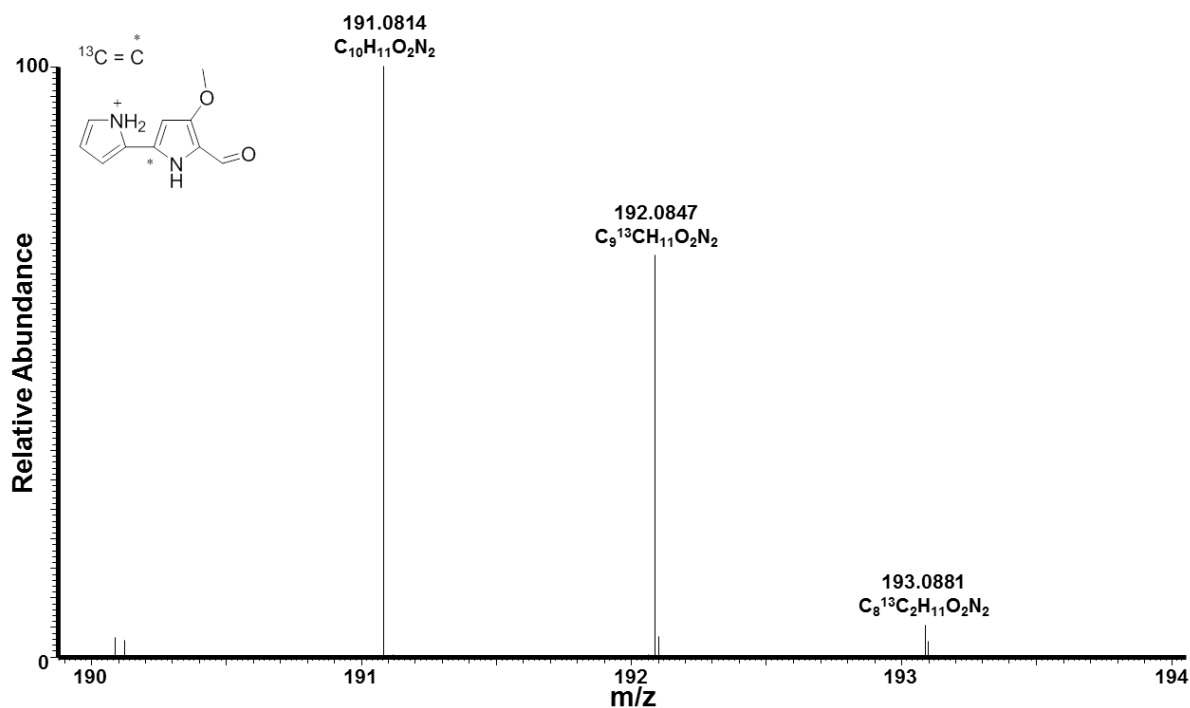


Abb. S400: HRMS-Spektrum von 4-Methoxy-2,2'-bipyrrol-5-carbaldehyd (MBC) mit eingebautem $[1-^{13}C]$ -L-Prolin von Nähragar mit 1 mg/mL $[1-^{13}C]$ -L-Prolin (Verbindung **8** $[M+H]^+$: m/z 192, $C_9^{13}CH_{11}N_2O_2$).

