Metagenom-Technologie zur Wirkstoffsuche sowie

Untersuchungen der Iromycine aus Streptomyces sp.

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten der Georg-August-Universität zu Göttingen

> vorgelegt von Frank Surup

aus Kassel

Göttingen 2007

D7

Referent: Prof. Dr. A. Zeeck Koreferent: Prof. Dr. U. Diederichsen Tag der mündlichen Prüfung: 03. Juli 2007 Die vorliegende Arbeit wurde im Institut für Organische und Biomolekulare Chemie der Universität Göttingen in der Zeit von Februar 2004 bis Mai 2007 unter Anleitung von Frau Dr. S. Grond und Herrn. Prof. Dr. A. Zeeck durchgeführt.

> Frau Dr. S. Grond und Herrn Prof. Dr. A. Zeeck danke ich für die interessante Themenstellung, das stete Interesse am Fortgang dieser Arbeit sowie für viele wertvolle Diskussionen und Anregungen.

Publikationen aus dieser Arbeit

Zeitschriftenbeiträge

F. Surup, O. Wagner, J. von Frieling, M. Schleicher, S. Oess, P. Müller, S. Grond, The Iromycins, a New Family of Pyridone Metabolites from Streptomyces sp. I. Structure, NOS Inhibitory Activity, and Biosynthesis, *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 5085–5090.

F. Surup, H. Shojaei, P. von Zezschwitz, B. Kunze, S. Grond, Iromycins from Streptomyces sp. and from synthesis: New inhibitors of the mitochondrial electron transport chain, *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, doi:10.1016/j.bmc.2007.11.023.

Tagungsbeiträge

F. Surup, J. von. Frieling, O. Wagner, S. Grond, Iromycins, Research of a new group of natural compounds, Vortrag gehalten bei *Göttinger-Tübinger Gespräche*, Goslar, **2005**.

F. Surup, J. von. Frieling, O. Wagner, S. Grond, Biosynthesis and Regulation Activity of the Iromycin-Antibiotics from *Streptomyces* sp., Poster präsentiert auf der *Prokagen* Konferenz, Göttingen, **2005**.

F. Surup, J. von. Frieling, O. Wagner, S. Grond, Biosynthesis and Regulation Activity of the Iromycin-Antibiotics from *Streptomyces* sp., Poster präsentiert auf der *Frontiers in Medicinal Chemistry* Konferenz, Berlin, **2007**.

F. Surup, G. Meurer, J. Mampel, C. Schleper, S. Grond, Metagenome Technology for Drug Discovery, Vortrag gehalten bei *Göttinger-Tübinger Gespräche*, Retzbach-Zellingen, **2007**.

F. Surup, J. von. Frieling, O. Wagner, P. Kössler, S. Grond, Biosynthesis and Regulation Activity of the Iromycin-Antibiotics from *Streptomyces* sp., Vortrag gehalten beim *V. Symposium Hochschule trifft Industrie*, Zeuthen, **2007**.

F. Surup, G. Meurer, J. Mampel, C. Schleper, S. Grond, Natural Products from a Metagenomic Approach, Poster präsentiert beim *V. Symposium Hochschule trifft Industrie*, Zeuthen, **2007**.

F. Surup, P. Kössler, S. Grond, Biosynthesis and Regulation Activity of the Iromycin-Antibiotics from *Streptomyces* sp., Poster präsentiert auf der *Prokagen* Konferenz, Göttingen, 2007.

INHALTSVERZEICHNIS

A. THEORETISCHER TEIL

I.	EINL	EITUNG	1
1.	Einl	EITUNG	1
	1.1	Mikrobielle Diversität	1
	1.2	Diversität in mikrobiellen Habitaten	1
	1.3	Neue Kultivierungsmethoden	3
	1.4	Isolierungsunabhängige Analyseverfahren	4
	1.5	Metagenom-Verfahren	4
	1.6	Anwendungen des Metagenomverfahrens	5
	1.6.1	Mikrobielle Gemeinschaften	5
	1.6.2	Funktionelle Gene und Biokatalysatoren	5
	1.6.3	Naturstoffe	6
	1.7	Heterologe Expression von Biosynthese-Genclustern	7
2.	AUF	GABENSTELLUNG	10
II.	META	AGENOMPROJEKT	. 11
			•
1.	ALL	GEMEINE METHODEN	11
	1.1	Erstellung einer Metagenom-Bibliothek	11
	1.2	Analyse einer Metagenombank	12
	1.2.1	Sequenzorientierte Analyse	13
	1.2.2	Funktionsorientierte Analyse	13
2.	DAS	BMBF-Projekt "Erschließung schwer kultivierbarer mariner Biodiversität füi	ł
	DIE V	VIRKSTOFFFORSCHUNG MIT MOLEKULARGENETISCHEN METHODEN"	14
	2.1	Ablauf des Projektes	15
	2.2	Vorarbeiten der Projektpartner	17
3.	EIGE	NE ARBEITEN	19
	3.1	Vorscreening potentieller Hoststämme	19
	3.2	Chemisches und Biologisches Screening und HPLC-Analyse	20
	3.3	Fermentationskurven	21
	3.4	Bearbeitung Klon M49.K9	22
	3.4.1	Fermentation A (12 L)	22
	3.4.2	Fermentation B (50 L)	23
	3.5	Bearbeitung Klon M73.N2	25
	3.5.1	Isolierung und Strukturaufklärung	25
	3.5.2	Tryptophan Fütterungsexperiment	26
4.	HET	EROLOG EXPRIMIERTE VERBINDUNGEN	26
	4.1	Brevinsäure (18)	26
	4.1.1	Biosynthesehypothese für Brevinsäure (18)	27

	4.1.2	Herstellung und Kultivierung von Subklonen	
	4.1.3	Annotierung eines Subfragments E. coli M49.K9	
	4.2	Tryptanthrin (21)	
	4.2.1	Biosynthesehypothese für Tryptanthrin (21)	30
5.	BIOL	OGISCHE AKTIVITÄT DER METABOLITE	
	5.1	Diskussion der biologischen Aktivität der Brevinsäure (18) und 19	33
	5.1.1	Vergleich der Brevinsäure (18) mit ähnlichen Strukturen	
	5.1.2	Synthese der Brevinsäure (18) und oxidierter Derivate (19, 46-48)	
	5.1.3	Diskussion der biologischen Aktivität von E. coli M49.K9	35
	5.2	Diskussion der biologischen Aktivität des Tryptanthrin (21)	36
6.	DISK	USSION DES PROJEKTES	37
7.	ALLO	GEMEINE BEWERTUNG DER METAGENOMSTRATEGIE ZUR WIRKSTOFFSUCHE	39
Ш.	ARBE	ITEN AN STREPTOMYCES BOTTROPENSIS DRA17	
1.	Fütt	ERUNGSEXPERIMENTE MIT MARKIERTEN VORLÄUFERN	44
	1.1	Stammisolierung und Taxonomie	44
	1.2	Stammhaltung und Fermentation von Streptomyces sp. Dra 17	45
	1.3	Aufarbeitung und Isolierung der Iromycine	46
	1.4	Strukturaufklärung neuer Iromycine	48
	1.5	Biosyntheseuntersuchungen	52
	1.5.1	Vergleich mit strukturell ähnlichen Naturstoffen	52
	1.5.2	Fütterungsexperimente mit ¹³ C-markierten Vorläufern	54
	1.5.3	Fütterungsexperimente mit ¹⁵ N-markierten Vorläufern	57
	1.6	Diskussion	58
2.	Mol	EKULARGENETISCHE UNTERSUCHUNGEN AN <i>S. BOTTROPENSIS</i> DRA17	61
	2.1	Hypothese zum Biosynthese-Gencluster des Iromycins	61
	2.2	Molekulargenetische Experimente	63
	2.2.1	Kartierung der Cosmidbank des Stammes Dra 17	63
	2.2.2	Überführung der DNA in <i>E. coli</i> ET12567	65
	2.2.3	Konjugation mit Streptomyces lividans K4-114 und S. coelicolor YU105	66
	2.2.4	Screening der transformierten Streptomyces-Klone	66
	2.2.5	Heterologe Expression von Klon Streptomyces lividans 2c-1b	67
	2.3	Genanalyse des sequenzierten Cosmid 2	67
	2.4	Genomsequenzierung von Streptomyces scabies 87.22	71
	2.5	Weitere Schritte zur Auffindung des Iromycin-Genclusters	72
3.	Oxid	ATIVER ABBAU DER IROMYCINE	
	3.1	Vergleich der biologischen Aktivität der Iromycine	
	3.2	P450-Oxidoreduktasen in Eukaryoten	
	3.3	P450-Oxidoreduktasen in Prokaryoten	74
	3.4	Einsatz von Enzyminhibitoren	75
	3.5	Fütterungsexperiment mit Streptomyces bottropensis Dra 17	76

3.6	Regioselektivität der Oxygenierung	
3.7	Diskussion der Ergebnisse	
4. Pr	ODUKTION VON PHYTOTOXINEN DURCH S. BOTTROPENSIS DRA17	
4.1	Streptomyces als Phytopathogen	
4.2	Durch Streptomyceten verursachte Phytokrankheiten	
4.2	.1 Kartoffelschorf (engl.: Common Scab)	
4.2	.2 Flachschorf (engl. Acid Scab)	
4.2	.3 Bodenfäule (engl.: Soil rot)	
4.2	.4 Rotbrauner Schorf (engl.: Russet Scab; jpn.: Kamenoko-byo)	
4.3	Von Streptomyces sp. produzierte Phytotoxine	
4.3	.1 Thaxtomin A (59)	
4.3	.2 Thaxtomin C (60)	
4.3	.3 Concanamycin A und B (97, 98)	
4.3	.4 FD-891 (99)	
4.4	Biosynthese des Thaxtomin A (59)	
4.5	Pathogene Insel	
4.6	Steuerung der Thaxtomin-Biosynthese	
4.7	Einfluss des Iromycin A (13) auf die Thaxtomin A (59) Biosynthese	
4.7	.1 Produktion von Thaxtomin (59) in verschiedenen Medien	
4.7	.2 Optimierung der Fermentationsbedingungen	
4.7	.3 Fermentationskurve	
4.7	.4 Iromycin A (13) Fütterungsexperiment	
4.8	Diskussion	
5. INI	HIBITION DES KOMPLEX I	
5.1	Strukturen von Piericidin (72) und Iromycin (13)	
5.2	Komplex I der Atmungskette	
5.3	Struktur-Wirkungs-Beziehung der Piericidine	101
5.4	Struktur-Wirkungs-Beziehung der Iromycinfamilie	
5.5	Komplex I-Inhibition durch Tryptanthrin (21)	
5.6	Weitere Wirkungen von Komplex I-Inhibitoren wie Piericidin (72)	107
5.7	Weitere Biologische Tests der Iromycine	
5.8	Ausblick und Diskussion	109
6. NC) Synthase-Inhibition	111
6.1	Iromycin A (13) in der Patentliteratur	111
6.2	Humane NO Synthasen	111
6.2	.1 NO-Synthase-Isoformen	113
6.2	.2 nNOS	113
6.2	.3 iNOS	
6.2	.4 eNOS	
6.3	Bakterielle NOS	

	6.4 Pflanzliche NOS	
	6.5 NO-Überproduktion als Krankheitsursache	
	6.6 Selektive NOS-Inhibition von Iromycin A-C (13, 14, 61)	
	6.7 Diskussion der Ergebnisse	117
IV. Z	ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE	
IVA.	. SUMMARY OF THE RESULTS	
B. E	EXPERIMENTELLER TEIL	127
I.	ALLGEMEINES	
1.	Instrumentelle Analytik	127
2.	CHROMATOGRAPHISCHE METHODEN	129
3.	Mikrobiologische Methoden	132
II.	METAGENOMPROJEKT	
1.	STAMMHALTUNG E. COLI UND B. SUBTILIS PC194	136
2.	VORSCREENING DER HOSTSTÄMME STREPTOMYCES SP. B444, Bacillus Sp. B1012, Bacil	LLUS SP.
	1A43	
3.	HERSTELLUNG VON TESTPLATTEN MIT CHLORAMPHENICOL-RESISTENTEM B. SUBTILIS	C194 137
4.	Screening Ansatz	
5.	Klon M49.K9 Fermentation A (12L)	
6.	Fermentationskurven MK49.K9 und M73.N2	
7.	FERMENTATIONSKURVE M73.N2	
8.	ISOLIERUNG VON REINSUBSTANZEN AUS FERMENTATIONKURVEN M73.N2	
9.	NACHWEIS VON TRYPTANTHRIN (<u>21</u>) IM ROHEXTRAKT VON M73.N2	140
10.	. ISOLIERUNG VON REINSUBSTANZEN AUS FERMENTATION B (50 L) MK49.K9	141
11.	CHARAKTERISIERUNG DER METABOLITEN	
12.	. Synthesen	147
III.	ARBEITEN AN STREPTOMYCES BOTTROPENSIS DRA17	
1.	Stammhaltung	150
	1.1 Agarplatten	
	1.2 Langzeiteinlagerung als Glycerineinlagerung	
2.	KULTIVIERUNG	
	2.1 Vorkulturen	150
	2.2 Variationen der Hauptkultur	150
3.	Standardaufarbeitung von Fermentationsansätzen	151
4.	Isolierung der Iromycine (<u>13</u> , <u>14, 61</u> - <u>64</u>)	152
5.	Isolierung von Thaxtomin A (<u>59</u>)	152
6.	CHARAKTERISIERUNG DER METABOLITEN	152

SYN	THESEN	159
BIOS	SYNTHESEUNTERSUCHUNGEN	167
8.1	Fütterung von 5-Chlorvaleriansäure (78), 5-Chlorvaleriansäure-N-acetylcysteamin- thioes	ter (80),
	2-Metylbuttersäure-N-acetylcyteamin-thioester (82), trans-2-Hexensäure (79)	167
8.2	Fütterung von Natriumnitrat und Ammoniumsulfat	168
8.3	Fütterungsexperiment mit Ancymidol (94)	168
Μοι	LEKULARBIOLOGISCHE METHODEN UND GERÄTE	168
ТНА	xtomin-Produktion	174
10.1	Medienwahl	174
10.2	Bestimmung der Konzentration	175
10.3	Medienoptimierung	176
10.4	Fermentationskurve	177
10.5	Fütterungsversuch	178
	Syn [*] Bios 8.1 8.2 8.3 Moi Tha 10.1 10.2 10.3 10.4 10.5	SYNTHESEN BIOSYNTHESEUNTERSUCHUNGEN 8.1 Fütterung von 5-Chlorvaleriansäure (78), 5-Chlorvaleriansäure-N-acetylcysteamin- thioes 2-Metylbuttersäure-N-acetylcyteamin-thioester (82), trans-2-Hexensäure (79) 8.2 Fütterung von Natriumnitrat und Ammoniumsulfat. 8.3 Fütterungsexperiment mit Ancymidol (94) MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN UND GERÄTE. THAXTOMIN-PRODUKTION 10.1 Medienwahl 10.2 Bestimmung der Konzentration 10.3 Medienoptimierung 10.4 Fermentationskurve 10.5 Fütterungsversuch

C .	LITERATURVERZEICHNIS	18	D
------------	----------------------	----	---

I. Einleitung

1. Einleitung

1.1 Mikrobielle Diversität

Das Verständnis der Mikrobiologie änderte sich in der Mitte der achtziger Jahre durch die Einführung molekulargenetischer Methoden bei der Untersuchung von Umweltproben grundlegend:^[1] Zum Einen hatten die meisten analysierten DNA-Sequenzen erstaunlicherweise keine Ähnlichkeit zu den aus Zellkulturen bekannter Organismen, zum Anderen wurden die bekannten Mikroorganismen fast nie in molekularen Stichproben gefunden. Dieser Befund wies darauf hin, dass die mikrobielle Diversität viel größer ist als zunächst angenommen.^[2]

Seitdem wurden große Fortschritte in der Taxonomie der Mikroorganismen erzielt. Als C. WOESE et al. 1985 durch 16S rRNA Gensequenzierung das Bakterienreich klassifizierten, konnten 11 Bakterienphyla unterschieden werden.^[3] Bis heute wurden außerdem 42 neue Phyla hinzugefügt. Somit sind nun 53 bakterielle Phyla mit ungefähr 4800 Spezies bekannt.^[4] Von den 53 Phyla enthalten nur 27 Phyla bereits mit heutigen Methoden kultivierbare Mikroorganismen, und auch davon sind meistens nur ein oder wenige Mitglieder kultivierbare.^[5] Somit besteht die andere Hälfte der bisher klassifizierten Phyla aus bislang unkultivierbaren Bakterien, die nur auf Basis der 16S rRNA Gensequenzen beschrieben werden konnten.^[6] Lediglich fünf Phyla *Actinobacteria, Bacteroidetes, Cyanobacteria, Firmicutes* und *Proteobacteria* enthalten kultivierbare Spezies, welche durch Produktion von bioaktiven Naturstoffen aufgefallen sind (Abb. 1). Diese fünf Stämme repräsentieren mit 95 % den Großteil aller kultivierten und publizierten Spezies. Daraus folgt, dass insgesamt 48 Stämme bisher aufgrund schlechter oder bisher nicht möglicher Kultivierbarkeit unzureichend physiologisch untersucht werden konnten und so auch die Isolierung von Naturstoffen aus diesen Organismen unmöglich war.

1.2 Diversität in mikrobiellen Habitaten

Besonders herausragend scheint die Diversität in den Habitaten Ozean und Boden zu sein. Für das Meer gibt es Schätzungen über insgesamt 10⁶ bis 10⁹ Spezies;^[7] während Boden wahrscheinlich 2000-18000 Spezies pro Gramm enthält.^[8]

In bakteriellen Habitaten existiert somit eine immense Diversität, die typischerweise aus einigen Dutzend vorherrschenden Arten und einer gewaltigen Anzahl nur in sehr kleiner Population auftauchenden Arten besteht.^[1] Diese meist biosynthetisch inaktiven, hungernden Bakterien, die sich zeitweilig nicht teilen, können in der Umwelt sehr lange überdauern.



Abb. 1: Phylogenetischer Baum der bakteriellen Domäne, die auf Analyse der 16S rRNA Gensequenzen beruht. Bakterielle Stämme mit kultivierbaren Repräsentanten sind blau und grün dargestellt. Nummern in rot zeigen publizierte Spezies innerhalb eines Phylums. Blau dargestellte Stämme enthalten mindestens einen Antiinfektiva produzierenden Vertreter. Die Skala entspricht 0.05 Auswechselungen pro Nucleotid-Position, Abb. aus Ref. [5].

Vertreter dieser seltenen Gattungen neigen dazu, unter diesen für sie ungünstigen Bedingungen kleiner zu sein und langsamer zu wachsen. Viele Bakterien liegen in solch geringer Konzentration vor, dass sie selbst mit molekulargenetischen Methoden schwierig zu detektieren sind. Sie werden bei Analysen leicht übersehen, da ihre DNA wegen ihrer geringen Anzahl in einer Mischkultur nicht leicht zu detektieren sind.

1.3 Neue Kultivierungsmethoden

Die von PASTEUR, KOCH, BEIJERINCK UND WINOGRADSKY im 19. Jahrhundert entwickelten Methoden legten die Grundlage für die Entwicklung der Mikrobiologie.^[9] Ihre konventionellen Verfahren zur Kultivierung und Anreicherung von Reinkulturen sind allerdings selektiv und fördern das Wachstum ganz bestimmter Mikroorganismen. Kolonien können erst bei Erreichen von etwa 10⁵ Zellen visuell wahrgenommen werden. Daher selektieren diese Verfahren Mikroorganismen, die sich schnell teilen, zu hohen Dichten heranwachsen, fähig sind sich isoliert zu vermehren und eine Resistenz gegenüber hohen Nährstoffkonzentrationen besitzen. Diese Bedingungen sind jedoch völlig verschieden von der natürlichen Umgebung der meisten Mikroorganismen. Neben der Existenz von obligat biotrophen Pathogenen, deren gesamter Lebenszyklus auf lebende Wirtszellen ausgerichtet ist, dürfte dies das Versagen der Kultivierung vieler Bakterien erklären.^[10]

Um die Kultivierung weiterer Spezies zu ermöglichen, wurden neue Kultivierungsmethoden entwickelt, die eine natürliche Umgebung simulieren. Durch Ausdehnung der Kultivierungszeit auf 10 Wochen konnten bisher für unkultivierbar gehaltene Mitglieder von *Acidobacteria* und *Verrucomicrobia* in Kultur gebracht werden.^[11] Bei Zusatz von Signalmolekülen wie cAMP und Acylhomoserinlacton konnte die Effizienz der Kultivierung aquatischer Bakterien gesteigert werden.^[12] BUTTON *et al.* konnten durch die Methode verdünnter Kultivierung zwischen 2 und 60 % der in marinen Proben enthaltenden Bakterien kultivierbar machen.^[13] Es wird vermutet, dass die meisten dieser Bakterien die stationäre Phase erreichen, bevor sie mit traditionellen Techniken erkennbar sind.

Ein neuartiger Ansatz von KELLER *et al.* bettet isolierte Bakterienzellen in permeable Mikrokapseln ein, durch die sie miteinander Signalmoleküle austauschen können. In diesen Kapseln teilen sich die Bakterien zu Kolonien von 20 bis 100 Zellen, die computergestützt auf Mikrotiterplatten umplattiert werden können.^[14] Dort wachsen die meisten Kolonien zu einer optischen Dichte von mehr als 0.1 (600 nm) heran, was weitergehende Analysen ermöglicht.

1.4 Isolierungsunabhängige Analyseverfahren

Daneben sind Methoden entwickelt worden, die die Rolle einzelner Mikroorganismen in ihrer Gemeinschaft auch ohne Notwendigkeit der Isolierung beleuchten können. Zu nennen ist hier die Kombination aus Fluoreszenz in-situ Hybridisierung (FISH) und Mikroautoradiographie, die bei einzelnen Zellen die Aufnahme von radioaktiv markierten Substraten mit phylogenetischen Informationen vergleicht. Dadurch ließ sich das Substrat-Aufnahmemuster von einzelnen Mikroben im komplexen mikrobiellen Konsortium identifizieren und die Funktionen der Mitglieder bestimmen.^[15]

Ein anderes Verfahren nutzt mit stabilen Isotopen markierte Vorläufer, die in wachsenden Zellen in die DNA inkorporiert werden. Die schwerere Erbsubstanz kann anschließend durch Zentrifugation abgetrennt und analysiert werden. Durch diese Methoden wurde die Rolle von Methanol-abbauenden Bakterien im Boden untersucht.^[16]

Durch Klonierung von aus der Umwelt isolierter DNA in geeignete Wirtsorganismen werden die DNA und ihre Expressionsprodukte einer Untersuchung zugänglich. Dieses Verfahren wird Metagenomik genannt und umgeht die Notwendigkeit der Kultivierung völlig.

1.5 Metagenom-Verfahren

Das Konzept, DNA direkt aus der Umwelt zu entnehmen wurde bereits 1985 von N. PACE vorgeschlagen.^[17] Durch direkte Klonierung von Umwelt-DNA (eDNA von engl. *economy DNA*) in Wirtsorganismen lassen sich Bibliotheken herstellen, die die gesamte Erbinformation der Probe enthält. Der Begriff "Metagenomik" entstammt der Kombination der Begriffe Metaanalyse (Prozess der Statistik, der unterschiedliche Ergebnisse aus verschiedenen Untersuchungen quantitativ vergleichbar macht) und Genomik (Analyse der kompletten Erbinformation eines Organismus). Das Metagenom ist demnach als die Gesamtheit aller genomischen Information eines Biotops zu einem bestimmten Zeitpunkt zu verstehen.^[18]

Die erste Anwendung von SCHMIDT *et al.* war eine Bibliothek, die aus einer Seewasserprobe in λ -Phagen abgelegt und nach 16S rRNA Genen gescreent wurde.^[19] Durch den Vergleich der 16S rRNA mit bekannten Sequenzen wurde die Identität des Mikroplanktons untersucht und es wurden einzigartige Sequenzen erhalten. Diese Fortschritte in der Klonierung von DNA direkt aus dem Wasser waren ein Meilenstein auf diesem Gebiet. Die Anwendung der Metagenomik auf Bodenproben wurde lange Zeit durch Komponenten wie Huminsäuren erschwert, die an DNA binden oder die für das Klonierungsverfahren notwendige Enzyme inhibieren.^[20] In der Zwischenzeit wurden auf allen Gebieten große Fortschritte erzielt, wodurch Studien ermöglicht wurden, die am Anfang der Entwicklung noch unmöglich erschienen.

1.6 Anwendungen des Metagenomverfahrens

1.6.1 <u>Mikrobielle Gemeinschaften</u>

Die Analyse des Metagenoms kann ganzheitliche Modelle über das Zusammenleben von Organismen liefern. Das am besten untersuchte Beispiel ist das Ökosystem der Richmond Mine in Kalifornien.^[21] Die Bedingungen dort gehören mit einem pH = 0.8, 42 °C und hohen Konzentration an Schwermetallionen zu den lebensfeindlichsten auf unserem Planeten. Durch die Analyse des Metagenoms konnten hier fast vollständige Genome von den vorherrschenden Organismen *Leptospirillum* Gruppe II und *Ferroplasma* Typ II sowie umfangreiche Sequenzen der anderen Mitglieder (*Leptospirillum* Gruppe III, *Ferroplasma* Typ I und G-plasma) erhalten werden. Dadurch konnte gezeigt werden, wie die Gemeinschaft die Nährstoffversorgung durch Kohlenstoff- und Stickstofffixierung und die Energieversorgung durch Oxidation von Schwefel sichert.

Bei nährstoffreicheren Ökosystemen, die eine höhere Komplexität und biologische Diversität aufweisen, ist es nicht möglich vollständige Genome der Mitglieder zu erhalten. Durch die Sequenzierung von DNA aus der Sargassosee mit 1 Milliarde Basenpaaren wurden 1.2 Millionen neue Gene entdeckt.^[22] Besonders interessant erscheint hier die Diversität von Rhodopsin-ähnlichen Photorezeptoren. Diese sind nicht wie zuvor vermutet auf *Archae* beschränkt, sondern bilden durch ihre weite Verbreitung unter Bakterien eine vom Chlorophyll unabhängige Energieversorgung des phototrophen Ökosystems.^[23] Daneben konnten wichtige Fragen des wenig verstandenen Phosphorkreislaufs beantwortet werden.

1.6.2 Funktionelle Gene und Biokatalysatoren

Durch Metagenomanalysen konnte eine große Anzahl neuer Gene identifiziert werden, die Enzyme wie Lipasen, Esterasen, Chitinasen, Amidasen, Amylasen kodieren oder am Metabolismus von 4-Hydroxybutyrat oder der Biosynthese von Biotin beteiligt sind.^[24]

Diese Vielzahl an Genabschnitten und Genen, die für bestimmte Enzyme kodieren, eignet sich in idealer Weise dazu, nach einem perfekt geeigneten Enzym für einen gewünschten industriellen Prozess zu suchen.^[25] Somit werden langwierige und kostspielige Optimierungen für industrielle Prozesse wesentlich erleichtert.

Weiterhin enthalten Metagenombanken eine große Zahl neuer Antibiotika-Resistenzgene mit einer vorher nicht bekannten Vielfalt. Außerdem wurde eine Vielzahl von Genen für den Abbau von Xenobiotika gefunden. Dies unterstreicht das biodegenerative Potential mikrobieller Gemeinschaften.^[24]

1.6.3 Naturstoffe

abgeleitete semisynthetische Naturstoffe und daraus Derivate spielen in der Wirkstoffentwicklung seit jeher eine dominierende Rolle. In der Zeit von 1981 bis 2002 waren neue Medikamente, die auf den Markt eingeführt wurden, zu etwa 30 % Naturstoffe oder deren synthetische Derivate.^[26] Daher ist die antibakterielle, antifungische oder Naturstoffen von immunsuppressive Wirkung von großem Interesse für die Wirkstoffentwicklung in der pharmazeutischen Industrie.

Um den immer häufiger auftretenden Resistenzen bekannter Erreger auch in Zukunft begegnen zu können und neue Therapiekonzepte zu ermöglichen, ist die Forschung auch weiterhin auf neue Leitstrukturen von Naturstoffen angewiesen.^[27] In den letzten Jahren ist die Zahl der neu angemeldeten auf Naturstoffen basierenden Medikamenten jedoch laufend zurückgegangen. Gerade in der Antibiotika-Entwicklung zeigt sich eine zunehmende Diskrepanz zwischen Resistenzentwicklungen und Forschungserfolg.^[28]

Der Mangel an neuen Leitstrukturen wird neben dem Zurückgehen der Forschungsintensitäten auf die Reisolierung von bekannten Substanzen zurückgeführt. Um die immer häufiger auftretende Reisolierung zu vermeiden, wurde das Naturstoffscreening z. B. auf bisher wenig untersuchte Habitate ausgedehnt. Besonders marine Organismen werden intensiv auf die Bildung von Sekundärstoffen hin untersucht, was zur Entdeckung einer Vielzahl neuartiger Strukturen führte.^[29] Weiterhin werden auch extremophile und endophytische Organismen in das Naturstoffscreening mit einbezogen.^[30]

Um das biosynthetische Potential von bislang unkultivierbaren Bakterien nutzen zu können, eignet sich die Expression ihrer Biosynthesegencluster in geeigneten Wirtsorganismen. Die Anwendung der Metagenom-Strategie erscheint ideal, um die gesamte Diversität auch bislang unbekannter Mikroorganismen erschließen zu können und so zu völlig unbekannten Substanzklassen zu gelangen.

1.7 Heterologe Expression von Biosynthese-Genclustern

Die heterologe DNA-Expression fremder Gene in Wirtsorganismen ist ein Ansatz mit großem Potenzial. Grundsätzlich erfordern alle derartigen Anwendungen, dass die Gene für Biosynthese, Resistenz, Regulation und notwendige Transportsysteme auf einem kontinuierlichen DNA Fragment liegen und der Wirtsstamm einen ähnlichen genetischen Hintergrund wie der ursprüngliche Produzent besitzt. Komplette Gencluster auf kontinuierlichen DNA-Stücken sind für bakterielle Naturstoffe üblich; Abweichungen im Metabolismus und Unterschiede in der Codon-Nutzung jedoch können Barrieren bei der Nutzung von Standard-Wirtsorganismen wie *E. coli* darstellen.

Pantocin A und B (1, 2) sind zwei vom Bakterium *Pantoea agglomerans* produzierte Antibiotika, die in der Natur den Erreger der Pflanzenkrankheit Feuerbrand (*Erwinia amylovora*) kontrollieren. 2 konnte als erster neuer Naturstoff durch die heterologe Expression in *E. coli* entdeckt werden.^[31] Zuvor waren nur Versuche gemacht worden, um Gene zu bekannten Naturstoffen zu exprimieren.

Vorraussetzung für das Gelingen des Experiments war die genetische Verwandtschaft von *P. agglomerans* zu *E. coli*.



Pederin (3) wird von dem Käfer *Paederus fuscipes* als chemischer Abwehrstoff verwendet. Produziert wird 3 allerdings von einem assoziierten Mikroorganismus, einem bis heute unkultivierten Verwandten von *Pseudomonas aeruginosa*, der vom Käfer-Weibchen auf die Nachkommen weitergegeben wird. Durch Isolierung der gesamten DNA eines 3 enthaltenden Käfers und Herstellung einer Cosmid-Bibliothek wurde die Analyse des BiosyntheseGenclusters ermöglicht. Es handelt sich um einen gemischten Polyketid-Synthase/Nichtribosomalen-Peptidsynthase-Gencluster, dessen Organisation Einblicke in die evolutionäre Verwandtschaft zwischen dem Biosyntheseweg des Pederin (**3**) und ähnlichen marinen Naturstoffen liefert. Diese werden von mit Schwämmen assoziierten Mikroorganismen produziert.^[32]

Die Möglichkeit der heterologen Expressionen von Naturstoffen ist die Vorraussetzung für den Einsatz der Metagenomik zur Wirkstoffsuche, wodurch die gesamte Naturstoffproduktion von Multispezies-Gemeinschaften zugänglich wird.

Mit Terraginin A - E (**4-8**) wurden die ersten Naturstoffe auf Basis einer Umwelt-DNA (eDNA)-Bibliothek isoliert, die 1020 *S. lividans* Klone enthielt. Durch die relativ geringe Anzahl von Mitgliedern der Bibliothek konnte ein HPLC-MS-Analyseverfahren angewendet werden. **4-8** waren bisher unbekannt und sind strukturell Metall-chelatisierenden Hydroxamsäuren wie Norcardamin (**9**) ähnlich, die oft eine antibiotische Aktivität zeigen. Es konnte für die Naturstoffe (**4-8**) allerdings keine biologische Aktivität festgestellt werden.^[33]



Mit Turbomycin A (10) und B (11) wurden die ersten antibiotisch aktiven Substanzen durch Expression einer Metagenombank in *E. coli* isoliert.^[34] Beide Naturstoffe sind farbig, das Screening wurde aber durch eine Melaninbildung erschwert. 10 war als Pilzmetabolit bekannt, 11 wurde bisher nicht als Naturstoff beschrieben.



Im Wirtsorganismus sind Biosyntheseuntersuchungen durch Analyse des Genclusters und durch Fütterungsexperimente markierter Vorläuferverbindungen möglich.

Durch Kombination des Metagenom-Ansatzes mit dem klassischen Verfahren der Fütterung isotopenmarkierter Verbindungen konnten S. F. BRADY und J. CLARDY die Biosynthese des aus Trytophan abgeleiteten Isocyanides **12** klären. Zwei Enzyme (IsnA und IsnB) sind für die Biosynthese des Metaboliten verantwortlich. Alle Atome entstammen dem Tryptophan, lediglich das Kohlenstoffatom der Isocyanid-Gruppe wird durch eine ungewöhnliche Reaktion aus Ribulose-5-phosphat herausgelöst und auf den Stickstoff übertragen. Dies wurde durch Fütterung von potentiellen ¹²C-Vorläufern mit Mangelmutanten bewiesen, die auf einem ¹³C-angereicherten Hintergrund wuchsen (Mutasynthese).^[35]



Bisher hat die Metagenom-Technik erst zu der Entdeckung von einigen kleineren Naturstoffen geführt. Da es sich bei der Metagenomik um eine junge Methode handelt, müssen einzelne Schritte noch verbessert werden. Strategien zur Verbesserung der heterologen Genexpression und effektivere Screening-Verfahren großer Metagenom-Bibliotheken werden in Zukunft zusammen mit etablierten Techniken die Entdeckungsrate von Naturstoffen beschleunigen und die Diversität der entdeckten Biomoleküle vergrößern. Daneben wird die Untersuchung der zugehörigen Biosynthesegencluster unseren Horizont über biosynthetische Abläufe erweitern.

2. Aufgabenstellung

Im Mittelpunkt dieser Arbeit steht die Suche nach Sekundärstoffen und Untersuchungen bezüglich ihrer Biosynthese sowie ihrer biologischen Aktivität.

Ziel des ersten Teils dieser Arbeit war es, im Rahmen des BMBF-Projektes "Erschließung schwer kultivierbarer mariner Biodiversität für die Wirkstoffforschung mit molekulargenetischen Methoden" bioaktive Naturstoffe zu finden. Dabei war eine in *E. coli* abgelegte Metagenombank zu analysieren. Kooperationspartner waren der Arbeitskreis SCHLEPER und die BRAIN AG.

Bioaktive Klone sollten nach einer Optimierung der Kultivierungsbedingungen in größerem Maßstab fermentiert und eine möglichst effiziente Isolierungsstrategie etabliert werden. Nach der Substanzisolierung sollte die Struktur der aktiven Metaboliten aufgeklärt werden, der sich die Profilierung der biologischen Aktivität und Überlegungen zur Biosynthese anschließen sollten.

Der zweite Teil dieser Arbeit bestand darin, die Biosyntheseuntersuchungen zu den Iromycinen A und B (13, 14) fortzusetzen. Diese werden von dem im Arbeitskreis ZEECK isolierten Bakterium *Streptomyces* sp. Dra17 produziert. Durch Vorarbeiten von O. WAGNER^[36] und J. VON FRIELING^[37] im Arbeitskreis ZEECK/GROND und durch die vorausgegangene Diplomarbeit^[38] war bekannt, dass diese offensichtlich über einen bisher unbekannten Polyketid-Biosyntheseweg des Typ I mit neuartiger Pyridonring-Bildung aufgebaut werden. Durch Fütterungsexperimente markierter potenzieller Vorläufer und durch dien nolekulargenetische Versuche mit einer Cosmidbank sollte die Biosynthese der kurzen und langen Seitenkette sowie die Quelle des Stickstoffs geklärt werden.



Weiterhin war zu untersuchen, ob der Stamm zu weiteren Biosyntheseleistungen fähig ist. Durch Einschleusung in möglichst diverse Testsysteme von Kooperationspartnern war die biologische Aktivität der Iromycine zu profilieren.

II. Metagenomprojekt

1. Allgemeine Methoden

Das Ziel der Metagenomik ist, die gesamte mikrobielle Erbinformation durch Klonierung in geeignete Vektoren (Plasmide, Cosmide, Bacterial Artificial Chromosomes) für Untersuchungen zugänglich zu machen, ungeachtet der Kultivierbarkeit und des physiologischen Status des potenziellen mikrobiellen Produzenten.

1.1 Erstellung einer Metagenom-Bibliothek

Das Vorgehen bei einer Metagenomanalyse umfasst die folgenden Schritte (Abb. 2):^[39]

- 1. Isolierung der DNA aus einer Umweltprobe
- 2. Ligation der DNA in einen geeigneten Vektor
- 3. Transformierung der Klone in ein Host-Bakterium
- 4. Screening der resultierenden Transformanden



Abb. 2: Vergleich der Herstellung einer Metagenombank (rechts) mit einem klassischen Ansatz (links), der die Kultivierung des Ursprungsorganismus erfordert; Abbildung aus Ref. [40].

1.2 Analyse einer Metagenombank

Zur Untersuchung der so erstellten Metagenombank sind zwei unterschiedliche Analyseverfahren gebräuchlich. Dies sind zum einen der sequenzorientierte und zum anderen der funktionsorientierte Ansatz (siehe Abb. 3). Jede dieser Methoden hat ihre Vorteile; zusammengenommen haben diese Ansätze das Verständnis über unkultivierbare Mikroorganismen stark vertieft.^[41]



Abb. 3: Analyse von Metagenombanken durch funktionsorientierte bzw. sequenzorientierte Verfahren; Abbildung aus Ref. [42].

1.2.1 <u>Sequenzorientierte Analyse</u>

Der sequenzorientierte Ansatz beruht auf der Verwendung konservierter DNA-Sequenzen für Hybridisierungssonden oder PCR-Primer, um damit nach Klonen zu suchen, die entsprechende Sequenzen enthalten.^[43] Durch Analyse von Klonen, die bakterielle 16S rRNA Gene oder das DNA-Reparaturgen der Archaea (*radA*) als phylogenetische Anker tragen, kann der Ursprungsorganismus der DNA bestimmt werden. Weitere Gene, die in diesen Klonen enthalten sind, können daraufhin den Organismen zugeordnet werden.

In diesem Verfahren ist die Suche nach Funktionen möglich, wenn für deren Gene Primer bekannt sind. Diese Analyse ist darüber hinaus unabhängig von einer erfolgreichen Expression.

1.2.2 <u>Funktionsorientierte Analyse</u>

Die funktionsorientierte Analyse geht von der Identifikation von Klonen aus, die gewünschte Charakteristika tragen. Dies kann eine enzymatische Aktivität, eine Antibiotikaresistenz oder die Produktion von Naturstoffen sein. Dazu werden die Klone auf enzymatische Aktivität oder Biosynthese von Naturstoffe getestet bzw. in Gegenwart eines Antibiotikums kultiviert. Danach folgt die Charakterisierung der aktiven Klone durch Sequenzierung und biochemische Analyse. Der Ansatz ist dahingehend eingeschränkt, dass er die erfolgreiche Genexpression der interessierenden Funktion in der Wirtzelle erfordert. Dies bedeutet im Allgemeinen auch, dass alle Gene des gesuchten Charakteristikums auf einem kontinuierlichen DNA-Stück vorliegen müssen. Weiterhin muss ein geeignetes Testsystem vorliegen, um große Mengen an Klonen auf die gewünschte Aktivität hin untersuchen zu können.

Für die Expression in verschiedenen Wirten stehen Shuttle-Vektoren zur Verfügung oder müssen zeitaufwendig hergestellt werden.^[44]

Durch diesen Ansatz ist es möglich, bisher unentdeckte Funktionen zu erschließen. Allerdings ist eine erfolgreiche Expression erforderlich.

2. Das BMBF-Projekt "Erschließung schwer kultivierbarer mariner Biodiversität für die Wirkstoffforschung mit molekulargenetischen Methoden"

Das im Rahmen der Fördermaßnahme "Marine Naturstoffforschung" des Referates Meeresund Polarforschung, Geowissenschaften unter dem Förderkennzeichen 03F0349 A laufende Projekt zum Verbundvorhaben "Erschließung schwer kultivierbarer mariner Biodiversität für die Wirkstoffforschung mit molekulargenetischen Methoden" war mit einer dualen Strategie darauf angelegt, neuartige Naturstoffe aus marinen Habitaten zu entdecken und in eine nachhaltige Entwicklung zu bringen. Einerseits sollten bestimmte, in terrestrischen Habitaten als biosynthetisch besonders kompetente oder bislang nicht untersuchte Mikroorganismengruppen (z. B. Actinobacteria, Myxobacteria und Archaea) gezielt in marinen Habitaten aufgespürt und untersucht werden. Andererseits war vorgesehen, mittels moderner genetischer und molekularbiologischer Methoden die enorme, bislang nicht kultivierbare mikrobielle Diversität dieser Habitate als Metagenom zu isolieren und in Cosmid- bzw. Bacterial Artificial Chromosome (BAC)-Banken zu erfassen. Neuartige Wirkstoffe können auf diese Weise heterolog in industriekompatiblen Wirtsstämmen exprimiert und produziert werden. Primärziel des Projektes war es, anhand neuer, bioaktiver Sekundärmetaboliten den Nachweis zu erbringen, dass auf Grundlage genetischer Informationen aus komplexen Umweltproben die Biosynthese von Sekundärmetaboliten möglich ist.

Dazu hatten sich drei Projektpartner mit folgenden Aufgaben zusammengeschlossen:

1.) Arbeitsgruppe Prof. SCHLEPER (Universität Bergen, Norwegen)

Die Probenentnahme aus verschiedenen Habitaten der Nordsee und des Wattenmeers sollte inkl. eines vorgeschalteten Diversitätsscreenings von dieser Arbeitsgruppe durchgeführt werden. Der Arbeitskreis war in Zusammenarbeit mit der Firma BRAIN zuständig für die Isolierung von Metagenom-DNA aus den marinen Proben. Daneben sollte ein sequenzhomologes Screening auf mit Biosynthese-Genclustern assoziierten Genen (PKS I und II, NRPS) durchgeführt werden.

2.) BRAIN Aktiengesellschaft (Zwingenberg)

Die Firma koordinierte das Projekt und war zusätzlich an der Erstellung der Metagenombank, der heterologen Expression und dem Aktivitätsscreening beteiligt. Weiterhin sollte die Firma BRAIN eine erweiterte Aktivitätsprofilierung und eine mögliche Substanzentwicklung übernehmen.

3.) Arbeitsgruppe Dr. GROND (Georg-August Universität Göttingen)

Die Arbeitsgruppe war dafür zuständig, die von den Projektpartnern erhaltenen rekombinanten Mikroorganismen durch Verwendung bekannter terrestrischer Protokolle chemisch zu profilieren. Die wichtigste Aufgabe war hierbei die Fermentation der Organismen in größeren Maßstäben, um die Naturstoffisolierung und Strukturaufklärung sicherstellen zu können.

2.1 Ablauf des Projektes

Bioprospecting

Die Probenentnahme aus verschiedenen Habitaten der Nordsee und des Wattenmeers sollte für möglichst diverse marine Standorte und Lebensgemeinschaften sorgen. Ein Diversitätsscreening unter Verwendung neu entwickelter Sonden sollte die Häufigkeit potentieller Sekundärstoffproduzenten in diesen marinen Habitaten feststellen, wodurch eine Fokussierung auf viel versprechende Proben ermöglicht wurde.

Metagenombanken

Verfahren zur Isolierung von Metagenom-DNA wurden adaptiert und optimiert und hinsichtlich der darin abgebildeten mikrobiellen Diversität durch 16S-Typisierung untersucht. Weiterhin wurden Cosmid-, Fosmid- und BAC-Vectoren für die Herstellung von Metagenom-Banken und deren Expression in heterologen Expressionswirten neu entwickelt.

Sequenzhomologes Screening

Durch Filterhybridisierung wurde das Vorhandensein typischer PKS- (Typ I und II) bzw. NRPS-Gene analysiert. Die Insert-DNA positiv reagierender Klone sollte charakterisiert werden und für die Transformation in Expressionswirten bereitgestellt werden.

Aktivitätsscreening

Pools der Metagenombanken wurden entweder nach erfolgter DNA-Isolierung durch Transformation, oder durch Konjugation eines geeigneten Expressionswirtes, in Expressionsbanken bzw. -klone überführt. Die erhaltenen rekombinanten Mikroorganismen wurden dann in einem Overlayexperiment mit *B. subtilis* auf antimikrobielle Aktivität geprüft. Positive Kandidaten wurden in Einzeltests verifiziert und dann einer chemischen Profilierung unterzogen.

Chemische Profilierung

Für ein Vorscreening der rekombinanten Mikroorganismen wurden für terrestrische Mikroorganismen entwickelte Standardprotokolle übernommen, so dass nach Extraktion chemische (DC, Anfärbereagenzien), spektroskopische bzw. spektrometrische (UV/HPLC, MS, NMR) und biologische Analysen erfolgen konnten.

Biotechnologie und Fermentation

In den Profilierungsstudien aufgefallene Klone wurden nach individuell optimierten Verfahren im 10 - 50 L-Maßstab fermentiert, um ausreichend große Mengen an Sekundärmetaboliten für die Strukturaufklärung zur Verfügung zu stellen.

Isolierung der Reinsubstanzen

Die Aufarbeitung aller Substanzen erfolgte mit den bei Sekundärmetaboliten aus Mikroorganismen üblichen Methoden, vor allem durch eine Abfolge verschiedener chromatographischer Trennschritte.

Strukturaufklärung

Die Strukturbestimmung erfolgte durch spektroskopische und spektrometrische Methoden.

Validierung und erweiterte Aktivitätsprofilierung

Reinsubstanzen wurden zunächst zur Verifizierung ihrer im Primärscreening gezeigten Aktivität (Overlay-Experiment) im Plattendiffusionstest gegen eine Auswahl an Testorganismen unterzogen. Des Weiteren konnte das Wirkstoffspektrum dieser Substanzen mittels einer erweiterten Aktivitätsprofilierung durch die Firma BRAIN analysiert werden.

Substanzentwicklung

Wirkstoffe, die in oben genannten Assays aufgefallen waren, sollten an einer Reihe von Tumorzelllinien in präklinischen, cytotoxischen Untersuchungen getestet werden.

Eine Übersicht über den Ablauf der ursprünglich geplanten Arbeiten ist in Abb. 4 dargestellt.



Abb. 4: Übersicht über die Projektstruktur des BMBF-Projektes "Erschließung schwer kultivierbarer mariner Biodiversität für die Wirkstoffforschung mit molekulargenetischen Methoden"

2.2 Vorarbeiten der Projektpartner

Bankengenerierung

Aus der mikrobiellen Symbiontenfraktion des Schwamms *Aplysina aerophoba* wurde von der Arbeitsgruppe SCHLEPER eine Metagenombank erzeugt und in geordneter Form in 76 Mikrotiterplatten à 384 Klonen angelegt. Zur Herstellung dieser Bank wurde das pEpiFOS-5/ *E. coli* Epi100 Fosmidklonierungssystem von EpiCentre[®] eingesetzt.^[45]

Für die Isolierung und Klonierung hochmolekularer DNA aus Schwamm-assoziierten Prokaryonten (SAPs) wurden bestehende Protokolle, die für Boden-DNA entwickelt worden waren, entsprechend weiteroptimiert und modifiziert. Nach Gewinnung der Prokaryonten-Fraktion aus Schwammgewebe durch differentielle Zentrifugation wurden die Zellen in unterschiedlichen Konzentrationen für die Zelllyse in Agarose eingebettet. Nach Lyse und Reinigung der DNA über Elektrophoresen mussten in weiteren Extraktionsschritten Hemmstoffe und Nukleasen entfernt werden, um die aus Pulsfeldgelelektrophorese isolierte DNA stabil erhalten. zu Nach einem zweiten Aufreinigungsschritt über Pulsfeldgelelektrophorese gelang es, hochgereinigte, klonierfähige DNA von >50 kbp Länge zu isolieren. Es wurden aus 5 g Schwamm (Frischgewicht) 1.2 µg hochmolekulare DNA erhalten. Diese wurde über glatte Enden mit dem Fosmidvektor pEpiFOS-5 ligiert und zur in vitro-Verpackung in Lambda-Köpfe eingesetzt.

Insgesamt wurden 29184 Klone konserviert. Basierend auf der Sequenz-Analyse von 62 zufällig ausgewählten Fosmidklonen, wurde die in der abgelegten Metagenombank konservierte genetische Diversität bestätigt. Aufgrund einer durchschnittlichen Insertgröße von 37.8 kbp sind 1.1 Gbp Metagenom-DNA in der Bank enthalten.

Diversitätsanalyse

Die in der Bank abgebildete Diversität wurde mit Hilfe Spezies-spezifischer 16S-rRNA PCR analysiert. Hierbei haben sich die *Archea* und die Gruppe der *Acidobacteria* als Indikatoren der erfassten Biodiversität bewährt. Von insgesamt 76 DNA Pools (jeweils 384 Klone einer Mikrotiterplatte) wurden 27 Pools positiv für *Acidobacteria* und mindestens 4 positiv für *Archaea* getestet. Dieses Resultat wird als indikativ für eine große mikrobielle Diversität auf genomischer Ebene in der Genbank gewertet.^[46]

Bankenscreening

Die aus dem Schwamm erstellte Metagenombank ist primär für ein PCR-basiertes, genetisches Screening nach **Biosynthese-Genclustern** geeignet. Aufgrund der durchschnittlichen Insertgröße kann in dieser Bank mit der vollständigen Abbildung kleinerer bis mittlerer Gencluster, etwa zur Synthese von Lantibiotika oder aromatischen Polyketiden gerechnet werden. Die Möglichkeit einer Expression dieser Cluster auch in E. coli wurde im Rahmen eines aktivitätsbasierten Overlay-Screenings mit den Indikator-organismen Bacillus subtilis, Staphylococcus aureus und Candida glabrata evaluiert. Dabei konnten zunächst sieben primäre Hitklone identifiziert werden, die spezifisch das Wachstum von Bacillus subtilis inhibieren. Zwei dieser Genbank-Klone (M49.K9 und M73.N2) konnten durch wiederholte Testung bestätigt werden. Einer der beiden Klone (M49.K9) produziert ein rotes Pigment, das für die Wachstumsinhibition verantwortlich sein könnte oder zumindest zeitgleich mit dem aktiven Wirkprinzip produziert wird. Die Fosmide beider Klone wurden präpariert und näher charakterisiert. Primär konnte bereits durch Retransformation gezeigt werden, dass die fosmidkodierte Sequenzinformation für die antibakteriellen Effekte verantwortlich ist. Eine Endsequenzierung der Fosmid-Insert-DNAs erbrachte zunächst keinen Hinweis auf bekannte Biosynthese-Gene bzw. Gencluster.

Als Expressionswirt wurde ursprünglich *Streptomyces lividans* aufgrund seiner guten Handhabbarkeit favorisiert. Da die heterologe Produktion neuartiger Sekundärmetabolite und vor allem deren Isolierung und strukturelle Aufklärung aber durch die von diesem Stamm produzierten Naturstoffe (vor allem Actinorhodin) beeinträchtigt wird, wurde versucht, die Produktion des Actinorhodins durch Deletion des entsprechenden Biosynthese-Genclusters (*act*) zu verhindern. Die Sequenz des kompletten Clusters ist aus *Streptomyces coelicolor* bekannt, einem engen Verwandten von *Streptomyces lividans*. Mit der Herstellung eines knockout-Konstrukts auf Basis des Suizidvektors pOJ260, wurde der größte Teil des *act*-Genclusters durch einen *neo*^R-Resistenzmarker ersetzt. Nach Transformation von *S. lividans*-Protoplasten konnten Transformanten erhalten werden, die Neomycin- oder Apramycin-resistent geworden waren. Durch Analyse der Transformanten (PCR) konnte die korrekte Integration des gesamten Konstrukts innerhalb des *act*-Cluster-Locus nachgewiesen werden.

Neben Streptomyces sp. wurde Bacillus subtilis als interessanter Expressionsstamm für bioaktive Wirksubstanzen ausgewählt. Bacillus sp. sollte speziell für die Expression peptidischer Wirkstoffe Verwendung finden, die vermehrt in den Bereichen Konservierung, Fungizide und Biofilm-Bekämpfung zum Einsatz kommen, da gerade in letzterem Bereich klassische Antibiotika kaum Wirkung erzielen. Hier konnten verschiedene Varianten genutzt werden, die beispielsweise in ihrer Fähigkeit zur homologen Rekombination inhibiert sind (durch Deletion des recA Gens), was die stabile Propagierung großer BAC-Plasmide erleichtern sollte. Zusätzlich wurde mit Varianten gearbeitet, die in ihrer Fähigkeit, Proteasen zu bilden (ein wesentlicher Faktor bei Bacillus sp. Expressionen) limitiert wurden, was wiederum für die erfolgreiche Expression peptidischer Wirkstoffe entscheidend sein sollte. Für diese Stämme wurden Transformationsprotokolle etabliert, wobei neben den klassischen Protoplastierungsmethoden vor allem auch die natürliche Kompetenz von Bacillus sp. zur Aufnahme fremder DNA in Verbindung mit neuartigen Methoden der Plasmidmultimerisierung getestet wurde.^[47]

3. Eigene Arbeiten

3.1 Vorscreening potentieller Hoststämme

Es war angedacht, für die heterologe Expression der Umwelt-DNA Hoststämme der Gattungen *Streptomyces* und *Bacillus* zu nutzen. Der Vorteil dieser Gattungen im Gegensatz zu dem weit verbreiteten Wirtstamm *E. coli* ist zum einen die Fähigkeit, Propionat für Biosynthesewege zur Verfügung zu stellen, zum anderen der wesentlich dichtere Bewuchs, hohe metabolische Aktivität und damit im Allgemeinen auch höhere Produktionsraten.

Von BRAIN AG wurden die Stämme *Streptomyces* sp. B444, *Bacillus* sp. B1012 und die *Bacillus* Mutante 1A43 übersandt. Um die Biosyntheseleistungen der Wirtsstämme zu analysieren und chemisch zu profilieren, wurden die Stämme im OSMAC-Verfahren^[48] auf den Medien LB, SGG und STA+ als Schüttelkulturen kultiviert und Mycel sowie Kulturfiltrat getrennt aufgearbeitet. Das chemische Screening der Extrakte erfolgte durch

dünnschichtchromatographische Auftrennung an Kieselgel, als Laufmittel diente ein Chloroform/Methanol-Gemisch (9:1). Die Analyse des Metaboliten-Spektrums erfolgte durch Farbe, unter UV-Licht (254 und 366 nm) und Anfärbereagenzien (Anisaldehyd, Orcin, Ehrlich). Außerdem wurden die Extrakte mittels analytischer HPLC (Säule 1, Programm 1) und HPLC-ESI-MS-Kopplung (Säule 1, Programm 1) analysiert. Es wurden diverse charakteristische Metabolitenmuster in einzelnen bzw. verschiedenen Medien aufgefunden. Allerdings gelang es während des Projektzeitraumes nicht, die ausgewählte DNA in die beschriebenen Wirts-Stämme umzuklonieren, so dass mit *E. coli* als Expressionswirt gearbeitet wurde.

3.2 Chemisches und Biologisches Screening und HPLC-Analyse

Von Firma BRAIN wurden zwei aktive Klone (M49.K9, M73.N2) des Stammes *E. coli* EPI100 übersandt, die im Overlay-Experiment *Bacillus subtilis* gehemmt hatten. Bei Klon M49.K9 war parallel zur Entwicklung der biologischen Aktivität die Bildung eines roten Pigments zu beobachten. Weiterhin wurde auch der nicht transformierte Wirtsstamm EPI100 zugeschickt.

E. coli EPI100 M49.K9, M73.N2 und der nicht transformierte Wirtstamm wurden im 1L-Maßstab in Schüttelkolben kultiviert. Um Scherkräfte zu begrenzen, wurden in allen Schüttel-Kultivierungen mit *E. coli* Erlenmeyerkolben ohne Schikanen verwendet. Die Kultivierungsdauer war an die Bedingungen des von der BRAIN AG durchgeführten Overlay-Experimentes angelehnt und betrug sechs Tage, davon zwei Tage 37 °C und 4 Tage 20 °C bei 180 rpm. Zur Aufarbeitung wurden Zellen und Medium durch Zentrifugieren getrennt. Die Zellen wurden nacheinander mit Aceton und Methanol extrahiert, das Kulturfiltrat mit Essigsäureethylester extrahiert. Um keine sehr polaren Stoffe im Aufarbeitungsprozess zu übersehen, wurde die wässrige Phase der Essigsäureethylester-Extraktion lyophilisiert. Es zeigte sich im Plattendiffusionstest mit *B. subtilis*, dass die überwiegende biologische Aktivität in der Fraktion der Essigsäureethylester-Extraktion konzentriert war. Damit war klar, dass es sich bei den aktiven Prinzipien von M49.K9 und M73.N2 um niedermolekulare organische Moleküle handeln muss, und nicht um empfindliche wasserlösliche Proteine. Auch der rote Farbstoff von M49.K9 befand sich in der Fraktion der Essigsäureethylester-Extraktion.

Die Extrakte wurden durch dünnschichtchromatographische Auftrennung an Kieselgel-DC-Platten (Laufmittel Chloroform/Methanol 9:1) chemisch gescreent. Das Metabolitenspektrum wurde anhand der Farbe, unter UV-Licht (254 und 366 nm) und mit Anfärbereagenzien (Anisaldehyd, Orcin, Ehrlich) analysiert. Ebenso wurden Untersuchungen mittels analytischer HPLC (Säule 1, Programm 1) und HPLC-MS (Säule 1, Programm 1) durchgeführt. Bei allen Analysen der Extrakte von M49.K9 und M73.N2 konnten keine Metaboliten entdeckt werden, die ausschließlich in den einzelnen Klonen vorhanden waren und somit als Produkt der heterologen Expression in Frage kamen. Vielmehr schwankte der Gehalt einzelner Metabolite so stark, dass diese Analyseverfahren nicht als alleinige Methoden angewendet werden konnten.

