Studien zur Ansamitocin-Biosynthese sowie Sekundärstoffproduktion durch mikrobielle Interaktion

Dissertation

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

vorgelegt von

Nadine Czempinski

aus Hameln

Göttingen 2007

D 7

Referent: Prof. Dr. A. Zeeck Korreferent: Prof. Dr. C. Steinem Tag der mündlichen Prüfung: 31.10.2007 Die vorliegende Arbeit wurde im Institut für Organische und Biomolekulare Chemie der Georg-August-Universität Göttingen von Februar 2004 bis August 2007 unter Anleitung von Prof. Dr. A. Zeeck und Dr. S. Grond durchgeführt.

> Frau Dr. Stephanie Grond und Herrn Prof. Dr. Axel Zeeck danke ich für die interessante Themenstellung, das stete Interesse und viele wertvolle Diskussionen, die den Weg zu der vorliegenden Arbeit begleitet haben.

INHALTSVERZEICHNIS

Α	THE	ORETISCHER TEIL	1	
1	Einle	itung	1	
1.1	Die	e Bedeutung von Naturstoffen in der Pharmakologie	1	
1.2	Qu	ellen zur Erschließung neuer Naturstoffe	3	
1	.2.1	Die Gewinnung von Naturstoffen aus synthetischen Ansätzen	4	
1	.2.2	Die Mutasynthese als Quelle neuer Sekundärmetaboliten	5	
1.3	Eir	ıblicke in die Interaktion von Mikroorganismen	8	
2	Aufg	abenstellung	11	
3	Zur I	Biosynthese und Derivatisierung der Ansamitocine (20)	13	
3.1	Be	deutung der Ansamitocine (20) als hochpotente Cytostatika	13	
3.2	Bio	osynthese der Ansamitocine (20): Die Startereinheit und das Diketid	15	
3	.2.1	Vorarbeiten zur Biosynthese der Ansamitocine (20)	15	
3	.2.2	Experimente zur Heterologen Expression der Diketide in Corynebakte	rium	
		glutamicum		
3	.2.3	Proteinanalytik		
3	.2.4	Diskussion der Ergebnisse		
3	.2.5	Ausblick		
3.3	Vo	rläufer-dirigierte Biosynthese mit der Actinosynnema pretiosum Mut	tante	
	HG	F073		
3	.3.1	Vorarbeiten zur Biosynthese der Ansamitocine (20) mit der A. pretiost	um Mutante	
		HGF073		
3	.3.2	Fermentationsoptimierung und Fütterungsexperimente		
3	.3.3	Isolierung und Analytik des 20-Desmethoxyansamitocins (42)		
3	.3.4	Biologische Aktivität	51	
3	.3.5	Diskussion der Ergebnisse	53	
3	.3.6	Ausblick	55	

4	Kitasatospora putterlickiae F98-18: Pilzinduzierte Sekundärstoffbildung
4.1	Regulation der Sekundärstoffbildung durch Interaktion des Stammes F98-18 mit
	<i>Mucor</i> sp
4.2	Fermentationen des Stammes F98-18 und <i>Mucor</i> sp 59
4.3	Isolierungsstrategie und chemische Analytik64
4.4	Chemische Derivatisierung und Analytik68
4.5	Diskussion der Ergebnisse71
4.6	Ausblick72
5	Streptomyces antimycoticus FZB53: Mikroorganismen für den Einsatz im biologischen Pflanzenschutz
5.1	Die Bedeutung des biologischen Pflanzenschutzes74
5.2	Hemmwirkung des Stammes FZB53 auf Tilletia caries und Fusarium culmorum76
5.3	Extrakte des Stammes FZB53: Isolierung und Analytik78
5.4	Optimierung von Fermentation, Isolierung und Analytik
5.5	Chemische Derivatisierung85
5.6	Beiträge zur Strukturaufklärung von 69 86
5.7	Diskussion der Ergebnisse und Ausblick89
6	Piriformospora indica: Induktion des verzweigten Wurzelwachstums der
	Modellpflanze Arabidopsis thaliana91
6.1	Symbiosen zwischen Pilzen und Pflanzen: Effekte auf das Pflanzenwachstum91
6	1.1 Der endophytische Pilz <i>Piriformospora indica</i> als Wachstums-Promotor für
-	Ptlanzen
6	1.2Auxine: Phytohormone als Wachstumsregulatoren in höheren Pflanzen

6.2	Vorarbeiten zur Analyse des diffusionsfähigen Metaboliten mit Auxin-Effekt93		
6.3	HPLC-ESI-MS-Analytik	. 96	
6.4	Dünnschichtchromatographische Analytik	. 99	
6.5	Problemlösung durch GC-MS-Analytik	101	
6.6	Diskussion der Ergebnisse und Ausblick	101	
7	Zusammenfassung der Ergebnisse	104	
7.1	Untersuchungen zur Ansamitocin-Biosynthese	104	
7	1.1 Heterologe Expression der Diketide in <i>C. glutamicum</i>	104	
7	1.2 Vorläufer-dirigierte Biosynthese mit der <i>Actinosynnema pretiosum</i> Mutante		
	HGF073	105	
7.2	Kitasatospora puttelickiae F98-18: Pilzinduzierte Sekundärstoffproduktion	106	
7.3	Streptomyces antimycoticus FZB53	107	
7.4	Induziertes Pflanzenwurzelwachstum durch P. indica	108	
в	EXPERIMENTELLER TEIL	110	
1	Allgemeines	110	
1.1	Instrumentelle Analytik	110	
1.2	Chromatographische Methoden	111	
1.3	Mikrobiologische Methoden	115	
1	3.1 Nährmedienbestandteile	115	
1	3.2 Schüttler und Fermenter	116	
1	3.3 Zentrifugen	116	
1	3.4 Stammhaltung	116	
2	Heterologe Expression: Die Diketide	118	

2.1	Kul	tivierung und Aufarbeitung	118
-	2.1.1	Kultivierung von C. glutamicum R163 pWLQ2c: asm A (Modul 1)/TE	118
4	2.1.2	Fütterung der Vorläufer	118
4	2.1.3	Probenentnahme zur Analyse	119
4	2.1.4	Aufarbeitung der Proben	120
4	2.1.5	Probenvorbereitung für HPLC-ESI-MS-Messungen	120
3	Vorläı	ıfer-dirigierte Biosynthese mit der Actinosynnema pretiosum Mutante	
	HGF0	73	121
3.1	Kul	tivierung und Aufarbeitung	121
	3.1.1	Kultivierung in Schüttelkolben	121
	3.1.2	Kultivierung im 10 L-Airliftfermenter	123
	3.1.3	Fütterung von Vorläufersubstanzen und andere Zusätze	123
	3.1.3.1	Synthese des N-Acetylcysteaminthioesters (38) von 3-Amino-4-chlorbenzoe	<u>-</u>
		säure (33)	126
	3.1.4	Fermentationsoptimierung	126
	3.1.5	Aufarbeitung	133
3.2	Isoli	ierung des 20-Desmethoxyansamitocins P-3 (42)	135
3.3	Cha	arakterisierung des 20-Desmethoxyansamitocins P-3 (42)	135
4	Kitasa	tospora putterlickiae F98-18	137
4.1	Kul	tivierung und Aufarbeitung	137
2	4.1.1	Kultivierung des Stammes F98-18	137
2	4.1.2	Kultivierung und Aufarbeitung des Pilzes Mucor sp.	137
2	4.1.3	Zufütterung des Mucor-Sterilfiltrats zum Stamm F98-18	138
2	4.1.4	Aufarbeitung der Hauptkulturen des Stammes F98-18	139
4.2	Isoli	ierung und Analyse des induzierten Metaboliten	139
4.3	Che	mische Derivatisierung	140
2	4.3.1	Acetylierung von Anthranilsäure (59)	140
2	4.3.2	Charakterisierung von 2-Acetylaminobenzoesäure (61)	140

INHALTSVERZEICHNIS

4.3.3	Methylierung von Anthranilsäure	
4.3.4	Charakterisierung des Anthranilsäuremethylesters (60)	
4.3.5	Acetylierung der Fraktion FIV-5	
4.3.6	Methylierung der Fraktion FIV-5	
5 Stre	ptomyces antimycoticus FZB53	
5.1 B	earbeitung der Extrakte des Stammes FZB 53	
5.2 E	igene Kultivierungsarbeiten	
5.2.1	Kultivierung und Aufarbeitung	
5.2.2	Isolierung der aktiven Substanz (69)	
5.2.3	Charakterisierung der aktiven Substanz (69)	
5.2.4	Chemische Derivatisierung	
5.2.4	4.1 Acetylierung der aktiven Substanz (69)	
5.2.4	4.2 Methylierung der aktiven Substanz (69)	
5.2.5	Isolierung der UV-löschenden Substanz (43)	
6 Pirij	formospora indica	
6.1 H	PLC-ESI-MS Analytik	
6.2 D	ünnschichtchromatographische Analytik	
C LITI	ERATUR	

A THEORETISCHER TEIL

1 Einleitung

1.1 Die Bedeutung von Naturstoffen in der Pharmakologie

Die Natur stellt eine reiche Quelle an überlebenswichtigen Stoffen dar, mit deren Vielfalt sie im Verlaufe der Evolution Menschen, Tiere, Pflanzen und Mikroorganismen in allen Habitaten versorgte. Der Mensch hat sich vor allem Extrakte seither zu Nutze gemacht. Viele verschiedene Gemische von Substanzen konnten sich über lange Evolutionsphasen zu einem definierten, hochkomplexen System aus überlebenswichtigen Naturstoffen entwickeln, die heute bei weitem nicht alle analysiert sind. Ein genaueres Verständnis der Wirkmechanismen dieser Systeme ist jedoch, z.B. für die Behandlung von Krankheiten unerlässlich und von großer Bedeutung.

Vor dem Zeitalter der Forschung auf dem Gebiet der Pharmakologie lehrte der Überlebensdrang der Menschen, die Natur zur Linderung und Heilung von Krankheiten zu nutzen. Pflanzen gehörten durch ihre weite Verbreitung zur regulären Nahrungsaufnahme und machten sich über die Zeit positiv mit ihren teilweise spezifischen Wirkungen gegen verschiedene körperliche Beschwerden bemerkbar. So bildeten Pflanzen den Grundstein für die traditionelle Medizin, welche noch heute weit verbreitet, z.B. in China Anwendung findet¹.

Bis zur zufälligen Entdeckung des Antibiotikums Penicillin ($\underline{1}$) im Jahre 1928² waren wirkstoffproduzierende Mikroorganismen weitestgehend wenig untersucht.



Bis zur Zeit des 2. Weltkrieges wurden jedoch hauptsächlich synthetische Stoffe hinsichtlich ihrer Wirkung auf Bakterien untersucht, wie z.B. der erste praktisch eingesetzte antibakterielle Wirkstoff Prontosil ($\underline{2}$). Die Bezeichnung "Antibiotikum" findet ihren historischen Ursprung in der ausschließlichen Bedeutung für Naturstoffe und deren Derivate, Synthetika wurden "antibakterielle Wirkstoffe" genannt.

Die Markteinführung von <u>1</u> zusammen mit den H_2N_3 Sulfonamiden wie Prontosil (<u>2</u>) Mitte der dreißiger Jahre konnte die Mortalitätsrate bei bakteriellen Infektionen bis heute drastisch senken³. Die Resistenzentwicklung vieler



Erreger begrenzt jedoch die Effizienz und die Einsatzzeit eines Antibiotikums. Einige Bakterien breiten sich heute mit entwickelten Multiresistenzen gegen mehrere Antibiotika O weltweit aus⁴, neue Antibiotika werden also dringend benötigt.



Obwohl es sich bei 99 % aller bekannten organischen Verbindungen um Syntheseprodukte handelt, fällt mehr als ein Drittel der Arzneimittelumsätze auf die Naturstoffe⁵, mit steigender Tendenz⁶.

3Naturstoffe zeigen eine strukturelle Vielfalt mit komplexenFunktionalisierungsmustern. Viele von ihnen wurden zwar synthetisch zugänglich gemacht,

jedoch bisher nicht in ihrer Originalität erreicht. Das Wirkstoffspektrum der Naturstoffe reicht von kleinen Molekülen wie Salicylsäure (3) bis hin zu hochkomplexen Ringsystemen, wie beim Vancomycin⁷ (<u>4</u>).