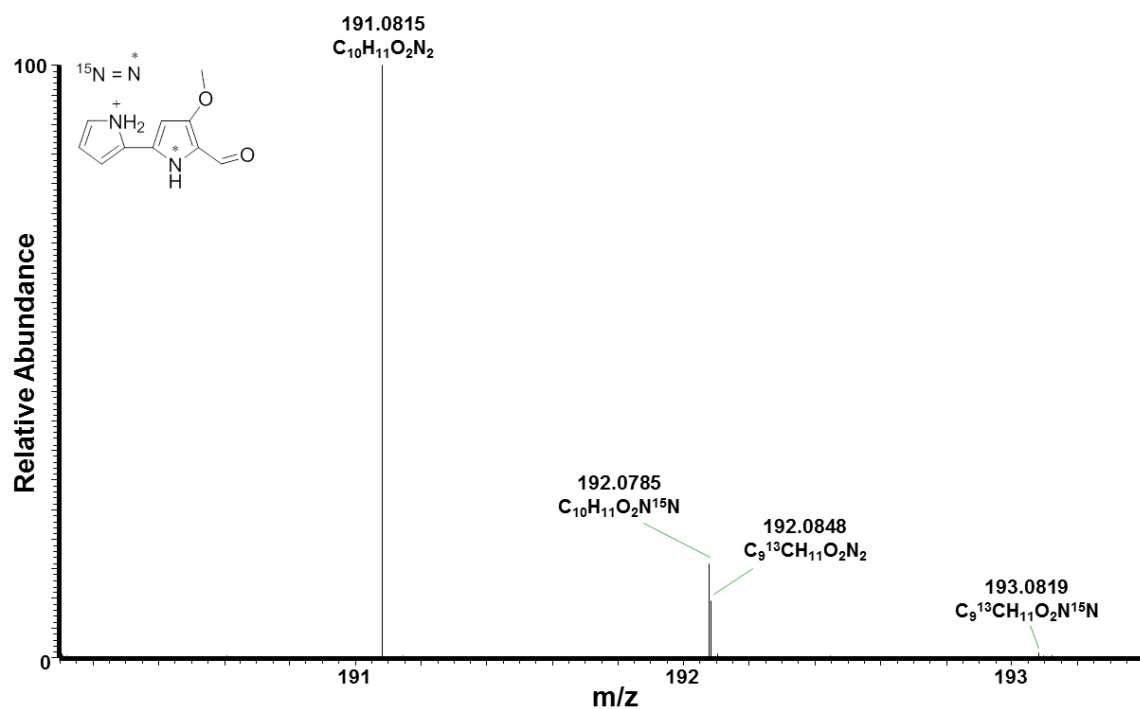


Abb. S401: HRMS-Spektrum von 4-Methoxy-2,2'-bipyrrol-5-carbaldehyd (MBC) mit eingebautem ^{15}N -L-Serin von Kartoffel-Dextrose-Agar mit 1 mg/mL ^{15}N -L-Serin (Verbindung **8** $[\text{M}+\text{H}]^+$: m/z 192, $\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{N}^{15}\text{O}_2$).