Durch Gelchromatographie (Sephadex LH-20/Methanol) wurde das aktive Extrakt von M49.K9 in 4 Fraktionen aufgetrennt, die im Plattendiffusionstest mit *B. subtilis* untersucht wurden. Die aktive Fraktion wurde durch präparative HPLC (Säule 3, Programm 1) in 15 Fraktionen aufgetrennt, von denen aber mehrere eine biologische Aktivität besaßen. Bei allen Trennungen wurden die Bedingungen (Säulenmaterial, Laufmittel) so gewählt, dass für die mit Sprühreagenzien bzw. UV-Analyse detektierbaren Metaboliten eine optimale Separation erreicht wurde; dies ließ auch eine optimale Separation des aktiven Prinzips erwarten. Für jede Fraktion wurde im Plattendiffusionstest gegen *B. subtilis* die biologische Aktivität bestimmt und mit DC bzw. HPLC analysiert, damit möglichst umgehend chemisch detektierbare Eigenschaften (Anfärbeverhalten, Masse, UV-Spektrum) mit der Bioaktivität korreliert werden konnten.

Die Fraktionen hatte jeweils eine Masse von unter 1 mg, sodass eine weitere Separation nicht möglich erschien. Es zeigte sich aber, dass die Kombination aus Säulenchromatographie und HPLC einerseits und Plattendiffusionstest andererseits, eine effektive Isolierung der aktiven Prinzipien nach einem Up-scale der Fermentationsmengen ermöglichen sollte.

3.3 Fermentationskurven

Um den optimalen Ernte-Zeitpunkt zu bestimmen, wurden Fermentationskurven der Klone M49.K9 und M73.N2 im 2 L Biostat B-Fermenter aufgenommen. Dazu wurden über 6 Tage hinweg je 10 mL Probe entnommen, lyophylisiert und der Rückstand mit Methanol extrahiert. Jeweils 1/10 der Proben wurde im Plattendiffusionstest mit *B. subtilis* pC194 verwendet, um den Zeitpunkt der maximalen Bioaktivität zu bestimmen. Die Hemmhöfe im Test waren nur sehr schwach ausgeprägt, zeigten aber eine maximale Aktivität zwischen 2 und 4 Tagen nach Beginn der Fermentation.

Um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse der Fermentationskurven abschätzen zu können, wurde der Klon M73.N2 erneut 6 Tage im 5 L Biostat-B-Fermenter kultiviert. Die entnommenen Proben wurden mit Essigsäureethylester extrahiert. Wiederum war die maximale Aktivität nach 4 Tagen festzustellen. Deshalb wurde der Kultivierungszeitraum bei 2 Tagen bei 37 °C und 4 Tagen bei 20 °C belassen. Diese Ergebnisse scheinen im

Widerspruch zum schnellen Wachstum von *E. coli* zu stehen. Offensichtlich sind für die Biosynthese der bioaktiven Metaboliten Enzyme notwendig, die auch nach Erreichen der stationären Phase exprimiert werden und die Biosynthese voranschreiten lassen.

3.4 Bearbeitung Klon M49.K9

3.4.1 Fermentation A (12 L)

Um eine ausreichende Substanzmenge isolieren zu können wurde der Klon *E. coli* EPI100 M49.K9 im 12 L Maßstab kultiviert. Die Kulturbrühe wurde erst bei pH = 8, dann ein weiteres Mal bei pH = 5 mit Essigsäureethylester extrahiert, um sowohl basisch als auch sauer reagierende Naturstoffe isolieren zu können.

Durch Gelchromatographie (Sephadex LH-20/Methanol) und anschließende präparative HPLC-Trennung (Säule 3/Programm 3) des im Alkalischen gewonnenen Extraktes wurde das Selektionsantibiotikum Chloramphenicol (**15**) reisoliert. Der gewählte Ansatz aus einer Kombination von chemischem und biologischem Screening ist also in der Lage, einen biologisch



aktiven Metaboliten zu isolieren. Um eine Reisolierung von **15** zu vermeiden, wurden alle weiteren Plattendiffusionstests ausschließlich mit dem chloramphenicol-resistenten Stamm *B*. *subtilis* pC194 durchgeführt, der von der Firma BRAIN AG zur Verfügung gestellt wurde.

Der im leicht Sauren erhaltene Extrakt wurde durch mehrfache Gelchromatographie (Sephadex LH-20/Methanol/Dichlormethan) und anschließende präparative HPLC aufgetrennt, wodurch mehrere leicht rote Fraktionen erhalten wurden, die im Plattendiffusionstest aktiv waren. Es zeigte sich mittels NMR-Spektroskopie, dass es sich um mindestens eine aromatische Komponente handeln muss. Die Substanzisolierung und Strukturaufklärung scheiterte trotz wiederholter semipräparativer HPLC (Säule 3, Programm 1) aufgrund der zu geringen Menge (ca. 1-2 mg) bei starker Verunreinigung.

Aus einer farbigen Fraktion der säulenchromatographischen Trennung wurde durch präparative HPLC ein Metabolit mit der Masse 716 u (16) isoliert. Die Elementarzusammensetzung beträgt wahrscheinlich C₃₁H₃₂N₄O₁₆. Das sehr schmale Maximum im UV-Spektrum bei 404 nm weist auf ein ausgedehntes π -System hin. Daher könnte es sich um ein Produkt des Porphyrinstoffwechsels handeln. Entsprechende Gene sind auf einem Subklon durch Sequenzanalyse gefunden worden (siehe Kapitel III.4.1.3). Da nur 0.3 mg isoliert wurden, ist eine weitere Strukturaufklärung mit dieser Fraktion leider nicht möglich.

3.4.2 Fermentation B (50 L)

Für den weiteren Versuch, ausreichend Substanz für die Strukturaufklärung zu gewinnen, wurde der Klon *E. coli* EPI100 M49 im 50 L Biostat U-Fermenter kultiviert. Die Extraktion mit Essigsäureethylester (ca. 200 L) wurde trotz des großen Arbeits- und Materialaufwands beibehalten, um eine Änderung des Arbeitsprotokolls zu vermeiden, wie sie beispielsweise eine Nutzung von Festphasenextraktion an XAD zur Folge gehabt hätte.

Durch Säulenchromatographie an Kieselgel (Lösungsmittel Dichlormethan/Methanol 98:2 \rightarrow 7:3) wurde das Rohprodukt in 13 Fraktionen aufgetrennt. Aus einer biologisch aktiven Fraktion konnte durch Säulen-Chromatographie an Kieselgel

(Cyclohexan/Essigester 1:1 \rightarrow 1:3) und präparative HPLC (Säule 3, Programm 5) 34.3 mg (0.69 mg/L) Phenylessigsäure (17) isoliert werden. Die Struktur konnte durch ¹H- und ¹³C-NMR-Daten bestimmt und durch ein HR-ESI-Spektrum abgesichert werden.



Es handelt sich dabei offensichtlich um ein bioaktives Abbauprodukt von Phenylalanin. Beim Menschen wird die bioaktive Wirkung durch die Phenylketonurie deutlich. Bei dieser Erkrankung entstehen pathogene Konzentrationen infolge einer übermäßigen Bildung vom Phenylpyruvat.^[49] Die meisten aeroben Bakterien bauen Phenylalanin zu Phenylacetat (**17**) ab.^[50]

Dies zeigt, dass ein in großer Menge vorhandener, aber eigentlich nur schwach bioaktiver Metabolit im Plattendiffusionstest von Rohfraktionen eine ähnliche Aktivität verursachen kann wie etwa ein starkes Antibiotikum in geringen Konzentrationen.

Die aktiven, polaren Fraktionen der Rohprodukttrennung wurden vereinigt und in eine Essigester- bzw. Methanol-lösliche Fraktion separiert. Die Isolierung der für die schwache Aktivität der Essigester-löslichen Fraktion verantwortlichen Substanz gelang leider nicht, da nach Säulenchromatographie an Kieselgel (Cyclohexan: Essigester 1:1 \rightarrow 1:5) und mehrfache präparative (Säule 3, Programm 4) bzw. semipräparative HPLC (Säule 3, Programm 2) keine Aktivität im Plattendiffusionstest festgestellt werden konnte.

Durch Säulen-Chromatographie der Methanol-löslichen Fraktion an Kieselgel (Cyclohexan: Essigester 1:1 \rightarrow 1:5) und anschließende präparative HPLC (Säule 2, Programm 9) konnten 2.3 mg (0.05 mg/L) eines violetten Pigments isoliert werden. Im ¹H-NMR-Spektrum (siehe Abb. 5) sind vier Protonen im Bereich zwischen 7.6 und 8.0 ppm zu detektieren, Kopplungskonstanten und Aufspaltung sprechen für einen ortho-substituierten Aromaten. Daneben sind Signale für fünf weitere Protonen vorhanden, die an drei Kohlenstoffatomen gebunden sind. Im ¹³C-NMR-Spektrum sind zwei Signale bei 180 und 183 ppm zu detektieren, die auf Carbonylgruppen hindeuten. Das Signal bei 175 ppm ist stark verbreitert, es handelt sich um eine Carbonsäure. Der Metabolit besitzt eine Masse von 289 u und eine Elementarzusammensetzung von $C_{14}H_{11}NO_4S$. Die Suche nach der Elementarzusammensetzung in *AntiBase*^[51] hatte keinen Erfolg, die Suche in Chapman & Hall^[52] lieferte Brevinsäure (**18**),^[53] deren Struktur sich gut mit den experimentellen NMR-Daten in Verbindung bringen ließ.



Abb. 5: ¹H-NMR-Spektrum (600 MHz, CD₃OD) der Brevinsäure (18).

Aus dem Rest der Fraktion wurden durch präparative HPLC (Säule 3, Programm 5) 0.5 mg (0.01 mg/L) eines rötlichen Metaboliten (**19**) isoliert. Mit einer Masse von 305 u und einer Elementarzusammensetzung von $C_{14}H_{11}NO_5S$ ist der Metabolit **19** um ein Sauerstoffatom schwerer als **18**. Das ¹H-NMR-Spektrum ist mit dem der Brevinsäure (**18**) praktisch identisch. Im ¹³C-NMR-Spektrum ist das Signal von C-7 zu 79.5 ppm verschoben. Dies deutet auf eine Oxidation des Schwefelatoms hin. Wäre die Doppelbindung zwischen C-5a und C-10a epoxidiert worden, so wäre im ¹³C-NMR-Spektrum die Verschiebung der Signale von C-5a und C-10a auf etwa 90 ppm zu erwarten gewesen.

Die Struktur konnte durch Totalsynthese bestätigt werden (siehe Kapitel II.5.1.2). Für die Verbindung **19** wird der Name Brevinsulfoxid vorgeschlagen.



Weiterhin wurde aus einer farbigen Fraktion 0.5 mg eines gelben Metaboliten (**20**) (0.01 mg/L) isoliert. Der Metabolit hat die Masse 359 u. Im ¹H-NMR- und COSY-Spektrum sind vier zusammenhängende Signale im aromatischen Bereich (7.3 - 7.6 ppm) zu detektieren. Weiterhin ist ein Triplett bei 5.35 ppm zu detektieren. Ein Vergleich mit den Spektren von **18** und **19** führte zu der Vermutung, dass der Metabolit **20** den Grundkörper der Brevinsäure (**18**) besitzt, an dessen Michael-System der nucleophile Angriff einer anderen Aminosäure erfolgt ist (siehe Abb. 6). Leider konnte wegen der geringen Menge kein ¹³C-NMR-Spektrum aufgenommen werden; es trat Zersetzung auf, bevor die Elementarzusammensetzung durch hochauflösende Massenspektrometrie bestimmt werden konnte.



Abb. 6: Mögliches Strukturelement des gelben Farbstoffes (20) mit beobachteten COSY-Korrelationen.

Von der Reisolierung des roten Pigments (16) mit der Masse 716 u wurde bisher aus Zeitgründen abgesehen, da es sich höchstwahrscheinlich um ein Produkt des Primärmetabolismus handelt.

3.5 Bearbeitung Klon M73.N2

3.5.1 Isolierung und Strukturaufklärung

Zur Substanzisolierung wurden die Kulturlösungen der Fermentationskurven von M73.N2 vereinigt (7 L) und mit Essigsäureethylester extrahiert. Durch zweimalige Gelchromatographie (Sepahdex/Methanol und Dichlormethan) und semipräparative HPLC Säule 6, Programm 2) konnten 0.8 mg eines aktiven Metaboliten (0.1 mg/L) mit der Masse 248 u und der Elementarzusammensetzung $C_{15}H_8N_2O_2$ isoliert werden, der nach Datenbanksuche in *AntiBase*^[51] und Chapman & Hall^[52] sowie durch Vergleich der NMRund UV-Spektren mit Vergleichssubstanz (Prof. LAATSCH/Universität Göttingen) als Tryptanthrin (**21**) identifiziert werden konnte.



Daneben wurde durch Gelchromatographie (Sepahdex/Methanol) und präparative HPLC (Säule 6, Programm 1) ein weiterer leicht bioaktiver Metabolit **22** mit der Masse 221 und der Elementarzusammensetzung $C_{15}H_{11}NO$ isoliert. Er zeigte ein ähnliches UV-Spektrum wie **21**, leider trat Zersetzung auf bevor die Struktur durch NMR-Spektroskopie aufgeklärt werden konnte.

3.5.2 Tryptophan Fütterungsexperiment

Um zu zeigen, dass es sich bei Tryptanthrin (**21**) um einen Abkömmling von Tryptophan handelt, wurde der *E. coli* Klon M73 unter den üblichen Bedingungen in Schüttelkolben kultiviert, es wurde 0 g/L, 1 g/L bzw. 5 g/L Tryptophan zugesetzt. Nach sechs Tagen Kultivierung wurde zur Ernte mit Essigsäureethylester ausgeschüttelt. Allerdings ließ sich **21** weder durch HPLC-MS (Säule 1, Programm 1) noch durch analytische HPLC (Säule 1, Programm 1) im Rohextrakt nachweisen, was wahrscheinlich an der sehr geringen Produktionsrate von unter 0.1 mg/L Kulturlösung liegt. Der Nachweis einer Komponente im Rohextrakt erscheint daher bei dieser sehr geringen Produktionsrate unmöglich.

4. Heterolog exprimierte Verbindungen

4.1 Brevinsäure (<u>18</u>)

18 wurde im Jahre 1976 in der Patentliteratur erstmals von EGUCHI *et al.* als synthetischer Farbstoff beschrieben.^[54] Im Jahre 1977 folgte ein weiteres Patent auf Brevinsäure (18), sein Cysteinderivat 23 und deren Methylester (24, 25) als Farbstoffe für Beschichtungen, Getränke, Nahrung und Polyesterfasern. Darin wurden 18 und 23 auch erstmals als Naturstoffe von *Brevibacterium flavum* und *B. lactofermentum* bzw. *Corynebacterium acetoacidophilum*, *C. glutamicum* und *C. glycinophilum* beschrieben.^[55]

1984 wurde wiederum von EGUCHI et al. für 18 der Name Brevinsäure vorgeschlagen.^[53]


4.1.1 Biosynthesehypothese für Brevinsäure (18)

Brevinsäure (2) wird vermutlich durch Kondensation von 2,3-Dihydroxy-1,4-naphthochinon oder 2-Hydroxy-1,4-naphthochinon (26) und L-Homocystein (27) gebildet (siehe Abb. 7).

L-Homocystein ist das letzte Zwischenprodukt bei der Methionin-Biosynthese aus Aspartat.^[56] Hier zeigt sich, dass die Vorläufer von Sekundärstoffen oft direkt aus dem Primärstoffwechsel entnommen werden. Der Westteil des Moleküls, 1,4-Naphthochinon, wird dagegen wahrscheinlich über den Shikimatweg und anschließende Oxidation aufgebaut.^[57] Durch zweifache 1,4-Addition werden die Untereinheiten verknüpft. **19** entsteht aus **18** durch Oxidation, die enzymatisch oder nicht-enzymatisch ablaufen könnte: Dabei könnte die Oxygenase direkt auf dem entsprechenden Insert codiert sein oder die enzymatische Aktivität aus allgemeinem *E. coli*-Metabolismus stammen. Chemisch könnte die Oxidation während der Isolierung z. B. an Kieselgel stattgefunden haben.



Abb. 7: Hypothetischer Biosyntheseweg von Brevinsäure (18) aus 2,3-Dihydroxy-1,4-naphthochinon (26) und L-Homocystein (27). Alternativ ist die Kondensation von L-Homocystein (27) an 2-Hydroxy-1,4-naphthochinon mit anschließender Oxidation möglich.

Es ist daher anzunehmen, dass Sequenzen der metagenomischen DNA für ein Enzym codieren, das die Oxidation des Naphthochinon-Vorläufers katalysiert. Enzyme des Shikimatweges könnten ebenfalls codiert sein, sofern der Vorläufer nicht direkt aus dem Primärstoffwechsel entnommen wird. Außerdem sollte ein für die Verknüpfung der Einheiten verantwortliches Gen zu finden sein.

4.1.2 Herstellung und Kultivierung von Subklonen

Von J. MAMPEL (BRAIN AG) wurden Subklone des Klones M49.K9 hergestellt und im Overlay-Assay mit *B. subtilis* auf die Produktion einer biologischen Aktivität getestet. Es wurden ein Subklon mit voller Aktivität und Pigmentproduktion, ein Subklon mit Partialaktivität ohne Pigmentproduktion sowie mehrere Klone ohne biologische Aktivität und Pigmentproduktion erhalten.

Ein *E. coli*-Klon mit Leervektor (EpiFos100 ohne Insert), *E. coli* M49.K9 mit vollem Insert und die Subklone mit voller, partieller (keine Pigmentproduktion) sowie fehlender Aktivität wurden anschließend unter den Standardbedingungen (2 Tage 37 °C, 4 Tage 20 °C, 180 rpm) kultiviert.

Der pH-Wert der fünf zugesandten Proben wurden mit 0.2 N HCl auf pH = 5.0 - 5.3 eingestellt und zweimal mit 250 mL Essigsäureethylester extrahiert. Die organische Phase wurde abgetrennt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Zusammensetzung der erhaltenen Proben wurde durch HPLC-DAD- und HPLC-DAD-ESI-MS-Kopplung untersucht. Leider konnte Brevinsäure (18) nicht durch Analyse der UV-Chromatogramme bei dem charakeristischen Maximum von 550 nm nachgewiesen werden. Auch durch Analyse mittels HPLC-ESI-MS-Kopplung konnte Brevinsäure (18) nicht zweifelsfrei nachgewiesen werden.

In den Proben 1 (volles Insert) und 3 (Subklon mit Aktivität und Pigmentproduktion) war durch Analyse des UV-Spektrums deutlich ein Metabolit zu erkennen, der für die rote Farbe der Proben 1 und 3 verantwortlich ist. Er konnte bereits aus dem 12 L Ansatz isoliert werden, allerdings ohne die Struktur abschließend klären zu können. Seine Molekülmasse beträgt 716 u, wahrscheinlich handelt es sich um ein Produkt der auf dem Cosmid vorhandenen Porphyrin-Gene (siehe unten).

4.1.3 Annotierung eines Subfragments E. coli M49.K9

Bisher wurde ein etwa 14 kb großes Fragment des Subklons mit Aktivität und Pigmentproduktion sequenziert. Die Daten wurden G. MEURER (BRAIN AG) annotiert

÷	800	<u>1</u> 600	<u>2</u> 400	3200	4000	4800	5600	<u>6</u> 400	7200	2000	8800	2600
		CDS anyl-tRN4	CDS he CDS he reductase	0 ene synthase me 	e C blogenes	./Chaperone	(g]ycosy] tr [[] ■ /Anhydro-N-ad	ansferase, prou	p 2 family pr	{ oteir CDS 	IIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIII	4
		8800	9600	<u>1</u> 0400	11	.200	12000	12800	13600			
									1 1			
		K	facilitato	Mandel	late racen IIII IIIIIII I∨ MFS 1	nase/mucor	ate lactor	nizing enzyme Bacillus cla	2 			

(Abb. 8). Es handelt sich ausschließlich um Gene des Primärstoffwechsels (Tabelle 1). Die Sequenzierung des restlichen Cosmids ist bereits in Auftrag gegeben worden.

Abb. 8: Gene auf dem bisher sequenzierten Subfragment von *E. coli* M49.K9. Es handelt sich um einzelne Gene für den Primärstoffwechsel und um Gene für die Porphyrin-Biosynthese. Unterhalb der Angabe der Basenpaare sind "Open Reading Frames" der drei möglichen Leseraster dargestellt.

Name	Start	Ende
Porphobilinogen-Deaminase	1382	453
Glutamyl-tRNA-Reductase	2680	1382
Sirohäm-Synthase	3294	2668
Cytochrom c-Biogenese-Protein	4122	3301
Chaperon/Anhydro-N-acetylmuraminsäure-Kinase	5384	4224
Glykosyl-Transferase	6480	5389
Malat-Dehydrogenase	7568	6483
Quecksilber-Reduktase/Dihydrolipoamid-Dehydrogenase	7684	9060
Hauptmoderator Superfamilie MFS_1	10388	9051
Mandelat Racemase/Muconat Lactonisierungs-Enzym	11686	10406
Dehydrogenase, Bacillus clausii	12761	11571
Hypothetisches Protein Mhun_2057	12911	13927

Tabelle 1: Annotierung von auf dem Fragment des Subklons von E. coli M49.K9 enthaltenen Genen.

4.2 Tryptanthrin (21)

Bei Tryptanthrin (**21**) handelt es sich um ein Alkaloid mit einer sehr langen Geschichte. Es wurde bereits 1892 von O'NEILL als eines der Oxidationsprodukte bei der Reaktion von Indigo mit KMnO₄ in Eisessig erhalten; die Struktur konnte jedoch erst später durch NMR-Spektroskopie^[58] und Röntgenkristallographie^[59] bestimmt werden. ZÄHNER *et al.* isolierten es aus *Candida lipolytica* und fanden eine antibiotische Aktivität.^[60] BERGMAN *et. al.* konnte

zeigen, dass es sich bei Couropitine A um **21** handelt.^[61] Eine einfache, wenn auch in relativ schlechten Ausbeuten verlaufende Synthese wurde von FRIEDLÄNDER und ROSCHDESTWENSKY bereits 1915 vorgeschlagen. Dabei wird Isatin (**28**) unter Hitze mit KMnO₄-Lösung behandelt.^[62] Später folgten weitere Syntheserouten.^[63]

4.2.1 Biosynthesehypothese für Tryptanthrin

In den orientalischen Orchideenarten *Calanthe discolor* und *C. liukiensis* ist Tryptanthrin neben Isatin (**28**), Indirubin (**29**) und dem Indolglykosid Calanthosid (**30**) isoliert worden.^[64] YOSHIKAWA *et al.* konnten zeigen, dass Tryptanthrin (**21**) durch enzymatische Hydrolyse von **30** mit β -Glucosidase in 0.2 M Acetatpuffer als Hauptprodukt entsteht, während die saure Hydrolyse von **30** zu **28** und **29** führt (Abb. 9).^[65]



Abb. 9: Produkte der sauren Hydrolyse von **30** sind **28** und **29**, während die enzymatischen Hydrolyse zu **21** als Hauptprodukt führt.

In Hefen dürfte ein anderer Biosyntheseweg vorherrschen, da ZÄHNER und FIEDLER bereits 1976 durch vorläuferdirigierte Biosynthese mit Tryptophan- und Anthranilsäurederivaten eine Reihe von chemisch veränderten Tryptanthrinderivaten herstellen konnten.^[66] Weil durch Abbau von substituiertem Thryptophan substituierte Anthranilsäure entsteht, wurde bei Fütterung mit markiertem Tryptophan neben monosubstituiertem Tryptanthrin auch die disubstituierten Verbindungen erhalten. Damit wurden zum einen Tryptophan und Anthranilsäure als biogenetische Vorläufer des Tryptanthrins (**21**) bewiesen, und zum anderen die breite Substratspezifität der an der Biosynthese beteiligten Enzyme.

Biologisch besonders wirksam erwiesen sich in antibiotischen Zellassays die halogenierten Verbindungen (**31**, **32**), deren Minimale Hemmkonzentration gegen *B. subtilis* mit 0.1 bzw. 0.3 μ g/mL kleiner als die der Stammverbindung **21** mit 3 μ g/mL ist (siehe Abb. 10).



Abb. 10: Durch Vorläuferdirigierte Biosynthese lassen sich halogenierte Derviate (31, 32) herstellen.^[66]

Tryptanthrin (21) entsteht wahrscheinlich durch die Kondensation von Anthranilsäure (33) mit Isatin (28) (siehe Abb. 11). Denkbar ist, dass die Säuregruppe der Anthranilsäure (33) durch CoA aktiviert ist. Sie wird durch das Stickstoffatom von 28 angegriffen; über Angriff der Aminogruppe von 33 läuft der Ringschluss ab. Durch eine Dehydratisierung entsteht schließlich im letzten Schritt die Doppelbindung.

Die metagenomische DNA des Klons M73.N2 enthält mindestens ein Gen, das für diese zweifache Kondensation codiert. Sollte **33** aktiviert sein, so ist ein weiteres für die Aktivierung verantwortliches Gen zu erwarten.

Daneben müssen Gene vorhanden sein, damit der Klon kompetent ist, die Vorläufer herzustellen.



Abb. 11: Hypothetisches Biosynthesschema für 21 aus 28 und 33.

Sowohl Anthranilsäure (33) als auch Isatin (28) sind Zwischenstufen des Tryptophan-Katabolismus (Abb. 12).^[67] Entscheidend für die erfolgreiche heterologe Expression des Genclusters ist daher ein verzweigter Tryptophan-Stoffwechsel. Der Befund, dass Tryptanthrin (21) gebildet wurde, unterstreicht das Vorliegen eines aktiven Indolstoffwechsels im Wirtsstamm E. coli. Allerdings ist im Genom des Wirtsorganismus E. coli kein Gen für die Oxidation des Indol zum Indoxyl vorhanden. Daher ist für diesen Schritt die erfolgreiche Expression einer Naphtalen-Dioxygenase notwendig. Da einige Enzyme dieses Typs bereits von anderen Organismen bekannt sind, könnten degenerierte Primer zur Auffindung des Tryptanthrin-Biosyntheseclusters dienen. Allerdings erscheint die komplette Sequenzierung des Cosmids einfacher.



Abb. 12: Biogenese von Anthranilsäure (33) und Isatin (28).^[67]

5. Biologische Aktivität der Metabolite

Die Metabolite Brevinsäure (18), Brevinsulfoxid (19) und Tryptanthrin (21) wurden im Plattendiffusionstest gegen *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* und *Candida albicans* getestet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 dargestellt.

	B. subtilis	S. aureus	E. coli	C. albicans
18	-	-	-	-
19	24	22	-	26
21	10	23	11	-

Tabelle 2: Hemmhofdurchmesser in mm im Plattendiffusionstest

(40 µg Testsubstanz, Durchmesser der Filterplättchen 9 mm)

Im Plattendiffusionstest mit Actinomyces viscosus, Streptococcus mutans, Propionibacterium acnes, Corynebacterium amycolatum, Staphylococcus epidermidis, Pseudomonas aeruginosa und Candida glabrata, der von der Firma BRAIN durchgeführt wurde, wies 21 weiterhin eine Aktivität gegen *C. amycolatum* auf, während für 18 keine Aktivität festgestellt werden konnte. 19 wurde bisher nicht getestet.

5.1 Diskussion der biologischen Aktivität von Brevinsäure (<u>18</u>) und <u>19</u>

Es wurde berichtet, dass Brevinsäure (18) eine schwache biologische Aktivität sowie eine diuretische Wirkung besitzt.^[53] Die Aktivität konnte in den durchgeführten biologischen Tests nicht nachvollzogen werden. Evtl. rührte das positive Testergebnis von Verunreinigungen durch Oxidationsprodukte wie 19 her.

5.1.1 Vergleich der Brevinsäure (18) mit ähnlichen Strukturen

Aus der Seescheide *Aplidium conicum* wurden mit den Conicachinonen A (**34**) und B (**35**) zur Brevinsäure (**18**) und Brevinsulfoxid (**19**) zwei recht ähnliche Metabolite isoliert.^[68] Diese besitzen eine starke Cytotoxität gegen Gliom-Zellen bei Ratten.

Aus dem Schwamm *Xestospongia* sp. wurden Halenachinone (**36**, **37**) und Xestochinone (**38**, **39**) isoliert, die sich mit der Brevinsäure (**18**) die 1,4-Naphtochinon-Struktur und den 2,3-verbrückten Stickstoff-/Schwefelheterozyklus teilen.^[69] **37** und **39** inhibieren die humane Phosphatase Cdc25B, die bei der Regulation der Mitose eine wichtige Rolle spielt. **39** ist in der Lage, den Fortschritt des Zellzyklus zu unterbrechen.



Wegen der strukturellen Ähnlichkeit wird angenommen, dass **19** ebenfalls cytostatische Eigenschaften besitzen könnte.

5.1.2 Synthese der Brevinsäure (18) und oxidierter Derivate (19, 46-48)

Um die biologische Aktivität von **19** genau spezifizieren und den Strukturbeweis endgültig führen zu können, wurden **18** und **19** totalsynthetisch hergestellt.

Um genügend Ausgangsmaterial für weitergehende Untersuchungen zur Verfügung zu stellen, wurde durch Addition von DL-Homocystein (40) an 2,3-Dichlor-1,4-naphtochinon (41) 0.96 g racemische Brevinsäure (42) hergestellt, wobei 40 durch Verseifung von DL-Homocysteinlacton (43) gewonnen wurde. Durch milde Oxidation mit Wasserstoffperoxid konnten dann die einfach oxidierten Derivate 44 und 45 als Diastereomere racemisch hergestellt werden (Abb. 13). Durch Abgleich von NMR-Spektren und Retentionszeiten konnte die Struktur von 19 bestätigt werden. Oxidationsversuche zur Darstellung von 46 und eine anschließende Trennung der Enantiomere (47, 48) sind in Planung.

Ebenfalls geplant ist eine enatiomerenreine Synthese ausgehend von käuflichem L-Homocystein, so dass die biologische Aktivität der Enantiomere spezifiziert werden kann. Bei unterschiedlicher Wirkung der einzelnen Isomere kann auf ein spezifisches Target geschlossen werden.



Abb. 13: Syntheseschema für die Zielstrukturen 42, und 44-48.

Durch Variation der Synthese sind eine große Anzahl ähnlicher Verbindungen zugänglich. Es ist daher geplant, ähnliche Derivate herzustellen, um so die Struktur-Wirkungs-Beziehung studieren zu können. Dazu sind Kondensationen mit Cystein und Serin anstelle von Homocystein geplant. Weiterhin eignen sich Derivatisierungen der Säurefunktion wie etwa die Bildung von Methylestern.

5.1.3 Diskussion der biologischen Aktivität von E. coli M49.K9

Da der *E. coli* Klon M49.K9 oxidatives Potenzial besitzt, wird angenommen, dass auch 46 biosynthetisch gebildet werden kann. Dieser bisher in den Kulturen nicht identifizierte und nicht literaturbekannte Metabolit könnte die Hauptaktivität im Rohextrakt von *E. coli* Klon M49.K9 verursachen. Die Oxidation des nicht antibiotisch aktiven 18 könnte auch in anderen bekannten Organismen *Brevibacterium flavum* und *B. lactofermentum* ablaufen, um ein nicht aktives Speicherderivat 18 in Abwehrstoffe wie 19 zu überführen.

Es wäre aber auch denkbar, dass das mutmaßliche Produkt der Porphyrin-Biosynthese (16) für die beobachtete Aktivität gegen *B. subtilis* verantwortlich ist. Porphyrine haben die katalytische Fähigkeit, unter Lichteinwirkung reaktive Sauerstoff-Spezies zu bilden. Dies könnte einen Teil der biologischen Aktivität verursachen.^[70]

5.2 Diskussion der biologischen Aktivität des Tryptanthrin (21)

Von ZÄHNER wurde erstmalig eine antibiotische Wirkung von **21** auf *Bacillus subtilis* berichtet.^[60] Später wurden im Verdünnungsreihentest eine minimale Hemmkonzentrationen von 3 μ g/ml gegen *B. subtilis* bestimmt.^[66]

In jüngerer Zeit wurde die Entdeckung mehrerer interessanter biologischer Aktivitäten von Tryptanthrin (**21**) beschrieben. DANZ *et. al.* fanden eine potente Hemmung der Synthese von Prostaglandin und Leukotrien, außerdem eine selektive Cyclooxygenase 2 (COX-2) Inhibition $(ICM_{50} = 1.5 \ \mu M).^{[71]}$

21 und abgeleitete Derivate sind Agonisten des sogenannten aryllischen Kohlenwasserstoffrezeptors. Dieser scheint ein Teil des Abwehrsystems höherer Organismen gegen Sekundärmetaboliten zu sein.^[72]

Weiterhin ist **21** ein Hemmstoff der induzierbaren NO-Synthase und hemmt die Interferon- γ Produktion.^{[73],[74]} Es wird vermutet, dass die Wachstumshemmung von *B. subtilis* und *S. aureus* durch Tryptanthrin (**21**) im Plattendiffusionstest auf einer Inhibition der bakteriellen NO-Synthase beruht, da diese Organismen bekannte Träger des Enzyms sind (siehe Kapitel III.6.3). Es wäre möglich, dass **21** differenziert auf die Isoformen der NO-Synthasen wirkt (siehe Kapitel III.6). Dies lässt die Anwendung als molekulares Hilfsmittel oder Medikament denkbar erscheinen. Daher ist geplant, in Kooperation mit N. OPITZ (Faculty of Medicine, Nursing & Health Science/ Monash University) **21** auf die Inhibition der drei humanen Isoformen zu testen.

Weiterhin wurde **21** im Rahmen dieser Arbeit auf die Inhibition vom Komplex I der Atmungskette getestet (siehe Kapitel III.6). **21** erwies sich als nicht aktiv.

Die Erkenntnisse über 21 zeigen sehr eindrucksvoll, dass selbst ein altbekannter Naturstoff eine Vielzahl bislang unbekannter Wirkungen besitzen kann. Auch Jahre nach der ursprünglichen Entdeckung eines Naturstoffs können in neuen Testsystemen weitere Wirkungen erkannt werden und diese dann als Basis für die Entwicklung neuer Medikamente dienen. Tryptanthrin (21) erfüllt dabei einige Vorraussetzungen für eine viel versprechende Leitstruktur. Hierbei sind das einmalige Spektrum der biologischen Aktivitäten sowie die Kombination von Strukturelementen zu nennen, die für oral verfügbare Medikamente hinsichtlich der Molmasse, Lipophilie und Zahl der Wasserstoffbindungs- bzw. Donorstellen typisch ist.

Der Stoff ist durch Synthese einfach zugänglich und besitzt zahlreiche Möglichkeiten der Variation für strukturelle Modifikationen zur Optimierung der biologischen Aktivität.^[75]

6. Diskussion des Projektes

Die Organisation des Projektes sah aufeinander aufbauende Arbeiten der einzelnen Projektpartner vor. Die Probenentnahme in der Nordsee, der Aufbau der Metagenombank durch die Arbeitsgruppe SCHLEPER und die Firma BRAIN sowie das Expressions-orientierte Screening war die Grundlage für die Auswahl aktiver Klone und anschließende Fermentation durch die Arbeitsgruppe GROND. Diesem Sachverhalt wurde durch leicht zeitversetzt geplanten Arbeitsbeginn der Arbeitsgruppen Rechnung getragen. Allerdings standen erst 18 Monate nach Start des Projektzeitraumes die beiden aktiven Klone bereit, was deutlich später war als geplant. Ein etwas größerer Projektzeitraum wäre daher von Vorteil gewesen.

Für die Fermentierungstechnnik und Strukturaufklärung konnten für Streptomyceten etablierte Protokolle der Arbeitsgruppen ZEECK/GROND angepasst werden. Zur Substanzisolierung wurde zunächst eine Kombination aus biologischem und chemischem Screening erfolgreich etabliert. Dieses Verfahren könnte für weitere Projekte von Nutzen sein, bei denen eine aktivitätsbasierte Isolationsstrategie zu verwenden ist. Aufgrund der außergewöhnlich geringen Stoffmengen, die es für das Verbundprojekt zu bearbeiten und erfolgreich aufzuklären galt, war eine äußerst effektive, genau ausgearbeitete Isolationsstrategie notwendig. Die Strukturaufklärung mit geringsten Mengen von unter 1 mg nur durch optimale Kombination von NMR-Spektroskopie, hochauflösender war Massenspektrometrie, HPLC-MS-Kopplung und Datenbanksuche möglich.

Als sehr problematisch erwiesen sich die äußerst geringen Produktionsraten des *E. coli*-Host-Stammes von unter 0.1 mg pro Liter Kulturbrühe, die neben dem biosynthetisch wenig leistungsfähigen Hintergrund vor allem auf die Verwendung von Single-Copy-Plasmiden zurückzuführen sein dürfte. Dadurch wurde nicht nur die Strukturaufklärung erschwert, sondern auch die Detektion der Metaboliten im Rohextrakt verhindert. Selbst die Validierung der biologischen Aktivität der aktiven Klone durch Rohextrakte erwies sich als schwierig. Es erscheint denkbar, dass positive Klone mit geringerer biologischer Aktivität übersehen wurden. Ein Folgeprojekt sollte daher die Verwendung eines anderen Expressionssystems beinhalten. Ein Wirt mit höherer Expressionsrate wie *Streptomyces* oder *Pseudomonas* würde die Isolierung wesentlich erleichtern. Allerdings wäre es möglich, dass die Expression eines in *E. coli* aktiven Cosmids in anderen Wirtsorganismen nicht erfolgreich verläuft. Dies ist bereits in anderen Projekten aufgefallen, da die in *E. coli* produzierten Indol-Vorläufer in anderen Wirtsorganismen nicht zur Verfügung stehen.^[76] Daher erscheint die Verwendung eines anderen Expressionssystems in *E. coli* vielversprechender zu sein. In anderen Metagenomprojekten konnten damit ausreichende Expressionsrate von ca. 1 mg pro Liter Kulturbrühe erhalten werden.^[77]

Das Screening nach biologischer Aktivität mit *B. subtilis* ist für die Suche nach bioaktiven Substanzen von Nutzen, da *B. subtilis* eine besondere unspezifische Empfindlichkeit auf diverse Metaboliten aufzuweisen scheint. Bezieht man andere Testsysteme in das biologische Screening mit ein, so könnten bisher übersehene bioaktive Klone aufgespürt werden, so wie das Screening nach hämolytischer Aktivität zu den Turbomycinen geführt hat.^[34] Besonders einfach erscheint hier die Suche nach Pigmentbildung zu sein. Die in diesem Projekt isolierten Substanzfamilien waren ausnahmslos farbig (Brevinsäure, Porphyrine, Tryptanthrin). In einem weiteren Projekt sollten daher sämtliche Klone neben der biologischen Aktivität auch auf Farbstoffproduktion hin untersucht werden.

Für die schnelle Strukturaufklärung bei Reisolierung bekannter Metaboliten wäre eine Substanzbibliothek wünschenswert. Ideal erscheint eine HPLC-DAD-MS-Kopplung; für viele Fälle wäre aber bereits eine HPLC-DAD-Kopplung ausreichend. Da derartige Bibliotheken nicht kommerziell erhältlich sind, müssten sie zunächst aufgebaut werden bzw. durch einen Kooperationspartner bezogen werden. Eine Kooperation mit einer Arbeitsgruppe, die eine große Anzahl an Verbindungen isoliert, wäre hervorragend. Ideal erscheint auch eine Verknüpfung der Substanzbibliothek mit Programmen wie Chapman & Hall oder Antibase.

Wichtig wäre es darüber hinaus, eine Sequenzierung und Annotierung der Cosmid-DNA zeitnah zu der Isolierung der Metabolite durchzuführen. Durch Gen-Informationen ist es in vielen Fällen möglich, zumindest auf die Substanzklasse des erwarteten Produktes zu schließen. Diese Substanzinformation sollte die Suche nach den Expressionsprodukten erleichtern.

Weiterhin wurde keine sequenzorientierte Analyse der Metagenombank angewendet. Die Suche nach PKS- und NRPS-Genclustern und die anschließende Exprimierung dieser Cosmide in kompetenten Wirten wie *Streptomyces*, *Bacillus* oder *Pseudomonads* erscheinen als vielversprechende Alternative zur ungerichteten Suche in *E. coli*.

Die Umsetzung dieser Punkte könnte für ähnliche Folgeprojekte von großem Vorteil sein.

7. Allgemeine Bewertung der Metagenomstrategie zur Wirkstoffsuche

Durch die gewählte Metagenomstrategie konnten zwei bioaktive Metabolite isoliert und ihre Strukturen aufgeklärt werden. Tryptanthrin (**21**) und Brevinsäure (**18**) sind als Naturstoffe bekannt. Auch die aus eDNA isolierten Naturstoffe Indirubin (**49**),^[78] Turbomycin A (**10**)^[34] und Violacein (**50**)^[79] waren bereits aus Wildstämmen als Biosyntheseprodukte bekannt. Noch nicht als Naturstoffe bekannt waren Terragin A-E (**4-8**),^[33] die Fettalkohole (**51**, **52**),^[76] langkettige *N*-Acyl Tyrosine (**53**)^[80] und deren Abkömmlinge (**54**, **55**),^[81] Palmitoylputrescin (**56**),^[82] *N*-Acylderivate von Arginin (**57**) und Tryptophan (**58**)^[83] und ein Isocyanid (**12**)^[35]. Abb. 14 gibt eine Übersicht von zuvor aus Metagenomansätzen isolierten Naturstoffen. Für alle außer den Terraginen (**4-8**) diente *E. coli* als Wirtsorganismus.

Es handelt sich ausschließlich um *N*-acylierte Aminosäurederivate und Abkömmlinge des Indolstoffwechsels. Dies ist mit der Fähigkeit des Wirtes *E. coli* zu erklären, selbst derartige Metabolite herzustellen. Wahrscheinlich ist *E. coli* nicht in der Lage, Vorläufer für viele andere Biosynthesewege zur Verfügung zu stellen. *N*-acetylierte Derivate waren trotz ihrer im Metagenomverfahren nachgewiesenen weiten Verbreitung bisher in traditionellen Analysen übersehen worden.^[84] Daher kann der Metagenomansatz zu einem besseren Verständnis der mikrobiellen Lebensgemeinschaften beitragen. Es wird angenommen, dass diese Metabolite als Signalmoleküle zwischen den Mikroorganismen dienen.

Bei den im Rahmen dieses und anderer Metagenom-Projekte isolierten und charakterisierten Metaboliten handelt es sich um chemisch eher einfachere Strukturen; in dieser Hinsicht ist also der sehr große Aufwand, der von der Probenentnahme, der Herstellung der Metagenombank und der aufgrund der geringen Produktionsrate schwierigen Substanzisolierung ausgeht, bisher wenig ertragreich. Allerdings handelt es sich um ein neues Verfahren, das zuerst einmal evaluiert und verbessert werden muss.

Ein Grund für die Isolierung von Naturstoffen mit relativ geringer Molekülmasse in bisherigen Metagenomprojekten ist die Länge der Cosmide, auf die mit maximal 40 kb keine großen Gencluster passen. Kleine Cluster aus wenigen Genen werden statistisch häufiger intakt in die Cosmide aufgenommen. Weiterhin dürften kleinere Biosynthesecluster statistisch häufiger sein.



Abb. 14: Bisher aus Umwelt-DNA isolierte Naturstoffe bzw. Naturstofffamilien.

Fraglich ist, warum keine Produkte der *N*-Acyltransferasen in der hergestellten Genombank gefunden wurden. Diese Enzyme wurden bisher in jeder von BRADY et al. hergestellten Bank identifiziert.^[84] Dies könnte am Screening-Verfahren liegen, da ein anderer Organismus zur Detektion der biologischen Aktivität verwendet wurde. Da von BRADY et al. ebenfalls ein *B. subtilis* Stamm verwendet wurde, ist es jedoch wahrscheinlicher, dass die Enzyme im untersuchten Ökosystem des Schwammes im vorliegenden Projekt keine besondere Rolle spielen. Aufgrund der geringen Temperatur des Ökosystems könnten andere Mechanismen zur Kommunikation verwendet werden. Am wahrscheinlichsten erscheint jedoch, dass die Expressionsprodukte aufgrund der zu geringen Expressionsrate bei relativ geringer biologischer Aktivität im Overlay-Screening übersehen wurden.

Ein sehr großer Vorteil des Metagenom-Verfahrens ist, dass durch Sequenzierung und Annotierung der metagenomischen DNA aktiver Klone die verantwortlichen Gene bzw. Gencluster einfach zugänglich sind und so analysiert werden können. Ein zeitaufwändiges und evtl. wegen fehlender Sonden schwieriges Screening entfällt also. Umso erfreulicher ist, dass sich derzeitig beide Cosmide in der Sequenzierung befinden.

Die zum Teil erhebliche Größe der für die Biosynthese von Naturstoffen, wie z. B. Polyketiden, verantwortlichen Gencluster erschwert die heterologe Expression aus eDNA. Der Rapamycin-Cluster ist etwa 110 kb groß. Bei Verwendung von Cosmiden, deren Inserts nur durchschnittlich 40 kb betragen, ist daher die Expression von großen Biosynthesegencluster unmöglich. Daher laufen Bemühungen, Vektoren zu erhalten, die DNA solcher Größe exprimierbar machen.

Ein Problem aller Metagenomprojekte ist die geringe Erfolgsrate, die beim Screening dieser erstellten Genbank bei etwa einem positiven Klon pro 500 Megabasen DNA liegt. Es ist jedoch anzunehmen, dass bioaktive Naturstoffe sehr viel weiter verbreitet sind als ein Cluster pro 500 Megabasen; als Beispiel sei hier S. coelicolor genannt. Auf seinem vollständig sequenzierten Genom von 8.6 Millionen Basen liegen 21 Cluster für Sekundärmetaboliten, Cluster ebenfalls 400.000 Basen. Bacilli sind also etwa ein pro begabte ähnlicher Sekundärmetabolitproduzenten mit Häufigkeit an Sekundärstoff-Biosynthesegenclustern. Nicht alle Mikroorganimengruppen sind aber entsprechend kompetent und werden daher auch nicht diese Dichte an Sekundärstoffclustern aufweisen. Aber selbst bei exotischeren Organismen wie extremophilen Pilzen konnte die Produktion von Sekundärstoffen nachgewiesen werden.^[85] Eine Möglichkeit, die Rate an positiven Expressionsklonen zu erhöhen, wäre, gezielt die DNA von als kompetent bekannten Organismen anzureichern. Dazu bietet sich für Streptomyces beispielsweise der hohe GC-

Gehalt an; mittels Dichtegradient bei Zentrifugation kann diese DNA angereichert werden.^[42] Kritisch muss hierbei aber angemerkt werden, dass dies den ursprünglichen Ansatz, mittels Metagenomtechnik das Genom von bislang nicht untersuchten oder gar völlig unbekannten Organismengruppen zugänglich zu machen, durchkreuzt.

Das Hauptproblem scheint vielmehr die Kombination aus Expressionswirt und Screening-Verfahren zu sein. Der hier verwendete Wirt *E. coli* lässt sich zwar leicht handhaben, ist aber nicht in der Lage alle notwendigen Vorläufer wie Propionat für Biosynthesewege zur Verfügung zu stellen. Daher können entsprechende Gencluster nicht erfolgreich exprimiert werden. Ein kompetenterer Wirt wie *Streptomyces* oder *Pseudomonas* wäre daher von Vorteil. Allerdings können auch diese nicht alle potentielle Vorläufer zur Verfügung stellen. Zudem wachsen diese Organismen langsamer und sind z. B. bei Transformationen schwieriger zu handhaben als *E. coli*.

Wichtig erscheint weiterhin die Wahl des Ökosystems, aus der die eDNA entnommen wird. Besonders reich an Naturstoffen scheinen Ökosysteme zu sein, in denen eine große Diversität der enthaltenden Organismen herrscht. In diesen ökologischen Nischen herrscht eine Vielzahl von Interaktionen zwischen den Mikroorganismen selbst und darüber hinaus zwischen ihnen und Eukaryonten. Da derartige Interaktionen wahrscheinlich meist durch Metabolite des Sekundärstoffwechsels vermittelt werden, sind hier die größten Erfolge zu erwarten.

Die im Boden lebenden saprophytischen *Actinomyceten* sind als besonders reiche Quelle für Sekundärmetabolite bekannt. In marinen Ökosystemen sind neben Cyanobakterien auch mit Schwämmen assoziierte Mikroorganismen viel versprechende Naturstoffproduzenten.^[86]

Leider ist es in den meisten Fällen bei Verwendung der Metagenomik nicht möglich, den Spenderorganismus der DNA zu bestimmen. Einen Anhaltspunkt liefert zwar bespielsweise der GC-Gehalt des Cosmids, aber nur in den seltensten Fällen wird es möglich sein, durch phylogenetische Einordnung zufällig enthaltener Gene des Primärstoffwechsels genau eine Spezies zuzuordnen. Untersuchungen zur intrinsischen Aktivität der Sekundärstoffe im Ökosystem sind daher im Allgemeinen unmöglich.

Mit Erfahrung des vorliegenden Projektes erscheint es als eine ideale Strategie, eine große Metagenombank in *E. coli* abzulegen und mit einem sequenzbasierten Screeningverfahren zu analysieren. Dabei würde die Metagenom-DNA mit Sonden auf PKS, NRPS oder andere mit Sekundärstoffen assoziierte Gene hybridisiert. Die Cosmide in diesem Schritt als positiv selektierter Klone könnten dann in kompetente Wirtsorganismen wie *Streptomyces*, *Bacillus* und *Pseudomonads* umkloniert werden. Anschließend würden die Wirte dann in einem funktionsbasierten Ansatz auf eine Sekundärstoffbildung hin untersucht. Dieses Verfahren

würde den Vorteil, in *E. coli* schnell eine große Menge Klone untersuchen zu können, mit dem Vorteil der besseren Expression in kompetenteren Wirten vereinigen.

Das durchgeführte Projekt "Erschließung schwer kultivierbarer mariner Biodiversität für die Wirkstoffforschung mit molekulargenetischen Methoden" war das erste Projekt, marine Naturstoffe durch Verwendung einer Metagenomstrategie zugänglich zu machen und dabei zu einer erfolgreichen Expression von Naturstoffen führte. Dabei wurden Naturstoffe aus zwei Naturstofffamilien isoliert und ihre Struktur aufgeklärt.

Derzeit laufen Bemühungen durch Genanalyse die Frage der Biosynthese der Metaboliten zu klären und durch weitergehende Profilierung ihre biologische Aktivität nutzbar zu machen.

III. Arbeiten an Streptomyces bottropensis Dra17

1. Fütterungsexperimente mit markierten Vorläufern

1.1 Stammisolierung und Taxonomie

Der Stamm *Streptomyces* sp. Dra 17 wurde aus einer am Drakenberg nahe Göttingen entnommenen Bodenprobe eines Kalkmagerrasens isoliert.^[36] Charakteristische Merkmale sind das weiße Luftmycel, welches sich nach 7-10 Tagen grau färbt und eine spiralähnliche Sporenmorphologie besitzt.

Der Stamm wurde von der DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH (DSMZ) taxonomisch untersucht.^[87] LL-Diaminopimelinsäure wurde in Ganzzell-Hydrolysaten gefunden; der Stamm produziert eine Mischung aus iso/ante-iso verzweigten Fettsäuren, aber nur einen sehr geringen Anteil von unverzweigten gesättigten und ungesättigten Fettsäuren. Weiterhin fehlen Hydroxyl- und 10-Methyl-verzweigte Fettsäuren bzw. sind nur in sehr geringen Mengen vorhanden. Dieses Fettsäuremuster ist für die Vertreter der Gattung *Streptomyces* diagnostisch. Zur Bestimmung der Spezies wurde das Gen der 16S ribosomalen Ribonucleinsäure (rRNA) sequenziert^[88] und mit allen zur Zeit vorliegenden 16S rDNA Sequenzen verglichen.^[89] Obgleich dieses die zur Zeit verlässlichste Methode der Bakterien-Taxonomie darstellt, können nicht alle Vertreter der Gattung *Streptomyces* allein mit Hilfe dieser Methode identifiziert werden. Um das Ergebnis der vergleichenden 16S rDNA Sequenzierung abzusichern, wurden die nächsten Verwandten gleicher Gattung herangezogen, um diagnostische Merkmale zu untersuchen und die Ergebnisse miteinander vergleichen zu können. Diagnostische Merkmale hierbei waren:

- <u>"International Streptomyces Project"-Kriterien:</u>^[90] a) Sporenketten Morphologie, b) Farbe der Kolonien, c) diagnostische Färbung der Rückseite der Kolonien (Substrat Mycel), d) Produktion von Exopigmenten, e) Melanin-Bildung auf spezifischen Kultur-Medien, f) Verwertung von neun diagnostisch relevanten Zuckern.
- <u>Verwertung von 96 diagnostischen Substraten</u> und Vergleich des Verwertungsmusters mit den Daten von 821 *Streptomyces*-Typus und Referenz-Stämmen.^[91]
- <u>Vergleich des Fettsäuremusters</u> des Isolates mit den in der Fettsäure-Datenbank niedergelegten Mustern.^[90b]
- 4) Vergleich des rRNA-Restriktionsmusters (RiboPrint Muster).

Die vergleichende 16S rDNA Sequenzierung ergab 100% Sequenzsimilarität zu Streptomyces bottropensis und dessen Synonym Streptomyces europaeiscabiei. Da mit Ausnahme des

RiboPrint Musters alle Merkmale von *Streptomyces* sp. Dra17 mit denen von *Streptomyces bottropensis* übereinstimmen, konnte Dra17 zweifelsfrei als *Streptomyces bottropensis*, einem Verwandten von *Streptomyces scabies*, identifiziert werden.

Flüssigkulturen von *Streptomyces bottropensis* Dra17 enthalten neben den als Phytopathogenen bekannten Thaxtomin A (**59**) und Thaxtomin C (**60**) Spuren von zwei mit Anisaldehyd/Schwefelsäure blau anfärbenden Verbindungen.

Sie konnten von O. WAGNER isoliert und strukturaufgeklärt werden. Diese einen Pyridon-Heterozyklus enthaltenden Metabolite wurden Iromycin A (13) und Iromycin B (14) genannt.^[36]



Außerdem wurden weitere, nicht näher charakterisierte Nebenkomponenten nachgewiesen. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass der Stamm *Streptomyces bottropensis* Dra17 zu weiteren Biosyntheseleistungen kompetent ist.^[36]

1.2 Stammhaltung und Fermentation von *Streptomyces* sp. Dra 17

Für die Stammhaltung und Fermentation konnte auf Vorarbeiten von O. WAGNER und J. VON FRIELING zurückgegriffen werden. Streptomyces sp. Dra17 wurde auf M2+Ca-Platten für 7-10 Tage bei 28 °C inkubiert.^[37] Eine Wachstumssteigung konnte durch Erhöhung der Calciumkonzentration auf 400 mg/L erreicht werden. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C, wobei Lagerungsdauer Monaten keinen eine von bis zu zwei Einfluss auf das Fermentationsverhalten zeigte.

Bei den von O. WAGNER und J. VON FRIELING durchgeführten Fermentationen wurden die Nährmedienzusammensetzung, -menge, Schüttelgeschwindigkeit, Kultivierungsart und -dauer variiert. Schüttelkolben, Rühr- und Umwurffermenter sind geeignet, Wachstum und Metabolitenproduktion zu erzielen. Zur Produktion der Iromycine (13, 14) erwiesen sich SGG-Medium für die Vorkultur und Hafermedium bzw. Medium S für die Hauptkultur als besonders geeignet. Bei der Verwendung von Hafermedium ist lediglich bei Fermentation in Schüttelkolben eine Iromycinproduktion erfolgt, während die Iromycine (13, 14) bei Verwendung von Medium S auch aus Fermentern isoliert werden konnten. Da die Biosynthese-Experimente lediglich auf die Iromycine (13, 14) und nicht auf die im Hafermedium produzierten Thaxtomine (59, 60) ausgerichtet waren, wurde Medium S als Hauptkulturmedium gewählt.^[38] Die Kultivierung erfolgte über 72 h in diversen Fermentern (1 L Biostat M, 2 bzw. 5 L Biostat B, 10 L Biostat E, 10 L Airliftvermenter, 50 L Biostat U). Die höchste Produktion von 13, die diagnostisch für die Produktion der übrigen Mitglieder der Metaboliten-Familie ist, wurde in den Großfermentern Biostat E und Biostat U mit maximal ca. 25 mg/L erzielt. Dies liegt vermutlich an der im Vergleich zu der Fermentationsmenge geringen Belüftung. Dagegen konnten bei Fermentation im Airlifter lediglich 1 mg/L 13 isoliert werden. Es ist daher davon auszugehen, dass eine geringe Sauerstoffsättigung die Iromycin-Produktion begünstigt. In den übrigen Fermentationsvarianten wurden ca. 10 mg/L Iromycin erhalten.

Gegen Ende der Fermentation zeigt sich neben einem starken Mycelrand an der Gefäßwand eine braune Färbung der Kulturbrühe. Zudem ist ein für Streptomyceten typischer erdiger Geruch wahrnehmbar.

1.3 Aufarbeitung und Isolierung der Iromycine

Im Rahmen der Doktorarbeit wurden die für die Reinisolierung der Iromycine (13, 14) notwendigen Methoden weiter optimiert. Hierbei brachten vor allem die in der Kulturbrühe enthaltenen Fettsäuren ein Trennproblem mit sich. Die verschiedenen Kultivierungen in diversen Fermentern wurden wie im Folgenden beschrieben aufgearbeitet.

Die Kulturbrühe wurde nach Zugabe von Celite filtriert. Mycel und Kulturfiltrat wurden voneinander getrennt aufgearbeitet, da der Hauptteil von **13** im Mycel und der Hauptteil von **14** im Kulturfiltrat vorlagen. Das Mycel wurde mit Aceton und Aceton/Methanol 1:1 aufgeschlossen; das Kulturfiltrat wurde an Amberlite[®] XAD-2 adsorbiert und mit Methanol eluiert. Auch eine Extraktion des Kulturfiltrats mit Essigsäureethylester oder die

Lyophilisation der Kulturbrühe mit anschließender Lösung in Methanol, erwiesen sich als möglich.