Das Prinzip der Naturstoffe und ihr Erfolg in der Pharmaforschung beruht vielfach auf ihrer Funktion als chemische Leitstruktur, die zur Entdeckung neuer, klinisch anwendbarer Wirkstoffe führt⁸⁻¹⁰.

Zwischen 1984 und 2004 zur Zulassung eingereichte, neue Wirkstoffe wiesen zu über 75 % eine Leitstruktur auf Naturstoff-Basis auf⁵.

Ein natürlicher Vorgang im Leben, die Evolution, macht aus Naturstoffen besonders gute Leitstrukturen für antibakteriell einsetzbare Therapeutika¹¹. Die Interaktion von Mikroorganismen aller Art, vor allem die von Bakterien und Pilzen, ist verantwortlich für deren gegenseitige Ausstattung mit bakteriellen Abwehr- oder Kommunikationsmechanismen in Form von ständig neuartig gebildeten Metaboliten. Eine derartige Maschinerie zur Entwicklung neuer Wirkstoffe hat die Synthese bisher nicht nachahmen können und wird somit auch zukünftig erfolgreich auf die Natur als Vorbild zurückgreifen.

1.2 Quellen zur Erschließung neuer Naturstoffe

Nach der Entdeckung und dem ungebremsten Einsatz der Antibiotika ab Mitte der dreißiger Jahre, folgte in den siebziger Jahren eine "Forschungsflaute" auf dem Gebiet der antibakteriellen Wirkstoffe, da man der Meinung war, es stünden weitaus genügend Antibiotika zum Einsatz zur Verfügung³. Das Problem der Resistenzentwicklung wurde dabei extrem unterschätzt. Der intensive Gebrauch von Antibiotika erhöht den evolutionären Druck auf Seiten der Mikroorganismen so sehr, dass diese darauf mit neuen Resistenzmechanismen reagieren^{12,13}, die sich rasch ausbreiten können, und somit das Therapiefeld gegen bestimmte Erreger im Laufe der Zeit immer weiter einschränken¹⁴.

Heutzutage bestimmen zum Großteil finanzielle Aspekte die Wege der industriellen Pharmaforschung. Die Entwicklung und die Markteinführung von neuen Medikamenten dauert oftmals mehr als zehn Jahre und kostet ca. 800 Mio. US Dollar^{15,16}. Die Methoden zur Gewinnung antibakterieller Naturstoffe durch klassische Screening-Verfahren sind zu aufwändig und zu teuer geworden. Deshalb sind Antibiotika, obwohl sie zu den größten Erfolgen der Medizingeschichte zählen, ökonomisch leider wenig attraktiv. Anstatt für die dringend benötigten Kurzzeittherapeutika, wie z.B. gegen Bluthochdruck, Arthritis und

Fettleibigkeit, investiert¹⁷. Aus diesem Grund haben sich seither viele Forschungsgruppen um eine profitablere Variante zur Erschließung neuer Antibiotika und anderer Wirkstoffe bemüht.

1.2.1 Die Gewinnung von Naturstoffen aus synthetischen Ansätzen

Die Totalsynthese ist eine Möglichkeit, um zu neuen Wirkstoffen zu gelangen. Bereits Ende der siebziger Jahre gelang COREY et al. ein Meilenstein in der Totalsynthese mit der chemischen Darstellung des Makrolidantibiotikums Erythromycin ($\underline{5}$)^{18,19}.



Die Nachteile der Totalsynthese liegen jedoch auf der Hand. Je komplexer die Strukturen, desto schwieriger wird die synthetische Zugänglichkeit über zahlreiche Stufen zu multi-Gramm Ausbeuten von Strukturen mit bestimmter Stereokonfiguration. Ein Versuch, diese Probleme zu umgehen, führte zur Partialsynthesetechnik. Sie findet im Bereich aller Wirkstoffklassen Anwendung, vor allem, wenn andere Quellen nicht mehr zur Verfügung stehen, wie am Beispiel des Ecteinascidins (ET)-743 (**6**) gezeigt werden kann. Die Zugänglichkeit dieses aus dem marinen Tunikaten *Ecteinascidia turbinata* isolierten Cytostatikums ist sehr schlecht, da die natürlichen Quellen nicht ausreichend zur Verfügung stehen. Das Interesse an diesem Naturstoff war durch seine enorm starke Aktivität jedoch sehr hoch, so dass partialsynthetische Ansätze unter Verwendung der Ausgangsverbindung Cyanosafracin B (**7**) über eine achtstufige Synthese erfolgreich zu **6** führten^{20,21}. Das Antibiotikum **7** kann zuvor als Naturstoff durch Fermentation von *Pseudomonas fluorescens* gewonnen werden.



1.2.2 Die Mutasynthese als Quelle neuer Sekundärmetaboliten

Die Partialsynthese bedient sich also verfügbaren Grundstrukturen und erzeugt durch Veränderung kleinerer Molekülteile eine neue Struktur. Diese Grundidee wurde auf die genetische Ebene der Naturstoffbildung übertragen, und der Begriff der Mutasynthese trat gegen Ende der siebziger Jahre zum ersten Mal auf²². Biosynthesestudien zur Antibiotika-Familie der Aminocyclitole, im speziellen zum Neomycin (<u>8</u>), haben zur Entwicklung der Mutasynthesetechnik zur Gewinnung verwandter Antibiotika geführt.



In seinen Biosyntheseuntersuchungen mit dem Neomycin-Produzenten *Streptomyces fradiae* fand RINEHART heraus, dass Desoxystreptamin (**9**) als einheitlicher Vorläufer ins Neomycin (**8**) eingebaut wird. Daraus folgerte er, dass eine Mutante des Stammes *S. fradiae*, die kein

EINLEITUNG

Desoxystreptamin ($\underline{9}$) produzieren kann, somit auch kein Neomycin ($\underline{8}$) produzieren können dürfte. Nach gelungenen Versuchen mit einer Desoxystreptamin-Knockout-Mutante von *S. fradiae*, die nur durch Zufütterung von $\underline{9}$ Neomycin ($\underline{8}$) produzieren konnte, wurden auch Desoxystreptamin-verwandte Vorläufermoleküle zur Produktion neuer, neomycinähnlicher Antibiotika mit Erfolg eingesetzt. Die Ära der Mutasynthese war hiermit geboren.

Diese Technik zur gezielten, biologischen Gewinnung neuer Wirkstoff-Analoga wurde über die Jahrzehnte optimiert und durch den Einfluss der Gentechnologie weiter ausgebaut. Zu Zeiten RINEHARTS wurden die Mutantenstämme durch Zusatz von Mutagenen, Substanzen, die Mutationen im Erbgut hervorrufen, wie z.B. Nitrosamine, hergestellt²².

Heutzutage können Wissenschaftler oft direkt ins Ergbut eingreifen und gezielt manipulieren. Voraussetzung hierfür ist die Kenntnis der Biosynthesegensequenz des angestrebten Naturstoffs in dem zu manipulierenden Organismus. Ein Beispiel für diese neueren Arbeiten beschreiben die Studien zu den Glycopeptid-Antibiotika des Vancomycin-Typs (<u>4</u>). Vancomycin (<u>4</u>) hat zur Zeit den Status eines Notfallantibiotikums²³⁻²⁵, jedoch steigt bereits die Zahl an Keimen mit reduzierter Vancomycin-Empfindlichkeit²⁶ sowie an Erregern mit Vancomycin-Resistenz^{27,28}. WEIST et al. haben sich deshalb mit der Gewinnung neuer Vancomycin-Analoga durch Mutasynthese beschäftigt^{29,30} (Abbildung 1).



Sie entfernten aus dem Wildtyp Stamm *A. mediterranei* das für die β -Hydroxy-tyrosin-Biosynthese verantwortliche *bhp*-Gen und konnten durch Zufütterung von 3-Fluor- β -hydroxytyrosin (<u>10</u>) zur *bhp*- Δ -Mutante das neue Fluorbalhimycin (<u>11</u>) mutasynthetisieren (Abbildung 1).

Die Wirkstoffklasse der Cytostatika ist ein ebenso begehrtes Ziel der Mutasynthesetechnik auf der Suche nach neuen, klinisch einsetzbaren Antitumorwirkstoffen, die bessere Verträglichkeit und bessere Wirksamkeit durch evtl. neuartige Wirkmechanismen aufweisen.

Ein Beispiel für die Anwendung der Mutasynthese auf diesem Forschungsgebiet sind die Arbeiten von HERTWECK et al.³¹ (Abbildung 2). Ihnen gelang durch Knock-out der Gene *aurG* und *aurF* der Aureothin-Biosynthese die Konstruktion einer Mutante, in der die biosynthetische Umwandlung der Chorisminsäure (<u>12</u>) zur *p*-Nitrobenzoesäure (<u>13</u>), dem natürlichen Vorläufer des Aureothins (<u>14</u>), geblockt war. Die Zufütterung der stammfremden Startereinheit *p*-Cyanobenzoesäure (<u>15</u>) führte zum neuen Cytostatikum Aureonitril (<u>16</u>). Durch Isolierung genügender Mengen konnten biologische Aktivitätstest mit <u>16</u> durchgeführt werden, die eine bessere cytostatische Wirksamkeit von Aureonitril (<u>16</u>) im Vergleich zu Aureothin (<u>14</u>) hervorbrachten.

Die Methodik der Mutasynthese ist ein lohnenswerter Forschungsansatz zur Erschließung neuer Wirkstoffanaloga. Durch den Einsatz in Bioaktivitätstests kann so innovative Strukturchemie in die biologisch-pharmakologische Anwendung gebracht werden.



Abbildung 2: Mutasynthese von Aureonitril (16).

1.3 Einblicke in die Interaktion von Mikroorganismen

Der Begriff Interaktion wird verstanden als das Einwirken bzw. Zusammenwirken von ganzen Systemen oder einzelnen Systembestandteilen. Auf Ebene der Mikroorganismen ist das Zusammenwirken von ganzen Bakterienstämmen untereinander, von Bakterien mit Pflanzen oder von bestimmten Molekülen mit den Bakterien gemeint. Interaktion kann auch manchmal als eine Art von Kommunikation auftreten, wie das sogenannte Quorum-Sensing. Als Quorum-Sensing bezeichnet man die Steuerung definierter biologischer Funktionen durch bestimmte Signalstoffmoleküle, die eingreifen, wenn eine bestimmte Populationsdichte in mikrobiellen Systemen erreicht wird^{32,33}. Ähnlich einem "mikrobiellen Hormonsystem" in

einer gegebenen Population dient es zur Ausführung von Prozessen, die eine einzelne Zelle nicht leisten kann, wie z.B. die Biolumineszenz und die Ausbildung von Biofilmen.

In den siebziger Jahren wurde das Quorum-Sensing zum ersten Mal in dem marinen, lumineszierenden Bakterium *Vibrio fischeri*, einem Symbionten auf marinen Tieren, beobachtet³⁴.





In diesem Bakterium führt eine Reaktionskaskade ab einer bestimmten Zelldichte zur

vermehrten Ausschüttung von Acylhomoserinlacton (<u>17</u>) und es kommt zur Biolumineszenz (Abbildung 3)³⁴. Die Interaktion von Mikroorganismen beschränkt sich jedoch nicht nur auf definierte Signalmoleküle, die



bestimmte Mechanismen in der Population einer Spezies auslösen. Interaktion kann auch zwischen zwei verschiedenen Systemen, wie zwischen Pflanzen und Bakterien oder Pilzen stattfinden und können nicht nur nützlich sein, sondern auch zur Schädigung eines beteiligten Systems führen, wie z.B. bei Interaktionen zwischen Pathogenen und Pflanzen. Eine Pflanze, die mit dem Mehltaupilz infiziert ist, reagiert mit Krankheitssymptomen auf den Befall³⁶. Dabei wird angenommen, dass der Erreger mit dem "Immunsystem" der Pflanze interagiert und so gezielt die Funktion bestimmter Proteine der pflanzlichen Abwehr außer Kraft setzt³⁷. Die Interaktion von ganzen Bakterien- oder Pilzstämmen untereinander führt zu einem anderen Verhalten der Stämme. Genau diesem Zusammenwirken widmet sich moderne

Naturstoffforschung ("Chemische Ökologie"), denn dadurch mag erst die Vielfältigkeit der Naturstoffe in ihrem Funktionszusammenhang im Evolutionsgeschehen entstanden sein. Abwehrmechanismen oder andere Reaktionen liefern neue Sekundärmetaboliten, wie FENICAL et al. am Beispiel eines marinen Pilzes herausfinden konnten³⁸. Dieser Pilz der Gattung *Pestalotia* bildete ausschließlich in Co-Kultivierung mit dem marinen Bakterium CNJ-328 das neue Antibiotikum Pestalon (<u>18</u>).



