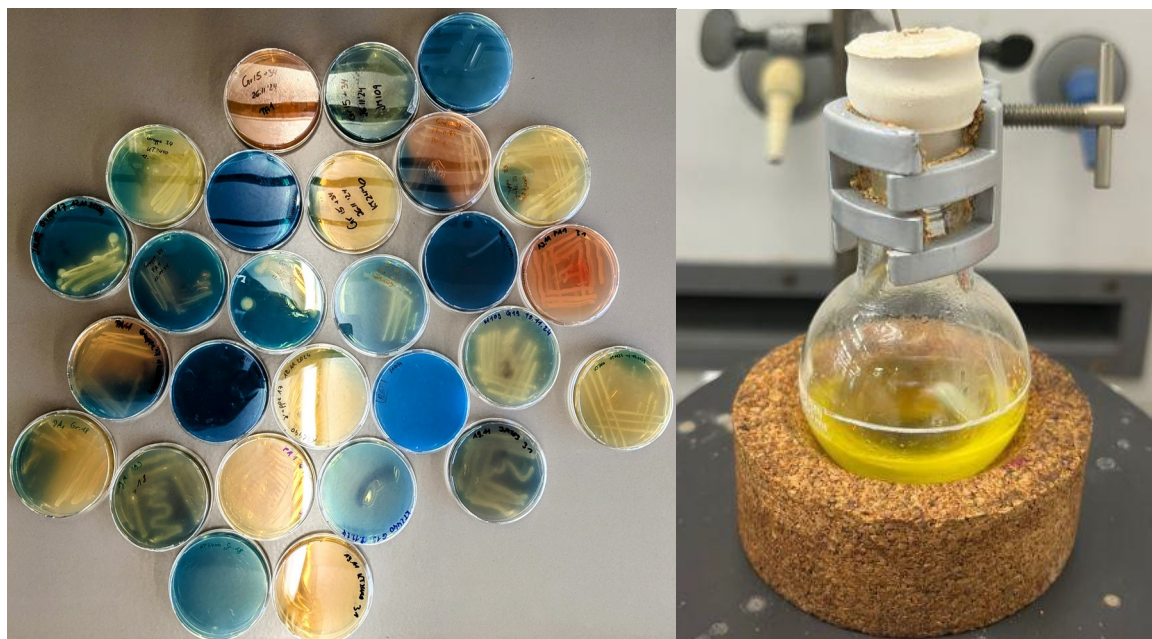


# **Praktikumsskript**

## **Masterpraktikum**

### **Bioanorganische Woche**



**Wintersemester 2025/26**

# Inhalt

1. Allgemeine Informationen.....	3
2. Die bioanorganische Chemie des Eisens.....	3
3. Dokumentation und Ablauf des Praktikums.....	4
4. Background: Siderophore Synthesis of TREN-1,2-HOPO.....	5
5. Synthesis of Precursor: 1,2-HOPO(Bn)-thiazolide.....	5
6. CAS (chrome azurol S)-based overlay assay.....	6
7. Wie man ein wissenschaftliches Poster erstellt.....	9
Literatur.....	10

# 1. Allgemeine Informationen

## 1.1 Zur Vorbereitung auf die Praktikumswoche

Zur Vorbereitung auf die Praktikumswoche müssen für die Synthese, die Einwaagen/Volumina der Edukte bestimmt, und die Stoffeigenschaften, inkl. Sicherheitshinweisen herausgesucht werden. Zusätzlich sollten die Konzepte der Schlenk-Technik, Dünnschichtchromatographie studiert worden sein. Bezüglich des CAS-Assays, sollte das zugrundeliegende Wirkprinzip verstanden sein.

## 1.2 Im Labor zu beachten

Alles, was im Labor gemacht wird, inkl. der tatsächlichen Einwaagen muss protokolliert werden, sowie jegliche Beobachtungen, wie beispielsweise Farbumschläge, das Auftreten von Niederschlägen, eigenständiges Erwärmen des Reaktionskolbens, oder eventuell vorhandene Kontaminationen auf genutzten Nährmedien.