Die Rohprodukte wurden anschließend durch Säulenchromatographie an Kieselgel (Cyclohexan / Essigester/ Methanol (CEM), 5:10:2; Säule $50 \ge 2.2 \text{ cm}$) und Sephadex LH-20 (Methanol; Säule $75 \ge 2.7 \text{ cm}$) aufgetrennt, wodurch Rohfraktionen der Iromycine erhalten wurden (Abb. 15).



Abb. 15: Aufarbeitungsschema für Streptomyces bottropensis Dra17.

Das Hauptproblem bei der Reinisolierung der Iromycine (13, 14), vor allem bei 13, war ein Fett-/Fettsäure-Gemisch, welches einen ähnliches Laufverhalten wie 13 zeigte. Dünnschichtchromatographisch war es nach Anfärbung mit Anisaldehyd/Schwefelsäure als bläulichgrauer Fleck dicht oberhalb des Iromycin A (13) zu detektieren. Es konnte chromatographisch zwar in reiner Form erhalten, aber von 13 durch Säulenchromatographie nie vollständig abgetrennt werden.^[37] Vermutlich ist das Substanzgemisch so schwer abtrennbar, da es mit der unpolaren C₁₀-Seitenkette von Iromycin A (13) stabile van-der-Waals-Wechselwirkungen eingehen kann. Daher wurde zur Reindarstellung reversed phase HPLC-Chromatographie benutzt. Als besonders günstig bei **13** erwies sich die Verwendung einer C_{18} -Nucleodur Säule (5µm, 250 x 21 mm). Um die bestmögliche Trennleistung zu erhalten, wurde ein isokratisches Programm mit 60 % Acetonitril etabliert. Die Aufreinigung an anderen C_{18} -Materialien (Kromasil, Supersphere) mit identischem Programm erwies sich als ebenfalls möglich.

Da es sich bei 14 um einen etwas polareren Naturstoff handelt, wurde für die Reinstoff-Darstellung eine C₈-Nucleosil-Säule (5 μ m, 250 x 20 mm) verwendet. Dabei wurde ein isokratisches Programm mit einem Acetonitril-Anteil von 30 % gewählt. Die Verwendung von C₁₈-Materialien (Nucleodur, Kromasil, Supersphere) lieferte hier dagegen keine guten Aufreinigungsergebnisse.

Durch Mitteldruckchromatographie (Lobar[®] C, Methanol/Wasser 8:2 \rightarrow 9:1) konnte aus der Mycel-Rohfraktion neben Iromycin A (13) das neue, violett anfärbende Iromycin C (61) in einer Ausbeute von bis zu 0.5 mg/L gewonnen werden. Es zeigt ein ähnliches Laufverhalten wie 13, ist aber ein wenig polarer. Die Aufreinigung wurde mit einer C₁₈-Nucleodur-Säule (5µm, 250 x 21 mm) und 60% Acetonitil durchgeführt.

Analog wurde durch HPLC an Nucleosil C₈-Säulenmaterial (Säule 12, 30 % Acetonitril isokratisch) neben dem bekannten Iromycin B das bislang unbekannte Iromycin D (62) mit bis zu 0.25 mg/L isoliert. Dieses färbt ebenfalls blau an und ist unwesentlich polarer als 14.

Aus der Roh-Fraktion von 14 konnte weiterhin durch Mitteldruckchromatographie (Lobar[®] C, Methanol/Wasser 7:3 \rightarrow 9:1) eine mit Anisaldehyd/Schwefelsäure blau anfärbende Minderkomponente isoliert werden, die als Iromycin E (63) spezifiziert wurde (Ausbeute 0.24 mg/L).

Durch präparative HPLC (Säule 6, Programm 8) wurde weiterhin aus dem Rohprodukt von **13** eine Nebenkomponente (Ausbeute 0.25 mg/L) abgetrennt, die als Iromycin F (**64**) benannt wurde.

1.4 Strukturaufklärung neuer Iromycine

Iromycin C (61)

Der farblose Feststoff Iromycin C (61) wurde aus dem Rohprodukt von Iromycin A (13) isoliert, was auf eine sehr ähnliche Polarität hindeutet. Da das UV-Spektrum mit dem von 13 und 14 übereinstimmte und der Metabolit mit Anisaldehyd blau anfärbte, wurde davon ausgegangen, dass es sich um ein Mitglied der Iromycinfamilie handelt.

Die Molmasse von 289 g/mol wurde durch ein ESI-Massenspektrum bestimmt, dessen Hochauflösung die Summenformel $C_{18}H_{27}NO_2$ lieferte. Das ¹H-NMR-Spektrum von **61** ist nahezu identisch mit dem von **13**, es unterscheidet sich lediglich durch das Vorhandensein von nur einer terminalen Methylgruppe der Seitenkette und durch Austausch der danebenliegenden Methin- durch eine Methylengruppe. ¹³C- und 2D-NMR-Experimente bestätigen diese Beobachtung. Geht man von einem Austausch einer Methylgruppe durch ein Wasserstoffatom aus, so ergibt sich die Struktur von Iromycin C (**61**), mit der alle spektroskopischen Daten übereinstimmen (Abb. 16).



Abb. 16: ¹H-NMR-Spektrum (300 MHz, CD₃OD) von 61.

Iromycin D (62)

Die farblose Substanz wurde mittels HPLC aus dem Rohprodukt von Iromycin B (14) isoliert. Das ESI-Massenspektrum zeigte die Molmasse von 305 g/mol, die Summenformel wurde durch HR-ESI-MS zu $C_{18}H_{27}NO_3$ bestimmt. Das ¹H-NMR-Spektrum (Abb. 17) von **62** unterscheidet sich von 14 durch das Auftreten einer neuen Methingruppe ($\delta_H = 4.18$), das Signal der terminalen Methylgruppe hat statt 6H eine Intensität von 3H und erscheint als Dublett. ¹³C- und 2D-NMR-Experimente unterstreichen, dass im Vergleich zu 14 eine Methylgruppe durch ein Wasserstoffatom ersetzt ist.



Abb. 17: ¹H-NMR-Spektrum (300 MHz, CD₃OD) von 62.

Iromycin E (63)

Die farblose ölige Substanz wurde durch MPLC aus der Rohfraktion von **14** aufgereinigt und zeigt eine Ausbeute von 0.24 mg/L. Das ESI-MS-Spektrum zeigt Ionen von $m/z = 302 ([M+H-H_2O]^+)$ und $m/z = 320 ([M+H]^+)$. Die Summenformel konnte durch hochauflösende ESI-Massenspektrometrie zu C₁₉H₂₉NO₃ bestimmt werden. ¹H-, ¹³C- und 2D-NMR-Experimente zeigten, dass die Seitenketten im Vergleich zu **13** unverändert vorliegen; auch die Zahl der Doppelbindungsäquivalente ist unverändert. Das ¹³C-NMR-Spektrum zeigte jedoch, dass sich der Heterozyklus signifikant verändert haben muss. Ein Signal wurde stark ins Tieffeld verschoben ($\delta_C = 199.2$), was auf das Vorhandensein einer Ketogruppe hindeutet. Weiterhin wies ein Signal bei $\delta_C = 79.4$ ppm auf eine Hydroxylgruppe hin. Mit Hilfe der

HMBC-Kopplungen der Wasserstoff-Atome 7-H, 1'-H, 1''-H auf die Kohlenstoffatome des Heterozyklus konnte die Struktur von **63** ermittelt werden (Abb. 18).



Abb. 18b: ¹H-NMR-Spektrum (600 MHz, CD₃OD) von 63.

Iromycin F (<u>64</u>)

Die farblose und ölige Substanz 64 wurde in einer Menge von 0.25 mg/L aus der Sephadexfraktion, die auch 13 enthielt, mittels HPLC gewonnen. Das ESI-Massenspektrum zeigt ein $[M+H]^+$ Ion bei m/z = 320 und $[2M+Na]^+$ Ion bei m/z = 661. Die Summenformel konnte durch ein hochaufgelöstes ESI-Massenspektrum zu C₁₉H₂₉NO₃ (M_r = 319 g/mol) bestimmt werden. ¹H-, ¹³C- und 2D-NMR-Experimente zeigten, dass die Seitenkette im Vergleich zu 13 unverändert geblieben ist. Analog zu 63 wies das Carbonspektrum auf das Vorhandensein einer Ketogruppe ($\delta_C = 199.6$) und Hydroxylgruppe ($\delta_C = 79.4$) hin. Die HMBC-Kopplungen der Wasserstoffatome 7-H, 1'-H, 1''-H zeigten jedoch eine Hydroxylgruppe an C-3 und ließen daher auf die Struktur von **64** schließen (Abb. 19).



Abb. 19b: ¹H-NMR-Spektrum (600 MHz, CD₃OD) von 64.

1.5 Biosyntheseuntersuchungen

1.5.1 Vergleich mit strukturell ähnlichen Naturstoffen

Die Iromycine teilen sich den Pyridonring mit einigen weiteren bioaktiven Naturstoffen. Kirromycin (**65**) wird von *Streptomyces collinus* und *S. ramocissimus* produziert.^[92] Der Wirkmechanismus ist eine Inhibition des Elongationsfaktors TU, wodurch die bakterielle Proteinbiosynthese gehemmt wird.^[93] Tenellin (**66**) dagegen ist ein Biosyntheseprodukt der insektenpathogenen Pilze *Beauveria bassiana* und *B. tenella*, und ist die Stammverbindung einer Reihe ähnlicher Metabolite.^[94] Dazu ist Militarinon A (**67**) zu zählen, das von *Paecilomyces militaris* produziert wird. Dies hat neben der insektenpathogenen Wirkung einen neurotrophinen Effekt auf Nervenzellen.^[95]



Die Seitenkette des Iromycins zeigt Ähnlichkeiten zu bioaktiven heterocyclischen Metaboliten. Actinopyron A-C (**68-70**) werden von *Streptomyces pactum* produziert, sie besitzen vasodilatierende Wirkungen bei Ratten und antimikrobielle Eigenschaften.^[96] Das strukturell verwandte Kalkipyron (**71**) wird von den marinen Cyanobakterien *Lyngbya majuscula* und *Tolypothrix* sp. gebildet. Es ist eine Toxizität gegen Salzwasser-Shrimps und Goldfische beschrieben worden.^[97] Piericidin A₁ (**72**) ist die Stammverbindung einer Familie ähnlicher Metaboliten (siehe Kapitel III.5.2). Dieses wurde erstmals aus *Streptomyces mobaraensis* isoliert. Neben einer Inhibition des Komplex I der Atmungskette besitzt die Familie eine Reihe weiterer Wirkungen (siehe Kapitel III.5.8).^[98] Das kürzlich entdeckte Verticipyron (**73**) ist ebenfalls gegen den Komplex I aktiv, weiterhin inhibiert es die NADH-Fumarat-Reduktase.^[99]



Mikrobielle Pyridone werden von den diversen Produzenten auf ganz verschiedenartigen Biosynthesewegen hergestellt: Fütterungsexperimente und die Identifikation einzelner Gene des Biosynthesegenclusters lassen vermuten, dass der Pyridonring des Kirromycins (**65**) aus β -Alanin als letzter Extendereinheit einer gemischten PKS-NRPS-Kette herrührt.^[100] Dagegen bildet Phenylalanin mit einer Umlagerung und einer konjugierte Polyketidkette die Strukturen von Tenellin (**66**)^[101] und Militarinon A (**67**)^[102] aus. Allgemein akzeptiert ist, dass sich die Piericidine (**72**) aus einer einzelnen von Acetat- und Propionateinheiten aufgebauten Polyketidkette (Abb. 20) ableiten.^[103]



Abb. 20: Einbaumuster von Vorläufern in Naturstoffe mit Pyridonring, die den Iromycinen strukturell ähneln.

1.5.2 Fütterungsexperimente mit ¹³C-markierten Vorläufern

Um die Frage nach der mikrobiellen Biosynthese der Iromycine aufzuklären, wurden Fütterungsexperimente mit markierten Vorläufern durchgeführt. Von O. WAGNER,^[36] J. v. FRIELING^[37] und im Rahmen der Diplomarbeit^[38] wurden [1-¹³C]Acetat, [1,2-¹³C₂]Acetat, [1-¹³C]Propionat, [1-¹³C]Isobutyrat, [1-¹³C]Isobutyrat-N-acetylcysteamin-thioester, [2-¹³C]Valin und L-[S-¹³CH₃]Methionin gefüttert. Dadurch konnte gezeigt werden, dass das Kohlenstoffgrundgerüst des Iromycins aus der Startereinheit Isobutyrat, drei Acetat- und drei Propionateinheiten aufgebaut wird. Die Startereinheit Isobutyrat entsteht biosynthetisch durch Transaminierung und Decarboxylierung aus Valin, was auch für andere Polyketide bewiesen werden konnte.^[104]

Dagegen werden Iromycin C (61) und D (62) offensichtlich mit Propionat als Startereinheit aufgebaut, was für eine geringe Substratspezifität des enzymatischen "Loadingmoduls" spricht. Dieser Austausch einer verzweigten Startereinheit durch eine unverzweigte ist relativ ungewöhnlich. Normalerweise werden verzweigte Einheiten gegeneinander ausgetauscht, wie zum Beispiel im Falle des Avermectins die Verwendung von Isobutyrat oder α -Methylbutyrat als Starter.^[105]

Frage der Biosynthese der C₃-Seitenkette

Die Iromycine sind die ersten Pyridon-Metaboliten, die zwei Alkylseitenketten tragen, was einen ungewöhnlichen Schritt in der Biosynthese erfordert. Wahrscheinlich werden Propionyl-CoA und Acetyl-CoA kondensiert, um einen Propylmalonyl-CoA Vorläufer zu erzeugen, der als Pentanoat (Valerat) Extendereinheit (C-3'/C-2'/C-1'/C-4/C-5) in eine einzelne Polyketidkette eingebaut wird. Bisher wurde ein Pentanoatextender in der Polyketidbiosynthese nur für den Immunsuppressor FK506 (Tacrolimus, 74) bewiesen. Von *Streptomyces hygroscopicus* wird FK520 (75) produziert, das dem FK506 (74) ähnlich ist. FK520 enthält eine Butyrateinheit, allerdings konnten auch Propionat- und Pentanoat-Analoga (76, 77) als Minderkomponenten isoliert werden. Dies zeigt neben der breiten Substratspezifität des Pentanoat-einbauenden Moduls das Vorhandensein des Valeriansäure-Bausteins im Stoffwechsel des Produzenten. Für den Iromycinproduzenten *S. bottropensis* Dra17 sind allerdings bisher keine C-5 Analoga identifiziert worden.



Ein alternativer Biosyntheseweg würde eine Polyketidkette nur aus Propionat und Acetat umfassen. Die C-1'/C-2'/C-3' Alkylkette würde als externe Propionateinheit an C-5 angehängt werden. Diese "2-Ketten-Biosynthese" wird als unwahrscheinlich erachtet, da bei literaturbekannten Polyketiden analoge Hypothesen derartiger Kondensationen bisher nicht zweifelsfrei bewiesen werden konnten. Außerdem sind die Einbauraten dieser Propionateinheit vergleichbar mit den Einbauraten der anderen Propionateinheiten im Iromycin-Kohlenstoffgerüst und es sind bislang keine unsubstituierten Iromycine gefunden worden.

Um die Hypothese des Pentanoat-Einbaus zu prüfen, wurden im Rahmen der Vorläuferdirigierten Biosynthese eine Reihe Valeriansäure-ähnlicher Substanzen zugefüttert. Vorteil dieser Methode sind neben dem Auftreten neuer Produkte die im Vergleich zu ¹³C-markierten Verbindungen wesentlich geringere Kosten. Die Vorläufer-dirigierte Biosynthese beruht auf der oftmals relativ geringen Substratspezifität der Enzyme des Sekundärstoffwechsels und nutzt aus, dass gering modifizierte Substratderivate akzeptiert werden. Die Verbindungen 5-Chlorvaleriansäure (78), trans-2-Hexensäure (79) und 2-Methylbuttersäure sind kommerziell erhältlich und verglichen mit ¹³C-markierter Valeriansäure sehr günstig. Um eine Penetration der Zellwand zu gewährleisten und die potentiellen Vorläufer zu aktivieren, wurden die 5-Chlorvaleriansäure-N-acetylcysteamin-thioester Säuren (80), zu trans-2-Hexensäure-N-acetylcysteaminthioester (81) und 2-Methylbuttersäure-N-acetylcysteamin-thioester (82) derivatisiert. Dazu wurde die von FLOSS et al. entwickelte Methode benutzt.^[106]

Da einerseits eine genügend hohe Precursorkonzentration gewährleistet werden sollte, andererseits aber toxische Effekte durch zu hohe Konzentration zu vermeiden waren, wurden die Verbindungen ab der 24. Stunde der Fermentation über einen Zeitraum von 12 h in einer Konzentration von jeweils 15 mmol/L zugefüttert. Nach Aufarbeitung von Mycelextrakt und Kulturfiltrat und anschließender säulenchromatographischer Trennung an Kieselgel, konnten allerdings mittels HPLC-ESI-MS-Kopplung keine Molmassen der erwarteten Iromycin-Derivate oder ihrer Natriumaddukte nachgewiesen werden.

Um trotz der offensichtlich geringen Akzeptanz der Vorläufer eine Inkorporation zu erreichen, wurde bei 5-Chlorvaleriansäure und 2-Methylbuttersäure der Versuch der Hochkonzentrationsmethode nach R. THIERIKE durchgeführt.^[107] Dazu wurden die Säuren ab der 24. Stunde über einen Zeitraum von 12 h bei einer Konzentration von 25 mmol/L Nährmedium zugefüttert. Wiederum konnten keine neuen Iromycinderivate isoliert werden, es wurden aber **13** und **14** in üblicher Menge gebildet. Es muss daher davon ausgegangen werden, dass die beteiligten Enzyme eine hohe Substratspezifität aufweisen und die Vorläufer-dirigierte Biosynthese nicht zum Erfolg führt (Abb. 21). Evtl. könnte sich 5-Fluorvaleriansäure als Vorläufer eignen, da der Atomradius des Fluors nur unwesentlich größer als der des Wasserstoffatoms ist.^[108]



Abb. 21: Nach Vorläufer-dirigierter Biosynthese von Valeriansäure-ähnlichen Molekülen war kein Auftauchen neuer Iromycinderivate durch Inkorporation der Vorläufer in das Grundgerüst festzustellen.

Um den intakten Einbau eines Pentanoatextenders zu beweisen, ist die Fütterung von [1-¹³C]markierter Valeriansäure geplant. Damit der Katabolismus des ¹³C-markierten Vorläufers zu Acetat und Propionat möglichst gering bleibt, ist die gleichzeitige Zugabe von Acetat und Propionat vorgesehen; das heißt der "metabolische Druck" zugunsten eines intakten Valeriansäurebausteins im Fettstoffwechsel wird erhöht.

Um die Toleranz der an der Biosynthese beteiligten Enzyme im Weiteren zu untersuchen, sollen Buttersäure, Hexansäure und 5-Fluorvaleriansäure zu SNAC-Estern derivatisiert und zugefüttert werden.

1.5.3 Fütterungsexperimente mit ¹⁵N-markierten Vorläufern

Alanin und Phenylalanin stellen den Stickstoff des Pyridonringes bei Kirromycin (65) und Tenellin (66) bzw. den Militarinonen (67) zu Verfügung.^{[100]-[102]} Im Gegensatz dazu ist die Stickstoffquelle bei den Iromycinen noch unklar. Die ¹⁵N-markierten 13 und 14 konnten bei Fütterung von (¹⁵NH₃)₂SO₄, nicht aber bei Fütterung von Na¹⁵NO₃ unter Standard-Fütterungsbedingungen erhalten werden. Der Stickstoffeinbau wurde durch FT-ICR-hochauflösende Massenspektrometrie bestimmt, indem die Isotopenmuster der Ionenpeaks (13: $C_{19}H_{29}^{15}NO_2$, 305 [M+H⁺], 14: $C_{19}H_{29}^{15}NO_3$, 321 [M+H⁺]) analysiert wurden. Das ¹⁵N/¹⁴N- Verhältnis konnte direkt in einer Messung neben dem ¹³C/¹²C-Verhältnis bestimmt werden; es liegt bei ca. 25% ¹⁵N-Anreicherung in 13 und 14. Das ¹³C-NMR-Spektrum bestätigte den ¹⁵N-Einbau durch einen Hochfeld-Shift der Signale von C-2 und C-6 (Abb. 22).



Abb. 22: Nachweis des Stickstoffeinbaus in **13** durch HR-ESI-MS (links) und ¹³C-NMR (rechts, 600 MHz, CD₃OD).

Daher kann davon ausgegangen werden, dass Stickstoff aus dem NH_4^+ -Pool oder einem direkten Abkömmling wie Glutamin in die Iromycine (**13**, **14**, **61-64**) eingefügt wird, zum Beispiel über die Transaminierung der C-6 Carbonylgruppe.

Ein Einbau von markiertem Stickstoff nach Fütterung von Na¹⁵NO₃ wurde dagegen nicht festgestellt, wodurch eine direkte Inkorporation von Nitrat ausgeschlossen werden kann. Nitrat kann von diversen Bakterien unter Stickstoffmangel-Bedingungen zu Ammonium reduziert werden, eine Umwandlung ist unter den gewählten Fütterungsbedingungen allerdings nicht beobachtet worden, was an einer ausreichenden Menge an Stickstoffquellen im Nährmedium liegen dürfte.

1.6 Diskussion

Durch Fütterungsexperimente mit ¹³C-markierten Verbindungen konnte die Biogenese aller Bausteine des Iromycins (**13**) aufgeklärt werden (siehe Abb. 23).



Abb. 23: Beobachtetes Markierungsmuster in **13** bei Fütterungsexperimenten mit [1-¹³C]Acetat, [1,2-¹³C₂]Acetat, [1-¹³C]Propionat, [1-¹³C]Isobutyrat und [2-¹³C]Valin.

Es handelt sich aller Wahrscheinlichkeit nach um ein Polyketid, das durch eine Polyketidsynthase des Typ I (PKS1) aufgebaut wird.^[109]

Allerdings ist es zur Klärung der Biosynthese der Propionat-Seitenkette wünschenswert, weitergehende Untersuchungen durchzuführen. Die wachsende Kette könnte einerseits mit einem sehr seltenen Pentanoat-Extender verlängert werden, wie er bisher nur in der Biosynthese des Polyketides FK506 (74) beobachtet wurde.^[110] Im Falle des FK 506 (74) konnte auch das entsprechende Modul der Polyketidsynthase I untersucht werden; es handelt sich um eine Acetyltransferase mit Propionatmotiv (siehe Kapitel III.2.3). Daher wurde angenommen, dass andere Anteile des Enzyms für die Spezifität der Propylmalonyl-Einheit sorgen.^[111]

Eine Erklärung für die entsprechenden Markierungen der Acetat- bzw. Propionatbausteine in den Fütterungsexperimenten könnte die Bildung des Valerat-Bausteins durch eine Fettsäuresynthase aus Acetat und Propionat sein. Der Aufbau von Fettsäuren mit ungerader Kohlenstoffanzahl aus Propionat- und Acetateinheiten ist sowohl für Eukaryonten als auch für Prokaryoten bewiesen worden.^[112] Dabei handelt es sich evtl. um einen ubiquitär verbreiteten Enzymapparat.

Ein Anhaltspunkt für diese Hypothese ist, dass geringe Mengen von Dihydro-FK506 (77), dem C-21-Propylanalogon von 74, von dem FK520-Produzenten *S. hygroscopicus* var. *ascomyceticus* produziert werden.^[111] Dies legt sowohl eine gewisse Verbreitung der Valeriansäurebiosynthese als auch eine erweiterte Substratspezifität der Butyrat-spezifischen Acetyltransferase-Domäne nahe.

Denkbar ist allerdings auch ein Zweikettenmechanismus, bei dem ein zusätzlicher Propionatbaustein an die Hauptkette angehängt wird. Ein Enzym, welches eine derartige Reaktion katalysiert, ist bislang allerdings nicht bekannt.

Ein von O. WAGNER postulierter Vorschlag, dass zwei etwa gleich lange Ketten kondensiert werden, erscheint bei der Vielzahl an ähnlichen Polyketiden (siehe Kapitel III.1.5.1) unwahrscheinlich, da die strukturell ähnlichen Metaboliten (**68-73**) höchstwahrscheinlich über eine modular ablaufende Biosynthese aus einer einzelnen Kette aufgebaut werden.

Weiterhin ist der eigentliche Stickstoffvorläufer unklar; Ammonium wird durch Transaminierungsreaktionen in alle Aminosäuren übertragen. Für Oxytetracyclin^[113] und Lysolipin^[114] konnte der Einbau einer intakten Malonamid-Einheit gezeigt werden. Auch wenn bei den Iromycinen nicht die Startereinheit, sondern die letzte Extendereinheit die Amidgruppe trägt, könnte der Stickstoffeinbau durch ein Amid-bildendes Enzym ablaufen.

Da Doppelbindungen primär zwischen zwei Extendereinheiten ausgebildet werden, ist die Lage der Doppelbindung zwischen C-2^{''} und C-3^{''} in der Seitenkette ungewöhnlich. Diese Doppelbindung in der Seitenkette scheint für die biologische Aktivität essentiell zu sein (siehe Kapitel III.5.6). Dies wird durch die strukturelle und biosynthetische Verwandtschaft der Polyketide (**68-73**) deutlich, welche alle diese ungewöhnliche Doppelbindung als Strukturmerkmal tragen. Der Rest der Seitenkette sowie der Heterozyklus weisen dagegen eine große Diversität auf. Für die Biosynthese wäre an dieser Stelle eine vollständige Reduktion durch die Polyketid-Synthase und erst spätere Dehydrierung durch eine Oxidase denkbar, wie sie für ungesättigte Fettsäuren typisch ist. Eine analoge Oxidation ist für FK506 (**74**) auf genetischer Ebene belegt^[110] und auch für Gilvocarcin V gezeigt worden.^[115]

Noch sind einige Fragen zur Biosynthese zu klären. Hierzu gehören die Lage der Doppelbindungen in der Seitenkette, der Stickstoffeinbau in den Heterocyclus und der Aufbau der zweiten Seitenkette. Zur Klärung dieser Fragestellungen sollte die Analyse der Gene des Biosynthesegenclusters Aufschluss geben.

2. Molekulargenetische Untersuchungen an S. bottropensis Dra17

2.1 Hypothese zum Biosynthese-Gencluster des Iromycins

Im Folgenden wird auf Grundlage bisheriger Ergebnisse eine tragfähige Hypothese zur Biosynthese von Iromycin A (13) formuliert, die von einer Polyketidsynthase I zum Aufbau eines Hexaketids aus einem Isobutyrat-Starter, zwei Acetat-, zwei Propionat- und einem Pentanoat-Extender (Abb. 24) und anschließenden postPKS-Funktionalisierungen ausgeht.



Abb. 24: Biosynthese-Hypothese zur Organisation des Iromycin-Biosynthese-Genclusters mit Bildung eines Pro-Iromycins durch eine PKS I.

Zunächst wird die an einen CoA-Rest gebundene Isobuttersäure durch die Acyltransferase (AT) auf das Acyl-Carrier-Protein (ACP) "geladen". Eine Alternative wäre, dass eine CO₂-Abspaltung der α -Ketosäure diese Energie bereitstellt. Die folgende Acetyltransferase (AT) verbindet Malonyl-CoA mit dem Enzymkomplex und die Ketosynthase (KS) katalysiert unter CO₂-Abspaltung die decarboxylative Kondensation der Einheiten. Anschließend wird die Doppelbindung mittels einer Ketoreduktase (KR) und nachfolgender Dehydratase (DH) eingeführt (Modul 2). Eine Propionateinheit wird anschließend als MethylmalonylCoA inkorporiert und durch KR und DH sowie durch eine Enoylreduktase (ER) vollständig

reduziert (Modul 3). Eine Kettenverlängerung wird mit Acetat vorgenommen und die Einheit ebenfalls vollständig reduziert (Modul 4). Auf gleiche Weise wird ein Pentanoat durch Katalyse der AT und KS von Modul 5 eingeführt, bevor ein weiteres Propionat als letzte den Vorläufer eingebaut wird (Modul 6). In Einheit in den beiden letzten Verlängerungsschritten werden keine weiteren Reduktionsschritte durchlaufen. Durch Abspaltung des β - δ -Diketothioesters durch eine Thioesterase wird die Polyketidkette freigesetzt. Der hypothetische Aufbau der die Iromycinbiosynthese katalysierenden PKS-I ist in Abb. 24 dargestellt.

Abschließend wird das Molekül durch post-PKS-Enzyme modifiziert. Durch ein Enzym könnte die endständige Säuregruppe zu einem Amid umgewandelt werden. Durch intramolekulare Kondensation würde der Pyridonring ausgebildet (Abb. 25a). Alternativ wäre es denkbar, dass direkt ein bislang nicht bekannter Methyl-Malonamid-CoA-Baustein als letzte Extendereinheit in die Polyketidkette inkorporiert wird. Weiterhin wäre auch die Transaminierung der Ketogruppe an C-6 mit intramolekularer Kondensation möglich (Abb. 25b).

Außerdem wird in der Seitenkette des Pro-Iromycins in einer Desaturase-ähnlichen Reaktion eine Doppelbindung eingefügt (Abb. 25c). Gene für derartige Oxidationen konnten bereits in den Biosynthesegenclustern von Tacrolimus und Gilvocarcin V analysiert werden.^[115] Alternativ wäre es denkbar, dass das Modul 3 lediglich AT-, KS- und DH-Regionen enthält und die Reduktion auf Stufe der Hydroxygruppe beendet ist. Durch Abspaltung von Wasser in einer Dehydratase-ähnlichen Reaktion entstünde die Doppelbindung (Abb. 25d). Allerdings ist eine derartige Reaktion bisher nicht literaturbekannt.



b) Stickstoffeinbau über zwischenzeitliche Bildung eines Imins


c) Einführung der C-2"-C-3"-Doppelbindung durch Dehydrierung



d) Einführung der C-2"-C-3"-Doppelbindung durch Dehydratisierung

Abb. 25: Alternative Post-PKS-Modifikationen eines hypothetischen Pro-Iromycins.

Um diese Biosynthesehypothese zu beweisen und offene Fragen zur Biosynthese der Iromycine beantworten zu können, ist es notwendig, den Biosynthesegencluster zu identifizieren, zu sequenzieren und biochemisch zu charakterisieren.

2.2 Molekulargenetische Experimente

2.2.1 Kartierung der Cosmidbank des Stammes Dra 17

Um den hypothetischen Aufbau des Biosynthesegenclusters zu untersuchen, wurden im Rahmen der Diplom-^[38] und Doktorarbeit molekulargenetische Arbeiten durchgeführt. Grundlage dieses Ansatzes ist der Hintergrund, dass Gene durch Sonden, die aus bekannten analogen Genen anderer Organismen hergestellt worden sind, lokalisiert werden können. Nach Sequenzierung der DNA ist es in vielen Fällen möglich, den codierenden Genen durch Vergleich mit bekannten Genen eine Funktion zuzuordnen.

Das Ziel ist es daher, das Gencluster der Iromycinbiosynthese zu finden. Dazu wurde der Stamm *Streptomyces bottropensis* Dra17 durch Verdünnungsausstrich vereinzelt und auf weitere Agarplatten überimpft.^[38] Anschließend folgte eine Probekultivierung der vereinzelten Kolonien in 300 mL Schüttelkolben mit Schikanen (4d, 250 U/min, 28 °C), um die Produktion der Iromycine zu überprüfen. Dies war notwendig, um sicherzustellen, dass im nächsten, kostenintensiven Schritt der betreffende Klon auch die gewünschte DNA-Sequenz enthält.

Nach Übersenden einer Kolonie, die Iromycin A (13) und B (14) in guter Ausbeute produziert, wurde von der Firma COMBINATURE eine Cosmidbank angelegt. Dazu wurde das gesamte Genom von *Streptomyces* sp. Dra17 durch partiellen *Bam*HI Verdau statistisch an etwa jeder 10. Schnittstelle geschnitten. Die Bruchstücke wurden dann in das Cosmid pOJ436

ligiert.^[112] Das Cosmid ist 11.1 kbp lang und besitzt außer einer $\Phi C31$ Integration-Site und der für die Erkennung wichtigen *attP*-Site eine *Bam*HI Schnittstelle. Daneben sind im Cosmid noch eine Apramycin-Resistenz, eine ori- sowie eine oriT-Region vorhanden. Diese vermitteln die Replikation des Cosmids in *E. coli* bzw. *Streptomyces*.^[116]

Cosmide, die Streptomyceten-DNA bis zu einer Länge von etwa 35 kb enthalten, wurden durch Elektroporation in kompetente *E. coli* Zellen eingeführt und kultiviert. Nach Isolierung der Plasmid-DNA wurde mittels der Sonde PKS I AT-KS auf PKS-I Gene geprüft, indem die Sonde mit dem AT-KS-Bereich der gesuchten Gene hybridisiert. Die 36 *E. coli* Kulturen, welche die betreffenden PKS I-positiven Cosmide enthalten, bilden die Cosmidbank CB-3745; diese wurde von COMBINATURE an uns weitergegeben.

Die *E. coli* Kulturen wurden wiederum per Verdünnungsausstrich vereinzelt und kultiviert. Nach einer alkalischen Lyse der Zellen konnte die Cosmid-DNA durch eine Mini-Präparation erhalten werden. Anschließend wurde die DNA mit Restriktionsendonuclease *Bam*HI vollständig verdaut, durch Gelelektrophorese aufgetrennt und mit Ethidiumbromid für die fotografische Dokumentation gefärbt. Von dem Agarosegel wurde ein Southern Blot angefertigt. Anschließend sollte die Membran mittels einer spezifischeren Sonde hybridisiert werden. Leider ließ sich aus der Struktur des Iromycin keine entsprechende Sonde ableiten, da keine strukturellen Besonderheiten wie Halogenatome, Aminosäurebausteine oder ähnliches im Molekül vorhanden sind.^[38]

Durch Auswertung des Agarosegels (Abb. 26) konnte die Gesamtlänge der DNA der Cosmidbank zu mindestens 85 kb bestimmt werden. Die Plasmide bilden durch z. T. sehr ähnliche Bandenmuster mehrere Familien. Daher konnte durch die Auswahl von 8 Plasmiden praktisch die gesamte in der Bank CB-3745 enthaltene DNA abgebildet werden. Nach vollständigem *Kpn*I und *Sau*AIII Verdau wurden die Plasmide 1, 2, 9, 14, 23, 27, 28 und 29 ausgewählt.



Abb. 26: Cosmidbank nach *Bam*HI Verdau und Gelelektrophorese. Mit Nummern sind die für die weiteren molekularbiologischen Untersuchungen ausgewählten Cosmide (1, 2, 9, 14, 23, 27, 28, 29) gekennzeichnet.

2.2.2 Überführung der DNA in E. coli ET12567

Zur Auffindung des Iromycingenclusters sollten diese Plasmide heterolog in geeigneten Host-Stämmen exprimiert werden. Besonders geeignet für die heterologe Expression von Polyketid-Genclustern sind *Streptomyces*-Spezies. Eine Methode um Fremd-DNA in Streptomyceten-Zellen einzuführen ist die intergenerische Konjugation mit *E. coli*. In diesem erstmals von MAZODIER et al. beschriebenen Verfahren nutzt man die Möglichkeit eines Transfers von Plasmiden zwischen beiden Spezies.^[117] Da der für die Genbank verwendete *E. coli* nicht mit *Streptomyces* konjugationsfähig ist, mussten die Cosmide zuerst in den konjugationsfähigen Stamm *E. coli* ET12567 überführt werden. Dazu wurde erneut eine Mini-Präparation durchgeführt und die resultierende DNA durch Elektroporation in *E. coli* ET12567 eingeführt. Durch die im Plasmid enthaltene Apramycin-Resistenz wurde der Transformationserfolg sichergestellt. Weiterhin wurden dem Medium Kanamycin und Chloramphenicol zugesetzt, um die Fähigkeit der Konjugation zu erhalten. Der Erfolg der Transformation wurde durch Mini-Präparation, *Bam*HI Verdau und anschließende Gelelektrophorese überprüft.

2.2.3 Konjugation mit Streptomyces lividans K4-114 und S. coelicolor YU105

Zur anschließenden intergenerischen Konjugation wurde der *E. coli* Stamm ET12567, welcher über die Plasmide pUB307 und pOJ436 verfügte,^[112] zusammen mit *Streptomyces lividans* K4-114 bzw. *S. coelicolor* YU105 ausplattiert. Die durch pUB307 für den Vorgang der Konjugation mobilisierten Plasmide pOJ436 tragen ein Apramycin-Resistenzgen, welches zur Selektion der erfolgreich konjugierten Streptomyceten-Kolonien herangezogen wird. Deshalb erfolgte nach etwa 20stündiger Inkubation die Überschichtung mit einer antibiotikahaltigen Pufferlösung. Diese enthielt sowohl Nalidixinsäure, welche selektiv cytotoxisch gegenüber *E. coli* Zellen wirkt, als auch Apramycin. So sollte es nach erneuter Inkubation zu einer Selektion ausschließlich derjenigen Zellen gekommen sein, bei welchen eine Integration des pOJ436-Apramycinresistenzgens ins Bakteriengenom stattgefunden hat. Durch mehrmalige Wiederholung des beschriebenen Ansatzes konnten Klone von *S. lividans* K4-114 erhalten werden, die die Cosmide 1, 2, 9, 14 und 29 tragen bzw. *S. coelicolor* YU105 mit den Cosmiden 1, 2, 9, 14, 23, 27, 28 und 29.

2.2.4 Screening der transformierten Streptomyces-Klone

Um zu überprüfen, ob sich unter den hergestellten Streptomyces-Klonen ein Iromycin-Bildner befindet, wurde ein Screening-Ansatz mit allen transformierten Organismen durchgeführt. Dazu wurden die hergestellten S. lividans- bzw. S. coelicolor-Klone in jeweils 75 mL M2-Medium in Schüttelkolben kultiviert. Kulturfiltrat und Mycel wurden getrennt aufgearbeitet. Leider waren durch DC-Analyse und HPLC-ESI-MS weder im Kulturfiltrat noch im Mycel Iromycin A (13) oder B (14) nachzuweisen. Bei Klon S. lividans K4-114 2c-1b konnte jedoch nach Ansprühen mit Anisaldehyd/Schwefelsäure ein leicht blau anfärbender Metabolit im mittleren Polaritätsbereich detektiert werden, der mit einem Metabolit der Masse 302 u im HPLC-MS-Lauf in Verbindung gebracht wurde. Da vermutet wurde, dass es sich um ein Pro-Iromycin handeln könnte, wurde S. lividans K4-114 2c-1b in größerem Maßstab (10 L) kultiviert. Zuvor wurde bei dem Klon S. lividans K4-114 2c-1b eine Medienoptimierung durchgeführt. Dazu wurde der Klon in SGG-Medium, Medium S, Medium S unter Zusatz von Acetat, Propionat und Valin, Medium M2 und Medium M2 unter Zusatz von Acetat, Propionat und Valin fermentiert. Durch HPLC-DAD-gekoppelte Analyse der Rohextrakte schien die Produktion des interessanten Metaboliten besonders in Medium S unter Zusatz von Acetat, Propionat und Valin ausgeprägt.

2.2.5 Heterologe Expression von Klon Streptomyces lividans 2c-1b

Der Klon *S. lividans* K4-114 2c-1b wurde im Biostat-E-Fermenter in 10 L Medium S unter Zusatz von Acetat, Propionat und Valin kultiviert. Nach Trennung vom Mycel und Kulturfiltrat konnten durch Chromatographie an Kieselgel, Größenchromatographie an Sephadex (Laufmittel: MeOH) und Reverse-Phase-Chromatographie 6.0 mg des mit Anisaldehyd/Schwefelsäure blau anfärbenden Stoffes **83** erhalten werden. Durch ¹H-, ¹³C- und 2D-NMR-Spektroskopie wurden die Strukturfragmente des Glycerins, der Esterfunktion und der Isopropylgruppe identifiziert. Da durch HLPC-ESI-MS die Masse zu 232 u bestimmt wurden, konnte daraus die Länge der Alkylkette ermittelt und die Struktur von **83** abgeleitet werden. Ein Iromycin-Derivat dagegen konnte nicht isoliert werden. Es muss daher davon ausgegangen werden, dass es sich bei dem isolierten Fett **83** um ein Produkt des Primärstoffwechsels handelt und *S. lividans* K4-114 Klon 2c-1b nicht in der Lage ist Iromycin zu bilden.



2.3 Genanalyse des sequenzierten Cosmid 2

Im Rahmen des Projektes wurde das Cosmid 2 von der Firma GATC durch ein Shotgun Verfahren mit einer 10x Coverage vollständig sequenziert.

Die Annotierung der assemblierten Daten erfolgte in Zusammenarbeit mit T. WEBER (Universität Tübingen). Der erste Schritt nach der Sequenzierung des Cosmids 2 war die Identifizierung von codierenden Bereichen auf der DNA. Zu diesem Zweck wurden zunächst mit Hilfe des Programmes *Critica*^[118] offene Leserahmen aufgefunden, welche anschließend mit der Software *Artemis*^[119] manuell überprüft wurden. Den so erhaltenen codierenden Abschnitten konnten durch Sequenzvergleiche mit Hilfe der Software-Pakete *Blast*^[120] und *HMMer*^[121] mögliche Funktionen zugeordnet werden. Zur Identifizierung der Domänen-organisation wurde eine HMM-basierte Suche nach Profilen einer PKS/NRPS-Domänen enthaltenden Datenbank durchgeführt.^[122] Mit diesem Ansatz konnten allen Bereichen der Sequenz mögliche Funktionen zugeordnet werden. Zur Visualisierung und weiteren Bearbeitung der erhaltenen Daten wurde das *Java*-basierte Programm *Artemis* verwendet.

Auf dem DNA-Insert des Cosmids 2 mit einer Länge von 39641 Basenpaaren sind fünf offene Leseraster (ORF) vorhanden, wovon drei offensichtlich PKS-Gene codieren (Abb. 27). Ein offenes Leseraster kodiert wahrscheinlich eine Glycosyl-Transferase (GT), eines ein Protein mit einer unbekannten Funktion. Das Gen unbekannter Funktion besitzt eine gewisse Analogie (44 % Identität, 54 % Ähnlichkeit) zu Nucleosid-Phosphorylasen.

Die drei PKS-ORFs (A, B und C) enthalten jeweils drei Module, allerdings ist nur der mittlere ORF vollständig auf dem Cosmid 2 enthalten und damit vollständig sequenziert. Trotzdem lassen sich durch die Abfolge der Module Hypothesen über das erwartete PKS-Produkt ableiten.



Abb. 27: Organisation der auf Cosmid 2 vorhandenen Gene. Unterhalb der Angabe der Basenpaare sind ORFs der drei möglichen Leseraster dargestellt. Auf dem Cosmid sind drei PKS-ORFs (A, B und C) und je ein ORF für eine Glycosyl-Transferase (glc-synth) und ein Protein unbekannter Funktion (hyp) enthalten.

Die phylogenetische Analyse von AT-Domänen erbringt erste Hinweise auf deren Substratspezifität. Da Malonyl-CoA-, Methylmalonyl-CoA- sowie Methoxymalonyl-CoAübertragende Domänen jeweils eine eigenständige Gruppe bilden, kann durch Sequenzvergleich mit den AT-Regionen anderer Polyketide auf das jeweilige Substrat geschlossen werden (Abb. 28).^{[123],[124]}

Die Divergenz der Substratmotive zeigt sich in einem relativ kleinen Abschnitt von etwa 20 Aminosäuren, während der *N*-terminale katalytische Serin-Rest in der konservierten Sequenz GXSXG in allen Acetyltransferasen vorkommt. Das sequenztypische Motiv für AT- Domänen, die Propionat-Extender inkorporieren, ist RVDVV-7-M-1-S-1-AXhW, wobei h eine aliphatische und hydrophobe Aminosäure und X Arg, Ser, Ala oder Glu repräsentieren. In AT-Regionen, die Acetat übertragen, hat derselbe Abschnitt aus 20 Aminosäuren die konservierte Sequenz ETGYA-7-Q-1-A-1-FGLL.^[125]

Daher lässt sich das in Abb. 29 abgebildete Produkt (84) der Polyketidsynthase ableiten.



Abb. 28: Zuordnung der Malonyl- bzw. Methylmalonyl- transferierenden AT-Regionen der PKS des Cosmids.



Abb. 29: Schematische Darstellung der Organisation des sequenzierten Cluster-Fragments und resultierendes hypothetisches Polyketidfragment (84).

Das erhaltene Muster passt nicht zu dem zu erwartenden Muster für die Iromycin-Biosynthese, wonach auf eine Startereinheit ein Acetat-, Propionat-, Acetat-, Pentanoat- und Propionatextender folgen sollte. Man muss daher davon ausgehen, dass das sequenzierte Cosmid keine Gene für die Iromycin-Biosynthese trägt. Dies zeigt aber auch, dass der Stamm *Streptomyces bottropensis* Dra17 außer zu der Biosynthese der Sekundärmetaboliten-Familien der Thaxtomine und der Iromycine offenbar noch zu der Biosynthese eines weiteren bislang nicht identifizierten Naturstoffs fähig ist. Eine Datenbanksuche nach dem hypothetischen Molekülfragment (**84**) lieferte große Ähnlichkeit zur Familie der Rifamycine (**85**) (siehe Abb. 30).^[126]

Im sequenzierten Teil des Biosyntheseclusters ist eine Glukosyltransferase enthalten. Die Unterbrechung der PKS-Gene in Biosynthesegenclustern durch ein anderes Enzym ist nicht ungewöhnlich.



Abb. 30: Biosynthese von Rifamycin B (**85**) durch eine Polyketidsynthase. Der grün gekennzeichnete Molekülteil ähnelt stark dem Polyketidfragment **84**, das aus der Organisation der Gene auf Cosmid 2 abgeleitet wurde. Lediglich die Lage einer Methylgruppe (rot) stimmt nicht mit der abgeleiteten Partialstruktur überein.

Die Suche nach dem Expressionsprodukt zu einer bekannten Gensequenz, "Genome mining" genannt, erscheint hier sehr viel versprechend.^[127] Die Idee könnte in einer neuen Arbeit weiter verfolgt werden.

Allerdings lassen sich Biosyntheseprodukte nicht eindeutig aus Gensequenzen ableiten, da es auch bei der Biosynthese von Polyketiden des Typ I sowohl zu einem Überspringen vorhandener Domänen als auch der iterativen Verwendung einzelner Module kommen kann.^[128] Daher sollen die Anschluss-Cosmide sequenziert werden, um den gesamten Gencluster für molekularbiologische Untersuchungen zugänglich zu machen. Denkbar ist, dass es sich bei dem Expressionsprodukt um den bisher nicht identifizierten Naturstoff mit der Masse 819 u handelt (siehe Kapitel III.4.7.1).

Von Interesse ist weiterhin, ob *S. bottropensis* Dra17 auch andere Gene der sogenannten "pathogenen Insel" (siehe Kapitel III.4.5) besitzt. Dazu könnte eine Hybridisierung der genomischen DNA mit entsprechenden Sonden Aufschluss geben.

2.4 Genomsequenzierung von Streptomyces scabies 87.22

Das gesamte Genom des Stammes *Streptomyces scabies* 87.22 ist vom Sanger Institut sequenziert worden.^[129] Der Stamm ist ein wichtiges Pathogen, welches durch die Bildung von Thaxtomin A (**59**) die Phytokrankheit Kartoffelschorf mit vielen Millionen Dollar Schaden weltweit verursacht (siehe Kapitel III.4.2). Da die Produktion des Phytotoxins Thaxtomin A (**59**) in *Streptomyces bottropensis* Dra17 offenbar durch Iromycin A (**13**) reguliert wird (siehe Kapitel III.4.7), könnte der Thaxtomin-bildende Stamm *Streptomyces scabies* 87.22 auch die Iromycin-Gene enthalten.

Das Genom hat eine Länge von insgesamt 10.148.695 Basenpaaren mit einem GC-Gehalt von 71,45 %. Bis jetzt sind zunächst nur nicht annotierte Rohdaten veröffentlicht worden.

Daher wurden von T. WEBER im oben beschrieben Verfahren die PKS-Gene annotiert. Auf dem Genom ist nur ein größerer PKS I Biosynthese-Gencluster mit 14 Modulen vorhanden. Domänenanzahl und Organisation stimmen exakt mit dem Prof. LEADLAY beschriebenen Concanamycin-Gencluster überein (siehe Abb. 31).^[124]



Abb. 31: Organisation der Concanamycin Polyketid-Synthase-Gene; Abb. aus Ref. [124].

Daneben ist außer vereinzelten Polyketidgenen wie AT- oder KS-Regionen nur ein kleinerer Polyketid-Cluster vorhanden. Die Organisation der Gene ist in Abb. 32 gezeigt. Die Organisation des Clusters stimmt nicht mit der aus der Iromycin-Struktur vorhergesagten Abfolge der Module überein.



Abb. 32: Organisation des Genclusters unbekannter Funktion im Genom von Streptomyces scabies 87.22

Weiterhin sind einige Gene mit unbekannter Funktion vorhanden. Nach der bisherigen Analyse des Genoms scheint *Streptomyces scabies* 87.22 nicht in der Lage zu sein, Iromycin (13) zu bilden.

2.5 Weitere Schritte zur Auffindung des Iromycin-Genclusters

Da die heterologe Expression von acht ausgewählten Plasmid-tragenden *E. coli* Klonen nicht erfolgreich verlief, erscheint dieser Ansatz nicht Erfolg versprechend zu sein. Eine Suche mit einer spezifischeren Sonde ist nicht möglich, da im Iromycin keine strukturellen Besonderheiten wie z.B. Halogenatome vorhanden sind, aus denen sich entsprechende Sonden ableiten ließen.

Lösung dieser Problematik könnte die Herstellung von Insertionsmutanten mit sogenannten "Suicidevektoren" sein. Durch Screening nach Iromycin-Mangelmutanten ließe sich dann durch PCR der Gencluster sequenzieren. Vorraussetzung für diesen Ansatz ist allerdings die Transformierbarkeit des Wildstammes *Streptomyces bottropensis* Dra17. Deshalb wurden von der Arbeitsgruppe WEBER (Universität Tübingen) Transformationsversuche an *Streptomyces bottropensis* Dra17 durchgeführt. Es wurde ein Single-crossover erhalten, jedoch konnte bislang kein Double-crossover erreicht werden. Dieser ist Vorraussetzung für die Sequenzierung der DNA. Sollte sich auch in anderen Versuchen der Stamm als nicht transformierbar erweisen, so wäre die heterologe Expression einer BAC-Bank mit längerer Insert-DNA eine viel versprechende, wenn auch teure Alternative.

3. Oxidativer Abbau der Iromycine

3.1 Vergleich der biologischen Aktivität der Iromycine

Neben Iromycin A (13) ist Iromycin C (61) ein Inhibitor der NO-Synthase, während Iromycin B (14) nur eine sehr geringe Aktivität aufweist (siehe Kapitel III.6.6).

Weiterhin hemmen **13** und **61** im Plattendiffusionstest die Testkeime *B. subtilis* und *S. aureus*, wogegen für die anderen Iromycine (**14**, **62-64**) keine biologische Aktivität festgestellt werden konnte (siehe Kapitel III.5.8).

Es wurde daher vermutet, dass es sich bei der Umwandlung von 13 in 14, 63 bzw. 64 und 61 in 62 um die ersten Schritte einer katabolischen Abbausequenz handeln könnte. Derartige Reaktionen werden von Cytochrome P450-Enzymen katalysiert.

3.2 P450-Oxidoreduktasen in Eukaryoten

In Eukaryonten sind Cytochrom P450-Oxidoreduktasen z. B. neben der Steroid-Biosynthese an biodegenerativen Prozessen beteiligt; diese Rolle ist von besonderem Interesse, da die meisten Xenobiotika, einschließlich Pharmazeutika, auf diese Weise verstoffwechselt werden. Durch Oxidation dieser zum Teil toxischen Substanzen wird die Ausscheidung ermöglicht. Gelegentlich werden Xenobiotika aber auch in reaktive Metaboliten mit schädlichen Nebenwirkungen verwandelt. So resultiert beispielsweise im Falle des Paracetamols durch die Oxidation der toxische Metabolit *N*-Acetyl-*para*-benzochinon.^[130]

Auch Pflanzen schleusen fremde Substanzen über oxidativen Abbau und anschließende Bindung von Zuckern aus. Das wirtsspezifische Toxin Destruxin B (**86**), das von dem pathogenen Pilz *Alternaria brassicae* produziert wird, verursacht die Blattfleckenkrankheit. Die Blattfleckenkrankheit ist eine der am meisten Schaden anrichtenden und am weitesten verbreiteten Pilzkrankheiten bei Raps und Senf. Während keine resistenten *Brassica* sp. bekannt sind, wird **86** von resistenten *Cruciferae*-Spezies durch eine Hydroxylierung des aktivierten Isopropylrestes zum Hydroxydestruxin B (**87**) und anschließende Umwandlung zum Hydroxydestruxin B-β-D-glucopyranosid (**88**) entgiftet (Abb. 33).^[131]



Abb. 33: Wirtsspezifischer Destruxin B (86)-Metabolismus von *Cruciferae* sp. (a) Hydroxylierung; (b) Glycosylierung^[131]

3.3 P450-Oxidoreduktasen in Prokaryoten

Cytochrom P450-Oxidoreduktasen als oxidative Hämoproteine sind auch in Mikroorganismen weit verbreitet. Die Anzahl an CYP-Genen im Genom bisher sequenzierter Mikroorganismen liegt zwischen null (*E. coli, Salmonella typhimurium*) und 40 (*Mycobacterium smegmatis*). In den Genomen der saprophytischen Actinomyceten *S. coelicolor* und *S. avermitilis* wurden 18 bzw. 33 CYP-codierende Genabschnitte gefunden.^[132]

Die Enzyme katalysieren Reaktionstypen wie die aliphatische Hydroxylierug, Alken-Epoxidierung, aromatische Hydroxylierung, oxidative Phenolkupplung, Heteroatom-Oxidierung, Dealkylierung und verschiedene Oxidationen wie C-C-Bindungspaltungen.^[133] Diese sind Teil sowohl biosynthetischer wie auch biodegenerativer Prozesse.

Biosynthese

In der späten Biosynthese der Makrolactam-Antibiotika spielen Enzyme, die zu der CYP Superfamilie gehören, eine entscheidende Rolle. Die stereo- und regiospezifischen Reaktionen laufen erst nach Bildung des Grundgerüstes durch Polyketidsynthasen ab. Der Einfluss der resultierenden Hydroxy- und/oder Epoxidsubstituenten zeigt sich häufig durch eine starke Zunahme der biologischen Aktivität der Metaboliten nach CYP Biotransformationen. In der Biosynthese der Erythromycin Antibiotika wird 6-Desoxyerythronolid B (89) in Saccharopolyspora durch das Enzym CYP107A1 in Erythronolid B (90) umgewandelt (Abb. 34).^[134]



Abb. 34: Der von CYP107A1 (*eryF*) katalysierte Biosyntheseschritt in der Biosynthese von der Erythromycin.^[134]

Biodegenerative Transformationen

Daneben katalysieren P450-Oxidoreduktasen biodegenerative Transformationen, die oft eine katabole Reaktionskaskade in Gang setzen. Dies erlaubt den Mikroorganismen ungewöhnliche Metaboliten als Kohlenstoff- oder Energiequelle zu nutzen, wobei die Reaktionen oft hochspezifisch sind. P450_{cam}, das aus *Pseudomonas putida* isoliert wurde, hydroxyliert stereospezifisch (*1R*)-(+)-Campher (**91**) zu 5-exo-Hydroxycampher (**92**) (Abb. 35). Dies erlaubt dem Bakterium, **91** als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle zu benutzen.^[135] Dagegen wird **91** von P450_{camr} aus *Rhodococcus* sp. stereoselektiv in der 6-endo-Position hydroxyliert (Abb. 35), was ebenfalls den Abbau des Moleküls einleitet.^[136]



Abb. 35: Hydroxylierung von Campher (97) durch P450_{cam} und P450_{cam}.^{[135],[136]}

3.4 Einsatz von Enzyminhibitoren

Durch Zusatz von Enzyminhibitoren lassen sich Oxidations-Schritte des Metabolismus natürlicher Sekundärmetabolite blockieren. Dies kann dazu genutzt werden, um "shunt"-Produkte zu akkumulieren und so Hinweise über den genauen Biosyntheseablauf zu erhalten.

Daneben ist es aber auch möglich, einen potentiellen oxidativen Abbau von Sekundärmetaboliten zu unterbinden.

Die Inhibierung der P₄₅₀-abhängigen Monooxygenasen ist mit Hilfe von Verbindungen wie Ancymidol (94),^[137] Metyrapon (95)^[138] oder Tetcyclacis (96)^[139] möglich.



3.5 Fütterungsexperiment mit Streptomyces bottropensis Dra 17

Um eine Inhibition der P450-Enzyme zu erreichen, wurde ein Fütterungsexperiment mit Ancymidol (94) durchgeführt. Dazu wurde der Stamm Dra17 in 300 mL Schüttelkolben mit Schikanen kultiviert, die mit 100 mL Medium S (gutes Medium für Iromycin-Produktion) gefüllt waren. Angeimpft wurde mit 5 % einer 48 h alten Vorkultur in SGG-Medium; nach 20 h wurden 3 mg bzw. 30 mg 94 in einer Portion zugegeben. Zum Vergleich wurde ein weiterer Kolben ohne Zugabe des Inhibitors als Referenz kultiviert. Nach 72 h wurden die Fermentationsbrühen lyophilisiert; nach einer Extraktion mit Methanol wurde das Metaboliten-Spektrum durch HPLC-DAD-MS-Kopplung analysiert. Die Analyse des Rohextraktes ergab, dass die Konzentration von Iromycin B (14) durch Zugabe von 94 abnimmt, während die Konzentration von 13 im Vergleich stark ansteigt. Durch die Akkumulation von 13 wird das Verhältnis von 13 zu 14 von 0.4 auf über 10 verschoben (siehe Abb. 36, Tabelle 3).

Durch HPLC-DAD-Analyse von Proben mit bekannter Konzentration der Iromycine (13, 14) als Referenz konnte durch Vergleich der Integrale auf die Produktionsausbeute der Iromycine (13, 14) geschlossen werden (Tabelle 3).