In einem anderen Fall konnte die Entstehung eines blauen Farbstoffs nur durch Interaktion zweier Bakterienstämme beobachtet werden. Der von GROSSART aus der Nordsee isolierte



Stamm *Rheinheimera baltica* HP1 wurde in einem Kommunikationsscreening auf die Interaktion mit anderen Stämmen getestet³⁹. Dazu wurde der Stamm mit jeweils einem anderen Stamm der marinen Stammsammlung auf einer Agarplatte räumlich nahe zueinander ausgestrichen. Zusammen mit dem Stamm HP10 konnte die Produktion eines blauen Farbstoffs durch *R. baltica* HP1 beobachtet werden. Dieser Farbstoff, als Glaukothalin (<u>19</u>)⁴⁰ bezeichnet, wurde von *R. baltica* HP1 nur in Anwesenheit des Stammes HP10 gebildet.

Mithilfe der Co-Kultivierungstechnik lassen sich die Mikroorganismen wahrscheinlich künstlich unter metabolischen Druck setzen. Durch mikrobiellen Stress werden so neue Metaboliten erzeugt, die nicht nur für die Naturstoffforschung von großer Bedeutung sein können.

2 Aufgabenstellung

Die vorliegende Arbeit ist in vier Themenabschnitte gegliedert. Das Hauptaugenmerk befasste sich mit Biosyntheseuntersuchungen zum Ansamitocin (27), einem hochpotenten, cytostatischen Naturstoff der Maytansinfamilie. Ein Ziel dieser Untersuchungen war die heterologe Expression der Diketidvorläufer des Ansamitocins 27 in Corynebakterium glutamicum. Dazu sollte zunächst in Kooperation mit J. VOSS (AK LIEBL) ein Shuttle-Vektor mit den genetischen Informationen für das Diketid konstruiert und anschließend in C. glutamicum transformiert werden. Die folgende heterologe Expression mit Fütterungsexperimenten stammeigener sowie stammfremder Startereinheiten des Ansamitocins sollte zur Diketidproduktion führen. Der Nachweis der Diketide sollte per HPLC-ESI-MS-Analyse erfolgen. Angestrebt wurde hierbei eine Fermentationsund Fütterungsoptimierung des produzierenden Organismus, mit dem Fernziel, eine Diketidproduktion in isolierbaren Mengen für Strukturaufklärung und Bioaktivitätstests zu erreichen.

Ein weiteres Ziel der Biosyntheseuntersuchungen zum Ansamitocin war die Vorläuferdirigierte Biosynthese zum 20-Desmethoxyansamitocin (42) mit der Actinosynnema pretiosum Knockout-Mutante HGF073. Dieses Derivat konnte bereits im Rahmen der Diplomarbeit, jedoch nur in sehr geringer Ausbeute isoliert werden. Durch Optimierung der Fermentations-, Fütterungs- und Isolierungsmethoden sollte im Rahmen dieser Arbeit eine Produktionssteigerung von 42 erreicht werden, um durch anschließende biologische Tests etwas über dessen Aktivität im Vergleich zum Ansamitocin P-3 (27) zu erfahren. Des Weiteren sollte die Spezifität der PKS-Loading domain des Ansamitocin-Biosynthesegenclusters durch Fütterung verschiedener stammfremder Biosynthesevorläufer ausgetestet werden. Die Erschließung neuer cytostatischer Ansamitocin-Analoga für eine spätere, potentielle klinische Anwendung war dabei der Leitgedanke.

Ein zweiter Themenbereich dieser Arbeit befasste sich ebenfalls mit der Substanzklasse der Maytansine. Der AK LEISTNER (Universität Bonn) isolierte aus einer maytansinproduzierenden Pflanze den Stamm *Kitasatospora putterlickiae* F98-18. Dieser reagierte bei Interaktion mit dem Schimmelpilz *Mucor* sp. mit der Produktion eines neuen Metaboliten. Ziel war die Isolierung und Strukturaufklärung dieser Substanz mit der

Vermutung, es könnte sich unter Umständen um eine bisher nicht isolierte Vorstufe der Ansamitocine ($\underline{20}$) handeln.

Der dritte Teil dieser Arbeit besteht aus einer Kooperation mit E. KOCH von der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft in Darmstadt. Der Stamm *Streptomyces antimycoticus* FZB53 ist dort in einem Screening gegen verschiedene phytopathogene Bakterien und Pilze aufgrund seiner starken Aktivität aufgefallen. Aus dem Metabolitenspektrum wurde die aktive Zone bestimmt. Aufgabe war es nun, die aktive Komponente zu isolieren und in ihrer Struktur aufzuklären. Des Weiteren sollte durch Fermentationsoptimierung die Ausbeute gesteigert werden, um verschiedene Bioaktivitätstests mit der aktiven Substanz durchführen zu können.

Ein viertes Themengebiet dieser Arbeit beschäftigt sich mit der Wirkung des Pilzes *Piriformospora indica* auf Pflanzen. A. SIRRENBERG (AK KARLOVSKY) hat in Studien ein verzweigtes Wurzelwachstum der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana*, ausgelöst durch Interaktion mit *P. indica*, festgestellt. Ziel sollte es sein, den für das Wurzelwachstum verantwortlichen Metaboliten mithilfe von HPLC-ESI-MS-Analyse der Pilz-Kulturfiltrat-Extrakte zu detektieren und zu charakterisieren.

3 Zur Biosynthese und Derivatisierung der Ansamitocine

3.1 Bedeutung der Ansamitocine als hochpotente Cytostatika

Anfang der siebziger Jahre wurden die von KUPCHAN et al. aus der buschartigen Pflanze *Maytenus serrata* isolierten⁴¹⁻⁴⁴ Maytansine (**20**) zum ersten Mal in der Literatur als hochaktive Naturstoffe mit herausragender Antitumoraktivität beschrieben. Studien ergaben, dass das Maytansin (**21**), vergleichbar mit den Vincaalkaloiden Vinblastin (**22**) und Vincristin (**23**), eine inhibierende Wirkung auf die Tubulinpolymerisation zeigt⁴⁵. Dieser angenommene Hauptmechanismus der Antitumoraktivität beinhaltet eine folgende Destabilisierung der Mikrotubuli mit anschließender Inhibition der Mitose⁴⁶⁻⁴⁸.



Aufgrund der hohen Aktivität wurde bald nach der Entdeckung des Maytansins ($\underline{21}$) versucht, dieses zu einem klinisch einsetzbaren Therapeutikum zu entwickeln. Erste vorklinische Studien wurden von ISSEL und CROOKE durchgeführt⁴⁹. Bald darauf folgten klinische Studien der Phase I, die jedoch starke neuro- und gastrointestinaltoxische Nebenwirkungen hervorbrachten. Nur wenige Patienten zeigten eine positive Reaktion auf das Maytansin ($\underline{21}$). Die trotzdem durchgeführten klinischen Experimente der Phase II beschlossen aber letztlich das Ende der klinischen Testung des Maytansins ($\underline{21}$)⁵⁰⁻⁵³.

Trotz aller fehlgeschlagenen Versuche blieb <u>21</u> mit seiner enormen Aktivität unvergessen. Die Möglichkeiten zur Wirkstoffoptimierung konnten aufgrund der eingeschränkten Gewinnung der Maytansine (<u>20</u>) - nur aus tropischen Pflanzen und in sehr geringen Mengen⁵⁴ - nicht ausgeschöpft werden. Umso größer war das Interesse, einen maytansinproduzierenden Mikroorganismus zu finden. Nach vielen gescheiterten Versuchen⁵⁵ isolierten HIGASIDE et al. gegen Ende der siebziger Jahre maytansinverwandte Verbindungen (Maytansinoide) aus *Nocardia* sp. No. C-15003, die sie Ansamitocine <u>24-28</u> nannten⁵⁴. Zu den weiteren maytansinoidproduzierenden Mikroorganismen zählt auch der Actinomycet Actinosynnema pretiosum ssp. auranticum.



Abbildung 4: Das Maytansin (20)/Ansamitocin (20)-Grundgerüst mit den verschiedenen Derivaten.

Erste biologische Testungen der neuen Ansamitocine <u>24-28</u> ergaben ein vergleichbares Wirkprofil zu den Maytansinen (<u>20</u>), insbesondere im Hinblick auf die Antitumoraktivität⁴⁵, jedoch auch die Nebenwirkungen betreffend. Die Testung der einzelnen Derivate zeigte für Ansamitocin P-3 (AP-3) (<u>27</u>) und P-4 (<u>28</u>) eine starke Antitumoraktivität gegen die Leukämie-Zelllinie P388 auf, hervorgehend aus einer umfangreichen Studie an Mäusen, bei der ein maximaler Effekt bei einer Tagesdosis von 25 μ g/kg erzielt wurde⁵⁶. In einer anderen Studie erwiesen sich <u>27</u> und <u>28</u> als stark cytostatisch gegenüber B16-Melanom-, Ehrlich-Carcinom-, Sarcom-180-, und P815- Mastocytom-Zelllinien. Geringere Aktivität zeigten sie gegenüber Leukämie-L1210-Zelllinien⁵⁴. Des Weiteren fand man einige Zeit später eine hohe Aktivität von AP-3 (<u>27</u>) gegen die humanen, soliden Tumorzellinen A-549 und HAT-29⁵⁷. Die Aktivität der Maytansinoide bleibt unbestritten, und die Möglichkeiten zur Etablierung im klinischen Bereich sind noch lange nicht ausgereizt. Mittlerweile konnten auch die Ausbeuten an Ansamitocin P-3 <u>27</u> durch Nährmedienvariation derart gesteigert werden⁵⁸, dass umfangreichere Testungen möglich sind. Des Weiteren ergaben neuere Untersuchungen auf biochemischer und genetischer Ebene Aufschluss über die Biosynthese der Ansamitocine⁵⁹. Allerdings konnten durch zu geringe Mengen und eine schwierige synthetische Zugänglichkeit bislang nur Grundkenntnisse von Struktur-Aktivitäts-Beziehungen erlangt werden⁶⁰⁻⁶⁴. Deshalb wird die Erschließung neuer Analoga mit besonderem Interesse verfolgt, z.B. durch unterschiedliche Derivatisierungsmethoden.

Erfolgversprechende Studien befassen sich mit der Fusion der Maytansinoide mit Tumorassoziierten Antikörpern, wodurch ein selektiverer Transport in die Tumorzellen möglich ist und toxische Nebenwirkungen verringert werden⁶⁵⁻⁶⁷. Das Fernziel, der Einsatz der Ansamitocine als medizinische Wirkstoffe, bleibt auch nach Jahren der Forschung attraktiv und rückt weiter in erreichbare Nähe.

3.2 Biosynthese der Ansamitocine: Die Startereinheit und das Diketid

3.2.1 Vorarbeiten zur Biosynthese der Ansamitocine (20)

Die Aufklärung des Ansamitocin Biosynthesegenclusters in der Arbeitsgruppe von H. G. FLOSS⁵⁹ zeigte, dass vier große "open reading frames" (ORFs) (asm A-asm D) für die Biosynthese des Ansamitocin-Grundgerüsts verantwortlich sind. Sie kodieren die Loading domain (3-Amino-5-hydroxybenzoesäure (AHBA) (29)) und sieben Kettenverlängerungs-Polyketidsynthase module einer multifunktionalen (PKS). Asm A enthält die Initiationsdomäne (Loading domain) und die beiden Module ersten zur Polyketidkettenverlängerung durch eine Propionat- und eine Acetateinheit. Asm B, C und D enthalten die PKS-Module 3-7 für die Komplettierung des Ansamitocin-Grundgerüsts, welches dann mittels der Amidsynthase Asm 9 zum Lactamring geschlossen wird. Verschiedene andere Genprodukte sind schließlich für die post-synthetischen Modifikationen von Proansamitocin (<u>30</u>) zum endgültigen Ansamitocin verantwortlich (Abbildung 5).