# 2. Die bioanorganische Chemie des Eisens

## 2.1 Hintergrund

Eisen ist eines der zentralen Elemente in der Bioanorganischen Chemie, das in zahlreichen biologischen Prozessen eine entscheidende Rolle spielt. In Lebewesen kommt Eisen in verschiedenen Redoxzuständen vor: als Eisen(II) ( $\text{Fe}^{2+}$ ), Eisen(III) ( $\text{Fe}^{3+}$ ), und Eisen(IV) ( $\text{Fe}^{4+}$ ). Diese Flexibilität zwischen Oxidationsstufen ermöglicht es Eisen, als Kofaktor in einer Vielzahl von enzymatischen Reaktionen zu dienen. Als solches ist das Element essentiell für jegliche Form des Lebens, das schließt Bakterien und Archaeen (Prokaryoten), als auch Protisten, Pflanzen und (Säuge)Tiere (Eukaryoten) ein.

Im AK Daumann arbeiten, (an)organische Chemiker\*Innen, Biochemiker\*Innen, Koordinationschemiker\*Innen und Mikrobiolog\*Innen zusammen. Beispielsweise synthetisieren wir biomimetische Komplexe für Eisenenzyme (z.B. die Ten-eleven-Translocation Enzyme) und untersuchen sowohl die Enzyme als auch die Komplexe mit diversen spektroskopischen Methoden (ESR, CD, UV-Vis, IR, NMR etc.). Zusätzlich interessieren wir uns dafür, wie Eisen von Bakterien aufgenommen wird. Dies geschieht mittels Chelatliganden (Siderophore), denn Eisen(III) ist normalerweise als Hydroxid/Oxid sehr unlöslich und somit biologisch schwer verfügbar. Es braucht also spezielle Liganden die helfen dieses Element zu mobilisieren. Siderophore sind spezielle Moleküle, die von Bakterien und anderen Mikroorganismen produziert werden, um Eisen aus der Umwelt aufzunehmen. Da freies Eisen unter aeroben Bedingungen nur schlecht löslich ist und oft in Form von schwer zugänglichen Verbindungen vorliegt, haben Bakterien die hochaffinen Siderophore entwickelt, die Eisen(III) binden und in eine Form überführen, die von der Zelle aufgenommen werden kann. Man unterscheidet hier verschiedene Klassen von Siderophoren (Catecholate, Hydroxamate, Phenolate...). Manche von diesen werden sogar medizinisch eingesetzt (siehe z.B. Desferrioxamin, ein Hydroxamat Siderophor). Einige dieser Liganden haben Forscher\*Innen veranlasst bioinspirierte Liganden zu synthetisieren (z.B. 1,2-HOPO). Um Siderophore zu detektieren wurden Assays entwickelt, um diese sichtbar zu machen; mittels metall-sensitiver Farbstoffe wie etwa Chromazurol S (CAS).

## 2.2 Praktikumsinhalte

In ihrem Praktikum werden sie zum einen zwei Stufen eines bioinspirierten an Hydroxamat-Siderophore angelehnten Liganden synthetisieren. Hierbei werden ihnen Schutzgastechiken an der Schlenkline vermittelt. Zum anderen werden sie bakterielle Chelatliganden mittels des CAS-Assays nachweisen.

## 3. Dokumentation und Ablauf des Praktikums

**Montag:** Die Teams 1 - 3 starten um 13 Uhr mit der Einführung in ihre Schlenklinie im EOC Saal (26.42.01.011 durch Timm Baranski) und die Vorbereitung ihrer Plätze für den nächsten Tag. Während Team 4 - 6 die Bakterien im anderen Teil des Saales ausplattiert (betreut durch Dr. Carl-Eric Wegner). Um 14 Uhr wird dann gewechselt, und die Teams 1 - 3 plattieren aus, während die Teams 4 - 6 ihre Synthese starten.