Fütterung 94 [mg/L]	Produktion 13 [mg/L]	Produktion 14 [mg/L]	Verhältnis 13/14
0	1.3	3.2	0.4
30	3.6	2.6	1.4
300	21	2.0	>10

Tabelle 3: Produktion von 13 and 14 in Gegenwart von Ancymidol (94).



Abb. 36: HPLC-Chromatogramme der Extrakte des Ancymidol Fütterungs-Experiments. Zur Auswertung wurde das Integral der Peaks von 13 und 14 bei der charakteristischen Wellenlänge zwischen 287.5 und 288.5 nm bestimmt.

Der Versuch beweist, dass Iromycin A (13) vom eigenen Produzentenstamm *Streptomyces* sp. Dra 17 durch eine P450-Monooxygenase abgebaut wird, unter anderem zu Iromycin B (14). Dieser Abbau kann durch Fütterung eines P450-Inhibitors deutlich verringert werden, wodurch 13 akkumuliert.

Die Iromycine D-F (62-64) waren nur im Rohextrakt des Referenzkolbens (keine Ancymidol-Zugabe) nachzuweisen. In diesem Kolben wurden neben den bekannten Vertretern der Iromycinfamilie (13, 14, 62-64) noch weitere bislang nicht identifizierte IromycinMetaboliten aufgefunden. Diese haben ein ähnliches UV-Spektrum wie **13**, **14**, **61-64** und Massen von 319 bzw. 335. Die Masse 335 stellt vermutlich ein doppelt oxidiertes Iromycin-Derivat dar. Offensichtlich wird **13** zu weiteren bislang nicht isolierten Derivaten abgebaut, und **13** bzw. **14**, **61-64** können nach der erstmaligen Oxidation einen weiteren Oxidationsschritt durchlaufen.

3.6 Regioselektivität der Monooxygenierung

Interessant ist die Diversität der entstehenden Produkte, da **13** in verschiedenen Positionen oxygeniert wird. Es herrscht zwar eine gewisse Präferenz für die Isopropylgruppe der Seitenkette vor, aber auch andere Positionen werden oxygeniert. Das Enzym oder die Enzyme sind dabei in der Lage, sowohl eine aliphatische Hydroxylierung zu katalysieren als auch Doppelbindungen zu epoxidieren. In Abb. 37a und 37b sind die hypothetischen Reaktionsmechanismen zur Umwandlung von **13** in **14** bzw. **64** dargestellt. **63** entsteht analog aus **13** durch Oxygenierung der Doppelbindung zwischen C-4 und C-5.



Abb. 37a. Hypothetischer Reaktionsmechanismus zur Umwandlung von 13 in 14.



Abb. 37b. Hypothetischer Reaktionsmechanismus zur Umwandlung von 13 in 64.

3.7 Diskussion der Ergebnisse

Durch ein Fütterungsexperiment mit Ancymidol (94) konnte bewisesen werden, dass *Streptomyces bottropensis* Dra17 den bioaktiven Metabolit Iromycin A (13) durch Oxygenierung in den deutlich weniger aktive Metaboliten Iromycin B (13) umwandelt und entsprechend auch Iromycin E und F (63, 64) entstehen sollten. Iromycin C (61) wird demnach analog zu Iromycin D (62) abgebaut.

Wenn die ursprüngliche Wirkung von Iromycin A (13) die Inhibition der Biosynthese des Phytotoxins Thaxtomin A (59) ist (siehe Kapitel III.4.7), so bedeutet eine Oxygenierung von 13 und Bildung des nicht bioaktiven 14 eine Modulation der Menge von 59. Durch den gezeigten katalytischen, oxidativen Abbauschritt reguliert der Stamm *S. bottropensis* Dra17 offensichtlich die Menge an biologisch aktivem Iromycin A (13).

Der beobachtete Abbau eines Sekundärmetaboliten durch den eigenen Produzentenstamm ist bislang in der Literatur nicht beschrieben worden. Neben der Biosynthese von Naturstoffen und dem Erschließen von Nährstoffquellen ist damit der gesteuerte Abbau eines Metaboliten durch den produzierenden Mikroorganismus ein bisher unentdecktes Einsatzgebiet der P450-Enzyme bei Bakterien.

4. Produktion von Phytotoxinen durch S. bottropensis Dra17

4.1 *Streptomyces* als Phytopathogen^[140]

Die Umweltbedingungen auf der Rhizodermis sind für bakterielles Wachstum und Überleben sehr viel günstiger als auf der Blattoberfläche, wo Feuchtigkeits- und Temperaturbedingungen großen Schwankungen unterworfen sind. Trotzdem sind nur relativ wenige Bakterien als Verursacher von Wurzelkrankheiten bekannt, während eine große Anzahl von *Pseudomonas-*, *Erwinia-* und *Xanthomonas-*Spezies als Pathogen von Blattwerk und Stammgewebe bekannt ist. *Clavibacter michiganensis* und *Ralstonia solanacearum* können zwar über Wurzelwunden in Pflanzen eindringen, sind aber in erster Linie Pathogene des Gefäßsystemes. *Erwinia carotovora* attackiert Wurzelfrüchte, ist aber hauptsächlich ein Lagerpathogen. Allerdings gibt es eine wachsende Liste an *Streptomyces-*Spezies, die sehr erfolgreiche Pathogene der Wurzeln und anderer Untergrundstrukturen von Pflanzen sind.

Wirt-Pathogen-Interaktionen sind generell komplex und fein reguliert. Pflanzliche Zellen haben die Fähigkeit, Mikroben durch diverse Moleküle wie Glykoproteine, Oligosaccharide und Peptide wahrzunehmen und reagieren auf verschiedenste Weise auf deren Anwesenheit. Es herrscht ein regelrechter molekularer "cross-talk" zwischen den Pflanzenwurzeln und den Bakterien der Rhizosphäre. Allerdings führen diese Interaktionen nur in den seltensten Fällen zu einer Erkrankung der Pflanze.

Die meisten der phytopathogenen Bakterien dringen durch natürliche Öffnungen oder Wunden in Pflanzen ein. Als Eintrittsstellen in die Wurzeln sind hauptsächlich Rupturen der Epidermis zu nennen. Obwohl auch unterirdische Strukturen Lentizellen besitzen, ist die Dichte viel geringer als auf Blättern. Daher scheint die geringere Zahl an möglichen Infektionsstellen der Wurzeln die bakteriellen Infektionen zu begrenzen und damit auch die ökonomische Bedeutung derartiger Krankheiten.

Im Gegensatz zu anderen Bakterien können phytopathogene Streptomyceten intakte Pflanzenzellen durchdringen. Diese Fähigkeit scheint zumindest zum Teil zu erklären, warum Streptomyceten im Gegensatz zu nicht-filamentösen Bakterien erfolgreiche Pathogene der Wurzeln sind.

4.2 Durch Streptomyceten verursachte Phytokrankheiten

Im Folgenden werden die wichtigsten und am besten erforschten der durch *Streptomyces* sp. verursachten Phytokrankheiten kurz vorgestellt:

4.2.1 Kartoffelschorf (engl.: Common Scab)

Die wichtigste von *Streptomyces* verursachte Pflanzenkrankheit ist der Kartoffelschorf mit weltweiter ökonomischer Bedeutung. Auch Radieschen, Karotten, Rüben, Erdnüsse und anderen Pfahlwurzler können durch Befall dieses Pathogenens erkranken. Wahrscheinlich umfasst der Wirtsbereich sogar alle höheren Pflanzen.^[141]

Auf Saatlingen führt Hypertrophie zu Gewebsverdickungen.^[142] Auf reifen Früchten bilden sich Nekrosen auf den befallenen Strukturen aus (siehe Abb. 38).



Abb. 38: Frühes bzw. spätes Stadium des Kartoffelschorfs.

Der Verursacher des Kartoffelschorfs wurde bereits 1891 isoliert und als *Oospor*a sp. klassifiziert. Später wurde er als *Actinomyces* und dann als *Streptomyces* eingeordnet.^[143]

Die Bakterien bilden eine homogene Gruppe, die durch glatte, graue Sporen mit spiralförmigen Ketten charakterisiert sind, Melanin produzieren und alle ISP (International Streptomyces Project)-Zucker verwenden können.

Aufgrund von 16S rDNA-Untersuchungen wurde *Streptomyces scabies* in die Spezies *S. scabies*, *S. turgiscabies*, *S. europaeiscabiei*, *S. stelliscabiei*, *S. luridiscabiei*, *S. puniciscabiei* und *S. niveiscabiei* unterteilt.

4.2.2 Flachschorf (engl. Acid Scab)

Diese Krankheit wurde 1953 in Maine zum ersten Mal beobachtet. Die physiologischen Veränderungen gleichen dem Kartoffelschorf. Darüber hinaus kann diese Krankheit auch auf Böden unterhalb von pH 5.2 bis hinunter zu pH 4.5 auftreten.

Der verursachende Organismus unterscheidet sich vom Verursacher des Kartoffelschorfs in Phänotyp und ökologischen Eigenschaften und wurde daher als neue Spezies *Streptomyces acidiscabies* klassifiziert. In Kultur unterscheidet er sich von *S. scabies* durch eine gewundene Sporenmorphologie, einer Sporenfarbe, die abhängig vom Medium von weiß bis violett reicht, ein rotes bzw. gelbes pH-sensitives Pigment und fehlende Melanin-Bildung. Das Pathogen wächst unter Laborbedingungen bei pH = 4 (*S. scabies* bis pH = 5), verwendet keine Raffinose als Kohlenstoffquelle und toleriert höhere Konzentrationen von Thalliumacetat, Streptomycin, Oleandomycin und Penicillin G. Die Sequenzsimilarität zu *S. scabies* beträgt lediglich 64 %.

4.2.3 Bodenfäule (engl.: Soil rot)

Die Bodenfäule der Süßkartoffel wird von *Streptomyces ipomoeae* verursacht. Die Spezies wurde 1940 isoliert, nutzt die meisten ISP-Zucker, aber verwendet keine Galakturonsäure. Sie produziert glatte, blaue Sporen mit offenen Schleifen, Spiralen oder kugelförmigen Strukturen. Das Pathogen infiziert sowohl faserförmige Wurzeln als auch frische Depotwurzeln der Süßkartoffel und ist in der Lage, direkt durch faserförmige Wurzeln zu penetrieren.^[144]

Die Sequenzsimilarität zwischen S. scabies und S. ipomoeae beträgt nur 15-27%.^[145]

4.2.4 <u>Rotbrauner Schorf (engl.: Russet Scab; jpn.: Kamenoko-byo)</u>

Die Infektion Rotbrauner Schorf wird seit Anfang des 20. Jahrhunderts in Europa und Amerika beobachtet. Diese Krankheit wird durch korkartige Runzeln auf der Knollenoberfläche charakterisiert. Die Infektion ist generell auf die Schale beschränkt, was allerdings die Qualität der Ernte herabsetzt. Im Gegensatz zum Kartoffelschorf nimmt das Auftreten dieser Form auf den meisten Böden zu. Das verursachende Bakterium unterscheidet sich von *S. scabies* durch die Bildung von pigmentiertem Mycel, gewundene Sporenketten und fehlende Melanin-Bildung und von *S. acidiscabies* durch die Sporenfarbe und ausbleibendes Wachstum auf Medien unterhalb von pH 4.5. Über 16S rDNA-Vergleich wurde der verursachende Organismus als neue Spezies identifiziert und *Streptomyces cheloniumii* benannt.^[146]

4.3 Von Streptomyces sp. produzierte Phytotoxine

4.3.1 <u>Thaxtomin A (59)</u>

Die phytopathogenen Spezies *S. scabies*, *S. acidiscabies*, *S. turgidiscabies*, *S. europaeiscabiei*, *S. stelliscabiei* und *S. niveiscabiei* sind literaturbekannte Produzenten des Thaxtomin A (**59**).^[140]

Die Struktur und die biologische Aktivität des Thaxtomin A wurde erstmals von LAWRENCE und KING beschrieben.^[147] **59** wurde ursprünglich aus Geweben infizierter Kartoffeln gewonnen. Später gelang es, **59** auch in Hafermehl-Medium herzustellen, was die Fermentationstechnik erleichterte und Biosyntheseuntersuchungen ermöglichte.^[148] Dadurch konnten auch weitere Mitglieder der Thaxtominfamilie wie Thaxtomin C (**60**) als Minderkomponenten isoliert und deren biologische Aktivität charakterisiert werden.^[149]



KING et al. berichtete bereits früh über eine positive Korrelation zwischen der Phytopathogenität von *S. scabies*-Isolaten und deren Fähigkeit, Thaxtomine zu bilden.^[150] Durch biologische Untersuchungen wurde festgestellt, dass das Toxin und andere Mitglieder der Thaxtomin-Familie Nekrosen auf aus Kartoffelknollen herausgeschnittenen Gewebeteilen hervorruft.^[151]

Die Gemeinsamkeit der Thaxtomin-Produktion vieler pathogener Stämme aus verschiedensten geographischen Regionen und das Fehlen der Produktion bei saprophytischen Spezies unterstützten die Hypothese, dass es sich um den entscheidenden Faktor in der Pathogenität der produzierenden Stämme handelt. Schließlich konnte durch Deletion und Komplimentierung der Thaxtomin-Gene gezeigt werden, dass das Molekül entscheidend für die Pathogenität ist.^[152]

Es wurde vermutet, dass Thaxtomin A (**59**) als Cellulose-Biosynthese-Inhibitor die Zellwandsynthese unterbricht, da nach Inkubation mit **59** die Inkorporation von ¹⁴C-markierter Glucose in die Zellwand der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* stark reduziert ist.^[153] Später wurde abgeleitet, dass die rasche pathogene Veränderung des Aufbaus und der Organisation der Zellwand einen programmierten Zelltod (PCD) auslösen kann. Dieser ist wie die Apoptose durch aktive Genexpression, *de novo*-Proteinsynthese und Fragmentierung der Kern-DNA gekennzeichnet.^[154]

Dagegen wurde von TEGG et al. vermutet, dass Thaxtomin A (**59**) einen Ca²⁺-Einstrom durch Öffnung von Ionenkanälen induziert, der zu einem erhöhten Protonenausstoß und Übersäuerung der Zellen führt. Untersuchungen mit *Arabidopsis thaliana* und Tomaten führten zu der Vermutung, dass **59** durch Einstrom von Ca²⁺ eine Signalkaskade auslöst.^[155]

Da sich die durch Concanamycin A (97) und Thaxtomin A (59) ausgelösten Krankheitssymptoms ähneln wäre es denkbar, dass 59 wie 97 auf die V-ATPase wirkt. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit eine mögliche ATPase-Inhibition durch Kooperation mit Dr. M. HUSS (Universität Osnabrück) untersucht. Die Ergebnisse stehen noch aus. Allerdings wurde in anderen Versuchen keine erhöhte H⁺-ATPase-Aktivität nach Zugabe von 67 beobachtet.^[156]

Bei Öffnung von humanen Ca²⁺-Kanälen würde sich **59** potenziell als Medikament eignen.

Die Wirkung von Thaxtomin A (**59**) scheint sehr spezifisch zu sein, da weder im eigenen Plattendiffusionstest gegen *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* und *Candida albicans* noch in von der Firma BRAIN durchgeführten Plattendiffusionstests gegen *Actinomyces viscosus*, *Streptococcus mutans*, *Propionibacterium acnes*, *Corynebacterium amycolatum*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Candida glabrata* eine biologische Aktivität zu erkennen war. Auch war keine Cytotoxizität gemäß der NCI-Richtlinien gegen die Krebszelllinien HM02 (Magenkarzinom), HepG2 (Leberkarzinom) und MCF7 (Mammakarzinom) festzustellen.^[36]

4.3.2 <u>Thaxtomin C (60)</u>

S. ipomoeae, Verursacher der Bodenfäule, ist Produzent eines anderen Mitgliedes der Thaxtominfamilie, des Thaxtomin C (**60**). Es unterscheidet sich von **59** durch das Fehlen einer *N*-Methyl- und der beiden Hydroxygruppen. **60** wird als Minderkomponente auch von den Produzenten des Thaxtomin A (**59**) gebildet, hat den gleichen Wirkmechanismus, ist jedoch schwächer aktiv.^[157] Als bislang einziges Mitglied der Thaxtomin-Familie konnte es totalsynthetisch hergestellt werden.^[158]



4.3.3 <u>Concanamycin A und B (97, 98)</u>

Von NATSUME et al. wurden aus *S. scabies* phytotoxische Metabolite isoliert, bei denen es sich nicht um Thaxtomine handelt. Sie konnten als Concanamycin A (97) und B (98) identifiziert werden.^[159] 97 und 98 wurden ursprünglich aus *S. diastatochromogenes* als Inhibitoren der Proliferation von Milz-Lymphozyten der Maus isoliert. Sie hemmen das Wachstum verschiedener Pilze und Hefen und sind außerdem als Inhibitoren der vakuolären H⁺-ATPase (V-ATPase) bekannt. Die Schädigung des Wurzelwachstums durch 97 und 98 ist vermutlich auf eine herabgesetzte Funktion der Vakuolen durch Inhibition der V-ATPase zurückzuführen. Offensichtlich werden auch durch die Concanamycine Kartoffelschorf-artige Symptome verursacht.



97: $R = C_2H_5$ Concanamycin A **98**: $R = CH_3$ Concanamycin B

In zukünftigen Arbeiten des AK GROND, die auf der vorliegenden Dissertation aufbauen, soll die Wirkung anderer V-ATPase-aktiver Substanzen auf Modellpflanzen untersucht werden. Es wird als sehr wahrscheinlich erachtet, dass ähnliche Substanzen, wie etwa die Bafilomycine^[160], ebenfalls eine phytotoxische Wirkung besitzen.

4.3.4 <u>FD-891 (99)</u>

Ebenfalls von NATSUME wurde das den Rotbraunen Schorf verursachende Phytotoxin isoliert und beschrieben.^[146] Es handelt sich um das 16-gliedrige Makrolid FD-891 (**99**). Es war bisher nur als cytotoxische Substanz bei *in vitro*-Tumor-Zelltests bekannt. Es konnte aus weiteren phytopathogenen Streptomyceten isoliert werden, was auf seine Verbreitung als Phytotoxin hindeutet.^[161]



4.4 Biosynthese des Thaxtomin A (59)

Durch Fütterungsexperimente mit ¹⁴C-markierten Aminosäuren konnte bewiesen werden, dass es sich bei Tryptophan, Phenylalanin und Methionin um Vorläufer des Thaxtomin A (**59**) handelt.^[162] Bei der Studie war es von Nachteil, dass zugegebene aromatische Aminosäuren einen inhibitorischen Effekt auf die Thaxtomin-Biosynthese ausüben.^[36, 162]

LORIA et al. konnte anhand molekulargenetischer Experimente mit *S. turgidiscabies* zeigen, dass der Biosynthesegencluster des **59** aus den vier Genen *txtA*, *txtB*, *txtC* und *nos* besteht.

Die Gene *txtA* und *txtB* kodieren nicht-ribosomale Peptidsynthetasen mit einer Länge von 1458 bzw. 1505 Aminosäuren.^[152] Sie besitzen beide Adenylierungs- (A), Thiolierungs- (T) und Kondensations- (C) Domänen. Zusätzlich enthalten beide Enzymkomplexe zwischen den A- und T- Domänen *S*-Adenosylmethionine-abhängige *N*-Methyltransferase-Domänen (M), die den Einbau der *N*-Methylgruppen katalysieren.

txtC kodiert eine Cytochrome P450-Monooxygenase. Durch knock-out Experimente konnte bewiesen werden, dass das Enzym die zweifache Oxidation von Thaxtomin D (100) über Thaxtomin B (101) zu Thaxtomin A (59) katalysiert.^[163]

Das *nos*-Gen kodiert ein Enzym, das zu den NO-Synthasen der Säugetiere (siehe Kapitel III.6.3) homolog ist. Seine Funktion ist von diesen aber grundverschieden: Während Säuger-NOS das Signalmolekül NO freisetzen, überträgt die bakterielle NO-Synthase von *S. turgidiscabies* Stickstoffmonoxid auf die Aminosäure Tryptophan und bewirkt damit eine direkte Nitrierung.^[164] Da auch der freie Metabolit 4-Nitrotryptophan aus Fermentationsansätzen von *S. scabies* bekannt ist,^[165] ist es wahrscheinlich, dass die Nitrierung bereits vor dem Aufbau der Thaxtomin-Grundgerüstes abläuft. Die Entstehung von nitrierten Anthranilsäure-Derivaten dürfte auf die Unspezifität des Enzyms zurückzuführen sein.^[166]

In Abb. 39 ist die Organisation des Thaxtomin-Biosynthesegenclusters und in Abb. 40 die Abfolge der Reaktionsschritte dargestellt.



Abb. 39: Organisation des Thaxtomin A-Biosynthesegenclusters. Gene des Clusters sind schwarz dargestellt.^[164160]



Abb. 40: Biosyntheseschema für die Biosynthese von Thaxtomin A (59).

4.5 Pathogene Insel

Ein Cosmidwalking- und Sequenzierungsansatz ergab, dass der GC-Gehalt der Region nahe des Thaxtomin-Biosynthesegenclusters mit 54% extrem niedrig gegenüber dem GC-Gehalt des Genoms von *S. turgidiscabies* mit 72% ist.

Die Region enthält noch weitere Gene, die für die Pathogenität des Wirtsorganismus sorgen (siehe Abb. 41).



Abb. 41: Organisation der pathogenen Insel in S. turgidiscabies; Abb. aus Ref. [170].

Eine Expression des *nec1*-Gen in *S. lividans*, erlaubt diesem sonst nicht-pathogenen Bakterium, Scheiben aus Kartoffelknollen zu kolonisieren und zu nekrotisieren.^[167] Da die Deletion des Genes die Thaxtomin-Biosynthese nicht beeinflusst, ist die Aktivität unabhängig von einer Thaxtomin-Bildung. Das Nec1-Protein scheint ein bislang nicht identifiziertes Zellangriffsziel zu haben, das auch in weiteren Pflanzen konserviert ist.

Daneben fanden sich Homologe von sechs Genen des pflanzlichen fasciation (*fas*)-Operons von *Rhodococcus fascians*. In *R. fascians* kodieren diese Gene Enzyme für die Biosynthese eines Zytokins, das eine Blatt-Gallenbildung bei Pflanzen verursacht. Da eine Thaxtomin-Defektmutante von *S. turgidiscabies* auf *Arabidopsis* belaubte Gallen verursacht, kann vermutet werden, dass *S. turgidiscabies* Zytokine mit ähnlicher Aktivität zu denen von *R. fascians* produziert.^[141]

Außerdem wurde ein Gen identifiziert (*tomA*), das homolog zur Tomatinase ist. Dieses gut charakterisierte Enzym phytopathogener Pilze entgiftet das Solanin, ein vor allem von Nachtschattengewächsen produziertes anti-mikrobielles Alkaloid. Das Hydrolyseprodukt führt schließlich zu einer Unterdrückung der pflanzlichen Abwehr durch Störung von Signalprozessen.^[168]

Daneben sind mehrere putative Transposasen vorhanden, die für eine Translokation der umliegenden DNA sorgen können.^[169] All diese Fakten sprechen für eine "Pathogene Insel", die mobilisiert werden kann und dann in andere Spezies eingebaut werden kann. Das 660 kbgroße Stück DNA wurde in *S. lividans* und *S. diastatochromogenes* überführt. Während *S. lividans*-Transkonjuganten keinen phytopathogenen Phänotyp entwickelten, waren *S. diastatochromogenes*-Transkonjuganten in der Lage, Thaxtomin A (**59**) zu bilden und nekrotische Symptome auf Kartoffelscheiben ähnlich wie *S. turgidiscabies* hervorzurufen.^[170] Dies spricht dafür, dass genetisch verwandte Organismen durch Übertragung der "Pathogenen Insel" zu Verursachern des Kartoffelschorf werden können. Dies könnte auch das Auftauchen von *S. acidiscabies* erklären, nachdem Bauern auf sauere Böden für den Kartoffelanbau umgestiegen waren.^[171] Erstaunlich ist, dass nur der genetisch nahe stehende *S. diastatochromogenes* eine Phytopathogenität entwickelte. Da diese Spezies auch als Produzent des Concanamycins (**97**, **98**) bekannt ist, scheint auch *S. diastatochromogenes* aus dieser Sicht zumindest potentiell phytopathogen zu sein. Eine genauere Untersuchung von Streptomyceten des *S. diastatochromogenes*-Clusters auf Phytopathogenität bzw. ein Screening nach Sekundärstoffen mit phytopathogener Wirkung der entsprechenden Spezies erscheint daher zukünftig sehr reizvoll.

4.6 Steuerung der Thaxtomin-Biosynthese

Die Biosynthese des Thaxtomin A (**59**) wird, wie üblich für Sekundärmetabolite, sehr fein reguliert. Wichtig ist die Entwicklungsphase des Bakteriums, da die Sekretion des Phytotoxins in der späten exponentiellen und frühen stationären Phase stattfindet.^[140]

Für die Biosynthese sind Pflanzenteile als Induktoren wichtig, da auf rein synthetischen Medien kein Thaxtomin gebildet wird. Dass die Zugabe von Suberin die Thaxtomin-Produktion auch in Stärke-Medium ermöglicht, ist umstritten.^[172] Cellobiose scheint ein wichtiges Signal zum Start der Produktion zu sein.^[173] Durch den Zusatz von Glucose oder aromatischen Aminosäuren wird die Biosynthese effektiv unterdrückt.^[148,174] Dies ist durch Feedback-Hemmung zu erklären, was an der Organisation des verantwortlichen Rezeptors liegen dürfte.

Ein direkter Zusammenhang zwischen der Melanin-Biosynthese und der Thaxtominproduktion konnte nicht festgestellt werden. Zwar war bei einigen Melanin-Mangelmutanten eine verminderte Bildung von **59** zu beobachten, dieser Effekt scheint aber eher auf andere pleiotrope Effekte zurückzuführen sein, wie erhöhte Sensitivität für Schwermetall-Ionen oder die Unfähigkeit unter bestimmten Bedingungen sporulieren zu können.^[175]

Die Biosynthese der Thaxtomine konnte durch Zugabe von NO-Synthase Inhibitoren unterdrückt werden.^[164,176] Bei einer NOS-Mangelmutante konnte durch Einsatz von NO-Donatoren die Biosyntheseaktivität zumindest partiell wieder hergestellt werden.^[176]

4.7 Einfluss des Iromycin A (13) auf die Thaxtomin A (59) Biosynthese

Iromycin A (13) ist als unspezifischer Inhibitor der humanen NO-Synthase-Isoformen patentiert worden (siehe Kapitel III.6.1).^[177] Da in den Biosynthese-Genclustern von Thaxtomin A (59) und C (60) eine bakterielle NOS enthalten ist, und humane NOS sowie bakterielle NOS eine hohe Similarität zueinander aufweisen, entstand die Hypothese, dass das Vorhandensein von Iromycin A (13) die Biosynthese des Thaxtomin (59, 60) beeinflussen könnte. Deshalb sollte 13 in wachsende Kulturen des Stammes zugefüttert werden, um zu prüfen, wieviel 59 unter diesen Bedingungen gebildet wird.

4.7.1 <u>Produktion von Thaxtomin (59) in verschiedenen Medien</u>

Als erstes Experiment wurde der Stamm *Streptomyces bottropensis* Dra 17 in diversen Medien kultiviert, um eine hohe und stabile Thaxtomin-Produktion zu erreichen. Dazu wurde *Streptomyces bottropensis* Dra 17 in 1 L Erlenmeyerkolben mit Schikanen kultiviert, die mit jeweils 200 mL der Medien Hafer, M2, 1187 bzw. 1358 befüllt waren. Bei Medium 1187 wurde Kartoffelmehl anstatt Stärke verwendet (= Medium 1187S), um evtl. Stimulantien der Kartoffel zu nutzen. Die Kolben wurden mit 20 mL einer 48 h alten SGG-Vorkultur (28 °C, 250 rpm) angeimpft und anschließend für 72 h bei 28 °C und 250 rpm inkubiert.

Zur Aufarbeitung wurden Mycel und Kulturfiltrat durch Zentrifugation getrennt. Das Kulturfiltrat wurde über XAD-16 extrahiert und das Mycel mit je 200 mL Aceton und 200 mL Aceton/Methanol (1:1) aufgeschlossen. Nach Entfernung der Lösungsmittel im Vakuum wurden die Proben in Methanol gelöst und die Zusammensetzung durch analytische HPLC (Säule 1, Programm 1) analysiert.

Dabei zeigte sich, dass **59** in allen Medien gebildet wurde. Da die im Kulturfiltrat enthaltene Menge an **59** mehr als 10 x größer als die im Mycel enthaltene Menge war, wurde entschieden, in weiteren Experimenten das Mycel durch Zentrifugation zu entfernen und das Kulturfiltrat mit Essigester zu extrahieren (siehe Tabelle 4).

Medium	Thaxtomin A (59)	Iromycin A (13)	Iromycin B (14)
M2	+++	-	+
Hafer	++	+	++
1187S	/	-	+
1358	+	+	+++

Tabelle 4: Produktion von **59, 13** und **14** in den verschiedenen Medien. +++: sehr hohe Produktion, ++: hohe Produktion, +: mäßige Produktion, /: kaum Produktion, -: keine Produktion nachweisbar.

Die maximale Produktion von Thaxtomin A (59) wurde in M2-Medium erzielt. Die zweitbeste Ausbeute wurde im Hafer-Medium erreicht, aber auch in den Medien 1358 und 1187S wurde 59 gebildet. 13 konnte nur im Mycelextrakt von Hafer und 1358 Medium nachgewiesen werden. Da aber 14 in den Extrakten aller Medien sowohl im Kulturfiltrat als auch im Mycel enthalten war, muss 13 zwischenzeitlich auch in den anderen Medien produziert worden sein, es wurde im M2 und 1187 aber offensichtlich bereits wieder vollständig oxygeniert.

Da einige der Thaxtomin-bildenden *S. scabies*-Stämme auch Concanamycin (**97**, **98**) produzieren, wurden die Extrakte auf eine mögliche Concanamycin-Produktion hin untersucht. Als Vergleich stand eine Rohproduktprobe aus dem Stamm *Streptomyces* sp. Gö 22/15 zur Verfügung, die die Concanamycine A (**97**), C und E enthielt. Es war in keinem der Extrakte Concanamycin A - E (**97**, **98**) nachzuweisen.

In allen getesteten Medien ist im mittleren Polaritätsbereich ein Metabolit mit der Masse 819 aufgefallen. Dieser Befund unterstreicht das biosynthetische Potential des Stammes *S. bottropensis* Dra17. Es könnte sich um das Expressionsprodukt des Genclusters handeln, der mit Cosmid 2 zum Teil sequenziert worden ist. Da die maximale Produktion im Medium 1187S beobachtet wurde, ist eine erneute Fermentation in diesem Medium vorgesehen.

Anschließend sollte eine Fermentationskurve in M2-Medium aufgenommen werden, um die Zeitabhängigkeit der Produktion von **59** und damit den optimalen Zeitraum für ein Fütterungsexperiment zu bestimmen. Weder in diesem Experiment noch bei durchgeführten Iromycin-Fütterungsexperimenten in M2-Medium wurde eine stabile Thaxtominproduktion erreicht (Daten hier nicht gezeigt). Daher wurde Hafermedium verwendet, das auch in den meisten Experimenten in der Literatur benutzt worden ist. Allerdings war auch hier zu Anfang die Produktion unzureichend bzw. blieb teilweise sogar ganz aus (Daten hier nicht gezeigt).

Da von O. WAGNER keine Vorkultur verwendet worden ist, vermutete man, dass der Medienwechsel von SGG als Vorkulturmedium auf M2 bzw. Hafer als Hauptkulturmedium bei dem Stamm biosynthetischen Stress verursacht, der die Produktion sinken lässt.

Daher wurden sowohl für die Stammhaltung auf Agarplatten als auch für Vor- und Hauptkultivierung Hafer-Medium verwendet. Dadurch konnte eine stabile Thaxtomin A (**59**)- Produktion erreicht werden.

4.7.2 Optimierung der Fermentationsbedingungen

Um die für die Thaxtomin A (**59**)-Biosynthese optimalen Bedingungen zu ermitteln, die sich für ein Fütterungsexperiment mit **13** eignen, wurde *Streptomyces bottropensis* Dra17 in Hafermedium unter leicht veränderten Bedingungen fermentiert. Dabei wurde die Kolbengröße (1L, 300 mL, 100 mL), die Schüttelgeschwindigkeit (120 rpm, 180 rpm, 250 rpm), die Anwesenheit von Schikanen (mit bzw. ohne) und die Menge an Medium (zwei bis drei Variationen pro Kolbengröße) variiert. Die exakten Bedingungen der einzelnen Versuchsansätze sind im Experimentalteil dieser Arbeit (B.III.10.3) beschrieben. Es wurden jeweils zwei Kolben unter identischen Bedingungen inkubiert und zur Aufarbeitung vereinigt. Nach Vereinigung der identischen Versuchsansätze wurden 30 mL der Kulturbrühe zentrifugiert und nach Abtrennung des Mycels mit 15 mL Essigester dreimal extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Rohextrakte wurden in jeweils 2 mL Methanol gelöst und die Menge an **59** mittels analytischer HPLC (Säule 1, Programm 1) bestimmt. Ziel des Versuches war es, die Bedingungen für eine möglichst hohe Produktion an **59** zu ermitteln.

Es zeigte sich, dass eine hohe Schüttelgeschwindigkeit und die Verwendung von Kolben mit Schikanen die Thaxtomin-Produktion erhöhen. Dies deutet darauf hin, dass die Verfügbarkeit von Sauerstoff die Biosynthese von **59** begünstigt. Da in der Biosynthese von **59** zwei durch P450-Oxygenasen vermittelte Oxidationen enthalten sind, spricht diese Beobachtung für einen hohen Sauerstoffbedarf dieser Reaktionschritte. Der Einsatz von Kolben mit Schikanen führt darüber hinaus zur Bildung eines starken Mycelrandes.

Für die weiteren Versuche wurde *S. bottropensis* Dra17 in 300 mL-Kolben ohne Schikanen kultiviert, die mit 75 mL Kulturmedium gefüllt waren. Unter diesen Bedingungen ist die Produktion von **59** sehr gut und es wird zudem nur ein geringer Mycelrand gebildet. Ein trockener Mycelrand kann Fütterungsexperimente stören, da Zellen evtl. metabolisch aktiv sind, aber nicht mehr durch die Zusammensetzung der Kulturbrühe beeinflusst werden. Zudem ist die Menge an Kulturbrühe noch relativ gering, was die Fütterungsmenge an Iromycin A (**13**) bei dem geplanten Experiment begrenzt.

4.7.3 Fermentationskurve

Um die Zeitabhängigkeit der Produktion von **59** und damit den optimalen Zeitraum für die Fütterung von Iromycin A (**13**) zu Unterdrückung der Thaxtomin A (**59**)-Biosynthese zu bestimmen wurde eine Fermentationskurve aufgenommen. 75 mL Hafermedium in 300 mL Erlenmeyerkolben ohne Schikanen wurden mit 5% einer 48 h alten Vorkultur (180 rpm,

28 °C) beimpft und bei 28 °C und 250 rpm inkubiert. Nach 0 h; 5 h; 14,5 h; 19,25 h; 24,75 h; 29 h; 38,5 h; 43,25 h; 48,75 h; 55,25 h; 62,5 h; 67,25 h; 73,75 h; 77,25 h; 88,75 h; 96,5 h; 121,75 h und 162,25 h wurden jeweils zwei Kolben auf die oben beschriebene Art und Weise aufgearbeitet. Die Menge an produziertem **13**, **14** und **59** wurde durch analytische HPLC (Säule 1, Programm 1) untersucht. Das Ergebnis für **59** ist in Abb. 42 dargestellt. Leider konnte die Menge an Iromycin A (**13**) und Iromycin B (**14**) unter den Versuchsbedingungen wegen zu geringer Konzentration in der Kulturbrühe nicht zuverlässig analysiert werden.



Abb. 42: Fermentationskurve für die Thaxtomin A (59)-Produktion von Streptomyces sp Dra 17.

Die Produktion begann in der 16. Stunde und war bis zur 60. Stunde annährend gleich bleibend. Nach 60 Stunden war die Produktion beendet und die Konzentration von **59** blieb konstant. Daher wurde Iromycin A (**13**) im Fütterungsexperiment etwa ab der 16. bis zur 60. Stunden zugegeben.

4.7.4 Iromycin A (13) Fütterungsexperiment

Der Fütterungsversuch wurde unter identischen Bedingungen wie die Fermentationskurve durchgeführt. **13** wurde in fünf verschiedenen Mengen (6 mg; 2 mg; 0,6 mg; 0,2 mg und 0,06 mg) in jeweils 2 mL Methanol gelöst und nach 14 h, 18 h, 22 h und 30 h (jeweils 1/8 der Gesamtmenge) bzw. nach 39 h, 47 h und 54 h (jeweils 1/6 der Gesamtmenge) zugefüttert. **13** wurde in mehreren Portionen zugegeben, um den oxidativen Abbau von **13** zu **14** möglichst wenig zu induzieren und die Konzentration an **13** möglichst stabil zu halten.

Um die Enzym-Inhibierung vergleichen zu können, wurden jeweils 2 mg der literaturbekannten NO-Synthase-Inhibitoren N^{ω} -Nitro-L-Arginin (**102**, NNA) und N^{ω} -Methyl-L-Arginin (**103**, NMMA) in 2 mL Methanol gelöst (siehe Abb. 43) und auf identische Weise zugefüttert. Als Vergleich wurden Kolben ohne Zugabe kultiviert.



Abb. 43: Vergleich der Strukturen von NNA (102) und NMMA (103) mit dem natürlichen Substrat Arginin (104).

Es wurden jeweils vier Kolben unter identischen Bedingungen inkubiert (n = 4). Die Proben wurden im oben beschriebenen Verfahren einzeln aufgearbeitet, die Produktion von **59**, **13** und **14** in den Rohextrakten wurde durch analytische HPLC-DAD-Kopplung (Säule 1, Programm 1) bestimmt.

Nur in den Kolben mit der höchsten zugefütterten Iromycin A- Menge (6 mg, 80 mg/L) war eine sehr geringe Menge an Iromycin A (13) nachzuweisen, in den restlichen Kolben war kein 13 detektierbar. Dagegen war die Menge an Iromycin B (14) in diesem Fall stark erhöht (auf ca. 350% des Referenzwertes); auch bei Fütterung von 2 mg 13 pro Kolben war die Konzentration von 14 auf mehr als das doppelte erhöht (siehe Abb. 44). Dies spricht für einen schnellen und vollständigen Abbau des zugefütterten 13 zu 14. Nur bei Fütterung von 6 mg Iromycin A (13) pro Kolben blieb etwas metabolisch wirksames 13 erhalten. In diesen Kolben war eine Abnahme der Thaxtomin A Produktion auf 65% des Referenzwertes festzustellen. Das zugefütterte **13** bewirkte daher eine Inhibierung der Thaxtomin-Biosynthese, wodurch der Einfluss des Iromycin A (**13**) auf die Nitrierungsreaktion der Thaxtomine bewiesen werden konnte. Das Wachstum von *S. bottropensis* Dra17 wurde nicht untersucht, allerdings wurde bereits von R. LORIA gezeigt, dass NO-Synthase-Inhibitoren keinen Einfluss auf das Zellwachstum haben.^{[164],[176]}

Selbst bei Fütterung der starken Inhibitoren NNA (102) und NMMA (103) wurden etwa 30% der normalen Thaxtomin A (59) Menge gebildet. Dies spricht dafür, dass die Nitrierung des biosynthetischen Vorläufers durch die NOS schon deutlich vor der Biosynthese von 59 einsetzt. Bei Fütterung der Enzyminhibitoren nach 17 h waren also wahrscheinlich schon nennenswerte Mengen des nitrierten Vorläufers 4-Nitrotryptophans produziert worden, die auch nach Zusatz der Inhibitoren zum Aufbau der Thaxtomine verwendet wurden (siehe Abb. 44).



Abb. 44: Produktion von Thaxtomin A (59) und Iromycin B (14) relativ zur Vergleichskultivierung

Da der oxidative Abbau von Iromycin A (13) zu Iromycin B (14) das Experiment erschwerte, ist geplant, die Fütterung unter gleichzeitiger Zugabe des P450-Inhibitors Ancymidol (94) zu wiederholen. Dabei wird auch die Biosynthese von Thaxtomin A (67) unterbrochen werden und sich Thaxtomin D (100) bzw. Thaxtomin B (101) akkumulieren. Die Inhibition der Thaxtomin Biosynthese sollte sich aber auch in Gegenwart eines P450-Inhibitors bestimmen lassen, indem die Menge aller Thaxtomine (59, 100, 101) analysiert werden. Dabei sollen die

Inhibitoren früher zugefüttert werden, da die Nitrierung offensichtlich deutlich vor der Produktion von **59** beginnt. Alternativ ist es denkbar, ein biologisch wirksames, aber weniger leicht abbaubares Iromycin-Derivat wie das totalsynthetisch hergestellte *tert*-Butylderivat in einem Fütterungsexperiment zu verwenden.^[178]

4.8 Diskussion

Durch die Fütterung des Iromycin A (13) konnte der Beweis erbracht werden, dass 13 die Biosynthese der Thaxtomine inhibiert. Eine derartige Regulation der Biosynthese eines Sekundärmetaboliten durch einen weiteren Sekundärmetaboliten ist einmalig und bisher nicht in der Literatur beschrieben worden.

Dadurch konnte ein wichtiger Faktor in der Regulation der Thaxtomin-Biosynthese von *Streptomyces bottropensis* Dra 17 aufgeklärt werden. Es stellt sich die Frage, warum zur Regulation der Biosynthese dieser Phytoxine ein solch ungewöhnlicher Weg realisiert ist. Der Vorteil gegenüber einer Regulation auf genetischer Ebene wie dem "Quorum Sensing"^[179] ist, dass der für die Biosynthese notwendige Enzymapparat bereits vollständig exprimiert vorliegen kann. Trotzdem wird die Biosynthese von Thaxtomin A (**59**) auf der ersten Stufe der Biosynthese unterdrückt, erst nach Abbau von Iromycin A (**13**) zu Iromycin B (**14**) beginnt der vorhandene Biosyntheseapparat zu arbeiten. Das Pathogen kann nun sehr schnell große Mengen des Toxins produzieren.

Die Regulation des ersten Schrittes in der Thaxtomin-Biosynthese erscheint sinnvoll, da die restlichen Vorläufermoleküle bereits eine schadhafte Wirkung besitzen. Diese könnten daher eine unerwünschte Gegenreaktion der Pflanze hervorrufen. Durch Inhibierung der Biosynthese bliebe das Pathogen bis zum Vorhandensein einer notwendig großen Zellenzahl unerkannt, bis nach Abbau von 13 schnell große Mengen an 59 produziert werden, so dass dann das Pathogen die Pflanze erfolgreich schädigen kann.

Möglich ist auch eine direkte Wirkung von Iromycin A (13) auf die Pflanze: 13 könnte auf eine bislang unbekannte NO-Synthase wirken. Bei *Arabidopsis* spp. konnte gezeigt werden, dass ein iNOS-ähnliches Enzym (siehe Kapitel III.6.3) einen grundlegenden Verteidigungsmechanismus darstellt. Durch Inhibition dieses Enzyms könnte 13 die pflanzliche Abwehr unterbrechen. Allerdings erklärt dies nicht den Abbau von Iromycin A (13) zu B (14) durch den produzierenden Organismus *Streptomyces bottropensis* durch eine P450-Oxygenase. Außerdem befindet sich der größte Teil von 13 im Mycelextrakt, aktiv wäre

nur der kleinere Teil außerhalb der Zellen. Dieser Effekt scheint also, sofern er vorhanden ist, nur sekundär zu sein.

In Abb. 45 sind die bekannten Regulationsmechanismen der Thaxtomin-Biosynthese zusammengefasst. Die fett gedruckten Teile gehören zu der im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Hypothese. Iromycin scheint daher ein Teil der Repressoren der Thaxtomin A (**59**)-Biosynthese zu sein.



Abb. 45: Steuerung der Thaxtomin A (59) Biosynthese durch verschiedene Faktoren und Wechselwirkung des
59 produzierenden Mikroorganismus mit anderen Organismen.^[173-182]

Außer durch Iromycin wird die Biosynthese durch weitere Faktoren unterdrückt. Im fortgeschrittenen Entwicklungsstadium produziert das Bakterium bei Vorhandensein von Cellobiose Thaxtomin A (**59**).^[173176] Die Vorraussetzung von Cellobiose in der Mikroumgebung kann dadurch erklärt werden, dass es für den Stamm Dra17 nur dann sinnvoll ist **59** zu bilden, wenn sich das Bakterium in der Nähe von Pflanzen befindet. Cellobiose könnte hierbei ein Erkennungsfaktor zu sein.

Vorhandensein von Glucose inhibiert die Thaxtomin-Produktion, bei ausreichender Nährstoffversorgung ist der Stamm damit nicht pathogen.^[148]

Das gebildete Thaxtomin A (**59**) erschließt die Pflanze als Nährstoffquelle für das Bakterium. Die Wirkung von **59** kann durch Umwandlung bzw. Entgiftung des Thaxtomins durch antagonistische Organismen abgeschwächt werden (Abb. 4.9). Pilze wie *Penicillium* sp. und *Trichoderma* sp. metabolisieren **59** und verhindern dadurch den bakteriellen Angriff. Allerdings sind die Organismen ihrerseits pathogen bzw. opportunistisch für die Pflanze und eignen sich daher nicht als biologische Kontrolle.^[180] Für den **59** abbauenden Pilz *Aspergillus niger* konnte die Struktur von Abbauprodukten aufgeklärt werden.^[181]

Eine biologische Kontrolle des Kartoffelschorfes kann dagegen durch *Streptomyces diastatochromogenes* erreicht werden.^[182] Die Inhibition des Pathogen *S. scabies* beruht dabei auf Konkurrenz und Antibiotikaeinsatz.

Die Glykosylierung von Thaxtomin A (**59**) als Teil eines Resistenzmechanismus der Pflanze ist umstritten.^[183] Unstrittig dagegen ist, dass Mikroorganismen wie *Bacillus mycoides* **59** glykosylieren und damit entgiften. Diese Entgiftung könnte als mikrobielle Kontrolle des Kartoffelschorfes von agrikulturellem Interesse sein.^[184]

Offen bleibt, ob es sich bei Iromycin A (13) um einen generellen Regulationsmechanismus für die Thaxtomin A (59)-Biosynthese handelt. Bei dem von SUKENGA et al. isolierten *Streptomyces* sp. könnte es sich um ein *S. scabies*-Isolat handeln, da alle bisher analysierten Merkmale auf diesen Befund hindeuten (siehe Kapitel III.6.1).^[177] Da die meisten *S. scabies*-Isolate auch Produzenten von 59 sind,^[171] deutet dies auf eine Regulation im oben diskutierten Zusammenhang hin.

Bei dem vom Sanger Institut sequenzierten *Streptomyces scabies* 87.22 konnten dagegen im Rahmen dieser Arbeit keine offensichtlich für die Iromycin-Biosynthese verantwortlichen Gene identifiziert werden (siehe Kapitel III.2.5). Dies könnte an der Annotierung der Gene liegen, oder dieser Thaxtomin A (**59**)-bildende Stamm ist nicht in der Lage, Iromycin (**13**) herzustellen.

Um die Frage zu klären, sollte eine Anzahl Thaxtomin A (**59**)-bildender Streptomyceten auf die Produktion von Iromycin (**13**, **14**, **61-64**) hin analysiert werden.

Die Wechselwirkungen zwischen Pathogen, Pflanze und umgebenden Mikroorganismen sind ein wissenschaftlich interessantes und ökonomisch herausragend wichtiges Thema, das durch jüngste Forschungsergebnisse zunehmend klarer wird. Oft lassen sich die makroskopischen Wechselbeziehungen bis auf molekulare Ebene im Mikrokosmos zurückführen.
5. Inhibition des Komplex I

5.1 Strukturen von Piericidin (<u>72</u>) und Iromycin (<u>13</u>)

Strukturell sind die Iromycine den Piericidinen sehr ähnlich. Beide Metabolitfamilien besitzen einen sechsgliedrigen, vollständig ungesättigten Heterozyklus unter Beteiligung eines Stickstoff-Atoms und eine lange unpolare Seitenkette. In der Seitenkette sind die Lage der ersten Doppelbindung und einer Methylgruppe identisch.

Unterschiedlich sind jedoch die Länge der Seitenketten, die Anzahl an Sauerstoffatomen am Ring und das Auftreten von Methylether- und Epoxidderivaten.

Piericidin A (72) und B sind Metaboliten von *Streptomyces mobaraensis*;^[185] nach Isolierung weiterer Metaboliten aus *Streptomyces pactum* wurden die Piericidine systematisch als A_n, B_n, C_n und D_n (n = 1, 2, 3, 4) klassifiziert.^[186] Als Derivate der Familie konnten Piericidinglykoside,^[187] Hydroxyglyko-Piericidine,^[188] Desoxytal-Piericidin,^[189] rhamnosyliertes Piericidin,^[190] Desmethoxypiericidine^{[191],[192]} und Piericidin-*N*-Oxide isoliert werden.^[193] Kürzlich wurde die Famile durch die Entdeckung der Piericidine C₅ bis C₈ erweitert.^[194]

Die natürlich auftretenden Piericidine enthalten als Gemeinsamkeit einen vollständig substituierten Pyridinring, dessen Substitutionsmuster dem des Benzochinones der Ubichinone (Coenzym Q, **105**) sehr ähnlich ist. Auch Teile der Seitenkette sind ähnlich.



Wahrscheinlich aufgrund dieser strukturellen Ähnlichkeit wirkt Piericidin (72) als Inhibitor des mitochondrialen Elektronentransportketten-Proteins NADH-Ubichinon-Reduktase (Komplex I) und ist einer der potentesten der bislang identifizierten Inhibitoren ($K_i = 0,6-$ 1,0 nM).^[195]

5.2 Komplex I der Atmungskette

Die oxidative Phosphorylierung findet in vielen Bakterien und in der inneren Membran der Mitochondrien von Eukaryoten statt (Abb. 46). Die Atmungskette besteht aus einer Reihe von sequentiell wirkenden Elektronen-Carriern, die ein oder zwei Elektronen aufnehmen oder abgeben können. Die Elektronen "fließen" spontan von Carriern mit niedrigem E^{'0} zu Carriern mit höherem E^{'0}, woraus die Sequenz NADH, UQ, Cytochrom *b*, Cytochrom c₁, Cytochrom c, Cytochrom a, Cytochrom a₃, O₂ resultiert.^[196]

Die durch diesen Prozess freiwerdende Energie wird genutzt, um Protonen aus der Matrix in den Intermembranraum zu transportieren, wodurch sich ein Gradient der Protonenkonzentration ausbildet. Durch die protonenmotorische Kraft wird schließlich Energie gespeichert, indem das spontane Einströmen von Protonen in die Matrix an die Synthese von ATP aus ADP und P_i durch den Komplex V gekoppelt wird.



Abb. 46: Schematisches Modell der mitochondrialen Elektronentransportkette. Inhibitoren der verschiedenen Komplexe sind grau dargestellt, Abb. aus Ref. [197].

Die erste Reaktion, die mit dem Ausschleusen von 4 Protonen verknüpft ist, wird von der NADH-Ubichinon-Reduktase (Komplex I) katalysiert. Der Komplex I ist der größte und komplizierteste der Enzymkomplexe der Atmungskette.^[197] Komplex I aus Rinderherzen besteht aus 43 Untereinheiten, von denen sieben durch das mitochondriale Genom codiert werden. Bei vielen Bakterien dagegen enthält er nur 13-14 Untereinheiten; dieser "minimale Komplex I" ist bei allen Säuger- Enzymen gut konserviert.

Bisher sind zwei verschiedene Bindungsstellen im Komplex I bekannt, durch die Inhibitoren die Funktion hemmen können.^[198] Piericidin A_1 (72) ist in der Lage, an beiden Inhibitor-Bindungsstellen zu binden.^[199]

Durch Photoaffinitäts-Markierung von **72** konnte gezeigt werden, dass der für die Aktivität verantwortliche Bindungsraum wahrscheinlich die PSST- und ND1-Untereinheiten des Komplexes I sind (Abb. 47). Die PSST- Untereinheit katalysiert vermutlich den Elektronentransfer vom Eisen-Schwefel-Cluster N2 auf Ubichinon. Dieser Prozess wird offensichtlich von **72** und ähnlichen Stoffen unterbunden, wodurch die ATP-Synthese zum Erliegen kommt.^[197]



Abb. 47: Schematisches Modell des Elektronenflusses im Komplex I. Bindungsstelle von 72 ist gekennzeichnet, Abb. aus Ref. [197].

5.3 Struktur-Wirkungs-Beziehung der Piericidine

Die Struktur-Wirkungs-Beziehung der Piericidine ist mehrfach Gegenstand von Untersuchungen gewesen. Die Inhibitionswirkungen der natürlichen Piericidine wurden von YOSHIDA et al. miteinander verglichen.^[186] Dabei zeigte sich, dass Variationen des Strukturteils ab C-4 bis zum Ende der Seitenkette keinen großen Einfluss auf die Aktivität haben, der "Kern" aber essentiell ist. Wichtig scheinen ferner die Doppelbindung zwischen C-2 und C-3 und besonders die phenolische Hydroxygruppe im Ring (C-4). GUTMAN et al. bewiesen durch einen synthetischen Inhibitor mit Piericidin-Ringstruktur und Ubichinon-Seitenkette, dass diese Hybridstruktur ebenso aktiv wie der Naturstoff ist.^[200] Durch Partialsynthese zugängliche Derivate wurden untersucht, wodurch eine für die biologische Aktivität notwendige Partialstruktur abgeleitet werden konnte (Abb. 48).^[201]



Abb. 48: Für biolgische Aktivität notwendiges Strukturfragment der Piericidine.

BOGER et al. konnten schließlich zum ersten Mal Piericidin A₁ (**72**) und B₁ durch Totalsynthese herstellen.^[202a] Dadurch wurden synthetische Intermediate und Derivate zugänglich, um die Struktur-Wirkungsbeziehung zu studieren.^[202b] Genau untersucht wurde der Einfluss der C-4'-Hydroxygruppe und C-5'-Methylgruppe. Durch Acetylierung und Methylierung der C-4'-Hydroxygruppe wurde die Aktivität von **72** etwa um den Faktor 6 bzw. 35 (von IC₅₀ = 3.7 nM auf IC₅₀ = 24 nM bzw. IC₅₀ = 130 nM) reduziert, während ein Fehlen der Methylgruppe an C-5' die Aktivität kaum beeinflusst (IC₅₀ = 3.7 nM auf IC₅₀ = 4 nM). Analoge Acetylierungen und Methylierungen wurden auch von Derivaten mit Farnesylseitenkette durchgeführt, was durchgängig zu einer stärkeren Abnahme der Aktivität führte. Die natürliche Seitenkette scheint somit im Vergleich zur Farnesylseitenkette Verluste in der Bindungsaffinität kompensieren zu können, die durch Modifikationen im Pyridyl-Kern hervorgerufen werden.^[202b]

5.4 Struktur-Wirkungs-Beziehung der Iromycinfamilie

Da sich die Iromycine und Piericidine strukturell ähneln, wurde eine mögliche Inhibition der Atmungskette durch die Iromycine in Kooperation mit Dr. B. KUNZE (HKI/Braunschweig) untersucht. Es wurde ermittelt, welche Konzentration der Substanzen die NADH Oxidation in submitochondrialen Partikeln aus Rinderherz 50% inhibieren (IC₅₀-Wert).

Obwohl Iromycin A (13) mit einem IC₅₀-Wert von 2.1 ng/mL fast um den Faktor 70 weniger wirksam ist als Piericidin A₁ (72) (IC₅₀ = 140 ng/mL), ist 13 auf Grund der submikromolaren Wirkkonzentration ganz klar als potenter Inhibitor der Atmungskette zu klassifizieren.

Zur Analyse der Struktur-Wirkungs-Beziehung der Iromycinfamilie wurden im Rahmen dieser Arbeit neben den natürlich vorkommenden Iromycinen A-F (**13**, **14**, **61-64**) gezielt partialsynthetisch Derivate hergestellt und untersucht. Um auch durch Partialsynthese nicht erreichbare Modifikationen zu ermöglichen, wurden Zwischenstufen der Iromycin-Totalsynthese und zwei totalsynthetische Derivate in die Analyse mit einbezogen.^[203]

Alle untersuchten Substanzen wurden durch HPLC (Säule 3, Programme siehe Experimenteller Teil B.III.7) gereinigt, um die für biologische Untersuchungen notwendige Reinheit zu erreichen.

Bei dem Test blieben alle Cytochrome in der oxidierten Form. Bei einigen Iromycin-Konzentrationen wurden die Cytochrome jedoch nach einigen Minuten wieder reduziert. Dieser Befund ist typisch für schwächere Inhibitoren. Über einen Vergleich der IC_{50} -Werte konnten die für die Inhibition des Komplex I notwendigen Strukturteile des Iromycins identifiziert werden.

Durch Oxygenierung wird Iromycin A (13) zu B (14), E (63) bzw. F (64) und Iromycin C (61) zu D (62) abgebaut (siehe Kapitel III.3). Diese Umwandlungen sind mit einem starken Rückgang der Aktivität verbunden. Der IC₅₀-Wert wird von 13 mit 140 ng/mL auf ca. 5700 ng/mL von 14 herabgesetzt, somit setzt ein polarer Substituent in der langen Alkylkette die Aktivität sehr stark herab. Die Oxidation von 61 (IC₅₀ = 1020 ng/mL) zu 62 macht die Verbindung unwirksam (IC₅₀ > 8097 ng/mL). Dies kann neben herabgesetzten Protein-Metabolit-Wechselwirkungen auch durch eine geringere Konzentration der Metaboliten in der Zellmembran erklärt werden, da wegen erhöhter Hydrophilie 14 und 62 verstärkt in der Extrabzw. Intrazellulären Flüssigkeit vorhanden sein sollten (Abb. 49).



Abb. 49: Strukturen der natürlichen Iromycine A (13), B (14), C (61) und D (62).