Abbildung 5: Der Ansamitocin Biosynthesegencluster und die ungewöhnliche Lage der Doppelbindungen. ADE: ACP-Ligase, ACP: Acyl Carrier Protein, KS: Ketosynthase, AT: Acyltransferase, DH: Dehydratase, ER: Enoylreduktase, KR: Ketoreduktase. Quelle: FLOSS et al.⁵⁹.

Um das Diketid aufzubauen, werden also die Informationen benötigt, über die das Gen asm A samt Modul 1 verfügt. Ist zusätzlich Modul 2 vorhanden, so erhält man das Triketid. Für das Tetraketid sind die Gene asm A und asm B bis einschließlich Modul 3 verantwortlich. Über die Module 4-7 baut sich dann der Rest des Ansamitocin-Rückgrats auf.

Die Verfolgung der Biosynthese des Ansamitocins über die einzelnen Ketide ist von großer Bedeutung, um die ungewöhnliche Lage der Doppelbindungen zu klären, die im fertigen Ansamitocin plötzlich an anderer Stelle als üblicherweise in Polyketiden wiederzufinden sind (Abbildung 5). Doppelbindungen liegen normalerweise zwischen den Verlängerungseinheiten Acetat/Propionat. Des Weiteren ist von Interesse, zu welchem Zeitpunkt der Biosynthese die Aktivität an Bedeutung gewinnt, d.h. ob die Ketide allein bereits eine Aktivität besitzen.



Abbildung 6: Die ungewöhnliche Lage der Doppelbindungen im Ansamitocin (<u>27</u>) im Vergleich zur Lage der Doppelbindungen im Tri- (<u>31</u>) und Tetraketid (<u>32</u>).

An dieser Stelle knüpfen die Vorarbeiten für die folgenden Experimente an. Zum einen gehörte dazu die Konstruktion des Plasmidvektors pHGF7669 mit einer Größe von 23671 bp von T. WEIN YU (Abbildung 7)⁶⁸. Es enthält den Promotor *actII-orf4*, ein Apramycin-Resistenzgen, sowie das Gen asm A mit der Loading domain, dem Modul 1 und einer zusätzlich eingefügten Thioesterase (*TE*). Der Promotor ist wichtig für die Entstehung eines funktionsfähigen Proteins der PKS, er ermöglicht das Ablesen des Plasmids (Transkription, Translation). Die Loading domain aktiviert die Startereinheit durch Bindung als Thioester und reicht sie weiter an das Modul 1. Durch das Einfügen einer Propionat-Einheit entsteht ein Diketid, welches durch die zusätzlich angehängte Thioesterase vom Enzym abgespalten wird.



Abbildung 7: Das Plasmid pHGF7669 mit dem Gen asm A (Modul 1+TE).

Mithilfe dieses konstruierten Plasmids pHGF7669 wurden dann im Rahmen der Diplomarbeit Expressionsversuche in *S. coelicolor* und *S. lividans* unternommen⁶⁹. Dabei wurden der natürliche Vorläufer AHBA (**29**) und der stammfremde Vorläufer 3-Amino-4-chlorbenzoesäure (3A4ClBA) (**33**) zuerst auf Agarplatte gefüttert, später in Flüssigkultur. In den jeweiligen Extrakten konnten per HPLC-ESI-MS die Diketide **34**, **35** und **36** nach AHBA-Fütterung reproduzierbar nachgewiesen werden. Nicht reproduzierbar konnte nur in der letzten Fermentation (Flüssigkultur) auch das acetylierte Diketid **37** mit 3A4ClBA als Vorläufer detektiert werden. Die produzierten Mengen der jeweiligen Diketide waren jedoch für die Isolierung zum Reinstoff mit dem Ziel NMR-spektroskopischer Untersuchungen zu gering. Da aber eine Reproduzierbarkeit der Ergebnisse erreicht werden konnte, blieb das Projekt von Interesse und sollte auf jeden Fall weiterverfolgt werden.



Abbildung 8: Die Diketidbiosynthese mit 3-Amino-5-hydroxybenzoesäure (<u>29</u>) als Vorläufer, Massenangabe für die HPLC-ESI-MS-Analyse (detektierte Massen unterstrichen).



Abbildung 9: Die Diketidbiosynthese mit 3-Amino-4-chlorbenzoesäure (<u>33</u>) als Vorläufer, Massenangabe für die HPLC-ESI-MS-Analyse (detektierte Massen unterstrichen).

Die heterologe Expression gewinnt grundsätzlich dann an Bedeutung, wenn interessante, aber schlecht greifbare Naturstoffe entdeckt werden, die z.B. nur in geringer Menge durch schlechte Wachstumseigenschaften der Organismen verfügbar sind und die Option auf Produktionssteigerung durch Kultivierung im Großmaßstab durch die Art der produzierenden Organismen nicht gegeben ist (z.B. marine Schwämme).

Da die heterologe Expression im Rahmen der Diplomarbeit in *S. coelicolor* und *S. lividans* zwar erfolgreich, die Produktion der Diketide aber zu gering war, wurde beschlossen, einen anderen Wirt für die heterologe Polyketidbiosynthese in Betracht zu ziehen.

Wie von PFEIFER und KHOSLA beschrieben, sind Actinomyceten zwar die produktivsten Polyketiderzeuger, dennoch gehören zahlreiche andere Bakterien und Pilze (z.B. Myxobakterien, Pseudomonaden und Aspergillen) zu den potentiellen heterologen PKS-Produzenten⁷⁰.

Zu Versuchen der heterologen Expression der Ansamitocin-Diketide wurde das *Corynebakterium glutamicum* ausgewählt. Dieser Mikroorganismus zeichnet sich durch besonders leichte Handhabung, wie z.B. schnelles Wachstum aus, zu vergleichen mit *E. coli*. Des Weiteren verfügen Corynebakterien über einfache PKS-Systeme und sind bekannt für die Produktion von Polyketiden in Form von Mycolsäuren.

Mit diesen Versuchen sollte zum einen getestet werden, ob sich das Corynebakterium zur heterologen Polyketidproduktion der Ansamitocin-Diketide eignet, zum anderen sollte das Ziel isolierbarer Mengen der Diketide verfolgt werden.

3.2.2 Experimente zur Heterologen Expression der Diketide in *Corynebakterium glutamicum*

In Kooperation mit J. VOSS aus dem Arbeitskreis von W. LIEBL (Institut für Mikrobiologie und Genetik, Universität Göttingen) wurden zahlreiche Expressions- und Fütterungsversuche zur Überproduktion von Ansamitocin P-3-Vorläufern in *Corynebakterium glutamicum* unternommen.

Die Konstruktion der Vektoren sowie die Versuche zur Expression des asm A (Modul 1)/*TE* Proteins ohne Fütterung wurden von J. Voss durchgeführt. Die Fütterungsversuche fanden in beiden Arbeitskreisen statt. Die HPLC-ESI-MS-Analysen wurden im AK ZEECK/GROND durchgeführt.

Konstruktion des Plasmids pWLQ2c und Expressionsversuche

Im Vorfeld wurde das Plasmid mit den genetischen Informationen für die Diketidproduktion konstruiert (J. VOSS). Ausgangspunkt war der Vektor pWLQ2 (W. LIEBL)⁷¹, ein Shuttle-Vektor für *E. coli* und *C. glutamicum*, ausgestattet mit einer Resistenz gegen Kanamycin und Ampicillin. Da das asm A (Modul 1)/*TE*-Fragment mit den Enzymen *EcoRI* und *PacI* aus pHGF7669 herausgeschnitten wird, musste zuerst eine *EcoRI* und *PacI* Schnittstelle in den Shuttle-Vektor pWLQ2 eingeführt werden (neues Konstrukt: pWLQ2b). Nach Klonierung der 9.6 kb- Bande des asm A (Modul 1)/*TE* in pWLQ2b erfolgte dessen Transformation in *C. glutamicum* R163 und in den Wildtyp *C. glutamicum* WT (= *C. glutamicum* DSM20300). *C. glutamicum* R163 ist eine restriktionsdefiziente Mutante des Stammes *C. glutamicum*

ASO19. Zusätzlich ist *C. glutamicum* R163 tru-, d.h. er kann keine Trehalose verwerten.

Ein erster Expressionsversuch mit *C. glutamicum* WT pWLQ2b: asm A (Modul 1)/*TE* durch Induktion mit Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG, 1 mM bei OD₆₀₀ = 0.8) zeigte keine Überproduktion der Polyketidsynthase. Mögliche Ursache konnte das Nichterkennen der Ribosomenbindungsstelle sein. In einer Zelle erzeugen die Ribosomen durch Ablesen der DNA die entsprechenden Proteine, deren Aminosäuresequenz durch die DNA-Basenabfolge kodiert wird. In diesem Fall handelte es sich um die Aminosäuresequenz zur Ausbildung der Polyketidsynthase. Wird die Ribosomenbindungsstelle nicht erkannt, findet keine Bindung an die Ribosomen in der Zelle statt und die Proteinsynthese wird unterbunden.

Aus diesem Grund wurde zusätzlich eine Ribosomenbindestelle in das Plasmid pWLQ2b: asm A (Modul 1)/*TE* eingeführt (neues Konstrukt: pWLQ2c: asm A (Modul 1)/*TE*). Nach der erfolgreichen Transformation von pWLQ2c: asm A (Modul 1)/*TE* in *C. glutamicum* R163 und *C. glutamicum* WT wurden erneut Expressionsversuche unternommen. Nach Induktion mit IPTG (0.1 mM) konnte ein Teil des asm A (Modul 1)/*TE* Proteins per ESI-MS-Analyse in der löslichen Phase (Überstand) nachgewiesen werden, der größte Teil aggregierte jedoch in der unlöslichen Phase (Zellmaterial).



Abbildung 10: Das Plasmid pWLQ2c (J. VOSS): bla=Ampicillin-Resistenzgen, neo tn5=Kanamycin-Resistenzgen, Ptac=Tac-Promotor (fusionierter *trp / lac*UV5-Promotor)⁷², lacI=LacI Protein, oriCg=origin of replication *C. glutamicum*, rrnB=*rrnB*- Replikations-Terminations Region aus dem *rrnB* operon von *E. coli*⁷³.

Fütterungsversuche mit C. glutamicum R163 und WT pWLQ2c: asm A (Modul 1)/TE

Es wurden insgesamt elf verschiedene Fütterungsexperimente ("X1-X11") mit *C. glutamicum* pWLQ2c: asm A (Modul 1)/*TE* durchgeführt.

Alle Kulturen wurden in Erlenmeyerkolben mit drei Schikanen bei 30°C und 180 rpm bis zu einer optischen Dichte von $OD_{600} = 0.7$ -0.8 kultiviert. Dann folgte die Fütterung der verschiedenen Vorläufer (150 µmol/100 mL), Induktion mit IPTG und Probenentnahme (10-25 mL) nach unterschiedlichen Kultivierungszeiten (12-120 Stunden). Die Ethylacetat-Extrakte der einzelnen entnommenen Proben wurden per HPLC-ESI-MS auf die verschiedenen möglichen Diketide <u>34-37</u> untersucht. Gleichzeitig mit den Proben für die Extraktion wurden auch Proben für die Proteinanalytik entnommen, 24 Stunden nach Induktion wurden je 10 mL entnommen, ab 48 Stunden nach Induktion genügten je 5 mL. Die Proteinanalytik ist in Kapitel 3.2.3 beschrieben.

X1-X9 (J. VOSS): Experimente mit den Stämmen C. glutamicum R163-pWLQ2c und WT-pWLQ2c

X1: Eine 100 mL Hauptkultur (*C. glutamicum* WT-pWLQ2c) wurde mit AHBA versetzt und mit IPTG (1 mM) induziert. Probenentnahme erfolgte vor der Induktion, sowie 24 und 48 Stunden nach der Induktion. Per HPLC-ESI-MS wurde die Masse des acetylierten Diketids <u>35</u> in beiden Proben detektiert (nur positiver Modus).