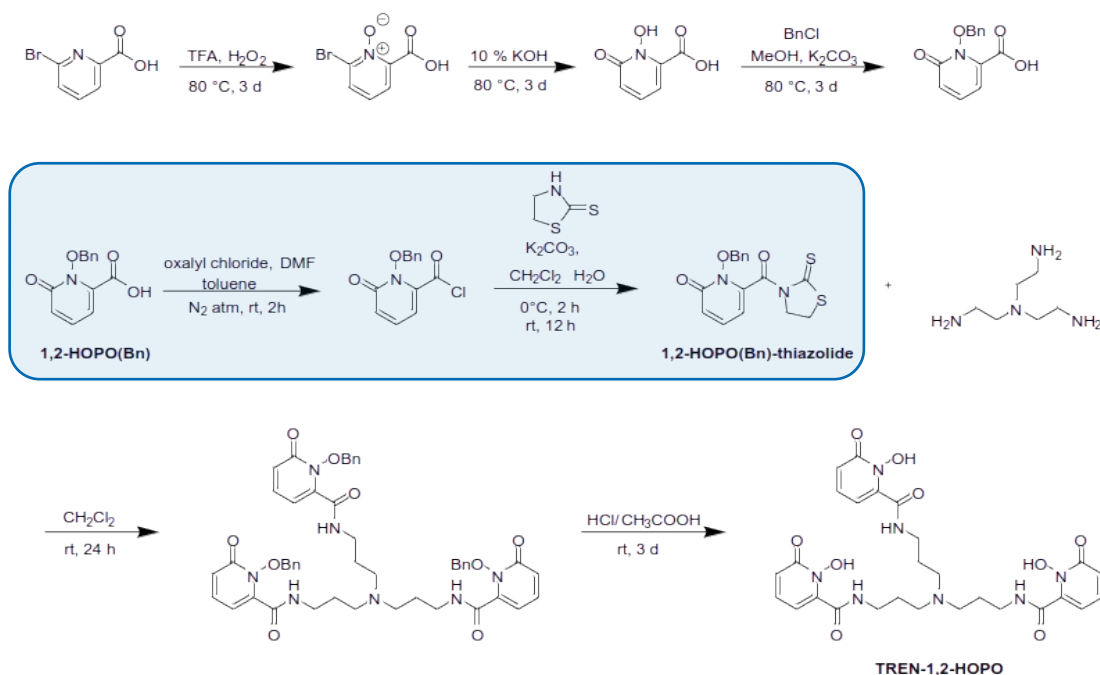
**Dienstag:** Alle Teams starten die Synthese um 13 Uhr, betreut durch Timm Baranski und Jonathan Gutenthaler-Tietze.

**Mittwoch:** Team 1 und 2 gießt um 13 Uhr die CAS Platten (betreut durch Dr. Carl-Eric Wegner) während Team 3 und 4 mit der Synthese weitermacht (betreut durch Timm Baranski). Um 14 Uhr wird dann gewechselt und Team 3 und 4 geht zum CAS Platten gießen, während Team 1 und 2 mit der Synthese fortfährt.

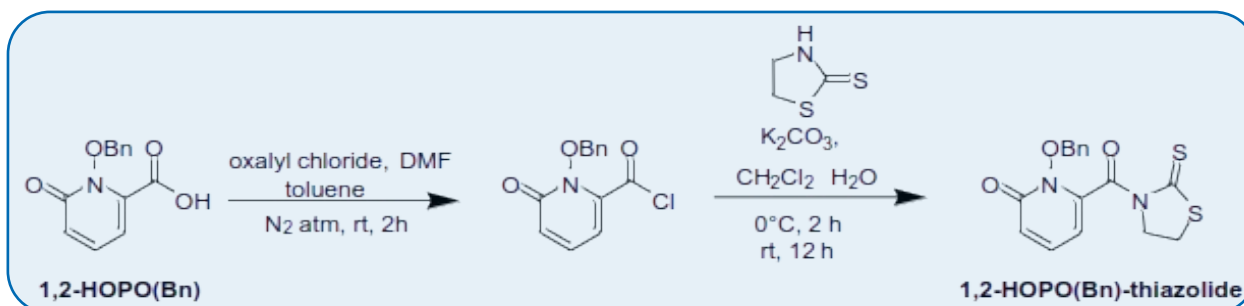
**Donnerstag:** Alle Teams arbeiten die zweite Stufe der Synthese auf und führt die Dünnschichtchromatografie durch (mit Timm Baranski und Jonathan Gutenthaler-Tietze). Um 15 Uhr werden die Agar-Platten aller Gruppen gemeinsam begutachtet (betreut durch Dr. Carl-Eric Wegner).