61 weist mit IC₅₀ = 1020 ng/mL eine deutlich geringere Aktivität als **13** auf. Daher war es von großem Intresse, dass durch S. HEYDAR in der Arbeitsgruppe VON ZESCHWITZ (Universität Göttingen) synthetisch ein Iromycin-Derivat (Iromycin S, **106**) hergestellt wurde, das in der Seitenkette endständig eine *tert*-Butyl- anstatt der *iso*-Propylgruppe trägt (Abb. 50).^[203] Diese Verbindung **106** ist mit IC₅₀ = 58 ng/mL mehr als doppelt so aktiv wie die Mutterverbindung **13**. Die Steigerung der Lipophilie der Seitenkette oder ihr räumlicher Anspruch bewirken also auch hier eine Verstärkung der Inhibition.



Abb. 50: Iromycin S (106) trägt eine tert-Butylgruppe statt der Isopropylgruppe.^[203]

Um den Einfluss der Doppelbindungen auf Aktivität zu untersuchen, wurden die isolierten Doppelbindungen in Iromycin A (13) mit Pd/C unter Wasserstoff-Atmosphäre hydriert. Das entstandene Derivat AH (107) besitzt mit $IC_{50} = 680$ ng/mL im Vergleich zu 13 eine um den Faktor 5 herabgesetzte Aktivität. Das totalsynthetische Iromycin M (108) hingegen ist mit $IC_{50} = 295$ ng/mL im Vergleich zu 61 ($IC_{50} = 1020$ ng/mL) deutlich stärker aktiv. Dadurch zeigt sich, dass die Doppelbindung zwischen C-2" und C-3" für die Inhibition des Komplex I entscheidend ist, während das Fehlen der Doppelbindung zwischen C-5" und C-6" einen eher wirkverstärkenden Einfluss auf die Struktur-Wirkungsbeziehung hat (Abb. 51).



Abb. 51: Hydrierte Iromycine AH (107) und M (108).

Mit Iromycin R (109), einem Zwischenprodukt der Iromycin A (13)-Synthese, sollte gezeigt werden, dass die Kernstruktur ohne lange Seitenkette nur eine Partialaktivität besitzt (Abb. 52). Leider liegen die genauen Ergebnisse der Analyse bislang nicht vor.



Abb. 52: Derivat 109 ohne lange Seitenkette.

Durch Bestimmung der IC₅₀-Werte von Iromycin E (**63**) und Iromycin F (**64**) konnte der Einfluss von Oxidationen in der Ringstruktur untersucht werden (Abb. 53). Beide Derivate besitzen aufgrund der strukturellen Änderung des Heterozyklus unter Aufhebung der Aromatizität keine nennenswerte Aktivität (IC₅₀ > 8097 ng/mL).



Abb. 53: Oxidation am Heterozyklus von Iromycin E (63) und F (64).

Die Notwendigkeit des Stickstoffatoms für die Inhibition wurde durch die Sauerstoffanaloga **110, 111** und **112** untersucht (Abb. 54). Die Substanzen waren Zwischenprodukte in der Synthese von **13, 108** bzw. **106**.^[203] Mit IC₅₀-Werten von 4800 bzw. 2500 ng/mL (**111, 112**) bzw. > 8097 ng/mL (**110**) sind sie weitgehend unwirksam. Die Anwesenheit des Stickstoffs ist daher essentiell für die Aktivität.



Abb. 54: Derivate 110, 111 und 112 enthalten statt des Stickstoffs ein Sauerstoffatom.^[203]

Der Einfluss einer freien Hydroxyfunktion in para-Stellung zum Stickstoff wird in der Literatur als besonders wichtig beschrieben.^[202b] Daher wurden Iromycin A (**13**) und Iromycin B (**14**) mit Diazomethan methyliert bzw. mit Acetylchlorid acetyliert (Abb. 55). Durch HPLC (Säule 3, Programme siehe Experimenteller Teil B.III.7) konnten die gewünschten Produkte **113** und **114** bzw. **115** und **116** aus einem komplexen Produktgemisch als Reinstoffe isoliert werden und waren so einer biologischen Untersuchung zugänglich. Eine Methylierung von **13** an 4'-OH setzt die Aktivität auf $IC_{50} = 890$ ng/mL um den Faktor 6 herab, während eine Acetylierung das Produkt unwirksam macht ($IC_{50} = > 8097$ ng/mL). Beide Iromycin B (**14**)-Derivate **114** und **116** sind unwirksam ($IC_{50} = > 8097$ ng/mL).



Abb. 55: Durch Methylierung (**113**, **114**) und Acetylierung (**115**, **116**) wurde der Einfluss der 4'-Hydroxygruppe auf die Aktivität der Verbindungen untersucht.

Die 4'-OH Gruppe hat somit einen großen Einfluss auf die Aktivität, der Unterschied der Aktivität zwischen dem methylierten und dem acetylierten Produkt könnte durch sterische Effekte oder Polarität zu erklären sein.

In	Tabelle 5	5 sind	alle IC ₅₀	der	untersuchten	Derivate	zusammengefasst.
			20				\mathcal{O}

X 7 1 · 1		10	10	
Verbindung	Strukturelle Modifikation	IC_{50}	IC_{50}	IC_{50}/IC_{50}
		(ng/mL)	(µM)	von 13
Piericidin A_1 (72)	-	2.1	0.005	67
Iromycin A (13)	-	140	0.461	1
Iromycin B (14)	Hydroxylierung der Seitenkette von 13	5700	17.8	0.025
Iromycin C (61)	Propionat-Startereinheit	1020	3.52	0.14
Iromycin D (62)	Hydroxylierung der Seitenkette von 61	>8097	>26.5	< 0.017
Iromycin E (63)	Hydroxylierung des Heterozyklus	>8097	>25.3	< 0.017
Iromycin F (64)	Hydroxylierung des Heterozyklus	>8097	>25.3	< 0.017
Iromycin S (106)	Modellsubstanz mit tert-Butylgruppe	58	0.183	2.4
Iromycin T (111)	Sauerstoffderivat von 106	4800	15.1	0.056
Iromycin U (110)	Sauerstoffderivat von 13	>8097	>26.6	< 0.017
Iromycin V (112)	Sauerstoffderivat von 108	2500	8.55	0.034
Iromycin M (108)	Modellsubstanz kürzerer Seitenkette	295	1.01	0.47
Iromycin AH (107)	13 mit hydrierter Seitenkette	680	2.21	0.21
Iromycin AM (113)	Methyliertes 13	890	2.80	0.16
Iromycin AA (115)	Acetyliertes 13	>8097	>23.4	< 0.017
Iromycin BM (114)	Methyliertes 14	>8097	>24.3	< 0.017
Iromycin BA (116)	Acetyliertes 14	>8097	>22.4	< 0.017
Iromycin R (109)	Modellsubstanz ohne Seitenkette	?	?	?

Tabelle 5: Ergebnisse der Komplex I-Inhibition der untersuchten Verbindungen.

5.5 Komplex I-Inhibition durch Tryptanthrin (21)

21 ist ein literaturbekannter Inhibitor der indizierbaren NO-Synthase (siehe Kapitel III.5). Iromycin A (**13**) ist in der Lage, bei den offenbar ähnlichen Strukturräumen der NO-Synthase und des Komplex I eine Inhibition zu erzielen. Ob auch andere iNOS und Komplex I-Inhibitoren in der Lage sind, beide Proteine zu inhibieren, sollte durch Testung von Tryptanthrin (**21**) ermittelt werden. **21** erwies sich im Test auf eine mögliche Komplex I- Inhibition allerdings als unwirksam (IC₅₀ => 8097 ng/mL). Es ist daher davon auszugehen, dass nicht alle NOS-Inhibitoren gleichzeitig Inhibitoren das Komplex I sind.



5.6 Weitere Wirkungen von Komplex I-Inhibitoren wie Piericidin (72)

Die mitochondriale Atmungskette ist ein wichtiges Target für diverse Arten von Pestiziden.^[204] Entkoppler verhindern die Ausbildung des Protonengradienten, während Inhibitoren speziell einzelne Komplexe hemmen. So wird Komplex IV durch Cyanid, Komplex III durch die Strobilurine, Komplex II durch Carboxin und Komplex I durch Rotenon gehemmt (Abb. 5.1).^[197]

Rotenon bindet fast an dieselbe Stelle im Komplex I wie Piericidin (72). Im Gegensatz zu Rotenon konnte Piericidin (72) aber bisher nicht als Insektizid eingesetzt werden, da es eine sehr starke Humantoxizität und äußerst geringe Stabilität aufweist.

Die antimikrobielle und cytotoxische Aktivität der Piericidine scheinen auf einer Inhibition des Komplex I zu beruhen. Komplex I-Inhibitoren können Apoptose auslösen, da es durch die Hemmung der Atmungskette zu einer Bildung von reaktiven Sauerstoff-Spezies kommt, was letztlich das Programm der Apoptose ablaufen lässt.^[205] Allerdings ist die therapeutische Breite aufgrund des unspezifischen Targets äußerst gering.^[190] Bei den Glucopiericidinen scheint das Verhältnis von Aktivität zu Toxizität etwas besser zu sein.^[187] Auch scheint keine direkte Proportionalität zwischen Inhibition des Komplex I und der Cytotoxizität zu existieren. BOGER et al. folgern daraus, dass die Cytotoxizität nicht nur auf einer Inhibition des Komplex I beruht.^[202b] Durch eine fortgesetzte Studie zur Struktur-Wirkungs-Beziehung der ungiftigen Iromycine (**13, 14, 61-64**) könnten sich die für die Toxizität verantwortlichen Strukturteile identifizieren lassen.

In einem Zellassay konnte eine potente Inhibiton der Interleukin-2-Produktion (IL-2) durch **72** gezeigt werden.^[206] Ebenso wie Cyclosporin eine Immunantwort durch Hemmung der IL-2 Produktion unterdrückt, könnte auch Piericidin bei Organtransplantationen oder Autoimmunkrankheiten von Nutzen sein.

Die analoge Wirkung von Actinopyron (**68-70**) weist darauf hin, dass die Wirkung auf einem vom Komplex I verschiedenen Target beruht.^[207] Daneben scheinen die Glucopiericidine

unwirksam zu sein.^[187] Es erscheint daher möglich, die Toxizität bei Erhalt der IL-2-Wirkung herabzusetzen.

Weiterhin ist bei dem 4'-Desmethoxypiericidin eine vasodilatierende Wirkung beschrieben worden ($EC_{50} = 0.2 \ \mu M$).^[191] Diese ist auch von dem strukturell ähnlichen Actinopyron (**68**-**70**) bekannt.

Daneben sind noch die Inhibition der Teilung von Seestern-Eiern durch Piericidin C₅ und $C_6^{[194a]}$ sowie die Kontrolle von Fouling-Organismen beschrieben.^[208] Beide Wirkungen sollten auf einer Inhibition des Komplex I beruhen.

5.7 Weitere Biologische Tests der Iromycine

13 und 14 wurden im Rahmen einer Kooperation mit der BASF AG auf herbizide, insektizide und fungizide Aktivität getestet.

Als insektizide Testorganismen dienten dabei *Anthonomus grandis* (Baumwollkapselrüßler), *Certitis capitata* (Mittelmeerfruchtfliege), *Heliothis virescens* (Eulenfalter) und *Megoura viciae* (Bohnenblattlaus). Dabei war keine insektizide Aktivität festzustellen.

Auch im fungiziden Test mit *Phytophtora infestans* (Kraut- und Knollenfäule), *Botrytis cinerea* (Grauschimmel), *Pyricularia oryzae* (Reisbrand) und *Septoria tritici* (Blattdürre des Weizens) sowie im herbiziden Test mit *Abuliton theophrasti* (Samtpappel), *Alopecurus myosuroides* (Acker-Fuchsschwanz), *Avena fatua* (Flughafer) *Echinochloa crus-galli* (Hühnerhirse), *Setaria faberi* (Fabers Borstenhirse) und *Setaria italica* (Kolbenhirse) waren keine Auffälligkeiten zu beobachten.

Die Metaboliten **13** und **14** wurden gemäß der NCI-Richtlinien von W. BEIL (Institut für Pharmakologie, Medizinische Hochschule Hannover) auf ihre cytotoxische Wirkung gegen die Krebszelllinien HM02 (Margenkarzinom), HepG2 (Leberkarzinom) und MCF7 (Mammakarzinom) untersucht, wiesen jedoch keine Aktivität auf ($IC_{50} > 10 \mu g/mL$).

Im Plattendiffusionstest gegen *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* und *Mucor hiemalis* wies **13** eine schwache Inhibition von *S. aureus* und *B. subtilis* auf, während **14** komplett unwirksam war.^[38]

In einem von der BRAIN AG durchgeführten Plattendiffusionstest mit *Actinomyces viscosus*, *Streptococcus mutans*, *Propionibacterium acnes*, *Corynebacterium amycolatum*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Candida glabrata* wies **13** eine schwache Aktivität gegen *A. viscosus* und *S. mutans* auf, während **14** keine Aktivität besaß.

In Plattendiffusionstests mit den Grünalgen Chlorella vulgaris, Chlorella sorokiniana und Scenedesmus subspicatus zeigten die Iromycine (13, 14) keine Aktivität. Offenbar reicht die Inhibierungsaktivität der Iromycine nicht aus, um über die Komplex I-Wirkung *in vivo* eine Wirkung auf pro- bzw. eukaryotische Organismen zu entfalten. Die Wachstumshemmung von *B. subtilis* und *S. aureus* könnte eher auf einer Inhibition der bakteriellen NO-Synthase beruhen (siehe Kapitel III.6.3).

5.8 Ausblick und Diskussion

Für die Piericidine sind eine Reihe von sehr viel versprechenden Wirkungen beschrieben worden. Einem kommerziellen Einsatz steht jedoch die hohe Humantoxizität und geringe Stabilität der Verbindungsklasse entgegen. Die mangelnde Toxizität der Iromycine könnte in folgenden Untersuchungen dazu genutzt werden, die für die Toxizität verantwortlichen Strukturteile zu identifizieren und durch strukturelle Variationen selektiv die Giftigkeit der Piericidine bei Erhalt der Wirksamkeit herabzusetzen.

Die insektizide Wirkung des Piericidins (72) sowie die Cytotoxizität scheint direkt mit der Inhibition des Komplex I verknüpft zu sein. Eine Verminderung der Toxizität durch Variation der Strukturbestandteile wird daher höchstwahrscheinlich auch mit einer Absenkung der erwünschten Wirkungen verbunden sein.

Günstiger erscheint die Lage bei der Vasodilatation und der immunsuppressiven Wirkung. Diese scheinen nicht mit der Inhibition des Komplex I verknüpft zu sein. Ein anderes Target lässt eine differenzierte Struktur-Wirkungs-Beziehung erwarten. Daher sollte eine gezielte Verminderung der Toxizität nicht zwangsläufig eine Absenkung der Wirksamkeit nach sich ziehen.

Als erster Schritt wird die Synthese eines Hybridantibiotikums (117) vorgeschlagen (Abb. 56), das den Heterozyklus von Piericidin A_1 (72) und die Seitenkette von Iromycin A (13) trägt. 117 sollte daher die Aktivität des Piericidins mit der Stabilität des Iromycins vereinen.





Eine weitere synthetisch leicht durchführbare Variation ist die Länge der kurzen Seitenkette. Anhand von 4-Hydroxypyridinen und 4-Hydroxychinolinen wurde bereits gezeigt, dass in dieser Position Substituenten größer als eine Methylgruppe die Aktivität gegen den Komplex I herabsetzen.^[209] Ein Iromycinderivat mit kürzerer zweiter Seitenkette könnte deshalb eine größere Aktivität besitzen.

Derartige Variationen könnten helfen, den bisher nicht nutzbaren Naturstoff Piericidin (72) zu einem weniger toxischen, aber dennoch wirksamen Stoff weiterzuentwickeln.

6. NO Synthase-Inhibition

6.1 Iromycin A (<u>13</u>) in der Patentliteratur^[177]

Iromycin A (13) wurde von SUKENGA et al. 1998 zum ersten Mal als Verbindung NK26588 beschrieben. Aus 20 L eines komplexen Mediums, das 2% Glycerol, 1% Glucose, 0.5% Pepton, 0.3% Fleischextrakt, 0.3% Hefeextrakt, 0.05% Kaliumdihydrogenphosphat, 0.05% Magnesiumsulfat und 0.2% Calciumcarbonat enthielt, wurden hier nach Extraktion mit Essigsäureethylacetat durch Adsorptions-, Gelfiltrations-, Dünnschicht-Chromatographie und HPLC 14.8 mg 13 isoliert. Eine inhibitorische Wirkung gegen die induzierbare NOS wurde mit der J774.1-Zelllinie aus Makrophagen untersucht.^[210] Die NO-Menge wurde nach dem Ansatz von GREEN et al. analysiert.^[211] Dadurch konnte der IC₅₀-Wert auf 2.0 μg/mL bestimmt werden. Die Toxizität von 13 wurde durch intraperitoneale Injektion in Mäuse untersucht, eine Verabreichung von 100 mg/kg zeigte keine Anzeichen von Toxizität.

Aufgrund der Melaninbildung sowie einer spiralartigen und glatten Sporenmorphologie wurde der Stamm als *Steptomyces* klassifiziert. Die Zellwand enthält LL-Diaminopimelinsäure und die Klassen der verwendeten Menachinone sind hauptsächlich MK-9 (H6) und HK-9 (H8). Alle ISP-Zucker (L-Arabinose, D-Xylose, D-Glucose, D-Fructose, Sucrose, Inositol, L-Rhamnose, Raffinose und D-Mannitol) werden als Kohlenstoffquelle benutzt. Alle Merkmale weisen auf *S. scabies* hin, so dass es sich um diese Spezies handeln könnte. Dieser Befund unterstützt die Hypothese, dass die Produktion von Iromycin A (**13**) als ein Regulationsmechanismus der Thaxtomin A (**59**)-Biosynthese auch in anderen *S. scabies* Stämmen erfolgen könnte (siehe Kapitel III.4.8).

6.2 Humane NO Synthasen^[212]

Stickstoffoxid-Synthasen (NOS) sind häm- und flavin-enthaltende Enzyme, die die Bildung von Stickstoffmonoxid (NO) durch zwei hintereinander folgende Monoxidationen katalysieren. Das Enzym besteht aus einer Reduktase-Domäne, die strukturell den P450-Oxidasen gleicht; und einer Oxygenase-Domäne, die eine Häm-Gruppe enthält (Abb. 57).



Abb. 57: Schematischer Aufbau der NO-Synthasen

Der Elektronen-Donor ist hierbei NADPH, das zwei Elektronen auf FAD überträgt, welches diese zu FMN weiterleitet. Das FMN reduziert das Häm-Eisen zu der Oxidationsstufe +2, an das Sauerstoff binden kann. Im ersten Schritt wird Arginin zu dem instabilen Zwischenprodukt *N*-Hydroxy-L-Arginin oxidiert, das im zweiten Schritt zu Citrullin und NO oxidiert wird. Der gesamte Prozess benötigt zwei Moleküle Sauerstoff und 1.5 Moleküle NADPH (siehe Abb. 58).



Abb. 58: Bildung von NO durch die NO Synthase. NOS katalysieren die Bildung von NO aus L-Arginin durch zwei Monoxygenierungen. Das Stickstoffatom des NO stammt aus der Guanidino-Gruppe des Arginin, das Sauerstoffatom aus molekularem Sauerstoff.

Der gesamte Elektronentransportprozess der NOS ähnelt den Prozessen in P450-Cytochromen sehr; es gibt aber wichtige Unterschiede in der Regulation. NO-Synthasen benötigen die Bindung von Calmodulin. Da Calmodulin bei intrazellulären basalen Ca²⁺-Niveaus nicht an das Enzym bindet, wird der Einstrom von Calcium-Ionen zur Aktivierung des Enzyms benötigt. Andererseits ist die Substratbindung nicht Vorraussetzung zum Start des Reaktionszyklus. Daher können in Abwesenheit eines Substrates reaktive potentiell zerstörerische Sauerstoffspezies wie Superoxid oder Wasserstoffperoxid gebildet werden. Die Aktivität des Enzyms muss daher sehr genau gesteuert werden.

6.2.1 NO-Synthase-Isoformen

Es gibt drei Hauptisoformen der NOS: die neuronale (nNOS oder NOS 1), induzierbare (iNOS oder NOS 2) und endotheliale (eNOS oder NOS 3). Die Eigenschaften der Isoformen sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

Eigenschaft	nNOS	iNOS	eNOS
Molekulare Masse	160 kD	130 kD	135 kD
Expression	konstitutiv	induzierbar	konstitutiv
Zellfraktion	Cytoplasma	Cytoplasma	Membran-gebunden
Abhängigkeit von Ca ²⁺ -Einstrom	abhängig	unabhängig	abhängig
Physiologischer Zweck	Neurotransmission	Cytotoxizität	Vasodilatation
Splicingvarianten	ja	ja	ja

Tabelle 6: Eigenschaften der NOS Isoformen

Die meisten physiologischen Funktionen von Stickstoffmonooxid werden über die Aktivierung der löslichen Guanylat-Cyclase vermittelt. Dieses Enzym wandelt GTP in den Botenstoff cGMP um. Die inaktive Form der Guanylatcyclase hat ein penta-koordiniertes Häm, das durch einen Histidinrest gebunden ist. Durch Bindung des NO wird die Häm-Histidin-Bindung gebrochen und das Enzym aktiviert. Der cGMP-Spiegel wird durch das Gleichgewicht zwischen der Guanylatcyclase-Aktivität und Phosphodiesterasen (besonders der spezifischen Phosphodiesterase-5) reguliert, die cGMP in inaktives 5'-GMP hydrolysieren.

6.2.2 <u>nNOS</u>

Diese Isoform wird hauptsächlich in der Skelettmuskulatur und in Neuronen konstitutiv exprimiert. Das produzierte NO dient als Neurotransmitter sowohl im zentralen wie auch peripheren Nervensystem. Im Skelettmuskel dient NO als Mediator der Kontraktionskraft. NO ist von anderen Neurotransmittern grundverschieden, da es frei durch Membranen diffundiert und daher weder in Lipidvesikeln gespeichert noch gezielt in die Zellen wieder aufgenommen werden kann. Stattdessen wird es nach Bedarf synthetisiert und durch Reaktionen inaktiviert. Die Isoform wird erst durch den Einstrom von Calcium aktiviert.

6.2.3 <u>iNOS</u>

iNOS ist besonders in neutrophilen Granulocyten und Makrophagen, Astrocyten und Hepatocyten zu finden. Es ist an der frühen Immunantwort beteiligt und seine Expression wird durch Cytokine wie Interferon- γ , Interleukin-1, den Tumor Nekrosefaktor- α oder Endotoxine wie Lipopolysaccharide erhöht. Da Calmodulin unter basalen physiologischen Bedingungen gebunden ist, ist iNOS immer aktiv. Daher wird die Enzymaktivität auf der Transkriptionsebene geregelt.^[213] Die Menge an synthetisiertem NO ist ca. 1000 x größer als die der anderen Isoformen.

Das produzierte NO wirkt in Kombination mit Peroxynitrit als potentes Zytotoxin, seine Rolle ist die Zerstörung von Pathogenen, die von Neutrophilen und Makrophagen eingeschlossen worden sind.^[214] Pathogene sind intrazelluläre Krankheitserreger wie Parasiten (Plasmodien, Schistosomen, Leishmanien, Toxoplasmen), Mikroben (Bakterien, Mykobakterien, Pilze) und Tumorzellen. Die zellulären Targets des Stickstoffmonooxids sind metallenthaltende Häm-Proteine und Eisen-Schwefel-Proteine, aber auch Thiolgruppen und Tyrosine. Durch diese Reaktionen ergeben sich cytostatische oder cytotoxische Effekte.

NO kann allerdings auch bei Überproduktion eigenes Gewebe zerstören.^[215] Genauso wird iNOS bei chronischen Entzündungen wie Rheumatischer Arthritis, Morbus Crohn und Asthma bronchiale exprimiert.

6.2.4 <u>eNOS</u>

Diese Isoform wird besonders von Endothelzellen gebildet, welche alle Blutgefäße auskleiden, und den Herzmyozyten. Wie die nNOS wird sie konstitutiv exprimiert und durch den Einstrom von Calcium aktiviert. Das NO, das nur in pikomolaren Konzentrationen produziert wird, führt zur Entspannung der glatten Gefäßmuskulatur und somit zur Vasodilatation. Weiterhin inhibiert NO den Vasokonstriktor Angiotensin II. Beide Effekte führen daher zu einer Blutdrucksenkung.

Die NO-Synthese ist Reaktion auf den Einstrom von Calcium nach Bindung von Liganden wie Acetylcholin, Bradykinin, Histamin, Insulin oder Scherbeanspruchung des Endothels.

Die Aktivität der eNOS wird neben Protein-Protein-Interaktionen und reversiblen Phosphorylierungen durch eine zelluläre Umverteilung des Enzyms ("Trafficking") gesteuert.^[216]

6.3 Bakterielle NOS^[217]

NOS-ähnliche Proteine konnten auch in einigen Prokaryoten wie *Deinococcus rariodurans*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus halodurans*, *Staphylococcus aureus*, *Geobacillus stearothermophilus*, *Streptomyces turgidiscabies* und *Norcardia* identifiziert werden. Bakterielle NOS enthalten die meisten Schlüsselelemente der Säuger-NOS-Oxygenase-Domäne, wie die ausgedehnte Dimer-Bindungsstelle und die Häm- bzw. Substrat-Bindungsstellen.

Die katalytischen Eigenschaften sind der Säuger-NOS-Oxygenase ähnlich, allerdings haben die Enzyme eine geringere NO-Dissoziationsrate vom Häm-Cofaktor. Dies limitiert die NO-Freisetzung und ermöglicht die Nitrierung von Substratmolekülen. Die Nitrierung von Tryptophan im Zuge der Thaxtomin A (**59**)-Biosynthese ist in Kapitel III.4.4 diskutiert worden.

6.4 **Pflanzliche NOS**^[218]

In Pflanzen wurden zwei nicht verwandte NOS-ähnliche Enzyme identifiziert: eine pathogeninduzierte NOS aus *Arabidopsis* und Tabak und eine hormon-aktivierte NOS aus *Arabidopsis* sp. (AtNOS). Die iNOS zeigt eine typische NOS-Aktivität, erfordert die gleichen Cofaktoren wie das Säuger-Enzym und ist für die unspezifische Immunabwehr verantwortlich.^[219] Die AtNOS wird anscheinend konstitutiv exprimiert und mit einer NO-Produktion in Verbindung mit hormonalen Signalen gebracht.^[220]

6.5 NO-Überproduktion als Krankheitsursache

Der Mangel an Stickstoffmonooxid ist ein sehr bedeutendes Problem bei den meisten Herz-Kreislauf-Erkrankungen. Aber auch die Überproduktion von NO kann zu diversen Erkrankungen, wie cerebrale Ischämie,^[221] Neurodegenerationen^[222] (nNOS); Diabetes,^[223] akuter Entzündung,^[224] (eNOS); chronischer Entzündung,^[224] Arthritis,^[225] Asthma,^[226] Meningitis,^[227] Migräne^[228] oder septischem Schock (iNOS) führen.^[229]

Daher besteht heute ein Interesse an pharmakologisch applizierbaren Inhibitoren der NO-Produktion.^[230] Unter anderem sind folgende Typen von Inhibitoren entwickelt worden:^[231]

- 1) Substratanaloga
- 2) starke Liganden zum Häm-Fe(III)
- 3) Konkurrenten der Tetrahydrobiopterin-Bindungsstelle
- 4) Dimerisierungs-Inhibitoren

Bei Applikation eines unspezifischen Inhibitors sind durch gleichzeitige Hemmung mehrerer Isoformen unerwünschte Nebenwirkungen möglich. N^{ω} -Methyl-L-Arginin (NNA, **102**), ein unspezifischer Inhibitor, wurde in klinischer Phase III als Medikament gegen septischen Schock eingesetzt. Leider verschlechterte der Einsatz durch Nebenwirkungen die Überlebensrate der Patienten.^[232] Dies unterstreicht den Bedarf nach Isoform-spezifischen Inhibitoren. Leider erwies sich bislang *in vivo* kein Inhibitor als spezifisch.

6.6 Selektive NOS-Inhibition von Iromycin A-C (<u>13, 14, 61</u>)

Im Rahmen dieser Arbeit wurde in Kooperation mit M. SCHLEICHER aus der Arbeitsgruppe S. OESS (Biochemie II/ Universität Frankfurt) die Inhibition von **13**, **14** und **61** auf die nNOS und eNOS Isoformen untersucht. Dazu wurden Eierstockzellen des Chinesischen Hamsters, die humane eNOS und nNOS exprimieren, mit einem Ca²⁺-Ionophor (A23187) in Gegenwart oder Abwesenheit von **13**, **14** und **61** stimuliert.

Bezüglich des eNOS-Zellassays zeigte Iromycin A (13) eine starke inhibitorische Aktivität, die durch Konzentrations-Bestimmung des Reaktionsproduktes Citrullin nachgewiesen wurde. 13 ist deutlich stärker potent als 61, während das hydroxylierte 13 nur ein schwacher Inhibitor ist. Als Kontrolle wurde die Produktion von Citrullin in stimulierten Zellen mit bzw. ohne den bekannten Inhibitor NNA (102) genutzt (Abb. 6.3).

Im Gegensatz dazu wurde keine signifikante Aktivität der Iromycine (13, 14, 61) auf die nNOS Isoform festgestellt (Abb. 59).



Abb. 59: Effekt der Iromycine A-C (13, 14, 61) auf die eNOS- bzw. nNOS-Aktivität

Die Iromycine (100 μ M) wurden 30 min vor der Stimulation mit A23187 (3 μ M) zugegeben und die eNOS und nNOS Aktivität durch einen Arginin zu Citrullin Umsatz Assay bestimmt,^[233] umgerechnet als Differenz zur Citrullin Produktion in Gegenwart des NOS Inhibitors L-NNA (100 μ M) und als Relativwerte ausgedrückt. Ähnliche Ergebnisse wurden mit 200 μ M Iromycin A-C (**13**, **14**, **61**) erhalten (bas: basale Aktivität).

6.7 Diskussion der Ergebnisse

Von besonderem Interesse ist, dass 13, 14 und 61 differenziert auf die NOS-Isoformen wirken.

Die Experimente zeigen in Verbindung mit den Ergebnissen von SUKENGA et al., dass die Iromycine auf die eNOS- und die iNOS-Isoformen in mikromolarer Größenordnung einwirken, wogegen die nNOS nicht wesentlich beeinflusst wird.

Durch die unterschiedliche Inhibition der eNOS- und nNOS- Isoformen könnte sich Iromycin A (13) beispielsweise als molekulares Hilfsmittel für Untersuchungen an Herzmuskelzellen oder Endothelzellen eignen. Diese Zellen exprimieren sowohl die eNOS als auch die nNOS Isoform, von der durch die Iromycine aber nur die eNOS inhibiert wird.

Da sowohl die eNOS als auch die iNOS gehemmt wird, sind die Iromycine keine selektiven Inhibitoren im eigentlichen Sinne.^[234] Trotzdem könnten sie als Leitstruktur für eine Medikamentenentwicklung dienen. Überproduktion von NO durch die iNOS kann zu fatalem Blutdruckabfall führen, der als septisch/cytokin-induzierter Kreislaufschock bekannt ist. Weil in diesem Fall die gleichzeitige Hemmung der iNOS und der eNOS erwünscht ist, ist der Einsatz von Iromycin A (**13**) als Medikament gegen den septischen Schock denkbar.

Erfolg versprechend ist, dass bislang weder *in vitro* im Cytotoxizitätstest noch *in vivo* im Mausmodell eine signifikante Toxizität festgestellt werden konnte.^[38,177]

So wird deutlich, dass bei Vorliegen ähnlicher Strukturräume im bakteriellen Zielprotein und humanem Proteinen Naturstoffe als sehr gut geeigneter Ausgangspunkt für Arzneimittelentwicklungen dienen können.

In Kooperation mit N. OPITZ (Faculty of Medicine, Nursing & Health Science/Monash University) werden die Iromycin A-C (13, 14, 61) auf Inhibition aller drei Hauptisoformen getestet, um direkt vergleichbare Daten zu erhalten. Die Ergebnisse liegen allerdings noch nicht vor.

Daneben sollen die weiteren natürlichen Iromycine D-F (**62-64**), semisynthetische bzw. synthetische Derivate (siehe Kaptitel III.5.6) getestet werden, um Einblicke in die Struktur-Wirkungs-Beziehung zu erhalten. Es wird erwartet, Hinweise auf notwendige strukturelle Molekülteile für die selektive Inhibition zu erhalten. Ziel der Synthese neuartiger Derivate wird sein, unter Erhalt oder Steigerung der Aktivität die Isoform-Spezifität zu verbessern.

Aus der Analyse von Co-Kristallen der iNOS und nNOS mit Inhibitoren wird abgeleitet, dass Guanidinium-ähnliche Strukturmotive mit langen Ketten gute Kandidaten für rationale Isoform-spezifische Medikamentenentwicklung sind.^[235] Daher könnten sich die strukturell ähnlichen Iromycine als Ausgangspunkt eignen.

IV. Zusammenfassung der Ergebnisse

Metagenomprojekt

Im Rahmen eines BMBF-Verbundprojektes wurden von der Firma BRAIN AG und der Arbeitsgruppe SCHLEPER eine Metagenombank der mikrobiellen Symbiontenfraktion des Schwamms *Aplysina aerophoba* erstellt. Diese wurde hinsichtlich der Bildung von Sekundärstoffen untersucht. Um eine optimale Produktion zu erreichen, mussten die Standardprotokolle für die Kultivierung von *E. coli* angepasst werden. Es wurde eine Kombination aus chemischem und biologischem Screening etabliert, um die in einem Overlay-Assay aufgefallenen aktiven Prinzipien isolieren zu können.

Dadurch konnten drei Sekundärstoffe aus den beiden aktiven Klonen erhalten und ihre Strukturen aufgeklärt werden. Bei Brevinsäure (18) und Tryptanthrin (21) handelt es sich um literaturbekannte Verbindungen, die jedoch erstmals mittels Metagenom-Ansatz erhältlich wurden. Die Struktur 19 ist neu, sie wurde bisher weder als Naturstoff noch als Syntheseprodukt beschrieben. Für 19 wurde der Name Brevinsulfoxid vorgeschlagen.



Die biologische Aktivität von 18, 19 und 21 wurde im Plattendiffusionstest gegen die Testorganismen *Bacillus subtilis, Staphylococcus aureus, Escherichia coli* und *Candida albicans* profiliert. Für 18 konnte keine Aktivität festgestellt werden. 19 weist eine außergewöhnlich hohe Aktivität gegen *B. subtilis, S. aureus* und *C. albicans* und 21 gegen *B. subtilis, S. aureus* und *E. coli* auf. Weiterhin weist 21 eine Aktivität in einem von der BRAIN AG durchgeführten Test gegen *C. amycolatum* auf.

Für die Brevinsäure (18), Brevinsulfoxid (19) und Tryptanthrin (21) wurden Biosynthesehypothesen formuliert. 21 entsteht wahrscheinlich durch Kondensation von Anthranilsäure (33) und Isatin (28). Durch Vergleich mit strukturell ähnlichen Verbindungen wurde abgeleitet, dass ein Teil der Brevinsäure (18) über den Shikimat-Biosyntheseweg aufgebaut wird; mit diesem Teil wird Homocystein kondensiert. Dies ist der erste Naturstoff, der über eine derart komplexe Biosynthese aufgebaut wird und durch die Methode des Metagenomverfahren, die weltweit derzeitig höchstes Intresse erfährt, isoliert werden konnte. Das bioaktive Derivat **19** entsteht durch biosynthetische oder artifizielle Oxidation des Schwefelatoms. Es wurde eine Syntheseroute entwickelt, um größere Mengen von Brevinsäurederivaten inkl. **19** herstellen zu können. Oxidierte Brevinsäurederivate könnten sich wegen ihrer strukturellen Ähnlichkeit zu bekannten cytotoxischen Substanzen Conicachinonen (**34**, **35**) bzw. Halenachinonen (**36**, **37**) und Xestochinonen (**38**, **39**) beispielsweise in der Krebstherapie eignen.

Abschließend wurde das Projekt kritisch diskutiert und der Metagenomansatz bewertet. Am Erfolg-versprechendsten erscheint, eine Metagenombank in *E. coli* abzulegen und im sequenzorientierten Analyseverfahren auf das Vorhandensein von mit Sekundärstoffen assoziierten Genen für PKS oder NRPS zu prüfen. Nach Umklonierung der positiven Cosmide in einen kompetenteren Wirt wie *Streptomyces, Bacillus* oder *Pseudomonas*, würde sich ein funktionsorientiertes Analyseverfahren wie ein chemisches Screening oder ein Aktivitätsassay anschließen.

Untersuchungen an Streptomyces sp. Dra17

Die Frage zur Biosynthese des neuen Pyridons mit seinen zwei ungewöhnlichen Seitenketten wurde durch Fütterungsexperimente mit ¹³C-markierten Verbindungen erfolgreich adressiert. Durch Zufütterung von abgewandelten Vorläufern, die von der Valeriansäure abgeleitet wurden, wurde die Substratspezifität der vermuteten Polyketid-Synthase-Biosynthese untersucht. Es wurde kein Einbau von 2-Hexensäure-, 5-Chlorvaleriansäure- und 2-Methylbuttersäure-SNAC-Estern festgestellt, so dass von einer hohen Substratspezifität auszugehen ist und keine Naturstoffanaloga durch die Methode der Vorläufer-dirigierten Biosynthese gewonnen werden können.



¹⁵N-markierte Verbindungen wurden zu wachsenden Kulturen zugegeben, um die Herkunft des Stickstoffatoms zu klären. Während bei Zugabe von ¹⁵N-Ammonium ein sehr hoher Einbau festgestellt wurde, war bei Zugabe von ¹⁵NO₃ keine Inkorporierung festzustellen. Daraus wurde gefolgert, dass der Überträger des Stickstoffatoms wahrscheinlich direkt dem Ammoniumpool entstammt und nicht über die Inkorporierung von Aminosäuren eingeführt wird.

Die in der Diplomarbeit begonnenen molekularbiologischen Experimente zur Auffindung des Iromycingencluster wurden fortgesetzt. Durch Verdaue mit den Endorestriktionsnucleasen *Bam*HI, *Kpn*I und *Sau*AIII wurden die von der Firma COMBINATURE AG bezogenen PKS-positiven Klone der Cosmidbank kartiert. Acht ausgewählte Cosmide wurden durch Elektroporation in *E. coli* ET12567 überführt und durch intergenerische Konjugation in *S. lividans* und *S. coelicolor* eingebracht. Das Screening nach heterolog-exprimiertem Iromycin (13, 14) erbrachte einen auffälligen Metaboliten. Bei Kultivierung eines Klons im 10 L-Maßstab konnte lediglich eine verzweigte Fettsäure (83) isoliert werden.

Das Cosmid 2 wurde vollständig sequenziert und annotiert (Kooperation mit T. WEBER/ Universität Tübingen). Die darauf befindlichen Gene weisen keine Ähnlichkeit zu der vorhergesagten Organisation eines hypothetischen Iromycin-Genclusters auf. Es wurde ein Polyketidfragment abgeleitet, dass durch die Gene voraussichtlich entsteht und mit bekannten Naturstoffen verglichen.

Das Genom des vom Sanger-Institut sequenzierten Organismus *Streptomyces scabies* 87.22 wurde auf das Vorhandensein des Iromycin-Biosynthesegenclusters geprüft. Es konnte neben einem kleineren Gencluster unbekannter Funktion der für die Biosynthese des Concanamycin (97, 98) notwendige Gencluster identifiziert werden. Gene für die Iromycinbiosynthese wurden nicht gefunden.

Durch Zugabe von Ancymidol (94) konnte nachgewiesen werden, dass der Stamm das produzierte Iromycin A (13) zu Iromycin B (14) oxidiert. Ein derartiger Abbau eines Sekundärmetaboliten im eigenen Produzentenstamm durch ein Bakterium ist bisher nicht in der Literatur beschrieben worden.

Durch Fermentaionen in größeren Maßstäben (10 L und 50 L) konnten vier weitere Mitglieder der Iromycin-Familie identifiziert werden. Diese Minderkomponenten wurden Iromycin C bis F (**61-64**) genannt.

Durch Variation der Kultivierungsbedingungen konnte die Produktion von Thaxtomin A (**59**) stabilisiert und gesteigert werden. Dazu wurden verschiedene Medien auf die Produktion von **59** getestet, die Kultivierungsbedingungen variiert und eine Fermentationskurve aufgenommen.

Es wurde die Hypothese entwickelt, dass die Biosynthese des Thaxtomin A (**59**) durch die inhibitorische Wirkung des Iromycin A (**13**) auf der Ebene der bakteriellen NO-Synthase gesteuert wird. Durch ein Fütterungsexperiment wurde bewiesen, dass durch Zugabe von **13** die Menge an gebildetem **59** zurückgeht. Allerdings wurde das Experiment durch Abbau von **13** zu **14** erschwert. Die Regulation der Biosynthese eines Sekundärstoffs durch einen anderen Sekundärstoff ist in dieser Form bisher nicht bekannt.

Die Struktur von Iromycin (13) wurde mit bekannten Naturstoffen verglichen. Aufgrund struktureller Ähnlichkeit von 13 mit Piericidin A_1 (72) wurde 13 in Kooperation mit B. KUNZE (HKI/Braunschweig) auf eine mögliche Inhibition des Komplex I getestet. Es wurde eine Wirkung festgestellt, die schwächer als die des Piericidins (72) ist; Iromycin A (13) zeichnet sich jedoch durch eine viel höhere Stabilität aus und stellt damit ein attraktives Werkzeug für molekulare Untersuchungen der Atmungskette dar. Durch Testung der anderen Mitglieder der Iromycinfamilie (13, 14, 61-64) wurde die Inhibition des Komplex I weiter analysiert.

Zur Ermittlung der Struktur-Wirkungs-Beziehung wurden partialsynthetische Methyl- (113, 114), Acetyl- (115, 116) und hydrierte Derivate (107) der Iromycine (13, 14) hergestellt und getestet. Nach Reinigung durch HPLC wurden Zwischenprodukte (110-112) und Variationen (106, 108) der von S. HAYDAR durchgeführten Iromycin-Totalsynthese in die Untersuchungen mit einbezogen.

Dadurch konnte ein für die Aktivität notwendiges Strukturfragment ermittelt werden. Es ist dem des Piericidins (72) sehr ähnlich. Durch Vergleich der Struktur-Wirkungs-Beziehungen des Iromycins mit Piericidin (72) könnten wichtige Informationen abgeleitet werden, so dass durch gezielte Veränderung der Struktur von 72 eine Anwendung von Derivaten der Naturstoffe ermöglicht werden könnte.

In Kooperation mit der BASF wurden **13** und **14** umfangreichen Tests auf herbizide, insektizide und fungizide Aktivität unterzogen. Es konnte keine Aktivität festgestellt werden. Da andere starke Inhibitoren des Komplex I jedoch herbizide, insektizide und fungizide

Wirkungen aufweisen, wird angenommen, dass die Hemmung des Komplex I duruch die Iromycine (13, 14, 61-64) nicht ausreicht, um *in vivo* eine Toxizität auf pro- und eukaryotische Zellen zu verursachen.

In Kooperation mit S. OESS (Biochemie II/Universität Frankfurt) wurde die Inhibition der endothelialen und neuronalen Isoformen der NO-Synthase durch Iromycin A (13), B (14) und C (61) untersucht. Es wurde eine selektive Wirkung von 13 und in schwächerem Maße 61 gegenüber der endotheliale NOS Isoform festgestellt, während die neuronale NOS praktisch nicht beeinflusst wird. 14 ist nur ein sehr schwacher Inhibitor. 13 eignet sich daher als molekulares Werkzeug zur Unterscheidung der Isoformen.

Der Einsatz von NOS-Inhibitoren als Arzneimittel wurde diskutiert. Substanzen wie **13**, die auch auf die induzierbare NOS Isoform wirken,^[177] sind pharmazeutisch als Chemotherapeutika gegen septischen Schock geeignet.

IVa. Summary of the results

Metagenom project

Within a BMBF joint project a metagenome library from the symbiotic fraction of the sponge *Aplysina aerophoba* was established by BRAIN AG and the working group SCHLEPER. This library has been screened for natural products. To get optimal production of secondary metabolites, standard protocols for cultivation of *E. coli* must be adapted. A combination of chemical and biological screening strategies has been established for the isolation of the active principles from an overlay screening experiment.

Using this technique three natural products from two active clones were isolated and structure elucidated. Brevinic acid (18) and tryptanthrin (21) were already known as natural products. The name brevinsulfoxide was suggested for the new metabolite 19.



The biological activity of **18**, **19** and **21** was profiled in an agar gel diffusion assay against the test organisms *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Candida albicans*. No activity was detected for **18**; **19** is strongly active against *B. subtilis*, *S. aureus* and *C. albicans* respectively. **21** tests positive against *B. subtilis*, *S. aureus* and *E. coli*. In addition, BRAIN tested **21** as an active against *C. amycolatum*.

Hypothesis for biosynthesis were developed for brevinic acid (18) and tryptanthrin (21). 21 is probably formed via a condensation of anthranilic acid (33) and isatin (28).

Due to structurally similar compounds it was concluded that **18** is built up via the shikimiacid pathway. This compound is condensed with a homocysteine molecule. The bioactive derivative **19** evolves from **18** by biological or artifical oxidation of the sulphur atom.

A synthetic route was developed to be able to synthesize higher amounts of brevinic acid (18) and oxidized derivatives including 19. Oxidized derivatives of brevinic acid (18) have a structural similarity to the known cytotoxic compounds conicaquinonene (34, 35),

halenaquinonene (36, 37) and xestoquinonene (38, 39). So they might qualify in cancer therapy.

Finally the project was critically reviewed and the metagene approach was evaluated. Most promising appears a metagenome library in *E. coli*, which is screened for genes of the secondary metabolism like PKS- or NRPS- gene clusters in a sequence-driven analysis. After transforming positive cosmids into more competent hosts like *Streptomyces*, *Bacillus* or *Pseudomonads* an overlay-assay or chemical screening would follow as a function-driven analysis.

Investigations with Streptomyces sp. Dra17

The biosynthesis of the new pyridone with two uncommon side chains was addressed successfully by feeding experiments of ¹³C labelled compounds. The specificity of putative PKS genes was analyzed by feeding experiments with possible precursors modified from valeric acid. No incorporation of these substances was detected, so precursor directed biosynthesis seems to be impractical to get natural product analogues.



¹⁵N-labelled precursors were added to growing cultures of the strain to clarify the origin of the nitrogen atom. Whereas a high incorporation rate was detected after feeding ¹⁵N-ammonia, no incorporation was detected after feeding ¹⁵NO₃. It was concluded that the carrier of the nitrogen atom derives from ammonia pool and that nitrogen is not incorporated by incorporation of an amino acid.

The genetic investigations for the discovery of the biosynthetic gene cluster of the iroymcins (13, 14, 61-64) started in the diploma thesis were continued. 36 PKS-positive clones of the cosmid library made by COMBINATURE AG were mapped through digestions with restriction endonucleases *Bam*HI, *Kpn*I und *Sau*AIII. Eight selected cosmids were transferred into *E. coli*

ET12567 by electroporation and following into *S. lividans* und *S. coelicolor* by intergeneric conjugation. The screening for heterologously expressed iromycin (**13**, **14**) yielded a noticeable metabolite. A branched fatty acid **83** was isolated after cultivating a clone carrying cosmid 2 in 10L scale.

"Cosmid 2" was fully sequenced and annotated (cooperation with T. WEBER/University of Tübingen/Germany). The genes found had no similarity to the predicted organisation of a hypothetic iromycin gene cluster. A polyketide fragment was deduced from the sequence and compared with known natural products.

The genom of *Streptomyces scabies* 87.22, which has been sequenced by the Sanger-Institute, was checked for a possible iromycin gene cluster. A gene cluster was found which is necessary for the biosynthesis of the concanamycins (**97**, **98**) along with a smaller cluster of unknown function. Obvious genes for the biosynthesis of iromycin A (**13**) were not found.

Through addition of ancymidol (94) to growing cultures of *S. bottropensis* Dra17 a conversion of iromycin A (13) into iromycin B (14) was demonstrated. Such an oxidative degradation of a secondary metabolite in the bacterial producing strain has not been known in literature before.

Minor components were found after fermentations in 10 L and 50 L scale. These members of the iromycin family were named iromycin C-F (**61-64**).

The thaxtomin A (59) production was stabalized and enhanced. For that purpose production of 59 has been determined in different media, the conditions for cultivation were varied and the time-dependency of production has been studied.

A hypothesis was established that the biosynthesis of thaxtomin A (59) is regulated by the inhibitory activity of iromycin A (13) on the level of the bacterial NO synthase. A decrease of 59 production was demonstrated by feeding 13. This experiment was complicated by degradation of 13 to 14. A regulation of the biosynthesis of a secondary metabolite by another secondary metabolite in this way is completely new.

The structure of iromycin (13) was compared with structures of other natural products. Due to a structural similarity of 13 to piericidin A_1 (72) iromycin A (13) was tested in cooperation with B. KUNZE (HKI Braunschweig/Germany) for a possible inhibition of complex I. 13 is active, but weaker as 72. By testing the other members of the iromycin family (13, 14, 61-64) the inhibition of complex I was analyzed. Partial synthetic methyl (113, 114), acetyl (115, 116) and hydrogenated (107) derivatives of the iromycins (13, 14) were synthezised and tested. After purification of intermediates (110-112) and variations (106, 108) of the total synthesis of S. HAYDAR these compounds were tested, too. So a necessary part of the structure for activity was shown. In comparing the the structure-activity-relationships of 13 and 72, it should be possible to gain information on how to modify the structures for favoured effects.

In cooperation with BASF AG **13** und **14** were tested for herbicide, insecticide and fungicide activity. No activity was detected. Due to the herbicide, insecticide or fungicide activity of strong inhibitors of complex I it is assumed that the activity of iromycins (**13**, **14**, **61-64**) is not strong enough for causing cytotoxicity of pro- and eukaryotic cells.

In cooperation with S. OESS (Biochemistry II/University of Frankfurt) iromycin A-C (13, 14, 61) were tested for inhibition of the endothelial (eNOS) and neuronal (nNOS) isoforms of nitrogen monoxide synthase. A selective inhibition of the eNOS isoform was detected. In contrast no impact on nNOS was found. 13 is a more potent inhibitor than 61 whereas 14 is only a weak inhibitor. Because of that 13 qualifies as a molecular tool for the biochemical differentiation of the isoforms.

The application of NOS inhibitors as drugs was discussed. Due to the inhibition of the inducible NOS isoform, substances like **13** might be suitable as a drug against septic shock.

B. EXPERIMENTELLER TEIL

I. Allgemeines

1. Instrumentelle Analytik

Massenspektren:

EI-MS: <u>Finnigan</u> MAT 95, 70 eV;
ESI-MS: <u>Finnigan</u> LC-Q;
HR-ESI-MS: <u>Bruker</u> Apex-Q III, 7 Tesla.
HR-ESI-MS: <u>Bruker</u> Apex IV, FT-ICR 7 Tesla.
DCI-MS: <u>Finnigan</u> MAT 95, 200 eV (Reaktandgas: NH₃);
Hochauflösungen wurden mit Perfluorkerosin als Vergleichssubstanz gemessen, die relativen Intensitäten beziehen sich auf den Basispeak (I = 100 %) und sind in Klammern angegeben.

Infrarotspektren:

Alle IR-Spektren wurden mit einem FT-IR-Spektrometer <u>Perkin-Elmer</u> Modell 1600 als KBr-Preßlinge gemessen.

Abkürzungen: br = breit, sh = Schulter.

Elektronenspektren (UV):

Alle Elektronenspektren wurden mit einem Spektrometer <u>Varian</u> Modell Cary 3E gemessen. Methanol/HCl bzw. Methanol/NaOH: Zu 2 mL methanolischer Lösung wurde jeweils ein Tropfen 2 N HCl bzw. 2 N NaOH gegeben. Die Wellenlänge λ ist in [nm] angegeben, der molare Extinktionskoeffizient ε in [1000 cm² mol⁻¹] und wird über nachfolgende Gleichung berechnet (Gleichung gilt für einen Ansatz von 10 mL Meßlösung):

$$\varepsilon = \frac{E * Molmasse * 10}{Einwaage [mg]}$$

Drehwerte:

Alle Drehwerte wurden mit einem Polarimeter <u>Perkin-Elmer</u> Modell 343 bestimmt, die Drehwerte $[\alpha]_D^{20}$ sind in $[10^{-1} \text{ deg cm}^2/\text{g}]$ angegeben, die Konzentrationen c in $[10^{-2} \text{ g/mL}]$, br = breit.

Circulardichroismus-Spektren:

<u>Jasco</u> J 500 mit <u>Jasco</u> IF 500 A/D-Wandler und <u>BMC</u> IF 800 Personalcomputer als Prozessor. Die molaren Elliptizitäten θ sind in [10⁻¹ grad cm² mol⁻¹] angegeben.

¹H-NMR-Spektren:

<u>Varian</u> Inova-600 (600 MHz), <u>Varian</u> Inova-500 (500 MHz), <u>Varian</u> Mercury-300 (300 MHz), <u>Varian</u> Unity-300 (300 MHz). Chemische Verschiebungen in $\delta_{\rm H}$ -Werten (ppm) relativ zum Lösungsmittel als internem Standard; Kopplungskonstanten (*J*) in Hertz (Hz). Abkürzungen: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett, dd = Dublett vom Dublett, ddd = Dublett vom Dublett vom Dublett vom Dublett, ddd = Dublett vom Dublett vom Dublett, td = Triplett, dd = Triplett vom Dublett, td = Triplett vom Triplett, dd = Nulliplett, td = Triplett vom Dublett, dd = Nulliplett, dd = Nulliplett, td = Triplett vom Dublett, td = Triplett vom Triplett, quin = Quintett, dquin = Dublett vom Quintett, tm = Triplett im Multiplett, m = Multiplett, br = breit. Alle ¹H-NMR-Spektren wurden näherungsweise als Spektren erster Ordnung interpretiert.

¹³C-NMR-Spektren:

<u>Varian</u> Inova-600 (150.8 MHz), <u>Varian</u> Inova-500 (125.7 MHz), <u>Varian</u> Mercury-300 (75.5 MHz), <u>Varian</u> Unity-300 (75.5 MHz). Chemische Verschiebungen in δ_{C} -Werten (ppm) relativ zum Lösungsmittel als internem Standard. **APT** (Attached **P**roton Test): CH (d) und CH₃ (q) stehen nach oben, C (s) und CH₂ (t) stehen nach unten. ¹³C-¹H-Multiplizitäten sind aus HSQC-Experimenten in Verbindung mit APT-Experimenten ableitbar. Abkürzungen: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett.

2D-NMR-Spektren:

¹H,¹H-COSY (¹H,¹H-Correlated Spectroscopy), HSQC (Heteronuclear Singular Quantum Coherence), HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Connectivity), HMQC (Heteronuclear Multiple Quantum Coherence), NOESY (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy), TOCSY (Total Correlation Spectroscopy).

2. Chromatographische Methoden

Dünnschichtchromatographie (DC):

HPTLC-Nano-Fertigplatten Kieselgel 60 F_{254} (Merck): 10 x 10 cm, Schichtdicke 0.2 mm; DC-Alufolien Kieselgel 60 F_{254} (Merck): 20 x 20 cm, Schichtdicke 0.2 mm; DC-Alufolien RP-18 F_{254s} (Merck): 20 x 20 cm, Schichtdicke: 0.2 mm.

Angegeben sind R_f-Werte (Laufhöhe relativ zur Laufmittelfront).

Sprühreagenzien:

Nach Merck, Anfärbereagenzien für die Dünnschichtchromatographie.²³⁶

Die DC-Platten wurden nach dem Ansprühen auf ca. 120°C erwärmt.

<u>Anisaldehyd (Anis, Nr. 21):</u> 1 mL Anisaldehyd gab man in eine Lösung aus 85 mL Methanol, 10 mL Eisessig und 5 mL konz. Schwefelsäure.

<u>Orcin-Sprühreagenz</u> (Orcin, *Nr. 120-122*): 1 g Eisen-(III)-chlorid wurde in 100 mL Schwefelsäure gelöst und zu gleichen Anteilen mit einer Orcinlösung (6 % in Ethanol) gemischt.

<u>Ehrlich Reagenz (Ehrlich, Nr. 91)</u>: 1 g 4-Dimethylaminobenzaldehyd wird in einer Mischung von 25 mL Salzsäure (36 %) und 75 mL Methanol gelöst.

<u>Salkowski-Reagenz für Indole (Salkowski, Nr. 128):</u> 1 mL Eisen(III)-chloridlösung (0,5 mmol/L) wird mit 50 mL Perchlorsäure (35 %) gemischt.

Palladiumchlorid (*Nr. 251*): 0.5 g Palladium-(II)-chlorid wurde in 100 mL Wasser mit einigen Tropfen Salzsäure (25 %) gelöst.

Säulenchromatographie:

ICN Kieselgel 60 (KG), 0.032–0.063 mm; Fluka Sephadex LH-20.

Adsorberharze:

Serva Amberlite[®] XAD-2.

Ermittlung von R_f-Werten:

Zur Bestimmung von R_{f} -Werten wurden 0.5 mg der zu untersuchenden Reinsubstanz in einem entsprechenden Lösungsmittel (p.a.) gelöst. Es wurde so auf DC-Alufolien aufgetragen, dass ein Vorlauf von 5 cm eingehalten wurde. Die Gesamt-Laufstrecke des Laufmittels betrug mindestens 15 cm. Die Detektion erfolgte mittels der unten beschriebenen Sprühreagentien.

Mitteldruckchromatographie: Pumpe: <u>Kronwald</u> HPP-100/ I 50, Lobar Fertigsäule, Säulenmaterial: <u>Merck</u> LiChroprep RP-18, Größe C, 40-63 µm.

High Performance Liquid Chromatography (HPLC):

• *LC-MS*:

Pumpe: <u>Flux Instruments</u> Rheos 4000; Autosampler: <u>Jasco</u> AS-851 (0 – 100 μ L variable Aufgabeschleife); UV-Detektor: <u>Finnigan</u> Surveyor; Massendetektor: <u>Finnigan</u> LC-Q; Entgaser: <u>Flux Instruments</u> ERC-3415 α ; Steuersoftware HPLC: <u>Flux Instruments</u> Janeiro; Datensystem: <u>Finnigan</u> Xcalibur; UV-Detektion: 200-800 nm, Masse: positive und negative Ionen.