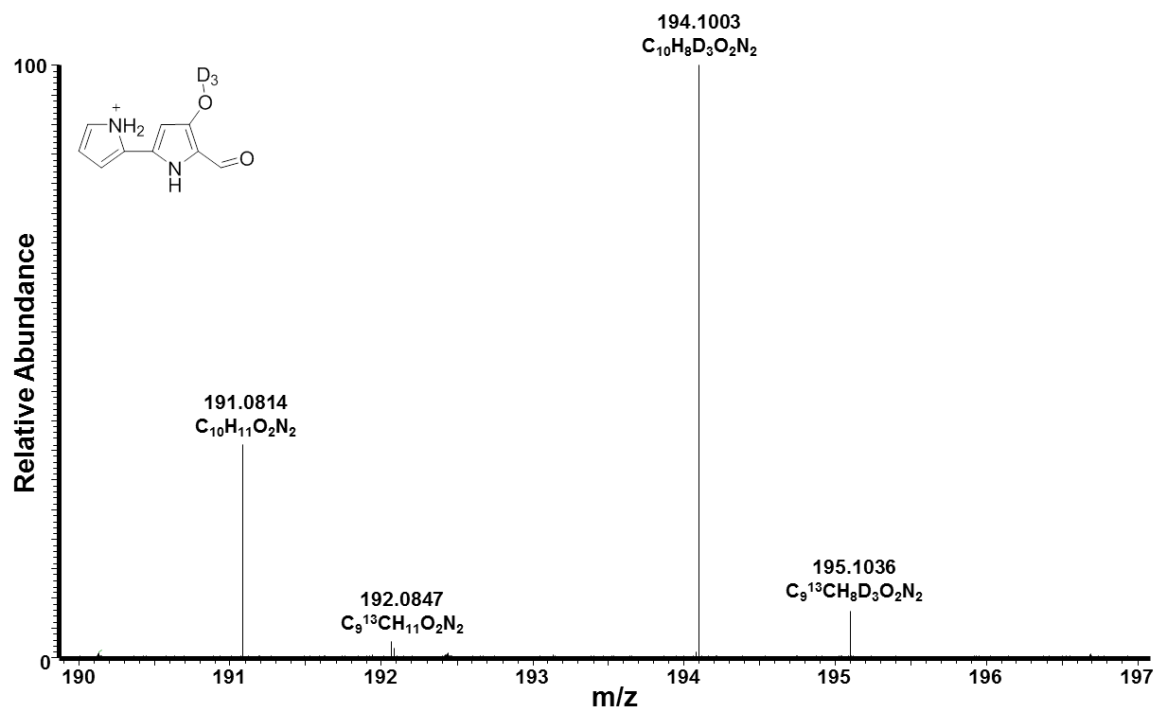


Abb. S402: HRMS-Spektrum von 4-Methoxy-2,2'-bipyrrol-5-carbaldehyd (MBC) mit eingebauter Methyl- D_3 Gruppe von Kartoffel-Dextrose-Agar mit 1 mg/mL [Methyl- D_3]-L-Methionin (Verbindung **8** $[\text{M}+\text{H}]^+$: m/z 194, $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{D}_3\text{N}_2\text{O}_2$).

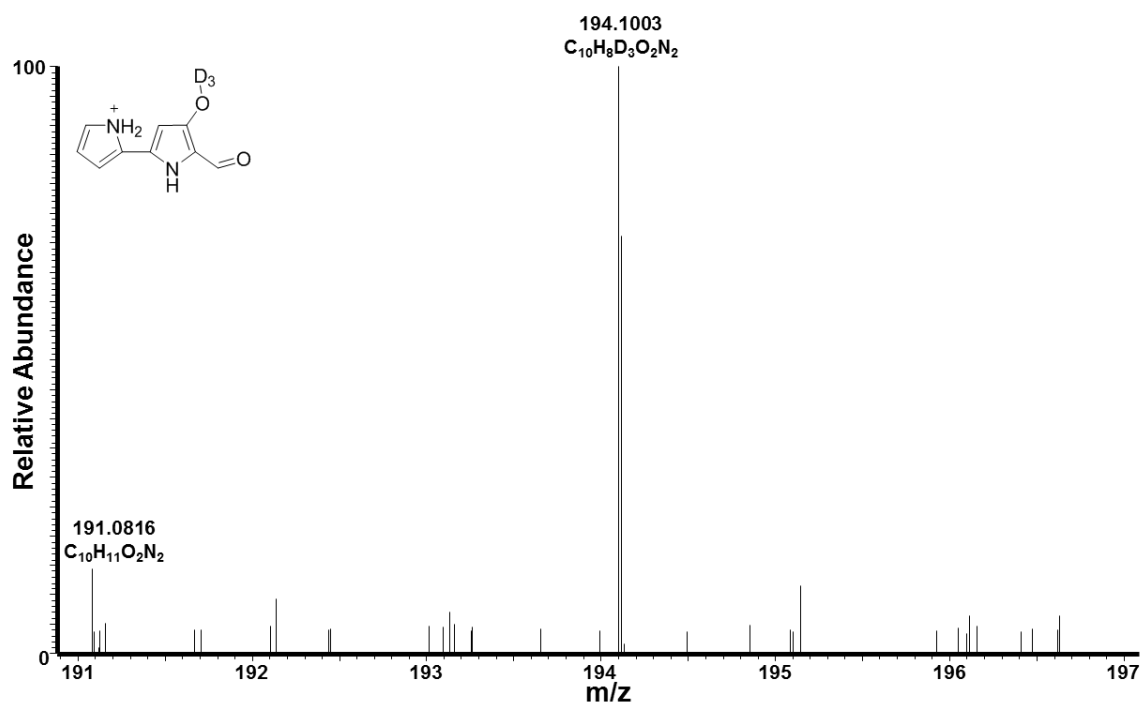


Abb. S403: HRMS-Spektrum von 4-Methoxy-2,2'-bipyrrol-5-carbaldehyd (MBC) mit eingebauter Methyl-D₃ Gruppe von Kartoffel-Dextrose-Agar mit 2 mg/mL [Methyl-D₃]-L-Methionin (Verbindung **8** $[M+H]^+$: *m/z* 194, $C_{10}H_8D_3N_2O_2$).