X2: Von zwei 100 mL Hauptkulturen (*C. glutamicum* R163-pWLQ2c) wurde eine mit AHBA (<u>29</u>) gefüttert und beide mit IPTG (1 mM) versetzt. Proben wurden vor der Induktion, 24 und 48 Stunden nach der Induktion entnommen. Die Analyse zeigte leider keine Diketidproduktion.

X3: Von zwei 100 mL Hauptkulturen (*C. glutamicum* WT-pWLQ2c) wurde eine mit <u>29</u> versetzt und zu beiden IPTG hinzugefügt (1 mM). Es wurden Proben vor der Induktion, 12, 24 und 48 Stunden nach der Induktion genommen. Ebenso wurde mit zwei 100 mL Hauptkulturen von *C. glutamicum* R163-pWLQ2c verfahren. In der Probe des *C. glutamicum* WT-pWLQ2c, die 24 Stunden nach Induktion genommen wurde, ließ sich eine Masse entsprechend des nichtacetylierten Diketids <u>34</u> bei einer Retentionszeit von ca. 3.4 min nachweisen. Ebenso in den Proben des *C. glutamicum* R163-pWLQ2c, 24 und 48 Stunden nach Induktion (nur pos. Modus).

Da die beiden Stämme *C. glutamicum* WT-pWLQ2c und *C. glutamicum* R163-pWLQ2c grundsätzlich ähnliche genetische und biologische Eigenschaften aufweisen, wurden alle folgenden Fermentationen nur noch mit *C. glutamicum* R163-pWLQ2c durchgeführt.

X4: Zu zwei 100 mL Kulturen wurde AHBA (<u>29</u>) hinzugefügt. Zur besseren Kontrolle der Produktivität des Stammes wurde aber nur eine Kultur zusätzlich mit IPTG (1 mM) versetzt, d.h. in der Kultur mit AHBA, ohne IPTG, sollte keine Diketidproduktion stattfinden. Die Proben zur Analyse wurden vor der Induktion mit IPTG sowie 16, 23 und 42 Stunden nach Induktion entnommen. In den Proben, die 16, 23 und 42 Stunden nach der Induktion genommen wurden, ließ sich eine Masse (Rt = ca. 3.5 min) entsprechend des nichtacetylierten Diketids <u>34</u> im positiven Modus nachweisen. Zum ersten Mal ließen sich auch im negativen Modus entsprechende Massen wiederfinden, allerdings in nur sehr geringem Umfang und nur in den Proben von 16 und 23 Stunden nach der Induktion.

X5: Bei dieser Fermentation sollte kontrolliert werden, ob eventuell gebildete Diketide möglicherweise deshalb aus den Probenextrakten nicht nachgewiesen werden konnten, da die Zellen vielleicht nicht in der Lage sind, diese ins Kulturfiltrat auszuschleusen.

Es wurden erneut zwei 100 mL Kulturen mit AHBA (29) versetzt und nur eine davon mit IPTG (1 mM) induziert. Proben wurden 42 Stunden nach Induktion entnommen.

Neben der Extraktion des Kulturfiltrats wurde zusätzlich das Zellmaterial der einzelnen Proben aufgeschlossen und extrahiert.

Die HPLC-ESI-MS-Analyse ergab eine Masse, entsprechend der des nicht-acetylierten Diketids <u>34</u>, nur in dem extrahierten Kulturfiltrat der mit IPTG induzierten Kultur. In den Extrakten der aufgeschlossenen Zellen wurde nichts detektiert, was auf ein gebildetes Diketid hindeuten könnte. Im Folgenden wurde daher nur noch das Kulturfiltrat der Proben extrahiert und untersucht.

X6: Wie bisher wurden zwei 100 mL Hauptkulturen mit AHBA (<u>29</u>) gefüttert und nur eine davon mit IPTG (1 mM) induziert. Proben wurden vor Induktion, 13, 25 und 50 Stunden nach Induktion genommen. Die Gesamtkultivierungsdauer wurde bei diesem Fütterungsversuch verlängert, um auszuschließen, dass die Diketidproduktion erst in einer späteren Phase der Kultivierung vermehrt stattfindet. Des Weiteren wurde den Kulturen ein größeres Probenvolumen (15 mL) im Vergleich zu den anderen Fermentationen entnommen, um die Menge der eventuell gebildeten Diketide für die Detektion zu erhöhen.

Die Analyse der einzelnen Proben zeigte jedoch keine Massen, die mit den eventuell gebildeteten Diketiden <u>34</u> und <u>35</u> übereinstimmten.

X7: Hierbei wurde ein anderer Fütterungsversuch gestartet, in dem nicht mehr AHBA (<u>29</u>), sondern 3A4ClBA (<u>33</u>) zwei 100 mL Kulturen zugesetzt wurde, von denen aber wieder nur eine mit IPTG (1 mM) induziert wurde. <u>33</u> wurde bereits im Rahmen der Diplomarbeit⁶⁹ für

Fütterungsversuche zur Ansamitocinproduktion mit Erfolg eingesetzt. Es besteht hierbei für die Massendetektion der Produkte ein kleiner Vorteil, da mit diesem Vorläufer ein Cl-Atom in die Struktur eingeführt wird. Das Chlor-Isotopenmuster ist spezifisch (das Verhältnis der Isotope ³⁵Cl/³⁷Cl beträgt ca. 3:1) und relativ gut bei ESI-MS-Messungen zu erkennen. Des Weiteren wurde nochmals das Volumen der Proben für eine bessere Detektion erhöht (25 mL). Sie wurden vor der Induktion, 13, 24 und 48 Stunden nach der Induktion entnommen.

Über HPLC-ESI-MS-Analyse der Extrakte konnte keine entsprechende Diketidmasse detektiert werden.

X8-9: Um direkt zu vergleichen, wurde in diesen Fermentationen sowohl AHBA (<u>29</u>) (X8) als auch 3A4ClBA (<u>33</u>) (X9) gefüttert. Von insgesamt vier 100 mL Kulturen wurden jeweils zwei mit <u>29</u> und die zwei anderen mit <u>33</u> versetzt. Jeweils eine Kultur davon wurde mit IPTG induziert. Probenentnahme erfolgte vor Induktion, 14, 24 und 47 Stunden nach Induktion.

Die Auswertung per HPLC-ESI-MS zeigte in Fermentation X8 in allen Proben (außer vor Induktion und nicht-induzierte Kulturen) die Masse des nicht-acetylierten Diketids <u>34</u> im positiven Modus mit der zugehörigen Masse im negativen Modus. Allerdings ist die Masse im negativen Modus nur in sehr geringem Ausmaß zu finden.

In allen Extrakten (außer vor Induktion und nicht induzierte Kulturen) von Fermentation X9 konnte die Masse des nicht-acetylierten Diketids <u>36</u> detektiert werden. Hier sind die Massen aber nur im positiven Modus zu finden.

In allen Fermentationen wurden die gefütterten Vorläufer (**29**, **33**) ebenfalls per HPLC-ESI-MS detektiert. Im Allgemeinen lässt sich dazu sagen, dass die AHBA (**29**) sehr gut im positiven, aber eher schlecht im negativen Modus detektiert wird. Bei der 3A4ClBA (**33**) verhält es sich umgekehrt. Im positiven Modus ist sie grundsätzlich schlechter zu detektieren, als im negativen Modus, was an sich nicht überraschend ist, da Säuren per ESI-MS normalerweise meistens besser im negativen Modus detektiert werden. Diese Beobachtungen zeigen, dass auch die Diketid-Carbonsäuren mit der HPLC-ESI-Methode gut detektierbar sein sollten.

X10-11 (AK GROND):

Die Fermentationen X10-X11 wurden mit dem Stamm *C. glutamicum* R163-pWLQ2c (AK LIEBL) nach den Anzuchtvorschriften von J. VOSS in eigener Arbeit durchgeführt.

Die Hauptkulturen wurden im LB_{kan}-Medium bei 30°C und 180 rpm bis zu einer optischen Dichte von $OD_{600} = 0.7$ -0.8 angezogen. Dann folgte Fütterung der Vorläufer AHBA (<u>29</u>), 3A4ClBA (<u>33</u>) und deren N-Acetylcysteaminthioester (3A4Cl-SNAC) (<u>38</u>), induziert wurde mit IPTG (0.1 mM) und die Schüttelgeschwindigkeit auf 150 rpm herab gesetzt. Zur Kontrolle wurde immer eine Kultur mit Vorläufer nicht induziert, hier durfte also keine Diketidproduktion zu beobachten sein.

Für die HPLC-ESI-MS-Analyse wurden Proben (je 25 mL) von jeder Kultur zu unterschiedlichen Kultivierungszeitpunkten entnommen und mit Ethylacetat extrahiert.

Der Einsatz der 3A4ClBA (<u>33</u>) als SNAC-Ester hatte mehrere Gründe, zum einen die erleichterte Aufnahme des Vorläufers in die Zelle. Die Überführung der Vorläufer-Säure in einen SNAC-Ester steigert die Lipophilie des Moleküls und somit auch seine Möglichkeit die Zellmembran zu durchdringen.

Zum anderen müssen freie Säuren für den weiteren Biosyntheseweg in der Zelle zunächst aktiviert werden. Natürlicherweise wird dieser Schritt vom Coenzym A (CoA) ($\underline{39}$) übernommen. Bei der Biosynthese von Polyketiden erfüllt der Phosphopantetheinarm (Strukturelement von CoA) des Acyl Carrier Proteins (ACP) ($\underline{40}$) der PKS den gleichen Zweck (Abbildung 11). Mittlerweile sind SNAC-Ester gut erprobte Imitate von CoA-thioestern, denen sogar eine bessere Membrangängigkeit zugesprochen wird, als den CoA-thioestern selbst⁷⁴.



Abbildung 11: N-Acetylcysteamin (41), Coenzym A (39) und ein Teil des Acyl Carrier Proteins (40).

X10: Von vier 250 mL Hauptkulturen wurden jeweils zwei mit AHBA (<u>29</u>) und die zwei anderen mit 3A4ClBA (<u>33</u>) gefüttert. Induziert wurde jeweils nur eine AHBA- und eine 3A4ClBA Kultur. Probenentnahme erfolgte vor Induktion, 24, 48,72 und 120 Stunden nach Induktion.

Die Probenextrakte wurden auf die eventuell gebildeten Diketide <u>34</u> und <u>35</u> mit AHBA (<u>29</u>) als Vorläufer sowie auf die Diketide <u>36</u> und <u>37</u> mit 3A4ClBA (<u>33</u>) als Vorläufer geprüft. Es wurden zwar Massen detektiert, die denen der Diketide <u>34</u> und <u>35</u> mit <u>29</u> als Vorläufer entsprechen konnten, jedoch wurden diese Massen mit fast identischen Retentionszeiten auch in den Probenextrakten detektiert, die nicht mit IPTG induziert worden sind. Folglich kann es sich hierbei nicht um gebildete Diketide handeln, da diese nur durch Induktion mit IPTG hätten gebildet werden dürfen.

X11: Zwei 250 mL Hauptkulturen wurden mit <u>33</u> gefüttert, zwei andere mit <u>38</u>, und jeweils eine Kultur davon wurde mit IPTG (0.1 mM) induziert. Die Proben für die HPLC-ESI-MS-Analyse wurden vor Induktion, 24, 48 und 72 Stunden nach Induktion genommen.

Die Analyse der Probenextrakte zeigte jedoch keine Diketidmassen, lediglich die gefütterten Vorläufer konnten detektiert werden (Abbildung 12) (3A4Cl-SNAC: $m/z = 272.92 [M+H]^+$, 544.68 $[2M+H]^+$ bei Rt = ca. 11.4 min).



Abbildung 12: Die Diketidbiosynthese mit 3A4CI-SNAC (<u>38</u>) als Vorläufer, Massenangabe für die HPLC-ESI-MS-Analyse (keine der angegebenen Massen konnte detektiert werden).

3.2.3 Proteinanalytik

Zur Überprüfung der Proteinexpression des asm A (Modul 1)/*TE* Gens erfolgte in Kooperation mit J. VOSS (AK LIEBL) die Proteinanalytik im Institut für Mikrobiologie und Genetik (Universität Göttingen)⁷⁵.