• HPLC 1 (analytisch):

Pumpe: <u>Kontron</u> P 322 System; Autosampler: <u>Kontron</u> Sa 360; Detektor: <u>Kontron</u> Dioden Array Detektor 440; Mischkammer: <u>Kontron</u> HPLC 360; Software: <u>Kontron</u> Kroma System 2000 Version 1.60; analytische Auftragsschleife: 20 µL.

• HPLC 2 (semipräparativ):

Pumpe: Jasco PU-1580; Detektoren: Jasco UV-1570 M, CD-995; Software: Jasco Borwin Version 1.50; Mischeinheit: Jasco LG-1580-02; Lösungsmittelentgaser: Jasco DG-1580-53; Autosampler: Jasco AS 1555; semi-präparative Auftragsschleife: 500 μL.

• HPLC 3 (präparativ):

Pumpe: Jasco PU-1587; UV-Detektor: Jasco UV/VIS 1575; Software: Jasco Borwin Version 1.50; präparative Auftragsschleife: 2 mL.

HPLC-Säulen:

- 1: <u>Grom</u> Supersphere 100 C18, 4 μ m, 100 mm x 2 mm.
- 2: <u>Grom</u> Supersphere 100 C18, 4 µm, 100 mm x 8 mm.
- 3. Grom Supersphere 100 C18, 4 μ m, 100 mm x 20 mm.
- 4: <u>Macherey-Nagel</u> Nucleodur 100 C18, 5 μm, 250 mm x 3 mm.
- 5: <u>Macherey-Nagel</u> Nucleodur 100 C18, 5 μm, 250 mm x 8 mm.
- 6: <u>Macherey-Nagel</u> Nucleodur 100 C18, 5 μm, 250 mm x 21 mm.
- 7: <u>Jasco</u> Kromasil 100 C18, 5 μm, 250 x 4 mm.
- 8: <u>Jasco</u> Kromasil 100 C18, 5 μm, 250 x 8 mm.

- 9: <u>Jasco</u> Kromasil 100 C18, 7 μm, 250 mm x 20 mm.
- 10: <u>Jasco</u> Nucleosil 100 C8, 5 μm, 250 mm x 3 mm.
- 11: <u>Jasco</u> Nucleosil 100 C8, 5 μm, 250 mm x 8 mm.
- 12: <u>Jasco</u> Nucleosil 100 C8, 5 μm, 250 mm x 20mm

HPLC-Programme:

Laufmittelsystem: Lösung A: Wasser Lösung B: Methanol Lösung C. Acetonitril

- Lösung A: Wasser mit 0.05% ige HCOOH und Lösung B: MeOH mit 0.05% HCOOH, Gradient von 80% Lösung A zu 100% Lösung B in 20 min, in 10 min auf 100% Lösung B, Flußrate 0.3 mL/min (analytisch), 2.5 mL/min (semipräparativ) bzw. 14 mL/min (präparativ).
- Lösung A: Wasser und Lösung C: AcCN, Gradient von 55% Lösung A zu 100% Lösung C in 25 min, in 5 min auf 100% Lösung C, Flußrate 0.5 mL/min (analytisch), 2.5 mL/min (semipräparativ) bzw. 17 mL/min (präparativ).
- Lösung A: Wasser mit 0.1% ige TFA und Lösung B: MeOH mit 0.1% TFA, Gradient von 90% Lösung A zu 100% Lösung B in 25 min, in 5 min auf 100% Lösung B, Flußrate 0.3 mL/min (analytisch), 2.5 mL/min (semipräparativ) bzw. 14 mL/min (präparativ).
- Lösung A: Wasser mit 0.01%ige HCOOH und Lösung B: MeOH mit 0.01% HCOOH, Gradient von 90% Lösung A zu 50% Lösung B in 10 min, zu 100% Lösung B in 10 min, in 5 min auf 100% Lösung B, Flußrate 0.3 mL/min (analytisch), 2.5 mL/min (semipräparativ) bzw. 14 mL/min (präparativ), UV-Detektion bei 210 nm.
- Lösung A: Wasser mit 0.01%ige HCOOH und Lösung B: MeOH mit 0.01% HCOOH, Gradient von 55% Lösung A zu 75% Lösung B in 25 min, in 5 min auf 75% Lösung B, Flußrate 0.3 mL/min (analytisch), 2.5 mL/min (semipräparativ) bzw. 14 mL/min (präparativ), UV-Detektion bei 254 nm.
- 6. Lösung A: Wasser und Lösung B: AcCN, Gradient von 80% Lösung A zu 60% Lösung B in 25 min, in 5 min auf 60% Lösung B, Flußrate 0.5 mL/min (analytisch), 2.5 mL/min (semipräparativ) bzw. 17 mL/min (präparativ), UV-Detektion bei 290 nm.
- 7. Lösung A: Wasser und Lösung B: AcCN, Gradient von 70% Lösung A zu 50% Lösung B in 25 min, in 5 min auf 50% Lösung B, Flußrate 0.5 mL/min (analytisch), 2.5 mL/min (semipräparativ) bzw. 17 mL/min (präparativ), UV-Detektion bei 290 nm.

- 8: isokratisch 65% AcCN mit 0.05%ige HCOOH und 35% Wasser mit 0.05%ige HCOOH, Flußrate 0.5 mL/min (analytisch), 2.5 mL/min (semipräparativ) bzw. 17 mL/min (präparativ), UV-Detektion bei 280 nm.
- 9: isokratisch 50% MeOH mit 0.05% ige HCOOH und 50% Wasser mit 0.05% ige HCOOH, Flußrate 0.3 mL/min (analytisch), 2.5 mL/min (semipräparativ) bzw. 2.5 mL/min (semipräparativ), UV-Detektion bei 500 nm.
- 10: isokratisch 25% AcCN und 75% Wasser, Flußrate 0.5 mL/min (analytisch), 2.5 mL/min (semipräparativ) bzw. 17 mL/min (präparativ), UV-Detektion bei 280 nm.
- 11. Lösung A: Wasser mit 0.1%ige TFA und Lösung B: MeOH mit 0.1% TFA, Gradient von 40% Lösung A zu 100% Lösung B in 25 min, 5 min auf 100% Lösung B, Flußrate 0.3 mL/min (analytisch), 2.5 mL/min (semipräparativ) bzw. 14 mL/min (präparativ).
- Lösung A: Wasser mit 0.1%ige TFA und Lösung B: MeOH mit 0.1% TFA, Gradient von 55% Lösung A zu 100% Lösung B in 25 min, 5 min auf 100% Lösung B, Flußrate 0.3 mL/min (analytisch), 2.5 mL/min (semipräparativ) bzw. 14 mL/min (präparativ).

Lösungsmittel:

Lösungsmittel für die Säulenchromatographie wurden zuvor destilliert. Für die HPLC wurden nur analysenreine Lösungsmittel und bi-destilliertes Wasser verwendet. Vor Benutzung entgaste man Lösungsmittel für die HPLC durch jeweils 15 Minuten langes Behandeln im Ultraschallbad und anschließendes Durchleiten von Helium.

3. Mikrobiologische Methoden

Alle mikrobiologischen Arbeiten wie Stammhaltung, Überimpfen und Fermentation wurden unter den üblichen sterilen Bedingungen durchgeführt.^[237]

Nährmedienbestandteile:

Die verwendeten Nährmedienbestandteile wurden von folgenden Firmen bezogen: <u>Merck</u>: Malzextrakt, D-Glucose, Fleischextrakt, Leberextrakt, Caseinpepton. <u>Henselwerk GmbH</u>: entfettetes Sojamehl <u>Gibco BRL</u>: Hefeextrakt <u>Oxoid</u>: Hefeextrakt <u>Neuform</u>: Hafermehl (Holo Hafergold) <u>Difco</u>: BiTek Agar-Agar, Bacto-Pepton <u>AppliChem</u>: D-Glucose <u>Fluka</u>: Maltose <u>Villa Natura</u>: Biomalz

Nährmedien:

Alle Nährmedien wurden 30 min bei 121 °C und einem bar Überdruck sterilisiert. Mengenangaben beziehen sich jeweils auf einen Liter demineralisiertes Wasser, der pH-Wert wurde vor der Sterilisation mit 0.5 M NaOH bzw. 0.5 M HCl eingestellt. Festen Medien wurde 20 g/L Agar hinzugefügt.

Medium S:	Stärke 10 g/L, Glycerin 4 g/L, Caseinpepton 4 g/L, Hefeextrakt 0.5 g/L,	
	Fleischextrakt 0.5 g/L, Leberextrakt 0.5 g/L, Natriumchlorid 1 g/L, pH =	
	7.0.	
Hafer-Medium:	Hafermehl 20 g/L, Spurenelementlösung 11: 2.5 mL/L, pH = 6.5 .	
M2-Medium:	Malzextrakt 10 g/L, Hefeextrakt 4 g/L, Glucose 4 g/L, pH = 7.0.	
	Für die Stammhaltung Zusatz von CaCO3 0.3 g/L, Agar 20 g/L.	
SM-Medium:	entfettetes Sojamehl 20 g/L, Mannit 20 g/L, pH = 7.0.	
	Für die Stammhaltung Zusatz von Agar 20 g/L.	
SGG:	Glucose 10 g/L, Glycerin 10 g/L, Stärke 10 g/L, Cornsteep Powder	
	2.5 g/L, Casein-pepton 5 g/L, Hefeextrakt 2 g/L, NaCl 1 g/L, CaCO3	
	3 g/L, pH = 7.3.	
NL 1187:	Stärke 10 g/L, (NH ₄) ₂ SO ₄ 2 g/L, K ₂ HPO ₄ 1 g/L, MgSO ₄ x 7 H ₂ O 1 g/L,	
	NaCl 1 g/L, CaCO ₃ 2 g/L, Spurenelementlösung 11: 5 mL/L, pH	
	unkorrigiert.	
NL 1358:	Glycerin 30 g/L, Caseinpepton 2 g/L, K ₂ HPO ₄ 1 g/L, NaCl 1 g/L,	
	MgSO ₄ x 7 H ₂ O 0.5 g/L, Spurenelementlösung 11: 5 mL/L, pH = 7.0.	
R5:	Sucrose 103 g/L, K ₂ SO ₄ 0.25 g/L, MgCl ₂ x 6 H ₂ O 10.12 g/L, Glucose	
	10 g/L, Casaminoacids 0.1 g/L, Spurenelementlösung A 1 mL,	
	Hefeextrakt 5 g/L, TES Puffer 5.73 g/L, $pH = 6.5$, für die Stammhaltung	
	Zusatz von Agar 24 g/L; nach Autoklavieren hinzufügen: KH2PO4	
	(0.5 %) 5 mL, CaCl ₂ x 2 H ₂ O (5 M) 2 mL, L-Prolin (20 %) 7.5 mL,	

134	V. Experimenteller Teil
LB:	NaOH (1 N) 3.5 mL. Trypton-Pepton 10 g/L, Hefeextrakt 5 g/L, NaCl 5 g/L, pH = 7.0 – 7.2. Für die Stammhaltung Zusatz von CaCO ₃ 0.3 g/L, Agar 20 g/L.
2 x YT:	Bactotrypton 16 g/L, Hefeextrakt 10 g/L, NaCl 5 g/L.
STA+:	Stärke 20 g/L, L-Asparagin 1.5 g/L, KCl 1 g/L, CaCO ₃ 1 g/L, D-Glucose 1 g/L, Spurenelementlösung 11: 20 mL/L pH = 8.0.
M1:	5 g Bacto-Pepton, 3 g Fleischextrakt, pH = 7.0.

Spurenelementlösung 11: CaCl₂ x 2 H₂O 3 g/L, Fe(III)-citrat 1 g/L, MnSO₄ 0.2 g/L, ZnCl₂ 0.1 g/L, CuSO₄ x 5 H₂O 0.025 g/L, Na₂B₄O₇ x 10 H₂O 0.02 g/L, CoCl₂ 0.004 g/L, Na₂MoO₄ x 2 H₂O 0.01 g/L.

Spurenelementlösung A für *R5***-Medium:** ZnCl₂ 0.04 g/L, FeCl₃·6 H₂O 0.2 g/L, CuCl·2 H₂O 0.01 g/L, MnCl₂·4 H₂O 0.01 g/L, Na₂B₄O₇·10 H₂O 0.01 g/L, (NH₄)₂MoO₄·4 H₂O 0.01 g/L.

Schüttler und Fermenter:

<u>Braun</u> Certomat BS-1, <u>Braun</u> Certomat HK, Schüttelbrett Universität Göttingen, <u>Braun</u> Biostat M (1 L), <u>Braun</u> Biostat B (2 L, 5 L), <u>Braun</u> Biostat E (15 L), 10 L-Airlift-Fermenter, gebaut: <u>Uni Dortmund</u> (10 L, 4 vvm), <u>Braun</u> Biostat U (50 L), <u>Fischer & Porter</u> Gasflowmeter (45711M), <u>The Analytical Development Co Ltd.</u> CO₂-Analysator, <u>Ingold</u> O₂-Elektrode.

Plattendiffusionstest:

Auf die mit verschiedenen Testkeimen angeimpften Agarplatten wurden Filterplättchen (Durchmesser: 9 mm, Dicke: 0.5 mm) gelegt, die mit 40 μ L Substanzlösung (in Methanol oder Chloroform gelöst, c = 1 mg/mL) getränkt und vor dem Auflegen unter sterilen Bedingungen getrocknet worden waren. Als Testkeime dienten *Bacillus subtilis, Escherichia coli, Staphylococcus aureus* und *Candida albicans*. Die Agarplatten wurden 24 h bei 25 °C (*C. albicans*) bzw. 37 °C (*B. subtilis, E. coli* und *S. aureus*) inkubiert.

Zusammensetzung der Nährböden für die Plattendiffusionstests:

B. subtilis und E. coli: 5 g/L Glucose, 0.5 g/L Trinatriumcitrat x 2 H₂O, 3 g/L KH₂PO₄, 7 g/L K₂HPO₄, 0.1 g/L MgSO₄ x 7 H₂O, 1 g/L (NH₄)₂SO₄ und 15 g/L Agar, keine pH-Einstellung.
S. aureus: 8 g/L Bacto Nutrient Broth, 5 g/L NaCl und 15 g/L Agar, keine pH-Ein-stellung.
C. albicans: 4 g/L Hefeextrakt, 10 g/L Malzextrakt, 4 g/L Glucose und 15 g/L Agar, pH = 5.5.

Zum Ansetzen der Testplatten-Medien wurde demineralisiertes Wasser verwendet. Die Glucose wurde erst nach der 30 minütigen Sterilisation zugegeben.

UV-Lampe:

Hanau Floutest, Benda Labor- und UV-Strahler.

Ultraschallbad:

Bandelin Sonorex RK 106 S.

II. Metagenomprojekt

1. Stammhaltung E. coli und B. subtilis pC194

Zur Stammhaltung wurde 1 mL einer 14 h alten Kultur mit 1 mL 30% igem sterilen Glycerin vermischt. Bei -20 °C gelagert kann das Gemisch über mehrere Jahre als Animpfmaterial dienen.

2. Vorscreening der Hoststämme *Streptomyces* sp. B444, *Bacillus* sp. B1012, *Bacillus* sp. 1A43

Die Kultivierung der drei zu untersuchenden Host-Stämme erfolgte in drei verschiedenen Medien (LB, SGG, STA+) in 250 mL Erlenmeyerkolben ohne Schikanen, die jeweils mit 75 mL Nährlösung gefüllt waren. Die Kolben wurden mit jeweils einem 1 cm² großen Stück einer gut bewachsenen Agarplatte beimpft bei 30 °C und 180 rpm inkubiert. Nach 48 h wurden 250 mL Hauptkultur (LB, SGG, STA+) in 1 L Erlenmeyerkolben ohne Schikanen mit jeweils 20 mL Kulturbrühe angeimpft. Nach 72 h Inokulation wurden zur Aufarbeitung zu den Kulturbrühen Celite gegeben und filtriert. Das Mycel wurde 15 min im Ultraschallbad mit 200 mL Methanol und 200 mL Aceton extrahiert, durch Filtration abgetrennt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Kulturfiltrat wurde an 500 ml Amberlite[®] XAD-2 adsorbiert, mit 250 mL demineralisiertem Wasser gewaschen und mit 100 mL Aceton und 200 mL Methanol eluiert. Anschließend wurden die Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Die so erhaltenen Extrakte (Kulturfiltrat und Mycel) wurden in 1 mL Methanol gelöst und 5 μ L dieser Lösung auf eine HPTLC-Kieselgelplatte aufgetragen. Die Dünnschichtchromatogramme wurden in CHCl₃/MeOH 9:1 entwickelt. Die Analyse des Metabolitenmusters erfolgte durch Eigenfarbe, UV-Licht (254 und 366 nm) und mit Hilfe von Sprühreagenzien (Anis, Orcin, Ehrlich). Außerdem wurden von den Extrakten HPLC-ESI-MS Läufe (Säule 1, Programm 1) durchgeführt und das Metabolitenspektrum analysiert.

3. Herstellung von Testplatten mit Chloramphenicol-resistentem *B. subtilis* pC194

Der Stamm *B. subtilis* pC194 wurde in 300 mL Erlenmeyerkolben ohne Schikanen, die mit 100 mL M1-Medium gefüllt waren, nach Animpfen mit 100 µL Glycerineinlagerung 16 h bei 180 rpm und 37°C inkubiert. Am Ende der Inkubationszeit wurde die optische Dichte bestimmt.

Als Basisagar der Testplatten dienten 20 mL M1-Medium (15 g/L Agar), als Overlayagar wurden 7 mL M1-Mediums (7 g/L Agar) verwendet, das mit 0.7 mL der Übernachtkultur ($OD_{600} = 1$) versetzt worden war. Die Platten wurden maximal eine Woche bei 4°C gelagert.

4. Screening Ansatz

Die Kultivierung von E. coli EPI100, M49.K9 und M73.N2 erfolgte in 1 L Erlenmeyerkolben ohne Schikanen, die mit jeweils 250 mL LB-Medium (M49.K9 und M73.N2: Zusatz von 12.5 μ g/L Chloramphenicol) gefüllt waren. Die Kolben wurden mit 250 μ L einer Glycerineinlagerung beimpft und 48 h bei 37 °C sowie 96 h bei 20 °C mit 180 rpm inkubiert. Die vereinigten Kulturbrühen (1 L) wurden zentrifugiert (15 min, 3000 rpm). Die Zellen wurden 15 min im Ultraschallbad mit 300 mL Methanol sowie 300 mL Methanol/Aceton 1:1 extrahiert, durch Filtration abgetrennt und das Lösungsmittel entfernt. Anschließend wurden 100 mL Methanol bzw. 50 mL Aceton zugegeben und filtriert. Methanol- und Acetonextrakte wurden vereinigt.

Der Überstand wurde dreimal mit 750 mL Essigester bei pH = 5 extrahiert, die vereinigten organischen Phasen wurden im Vakuum eingeengt. Die wässrige Phase wurde lyophyllisiert und mit 300 mL Methanol/Wasser 9:1 aufgenommen. Durch Filtration wurden die unlöslichen Bestandteile abgetrennt.

Die so erhaltenen Extrakte (Zellen, Essigester und Lyophyllisat der wässrigen Phase) wurden in Methanol gelöst, wobei eine Konzentration von 3 mg/mL eingestellt wurde. Es wurde mit jeweils 50 μ L dieser Lösungen ein Plattendiffusionstest mit *B. subtilis* durchgeführt und je 5 μ L auf eine HPTLC-Kieselgelplatte aufgetragen. Die Dünnschichtchromatogramme wurden in Chloroform/Methanol 9:1 entwickelt. Die Analyse des Metabolitenmusters erfolgte durch Eigenfarbe, unter UV-Licht (254 und 366 nm) und mit Hilfe von Sprühreagenzien (Anis, Orcin, Ehrlich, Salkowski). Außerdem wurden von den Extrakten HPLC-ESI-MS Läufe (Säule 1, Programm 1) durchgeführt und das Metabolitenspektrum analysiert.

Das Kulturfiltrat von MK49.K9 wurde mittels Gelchromatographie (Sephadex LH-20/Methanol) in vier Fraktionen aufgetrennt. Die Hauptmenge des roten Pigment befand sich in Fraktion 4, während die Hauptaktivität in Fraktion 3 lokalisiert werden konnte. Die Fraktion 3 (17 mg) wurde mittels präparativer HPLC (Säule 3, Programm 1) in 15 Fraktionen aufgetrennt. Ein Plattendiffusionstest mit dem vorhandenen *B. subtilis* Stamm ergab, dass die Fraktionen 8, 12-14 den Teststamm hemmen. HPLC-ESI-MS (Säule 1, Programm 1) zeigte, dass sich in allen Fraktionen ein Stoff mit einem M+H⁺-Peak von 335 enthalten ist.

5. Klon M49.K9 Fermentation A (12 L)

Der Hitklon M49.K9 wurde in einem 12 L-Ansatz in 1 L-Erlenmeyerkolben ohne Schikanen, die mit jeweils 250 mL LB-Medium unter Zusatz von 12.5 mg/L Chloramphenicol gefüllt waren, kultiviert. Nach Zugabe von je 100 μ L Glycerineinlagerung wurden die Kolben bei 180 rpm 48 h bei 37 °C und 96 h bei 20 °C inkubiert. Zur Ernte wurde die vereinigte Kulturbrühe zentrifugiert (10 min, 3000 rpm). Die Zellen wurden 15 min im Ultraschallbad mit 250 mL Methanol sowie 250 μ L Aceton extrahiert, durch Filtration abgetrennt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Kulturfiltrat wurde bei pH = 8 und bei pH = 5 mit Essigester extrahiert und die organischen Phasen getrennt eingeengt.

<u>Isolierung</u>

Das bei pH = 8 erhaltene Kulturfiltratextrakt wurde säulenchromatographisch (Sephadex LH-20/Methanol) in vier Fraktionen getrennt, wobei sich die biologische Aktivität in Fraktion 4 befand. Präparative HPLC (Säule 3, Programm 3) ergab 8.0 mg Chloramphenicol (**15**). Um die Reisolierung von **15** zu verhindern, wurden alle weiteren Aktivitätsuntersuchungen mit dem Chloramphenicol-resistenten Stamm *B. subtilis* pC194 durchgeführt.

Durch Gelchromatographie (Sephadex LH-20/Methanol) wurde das bei pH = 5 erhaltene Kulturfiltratextrakt in 10 Fraktionen getrennt, wobei die biologische Aktivität in den Fraktionen 6a, 6b und 7 eingeengt werden konnte. Die Fraktion 7 wurde durch eine weitere Trennung an Sephadex (Methanol) in 5 Fraktionen aufgetrennt. Da sich 74 und 75 als aktiv und in der analytischen HPLC als sehr ähnlich erwiesen, wurden diese Fraktionen vereinigt.

6a und 74-5 wurden mittels präparativer HPLC an einer Supersphere-Säule (Säule 3, Programm 1) in 11 bzw. 10 Fraktionen aufgetrennt. Es erwiesen sich jeweils drei Fraktionen

als biologisch aktiv gegen *B. subtillis* pC194 (6d, g, i; 74e, f, h). Nach Vereinigung der aktiven Fraktionen und Trennung durch präparative HPLC (Säule 8, Programm 8) konnten keine Reinsubstanzen erhalten werden.

Fraktion 8 wurde in Aceton gelöst, das unlösliche rote Pigment wurde mit anderen unlöslichen Komponenten durch Filtration abgetrennt. Durch Präparative HPLC (Säule 3, Programm 2) wurden 0.3 mg eines roten Pigments (16) erhalten.

Fraktion 9 wurde durch Gelchromatographie (Sephadex LH-20/Methanol) in 8 Fraktionen aufgetrennt. Fraktion 97 (0.8 mg) enthält als Hauptkomponente einen gelben Farbstoff (**20**).

6. Fermentationskurven MK49.K9 und M73.N2

Um die Zeitabhängigkeit der Metabolitenproduktion der Stämme MK49.K9 und M73.N2 zu bestimmen wurden die Stämme 6 Tage bei 500 rpm und einer Belüftung von 2 vvm in je 2 L LB-Medium unter Zusatz von 12.5 μ g/L Chloramphenicol bei 37 °C kultivert. Die ersten 3 Tage wurde alle 6 h eine Probe von 10 mL entnommen, ab dem 4. Tag alle 24 h. Dabei wurden die OD-Werte der entnommenen Proben bestimmt und kontinuierlich die pH und pO₂-Werte der Fermenter gemessen. Die Proben wurden im Vakuum lyophylisiert, anschließend wurde mit 10 ml Methanol extrahiert. Nach Filtrieren wurde das Lösungsmittel entfernt. Um die biologische Aktivität festzustellen, wurde die Proben in 500 μ L Methanol gelöst und jeweils 50 μ L im Plattendiffusionstest mit *B. subtilis* pC194 aufgetragen. Dabei zeigte sich, dass die maximale biologische Aktivität nach ca. 2 d erreicht war und nach ca. 4 d wieder abnahm.

7. Fermentationskurve M73.N2

Die Fermentationskurve wurde zur Einschätzung der Reproduzierbarkeit mit dem Stamm M73.N2 wiederholt. Dazu wurde 5 Tage bei 500 rpm und einer Belüftung von 2 vvm in 5 L LB-Medium unter Zusatz von 12.5 μ g/L Chloramphenicol bei 37 °C kultiviert. Es wurden je 30 mL Probe nach 0; 2,5; 5; 10; 19, 21 Stunden, weiterhin nach ca. 2, 3, 4 und 5 Tagen entnommen. Zur Aufarbeitung wurden jeweils 20 mL Essigester hinzugefügt, zentrifugiert und die organische Phase nach Abtrennung evaporiert.

Zur Durchführung eines Plattendiffusionstest wurden die Proben in 1 mL Methanol gelöst und davon 50 μ L auf Testplättchen aufgetragen. Es zeigte sich, dass die 4 Tage alte Probe die maximale Aktivität gegen den Chloramphenicol-resistenten Stamm *B. subtilis* PC194 aufwies.

8. Isolierung von Reinsubstanzen aus Fermentationkurven M73.N2

Die verbleibenden Kulturlösungen der Fermentationskurven von M73.N2 wurden im Ultratorax behandelt und anschließend bei pH = 5 mit Essigsäureethylester extrahiert. Die organischen Phasen wurden im Vakuum evaporiert und anschließend vereinigt.

Das Kulturfiltrat von M73.N2 wurde mittels Gelchromatographie (Sephadex LH-20/Methanol) in 16 Fraktionen aufgetrennt. Es zeigte sich im Plattendiffusionstest, dass die Hauptaktivität in den Fraktionen 7-10 lag. Die Fraktionen 7-9 wurden vereinigt und mittels Gelchromatographie (Sephadex LH-20/Dichlormethan) in 12 Fraktionen aufgetrennt, wodurch die biologische Aktivität in Fraktion 2 konzentriert wurde. Durch präparative HPLC (Säule 6, Programm 2, UV-Detektion 220 nm) konnten 0.5 mg Tryptanthrin (**21**) isoliert werden.

Durch präparative HPLC (Säule 6, Programm 1, UV-Detektion 220 nm) wurde die Fraktion 10 (3.7 mg) aufgetrennt und es wurden 0.8 mg (**22**) erhalten.

9. Nachweis von Tryptanthrin (21) im Rohextrakt von M73.N2

Der Stamm M73.N2 wurde in 300 mL Erlenmeyerkolben ohne Schikanen 120 h bei 180 rpm in 75 mL LB-Medium unter Zusatz von 12.5 μ g/L Chloramphenicol kultiviert, die Temperatur betrug die ersten 48 h 37 °C, die letzten 96 h der Fermentation 20 °C. Es wurden jeweils 3 Kolben von M73.N2, dem leeren Host-Stamm und des LB-Mediums mit 0 g/L, 1 g/L und 5 g/L Tryptophan kultiviert.

Zur Aufarbeitung wurden die Kulturlösungen im Ultraschallbad behandelt und anschließend bei pH = 7.2 zweimal mit 200 mL Essigsäureethylester extrahiert. Die organischen Phasen wurden im Vakuum evaporiert und der Rückstand in Methanol aufgenommen. Es waren in der HPLC-ESI-MS (Säule 1, Programm 1) weder die Massen 248 noch 221 nachzuweisen. Daher wurden die Probe von M73.N2 mit 50 mL Benzol aufgenommen und erneut mittels HPLC-ESI-MS (Säule 1, Programm 1) untersucht; wiederum mit negativem Ergebnis. Auch der biologische Test zeigte nicht signifikant, dass der Extrakt des transformierten Produzentenstammes im Vergleich zur Kontrolle eine antibiotische Wirkung besitzt.

10. Isolierung von Reinsubstanzen aus Fermentation B (50 L) MK49.K9

Der Stamm M49.K9 wurde im BRAUN Biostat U-Fermenter 69 h bei 200 rpm in 50 L LB-Medium unter Zusatz von 12.5 μ g/L Chloramphenicol kultiviert, die Temperatur betrug 37 °C, die letzten 16 h der Fermentation 20 °C.

Zur Aufarbeitung wurde die Kulturlösung im Ultratorax behandelt und anschließend bei pH = 5 mit 200 L Essigsäureethylester extrahiert. Die organischen Phasen wurden im Vakuum evaporiert. Der Kulturfiltrat-Extrakt wurde durch Säulen-Chromatographie an Kieselgel (CH₂Cl₂: CH₃OH 98:2 \rightarrow 7:3) in 13 Fraktionen getrennt. Die biologisch aktive Fraktion 3 wurde durch Säulen-Chromatographie an Kieselgel (Cyclohexan: Essigester 1:1 \rightarrow 1:3) in 8 Fraktionen aufgetrennt. Präparative HPLC (Säule 3, Programm 5) der aktiven Fraktion 5 ergab 34.3 mg Phenylessigsäure (17), die in Aktivitätstests gegen *B. subtilis* pC194 eine schwache Aktivität zeigte.

Die biologisch aktiven Fraktionen 9-12 wurden vereinigt und in eine Essigester-lösliche und eine Methanol-lösliche Fraktion aufgetrennt. Die Essigester-lösliche Fraktion wurde durch Säulen-Chromatographie an Kieselgel (Cyclohexan: Essigester $1:1 \rightarrow 1:5$) in 11 Fraktionen aufgetrennt. Die schwach biologisch aktive Fraktion 96 wurde durch präparative HPLC (Säule 3, Programm 4) in 12 Fraktionen aufgetrennt, die resultierende schwach aktive Fraktion 96-7-8f durch erneute präparative HPLC (Säule 3, Programm 2) in 16 Fraktionen aufgetrennt, was aber zu keiner aktiven Reinsubstanz führte.

Die Methanol-lösliche Fraktion, die das rote Pigment enthielt, wurde durch Säulen-Chromatographie an Kieselgel (Cyclohexan: Essigester $1:1 \rightarrow 1:5$) in 6 Fraktionen aufgetrennt. Durch semipräparative HPLC (Säule 2, Programm 9) wurden 2.3 mg Brevinsäure (18) erhalten. Durch erneute präparative HPLC (Säule 3, Programm 9) unter Zusatz von 0.05 % Ameisensäure wurden aus derselben Fraktion 0.5 mg 19 isoliert.

11. Charakterisierung der Metaboliten

Chloramphenicol (15)

 $C_{11}H_{12}N_2O_5Cl_2 \qquad (322.02)$

 $R_t = 7.6 \min (HPLC-MS, Säule 1, Programm 1)$

ESI-MS: $m/z = 323 [M+H]^+$.

HR-ESI-MS: berechnet m/z = 323.01960

gefunden m/z = 323.01990 (Abweichung 0.9 ppm)

¹**H-NMR** (300 MHz, CD₃OD): δ = 3.60 (dd, *J* = 11 Hz, 7 Hz, 1H, 3'-CH_aOH), 3.80 (dd, *J* = 11 Hz, 7 Hz, 1H, 3'-CH_bOH), 4.12 (m, 1H, 1'-H), 5.15 (d, *J* = 3 Hz, 1H, 2'-H), 6.22 (s, 1H, 2-H), 7.64 (d, *J* = 8 Hz, 2H, H_{aryl}), 8.17 (d, *J* = 8 Hz, 2H, H_{aryl}) ppm.

¹³C-NMR (75.5 MHz, CD₃OD): $\delta = 58.5$ (d, C-1'), 62.2 (t, CH₂OH), 67.4 (d, C-2), 71.3 (d, C-2'), 124.1 (s, C_{arvl}), 128.3 (s, C_{arvl}), 148.6 (s, C_{arvl}), 151.6 (s, C_{arvl}), 166.6 (s, C-1) ppm.

16 aus Fermentation A (E. coli M49.K9)

 $C_{31}H_{31}N_4O_{16} \ ? \ (716.18)$

 \mathbf{R}_{t} = 18.9 min (HPLC-MS, Säule 1, Programm 1)

ESI-MS: $m/z = 716 [M]^+$.

HR-ESI-MS: berechnet m/z = 716.18078

gefunden m/z = 716.18168 (Abweichung 1.26 ppm)

ESI-MS: $m/z = 715 [M-H]^{-}$.

HR-ESI-MS: berechnet m/z = 715.17405

gefunden m/z = 715.17417 (Abweichung 0.16 ppm)



Phenylessigsäure (17)

 $C_8H_8O_2$ (136.05) farbloser Feststoff

 \mathbf{R}_{t} = 7.8 min (HPLC-MS, Säule 1, Programm 1)

EI-MS: $m/z = 136 (42) [M]^+, 91 (100) [C_7H_9]^+.$ HR-EI-MS: berechnet m/z = 136.0524gefunden m/z = 136.0520 (Abweichung 3 ppm)

¹**H-NMR** (300 MHz, CD₃OD): δ = 3.58 (s, 2H, 2-H), 7.19-7.33 (m, 5H, 4-H, 4'-H, 5-H, 5'-H, 6-H).

¹³**C-NMR** (75.5 MHz, CD₃OD): δ = 42.0 (t, C-2), 127.8 (s, C-6), 129.4 (d, C-4), 130.3 (d, C-5), 136.1 (d, C-3), 178.5 (s, C-1).

Brevinsäure (18)

(*R*)-5,11-Dioxo-5,7,8,9,10,11-hexahydro-6-thia-10-azacyclohepta[*b*]naphthalin-9-carbonsäure

C₁₄H₁₁NO₄S (289.31) Intensiv violetter Feststoff
 Rf-Wert:
 0.01 (CHCl₃/MeOH 9:1)

 0.05 (Cyclohexan/Essigester/Methanol 5:10:2)

 0.76 (Methanol/Wasser 7:3)

 $R_t = 12.4 \text{ min (HPLC-MS, Säule 1, Programm 1)}$

ESI-MS: $m/z = 290 [M+H]^+$. HR-ESI-MS: berechnet m/z = 290.048155gefunden m/z = 290.048156 (Abweichung 0.003 ppm)



IR (KBr):	$\widetilde{\mathbf{v}}$ = 3336, 2926, 2854, 1718, 1670, 1618, 1558, 1466, 1332, 1288, 1239, 1140,
	1095, 722 cm ⁻¹ .
UV (MeOH):	λ_{max} (lg ε) = 206 (16321), 292 (13708); 549 (1498);
(MeOH/HCl):	λ_{max} (lg ε) = 206 (15005), 289 (14071); 534 (1368);
(MeOH/NaOH	I): $\lambda_{\text{max}} (\lg \varepsilon) = 207 (19434), 292 (13682); 556 (1515) \text{ nm}.$

V. Experimenteller Teil

 $[\alpha]_{D}^{20} = +1100^{\circ} (c = 1.0, Methanol)$

CD (MeOH) $\lambda_{\text{extr}} \text{ nm} ([\Theta]^{20}) = 207 (-41), 239 (+18), 269 (-15), 295 (+20), 430 (0), 565 (+9).$

- ¹**H-NMR** (600 MHz, CD₃OD): $\delta = 2.21$ (m, 1H, 8-H_a), 2.47 (m, 1H, 8-H_b), 3.09 (dd, J = 16 Hz, 6 Hz, 1H, 7-H_a), 3.67 (dq, J = 16 Hz, 6 Hz, 1H, 7-H_b), 5.40 (br d, J = 6 Hz, 1H, 9-H), 7.62 (t, J = 7.5 Hz, 1H, 2-H),^{*1} 7.68 (t, J = 7.5 Hz, 1H, 3-H),^{*1} 7.91 (d, J = 7.5 Hz, 1H, 4-H),^{*2} 7.94 (d, J = 7.5 Hz, 1H, 1-H)^{*2} ppm.
- *1,*2: Die Zuordnung der Signale untereinander ist nicht gesichert.

¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD): δ = 31.5 (t, C-7), 32.2 (t, C-8), 55.9 (d, C-9), 116.7 (s, C-5a), 126.9 (d, C-1),^{*1} 127.4 (d, C-4),^{*1} 131.6 (s, C-4a), 133.8 (d, C-3),^{*2} 134.2 (s, C-11a),^{*3} 135.5 (d, C-2),^{*2} 147.4 (s, C-10a), 174.9 (s, COOH), 180.0 (s, C-11), 182.9 (s, C-5) ppm.
*1,*2, *3: Die Zuordnung der Signale untereinander ist nicht gesichert.

Brevinsulfoxid (19)

(R)-5,6,11-Trioxo-6,7,8,9,10,11-hexahydro-5H-6 λ^4 -thia-10-azacyclohepta[*b*]naphthalin-9-carbonsäure



 $C_{14}H_{11}NO_5S$ (305.31)

Orangeroter Feststoff

*R*_f-Wert:
 0.89 (CHCl₃/MeOH 9:1)

 0.87 (Cyclohexan/Essigester/Methanol 5:10:2)

 0.26 (Methanol/Wasser 7:3)

 $\mathbf{R}_{t} = 6.5 \min (HPLC-MS, Säule 1, Programm 1)$

ESI-MS: $m/z = 306 [M+H]^+$.

HR-ESI-MS: berechnet m/z = 306.043070

gefunden m/z = 306.043147 (Abweichung 0.25 ppm)

UV (MeOH/HCl): $\lambda_{max} = 232, 260, 424.$

 $[\alpha]_{D}^{20} = -30^{\circ} (c = 1.0, \text{Methanol})$

¹H-NMR (600 MHz, Aceton-d₆): δ = 2.45 (ddt, J = 13 Hz, 6 Hz, 1 Hz, 1H, 7-H_a), 2.79 (m, 1H, 7-H_b), 2.92 (dd, J = 14 Hz, 6 Hz, 1H, 8-H_a), 3.35 (dd, J = 14 Hz, 6 Hz, 1H, 8-H_b), 5.00 (td, J = 12 Hz, 5 Hz, 1H, 9-H), 7.81 (dt, J = 7.5 Hz, 1 Hz, 1H, 3-H),^{*1} 7.91 (dt, J = 7.5 Hz, 1 Hz, 1H, 2-H),^{*1} 8.09 (dd, J = 7.5 Hz, 1 Hz, 1H, 4-H),^{*2} 8.12 (dt, J = 7.5 Hz, 1 Hz, 1H, 1-H)^{*2} ppm.

*1,*2: Die Zuordnung der Signale untereinander ist nicht gesichert.

¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD): $\delta = 30.7$ (t, C-8), 43.9 (d, C-9), 79.5 (t, C-7), 126.3 (s, C-11a), 127.5 (d, C-4),^{*1} 127.9 (d, C-1),^{*1} 128.4 (s, C-4a), 131.7 (s, C-5a), 134.2 (d, C-3),^{*2} 136.6 (d, C-2),^{*2} 152.0 (s, C-10a), 181.2 (s, C-11),^{*3} 182.2 (s, C-5),^{*3} ppm.

*1,*2, *3: Die Zuordnung der Signale untereinander ist nicht gesichert.

20 aus Fermentation E. coli M49.K9

Gelber Feststoff

 $R_{t} = 16.6 \text{ min (HPLC-MS, Säule 1, Programm 1)}$ ESI-MS: $m/z = 360 [M+H]^{+}$. $m/z = 358 [M-H]^{+}$. UV (MeOH/HCl): $\lambda_{max} = 228, 284, 468$. ¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD): $\delta = 0.89$ (m), 2.03 (m), 5.33 (t, J = 5 Hz, 1H), 6.92 (m, H_{aryl}, 1H), 7.19 (dt, J = 7 Hz, 1 Hz, H_{aryl}, 1H), 7.26 (dd, J = 6 Hz, 3 Hz, H_{aryl}, 1H), 7.52 (dd, J = 6 Hz, 3 Hz, H_{aryl}, 1H) ppm.

Tryptanthrin (21)

C₁₅H₈N₂O₂ (248.06)

gelber Feststoff

*R***⁺Wert:** 0.88 (CHCl₃/MeOH 9:1) 0.86 (CEM 5:10:2) 0.19 (MW 7:3)



 $\mathbf{R}_{t} = 14.0 \min (HPLC-MS, Säule 1, Programm 1)$

- **ESI-MS:** $m/z = 249 [M+H]^+$.
- **HR-EI-MS:** berechnet m/z = 249.06588gefunden m/z = 249.06585 (Abweichung 0.1 ppm)

 $[\alpha]_{D}^{20} = -80^{\circ} (c = 1.0, Methanol)$

¹H-NMR (600 MHz, CD₂Cl₂): δ = 7.43 (dt, J = 8 Hz, 1 Hz, 4-H), 7.68 (dt, J = 8 Hz, 1.5 Hz, 9-H), 7.79 (dt, J = 8 Hz, 1.5 Hz, 2-H), 7.85 (dd, J = 8 Hz, 1.5 Hz, 10-H), 7.87 (ddt, J = 8 Hz, 1.5 Hz, 0.5 Hz, 3-H), 7.98 (dd, J = 8 Hz, 0.5 Hz, 8-H), 8.41 (dd, J = 8 Hz, 0.5 Hz, 11-H), 8.60 (td, J = 8 Hz, 0.5 Hz, 5-H) ppm.

¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD): δ = 118.0 (d, C-5), 122.4 (s, C-5a), 124.0 (s, C-7a), 125.4 (d, C-3), 127.4 (d, C-4), 127.7 (d, C-11), 130.4 (d, C-9), 130.8 (d, C-8), 135.3 (d, C-10), 138.5 (d, C-2), 144.7 (s, C-6a), 146.6 (s, C-1a), 146.9 (s, C-11a), 158.3 (d, C-12), 182.8 (s, C-6) ppm.

22 aus Fermentation E. coli M73.N2

 $C_{15}H_{11}NO$ (221.09) gelber Feststoff $R_t = 14.8 \min (HPLC-MS, Säule 1, Programm 1)$

ESI-MS: $m/z = 222 [M+H]^+$.

HR-EI-MS: berechnet m/z = 222.091340gefunden m/z = 222.091422 (Abweichung 0.4 ppm) UV (MeOH/HCl): $\lambda_{max} = 240, 268.$ ¹**H-NMR** (600 MHz, CD_2Cl_2): $\delta = 4.04$ (q, J = 7 Hz, 2 H), 5.80 (s, 1 H), 6.73 (m, 1H), 6.77 (m, 1 H), 6.88 (dt, J = 7 Hz, 1 Hz, 2 H), 7.04 (dd, J = 8 Hz, 1 Hz, 1 H), 7.33 (dd, J = 8 Hz, 1 Hz, 1 H), 7.36 (dd, J = 8 Hz, 1 Hz, 1 H), 9.9 (br s, 1 H) ppm.

¹³**C-NMR** (125 MHz, CD₃OD): $\delta = 40.3$, 112.1, 115.6, 119.1, 120.3, 121.9, 124.1, 128.1, 130.3, 136.6, 138.1, 156.4 ppm.

12. Synthesen

Darstellung von DL-Homocystein (40)

DL-Homocystein wurde ausgehend von (*RS*)-3-Amino-thia-2cyclopentanon Hydrochlorid (DL-Homocystein Thiolacton·HCl) (Alfa Aesar) nach der Vorschrift von BÜDY et al. dargestellt.^[238]

HS H₂N^wCOOH

40

(*RS*)-3-Amino-thia-2-cyclopentanon Hydrochlorid (500 mg, 3.27 mmol) wurde in 5 M NaOH gelöst und 15 min bei 40 °C gerührt. Die Umsetzung wurde dünnschichtchromatographisch überprüft und das Produkt ohne weitere Aufarbeitung im nachfolgenden Schritt verwendet.

Darstellung von (*RS*)-5,11-Dioxo-5,7,8,9,10,11-hexahydro-6-thia-10-azacyclohepta-[*b*]naphthalin-9-carbonsäure (42)

2,3-Dichloro-1,4-naphtochinon (734 mg, 3.27 mmol) wurde in Methanol (40 mL) gelöst und über 15 min bei 0 °C mit der im vorausgehenden Schritt dargestellten Lösung von DL-Homocystein (3.27 mmol) versetzt. Die Reaktionsmischung wurde 10 min bei 0 °C und 15 min bei 25 °C gerührt. Die Reaktion wurde dünnschichtchromatographisch verfolgt.

Zur Aufarbeitung wurde die Lösung im Vakuum eingeengt, durch Zugabe von 2 M HCl auf pH = 1 eingestellt und mit Essigester (3x 100 mL) extrahiert. Nach Entfernung des Lösungsmittels im Vakuum wurden durch Säulenchromatographie an Kieselgel (Lösungsmittel Dichlormethan/Methanol 4:1) 0.964 g der Titelverbindung in quantitativer Ausbeute als violetter Feststoff erhalten.



42

C₁₄H₁₁NO₄S (289.05) Intensiv violetter Feststoff

Schmelzpunkt: 148 °C

 \mathbf{R}_{t} = 13.1 min (HPLC-MS, Säule 1, Programm 1)

ESI-MS: $m/z = 290 [M+H]^+$.IR (KBr): $\tilde{v} = 3420, 2961, 2926, 1668, 1595, 1558, 1474, 1331, 1288, 1219, 1140 cm^{-1}$.UV(MeOH): $\lambda_{max} (\lg \varepsilon) = 233 (9643), 290 (16173); 554 (1806);$
(MeOH/HCl): $\lambda_{max} (\lg \varepsilon) = 233 (9763), 288 (16680); 536 (1645);$
(MeOH/NaOH): $\lambda_{max} (\lg \varepsilon) = 235 (9325), 289 (15780); 554 (1734) nm.$

¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD): δ = 2.20 (ddt, J = 14 Hz, 6 Hz, 2 Hz, 1H, 8-H_a), 2.47 (m, 1H, 8-H_b), 3.09 (ddd, J = 16 Hz, 6 Hz, 2 Hz, 1H, 7-H_a), 3.68 (m, 1H, 7-H_b), 5.40 (dd, J = 11 Hz, 6 Hz, 1H, 9-H), 7.62 (dt, J = 7.5 Hz, 2 Hz, 1H, 2-H),^{*1} 7.68 (dt, J = 7.5 Hz, 2 Hz, 1H, 3-H),^{*1} 7.90 (dd, J = 7.5 Hz, 2 Hz, 1H, 4-H),^{*2} 7.94 (dd, J = 7.5 Hz, 2 Hz, 1H, 1-H)^{*2} ppm.
*1,*2: Die Zuordnung der Signale untereinander ist nicht gesichert.

¹³C-NMR (75.5 MHz, CD₃OD): δ = 31.5 (t, C-7), 32.2 (t, C-8), 47.7 (d, C-9), 116.6 (s, C-5a), 127.0 (d, C-1),^{*1} 127.4 (d, C-4),^{*1} 131.6 (s, C-4a), 133.8 (d, C-3),^{*2} 134.2 (s, C-11a),^{*3} 135.5 (d, C-2),^{*2} 147.4 (s, C-10a), 174.9 (s, COOH), 180.0 (s, C-11), 182.8 (s, C-5) ppm.
*1,*2, *3: Die Zuordnung der Signale untereinander ist nicht gesichert.

Darstellung von (RS)-5,6,11-Trioxo-6,7,8,9,10,11-hexahydro-5H- $6\lambda^4$ -thia-10-azacyclohepta[b]naphthalin-9-carbonsäure (44)

Eine Lösung von **42** (180 mg, 0.61 mmol) in 6 mL Eisessig wurde bei 0 °C mit H₂O₂-Lösung versetzt (140 μ L, 30 % ig in H₂O). Die Reaktionsmischung wurde anschließend 24 h bei 25 °C gerührt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Säulenchromatographie an Kieselgel (Dichlormethan/Methanol 4:1) ergab 91.0 mg der Titelverbindung **44** (0.30 mmol, 49 %) als orangeroten Feststoff.



C₁₄H₁₁NO₅S (305.31) Orangeroter Feststoff Schmelzpunkt: 50 °C

 $R_t = 7.1 \min (HPLC-MS, Säule 1, Programm 1)$

ESI-MS: $m/z = 306 [M+H]^+$.

IR (KBr):	$\tilde{v} = 3420, 2926, 1684, 1603, 1590, 1385, 1339, 1281, 1204, 1034, 729 \text{ cm}^{-1}.$
UV (MeOH):	λ_{max} (lg ε) = 222 (11006), 259 (9731); 429 (1136);
(MeOH/HCl):	λ_{max} (lg ε) = 224 (10578), 255 (9398); 433 (946);
(MeOH/NaOH	I): $\lambda_{\text{max}} (\lg \varepsilon) = 220 (10821), 263 (10040); 442 (1071) \text{ nm.}$

¹**H-NMR** (300 MHz, D₂O): $\delta = 2.20$ (ddt, J = 14 Hz, 6 Hz, 2 Hz, 1H, 8-H_a), 2.67-2.92 (m, 2H, 8-H_b, 7-H_a), 3.55 (m, 1H, 7-H_b), 4.38 (dd, J = 12 Hz, 5 Hz, 1H, 9-H), 7.59-7.84 (m, 4H, 1-H, 2-H, 3-H, 4-H) ppm.

¹³C-NMR (75.5 MHz, CD₃OD): δ = 29.6 (t, C-8), 43.1 (t, C-7), 59.4 (d, C-9), 113.3 (s, C-5a), 127.4 (d, C-4),^{*1} 128.0 (d, C-1),^{*1} 129.9 (s, C-4a),^{*2} 132.8 (d, C-11a),^{*2} 134.8 (s, C-3),^{*3} 137.3 (d, C-2),^{*3} 151.7 (s, C-10a), 175.8 (s, COOH), 180.7 (s, C-11), 183.0 (s, C-5) ppm.
*1,*2, *3: Die Zuordnung der Signale untereinander ist nicht gesichert.

III. Arbeiten an Streptomyces bottropensis Dra17

1. Stammhaltung

1.1 Agarplatten

Zur Stammhaltung dienten Petrischalen mit M2+Ca-Medium, die 7-10 Tage bei 28 °C inkubiert wurden. Stamm Dra17 zeigte nach 3-4 Tagen ein weißes Luftmycel, welches sich nach 5-6 Tagen grau anfärbte. Ein Überimpfen auf weitere Platten erfolgte durch Ausstreichen der Sporen mit einer Platinimpföse. Die bewachsenen Platten wurden maximal 10 - 12 Wochen bei 4 °C gelagert.

1.2 Langzeiteinlagerung als Glycerineinlagerung

Zur Stammhaltung wurde 1 mL einer 48 h alten Kultur mit 1 mL sterilen Glycerin vermischt. Bei -20 °C gelagert kann das Gemisch über mehrere Jahre als Animpfmaterial dienen.

2. Kultivierung

2.1 Vorkulturen

Die Fermentation der Vorkultur erfolgte in 300 mL Erlenmeyerkolben mit drei Schikanen. Die Erlenmeyerkolben waren mit jeweils 100 mL SGG-Medium gefüllt und wurden mit 1 cm² einer gut bewachsenen Agarplatte beimpft. Die Inkubation der Kulturen erfolgte bei 28 °C und 250 rpm für 48 h.

2.2 Variationen der Hauptkultur

Variation A: Kultivierung in Schüttelkulturen

Die Fermentation erfolgte in 300 mL Erlenmeyerkolben mit drei Schikanen, die mit jeweils 90 mL Medium S gefüllt waren, bei 28 °C und 250 rpm. Angeimpft wurde mit 10 mL der oben beschriebenen Vorkultur. Nach 72 h wurden die Kulturen geerntet.

Variation B: Kultivierung in Biostat-M-Fermenter

Im 1 L-Biostat M-Fermentationsgefäß wurden 900 mL Medium S und 3 Tropfen 10 %ige Niax-Lösung (10 mL Niax in 90 mL 70 % Ethanol) autoklaviert. Nach dem Animpfen mit 100 mL der Vorkultur wurde für 72 h bei 28 °C, 600 U/min und 1.6 L/min kultiviert. Auf eine pH-Regulierung wurde verzichtet. Der Ernte-pH betrug 7.4 -7.9.

Variation C: Kultivierung in Biostat-B-Fermenter

Im 2 L-Biostat B-Fermentationsgefäß wurden 1800 mL Medium S und 10 Tropfen 10 %ige Niax-Lösung (10 mL Niax in 90 mL 70 %igem Ethanol) autoklaviert. Nach dem Animpfen mit 200 mL der Vorkultur wurde für 72 h bei 28 °C, 500 U/min und 3.2 L/min kultiviert. Auf eine pH-Regulierung wurde verzichtet, wodurch der pH bei Ernte einen Wert von 8.3 – 8.6 erreichte.

Variation D: Kultivierung in Biostat-E-Fermenter

Im 15 L-Biostat E-Fermentationsgefäß wurden 10 L Medium S und 220 mL 10 %ige Niax-Lösung (10 mL Niax in 90 mL 70 %igem Ethanol) autoklaviert. Nach dem Animpfen mit 750 mL der Vorkultur wurde für 63 h bei 28 °C, 200 U/min und 1.5 vvm kultiviert. Der pH-Regulierung wurde durch automatische Zugabe von Zitronensäure bzw. NaOH zwischen 5.5 und 7.5 gehalten, wobei der Ernte-pH einen Wert von 7.5 erreichte.

Variation E: Kultivierung im Airlift-Fermenter mit Überdruck

Zur Kultivierung im 10 L Airlift Fermenter wurden 9.2 L Medium S und 3 g Niax mit 800 mL Vorkultur beimpft. Es wurde 72 h bei 28 °C, 5 bar Überdruck und einer Belüftung von 4 vvm fermentiert. Auf eine pH-Regulierung wurde verzichtet, der pH betrug am Ende der Fermentation 4.6.

Variation F: Kultivierung in Biostat-U-Fermenter

Die Fermentation im 50 L Biostat U Fermenter, befüllt mit 47 L Medium S, dem 4.5 g Niax zugesetzt waren, und 3 L Vorkultur, erfolgte bei 28 °C, 200 rpm und 0.8 vvm. Der pH wurde durch Zitronensäure- bzw. NaOH-Zugabe zwischen 4.5 und 8.5 gehalten und betrug am Ende der Fermentation 8.0.

3. Standardaufarbeitung von Fermentationsansätzen

Zur Aufarbeitung wurde zur Kulturbrühe Celite gegeben und filtriert. Das Mycel wurde mit 0.5 L Methanol und 0.5 L Aceton je Liter Kulturlösung extrahiert und das Kulturfiltrat je Liter an ca. 250 mL Amberlite[®] XAD-2 adsorbiert, mit 300 mL demineralisiertem Wasser gewaschen und mit 500 mL Methanol eluiert. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

4. Isolierung der Iromycine (13, 14, 61-64)

Die Isolierung der Iromycine A-F (13, 14, 61-64) erfolgte durch Säulenchromatographie an Kieselgel (Cyclohexan/Essigester/Methanol (CEM) 5:10:2 bzw. Dichlormethan/Methanol (7:3 \rightarrow 1:1)), Gelchromatographie (Sephadex LH-20/Methanol), Mitteldruckchromatographie (Methanol/Wasser 7:3 \rightarrow 9:1) und HPLC. Das allgemeine Aufarbeitungsschema ist als Abb. 15 im Theoretischen Teil dieser Arbeit dargestellt (siehe Seite 47).

5. Isolierung von Thaxtomin A (59)

Die Isolierung von Thaxtomin A (59) erfolgte durch Säulenchromatographie an Kieselgel (Dichlormethan/Methanol 7:3 \rightarrow 1:1) und Gelchromatographie (Sephadex LH-20/Methanol).

6. Charakterisierung der Metaboliten

Iromycin A (13)





C₁₉H₂₉NO₂ (303.45) **R_f-Wert:** 0.30 (CHCl₃/MeOH 9:1) 0.76 (Cyclohexan/Essigester/Methanol 5:10:2) 0.03 (Methanol/Wasser 7:3)

Anfärbeverhalten: violett (Anisaldehyd)

EI-MS m/z (%) = 303 (38) [M]⁺, 274 (12) [M-C₂H₅]⁺, 260 (17) [M-C₃H₇]⁺, 234 (100) [M-C₅H₉]⁺, 220 (69), 192 (25), 164 (21), 71 (13), 55 (17), 43 (38).

IR (KBr): $\tilde{v} = 3398, 2961, 2931, 2871, 1636, 1458, 1381, 1219, 1165, cm⁻¹.$

UV (MeOH): λ_{max} nm (ε): 291 (7065), 206 (32120); (MeOH/HCl): λ_{max} nm (ε): 273 (7710), 204 (37495); (MeOH/NaOH): λ_{max} nm (ε): 278 (7050), 204 (24980) nm.

¹**H-NMR** (500 MHz, CD₃OD): $\delta = 0.97$ (t, J = 7.5 Hz, 3H, 3'-H₃), 0.98 (d, J = 7.0 Hz, 6H, 8"-H₃, 9"-H₃), 1.50 (tq, J = 8.0, 7.5 Hz, 2H, 2'-H₂), 1.73 (s, 3H, 10"-H₃), 1.98 (s, 3H, 7-H₃), 2.26 (dqq, J = 7.0, 7.0, 7.0 Hz, 1H, 7"-H), 2.43 (t, J = 8.0 Hz, 2H, 1'-H₂), 2.70 (d, J = 6.5 Hz, 2H, 4"-H₂), 3.32 (d, J = 7.5 Hz, 2H, 1"-H₂), 5.17 (dt, J = 7.5, 1.5 Hz, 1H, 2"-H), 5.32 (ddd, J = 15.0, 6.5, 1.0 Hz, 1H, 5"-H), 5.42 (ddt, J = 15.0, 7.0, 1.0 Hz, 1H, 6"-H) ppm. Das Signal der CH₂-Gruppe 1"-H₂ liegt unter dem Methanol-Signal.

¹³C-NMR (75.5 MHz, CD₃OD): $\delta = 8.7$ (q, C-7), 14.5 (q, C-3'), 16.5 (q, C-10"), 23.0 (q, C-8", C-9"), 24.1 (t, C-2'), 28.0 (t, C-1'), 30.4 (t, C-1"), 32.3 (s, C-7"), 43.7 (t, C-4"), 106.0 (s, C-3), 113.7 (s, C-5), 121.0 (d, C-2"), 125.7 (d, C-5"), 138.8 (s, C-3"), 140.8 (d, C-6"), 143.0 (s, C-6), 165.9 (s, C-2), 166.1 (s, C-4) ppm.