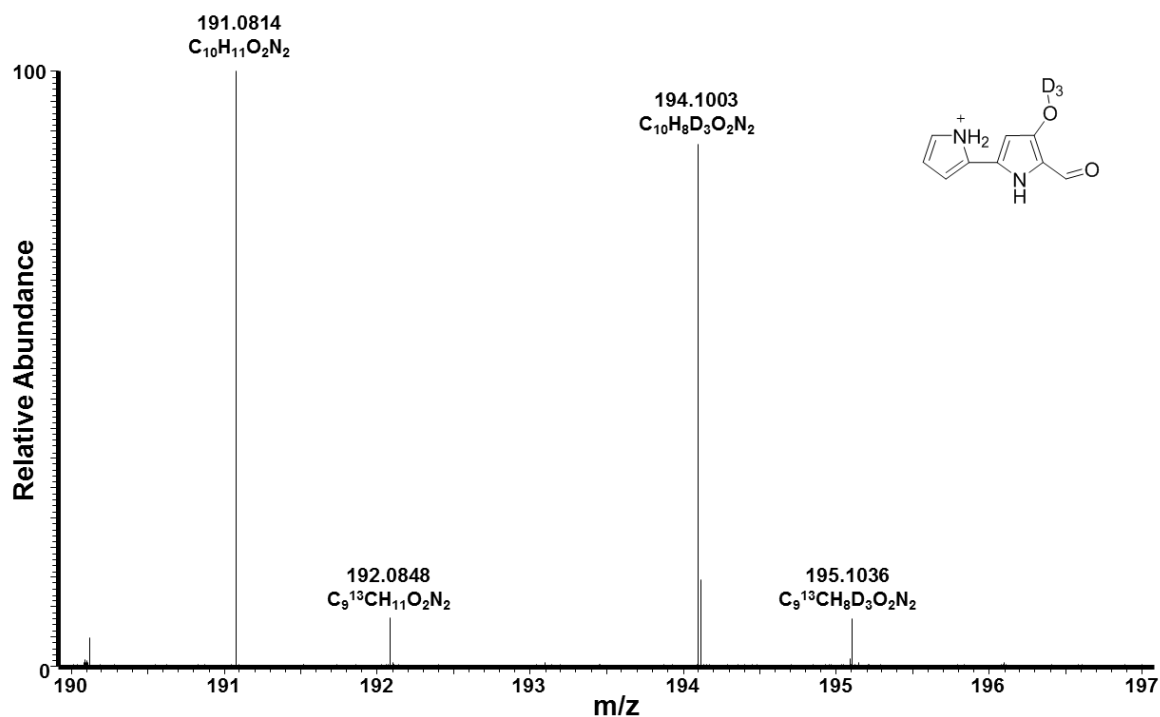


Abb. S404: HRMS-Spektrum von 4-Methoxy-2,2'-bipyrrol-5-carbaldehyd (MBC) mit eingebauter Methyl-D₃ Gruppe von Kartoffel-Dextrose-Agar mit 0.5 mg/mL [Methyl-D₃]-L-Methionin (Verbindung **8** $[M+H]^+$: *m/z* 194, $C_{10}H_8D_3N_2O_2$).