**Donnerstag in der darauffolgenden Woche:** Deadline für die Dokumentation die pro Team in Form eines Posters im pdf-Format elektronisch abzugeben ist. Siehe dazu die ppt Vorlage im Ilias. Auf der Abschlussveranstaltung wird das schönste Poster gekürt und gewinnt einen Preis. Feedback zum Poster wird im Anschluss schriftlich den Praktikumssteilnehmer\*Innen mitgeteilt.

## 4. Background: Siderophore Synthesis of TREN-1,2-HOPO



## 5. Synthesis of Precursor: 1,2-HOPO(Bn)-thiazolidine



### Monday - First Day:

1,2-HOPOBn (\_\_\_\_\_ mg, 0.50 mmol, 1.00 eq) was dried overnight *in vacuo*.

### Tuesday - Second Day:

The dried 1,2-HOPOBn was suspended in dry toluene (2 mL). Oxalyl chloride (\_\_\_\_\_  $\mu\text{L}$ , 0.90 mmol, 1.8 eq) was added at room temperature under an  $\text{N}_2$  atmosphere. Under stirring, 2-3 drops of DMF were added every 1 hour until no further gas evolution was observed. The solvent and excess oxalyl chloride were carefully removed *in vacuo* overnight. The acid chloride was then used without further purification immediately in the next step.

### Wednesday - Third Day:

The 1,2-HOPOBn acid chloride was dissolved in dichloromethane (5 mL) and added dropwise to a vigorously stirred solution of mercaptothiazolidine (\_\_\_\_\_ mg, 0.60 mmol, 1.20 eq) and potassium carbonate (\_\_\_\_\_ mg, 2.50 mmol, 5.00 eq) in water (1.5 mL) while cooling in an ice bath. After complete addition, the bright yellow mixture was warmed to room temperature and stirred overnight.

### Thursday - Fourth Day:

The layers were separated and the aqueous layer extracted with dichloromethane ( $3 \times 10$  mL). The combined organic phases were dried over sodium sulfate and filtered. The crude product was analyzed by TLC {DCM & MeOH} and then evaporated under reduced pressure using a rotary evaporator.

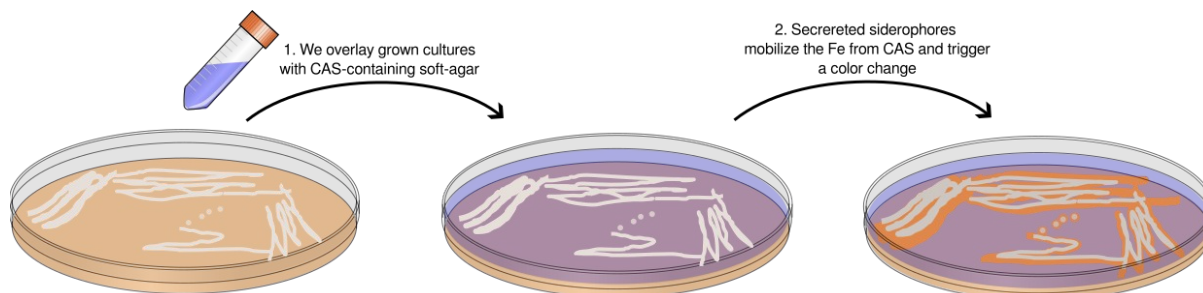
The samples, a yellow oil collected from all students, will be combined and purified by the assistant using column chromatography.

## 6. CAS (chrome azurol S)-based overlay assay

**Background:** Siderophores are chelators secreted by prokaryotes to mobilize poorly soluble iron and facilitate its subsequent uptake. Related chelators are known for other metals, e.g. chalkophores (copper) or zincophores (zinc).

In this part of the practical course, we will screen three different bacterial strains: *Escherichia coli* JM109, *Pseudomonas allopuntida* KT2440, and *Methylobacterium extorquens* PA1 for siderophore production.