Iromycin B (14)

4-Hydroxy-6-((*E*,*E*)-7-hydroxy-3,7-dimethylocta-2,5-dienyl)-3-methyl-5-propyl-1*H*-pyridin-2on



 $C_{19}H_{29}NO_3$ (319.45)

Schmelzpunkt: 51 °C

*R*_f-Wert:
 0.15 (CHCl₃/MeOH 9:1)

 0.50 (Cyclohexan/Essigester/Methanol 5:10:2)

 0.24 (Methanol/Wasser 7:3)

Anfärbeverhalten: blau (Anisaldehyd) violett (Vanillin-Schwefelsäure) **EI-MS** m/z (%) = 319 (4) [M]⁺, 317 (5) [M-2H]⁺, 304 (15) [M-CH₃]⁺, 301 (11) [M-H₂O]⁺, 274 (37), 220 (88), 164 (12), 129 (14), 43 (100).

IR (KBr): $\tilde{v} = 3366, 2964, 2930, 2871, 1630, 1430, 13761, 1220, 1156, cm⁻¹.$

UV	(MeOH):	$λ_{max}$ nm (ε): 290 (9540), 207 (41595);
	(MeOH/HCl):	$λ_{max}$ nm (ε): 273 (11020), 204 (52870);
	(MeOH/NaOH):	$λ_{max}$ nm (ε): 278 (8315), 220 (38890) nm.

¹**H-NMR** (500 MHz, CD₃OD): $\delta = 0.94$ (t, J = 7.5 Hz, 3H, 3'-H₃), 1.24 (s, 6H, 8"-H₃, 9"-H₃), 1.47 (tq, J = 8.0, 7.0 Hz, 2H, 2'-H₂), 1.73 (d, J = 1.0 Hz, 3H, 10"-H₃), 1.95 (s, 3H, 7-H₃), 2.41 (t, J = 8.0 Hz, 2H, 1'-H₂), 2.72 (d, J = 6.5 Hz, 2H, 4"-H₂), 5.18 (dt, J = 7.0, 1.0 Hz, 1H, 2"-H), 5.57 (td, J = 15.5, 6.0 Hz, 1H, 5"-H), 5.62 (d, J = 15.5 Hz, 1H, 6"-H) ppm. Das Signal der CH₂-Gruppe 1"-H₂ liegt unter dem Methanol-Signal.

¹³C-NMR (151 MHz, CD₃OD): $\delta = 8.7$ (q, C-7), 14.5 (q, C-3'), 16.6 (q, C-10"), 24.1 (t, C-2'), 27.9 (t, C-1'), 29.9 (q, C-8", C-9"), 30.4 (t, C-1"), 43.3 (t, C-4"), 71.1 (s, C-7"), 106.0 (s, C-3), 113.7 (s, C-5), 121.3 (d, C-2"), 125.3 (d, C-5"), 138.5 (s, C-3"), 141.2 (d, C-6"), 142.9 (s, C-6), 165.9 (s, C-2), 166.0 (s, C-4) ppm.

Iromycin C (61)

4-Hydroxy-3-methyl-5-propyl-6-((*E*,*E*)-3-methylocta-2,5-dienyl)-1*H*-pyridin-2-on



 $C_{18}H_{27}NO_2$ (289.42)

Anfärbeverhalten: violett (Anisaldehyd)

<i>R</i> _f -Wert:	0.67 (Cyclohexan/Essigester/Methanol 5:10:2)
	0.05 (Methanol/Wasser 7:3)
ESI-MS:	(positive Ionen): $m/z = 290 [M+H]^+$, $312 [M+Na]^+$, $601 [2M+Na]^+$
	(negative Ionen): $m/z = 288 [M-H]^{-}$, 334 [M+HCOO] ⁻

HR-ESI-MS: berechnet m/z = 290.21146

gefunden m/z = 290.21149 (Abweichung 0.1 ppm)

IR : $\tilde{\upsilon} = 3420, 2962, 2932, 2872, 1717, 1636, 1458, 1380, 1220, 1167, 1115, 1054, 970 cm⁻¹.$ $UV : (MeOH) <math>\lambda_{max} nm(\varepsilon)$: 293 (1988), 207 (8432). (MeOH + NaOH) $\lambda_{max} nm(\varepsilon)$: 278 (2213), 221 (8394).

¹**H-NMR** (600 MHz, CD₃OD): $\delta = 0.94$ (t, J = 7.5 Hz, 3 H, 3'-H₃), 0.96 (t, J = 7.5 Hz, 3 H, 8"-H₃), 1.47 (tq, J = 8.0, J = 7.5 Hz, 2 H, 2'-H₂), 1.70 (s, 3 H, 9"-H₃), 1.95 (s, 3 H, 7-H₃), 2.01 (ddq, J = 7.5, J = 7.5, J = 1.0 Hz, 2 H, 7"-H₂), 2.40 (t, J = 8.0 Hz, 2 H, 1'-H₂), 2.67 (d, J = 7.0 Hz, 2 H, 4"-H₂), 3.26 (d, J = 7.0 Hz, 2 H, 1"-H₂), 5.15 (dt, J = 7.0, J = 1.0 Hz, 1 H, 2"-H), 5.37 (dtt, J = 15.5, J = 7.0, J = 1.0 Hz, 1 H, 5"-H), 5.50 (dtt, J = 15.5, J = 7.5, J = 1.0 Hz, 1 H, 6"-H) ppm.

¹³**C-NMR** (151 MHz, CD₃OD): $\delta = 8.7$ (+, C-7), 14.3 (+, C-3'), 14.5 (+, C-8"), 16.5 (+, C-9"), 24.1 (-, C-2"), 26.6 (-, C-7"), 28.0 (-, C-1"), 30.4 (-, C-1"), 43.7 (-, C-4"), 106.0 (C_{quat}, C-3), 113.8 (C_{quat}, C-5), 121.0 (+, C-2"), 127.7 (+, C-5"), 135.2 (+, C-6"), 140.4 (C_{quat}, C-6), 140.5 (C_{quat}, C-3"), 165.9 (C_{quat}, C-2), 166.8 (C_{quat}, C-4) ppm.

Iromycin D (62)



*R*_f-Wert: 0.01 (CHCl₃/MeOH 9:1)

0.36 (Cyclohexan/Essigester/Methanol 5:10:2)0.23 (Methanol/Wasser 7:3)

ESI-MS: (positive Ionen): $m/z = 288 [M+H-H_2O]^+$, 306 $[M+H]^+$, 633 $[2M+Na]^+$

HR-ESI-MS: berechnet m/z = 306.206308

gefunden m/z = 306.206370 (Abweichung 0.2 ppm)

 $[\alpha]_{D}^{20} = -150^{\circ} (c = 1.0, Methanol)$

IR : $\tilde{\upsilon} = 3421, 2962, 2929, 2871, 1700, 1635, 1436, 1376, 1220, 1167, 1114, 1056, 971 cm⁻¹.$ $UV : (MeOH) <math>\lambda_{max} nm (\varepsilon)$: 289 (911), 206 (3771); (MeOH + HCl) $\lambda_{max} nm (\varepsilon)$: 275 (1094), 204 (4513); (MeOH + NaOH) $\lambda_{max} nm (\varepsilon)$: 278 (943), 220 (3561) nm.

¹**H-NMR** (600 MHz, CD₃OD): $\delta = 0.94$ (t, *J* = 7.0 Hz, 3 H, 3'-H₃), 1.19 (d, *J* = 7.0 Hz, 3 H, (8"-H₃), 1.48 (tq, *J* = 8.0 Hz, 7.0 Hz, 2 H, 2'-H₂), 1.73 (s, 3 H, 10"-H₃), 1.95 (s, 3 H, 7-H₃), 2.41 (dt, *J* = 8.0 Hz, 2.0 Hz, 2 H, 1'-H₂), 2.73 (d, *J* = 7.0 Hz, 2 H, 4"-H₂), 4.18 (dq, *J* = 7.0 Hz, 1 H, 7"-H), 5.18 (dt, *J* = 7.0 Hz, 1.0 Hz 1 H, 2"-H), 5.55 (ddt, *J* = 15.0, 6.5 Hz, 1 H, 5"-H), 5.58 (ddd, *J* = 15.0, 6.5, 1.0 Hz, 1 H, 6"-H) ppm.

¹³**C-NMR** (75.5 MHz, CD₃OD): $\delta = 8.7$ (+, C-7), 14.5 (+, C-3'), 16.6 (+, C-9"), 23.7 (+, C-8"), 24.1 (-, C-2'), 27.9 (-, C-1'), 30.3 (-, C-1"), 43.2 (-, C-4"), 69.1 (+, C-7"), 106.0 (C_{quat}, C-3), 113.8 (C_{quat}, C-5), 121.4 (+, C-2"), 128.4 (+, C-6"), 137.5 (+, C-5"), 138.3 (C_{quat}, C-3"), 142.8 (C_{quat}, C-6), 165.9 (C_{quat}, C-2), 166.4 (C_{quat}, C-4) ppm.

Iromycin E (63)

4,5-Dihydroxy-6-((*E*,*E*)-3,7-dimethylocta-2,5dienyl)-3-methyl-5-propyl-5*H*-pyridin-2-on



 $C_{19}H_{29}NO_3$ (319.45)

Anfärbeverhalten: blau (Anisaldehyd)

*R***⁺Wert:** 0.73 (Cyclohexan/Essigester/Methanol 5:10:2)

0.49 (Methanol/Wasser 7:3)

ESI-MS: (positive Ionen): $m/z = 302 [M+H-H_2O]^+$, 320 $[M+H]^+$, 342 $[M+Na]^+$, 661 $[2M+Na]^+$

HR-ESI-MS: berechnet m/z = 320.22202

gefunden m/z = 320.22200 (Abweichung 0.1 ppm)

 $[\alpha]_{D}^{20} = -380^{\circ} (c = 1.0, Methanol)$

IR: $\tilde{\upsilon} = 3421, 2959, 2929, 1718, 1636, 1560, 1458, 1380, 1050, 971 cm^{-1}.$ UV: (MeOH) λ_{max} nm (ε): 279 (278), 203 (2526); (MeOH + HCl) λ_{max} nm (ε): 279 (376), 202 (1058); (MeOH + NaOH) λ_{max} nm (ε): 278 (197), 220 (749).

¹**H-NMR** (300 MHz, CD₃OD): $\delta = 0.89$ (m, 3 H, 3'-H₃), 0.96 (d, J = 7.0 Hz, 6 H, 8"-H₃, 9"-H₃), 1.24 (m, 2 H, 2'-H₂), 1.59 (s, 3 H, 10"-H₃), 1.59/2.26 (m, 2 H, 1'-H_a/1'-H_b), 1.94 (s, 3 H, 7-H₃), 1.94 (s, 3 H, 10"-H₃), 2.26 (m, 1 H, 7"-H), 2.66 (d, J = 6.5 Hz, 2 H, 4"-H₂), 2.98 (d, J = 7.0 Hz, 2 H, 1"-H₂), 5.34 (m, 1 H, 5"-H), 5.35 (m, 1 H, 2"-H), 5.40 (m, J = 15.5 Hz, 1 H, 6"-H) ppm;

¹³**C-NMR** (75.5 MHz, CD₃OD): $\delta = 8.6$ (+, C-7), 14.3 (+, C-3'), 16.1 (+, C-10"), 22.9 (+, C-8", C-9"), 27.8 (-, C-1"), 30.4 (-, C-2"), 32.3 (+, C-7"), 35.3 (-, C-1"), 43.8 (-, C-4"), 71.0 (C_{quat}, C-5), 106.1 (C_{quat}, C-3), 118.8 (+, C-2"), 126.1 (+, C-5"), 138.2 (C_{quat}, C-3"), 140.3 (C_{quat}, C-6"), 165.7 (C_{quat}, C-4), 176.6 (C_{quat}, C-2), 177.6 (C_{quat}, C-6) ppm.

Iromycin F (64)

2,3-Dihydroxy-6-((*E*,*E*)-3,7-dimethylocta-2,5-dienyl)-3-methyl-5-propyl-3*H*-pyridin-4-on



 $C_{19}H_{29}NO_3$ (319.45)

Anfärbeverhalten: violett (Anisaldehyd)

*R***_f-Wert:** 0.25 (CHCl₃/MeOH 9:1)

0.74 (Cyclohexan/Essigester/Methanol 5:10:2)

0.24 (Methanol/Wasser 7:3)

 $[\alpha]_{D}^{20} = -23^{\circ} (c = 1.0, Methanol)$

ESI-MS: (positive Ionen): $m/z = 320 [M+H]^+$, $342 [M+Na]^+$, $661 [2M+Na]^+$

HR-ESI-MS: berechnet m/z = 320.22202

gefunden m/z = 320.22227 (Abweichung 0.8 ppm)

IR: $\tilde{\upsilon} = 3420, 2962, 2933, 2873, 1716, 1662, 1624, 1458, 1384, 1196, 1116, 1062, 976 cm⁻¹.$

UV:	(MeOH)	$\lambda_{max} nm (\epsilon): 312 (1561), 202 (3818).$
	(MeOH + HCl)	$λ_{max}$ nm (ε): 315 (1423), 202 (3851)
	(MeOH + NaOH)	$λ_{max}$ nm (ε): 316 (1295), 206 (3056).

¹**H-NMR** (300 MHz, CD₃OD): $\delta = 0.91$ (t, J = 7.0 Hz, 3 H, 3'-H₃), 0.96 (d, J = 7.0 Hz, 6 H, 8"-H₃, 9"-H₃), 1.38 (m, 2 H, 2'-H₂), 1.47 (s, 3 H, 7-H₃), 1.71 (s, 3 H, 10"-H₃), 2.24 (m, 1 H, 7"-H), 2.10-2.40 (m, 2 H, 1'-H₂), 2.69 (d, J = 6.5 Hz, 2 H, 4"-H₂), 3.10 (m, J = 16.0, 7.0 Hz, 1 H, 1"-H_a), 3.20 (m, J = 16.0, 7.0 Hz, 1 H, 1"-H_b), 5.16 (m, J = 7.0 Hz, 1 H, 2"-H), 5.35 (m, J = 15.5, 6.5 Hz, 1 H, 5"-H), 5.40 (m, J = 15.5, 6.5 Hz, 1 H, 6"-H) ppm.

¹³C-NMR (75.5 MHz, CD₃OD): $\delta = 14.4$ (+, C-3'), 16.7 (+, C-10"), 23.0 (+, C-8", C-9"), 23.8 (-, C-2'), 27.5 (-, C-1'), 29.2 (+, C-7), 31.3 (-, C-1"), 32.3 (+, C-7"), 43.6 (-, C-4"), 79.4 (C_{quat}, C-3), 114.9 (C_{quat}, C-5), 119.2 (+, C-2"), 125.6 (+, C-5"), 140.1 (C_{quat}, C-3"), 140.9 (+, C-6"), 154.4 (C_{quat}, C-6), 178.1 (C_{quat}, C-2), 199.6 (C_{quat}, C-4) ppm.

Thaxtomin A (59)

 $C_{22}H_{22}N_4O_6$ (438.44)

Schmelzpunkt: 220 °C



*R*_f-Wert: 0.18 (CHCl₃/MeOH 9:1)

EI-MS (70 eV): m/z (%) = 420.0 (2) (M⁺ - H₂O), 303 (4), 270 (9), 246 (31), 176 (9) (C₉H₈N₂O₂), 175 (8) (C₉H₇N₂O₂), 162 (100) (C₈H₆N₂O₂), 116 (67) (C₈H₆N), 107 (36) (C₇H₇O), 89 (23) (C₇H₅).

ESI-MS (negative Ionen): 437 (100) [M-H]⁻, 875 (67) [2 M-H]⁻, 1313 (15) [3 M-H]⁻. ESI-MS (positive Ionen): 461 (34) [M+Na]⁺, 899 (100) [2M+Na]⁺.

IR: $\tilde{\upsilon} = 3370, 2940, 1650, 1600, 1510, 1455, 1325, 1285, 1075, 995, 735 cm⁻¹.$

UV:	(MeOH)	λ_{max} nm (ε): 398 (2500), 368 (2235), 338 (2060), 214 (35300).
	(MeOH + HCl)	$λ_{max}$ nm (ε): 398 (2150), 368 (1975), 338 (1620), 214 (32575).
	(MeOH + NaOH)	$λ_{max}$ nm (ε): 402 (2060), 368 (1755), 338 (1535), 207 (40820).
$[\alpha]_{D}^{20}$	$0 = +182.5^{\circ} (c = 1.0, N)$	(ethanol)

CD (MeOH) $\lambda_{\text{extr}} \text{ nm} ([\Theta]^{20}) = 212 (-6500), 227 (+31180), 280 (+1680), 322 (-650), 404 (+2630).$

¹**H-NMR** (300 MHz, DMSO-d₆): $\delta = 1.62$ (dd, J = 8.5, 14.0 Hz, 1 H, 10-H_a), 2.40 (dd, 6.5, 14.0 Hz, 1 H, 10-H_b), 2.62 (s, 3 H, N₁₂-CH₃), 2.85 (s, 3 H, N₁₅-CH₃), 2.98 (d, J = 13.5 Hz, 1 H, 17-H_a), 3.13 (d, J = 13.5 Hz, 17-H_b), 3.65 (dd, J = 6.5, 8.5 Hz, 1 H, 11-H), 6.55 (d, J = 7.5 Hz, 1 H, 23-H), 6.62 (s, 1 H, 19-H), 6.65 (d, J = 8.0 Hz, 1 H, 21-H), 6.90 (s, 1 H, 2-H), 7.16 (dd, J = 8.0, 8.0 Hz, 1 H, 22-H), 7.20 (dd, J = 8.0, 8.0 Hz, 1 H, 6-H), 7.75 (d, J = 8.0 Hz, 1 H, 7-H), 7.79 (d, J = 7.5 Hz, 1 H, 5-H), 9.55 (s, breit, NH), 11.80 (s, breit, phenol. OH) ppm.

¹³C-NMR (75.5 MHz, DMSO-d₆): δ = 27.4 (q, N₁₅-CH₃), 31.6 (t, C-10), 32.9 (q, N₁₂-CH₃), 42.5 (t, C-17), 62.7 (d, C-11), 85.9 (s, C-14), 109.0 (s, C-3), 114.2 (d, C-21), 116.95 (d, C-5), 117.2 (d, C-19), 117.9 (s, C-9), 118.4 (d, C-7), 119.8 (d, C-6), 121.0 (d, C-23), 129.5 (d, C-22), 130.9 (d, C-2), 136.2 (s, C-18), 139.1 (s, C-8), 141.8 (s, C-4), 157.3 (s, C-20), 163.9 (s, C-16), 165.8 (s, C-13) ppm.

7. Synthesen

Alle Reaktionen wurden mit trockenen destillierten Lösungsmitteln und demineralisiertem Wasser unter Argonatmosphäre durchgeführt.

Darstellung von 5-Chlorvaleriansäure-N-acetylcysteamin-thioester (80)

Eine Lösung von 5-Chlorvaleriansäure (467 mg, 3.45 mmol, 1.11 Äq) in Dichlormethan (50 mL) wurde mit *N*-Acetylcysteamin (370 mg, 3.11 mmol, 1.00 Äq) versetzt. Nach Zugabe von N'-(3-Dimethylaminopropyl)-*N*-ethylcarbodiimid Hydrochlorid (900 mg, 4.66 mmol,

V. Experimenteller Teil

1.50 Äq) und DMAP (50 mg) wurde 18 h bei 25 °C gerührt. Anschließend wurden Dichlormethan (50 mL) und Wasser (100 mL) hinzugegeben, die organische Phase mit gesättigter Ammoniumchloridlösung (50 mL) und gesättigter Natriumchloridlösung (50 mL) gewaschen. Nach Trocknen des Reaktionsproduktes über Magnesiumsulfat erfolgte die Aufreinigung mittels Säulenchromatographie an Kieselgel (Chloroform/Methanol 9:1) wobei 0.673 g der Titelverbindung (**80**) (2.83 mmol, 91 %) als farblose Flüssigkeit erhalten wurde.



 $C_9H_{16}O_2NSCl$ (237.75)

*R*_f-Wert: 0.45 (CHCl₃/MeOH 9:1)

EI-MS m/z (%) = 238 (1) [M+H]⁺, 178 (4), 119 (100), 91 (21), 60 (47), 55 (43), 43 (29).

¹**H-NMR** (300 MHz, CDCl₃): $\delta = 1.75$ (m, 4H, 3-H, 4-H), 1.91 (s, 3H, 2"-H), 2.56 (m, 2H, 2-H), 2.97 (t, J = 6.5 Hz, 2H, 1'-H), 3.35 (q, J = 6.5 Hz, 2H, 2'-H), 3.48 (m, 2H, 5-H).

¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃): $\delta = 22.7$ (t, C-3); 23.0 (t, C-4); 28.3 (q, C-2"); 31.4 (t, C-2); 39.4 (t, C-2'); 42.9 (t, C-1'); 44.2 (t, C-5); 170.5 (s, C-1"); 199.3 (s, C-1).

Die Zuordnung der Signale für 3-H und 4-H ist nicht gesichert.

Darstellung von 2-Methylbuttersäure-N-acetylcysteamin-thioester (82)

Die Synthese von 2-Methylbuttersäure-*N*-acetylamin-thioester (**82**) erfolgte nach der gleichen Vorschrift wie die Darstellung von 5-Chlorvaleriansäure-N-acetylamin-thioester (**80**). Es wurde 2-Methylbuttersäure (3.92 g, 38.4 mmol, 1.20 Äq) mit *N*-Acetylcysteamin (3.81 g, 32.0 mmol, 1.00 Äq) und *N'*-(3-Dimethylaminopropyl)-*N*-ethylcarbodiimid Hydrochlorid (9.50 g, 49.2 mmol, 1.54 eq) in 50 mL Dichlormethan umgesetzt. Man erhielt 5.97 g der Titelverbindung (29.6 mmol, 93 %) als farbloses Öl (**82**).



 $C_9H_{17}O_2NS$ (203.31)

*R*_f-Wert: 0.48 (CHCl₃/MeOH 9:1)

¹**H-NMR** (300 MHz, CDCl₃): $\delta = 0.90$ (t, J = 7.5 Hz, 3H, 4-H), 1.14 (d, J = 7 Hz, 3H, 5-H), 1.47 (dq, J = 7.5 Hz, 7Hz, 1H, 3-H_a), 1.70 (dq, J = 7.5 Hz, 7Hz, 1H, 3-H_b), 1.91 (s, 3H, 2"-H), 2.58 (tq, J = 7 Hz, 1H, 2-H), 2.98 (t, J = 7 Hz, 2H, 1'-H₂), 3.30 (t, J = 7 Hz, 2H, 2'-H₂), 4.85 (br s, 1H, N-H).

¹³**C-NMR** (75.5 MHz, CDCl₃): δ = 12.0 (q, C-4), 17.7 (q, C-5), 22.5 (q, C-2"), 28.2 (t, C-3), 28.9 (t, C-1'); 40.2 (t, C-2'), 51.3 (d, C-2), 173.3 (s, C-1"), 204.7 (s, C-1).

Darstellung von Iromycin AM (6-(3,7-Dimethyl-octa-2,5-dienyl)-4-methoxy-3-methyl-5propyl-1*H*-pyridin-2-on, 113)

Iromycin A (13, 15.0 mg, 49 μ mol) in einem Methanol-Wassergemisch (1 mL, 19:1) wurde bei 0 °C mit Diazomethanlösung (1 mL, 0.4 M in Ether) versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde auf Raumtemperatur erwärmt und für 1 h gerührt. Nach Entfernung des Lösungsmittels im Vakuum wurde das Rohprodukt in Methanol aufgenommen. Durch Chromatographie an Kieselgel (Chloroform/Methanol 9:1) wurden 5.3 mg der Titelverbindung (113, 17 μ mol, 34 %) als farbloser Feststoff gewonnen.



 $C_{20}H_{31}NO_2 \quad \ (317.48)$

Schmelzpunkt: 43 °C

R^r-Wert: 0.67 (CHCl₃/MeOH 9:1)

0.85 (Cyclohexan/Essigester/Methanol 5:10:2)

0.03 (Methanol/Wasser 7:3)

Anfärbeverhalten: violett (Anisaldehyd)

ESI-MS $m/z = 318 [M+H]^+$, 340 $[M+Na]^+$, 657 $[2M+Na]^+$, 974 $[3M+Na]^+$, 1291 $[4M+Na]^+$.

IR: $\tilde{\upsilon} = 3421, 2957, 2867, 1639, 1475, 1370, 1225, 1146, 1113, 1059, 970, 743 cm⁻¹.$

UV: (MeOH) λ_{max} nm (ϵ): 210 (3749), 234 (1163), 304 (1740).(MeOH + HCl) λ_{max} nm (ϵ): 209 (3861), 232 (981), 287 (1903).(MeOH + NaOH) λ_{max} nm (ϵ): 211 (3444), 230 (1170), 303 (1704).

¹**H-NMR** (300 MHz, Aceton-d₆): $\delta = 0.92$ (d, J = 7.0 Hz, 6H, 8"-H₃, 9"-H₃), 0.95 (t, J = 7.0 Hz, 3H, 3'-H₃), 1.47 (tq, J = 8.0, 7.0 Hz, 2H, 2'-H₂), 1.76 (s, 3H, 10"-H₃), 1.98 (s, 3H, 7-H₃), 2.21 (dqq, J = 7.0, 7.0, 7.0 Hz, 1H, 7"-H), 2.38 (dt, J = 8.0 Hz, J = 2 Hz, 2H, 1'-H₂), 2.66 (d, J = 6.5 Hz, 2H, 4"-H₂), 3.38 (d, J = 7 Hz, 2H, 1"-H₂), 3.78 (s, 3H, OCH₃), 5.25 (dt, J = 7.0, 1.0 Hz, 1H, 2"-H), 5.34 (ddd, J = 15.0, 6.5, 1.0 Hz, 1H, 5"-H), 5.40 (dtd, J = 15.0, 6.5, 1.0 Hz, 1H, 6"-H).

¹³C-NMR (75.5 MHz, CD₃OD): $\delta = 10.0$ (q, C-7), 14.6 (q, C-3'), 16.5 (q, C-10"), 22.9 (q, C-8", C-9"), 24.8 (t, C-2'), 28.0 (t, C-1'), 29.0 (t, C-1"), 31.7 (s, C-7"), 43.3 (t, C-4"), 60.8 (q, OCH₃), 114.6 (s, C-3), 115.5 (s, C-5), 121.5 (d, C-2"), 125.4 (d, C-5"), 137.3 (s, C-3"), 140.1 (d, C-6"), 143.5 (s, C-6), 166.6 (s, C-2), 168.2 (s, C-4).

Darstellung von Iromycin AA (4-Acetyl-6-(3,7-dimethyl-octa-2,5-dienyl)-3-methyl-5propyl-1*H*-pyridin-2-on, 115)

Iromycin A (**13**, 15 mg, 49 μmol) wurden bei 0 °C in Pyridin (1 mL) gelöst und mit Acetanhydrid (20.4 mg, 0.20 mmol) versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde auf 25 °C erwärmt und bei dieser Temperatur 4 h gerührt. Anschließend wurde die Lösung bei 0 °C unter Rühren mit gesättigter Natirumhydrogencarbonat-Lösung (3 mL) versetzt. Nach Zugabe von Wasser (5 mL) wurde mit Chloroform (2x 10 mL) extrahiert und die organischen Phasen vereinigt. Pyridin wurde durch wiederholtes Aufnehmen in Toluol (3x 5 mL) entfernt. Durch präparative HPLC (Säule 3, Programm 11) wurden 6.6 mg (39 %) des Produktes **115** als farbloser Festsoff erhalten.



 $C_{21}H_{31}NO_3$ (345.49)

Schmelzpunkt: 110 °C

*R*_f-Wert:
 0.71 (CHCl₃/MeOH 9:1)

 0.85 (Cyclohexan/Essigester/Methanol 5:10:2)

 0.04 (Methanol/Wasser 7:3)

Anfärbeverhalten: violett (Anisaldehyd)

ESI-MS $m/z = 346 [M+H]^+$, 368 $[M+Na]^+$, 713 $[2M+Na]^+$, 1058 $[3M+Na]^+$, 1403 $[4M+Na]^+$.

IR: $\tilde{\upsilon} = 2962, 2873, 1758, 1650, 1575, 1466, 1371, 12007, 1146, 1100, 968, 888, 720 cm⁻¹.$

UV:	(MeOH)	λ_{max} nm (ϵ): 204 (4413), 234 (1441), 308 (1772).
	(MeOH + HCl)	$λ_{max}$ nm (ε): 204 (4702), 232 (1201), 298 (1659).
	(MeOH + NaOH)	λ_{max} nm (ϵ):206 (5954), 220 (4668), 283 (1066).

¹**H-NMR** (300 MHz, CD₂Cl₂): $\delta = 0.92$ (t, J = 7.0 Hz, 3H, 3'-H₃), 0.94 (d, J = 7.0 Hz, 6H, 8"-H₃, 9"-H₃), 1.41 (tq, J = 8.0, 7.0 Hz, 2H, 2'-H₂), 1.70 (s, 3H, 10"-H₃), 1.85 (s, 3H, 7-H₃), 2.22 (m, 1H, 7"-H, 1'-H), 2.30 (s, 3H, CH₃COO), 2.67 (d, J = 6.5 Hz, 2H, 4"-H₂), 3.33 (d, J = 6.5 Hz, 2H, 1"-H₂), 5.20 (dt, J = 7.0, 1.0 Hz, 1H, 2"-H), 5.33 (ddd, J = 15.0, 6.5, 1.0 Hz, 1H, 5"-H), 5.40 (dtd, J = 15.0, 6.5, 1.0 Hz, 1H, 6"-H).

¹³C-NMR (75.5 MHz, CD₂Cl₂): $\delta = 9.8$ (q, C-7), 14.3 (q, C-3'), 16.4 (q, C-10"), 20.6 (q, CH₃COO), 22.6 (q, C-8", C-9"), 23.6 (t, C-2'), 27.9 (t, C-1'), 29.9 (t, C-1"), 31.3 (s, C-7"), 43.0 (t, C-4"), 112.9 (s, C-3), 117.2 (s, C-5), 119.2 (d, C-2"), 124.6 (d, C-5"), 139.2 (s, C-3"), 140.0 (d, C-6"), 142.5 (s, C-6), 158.3 (s, H₃CCOO), 164.8 (s, C-2), 167.7 (s, C-4).

Darstellung von Iromycin AH (6-(3,7-Dimethyloctanyl)-4-hydroxy-3-methyl-5-propyl-1H-pyridin-2-on, 107)

Iromycin A (**13**) (41.7 mg, 0.137 mmol) wurden in Methanol (10 mL) gelöst und unter Wasserstoffatmosphäre bei Anwesenheit von Pd/C (20 mg) für 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Filtration und Entfernen des Lösungsmittels konnten durch präparative HPLC (Säule 3, Programm 11) 5.8 mg der Titelverbindung (18.9 μmol, 14 %) erhalten werden.



C₁₉H₃₃NO₂ (307.48)

*R*_f-Wert:
 0.10 (CHCl₃/MeOH 9:1)

 0.52 (Cyclohexan/Essigester/Methanol 5:10:2)

0.77 (Methanol/Wasser 7:3)

Anfärbeverhalten: violett (Anisaldehyd)

ESI-MS: $m/z = 308 [M+H]^+$.

IR: $\tilde{\upsilon} = 3421, 2963$ (sh), 2873, 1654, 1560, 1547, 1375, 1167 cm⁻¹.

UV: (MeOH) λ_{max} nm (ϵ): 209 (4192), 287 (1051).(MeOH + HCl) λ_{max} nm (ϵ): 206 (5223), 272 (1002).(MeOH + NaOH) λ_{max} nm (ϵ): 204 (6564), 217 (4343), 274 (1030)

¹**H-NMR** (300 MHz, CD₃OD): $\delta = 0.88$ (t, J = 7.0 Hz, 6H, 8"-H₃, 9"-H₃), 0.95 (m, 3H, 10"-H₃), 0.96 (m, J = 7.0 Hz, 3H, 3'-H₃), 1.14-1.20 (m, 3H, 4"-H_a, 6"-H₂), 1.28-1.41 (m, 4H, 2"-H_a, 4"-H_b, 5"-H₂), 1.47-1.61 (m, 5H, 2'-H₂, 2"-H_b, 3"-H, 7"-H), 1.95 (s, 3H, 7-H₃), 2.42 (m, 2H, 1'-H₂), 2.47-2.59 (m, 2H, 1"-H₂).

¹³C-NMR (75.5 MHz, CD₃OD): $\delta = 8.7$ (q, C-7), 14.5 (q, C-3'), 19.9 (q, C-10"), 23.0 (q, C-8", C-9"), 24.4 (t, C-2'), 25.9 (t, C-5"), 28.0 (t, C-1'), 29.0 (t, C-1"), 29.2 (d, C-7"), 34.2 (d, C-3"), 38.1 (t, C-2"), 38.1 (t, C-4"), 40.4 (t, C-6"), 105.8 (s, C-3), 113.3 (s, C-5), 144.7 (s, C-6), 166.0 (s, C-2), 166.3 (s, C-4).

Darstellung von Iromycin BM (6-(7-Hydroxy-3,7-dimethyl-octa-2,5-dienyl)-4-methoxy-3-methyl-5-propyl-1H-pyridin-2-on, 114)

Die Synthese von **114** erfolgte analog zur Darstellung von **113**. Es wurden 27.7 mg **14** (0.087 mmol) mit 1 mL etherischer Diazomethanlösung umgesetzt. Man erhielt 29.6 mg Rohprodukt. Daraus wurden durch präparative HPLC (Säule 3, Programm 11) 4.5 mg **114** (0.013 mmol, 15 %) als farbloses Öl für biologische Tests isoliert.



 $C_{20}H_{31}NO_3$ (333.47)

*R*_f-Wert:
 0.28 (CHCl₃/MeOH 9:1)

 0.64 (Cyclohexan/Essigester/Methanol 5:10:2)

 0.14 (Methanol/Wasser 7:3)

Anfärbeverhalten: blau (Anisaldehyd)

ESI-MS $m/z = 334 [M+H]^+$, 356 $[M+Na]^+$, 689 $[2M+Na]^+$, 1022 $[3M+Na]^+$.

IR: $\tilde{\upsilon} = 3398, 2964, 2871, 1637, 1458, 1388, 1224, 1149, 1111, 1059, 1009, 972, 923 cm⁻¹.$

UV: (MeOH) λ_{max} nm (ϵ): 208 (3690), 229 (1478), 304 (1350).(MeOH + HCl) λ_{max} nm (ϵ): 205 (4158), 289 (1411).(MeOH + NaOH) λ_{max} nm (ϵ): 207 (4326), 226 (1878), 303 (1545).

¹**H-NMR** (600 MHz, CD₃OD): $\delta = 0.95$ (t, J = 7.5 Hz, 3H, 3'-H₃), 1.24 (s, 6H, 8"-H₃, 9"-H₃), 1.47 (tq, J = 8.0, 7.0 Hz, 2H, 2'-H₂), 1.73 (d, J = 1.5 Hz, 3H, 10"-H₃), 2.01 (s, 3H, 7-H₃), 2.38 (m, 2H, 1'-H₂), 2.72 (d, J = 5.5 Hz, 2H, 4"-H₂), 3.30 (d, J = 7.0 Hz, 1H, 2"-H₂), 3.78 (s, 3H, CH₃O), 5.17 (dt, J = 7.0, 1.5 Hz, 1H, 2"-H), 5.57 (td, J = 15.5, 5.5 Hz, 1H, 5"-H), 5.62 (d, J = 15.5 Hz, 1H, 6"-H).

¹³C-NMR (150.8 MHz, CD₃OD): $\delta = 10.0$ (q, C-7), 14.6 (q, C-3'), 16.6 (q, C-10"), 25.0 (t, C-2'), 28.3 (t, C-1'), 29.9 (q, C-8", C-9"), 30.5 (t, C-1"), 43.3 (t, C-4"), 61.3 (q,

H₃CO), 71.1 (s, C-7"), 116.3 (s, C-3), 117.0 (s, C-5), 121.2 (d, C-2"), 125.2 (d, C-5"), 138.6 (s, C-3"), 141.3 (d, C-6"), 143.8 (s, C-6), 166.8 (s, C-2), 169.7 (s, C-4).

Darstellung Iromycin BA (4-Acetyl-6-(7-hydroxy-3,7-dimethyl-octa-2,5-dienyl)-3methyl-5-propyl-1H-pyridin-2-on, 116)

Die Darstellung von **116** erfolgte analog zu der Darstellung von **115**. Es wurden Iromycin B (**14**) (39.5 mg, 123 μ mol) zu 45.6 mg Rohprodukt umgesetzt. Daraus wurden durch präparative HPLC (Säule 3, Programm 12) 2.4 mg der Titelverbindung (6.6 μ mol, 5.4 %) als farbloser Feststoff isoliert.



 $C_{21}H_{31}NO_4$ (361.49)

Schmelzpunkt: 55 °C

*R*_f-Wert: 0.33 (CHCl₃/MeOH 9:1)

0.70 (Cyclohexan/Essigester/Methanol 5:10:2)

0.19 (Methanol/Wasser 7:3)

Anfärbeverhalten: blau (Anisaldehyd)

ESI-MS $m/z = 362 [M+H]^+$, 384 $[M+Na]^+$, 745 $[2M+Na]^+$. ESI-MS $m/z = 360 [M-H]^-$.

IR : $\tilde{\upsilon}$ = 3420, 2966, 2932, 2873, 1772, 1647, 1458, 1436, 1371, 1191, 1145, 1102, 1012, 973, 885 cm⁻¹.

UV :	(MeOH)	$λ_{max}$ nm (ε): 205 (6753), 233 (2612), 305 (2535).
	(MeOH + HCl)	$λ_{max}$ nm (ε): 204 (7633), 232 (2476), 297 (2600).
	(MeOH + NaOH)	λ _{max} nm (ε): 206 (8879), 220 (7421), 285 (2147).

¹**H-NMR** (600 MHz, CD₃OD): $\delta = 0.95$ (t, J = 7.5 Hz, 3H, 3'-H₃), 1.24 (s, 6H, 8"-H₃, 9"-H₃), 1.43 (m, 2H, 2'-H₂), 1.73 (d, J = 1.0 Hz, 3H, 10"-H₃), 1.85 (s, 3H, 7-H₃), 2.33 (s, 3H, CH₃COO), 2.72 (d, J = 8.0 Hz, 2H, 1'-H₂), 2.72 (d, J = 5.5 Hz, 2H, 4"-H₂), 3.35 (d, J = 7.0 Hz, 1H, 1"-H₂), 5.18 (dt, J = 7.0, 1.0 Hz, 1H, 2"-H), 5.57 (td, J = 15.5, 5.5 Hz, 1H, 5"-H), 5.62 (d, J = 15.5 Hz, 1H, 6"-H).

¹³C-NMR (125.3 MHz, CD₃OD): $\delta = 10.0$ (q, C-7), 14.6 (q, C-3'), 16.6 (q, C-10"), 24.3 (q, H₃CCOO), 25.0 (t, C-2'), 28.3 (t, C-1'), 29.9 (q, C-8", C-9"), 30.5 (t, C-1"), 43.2 (t, C-4"), 71.1 (s, C-7"), 115.3 (s, C-3), 118.3 (s, C-5), 121.0 (d, C-2"), 125.2 (d, C-5"), 138.8 (s, C-3"), 141.3 (d, C-6"), 144.2 (s, C-6), 160.0 (s, H₃CCOO), 165.8 (s, C-2), 169.0 (s, C-4).

8. Biosyntheseuntersuchungen

8.1 Fütterung von 5-Chlorvaleriansäure (<u>78</u>), 5-Chlorvaleriansäure-Nacetylcysteamin-thioester (<u>80</u>), 2-Metylbuttersäure-N-acetylcyteamin-thioester (<u>82</u>), *trans*-2-Hexensäure (<u>79</u>)

Die Fütterungsexperimente wurden im Biostat B-Fermentern bei 28 °C, einer Belüftung von 3.2 L/min und 500 rpm durchgeführt. Bei allen Versuchen wurde zusätzlich Natriumacetat (900 mg/L) ab der 24. Stunde über 12 h zur Steigerung der Ausbeuten zugegeben. Die Substanzen wurden in 14 mL einer Wasser/Ethanol-Mischung (1:1) gelöst und in einen autoklavierten 200 mL Erlenmeyerkolben sterilfiltiert. Ab der 24. h der Fermentation wurde die gelöste Verbindung über 12 h mittels einer Pumpe (Förderleistung 1.17 mL/h) dem Fermenter zugegeben. Die Aufarbeitung und Isolierungsstrategie ist in Abschnitt 3. und 4. beschrieben. Das Metabolitenspektrum wurde durch HPLC-ESI-MS-Spektrometrie (Säule 1, Programm 1) analysiert.

In Tabelle 7 sind die Fütterungsexperimente zusammengefasst.

Verbindung	Zugefütterte Menge	Zugefütterte Menge
	[mmol/L]	[g]
5-Chlorvaleriansäure	25	6.41
5-Chlorvaleriansäure- <i>N</i> -acetylcysteamin-thioester (80)	15.0	5.93
2-Metylbuttersäure- <i>N</i> -acetylcyteamin-thioester (82)	14.8	5.97
trans-2-Hexensäure	25	5.70

Tabelle 7: Gefütterte potentielle Vorläufer

8.2 Fütterung von Natriumnitrat und Ammoniumsulfat

Die Fütterungsexperimente wurden in Biostat M-Fermentern bei 28 °C, einer Belüftung von 3.2 L/min und 500 rpm durchgeführt. Vor der Fütterung markierter Verbindungen wurde die Stoffwechselverträglichkeit der Verbindungen durch Fütterung unmarkierter Analoga überprüft. Bei den Versuchen wurde zusätzlich Natriumacetat (900 mg/L) ab der 24. Stunde über 12 h zur Ausbeutensteigerung zugegeben. Die Substanzen (1 g Na¹⁵NO₃ bzw. 0.8 g (¹⁵NH₄)₂SO₄) wurden in 24 mL Wasser gelöst und autoklaviert. Ab der 24. Stunde der Fermentation wurde die gelöste Verbindung über 12 h mittels einer Pumpe (Förderleistung 2 mL/h) dem Fermenter zugegeben. Die Aufarbeitung und Isolierung von Iromycin A (**13**) und B (**14**) erfolgte durch das in Abschnitt B.III.3 und B.III.4 beschriebene Verfahren.

8.3 Fütterungsexperiment mit Ancymidol (94)

Als Vorkultur wurde *Streptomyces* sp. Dra17 wurde in 300 mL Schüttelkolben mit Schikanen, die mit 100 mL SGG-Medium befüllt waren, für 48 h bei 28 °C und 250 rpm kultiviert. Als Hauptkultur dienten 100 mL Medium S in 300 mL Schüttelkolben mit Schikanen, die mit 5 % der Vorkultur angeimpft und bei 28 °C und 250 rpm inkubiert wurden. Nach 20 h wurden 3 mg bzw. 30 mg **94** in einer Portion zugegeben. Zum Vergleich wurde ein weiterer Kolben ohne Zugabe des Inhibitors als Referenz kultiviert. Nach 72 h wurden die Kolben lyophilisiert und mit 2x 30 mL Methanol extrahiert. Die Menge an **13** und **14** wurde durch HPLC-ESI-MS-Spektrometrie (Säule 1, Programm 1) analysiert.

9. Molekularbiologische Methoden und Geräte

Reagenzien: Phenol/Chloroform <u>Roth</u>, Ribonuclease A <u>Sigma</u>, Lysozyme <u>Fluka</u>, Restriktionsenzyme (BamH1, Kpn1, SacA3), Puffer, BSA <u>New England Biolabs</u>, Farbstoff Blue Orange Loading Dye, 1 kb DNA-Leiter <u>Promega</u>, Tris Ultra Qualität, Agarose NEEO-Qualität <u>Roth</u>.

Für Transformations- und Konjugationsversuche verwendete Puffer / Lösungen:

P1:	Tris-HCl (pH = 8.0) 7.9 g/L, EDTA (pH = 8.0) 3.7 g/L.	
P2:	Natriumdodecylsulfat (SDS, 10 %) 100 mL, NaOH (1 M) 200 mL, ddH2O	
	700 mL.	
P3:	5 M Kaliumacetat 600 mL, Eisessig 115 mL, ddH ₂ O 285 mL.	

H ₂ O 2.02 g, Spurenelementlösung A
nach Autoklavieren hinzufügen:
68 %) 10 mL, TES-Puffer (5.73 %,
$0.25 \text{ M}, \text{pH} = 8.0) 4 \text{ mL}, \text{ddH}_2\text{O}$

991 mL. NaOH / SDS: 0.3 M NaOH, 2 % SDS.

- **50 х ТАЕ:** Tris/Base 242 g/L, Eisessig 57.1 mL/L, EDTA 18.6 g/L oder 100 mL/L 0.5 м EDTA, pH 8.0 mit ddH₂O auffüllen.
- **1 x TAE:** 20 mL 50 x TAE (Stammlösung), 980 mL ddH₂O.
- 5 x TBE: 54 g Tris/Base, 27.5 g Borsäure, 20 mL 0.5 M EDTA, pH 8.0 mit ddH₂O auf 1 L auffüllen.
- **1 x TBE:** 200 mL TBE (Stammlösung), 800 mL ddH₂O.

Zentrifugen: Eppendorf Zentrifuge 5415D, Sigma Laboratory Zentrifuge 3 K 30, (Rotor 19777 und 12154), 4K10 (Rotor 11140), 4K15 (Rotor 12256).

Elektroporation: Biorad Gene Pulser II, Biorad Pulse Controller Plus.

Gelelektrophorese: Biorad PowerPac 300.

Vortex: Winn Vortex-Genie.

Photometer: Eppendorf BioPhotometer.

Enzyme:

Sac I: Schnittstellen 5[°]...GAGCT|C...3[°] 3[°]...C|TCGAG...5[°]

Kpn I: Schnittstellen	5 [°] GGTAC C3 [°]
	3 [°] C CATGG5 [°]
BamHI:Schnittstellen:	5'G GATCC3

3'...CCTAG|G...5'

Stammhaltung

750 μL der Kulturlösung der *E. coli* Kultivierung wurden mit 750 μL Glycerol (50%) versetzt und zur Stammhaltung bei -20 °C gelagert.

Alkalische Lyse und Mini Präparation

Die 36 PKSI-3745-positiven *E. coli* Klone wurden nach einem Verdünnungsausstrich in 3 mL LB-Medium (14 h, 250 U/min, 37 °C) unter Zusatz von 100 μ g/mL Apramycin kultiviert. Nach Zentrifugation (4 min, 13000 U/min, 4 °C) wurde der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 300 μ L AL1 resuspendiert. Nach Zugabe von 300 μ L AL2 wurde leicht geschwenkt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 300 μ L AL3 zugefügt, leicht geschwenkt und 30 min bei 0 °C inkubiert. Nach Zentrifugation (20 Min, 13000 U/min, 4 °C) wurde der Überstand mit 1.5 mL Isopropanol versetzt. Es wurde Durchmischt, 30 min bei Raumtemperatur inkubiert (10 min, 13000 U/min, 4 °C). Nach Verwerfen des Überstandes wurde die erhaltene Plasmid-DNA mit 1.5 ml 70%igem Ethanol gewaschen und an der Luft getrocknet. Abschließend wurde die DNA in 40 μ L TE gelöst und bei -20 °C gelagert.

BamHI, KpnI, SacAIII Verdau

Es wurden pro isolierten Cosmid 2 μ L TE Lösung mit 0.15 μ L BSA, 10.85 μ L bidest. Wasser, 1.5 μ L Puffer und 0.5 μ L Enzym versetzt und 1 h bei 37 °C inkubiert. Eine Lagerung erfolgte bei –20 °C.

Gelelektrophorese

Nach Zugabe von 2 μ L Loading Puffer wurde die Lösung des Verdaus auf ein 0.8% Agarosegel aufgetragen. Die Gelektrophorese wurden 16 h bei 24 V durchgeführt. Anschließend wurde das Gel wurde mit 30 μ L Ethidiumbromid in 300 mL (0.5x) TBE-Puffer entwickelt und unter UV-Licht ausgewertet.

Herstellung kompetenter E. coli-Zellen (ET12567)

Zur Herstellung der kompetenten Zellen wurden LB-Agar-Platten mit 20 μ L einer Glycerineinlagerung von *E. coli* DH10 α -Zellen im Verdünnungsausstrich beimpft und 14 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden viermal 20 mL SOB-Medium unter Zusatz von 50 μ g/L Kanamycin und 12.5 μ g/L in 100 mL Erlenmeyerkolben ohne Schikanen mit einer einzelnen Kolonie beimpft und 12 h bei 37 °C und 220 rpm inkubiert. Je 500 mL SOB-
Medium (Zusatz von 50 µg/L Kanamycin und 12.5 µg/L) in 1 L Erlenmeyerkolben ohne Schikanen, die auf 28 °C vorgewärmt waren, wurden mit 3.5 mL der Vorkultur angeimpft. Inkubiert wurde bei 37 °C und 180 rpm bis zu einer optischen Dichte von OD₆₀₀ ca. 0.7 (nicht mehr als OD₆₀₀ = 0.8, ca. 4.5 h). Zu jeder Zeit wurden Kulturen, Glycerinlösungen und abzentrifugierte Zellen auf Eis gekühlt. Je 125 mL Kultur wurden zentrifugiert (10 min, 4 °C, 4400 rpm), wobei keine sterilen Bedingungen eingehalten werden mussten. Der Überstand wurde verworfen und erneut 125 mL Kultur zugegeben und zentrifugiert (10 min, 4 °C, 4400 rpm). Der Überstand wurde verworfen und fünfmal mit gekühlter 10%iger Glycerinlösung (4 °C) gewaschen und zentrifugiert (10 min, 4 °C, 4400 rpm). Die Zellen wurden nach Verwerfen des Überstandes durch Suspendieren in 10%igem Glycerin in vier 15 mL Gefäße überführt, zentrifugiert (1 min, 4 °C, 10000 rpm) und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden in jeweils 1 mL 10%igem Glycerin aufgenommen. Je 50 µL Zell-Suspension wurden in 500 µL Eppendorf-Gefäße überführt, in einem N₂-Bad schockgefroren und zügig bei -80°C gelagert.

Transformation

Je 50 μ L der kompetenten Zellen wurden zu 1 μ L der Ligationsansätze (Cosmide 1, 2, 9, 14, 23, 27, 28, 29) in eine eisgekühlte Elektroporationsküvette pipettiert. Sofort nach dem Elektrischen Impuls wurde 1 mL LB-Medium zugegeben und der Ansatz 1 h bei 37 °C regeneriert. Nach Ausplattieren auf LB-Agarplatten (Zusatz von 100 μ g/L Apramycin) wurden die Platten 30 min bei Raumtemperatur getrocknet und 14 h bei 37 °C inkubiert.

Elektroporationsbedingungen

Spannung 2.5 kV, Feldstärke: 2.5 μ F, Widerstand: 200 Ω

Konjugation mit Streptomyces lividans K4-114 und Streptomyces coelicolor YU 105

Es wurden Glycerineinlagerung der Stämme *Streptomyces* lividans K4-114 und *Streptomyces coelicolor* YU 105 hergestellt. Dazu wurde 1 mL einer 48 Stunden alten Kultur (Fermentationsbedingungen siehe Kapitel mit der gleichen Menge einer sterilen, 86% igen Glycerinlösung versetzt.

Die transformierten Klone des *E. coli* Stammes ET12567 mit den Cosmiden 1, 2, 9, 14, 23, 27, 28 und 29, welche außerdem über die Plasmide pUB307 und pSET152 verfügen, wurden

in jeweils 3 mL LB-Medium unter Zusatz von 25 µg/mL Chloramphenicol, 100 µg/mL Apramycin und 50 µg/mL Kanamycin bei 37 °C und 250 rpm in verschließbaren Reagenzgläsern kultiviert. Nach 12 h wurden 50 µL der Zelllösung entnommen und zu 3 mL frisch angesetztem LB-Medium ebenfalls unter Zusatz der Selektionsantibiotika pipettiert. Die Ansätze wurden erneut bei 37 °C und 250 rpm kultiviert, bis eine optische Dichte OD₆₀₀ zwischen 0.4 und 0.6 erreicht war (etwa vier Stunden). Anschließend wurde vier Minuten bei 1000 x g zentrifugiert und die Zellen zweimal mit je 5 mL LB-Medium gewaschen. Der erhaltene Rückstand wurde in 500 µL LB-Medium aufgenommen und mit 500 µL der Glycerineinlagerung des Mycels von Stamm K4-114 bzw. YU 105 vermischt. Die Ansätze wurden dreimal mit je 5 mL 2 x YT-Medium gewaschen und zentrifugiert (3 min, 3000 rpm). Der Überstand wurde verworfen und der Rückstand im verbleibenden Medium resuspendiert. Die erhaltene Zellsuspension wurde auf dem Medium SM unter Zusatz von 0.01 M Magnesiumchlorid ausplattiert und bei 30 °C für 16 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Platten mit 1 mL einer Lösung aus 1.3 mg/mL Apramycin und 1 mg/mL Nalidixinsäure überschichtet und nach Trocknung weiterhin bei 30 °C inkubiert. Es wurden folgende erfolgreiche Transformanden hergestellt: Cosmide 1, 2, 9, 14, 23, 27, 28 und 29 in S. coelicolor YU 105 und 1, 2, 9, 14, 28 und 29 in S. lividans K4-114.

Screening Heterologe Expression

Die Klone von *S. coelicolor* mit den Cosmiden 1, 2, 9, 14, 23, 27, 28 und 29 und *S. lividans* K4-114 mit den Cosmiden 1, 2, 9, 14, 28 und 29 wurden in je 300 mL Erlenmeyerkolben, die mit jeweils 75 mL M2 Medium unter Zusantz von 100 µg/mL Apramycin gefüllt waren, bei 30 °C und 180 rpm inkubiert. Nach 72 h wurde durch Filtration unter Zugabe von Celite das Mycel vom Kulturfiltrat getrennt. Das Mycel wurde mit 100 mL Methanol und 100 mL Aceton extrahiert und das Kulturfiltrat zweimal mit 100 mL Essigester extrahiert. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Die so erhaltenen Extrakte (Kulturfiltrat und Mycel) wurden in 3 mL Methanol gelöst und 5 μ L dieser Lösung auf eine HPTLC-Kieselgelplatte aufgetragen. Die Dünnschichtchromatogramme wurden in CHCl₃/MeOH 9:1 entwickelt. Die Analyse des Metabolitenmusters erfolgte durch Eigenfarbe, UV-Licht (254 und 366 nm) und mit Hilfe von Sprühreagenzien (Anis, Orcin, Ehrlich). Außerdem wurden von den Extrakten HPLC-ESI-MS Läufe (Säule 1, Programm 1) durchgeführt und das Metabolitenspektrum analysiert.

Medienoptimierung

Der das Cosmid 2 tragende Klon *S. lividans* K4-114 wurde in 1 L Erlenmeyerkolben, die mit 150 mL Nährlösung unter Zusatz von 50 µg/mL Apramycin gefüllt waren, bei 30 °C und 225 rpm inkubiert. Als Nährmedien dienten SGG, M2 und Medium S. Bei M2 und Medium S wurde zusätzlich eine Variation durchgeführt, bei der von der 24. bis zur 36. Stunde pro Kolben 154 mg Natriumacetat Trihydrat, 75 mg Natriumpropionat und 30 mg Valin zugefüttert wurden. Nach 72 h Inokulation wurden zur Aufarbeitung zu den Kulturbrühen Celite gegeben und filtriert. Das Mycel wurde 15 min im Ultraschallbad mit 200 mL Methanol und 200 mL Aceton extrahiert, durch Filtration abgetrennt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Kulturfiltrat wurde an 500 ml Amberlite[®] XAD-2 adsorbiert, mit 250 mL demineralisiertem Wasser gewaschen und mit 100 mL Aceton und 200 mL Methanol eluiert. Anschließend wurden die Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Die so erhaltenen Extrakte (Kulturfiltrat und Mycel) wurden in 3 mL Methanol gelöst und 5 μ L dieser Lösung auf eine HPTLC-Kieselgelplatte aufgetragen. Die Dünnschichtchromatogramme wurden in CHCl₃/MeOH 9:1 entwickelt. Die Analyse des Metabolitenmusters erfolgte durch Eigenfarbe, UV-Licht (254 und 366 nm) und mit Hilfe von Sprühreagenzien (Anis, Orcin, Ehrlich). Außerdem wurden von den Extrakten HPLC-ESI-MS Läufe (Säule 1, Programm 1) durchgeführt und das Metabolitenspektrum analysiert.

Heterologe Expression

Vorkulturen

Die Fermentation der Vorkulturen erfolgte in 300 mL Erlenmeyerkolben ohne Schikanen. Die Erlenmeyerkolben waren mit 100 mL SGG-Medium gefüllt und wurden mit jeweils 1 cm² einer gut bewachsenen Agarplatte von dem das Cosmid 2 tragenden Klon *S. coelicolor* 2c1b angeimpft. Die Inkubation der Kultur erfolgte 48 h bei 28°C und 250 rpm. Hauptkultur

Die Fermentation wurde im 15 L Biostat E Fermenter durchgeführt, der mit 9.2 L Medium S gefüllt war und mit 800 mL Vorkultur beimpft wurde. Nach 20 h wurden 50 µL/ml Apramycin zugegeben. Es wurde für 72 h bei 28 °C, 200 U/min und 1.5 vvm kultiviert. Der pH wurde durch automatische Zugabe von Zitronensäure bzw. NaOH zwischen 5.5 und 7.5 gehalten. Zur Aufarbeitung wurde zur Kulturbrühe Celite gegeben und filtriert. Das Mycel wurde mit 1 L Methanol und 1 L Methanol/Aceton (1:1) extrahiert und das Kulturfiltrat je Liter an 2 L Amberlite[®] XAD-2 adsorbiert, mit 3 L demineralisiertem Wasser gewaschen und mit 5 L Methanol eluiert. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Durch Gelchromatographie (Sephadex LH-20/Methanol, Aceton) und Mitteldruckchromatographie (Methanol/Wasser 8:2 \rightarrow 9:1) konnten 6.0 mg des mit Anisaldeyd blau anfärbenden Fettes (83) erhalten werden.