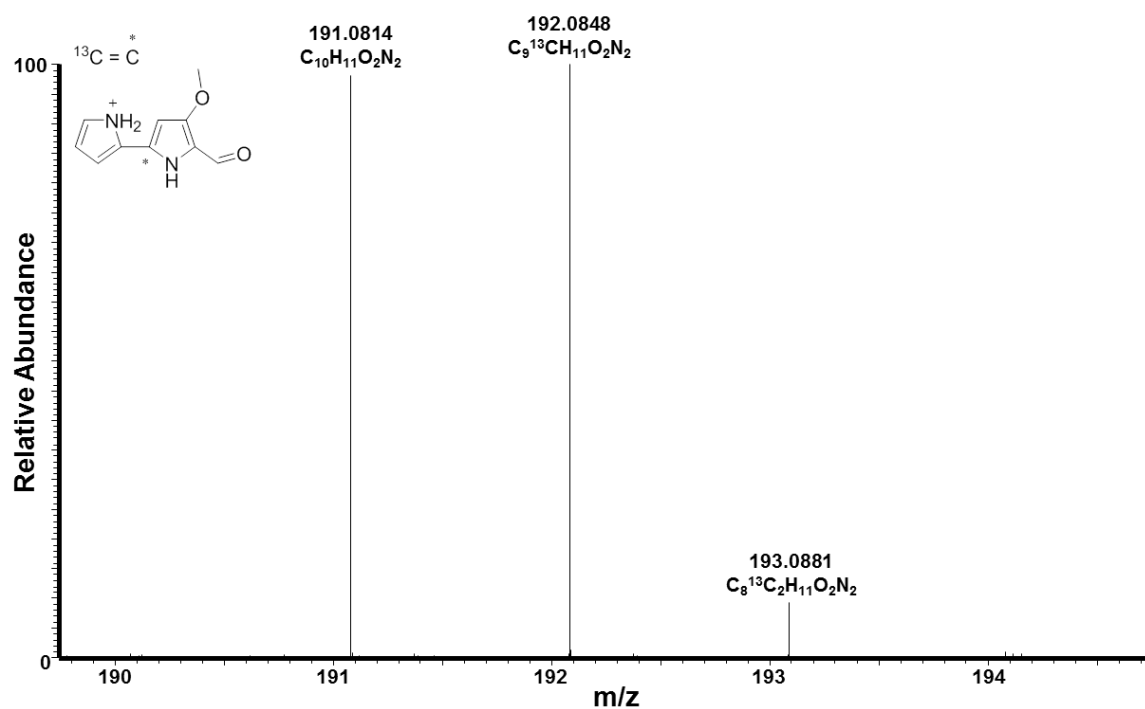


Abb. S405: HRMS-Spektrum von 4-Methoxy-2,2'-bipyrrol-5-carbaldehyd (MBC) mit eingebautem [1- ^{13}C]-L-Prolin von Kartoffel-Dextrose-Agar mit 1 mg/mL [1- ^{13}C]-L-Prolin (Verbindung **8** $[\text{M}+\text{H}]^+$: m/z 192, $\text{C}_9^{13}\text{CH}_{11}\text{N}_2\text{O}_2$).

Tabellen

Tab. 15: Peakhöhenverhältnisse aus HPLC-HRMS-Spektren von mit [1,2-¹³C₂]-Natriumacetat markierten Serratamoliden, produziert von *S. marcescens* MSRBB2 (n.n. = nicht nachweisbar; * = beobachtetes Peakhöhenverhältnis in % von M+4).

Summenformel		Peakhöhenverhältnisse in % von M											
Nr.	[M+H]	M+2	M+4	M+6	M+8	M+10	M+12	M+14	M+16	M+18	M+20	M+22	M+24
8	C ₂₄ H ₄₃ N ₂ O ₈	n.n.	100	139*	228*	127*	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
9	C ₂₅ H ₄₅ N ₂ O ₈	248	648	1139	857	423	115	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
10	C ₂₆ H ₄₇ N ₂ O ₈	140	334	603	783	763	554	295	118	31	3	n.n.	n.n.
11	C ₂₇ H ₄₉ N ₂ O ₈	323	634	1077	1090	891	466	198	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
12	C ₂₈ H ₅₁ N ₂ O ₈	80	205	390	556	606	518	344	176	65	16	1	n.n.
13	C ₂₉ H ₅₃ N ₂ O ₈	111	139	616	737	678	344	168	30	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
14	C ₃₀ H ₅₅ N ₂ O ₈	33	88	215	312	386	363	285	171	82	27	1	n.n.
15	C ₂₆ H ₄₅ N ₂ O ₈	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
16	C ₂₇ H ₄₇ N ₂ O ₈	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
17	C ₂₈ H ₄₉ N ₂ O ₈	116	324	631	889	984	848	571	294	109	20	1	n.n.
18	C ₂₉ H ₅₁ N ₂ O ₈	93	80	100	241	218	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
19	C ₃₀ H ₅₃ N ₂ O ₈	37	151	323	504	591	599	477	303	126	31	3	4
20	C ₂₆ H ₄₉ N ₂ O ₉	113	279	491	647	631	474	265	108	27	4	n.n.	n.n.
21	C ₂₇ H ₅₁ N ₂ O ₉	161	474	865	1086	1040	776	416	163	45	5	1	n.n.
22	C ₂₈ H ₅₃ N ₂ O ₉	76	205	369	524	573	481	329	165	62	16	1	n.n.
23	C ₂₈ H ₅₁ N ₂ O ₉	81	217	414	602	686	595	409	209	76	5	1	n.n.
24	C ₂₅ H ₄₇ N ₂ O ₉	448	736	1132	1206	773	129	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
25	C ₂₉ H ₅₅ N ₂ O ₉	343	718	983	1067	924	597	318	118	25	1	n.n.	n.n.
26	C ₃₀ H ₅₇ N ₂ O ₉	43	117	233	333	404	400	314	189	89	30	2	n.n.
27	C ₃₁ H ₅₉ N ₂ O ₉	142	978	1805	3971	4689	4343	3218	2286	246	54	n.n.	n.n.
28	C ₂₉ H ₅₃ N ₂ O ₉	209	559	1173	1634	1847	1561	1034	577	198	54	5	n.n.
29	C ₃₀ H ₅₅ N ₂ O ₉	34	98	197	327	383	367	307	188	90	27	6	n.n.
30	C ₃₁ H ₅₇ N ₂ O ₉	50	183	668	1099	1381	1429	1112	610	305	16	n.n.	n.n.
31	C ₁₃ H ₂₆ NO ₅	207	328	273	115	21	n.n.	-	-	-	-	-	-
32	C ₁₅ H ₃₀ NO ₅	166	287	295	189	80	13	n.n.	-	-	-	-	-
33	C ₁₅ H ₂₈ NO ₅	170	329	365	245	96	15	n.n.	-	-	-	-	-