We will take advantage of the metal-sensitive dye chrome azurol S (CAS) for the screening. We will grow the three strains on a medium lacking iron, thus stimulating siderophore production and release, and visualize siderophore release using CAS (Figure 1). CAS is a metal sensitive-dye and appears blue if iron is bound. If iron is released, the color changes to orange-yellow.



**Figure 1:** The overlay CAS assay in a nutshell. Cultures grown on a solid medium are overlaid with CAS-containing soft agar. Siderophores in the extracellular space mobilize iron from the CAS and cause a color change from blue to orange.

### Monday - First Day:

You will find all the needed materials on the bench assigned to your group. Details regarding the composition of the used media reagents can be found in the references listed at the end of this document.

We will start with a little background session about the essential elements of life, and how iron fits in here. Next, we will do a microbiology 101 crash course concerning cultivation and sterile work.

### Procedure:

1. Inspect the three plates we provided you with (one for each strain); how do the strains differ in terms of morphology (color, colony shape, etc.)?

Note: We will use this information on Thursday to assess growth and check for potential contamination.

2. Clean the surface of your bench with Bacillol® (a mixture of 1-, 2-propanol and ethanol).

Note: Don't spray the product on the bench (in microbiology we always want to avoid aerosol formation); spray it on a paper towel and wipe the surface.

3. Turn on the Bunsen burner and open the air hole fully. The roaring blue flame creates a zone of protection that allows you to work under sterile conditions. The rising air pushes microbes and particles up and away from your workspace. The resulting sterile workspace has roughly a radius of ~ 50 cm (Figure 2).



**Figure 2:** The roaring blue flame of the Bunsen burner creates a sterile workspace suitable for microbiological work.

Picture credit: neosynbio.com

4. Open one of the plates, pick up the biomass of a single colony with an inoculation loop, and streak it out on a fresh agar plate according to the four-streak technique.

Note: The idea is to distribute and “dilute” biomass. The latter leads ideally to single colonies, which facilitates checking for contaminants.

Prepared plates are incubated at 28 °C (*M. extorquens* PA1 and *P. alloputida* KT2440) and 37°C (*E. coli* JM109) until Thursday.

### **Wednesday - Third Day:**

#### Procedure:

1. Preheated (50 °C) CAS-containing soft agar is poured over the incubated plates and the plate surface completely covered. The soft agar layer should have a thickness of approximately 0.5 cm.
2. We inspect the plates for potential color changes after ~1 hour.

### **Thursday - Fourth Day:**

#### Procedure:

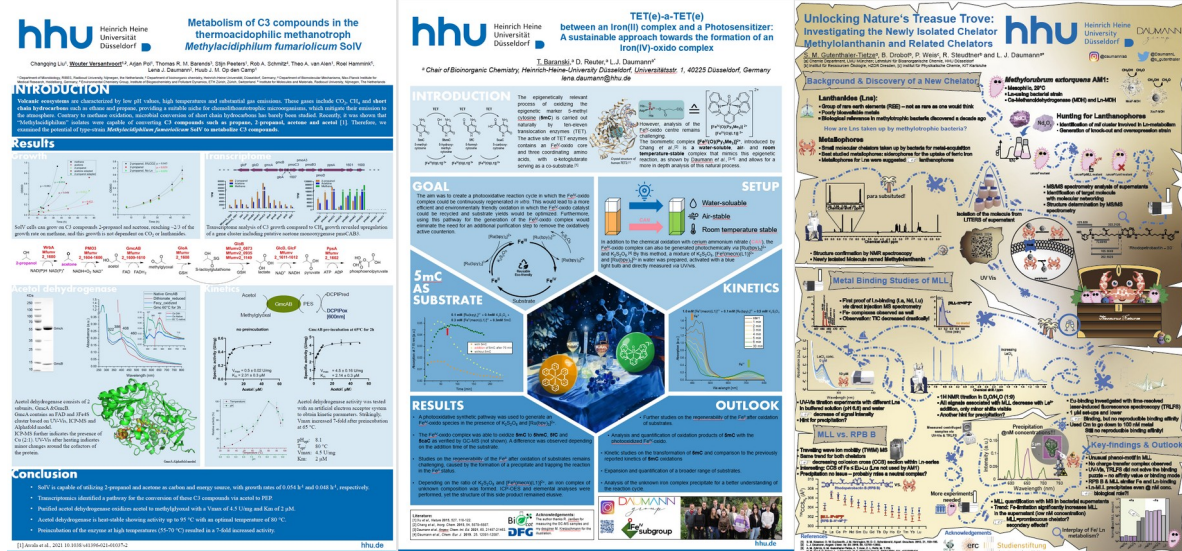
1. We re-visit our plates. After one day the colour change becomes more pronounced and plates can be interpreted more easily.