Fett aus heterologem Expressionsveruch (83)

 $C_{12}H_{24}O_4$ (232.32)



ESI-MS: (positive Ionen): $233 [M+H]^+$.

¹**H-NMR** (600 MHz, CD₃OD): $\delta = 0.87$ (d, J = 6.5 Hz, 6H, CH₃), 1.24-1.40 (m, 8H, CH₂), 1.51 (tqq, J = 6.5 Hz, 1H, CH), 3.51-3.57 (m, 2H, CH₂), 3.81 (dt, J = 5 Hz, 1H, CHOH), 4.05 (dd, J = 11 Hz, 5 Hz, 1H, CH_{2a}OH), 4.14 (dd, J = 11 Hz, 5 Hz, 1H, CH_{2b}OH).

¹³C-NMR (150.8 MHz, CD₃OD): $\delta = 23.1$ (q, 2xCH₃), 30.2 (t, CH), 30.6 (t, CH₂), 30.6 (t, CH₂), 30.8 (t, CH₂), 34.9 (t, CH₂), 40.2 (t, CH₂), 64.0 (t, CH₂OH), 66.5 (t, CH₂OH), 71.1 (d, CHOH), 175.5 (s, COO).

10. Thaxtomin-Produktion

10.1 Medienwahl

Der Stamm *S. bottropensis* Dra 17 wurde in 1 L Erlenmeyerkolben mit drei Schikanen, die mit jeweils 200 mL Nährlösung gefüllt waren, mit 20 mL einer SGG-Vorkultur (s. Abschnitt III.2) beimpft. Als Nährlösung wurden die Medien M2, Hafer, 1187 und 1358 verwendet. Es wurde 72 h bei 28 °C und 250 rpm inkubiert. Es erfolgte die in Abschnitt III.3 beschriebene Standard-Aufarbeitung. Das Metabolitenspektrum wurde mittels HPLC-ESI-MS-Spektrometrie (Säule 1, Programm 1) analysiert (Tabelle 8).

	Integral 59	Integral 13	Integral 14
Hafer KF +	124726	n.b.	532176
Hafer KF -	121438	n.b.	533545
Hafer Mycel +	8230	70988	249462
Hafer Mycel -	8254	74383	269341
1187S KF +	21656	n.b.	373173
1187S KF -	21919	n.b.	379567
1187S M +	n.b.	n.b.	245175
1187S M -	n.b.	n.b.	238637
M2 KF +	425491	n.b.	379676
M2 KF -	436791	n.b.	365668
M2 M +	38909	n.b.	239431
M2 M -	34408	n.b.	252444
1358 KF +	85467	n.b.	443007
1358 KF -	89255	65130	451669
1358 M +	n.b.	18043	237278
1358 M -	n.b.	18275	252795

Tabelle 8: Produktion der Metaboliten **59**, **13** und **14** in den Medien Hafer, 1187s, M2 und 1358. Es wurden zwei Läufe durchgeführt (+ und -). n.b.= Produktion nicht bestimmbar.

10.2 Bestimmung der Konzentration

Zur Bestimmung der produzierten Mengen an **59**, **13** und **14** in den Proben der Fermentationskurve wurde das Integral der Messungen mit dem Integral von Proben bekannter Konzentration verglichen. Eichmessungen (siehe Tabelle 9) erfolgten an der semipräparativen HPLC bei einer Wellenlänge zwischen 287.5 und 288.5 nm für **13** und **14** bzw. 403.5 und 404.5 nm für **59**.

	Integral 59 (400 nm)	Integral 13 (290 nm)	Integral 14 (290 nm)
1000 µg/mL	32311745	68406177	57519894
100 μg/mL	3315974	6760258	5933258
10 μg/mL	-	658176	615298
1 μg/mL	-	84391	76204

Tabelle 9: Eichwerte zur Bestimmung der Metabolit-Konzentrationen 13, 14, 59.

10.3 Medienoptimierung

Als Vorkultur wurden 250 mL Hafermedium in 1 L Erlenmeyerkolben mit drei Schikanen, durch 1 cm² einer gut bewachsenen Hafer-Agarplatte beimpft. Es wurde 48 h bei 250 rpm und 28 °C inkubiert. Durch Zugabe von 5% Vorkultur wurden jeweils 2 Kolben der die in Tabelle 1 beschriebenen Hauptkulturen (Hafer-Medium) beimpft. Es wurde 72 h bei 28 °C inkubiert. Zur Aufarbeitung wurden die Zellen abzentrifugiert (10 min, 4000 rpm) und verworfen; 30 mL des Kulturfiltrates wurden dreimal mit 15 mL Essigsäureethylester extrahiert. Durch analytische HPLC (Säule 1, Programm 1) wurde die Thaxtomin A Produktion bestimmt (siehe Tabelle 10).

Ansatz	Kolbengröße	Schikane	Füllung	rpm	Fläche	c (59)
	[ml]		[ml]			[mg/L]
AI1-2	1000	ja	300	120	8095274	20
AI3-4	1000	ja	150	120	8630295	21
AI5-6	1000	ja	75	120	10181310	25
AI7-8	1000	nein	300	120	1330637	3
AI9-10	1000	nein	150	120	6472580	16
AI11-12	1000	nein	75	120	8600788	21
AII1-2	1000	ja	300	180	6296646	16
AII3-4	1000	ja	150	180	10034805	25
AII5-6	1000	ja	75	180	7595851	19
AII7-8	1000	nein	300	180	5565954	14
AII9-10	1000	nein	150	180	9548774	24
AII11-12	1000	nein	75	180	9583735	24
AIII1-2	1000	ja	300	250	10123288	25
AIII3-4	1000	ja	150	250	10715189	27
AIII5-6	1000	ja	75	250	10154029	25
AIII7-8	1000	nein	300	250	6139897	15
AIII9-10	1000	nein	150	250	8838514	22
AIII11-12	1000	nein	75	250	10441311	26
BI1-2	300	ja	100	120	4192369	10
BI3-4	300	ja	75	120	5444180	14
BI5-6	300	ja	50	120	6820731	17
BI7-8	300	nein	100	120	3225647	8
BI9-10	300	nein	75	120	4067441	10
BI11-12	300	nein	50	120	5233908	13
BII1-2	300	ja	100	180	7070288	18
BII3-4	300	ja	75	180	6188320	15
BII5-6	300	ja	50	180	9507239	24
BII7-8	300	nein	100	180	5990725	15
BII9-10	300	nein	75	180	5596122	14
BII11-12	300	nein	50	180	11024498	27
BIII1-2	300	ja	100	250	8475731	21
BIII3-4	300	ja	75	250	10743305	27
BIII5-6	300	ja	<u>5</u> 0	250	12462005	31

BIII7-8	300	nein	100	250	9169460	23
BIII9-10	300	nein	75	250	9603555	24
BIII11-12	300	nein	50	250	8116273	20
CI1-2	100	ja	30	120	3150301	8
CI3-4	100	ja	15	120	3322080	8
CI7-8	100	nein	30	120	3283179	8
CI9-10	100	nein	15	120	3703504	9
CII1-2	100	ja	30	180	4156500	10
CII3-4	100	ja	15	180	5118633	13
CII7-8	100	nein	30	180	5158235	13
CII9-10	100	nein	15	180	4022345	10
CIII1-2	100	ja	30	250	6575251	16
CIII3-4	100	ja	15	250	7101344	18
CIII7-8	100	nein	30	250	6264106	16
CIII9-10	100	nein	15	250	10382139	26

Tabelle 10: Durchführung und Ergebnisse der Fermentationsoptimierung von 59.

10.4 Fermentationskurve

Zur Aufnahme des zeitabhängigen Produktionsverlaufes von Thaxtomin A (**59**) wurde *Streptomyces* sp. Dra17 in 300 mL Schüttelkolben ohne Schikanen, die mit 75 mL Hafermedium befüllt waren, nach Beimpfen mit 3.75 mL einer 48 h alten Vorkultur (Bedingungen siehe B.10.1) bei 28 °C und 250 rpm kultiviert. Es wurden zu den in Tabelle 11 aufgeführten Zeiten je 2 Kolben entnommen, vereinigt und der pH-Wert gemessen. Zur Aufarbeitung wurden die Zellen abzentrifugiert (10 min, 4000 rpm) und verworfen; 30 mL des Kulturfiltrates wurden dreimal mit 15 mL Essigsäureethylester extrahiert. Durch analytische HPLC (Säule 1, Programm 1) wurde die Thaxtomin A (**59**)-Produktion bestimmt (siehe Tabelle 11).

Probe #	Fermentations-	pН	Fläche	Menge 59
	Dauer [h]			[mg/L]
Medium	-	5.8	-	-
0	0	5.6	587645	1.5
1	5	5.5	585038	1.5
2	14.5	5.2	1042438	2.6
3	19.25	5.0	3374320	8.4
4	24.75	4.8	2785614	6.9

5	31	4.7	6485627	16.1	-
6	38.5	4.7	5513670	13.7	
7	43	4.5	9591911	23.8	
8	48.75	4.3	14891230	37.0	
9	55.25	4.7	8574584	21.3	
10	62.5	4.5	12508827	31.0	
11	67.25	4.5	12727574	31.6	
12	73.75	4.5	13784334	34.2	
13	77.25	4.6	10289004	25.5	
14	88.75	4.6	15354894	38.1	
15	96.5	4.4	11437977	28.4	
16	121.75	4.8	11305467	28.1	
17	162.25	4.6	10284893	25.5	

Tabelle 11: Fermentationskurve

10.5 Fütterungsversuch

Streptomyces sp. Dra 17 wurde in 300 mL Schüttelkolben ohne Schikanen, die mit 75 mL Hafermedium befüllt waren, nach Beimpfen mit 3.75 mL einer 48 h alten Vorkultur (Bedingungen siehe B.10.1) bei 28 °C und 180 rpm kultiviert. Nach 14 h, 18 h, 22 h und 30 h wurden je 250 µL der in Tabelle 12 angegebenen gelösten Substanzen (Lösungsmittel: 2 mL Methanol, NMMA: Wasser) gefüttert, nach 39 h, 47 h und 54 h weitere 333 µL. Die Kolben wurden einzeln aufgearbeitet. Dazu wurden die Zellen abzentrifugiert (10 min, 4000 rpm) und verworfen; 30 mL des Kulturfiltrates wurden dreimal mit 15 mL Essigsäureethylester extrahiert. Durch analytische HPLC (Säule 1, Programm 1) wurde die Thaxtomin A (**59**)-Produktion bestimmt (siehe Tabelle 12) bzw. die Menge an **14** (Tabelle 13) und **13** (Tabelle 14) analysiert.

Ansatz	Kolben 1	Kolben 2	Kolben 3	Kolben 4	(Ø)	Produktion
	[Integral]	[Integral]	[Integral]	[Integral]	[Integral]	in %/Ref.
80 mg/L 13	15278318	9168093	14256667	13069608	12943172	65
27 mg/L 13	21595908	20034362	20018436	19651000	20324926	102
8 mg/L 13	19099405	20061528	22783807	19651286	20399006	102
2.7 mg/L 13	22935560	22176899	21798695	21353355	22066127	111
0.27 mg/mL 13	22228250	22658908	21503861	19838660	21557420	108
1 mg/mL	6816454	7049945	6941471	6085738	6723402	34
NNA (102)						
1mg/ml	5796453	6630068	4552969	5404489	5595995	28
NMMA (103)						
Referenz	19174972	21094422	20008396	19421720	19924877	100

Tabelle 12: Konzentation von 59 im Fütterungsversuch.

Ansatz	Kolben 1	Kolben 2	Kolben 3	Kolben 4	(Ø)	Produktion
	[Integral]	[Integral]	[Integral]	[Integral]	[Integral]	in %/Ref.
80 mg/L 13	2402010	1826278	2387828	2517010	2283282	348
27 mg/L 13	1362915	1366107	1418390	1424900	1393078	212
8 mg/L 13	731134	641556	737056	627151	684224	104
2.7 mg/L 13	575682	625262	576693	534969	578152	88
0.27 mg/mL 13	467624	485849	419871	365490	434709	66
1 mg/mL	290492	620651	498629	558237	492002	75
NNA (102)						
1mg/ml	602576	614291	518196	537561	568156	87
NMMA (103)						
Referenz	554372	633590	671736	766740	656610	100

Tabelle 13: Konzentation von 14 im Fütterungsversuch.

Ansatz	Kolben 1	Kolben 2	Kolben 3	Kolben 4	(Ø)	Produktion
	[Integral]	[Integral]	[Integral]	[Integral]	[Integral]	in %/Ref.
80 mg/L 13	50477	65834	73396	47758	-	-

Tabelle 14: Konzentation von 13 im Fütterungsversuch.

C. LITERATURVERZEICHNIS

- ¹ C. Pedrós-Alió, *Science* **2007**, *315*, 192–193.
- ² N. R. Pace, D. A. Stahl, D. J.Lane, G. J. Olsen, *Adv. Microb. Ecol.* **1986**, *9*, 1–55.
- ³ C. R. Woese, E. Stackebrandt, T. J. Macke, G. E. A. Fox, *Syst. Appl. Microbiol.* **1985**, *6*, 143–151.
- ⁴ M. S. Rappé, S. J. Giovannoni, *Annu. Rev. Microbiol.* **2003**, *57*, 369–394.
- ⁵ M. Keller, K. Zengler, *Nat. Rev.* **2004**, *2*, 141–150.
- ⁶ M. A. Dojka, J. K. Harris, N. R. Pace, *Appl. Environ. Microbiol.* **2000**, *66*, 1617–1621.
- ⁷ C. Pedrós-Alió, *Trends Mircorbiol.* **2006**, *14*, 257–263.
- ⁸ R. Daniel, *Nature Rev.* **2005**, *3*, 470–478.
- ⁹ a) S. Winogradsky, *Botanische Zeitung* 1887, 45, 489–507, 513–523, 529–539, 545–559, 569–576, 585–594, 606–610; b) W. M. Beijernick, *Zentralblatt Bakteriol.* 1895, 1, 1–9, 49–59, 104–114.
- ¹⁰ H. Eilers, J. Pernthaler, F. O. Glöckner, R. Amann, *Appl. Environ. Microbiol.* **2000**, *66*, 3044–3051.
- ¹¹ P. H. Janssen, P. S. Yates, B. E. Grinton, P. M. Taylor, M. Sait, *Appl. Environ. Microbiol.* 2002, 68, 2391–2396.
- ¹² A. Bruns, U. Nübel, H. Cypionka, J. Overmann, *Appl. Environ. Microbiol.* **2003**, *69*, 1980–1989.
- ¹³ D. K. Button, F. Schut, P. Quang, R. Martin, B. R. Roberston, *Appl. Environ. Microbiol.* **1993**, *59*, 881–891.
- ¹⁴ K. Zengler, G. Toledo, M. Rappe, J. Elkins, E. J. Mathur, J. M. Short, M. Keller, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 15681–15686.
- ¹⁵ N. Lee, P. H. Nielsen, K. H. Andreasen, S. Juretschko, J. L. Nielsen, K.-H. Schleifer, M. Wagner, *Appl. Environ. Microbiol.* **1999**, *65*, 1289–1297.
- ¹⁶ S. Radajewski, P. Ineson, N. R. Parekh, J. C. Murrell, *Nature* **2000**, *403*, 646–649.
- ¹⁷ N. R. Pace, D. A. Stahl, D. J. Lane, G. J. Olsen, *ASM News* **1985**, *51*, 4–12.
- ¹⁸ J. Handelsman, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2004**, *68*, 669–685.
- ¹⁹ T. M. Schmidt, E. F. DeLong, N. R. Pace, *J. Bacteriol.* **1991**, *173*, 4371–4378.
- ²⁰ C. S. Riesenfeld, P. D. Schloss, J. Handelsman, *Annu. Rev. Genet.* **2004**, *38*, 525–552.
- G. W. Tyson, J. Chapman, P. Hugenholtz, E. E. Allen, R. J. Ram, P. M. Richardson, V. V. Solovyev, E.
 M. Rubin, D. S. Rokhsar, J. F. Banfield, *Nature* 2004, 428, 37–43.
- J. C. Venter, K. Remington, J. F. Heidelberg, A. L. Halpern, D. Rusch, J. A. Eisen, D. Wu, I. Paulsen,
 K. E. Nelson, W. Nelson, D. E. Fouts, S. Levy, A. H. Knap, M. W. Lomas, K. Nealson, O. White, J.
 Peterson, H. Hoffman, R. Parsosns, H. Baden-Tillson, C. Pfannkoch, Y.-H. Rogers, H. O. Smith,
 Science 2004, *304*, 66–74.
- ²³ O. Béjà, L. Aravind, E. V. Koonin, M. T. Suzuki, A. Hadd, L. P. Nguyen, S. B. Jovanovich, C. M. Gates, R. A. Feldman, J. L. Spudich, E. N. Spudich, E. F. DeLong, Science 2000, 289, 1902–1906.
- ²⁴ N. Kimura, *Microbes Environ.* **2006**, *21*, 201–215.
- ²⁵ P. Lorenz, J. Eck, *Nature Rev.* **2005**, *3*, 510–516.
- ²⁶ D Newman, G. Cragg, K. Snader, *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 1022–1037.
- ²⁷ K. M. Overbye, J. F. Barrett, *Drug Discovery Today* **2005**, *10*, 45–52.

28	F. von Nussbaum, M. Brands, B. Hinzen, S. Weigand, D. Häbich, Angew. Chem. 2006, 118, 5194-
	5254.
29	G. M. König, S. Kehraus, S. F. Seibert, A. Abdel-Lateff, D. Müller, ChemBioChem 2006, 7, 229-238.
30	A. Extance, Chemistry Reviews 2005, 15, 2–6.
31	a) S. F. Brady, S. A. I. Wright, J. C. Lee, A. E. Sutton, C. H. Zumoff, R. S. Wodzinski, S. V. Beer, J.
	Clardy, J. Am. Chem. Soc. 1999, 121, 11912–11913; b) M. Jin, S. A. I. Wright, S. V. Beer, J. Clardy,
	Angew. Chem. 2003, 115, 3004–3007.
32	J. Piel, Proc.Natl. Acad. Sci. USA 2002, 99, 14002–14007.
33	GYS. Wang, E. Graziani, B. Waters, W. Pan, X. Li, J. McDermott, G. Meurer, G. Saxena, R. J.
	Andersen, J. Davies, Org. Lett. 2000, 2, 2401–2404.
34	D. E. Gillespie, S. F. Brady, A. D. Bettermann, N. P. Cianciotto, M. R. Liles, M. R. Rondon, J. Clardy,
	R. M. Goodman, J. Handelsman, Appl. Environ. Microbiol. 2002, 68, 4301-4306.
35	a) S. F. Brady, J. Clardy, Angew. Chemie. Int. Ed. 2005, 44, 7063-7065; b) S. F. Brady, J. Clardy,
	Angew. Chemie. Int. Ed. 2005, 44, 7045–7048.
36	O. Wagner, Dissertation, Universität Göttingen, 2000.
37	J. v. Frieling, Staatsexamensarbeit, Universität Göttingen, 2002.
38	F. Surup, Diplomarbeit, Universität Göttingen, 2003.
39	R. Daniel, Curr. Opin. Biotechnol. 2004, 15, 199–204.
40	P. Lorenz, Chem. Ing. Tech. 2006, 78, 461–468.
41	N. Ward, FEMS Microbiol. Ecol. 2006, 55, 331–338.
42	P. D. Schloss, J. Handelsman, Curr. Opin. Biotechnol. 2003, 14, 303-310.
43	J. Xu, Mol. Ecol. 2006, 15, 1713–1731.
44	A. Martinez, S. J. Kolvek, C. L. T. Yip, J. Hopke, K. A. Brown, I. A. MacNeil, M. S. Osburne, Appl.
	Environ. Microbiol. 2004, 70, 2452–2463.
45	EpiFOS TM Fosmid Library Production Kit, Manual; EpiCentre®
46	J. E. M. Stach, L. A. Maldonado, D. G. Masson, A. C. Ward, Appl. Environ. Microbiol. 2003, 69, 6189-
	6200.
47	M. A. Smith, M. J. Bidochka, Can. J. Microbiol. 1998, 44, 351-355.
48	H. B. Bode, B. Bethe, R. Höfs, A. Zeeck, ChemBioChem 2002, 3, 619-627.
49	L. Nelson, M. Cox, Lehninger Biochemie, Springer, Berlin Heidelberg, 2001, 698-701.
50	W. Ismail, M. E Mohamed, B. L. Wanner, K. A. Datsenko, W. Eisenreich, F. Rohdich, A. Bacher, G.
	Fuchs, Eur. J. Biochem. 2003, 270, 3047-3054.
51	H. Laatsch, Natrustoffdatenbank AntiBase, Chemical Conzepts, Weinheim 2006.
52	Autorenkollektiv, Chapman & Hall/CRC Dictionary of Natural Products on CD-ROM, Version 15:2,
	Chapman&Hall, CRC, 2007 .
53	C. Eguchi, Y. Yokokawa, Heterocycles 1984, 21, 470.
54	Japan Pat. 1976, JP 51050938 19760506, CAN 86:28618, AN 1977:28618.
55	Japan Pat. 1977, JP 52084220 19770713, CAN 87:186079, AN 1977:586079.

- ⁵⁶ L. Nelson, M. Cox, *Lehninger Biochemie*, Springer, Berlin Heidelberg, **2001**, 900–902.
- ⁵⁷ P. M. Dewick, *Nat. Prod. Rep.* **1995**, *12*, 579–607.

- 58 M. Brufani, W. Fideli, F. Mazza, A. Gerhard, W. Keller-Schierlein, *Experientia* 1971, 27, 1249–1250. 59 W. Fedeli, F. Mazza, J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2, 1974, 1621-1623. 60 W. Schindler, H. Zähner, Arch. Microbiol. 1971, 79, 187-203. 61 a) J. Bergman, B. Egestad, J.-O. Lindström, Tet. Lett. 1977, 30, 2625–2626; b) J. Bergman, J.-O. Lindström, U. Tilstam, Tet. Lett. 1985, 41, 2879-2881. 62 P. Friedländer, N. Roschdestwensky, Ber. 1915, 48, 1841-1847. 63 a) C. Bird, Tetrahedron 1963, 19, 901–904; b) J. Cornforth, P. Hitchcock, P. Rozos, J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1, 1996, 2787–2792. 64 T. Murakami, A. Kishi, T. Sakurama, H. Matsuda, M. Yoshikawa, *Heterocycles* 2001, 55, 957–966. 65 M. Yoshikawa, T. Murakami, A. Kishi, T. Sakurama, H. Matsuda, M. Normura, M. Kubo, Chem. Pharm. Bull. 1998, 46, 886-888. 66 E. Fiedler, H.-P. Fiedler, A. Gerhard, W. Keller-Schierlein, W. König, H. Zähner, Arch. Microbiol., 1976, 107, 249-256. 67 A. Berry, T. C. Dodge, M. Pepsin, W. Weyler, J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 2002, 28, 127-133. 68 A. Aiello, E. Fattorusso, P. Luciano, M. Menna, G. Esposito, T. Iuvone, D. Pala, Eur. J. Org. Chem. 2003, 9, 898-900. 69 S. Cao, C. Foster, M. Brisson, J. S. Lazo, D. G. I. Kingston, Bioorg. Med. Chem. 2005, 13, 999-1003. 70 M. Ochsner, J. Phytochem. Phytobiol. B Biol. 1997, 39, 1-18. 71 a) H. Danz, S. Stoyanova, P. Wippich, A. Brattström, M. Hamburger, *Planta Med.* 2001, 67, 411–416; b) H. Danz, S. Stoyanova, O. A. R. Thomet, H.-U. Simon, G. Dannhardt, H. Ulbrich, M. Hamburger, Planta Med. 2002, 68, 875-880. 72 D. Schrenk, D. Riebniger, M. Till, S. Vetter, H.-P. Fiedler, Biochem. Pharmacol. 1997, 54, 165-171. 73 T. Ishihara, K. Kohno, S. Ushio, K. Iwaki, M. Ikeda, M. Kurimoto, Eur. J. Pharmacol. 2000, 407, 197-204. 74 Y. Takei, T. Kunikata, M. Aga, S. Inoue, S. Ushio, K. Iwaki, M. Ikeda, M. Kurimoto, Biol. Pharm. Bull. 2003, 26, 365-367. 75 M. Hamburger, Phytochem. Rev. 2002, 1, 333-344. 76 S. Courtois, C. M. Cappellano, M. Ball, F.-X. Francou, P. Normand, G. Helynck, A. Martinez, S. J. Kolvek, J. Hopke, M. S. Osburne, P. R. August, R. Nalin, M. Guérineau, P. Jeannin, P. Simonet, J.-L. Pernodet, Appl. Environ. Microbiol. 2003, 69, 49-55. 77 J. Clardy, persönliche Mitteilung, 2007. 78 I. A. MacNeil, C. L. Tiong, C. Minor, P. R. August, T. H. Grossman, K. A. Loiacono, B. A. Lynch, T. Phillips, S. Narula, R. Sundaramoorthi, A. Tyler, T. Aldredge, H. Long, M. Gilman, D. Holt, M. S. Osborne, J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 2001, 3, 301–308. 79 S. F. Brady, C. C. Chao, J. Handelsman, J. Clardy, Org. Lett. 2001, 3, 1981–1984. 80 S. F. Brady, J. Clardy, J. Am. Chem. Soc. 2000, 122, 12903-12904. 81 S. F. Brady, J. Clardy, J. Am. Chem. Soc. 2002, 124, 9968-9969.
- ⁸² S. F. Brady, J. Clardy, J. Nat. Prod. **2004**, 67, 1283–1286.
- ⁸³ S. F. Brady, J. Clardy, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 3613–3616.

- ⁸⁴ S. F. Brady, C. C. Chao, J. Clardy, *Appl. Environ. Microbiol.* **2004**, *70*, 6865–6870.
- ⁸⁵ A. A. Stierle, D. B. Stierle, K. Kelly; J. Org. Chem. **2006**, 71, 5357–5360.
- ⁸⁶ G. Wang, J. Ind. Microbiol. Biotechnol. **2006**, 33, 545–551.
- ⁸⁷ M. Kroppenstedt, *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ)*, **2006**.
- ⁸⁸ F. A. Rainey, N. Ward-Rainey, R.M. Kroppenstedt, E. Stackebrandt, *Ind. J. Syst. Bacteriol.* 1996, 46, 1088–1092.
- a) B.L. Maidak, G.J. Olsen, N. Larsen, M.J. McCaughey, C.R. Woese, *Nucl. Acids Res.* 1996, 24, 82–85; b) DSMZ eigene Datenbank.
- ⁹⁰ E. B. Shirling, D. Gottlieb, *Int. J. Syst. Bacteriol.* a) 1968, *16*, 313–340; b) 1969, *17*, 315–322; c) 1970, *18*, 69–189; d) 1970, *18*, 279–392; e) 1971, *19*, 391–512; 1973, *22*, 360.
- ⁹¹ P. Kämpfer, R. M. Kroppenstedt, W. Dott, J. Gen. Microbiol. **1991**, 13, 1831–1891.
- ⁹² H. Wolf, E. Fischer in *Modes and Mechanisms of Microbial Growth Inhibitors* (Ed.: F. E. Hahn),
 Springer, Berlin-Heidelberg, **1983**, pp. 71–89.
- ⁹³ T. Hogg, J. R. Mesters, R. Hilgenfeld, *Curr. Protein Pept. Sci.* **2002**, *3*, 121–131.
- ⁹⁴ (a) C.-K. Wat, A. G. McInnes, D. G. Smith, J. L. C. Wright, L. C. Vining, *Can. J. Chem.* 1977, 55, 4090–4098; (b) R. J. Cox, D. J. O'Hagan, *Chem. Soc. Perkin Trans. 1* 1991, 2537–2540.
- ⁹⁵ K. Schmidt, W. Gunther, S. Stoyanova, B. Schubert, Z. Li, M. Hamburger, Org. Lett. 2002, 4, 197–199.
- ⁹⁶ K. Yano, K. Yokoi, J. Sato, J. Oono, T. Kouda, Y. Ogawa, T. Nakashima, J. Antibiot. **1986**, *39*, 32–37.
- ⁹⁷ M. A. Graber, W. H. Gerwick, J. Nat. Prod. **1998**, 61, 677–680.
- ⁹⁸ N. Takahashi, A. Suzuki, S. Tamura, J. Am. Chem. Soc. **1965**, 87, 2066–2067.
- (a) H. Ui, K. Shiomi, H. Suzuki, H. Hatano, H. Morimoto, Y. Yamaguchi, R. Masuma, T. Sunazuka, H. Shimamura, K. Sakamoto, K. Kita, H. Miyoshi, H. Tomoda, S. Omura *J. Antibiot.* 2006, *59*, 785–790; (b) H. Shimamura, T. Sunazuka, T. Izuhara, T. Hirose, K. Shiomi, S. Omura, *Org. Lett.* 2007, *9*, 65–67.
- ¹⁰⁰ T. Weber, K. Laiple, E. Proß, A. Textor, S. Grond, K. Welzel, S. Pelzer, A. Vente, W. Wohlleben, Revealing the kirromycin biosynthesis in *Streptomyces collinus* Tü 365 - Implications from the biosynthetic gene cluster of Kirromycin. (*in Vorbereitung*).
- a) E. Leete, N. Kowanko, *Tetrahedron Lett.* 1975, 47, 4103–4106; b) K. L. Eley, L. M. Halo, Z. Song,
 H. Powles, R. J. Cox, A. M. Bailey, C. M. Lazarus, T. J. Simpson, *ChemBioChem* 2007, 8, 289–297.
- ¹⁰² K. Schmidt, U. Riese, Z. Li, M. Hamburger, J. Nat. Prod. 2003, 66, 378–383.
- ¹⁰³ M. Tanabe, H. Seto J. Org. Chem. **1970**, 35, 2087–2088.
- a) B. S. Moore, C. Hertweck, *Nat. Prod. Rep.* 2002, *19*, 70–99; b) W. Trowitzsch-Kienast, V. Wray, K. Gerth, H. Reichenbach, G. Höfle, *Liebigs Ann. Chem.* 1986, 93–98; c) B. Silakowski, H. U. Schairer, H. Ehret, B. Kunze, S. Weinig, G. Nordsiek, P. Brandt, H. Blöcker, G. Höfle, S. Beyer, R. Müller, *J. Biol. Chem.* 1999, *274*, 37391– 37399; d) C. D. Denoya, R. W. Fedechko, E. W. Hafner, H. A. I. McArthur, M. R. Morgenstern, D. D. Skinner, K. Stutzman-Engwal, R. G. Wax, W. C. Wernau, *J. Bacteriol.* 1995, *177*, 3504–3511.
- ¹⁰⁵ C. J. Dutton, S. P. Gibson, A. C. Goudie, K. S. Holdom, M. S. Pacey, J. C. Ruddock, J. D. Bu'lock,
 M. K. Richards, *J. Antibiot.* 1991, 44, 357–365.

- ¹⁰⁶ B. J. Carroll, S. J. Moss, L. Bai, Y. Kato, S. Toelzer, T.-W. Yu, H. G. Floss, *J. Am. Chem. Soc.* 2002, 124, 4176–4177.
- ¹⁰⁷ R. Thierike, *Dissertation*, Universität Göttingen, **1988**.
- ¹⁰⁸ G. Thormann, *Dissertation*, Universität Göttingen, **2004**.
- ¹⁰⁹ J. Staunton, K. J. Weissman. *Nat. Prod. Rep.* **2001**, *18*, 380–416.
- ¹¹⁰ H. Motamedi, S.-J. Cai, A. Shafiee, K. Elliston, *Eur. J. Biochem.* **1997**, 244, 74–80.
- ¹¹¹ H. Motamedi, A. Shafiee, *Eur. J. Biochem.* **1998**, 256, 528–534.
- a) A. James, G. Peeters, M. Lauryssens, *Biochem. J.* 1956, 64, 726–730; b) E. Radmacher, L.
 Alderwick, G. Besra, A. Brown, K. Gibson, H. Sahm, L. Eggeling, *Microbiology* 2005, 151, 2421–2427.
- ¹¹³ R. Thomas, D. Williams, J. Chem. Soc., Chem. Commun. **1983**, 128–130.
- ¹¹⁴ H. Bockholt, G. Udvarnoki, J. Rohr, U. Mocek, J. Beale, H. Floss, *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 2064–2069.
- ¹¹⁵ T. Liu, M. Kharel, C. Fischer, A. McCormick, J. Rohr, *ChemBioChem* **2006**, *7*, 1070–1077.
- ¹¹⁶ T. Kieser, M. J. Bibb, M. J. Buttner, K. F. Chater, D. A. Hopwood, *Practical Streptomyces Genetics*, The John Innes Foundation, Norwich, **2000**.
- ¹¹⁷ P. Mazodier, R. Petter, C. Thompson, J. Bacteriol. **1989**, 171, 3583–3585.
- ¹¹⁸ J. H. Badger, G. J. Olsen, *Mol. Biol. Evol.* **1999**, *16*, 512–524.
- ¹¹⁹ K. Rutherford, J. Parkhill, J. Crook, T. Horsnell, P. Rice, M. A. Rajandream, B. Barrell, *Bioinformatics* **2000**, *16*, 944–945.
- ¹²⁰ S. F. Altschul, W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, D. J. Lipman, J. Mol. Biol. **1990**, 215, 403–410.
- ¹²¹ S. R. Eddy, HMMER: Profile hidden Markov models for biological sequence analysis, http://hmmer.janelia.org, **2006**.
- ¹²² T. Weber, persönliche Mitteilung, **2007**.
- a) J. Lau, H. Fu, D. E. Cane, C. Khosla, *Biochemistry* 1999, *38*, 1643–1651; b) F. Del Vecchio, H.
 Petkovic, S. G. Kendrew, L. Low, B. Wilkinson, R. Lill, J. Cortés, B. A. M. Rudd, J. Staunton, P. F.
 Leadlay, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2003, *30*, 489–494; c) C. D. Reeves, S. Murli, G. W. Ashley,
 M. Piagentini, C. R. Hutchinson, R. McDaniel, *Biochemistry* 2001, *40*, 15464–15470.
- ¹²⁴ S. F. Haydock, A. N. Appleyard, T. Mironenko, J. Lester, N. Scott, P. F. Leadlay, *Microbiology* 2005, 151, 3161–3169.
- ¹²⁵ S. Haydock, J. Aparicio, I. Molnár, T. Schwecke, L. Khaw, A, König, A. Marsden, I. Galloway, J. Staunton, P. Leadlay, *FEBS Letters* **1995**, *374*, 246–248.
- ¹²⁶ L. Tang, Y. J. Yoon, C.-Y. Choi, C. R. Hutchinson, *Gene* **1998**, *216*, 255–265.
- a) B. O. Bachmann, *Nat. Chem. Biol.* 2005, *1*, 244–245; b) S. Lautru, R. J. Deeth, L. M. Bailey, G. L. Challis, *Nat. Chem. Biol.* 2005, *1*, 265–268.
- ¹²⁸ S. C. Wenzel, F. Gross, Y. Zhang, J. Fun, A. F. Stewart, R. Müller, *Chem. & Biol.* **2005**, *12*, 349–356.
- ¹²⁹ Die Sequenzdaten wurden von der S. scabies Sequenzierungsgruppe am Sanger Institut produziert und können unter ftp://ftp.sanger.ac.uk/pub/pathogens/ssc/ erhalten werden.
- E. Oberdisse, E. Hackenthal, K. Kuschinsky, *Pharmakologie und Toxikologie* 1997, Berlin Heidelberg, Kapitel 14.
- ¹³¹ M. S. C. Pedras, S. Montaut, , I. L Zaharia, Y. Gai, D. E. Ward, *Phytochem.* **2003**, *64*, 957–963.

- ¹³² S. L. Kelly, D. C. Lamb, C. J. Jackson, A. G. S. Warrilow, D. E. Kelly, *Adv. Microb. Physiol.* 2003, 47, 131–186.
- ¹³³ M. J. Cryle, J. E. Stok, J. J. De Voss, *Aust. J. Chem.* **2003**, *56*, 749–762.
- ¹³⁴ J. F. Anderson, C.R. Hutchinson, *J. Bacteriol.* **1992**, *174*, 725–735.
- ¹³⁵ J. Hedegaard, I. C. Gunsalus, J. Biol. Chem. **1965**, 240, 4038–4043.
- G. Grogan, G. A. Roberts, S. Parsons, N. J. Turner, S. L. Flitsch, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2002, 59, 449–454.
- ¹³⁷ H. Oikawa, S. Ohashi, A. Ichihara, S. Sakamura *Tetrahedron* **1999**, *55*, 7541–7554.
- ¹³⁸ H. Oikawa, Y. Murakami, A. Ichihara *Tetrahedron Letters* **1991**, *32*, 4533–4536.
- ¹³⁹ S. J. Britz, R. A. Saftner, *J. Plant Growth Regul.* **1987**, *6*, 215–219.
- ¹⁴⁰ R. Loria, J. Coombs, M. Yoshida, J. Kers, R. Bukhalid, *Phys. Mol. Plant Path.* **2003**, 62, 65–72.
- ¹⁴¹ R. Loria, J. Kers, M. Joshi, Annu. Rev. Phytopathol. **2006**, 44, 469–487.
- ¹⁴² C. Goyer. P.-M. Charest, V. Toussaint, C. Beaulieu, *Can. J. Bot.* **2000**, 78, 374–380.
- ¹⁴³ R. Locci, *Actinomyces* **1994**, *5*, 45–56.
- ¹⁴⁴ R. Loria, R. A. Bukhalid, B. A. Fry, R. R. King, *Plant Disease* **1997**, *81*, 836–846.
- ¹⁴⁵ C. A. Clark, C. Chen, N. Ward-Rainey, G. S. Pettis, *Phytopathology* **1998**, 88, 1179–1186.
- M. Natsume, M. Komiya, F. Koyanagi, N. Tashiro, H. Kawaide, H. Abe, J. Gen Plant. Pathol. 2005, 71, 364–369.
- ¹⁴⁷ R. R King, C. H. Lawrence, M. C. Clark, L. A. Calhoun, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1989**, 13, 849– 850.
- ¹⁴⁸ M. J. Babcock, E. C. Eckwall, J. L. Schottel, *J. Gen. Microbiol.* **1993**, *139*, 1579–1589.
- ¹⁴⁹ R. R. King, C. H. Lawrence, J. Agric. Food Chem. **1996**, *44*, 1108–1110.
- ¹⁵⁰ R. R King, C. H. Lawrence, M. C. Clark, *Am. Potato J.* **1991**, *68*, 675–680.
- ¹⁵¹ C. H. Lawrence, M. C. Clark, R. R. King, Phytopathology **1990**, *80*, 606–608.
- ¹⁵² F. G. Healy, M. Wach, S. B. Krasnoff, D. M. Gibson, R. Loria, *Mol. Microbiol.* **2000**, *38*, 794–804.
- ¹⁵³ W.-R. Scheible, B. Fry, A. Kochevenko, D. Schindelasch, L. Zimmerli, S. Somerville, R. Loria,
 C. R. Somerville, *Plant Cell* 2003, *15*, 1781–1794.
- ¹⁵⁴ I. Duval, V. Brochu, M. Simard, C. Beaulieu, N. Beaudoin, *Planta* **2005**, 222, 820–831.
- ¹⁵⁵ R. S. Tegg, L. Melian, C. R. Wilson, S. Shabala, *Plant Cell Physiol.* **2005**, *46*, 638–648.
- ¹⁵⁶ B. A. Fry, R. Loria, *Phys. Mol. Plant Path.* **2002**, *60*, 1–8.
- ¹⁵⁷ R. R. King, C. H. Lawrence, J. Agric. Food Chem. **2001**, 49, 2298–2301.
- ¹⁵⁸ R. R. King, *Can. J. Chem.* **1997**, *75*, 1172–1173.
- a) M. Natsume, R. Ryu, H. Abe, *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 1996, *62*, 411–413; b) M. Natsume, A. Yamada, N. Tashiro, H. Abe, *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 1998, *64*, 202–204; c) M. Natsume, M. Taki, N. Tashiro, H. Abe, *J. Gen. Plant Pathol.* 2001, *67*, 299–302.
- ¹⁶⁰ S. Gagliardi, M. Rees, C. Farina, *Curr Med Chem.* **1999**, *6*, 197–212.
- ¹⁶¹ M. Natsume, M. Komiya, F. Koyanagi, H. Kawaide, N. Tashiro, H. Abe, *A.C.S. Symp. Ser.* 2005, 892, 239–245.
- A. Lauzier, C. Goyer, L. Ruest, R. Brzezinski, D.L. Crawford, C. Beaulieu, *Can. J. Microbiol.* 2002, 48, 359–364.

- ¹⁶³ F. G. Healy, S. B. Krasnoff, M. Wach, D. M. Gibson, R. Loria, *J. Bacteriol.* **2002**, *184*, 2019–2029.
- ¹⁶⁴ J. A. Kers, M. J. Wach, S. B. Krasnoff, J. Widom, K. D. Cameron, R. A. Bukhalid, D. M. Gibson, B. R. Crane, R. Loria, *Nature* 2004, 429, 79–82.
- ¹⁶⁵ R. R. King, H. Lawrence, *Phytochemistry* **1995**, *40*, 41–43.
- ¹⁶⁶ R. R. King, C. H. Lawrence, L. H. Calhoun, *Phytochemistry* **1998**, *49*, 1265–1267.
- a) R. A. Bukhalid, R. Loria, *J. Bacteriol.* 1997, 179, 7776–7783; b) R. A. Bukhalid, T. Takeuchi, D. Labeda, R. Loria, *Appl. Environ. Microbiol.* 2002, 68, 738–744.
- ¹⁶⁸ K. Bouarab, R. Melton, J. Peart, D. Baulcombe, A. Osbourn, *Nature* **2002**,*418*, 889–892.
- ¹⁶⁹ F. G. Healy, R. A. Bukhalid, R. Loria, J. *Bacteriol.* **1999**, *181*, 1562–1568.
- J. A. Kers, K. D. Cameron, M. V. Joshi, R. A. Bukhalid, J. E. Morello, M. J. Wach, D. M. Gibson,
 R. Loria *Mol. Microbiol.* 2005, *55*, 1025–1033.
- ¹⁷¹ R. A. Bukhalid, S. Y. Chung, R. Loria, *Mol. Plant Microbe Interact.* **1998**, *11*, 960–967.
- J. Beauséjour, C. Goyer, J. Vachon, C. Beaulieu, *Can. J. Microbiol.* **1999**, 45, 764–768.
- ¹⁷³ M. J. Wach, S. B. Krasnoff, R. Loria, D. M. Gibson, Arch. Microbiol. 2007.
- R. Loria, R. A. Bukhalid, R. A. Creath, R. H. Leiner, M. Olivier, J. C. Steffens, *Phytopathology* 1995, 85, 537–541.
- ¹⁷⁵ J. Beauséjour, C. Beaulieu, *Can. J. Microbiol.* **2004**, *50*, 705–709.
- ¹⁷⁶ M. J. Wach, J. A. Kers, S. B. Krasnoff, R. Loria, D.M. Gibson, *Nitric Oxide* **2004**, *12*, 46–53.
- ¹⁷⁷ Japan Pat. **1998**, JP 9755460 19970225, CAN 129:244203 AN 1998:586309.
- ¹⁷⁸ S. Hydar, *Dissertation*, Göttingen **2007**.
- ¹⁷⁹ S. R. Chhabra, B. Philipp, L. Eberl, M. Givskov, P. Williams, M. Cámara, *Top. Curr. Chem.* 2005, 240, 279–315.
- ¹⁸⁰ C. L. Doumbou, V. Akimov, C. Beaulieu, *Appl. Environ. Microbiol.* **1998**, *64*, 4313–4316.
- ¹⁸¹ G. Lazarovits, J. Hill, R. R. King, L. A. Calhoun, *Can. J. Microbiol.* **2004**, *50*, 121–126.
- ¹⁸² E. C. Neeno-Eckwall, L. L. Kinkel, J. L. Schottel, *Can. J. Mikrobiol.* **2001**, *47*, 332–340.
- a) L. A. Acuna, G. A. Strobel, B. J. Jacobsen, D. L. Corsini, *Plant Science* 2001, *161*, 77–88; b) R. R. King, C. H. Lawrence, J. Embleton, L. A. Calhoun, *Phytochemistry* 2003, *64*, 1091–1096.
- ¹⁸⁴ King, C. H. Lawrence, L. A. Calhoun, J. Agric. Food Chem. **2000**, 48, 512–514.
- a) S. Tamura, N. Takahashi, S. Miyamoto, R. Mori, S. Suzuki, J. Nagatsu, *Agric. Biol. Chem.* 1963, 27, 576–582;
 b) S. Tamura, A. Suzuki, Y. Kimura, S. Miyamoto, S. Tamura, T. Mitsui, J. Fukami, *Agric. Biol. Chem.* 1968, 32, 1115–1122.
- ¹⁸⁶ S. Yoshida, N. Takahashi, *Heterocycles* **1978**, *10*, 425–467.
- ¹⁸⁷ M. Matsumoto, K.-I. Mogi, K. Nagaoka, S. Ishizeki, R. Kawahara, T. Nakashima, J. Antibiot. 1987, 40 149–156.
- a) S. Funayama, M. Ishibashi, Y. Anraku, M. Miyauchi, H. Mori, K. Komiyama, S. Omura, *J. Antibiot.* **1989**, *42*, 1734–1740; b) H. Mori, S. Funayama, Y. Sudo, K. Komiyama, S. Omura, *J. Antibiot.* **1990**, *43*, 1329–1331.
- ¹⁸⁹ H. Iwasaki, K.-I. Kamisango, H. Kuboniwa, H. Sasaki, S. Matsubara, J. Antibiot. **1991**, 44, 451–452.

- a) K.-I. Kimura, S. Nakayama, N. Nakajima, M. Yoshihama, N. Miyata, G. Kawanishi, J. Antibiot. **1990**, 43, 1341–1343; b) K.-I. Kimura, H. Takahashi, N. Miyata, M. Yoshihama, M. Uramoto, J. Antibiot. **1996**, 49, 697–699.
- a) K. Kominato, Y. Watanabe, S.-I. Hirano, T. Kioka, T. Terasawa, T. Yoshioka, K. Okamura, H. Tone, *J. Antibiot.* 1995, 48, 99–102; b) K. Kominato, Y. Watanabe, S.-I. Hirano, T. Kioka, T. Terasawa, T. Yoshioka, K. Okamura, H. Tone, *J. Antibiot.* 1995, 48, 103–105.
- ¹⁹² K. Ströch, *Dissertation*, Universität Göttingen, **2003**.
- ¹⁹³ N. Naganawa, M. Matsuda, S. Hattori, M. Hamada, T. Takeuchi, J. Antibiot. 1991, 44, 1283–1285; b)
 H. Nishjoka, T. Sawa, Y. Takahashi, H. Naganawa, M. Hamada, T. Takeuchi, J. Antibiot. 1993, 46, 564–568; c) H. Nishioka, M. Imoto, T. Imaoka, T. Sawa, T. Takeuchi, K. Umezawa, J. Antibiot. 1994, 47, 447–452.
- a) N. K. Kubota, E. Ohta, S. Ohta, F. Koizumi, M. Suzuki, M. Ichimura, S. Ikegami, *Bioorg. Med. Chem.* 2003, *11*, 4569–4575; b) Y. Hayakawa, S. Shirasaki, S. Shiba, T. Kawasaki, Y. Matsuo, K. Adachi, Y. Shizuri, *J. Antibiot.* 2007, *60*, 196–200.
- ¹⁹⁵ D. J. Horgan, J. E. Casida, *Biochem. J.* **1968**, *108*, 153–154.
- ¹⁹⁶ D. Nelson, M. M. Cox, *Lehninger Biochemie*, 2001, Berlin Heidelberg; Kapitel 19.
- ¹⁹⁷ F. Schuler, J. E. Casida, *Pest Man. Sci.* **2001**, *57*, 932–940.
- ¹⁹⁸ M. D. Esposti, A. Ghelli, *Biochem. Soc. Transact.* **1999**, *27*, 606–609.
- T. Friedrich, P. van Heek, H. Leif, T. Ohnishi, E. Forche, B. Kunze, R. Jansen, W. Trowitzsch-Kienast,
 G. Höfle, H. Reichenbach, H. Weiss, *Eur. J. Biochem.* 1994, 219, 691–698.
- a) F. P. Schmidtchen, H. Rapoport, J. Am. Chem. Soc. 1977, 99, 7014–7019; b) M. Gutman, S. Kliatchko, FEBS Lett. 1976, 67, 348–353.
- ²⁰¹ a) S. Yoshida, Y. Nagao, A. Watanabe, N. Takahashi, *Agric. Biol. Chem.* **1980**, *44*, 2921–2924; b) S. oshida, Y. Nagao, A. Watanabe, N. Takahashi, *Agric. Biol. Chem.* **1980**, *44*, 2913–2920.
- a) M. J. Schnermann, D. L. Boger, *J. Am. Chem. Soc.* 2005, *127*, 15704–15705; b) M. J. Schnermann,
 F. A. Romero, I. Hwang, E. Nakamaru-Ogiso, T. Yagi, D. L. Boger, *J. Am. Chem. Soc.* 2006, *128*, 11799–11807.
- ²⁰³ S. Haydar, *Dissertation*, Universität Göttingen, **2007**.
- ²⁰⁴ P. Lümmen, *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, *1364*, 287–296.
- ²⁰⁵ N. Li, K. Ragheb, G. Lawler, J. Sturgis, B. Rajwa, J. A. Melendez, J. P. Robinson, *J. Biol. Chem.* 2003, 278, 8516–8525.
- ²⁰⁶ S. C. Ahn, B. Y. Kim, W. K. Oh, D. O. Kang, G. Y. Heo, M. S. Kim, M. S. Lee, J. S. Ahn, *J. Antibiot.* **2002**, 55, 1013–1015.
- ²⁰⁷ *Japan Pat.* **1997**, JP 95304773 19951122, CAN 127:104337, AN 1997:464956.
- ²⁰⁸ *Int. Pat.* **2006**, WO 2006097479, CAN 145 :337560, AN 2006 :977372.
- ²⁰⁹ K. H. Chung, K. Y. Cho, Z. Naturforsch. **1989**, 44c, 609–616.
- ²¹⁰ D. J. Stuehr, M. A. Marletta, *Cancer Res.* **1987**, *47*, 5590–5594.
- ²¹¹ L. C. Green, D. A. Wagner, J. Glogowski, P. L. Skipper, J. S. Wishnok, S. R. Tannenbaum, *Anal. Biochem.* **1982**, *126*, 131–138.

- ²¹² Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations (Ed.: T. M. Devlin), Wiley-Liss, Hoboken, 2006, pp. 432–440.
- ²¹³ P. Vallance, *Fundam. Clin. Pharmacol.* **2003**, *17*, 1–10.
- ²¹⁴ P. Pacher, J. S. Beckman, L. Liaudet, *Physiol. Rev.* **2007**, *87*, 315–424.
- ²¹⁵ Z. M. Lohinai, C. Szabó, *Med. Sci. Monit.* **1998**, *4*, 1089–1095.
- ²¹⁶ A. Icking, S. Oess, W. Müller-Esterl, *BIOspektrum* **2006**, *12*, 342–345.
- ²¹⁷ Z.-Q. Wang, R. J. Lawson, M. R. Buddha, C.-C. Wei, B. R. Crane, A. W. Munro, D. J. Stuehr, *J. Biol. Chem.* **2007**, 282, 2196–2202.
- ²¹⁸ D. Zeidler, U. Zähringer, I. Gerber, I. Dubery, T. Hartung, W. Bors, P. Hutzler, J. Durner, *Proc.Natl. Acad. Sci. USA* 2004, *101*, 15811–15816.
- ²¹⁹ M. R. Chandok, A. J. Ytterberg, K. J. van Wijk, D. F. Klessig, *Cell* **2003**, *113*, 469–482.
- ²²⁰ F.-Q. Guo, M. Okamoto, N. M. Crawford, *Science* **2003**, *302*, 100–103.
- ²²¹ J. Zhang, S. H. Snyder, Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. **1995**, 35, 213–233.
- P. Hantrye, E. Brouiillet, R. J. Ferrante, S. Plafi, R. Dolan, R. T. Matthews, M. F. Beal, *Nat. Med.* 1996, 2, 1017–1021.
- ²²³ M. Pannirselvam, T. J. Anderson, C. R. Triggle, *Drug Dev. Res.* 2003, 58, 28–41.
- F. S. Laroux, K. P. Pavlick, I. N. Hines, S. Kawachi, H. Harada, S. Bharwani, J. M. Hoffman, M. B. Grisham, Acta Physiol. Scand. 2001, 173, 113–118.
- ²²⁵ R. J. van't Hof, S. H. Ralston, *Immunology* **2001**, *103*, 255–261.
- ²²⁶ S. P. Sanders, *Am. J. Resp. Cell Mol. Biol.* **1999**, *21*, 147–149.
- ²²⁷ P. J. Korytko, K. M. Boje, *Neuropharmacology* **1996**, *35*, 231–237.
- ²²⁸ M. Ashina, L. H. Lassen, L. Bendtsen, R. Jensen, J. Olesen, *Lancet* **1999**, *353*, 287–289.
- ²²⁹ A. Giusti-Paiva, M. R. Martinez, J. V. C. Felix, M. J. A. da Rocha, E. C. Carnio, L. L. K. Elias, J. Antunes-Rodrigues, *Shock* 2004, 21, 271–275.
- a) G. J. Southan, C. Szabó, *Biochem. Pharmacol.* 1996, *51*, 383–394; b) L. Salerno, V. Sorrenti, C. Di Giacomo, G. Romeo, M. A. Siracusa, *Curr. Pharm. Des.* 2002, *8*, 177–200.
- ²³¹ M. Knipp, *ChemBioChem* **2006**, *7*, 879–889.
- A. López, J. A. Lorente, J. Steingrub, J. Bakker, A. McLuckie, S. Willatts, M. Brockway, A. Anzueto,
 L. Holzapfel, D. Breen, M. S. Silverman, J. Takala, J. Donaldson, C. Arneson, G. Grove, S. Grossman,
 R. Grover, *Crit. Care Med.* 2004, *32*, 21–30.
- (a) M. Schleicher, F. Brundin, S. Gross, W. Müller-Esterl, S. Oess, *Mol. Cell. Biol.* 2005, 25, 8251–8258; (b) A. Nuszkowski, R. Gräbner, G. Marsche, A. Unbehaun, E. Malle, R. Heller, *J. Biol. Chem.* 2001, 276, 14212–14221.
- ²³⁴ W. K. Alderton, C. E. Cooper, R. G. Knowles, *Biochem. J.* **2001**, *357*, 593–615.
- ²³⁵ R. Fedorov, R. Vasan, D. K. Ghosh, I. Schlichting, *Proc.Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 5892–5897.
- ²³⁶ Anfärbereagenzien für Dünnschicht- und Papierchromatographie, Merck, Darmstadt **1980**.
- ²³⁷ H. G. Schlegel, *Allgemeine Mikrobiologie*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, **1992**.
- ²³⁸ J. A. Duerre, C. H. Miller, *Anal. Biochem.* **1966**, *17*, 310-315.

Danksagung

Ein großes Dankeschön richtet sich an Hans-Jörg Langer, der oft meine rechte Hand war und stets mit Rat und Tat zur Seite stand. Auch den anderen CTAs Hans-Peter Kroll, Michaela Klingebiel und Jutta-Gerber Nolte möchte ich für die Hilfe im Labor danken.

Den Studenten Markus Granitzka und Arne Walter danke ich für die Unterstützung bei der Laborarbeit.

Für die Aufnahme von NMR-Spektren danke ich den Abteilungs-Operatoren Stephanie Grond, Inken Plitzko, Sandra Lösgen, Melanie Quitschau und den ehemaligen Operatoren Oliver Schlörke, Diana Wolff, Sven Meyer sowie der NMR-Abteilung mit Herrn Reinhard Machinek, Christiane Siebert, Carola Zolke und Martin Weitemeyer.

György Udvarnoki und Herrn Frauendorf danke ich für die Aufnahme von Massenspektren. Nadine Czempinski, Luise Hoffmann, Markus Radzom und Daniel Vollmar möchte ich für die Durchführung und Auswertung von HPLC-MS-Läufen danken.

Bei Adriana Textor, Marko Gentzsch, Adrijana Kubicek, Jens Bitzer und Beatrix Girmann bedanke ich mich für die nette Zeit beim Essen und in den Pausen.

Bei Philip Kössler, Adriana Textor, Daniel Vollmar, Melanie Quitschau sowie den Abteilungsexternen Annett Spitzl und Jürgen Sievert bedanke ich mich herzlich für das engagierte und kritische Korrekturlesen dieser Arbeit.

Der größte Dank geht an meine Familie, die mich stets unterstützt hat und mir das Studium ermöglichte sowie meine Freundin Julia Klompen, die immer für mich da war und so oft geholfen hat.

Lebenslauf

Am 29.08.1978 wurde ich als erstes Kind des Angestellten Gert Surup und seiner Ehefrau Gudrun Surup, geb. Dörhage in Kassel (Hessen) geboren.

Von August 1985 bis Juni 1989 besuchte ich die Auefeldschule (Grundschule) in Kassel. Im Sommer 1989 wechselte ich auf das Friedrichsgymnasium in Kassel. Im Juli 1995 verließ ich das Friedrichsgymnasium in Kassel und wechselte auf die Jacob-Grimm-Schule in Kassel (Gymnasiale Oberschule), an der ich im Jahre 1998 die Allgemeine Hochschulreife erwarb.

Meinen Grundwehrdienst leistete ich von Juli 1998 bis April 1999 in Osterode beim Panzergrenadierregiment 12 ab.

Zum Sommersemester 1999 begann ich das Studium der Chemie an der Georg-August-Universität zu Göttingen. Im Oktober 2001 legte ich die Diplom-Vorprüfung ab. Im Rahmen des Förderprogramms Erasmus studierte ich von Oktober 2002 bis Dezember 2002 in Dublin, Irland.

Von Juni 2003 bis Dezember 2003 fertigte ich im Arbeitskreis von Prof. Dr. A. Zeeck meine Diplomarbeit mit dem Titel "Biosynthesestudien zu den Iromycinen mit *Streptomyces* sp. Dra17" an und absolvierte im Januar 2004 die Diplom-Chemiker Hauptprüfung.

Seit Februar 2004 arbeite ich unter Anleitung von Dr. S. Grond und Prof. Dr. A. Zeeck an der vorliegenden Dissertation.

Göttingen, den 31.05.2007

FRANK SURUP