Wie in Kapitel 3.2.2 beschrieben, wurden bei jeder Probenentnahme für die Extraktion mit Ethylacetat parallel auch Proben für die Proteinanalytik entnommen. Das Volumen der Proben betrug bei Entnahme 24 Stunden nach Induktion 10 mL, ab 48 Stunden nach Induktion nur noch 5 mL. Bis zur weiteren Bearbeitung erfolgte Aufbewahrung der Proben bei -20° C.
Ultraschall-Zellaufschluss

Die einzelnen Proben aus jeder Kultivierung wurden zunächst durch Zentrifugation in die lösliche (Kulturfiltrat) und die unlösliche (Pellet, Zellmaterial) Phase getrennt. Um den Inhalt des Zellmaterials auch untersuchen zu können, unterwarf man die unlösliche Phase einem Ultraschallzellaufschluss. Die Zelltrümmer wurden anschließend abzentrifugiert und der Überstand für die weiteren Analysen verwendet.

Im Anschluss wurde zunächst eine quantitative Bestimmung der Proteine durchgeführt.

Quantitative Proteinbestimmung (Bradfordtest)⁷⁵

Der Bradfordtest ist eine sehr sensible Methode zur photometrischen Bestimmung von Proteinkonzentrationen in Lösung. Das Prinzip beruht auf der Verschiebung des Absorptionsmaximums von Coomassie Brilliant Blue G250. Dieser anionisch vorliegende Farbstoff bindet an positiv geladene Aminosäuren der Proteine. Die Verschiebung des Absorpionsmaximums von 470 nm des freien zu 595 nm des gebundenen Farbstoffs wird gegen eine Nullprobe ohne Protein gemessen. Die Nachweisgrenze dieses Test liegt zwischen 1 μ g und 20 μ g.

Den einzelnen Proben wurde also zunächst der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue zugesetzt. Dann erfolgte die Messung der Zunahme der Absorption über die optische Dichte bei 595 nm, welche ein Maß für die Proteinkonzentration in Lösung war. Aus den gemessenen Werten ließ sich dann die Proteinkonzentration per Vergleich mit einer Eichgeraden des Standardproteins BSA bestimmen.

Zum Schluss folgte eine Gelelektrophorese, um zu sehen, ob und in welcher Phase die Bildung des asm A (Modul 1)/*TE* Proteins stattgefunden hat.

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE wurde für die Auftrennung des Proteingemisches angewendet. Sie trennt Proteine entsprechend ihrer molaren Massen auf, wobei Dimere bzw. Multimere in ihre Untereinheiten zerteilt werden. SDS (Sodiumdodecylsulfat) wird durch die meisten Proteine in einem konstanten Verhältnis gebunden. Die hohe negative Ladung des SDS wird dabei auf die Proteine übertragen und überdeckt so die eigentliche Ladung des Proteins. Es kommt somit zu einem konstanten Ladungs-Masse-Verhältnis der SDS-beladenen Proteine. Der Vernetzungsgrad des Acrylamid/Bisacrylamid-Gels ist für seine Trennleistung in einem bestimmten Molekularmassenbereich entscheidend. Die Auftrennung von Proteinen mit Molekularmassenbereich von 10-180 kDa erfolgte mittels eines 10 %igen Gels.

Die bei 95°C (5 min) denaturierten Proben wurden mit einem Gesamtvolumen von 15 μ L auf das Gel aufgetragen, als Farbindikator zum Beobachten des Fortschreiten der Gelelektrophorese diente Bromphenolblau. Nach 45-60 min bei 30 mA wurde das Experiment abgebrochen und die Proteine mit Coomassie Brilliant Blue R250 angefärbt.

Die Größenbestimmung der aufgetrennten Proteine erfolgte mittels Vergleich eines parallel eingesetzten Markers aus bekannten Proteinengrößen.

Die folgenden Abbildungen zeigen zwei SDS-Gele von Proben aus Fermentation X11.



Abbildung 13: Gefärbtes SDS-Gel (X11). 3A4Cl-SNAC (<u>38</u>)-Fütterung <u>ohne</u> Induktion durch IPTG. s24h: lösliche Phase (24 Stunden), s48h: lösliche Phase (48 Stunden), s72h: lösliche Phase (72 Stunden), P24h: unlösliche Phase (24 Stunden), P48h: unlösliche Phase (48 Stunden), P72h: unlösliche Phase (72 Stunden), M: Marker.

In Abbildung 13 ist das mit Coomassie-Blau angefärbte SDS-Gel der 3A4Cl-SNAC (<u>38</u>)-Fütterung aus Fermentation X11 zu sehen (nur <u>nicht</u> induzierte Proben). Von links nach rechts sind folgende Proben aufgetragen:

- s24h: Probe der löslichen Phase (Kulturfiltrat) nach 24 h ohne Induktion
- s48h: Probe der löslichen Phase (Kulturfiltrat) nach 48 h ohne Induktion
- s72h: Probe der löslichen Phase (Kulturfiltrat) nach 72 h ohne Induktion
- P24h: Probe der unlöslichen Phase (Pellet) nach 24 h ohne Induktion
- P48h: Probe der unlöslichen Phase (Pellet) nach 48 h ohne Induktion

- P72h: Probe der unlöslichen Phase (Pellet) nach 72 h ohne Induktion
- Ganz rechts: Marker mit bekannten Proteingrößen



Abbildung 14: Gefärbtes SDS-Gel (X11). 3A4Cl-SNAC (<u>38</u>)-Fütterung <u>mit</u> Induktion durch IPTG. s24h: lösliche Phase (24 Stunden), s48h: lösliche Phase (48 Stunden), s72h: lösliche Phase (72 Stunden), P24h: unlösliche Phase (24 Stunden), P48h: unlösliche Phase (48 Stunden), P72h: unlösliche Phase (72 Stunden), M: Marker.

In Abbildung 14 ist das Coomassie-Blau angefärbte SDS-Gel der 3A4Cl-SNAC (<u>38</u>)-Fütterung aus Fermentation X11 zu sehen (nur mit IPTG induzierte Proben). Die Proben sind analog zu dem Gel aus Abbildung 13 aufgetragen.

Hier eingekreist in den drei Proben der unlöslichen Phase sieht man im Vergleich zum Gel mit nicht induzierten Proben eine zusätzliche Bande größer als 116 kDa, bei der es sich um das gebildete asm A (Modul 1)/TE Protein handeln sollte. Des Weiteren ist festzustellen, dass das Protein leider nur in der unlöslichen Phase zu finden ist, nicht aber in der löslichen Phase.

Diese Problematik wurde bereits in Abschnitt 3.2.2 erwähnt. Es erfolgt eindeutig eine Überexpression des diketidbildenden Proteins. Es wird zwar in sehr hoher Menge gebildet, was aber wiederum der Grund dafür ist, warum es in der unlöslichen Phase aggregiert. Obwohl es also vorhanden ist, steht das Protein somit leider nicht für die Diketidproduktion zur Verfügung. Dies ist ein möglicher Grund für den schlechten bis gar keinen Nachweis von Diketiden in den einzelnen Fermentationen.

3.2.4 Diskussion der Ergebnisse

Die Klonierung des asm A (Modul 1)/*TE* Fragments aus pHGF7669 in den Shuttle-Vektor pWLQ2 sowie die Transformation des entstandenen Vektors pWLQ2c: asm A (Modul 1)/*TE* in *C. glutamicum* wurde erfolgreich von J. Voss durchgeführt.

Die verschiedenen Experimente zur heterologen Expression mit Fütterung des natürlichen Vorläufers AHBA (<u>29</u>) sowie der stammfremden Vorläufer 3A4ClBA (<u>33</u>) und 3A4Cl-SNAC (<u>38</u>) wurden per HPLC-ESI-MS ausgewertet und zeigten teilweise eine erfolgreiche Diketidproduktion, die jedoch nicht immer verlässlich reproduzierbar war (Tabelle 1).

Die gelungene Transformation mit gefolgten Experimenten zur heterologen Expression zeigt, dass neben den bereits in der Diplomarbeit⁶⁹ erprobten Organismen *S. coelicolor* und *S. lividans* auch das *C. glutamicum* als Wirt für heterologe Polyketidproduktion geeignet ist. Des Weiteren wurde mit den Fütterungsversuchen reproduzierbar gezeigt, dass die PKS in der Lage ist, von außen zugegebene Vorläufer zu akzeptieren. Sowohl auf den natürlichen Vorläufer <u>29</u> als auch auf den stammfremden Vorläufer <u>33</u> wird offensichtlich als Startereinheit für die Diketidbiosynthese zugegriffen, zum Kettenverlängerungsschritt über die PKS-Domänen weitergereicht und die Biosynthese mit dem Diketid abgeschlossen.

In Anbetracht der Tatsache, dass in fast allen Fermentationen nur die Masse des jeweiligen nicht-acetylierten Diketids (<u>34</u> bzw. <u>36</u>) nachzuweisen war, ist anzunehmen, dass der Stamm *C. glutamicum* im Gegensatz zu *S. coelicolor* ein geringeres Acetylierungspotential aufweist.

Zum ersten Mal wurden die Massen der Diketide mit AHBA (**29**) als Vorläufer nicht nur im positiven, sondern auch im negativen Modus der ESI-MS-Analyse detektiert. Allerdings sind sie dort nur in geringem Ausmaß zu finden, was aber damit zusammen hängen kann, dass **29** selbst, trotz ihrer Säurefunktion, auch fast ausschließlich im positiven Modus nachgewiesen werden konnte.

Durch starke Variation der Fermentationsdauer, bis zu 120 Stunden lang, konnten nun auch Erkenntnisse über den Bildungszeitpunkt der Diketide erlangt werden. Frühestens nach 14 Stunden konnten die ersten Massen der jeweiligen Diketide nachgewiesen werden. Des Weiteren gibt es keinen Grund zu der Annahme, dass diese weiter metabolisiert werden, da sie auch zu späteren Kultivierungszeitpunkten detektiert worden sind.

Das in *C. glutamicum* exprimierte, diketidproduzierende PKS-Protein konnte durch die Proteinanalytik nachgewiesen werden. Es zeigte sich, dass die Expression so gut funktionierte, dass eine Überexpression des Proteins stattfand, zu erkennen an dessen Aggregation in der unlöslichen Phase. Leider führte diese durch Überexpression hervorgerufene Aggregation zur geringen Diketidproduktion.

Diese Experimente zur heterologen Expression der Diketide in *C. glutamicum* haben die Voraussetzung für weitere Biosyntheseuntersuchungen zum gesamten Ansamitocin-Molekül geschaffen. Die Möglichkeit zur Bildung verschiedener Diketide mittels *C. glutamicum* ist ausbaufähig und könnte zur Erlangung neuer Erkenntnisse zur Ansamitocin-Biosynthese von großem Nutzen sein.

Gefütterte Vorläufer				Detektion per	Detektion per				
		Diketid	Rt [min]	HPLC-ESI-MS:	HPLC-ESI-MS:				
				Pos. Modus	Neg. Modus				
FermentationX1									
AHBA		<u>35</u>	4.7	Ja	Nein				
FermentationX2									
AHBA		-	-	=	-				
Fermentation X3									
AHBA		<u>34</u>	3.4	Ja	Nein				
Fermentation X4									
AHBA		<u>34</u>	3.5	Ja	Ja (sehr gering)				
Fermentation X5									
AHBA	Kulturfiltrat	<u>34</u>	3.5	Ja	Nein				
	Zellmaterial	-	-	-	-				
Fermentation X6									
AHBA		-	-	-	-				
Fermentation X7									
3A4ClBA		-	-	-	-				
Fermentation X8									
AHBA		<u>34</u>	3.4	Ja	Ja (sehr gering)				
Fermentation X9									
3A4CIBA <u>36</u>		11.2	Ja	Nein					
Fermentation X10									
AHBA -		-	-	-	-				
- 3A4CIBA		-	-	-					
Fermentation X11									
3A4ClBA		-	-	-	-				
3A4C1-SNAC		-	-	-	-				

 Tabelle 1: Ergebnisübersicht der Experimente zur heterologen Expression mit C. glutamicum: asm A

 (Modul 1)/TE.

3.2.5 Ausblick

Für den weiteren Fortschritt der Biosyntheseuntersuchungen ist die Isolierung und Strukturaufklärung der bisher analytisch nachgewiesenen Diketide <u>34-37</u> von großer Bedeutung.