Note: Do you see differences regarding the intensity/shade? Check Pérez-Miranda et al., 2007. What might these tell us about the present siderophores?

## 7. Wie man ein wissenschaftliches Poster erstellt

### Beispiele und Aufbau:

Sie finden drei Beispiele für gelungene Poster vom AK Daumann hier.



Über Ilias stellen wir Ihnen zwei Vorlagen zur Verfügung. Sie dürfen die Template nach Ihren Wünschen verändern (Farbe, Form, Aufbau) oder ein ganz Eigenes verwenden.

Wichtig ist nur, dass folgende Infos mindestens auf dem Poster Platz finden:

- HHU logo
- Titel
- Autoren
- Einleitung: Thema/Relevanz, gerne mit Abbildung
- Resultate und Ergebnisse: Was wurde gemacht? Sie dürfen hier entweder mehr Fokus auf die Agarplatten oder die Synthese legen, es sollten aber alle relevanten Inhalte auf dem Poster, sinnvoll verknüpft vorkommen, wie sie das darstellen, bleibt Ihnen überlassen. Gehen sie auf verwendete Methode(n) ein, zeigen sie Ihre Ergebnisse in sinnvollen Abbildungen (z.B. von den Agarplatten) oder Graphen oder in Chemdraw Schemes (Synthese).
- Schlussfolgerung(en): Was hat gut geklappt, was nicht? Warum ist z.B. die Ausbeute abgewichen etc. Sie dürfen sich hier auf einen Aspekt konzentrieren
- Literatur: Was haben sie verwendet z.B. um die Synthese nachzuschlagen, oder welche Quelle haben sie für eine Abbildung genutzt?

## Literatur

- Louden BC, Haarmann D, Lynne AM. 2011. Use of blue agar CAS assay for siderophore detection. *J Microbiol Biol Educ* 12:51–53.
- Schwyn B, Neilands JB. 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal Biochem* 160:47–56.
- Xu J, Churchill DG, Botta M, Raymond KN. 2004. Gadolinium(III) 1,2-hydroxypyridonate-based complexes: toward MRI contrast agents of high relaxivity. *Inorg Chem* 43:5492–5494.
- Fan D, Fang Q. 2021. Siderophores for medical applications: Imaging, sensors, and therapeutics. *Int J Pharm* 597:120306.
- Pérez-Miranda S, Cabirol N, George-Téllez R, Zamudio-Rivera LS, Fernández FJ. 2007. O-CAS, a fast and universal method for siderophore detection. *J Microbiol Methods* 70:127–131.
- Delaney NF, Kaczmarek ME, Ward LM, Swanson PK, Lee M-C, Marx CJ. 2013. Development of an optimized medium, strain and high-throughput culturing methods for *Methylobacterium extorquens*. *PLoS One* 8:e62957.
- <https://schlenklinesurvivalguide.com/> (abgerufen am 09.10.2025)

Weitere Tipps wie man Poster entwirft:

- <https://fourwaves.com/blog/how-to-make-a-scientific-poster/>
- [https://www.uni-bremen.de/fileadmin/user\\_upload/sites/studierwerkstatt/Leitfaden\\_wissenschaftliche\\_Poster\\_erstellen.pdf](https://www.uni-bremen.de/fileadmin/user_upload/sites/studierwerkstatt/Leitfaden_wissenschaftliche_Poster_erstellen.pdf)