7.3 Abkürzungsverzeichnis

AdoMet	S-Adenosylmethionin
bp	Basenpaare
BW	Botswana
CM	Kamerun
Da	Dalton
DE	Deutschland
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EIC	Extracted ion chromatogram - extrahiertes Ionenchromatogramm
FA	Formic acid - Ameisensäure
GH	Ghana
HBC	4-Hydroxy-2,2'-Bipyrrol-5-Carboxylaldehyd
HBM	4-Hydroxy-2,2'-Bipyrrol-5-Methylalkohol
HPLC	high performance liquid chromatography - Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HRMS	high resolution mass spectrometry - hochauflösende Massenspektrometrie
IMS	Imaging mass spectrometry - bildgebende Massenspektrometrie
LOD	Limit of detection - Nachweisgrenze
MALDI	Matrix-assistierte Laser-Desorption/Ionisation
MAP	2-Methyl-3-Amylpyrrol
MBC	4-Methoxy-2,2'-Bipyrrol-5-Carboxylaldehyd
Min	Minuten
<i>m/z</i>	Masse - Ladungsverhältnis
NA	Nutrient agar - Nähragar
NB	Nutrient broth - Nährlösung
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NRPS	nicht-ribosomale Peptidsynthetase
PCR	polymerase chain reaction - Polymerase-Kettenreaktion
PDA	Potato-dextrose-agar - Kartoffel-Dextrose-Agar
PKS	Polyketide-Synthetase
rpm	revolutions per minute - Umdrehungen pro Minute
S	Sekunden
TIC	Total ion current - Totalionenstrom
ZA	Südafrika

7.4 Eidesstattliche Versicherung

Name, Vorname

Matrikel-Nr.

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel „Massenspektrometrische und bildgebende Verfahren zur Untersuchung von Sekundärmetaboliten der Genera *Maytenus* und *Putterlickia* und assoziierten Endophyten“ selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe angefertigt habe. Ich habe keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt sowie wörtliche und sinngemäße Zitate kenntlich gemacht.

Die Arbeit hat in gegenwärtiger oder in einer anderen Fassung weder der TU Dortmund noch einer anderen Hochschule im Zusammenhang mit einer staatlichen oder akademischen Prüfung vorgelegen.

Ort, Datum

Unterschrift

Belehrung:

Wer vorsätzlich gegen eine die Täuschung über Prüfungsleistungen betreffende Regelung einer Hochschulprüfungsordnung verstößt, handelt ordnungswidrig. Die Ordnungswidrigkeit kann mit einer Geldbuße von bis zu 50.000,00 € geahndet werden. Zuständige Verwaltungsbehörde für die Verfolgung und Ahndung von Ordnungswidrigkeiten ist der Kanzler/die Kanzlerin der Technischen Universität Dortmund. Im Falle eines mehrfachen oder sonstigen schwerwiegenden Täuschungsversuches kann der Prüfling zudem exmatrikuliert werden, § 63 Abs. 5 Hochschulgesetz NRW.

Die Abgabe einer falschen Versicherung an Eides statt ist strafbar.

Wer vorsätzlich eine falsche Versicherung an Eides statt abgibt, kann mit einer Freiheitsstrafe bis zu drei Jahren oder mit Geldstrafe bestraft werden, § 156 StGB. Die fahrlässige Abgabe einer falschen Versicherung an Eides statt kann mit einer Freiheitsstrafe bis zu einem Jahr oder Geldstrafe bestraft werden, § 161 StGB.

Die oben stehende Belehrung habe ich zur Kenntnis genommen:

Ort, Datum

Unterschrift