Die Diketide konnten nur in kleinen, analytischen Mengen nachgewiesen werden, obwohl während der einzelnen Fermentationen das Probenvolumen zur Extraktion erhöht worden ist. Wie bereits erwähnt kann auch eine weitere Verstoffwechselung der Diketide nicht die Ursache für die geringen Mengen sein, da sie auch zu späten Kultivierungszeitpunkten in den jeweiligen Proben mit gleicher Intensität wie zu früheren Kultivierungszeitpunkten nachgewiesen werden konnten. Das Problem muss letztlich wohl bei der äußerst geringen Bildung der Diketide vermutet werden.

Die Proteinanalytik zeigte zwar, dass das Protein zur Biosynthese der Diketide gebildet wurde, jedoch aggregierte der größte Teil davon immer wieder in der unlöslichen Phase des Zellmaterials. Letztendlich stand das Protein bei der Fermentation nur bedingt zur Biosynthese zur Verfügung, was wiederum die geringen Mengen an Diketidmassen erklären könnte.

Die starke Aggregation des Proteins im Zellmaterial wird durch sehr starke Überexpression hervorgerufen, wofür ein zu starker Promotor verantwortlich sein könnte. Es wäre also sicherlich ein lohnenswerter Versuch, einen neuen Vektor mit einem schwächeren Promotor (Arabinose-Promotor⁷⁶) und dem asm A (Modul 1)/*TE* Fragment zu konstruieren und diesen wiederum für weitere Expressionsversuche in *C. glutamicum* zu transformieren.

Möglicherweise fehlt auch dem ACP der PKS der Phosphopantetheinarm, der die Startereinheit als Thioester bindet und an die folgenden Enzyme der PKS weiter reicht, um die Biosynthese zu vollziehen. Das ACP muss quasi erst durch den Transfer des Phosphopantetheinarms von CoA auf den Serin-Rest vom ACP aktiviert werden. Dieser Schritt wird von einer Phosphopantetheinyltransferase katalysiert (PPTase). In jüngeren Forschungsarbeiten wurde herausgefunden, dass *C. glutamicum* über zwei verschiedene PPTasen verfügt, die jeweils nur bestimmte Proteinsubstrate aktivieren⁷⁷. Unter Umständen ist das Protein für die Biosynthese der Diketide kein Substrat für die PPTasen von *C. glutamicum*. Eine weitere Möglichkeit zur Diketidproduktionssteigerung wäre also die

Klonierung eines PPTase Gens⁷⁸ in den Vektor pWLQ2c mit anschließender Transformation in *C. glutamicum* für erneute Expressions- und Fütterungsversuche.

Von großer Bedeutung ist auch der Einsatz der reinen Diketide als Vergleich für die Analytik. Genauere Kenntnis über die physikochemischen Eigenschaften und das analytische Verhalten der Diketide wäre ebenfalls von großem Vorteil. Sie wurden bisher nur durch synthetische Arbeiten im AK KIRSCHNING (Universität Hannover) zugänglich gemacht⁷⁹. Die eigene Synthese der Diketide wäre also erstrebenswert, mit Option auf die Synthese des Tri- oder sogar Tetraketids. Die reinen Verbindungen könnten dann genutzt werden, um ihre analytische Nachweisgrenze zu bestimmen.

Es besteht des Weiteren die Option zur heterologen Expression der Triketide. Dazu sind die genetischen Informationen von asm AB (pHGF7513) nötig. Diese Bande wurde bereits erfolgreich in den Shuttle-Vektor pWLQ2 kloniert (J. VOSS, AK LIEBL). Nach gelungener Transformation in *C. glutamicum* steht auch dieses Konstrukt für weitere biosynthetische Studien zur Verfügung und eröffnet somit neue Einblicke in einen weiteren Schritt der Ansamitocin-Biosynthese.

3.3 Vorläufer-dirigierte Biosynthese mit der Actinosynnema pretiosum Mutante HGF073

3.3.1 Vorarbeiten zur Biosynthese der Ansamitocine mit der A. pretiosum Mutante HGF073

Das hochaktive Cytostatikum Ansamitocin P-3 (AP-3) (<u>27</u>) (Abbildung 15), isoliert aus *Actinosynnema pretiosum*, bildet die Grundlage für die folgenden Forschungsarbeiten. Seine enorme Aktivität, unglücklicherweise gekoppelt mit stark toxischen Nebenwirkungen, macht es für Forschungsarbeiten hochinteressant.



Abbildung 15: Ansamitocin P-3 (27).

Neue Analoga von <u>27</u> für ein umfassenderes Verständnis von Struktur-Wirkungs-Beziehungen ist eines der verfolgten Ziele, das bisher nur teilweise durch äußerst aufwendige und langwierige synthetische Arbeiten erreicht werden konnte. Des Weiteren sind Derivatisierungen am aromatischen Zentrum der Ansamitocine (Startereinheit), die durch Synthese besonders schwer zugänglich sind, von besonderem Interesse. Die Erschließung neuer Derivate wird deshalb nicht nur durch Synthese verfolgt, sondern auch durch Methoden, wie z.B. mikrobielle Umwandlung⁸⁰.

Die Idealvorstellung ist ein Derivat von <u>27</u> mit ähnlich hoher cytostatischer Aktivität, aber geringeren oder gar keinen Nebenwirkungen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde auf die Biotransformation mit Vorläufer-dirigierter Biosynthese als Quelle für neue Ansamitocin-Derivate zurück gegriffen. Das Fundament für diese biosynthetischen Untersuchungen wurde während der Diplomarbeit⁶⁹ gelegt, in deren Rahmen bereits Experimente zur Vorläufer-dirigierten Biosynthese mit der *A. pretiosum* Mutante HGF073⁸¹ durchgeführt worden sind.

HGF073 ist eine AHBA-Blockmutante (L. BAI), welcher die Fähigkeit zur Biosynthese der natürlichen Startereinheit AHBA (29) aus dem Genom entfernt wurde. Ohne die Startereinheit kann die gesamte Ansamitocin-Biosynthese nicht stattfinden. Die Loading domain, der Polyketidbiosynthesestartpunkt der PKS, ist jedoch voll intakt, so dass von außen zugeführte Startereinheiten für die Polyketidbiosynthese verwertet werden können.

In der Diplomarbeit wurde gezeigt, dass die Mutante HGF073 den natürlichen Vorläufer $\underline{29}$ sowie den stammfremden Vorläufer $\underline{33}$ akzeptiert. Mit $\underline{29}$ wird das natürliche AP-3 ($\underline{27}$) gebildet, mit $\underline{33}$ als Vorläufer wurde das neue 20-Desmethoxyansamitocin ($\underline{42}$) erschlossen (Abbildung 16).



Abbildung 16: Biotransformation mit HGF073: Oben: AHBA (<u>29</u>) führt als Startereinheit zum AP-3 (<u>27</u>). Unten: 3A4ClBA (<u>33</u>) führt als Startereinheit zum 20-Desmethoxyansamitocin (<u>42</u>).

Die 3A4ClBA (<u>33</u>) wurde bewusst als Startereinheit für die Vorläufer-dirigierte Biosynthese der Ansamitocine gewählt, da sie strukturell die einfachste Variante zur Ausbildung des 20-Desmethoxy-Derivates <u>42</u> darstellt. Die zur Ringbildung nötige Aminogruppe ist vorhanden sowie auch das Chloratom in nativer Position.

Aufgrund von Studien am verwandten Ansamycin-Antibiotikum Geldanamycin (<u>43</u>), wurde vermutet, dass sich die fehlende Methoxyfunktion in C-20-Position positiv auf das Ausmaß der Nebenwirkungen auswirken würde^{82,83}. <u>43</u> ist an seinem Chinonring in C-17-Position auch mit einer Methoxygruppe ausgestattet. Derivatisierungen ergaben u.a. das 17-Allylamino-17-desmethoxygeldanamycin (17-AAG) (<u>44</u>), welches durch stabilere und weniger toxische Eigenschaften im Vergleich zu <u>43</u> bereits in klinischen Studien der Phase II

angelangt ist⁸⁴. Bei 17-AAG (<u>44</u>) handelt es sich um ein sogenanntes Prodrug, welches durch das Enzym CYP3A4 in die aktive Form 17-Amino-17-desmethoxygeldanamycin (17-AG) (<u>45</u>) überführt wird⁸³.



Abbildung 17: Das Ansamycin-Antibiotikum Geldanamycin (<u>43</u>) und die Derivate 17-AAG (<u>44</u>) sowie 17-AG (<u>45</u>).

Die gelungene Vorläufer-dirigierte Biosynthese des 20-Desmethoxyansamitocins (<u>42</u>) mittels der Mutante HGF073 öffnete das Tor für weitere Derivatisierungen mittels Biotransformation. Eine Testung dieses Derivats war jedoch aufgrund ungenügender isolierter Mengen nicht möglich. Somit sollte Ziel dieser Arbeit sein, durch Fermentationsoptimierung genügend <u>42</u> für biologische Aktivitätstests zu isolieren. Zum anderen sollten dem PKS-Biosyntheseapparat von HGF073 auch weitere Vorläufer in Fütterungsexperimenten angeboten werden, um die Akzeptanzgrenze der Loading domain feststellen zu können und eventuell weitere, neue Derivate für Biotests zugänglich zu machen.

Ein weiteres Problem stellte die schlechte Detektierbarkeit von geringen Mengen des Derivates <u>42</u> dar. Trotz vieler funktioneller Gruppen sowie Doppelbindungssysteme konnte es weder im UV-Licht noch durch Anfärben mit entsprechenden Sprühreagenzien auf dem Dünnschichtchromatogramm sichtbar gemacht werden. Eine Analyse per HPLC-ESI-MS war bisher unumgänglich. Durch die Isolierung größerer Mengen 20-Desmethoxyansamitocin (<u>42</u>) wäre es möglich, auch dieses Problem zu lösen.

3.3.2 Fermentationsoptimierung und Fütterungsexperimente

In verschiedenen Fermentationen wurden die Kultivierungsbedingungen optimiert. Die einzelnen Fermentationen sind im Folgenden als ASM K fortlaufend bis ASM X bezeichnet. Zur Optimierung gehörten verschiedene Strategien zur Produktionssteigerung, wie der Einsatz des Adsorberharzes XAD während der Kultivierung, bis hin zum Nährmedienwechsel und veränderten Fütterungsbedingungen.

Die Fermentationen ASM K-ASM X

ASM K: Die Kultivierung des Stammes *Actinosynnema pretiosum* HGF073 erfolgte in 1 L Erlenmeyerkolben mit 3 Schikanen bei 29°C und 225 rpm im Malz-Glucose-Hefe-Nährmedium M2 unter Zufütterung von 3A4Cl-SNAC (7.3 mM) (<u>38</u>), Natriumisobutyrat (5 mM) und Dimethylsulfoxid (DMSO, 1 Vol-%).

Der SNAC-Ester <u>38</u> wurde zuvor aus 3A4ClBA (<u>33</u>) und N-Acetylcysteamin (<u>41</u>) durch Versetzen mit EDCI/DMAP und Rühren bei Raumtemperatur synthetisiert (s. Kapitel B 3.1.3.1).

Die Zugabe der Substanzen erfolgte portionsweise nach 24, 48 und 85 Stunden. DMSO wurde eine Stunde vor Fütterungsbeginn zur besseren Aufnahme der Vorläufer in die Zellen hinzugesetzt. Mit Anwendung dieser literaturbekannten Methode der Produktionssteigerung⁸⁵ wurde eine Verdopplung der Ausbeute des 20-Desmethoxy-Derivates <u>42</u> während der Diplomarbeit erreicht⁶⁹.

Der Vorteil des Einsatzes von SNAC-Estern zur Produktionssteigerung wurde bereits in Kapitel 3.2.2 erläutert (s. auch Abbildung 11). Natriumisobutyrat wurde zur Unterstützung der bevorzugten Ausbildung des Ansamitocin P-3 Derivates zugesetzt. AP-3 (<u>27</u>) enthält eine strukturspezifische Isobutyrat-Seitenkette an C-3-Position. Durch das Überschussangebot von Natriumisobutyrat wird die Bildung der Nebenprodukte Ansamitocin P-1 (<u>25</u>), P-2 (<u>26</u>) und P-4 (<u>28</u>) (Abbildung 4) im besten Fall fast vollständig unterdrückt.

Nach insgesamt 113 Stunden Kultivierung wurde geerntet und aufgearbeitet. Nachdem sich eine Aufarbeitung über das Adsorberharz XAD aus den Erfahrungen der Diplomarbeit als ungünstig erwiesen hatte, wurde auf die bewährte Extraktion mit Ethylacetat zurückgegriffen. Es erfolgte grundsätzlich nur die Bearbeitung des Kulturfiltrats, da aus vorangegangenen Fermentationen die Anwesenheit der Ansamitocine im Zellmaterial als unwesentlich angesehen werden konnte. Die Reinigung des Ethylacetat-Extrakts an Sephadex LH-20/MeOH ergab vier Fraktionen. Bei der HPLC-ESI-MS-Analyse dieser Fraktionen konnte die Masse des 20-Desmethoxy-Derivats <u>42</u> nicht nachgewiesen werden.

ASM L: Die Kultivierung und Fütterung erfolgte analog zu ASM K. Zum Vergleich wurden zusätzliche Kulturen mit dem bewährten Vorläufer 3A4ClBA (7.3 mM) (<u>33</u>) gefüttert. Ernte erfolgte nach 120 Stunden Kultivierung mit anschließender Reinigung der verschiedenen Ethylacetat-Extrakte über Sephadex LH-20/MeOH. In einer Fraktion aus der Fütterung mit <u>33</u> konnte <u>42</u> per HPLC-ESI-MS nachgewiesen werden. Die Analyse der Fütterung des SNAC-Esters <u>38</u> zeigte wiederholt keine Ansamitocin-Produktion. Es wurde deshalb beschlossen, auf die Fütterung von <u>38</u> in künftigen Fermentationen zu verzichten und auf andere Mittel zur Produktionssteigerung zurückzugreifen.

ASM M: Die Kultivierung wurde bei 28°C, 225 rpm für insgesamt 160 Stunden durchgeführt. Die portionsweise Fütterung von 3A4ClBA (7.3 mM) (<u>33</u>) und Natriumisobutyrat erfolgte nach 24, 48 und 72 Stunden.

Als weiterer Versuch zur Produktionssteigerung wurde nun das Adsorberharz XAD-2 eingesetzt. Einem Teil der Kulturen wurde das XAD ca. 16 Stunden nach der ersten Fütterung von <u>33</u>/Natriumisobutyrat zugesetzt, dem anderen Teil der Kulturen wurde das XAD 16 Stunden nach der zweiten Fütterung verabreicht. Zusätzlich wurde nochmal jeweils der Hälfte dieser Kulturen eine Stunde vor Fütterungsbeginn DMSO zugesetzt. Es gab also Kulturen nur mit XAD und welche mit XAD+DMSO zur Produktionssteigerung.

Hinter der Idee der XAD-Fütterung steckt das "Prinzip von Le Chatelier⁴⁸⁶. Das gebildete Ansamitocin-Derivat <u>42</u> bindet an das Adsorberharz XAD-2 und wird so aus dem Reaktionsgleichgewicht des Kulturfiltrats entfernt. Das System sollte entsprechend mit Nachproduktion reagieren, das Ergebnis bedeutete eine Produktionssteigerung. Der beste Zugabezeitpunkt von XAD zu den Kulturen sollte durch die zeitlich unterschiedliche Zugabe herausgefunden und etabliert werden.

Die Aufarbeitung der entsprechenden Kulturen erfolgte getrennt voneinander. Zur Sicherheit wurde bei diesem Fermentationsansatz neben dem Kulturfiltrat auch das Mycel (mit Aceton) extrahiert. Die Analyse der Rohextrakte per HPLC-ESI-MS zeigte <u>42</u> im Kulturfiltrat- und Mycelextrakt mit XAD-Zusatz 16 Stunden nach der ersten Fütterung von 3A4ClBA/Natriumisobutyrat, ohne DMSO-Zusatz. In den Extrakten aus XAD-Zugabe 16 Stunden nach der zweiten Fütterung, auch in Kombination mit DMSO, konnte kein Ansamitocin (<u>42</u>) nachgewiesen werden.

ASM N: Diese Fermentation stützte sich auf die Erkenntnisse aus Fermentation ASM M. Das XAD wurde bei dieser Fermentation bereits 12 Stunden nach der ersten 3A4ClBA/Natriumisobutyrat-Fütterung zugesetzt. Des Weiteren wurde DMSO wieder in gesonderten Kulturen gefüttert und nicht mehr in Kombination mit XAD.

Die Aufarbeitung erfolgte wie unter asm M beschrieben. Von den DMSO Kulturen wurde nur das Kulturfiltrat extrahiert. Von den XAD Kulturen erfolgte Extraktion von Kulturfiltrat und Zellmaterial. Durch HPLC-ESI-MS-Untersuchung ließ sich das Derivat <u>42</u> nur im Kulturfiltratextrakt der DMSO-gefütterten Kulturen wiederfinden. Die Kulturen mit XAD-Zusatz erbrachten erneut keine Produktion des 20-Desmethoxyansamitocins (<u>42</u>).

ASM O: Bis zu diesem Zeitpunkt verlief eine Fermentation mit XAD mit erfolgreicher Ansamitocin-Produktion (ASM M), eine zeigte keine Produktion (ASM N). Somit sollte dies der letzte Versuch einer XAD-gesteuerten Fermentation sein. Zum Vergleich wurde gleichzeitig eine DMSO-unterstützte Kultivierung gestartet. Gefüttert wurden erneut 3A4ClBA (<u>33</u>) und Natriumisobutyrat wie beschrieben. Die Kulturen wurden in diesem Versuch bei 120 spm (Längsschüttler) inkubiert, die XAD-Zugabe erfolgte ca. 18 Stunden nach der ersten Fütterung von <u>33</u>/Natriumisobutyrat. Geerntet wurde wie bei Fermentation ASM M nach ca. 160 Stunden Gesamtkultivierungszeit. Das Kulturfiltrat der Kulturen mit DMSO-Zusatz wurde wie das Kulturfiltrat der XAD-haltigen Kulturen einer Ethylacetat-Extraktion unterzogen. Außerdem erfolgte wieder eine Mycel-Aceton-Extraktion des Zellmaterials mit XAD. Die DMSO-gefütterten Kulturen zeigten bei der Analyse das gebildete Ansamitocin-Derivat <u>42</u>. In dem Mycelextrakt der XAD-Fermentation konnte <u>42</u> nur in geringem Umfang detektiert werden, der Kulturfiltratextrakt zeigte keine Produktion von <u>42</u>.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde beschlossen, die XAD-gestützten Fermentationsansätze einzustellen. Die Ansamitocin-Produktion konnte nicht reproduzierbar durch XAD-Zusatz verbessert werden. Die DMSO-Zugabe hingegen lieferte reproduzierbare, konstante Ergebnisse.

Die nächsten Fermentationen wurden im Längsschüttler bei 120 spm vorgenommen, da der Stamm zur Produktion offensichtlich mehr Sauerstoff benötigt. Durch das andere Schüttelverhalten im Längsschüttler, im Vergleich zum Rundschüttler, ist eine bessere Sauerstoffversorgung gewährleistet.

ASM P: Mit dieser Fermentation wurde ein ganz neuer Versuch zur Ansamitocin-Produktionssteigerung erprobt. Die Zufütterung des Kulturfiltrats eines Pilzes sollte die Ansamitocin-Produktion stimulieren. Da die Ansamitocine antifungale Aktivität aufweisen⁸⁷, sollte der Stamm HGF073 zur Abwehrreaktion gegen den eingedrungenen Pilz das Ansamitocin als Fungizid vermehrt produzieren.

Der Pilz *Chaetomium* sp. 6556⁸⁸ wurde zunächst für 7 Tage bei 24°C und 180 rpm kultiviert. Danach erfolgte Trennung von Kulturfiltrat und Mycel mit anschließender Sterilfiltration des Kulturfiltrats.

Der Stamm HGF073 wurde unter Zufütterung von 3A4ClBA (<u>33</u>) und Natriumisobutyrat kultiviert. Das Sterilfiltrat des Pilzes wurde den Kulturen 16 Stunden nach der ersten Fütterung von 3A4ClBA/Natriumisobutyrat zugesetzt. Auf die zusätzliche Gabe von DMSO wurde verzichtet, um den Stress für die Zellen nicht allzu sehr zu erhöhen.

Nach insgesamt 136 Stunden Kultivierung wurden Kulturfiltrat und Mycel extrahiert. Die Analyse der Extrakte ergab das 20-Desmethoxyansamitocin (<u>42</u>) in allen Rohprodukten, allerdings in so geringer Konzentration, dass auf eine weitere Bearbeitung der Extrakte verzichtet wurde.

Eine erneute Fermentation mit Pilzzugabe wurde aufgrund dieser Ergebnisse nicht in Betracht gezogen.

ASM Q: Um die Reproduzierbarkeit der bisherigen Ergebnisse durch Fermentation mit DMSO-Zusatz unter Beweis zu stellen, wurde mit diesem Versuch noch einmal eine "Standard"-Fermentation unternommen.

Die Kultivierung erfolgte bei 28°C und 120 spm für insgesamt 138 Stunden. Die Fütterung von 3A4ClBA (7.3 mM) (<u>33</u>) und Natriumisobutyrat (5 mM) fand nach 24, 48 und 72 Stunden statt. DMSO (1 Vol-%) wurde wieder eine Stunde vor Fütterungsbeginn zugesetzt. Der Ethylacetat-Extrakt des Kulturfiltrats durchlief eine Reinigung per Sephadex LH-20/Methanol. Die erhaltenen Fraktionen wurden zunächst per HPLC analysiert (HPLC A, Säule A, Programm E (s. Kapitel 1.2)), Detektion erfolgte bei einer Wellenlänge von $\lambda = 247$ nm, dem gemessenen UV-Maximum von 20-Desmethoxyansamitocin (<u>42</u>)⁶⁹. Es konnte jedoch kein **42** detektiert werden. Eine absichernde HPLC-ESI-MS-Messung konnte

die Masse des Derivats <u>42</u> auch nicht nachweisen.

ASM R: In diesem Experiment sollte der Einfluss des Sauerstoffgehalts während der Fermentation von HGF073 auf die Ansamitocin-Produktion genauer überprüft werden. Dazu wurde ein Teil der Kulturen in Erlenmeyerkolben mit Schikane und ein anderer Teil in Kolben ohne Schikane kultiviert. Fütterung der Substanzen 3A4ClBA (33), Natriumisobutyrat und DMSO erfolgte analog zu den anderen Fermentationen. Nach insgesamt 141 Stunden Kultivierungszeit wurde geerntet. Die Aufarbeitung erfolgte durch Extraktion der Kulturfiltrate und des Zellmaterials. Anschließend folgte eine HPLC-Analyse der Rohextrakte (HPLC A, Säule A, Programm E, (s. Kapitel 1.2)), mittels der die Bildung des Ansamitocin-Derivats $\underline{42}$ bestätigt wurde (Rt = ca. 16.1 min). Nach Aufreinigung der Rohextrakte über Sephadex LH-20/MeOH erfolgte der massenspektrometrische Nachweis des Derivats 42 per HPLC-ESI-MS in den Fraktionen. Eine Quantifizierung des Signals von 42 zeigte im Vergleich der einzelnen Fermentationsansätze eine leicht erhöhte Ausbeute an 20-Desmethoxyansamitocin (42) im Fermentationsansatz mit Schikanekolben. Offensichtlich hat der Stamm HGF073 für die Produktion von Ansamitocin tatsächlich einen erhöhten Sauerstoffbedarf. Die künftigen Fermentationen wurden also weiterhin in Schikanekolben durchgeführt, außerdem sollte eine Kultivierung im Airliftfermenter erfolgversprechend sein.

ASM S: Da die schlechten Ausbeuten schon lange ein großes Problem in der Ansamitocinforschung darstellten, wurde an der Entwicklung eines speziellen Nährmediums gearbeitet, welches im Jahr 2006 dann auch von BANDI et al. veröffentlicht wurde. Mit den Hauptbestandteilen Dextrin, Proflo (Cotton seed flour) und Maltose wurden bei Kultivierungsarbeiten mit A. pretiosum HGF073 78.3 mg/L Ansamitocin P-3 (27) isoliert, eine 15 fach höhere Ausbeute als bei Kultivierungen im M2-Medium (= YMG-Medium)⁵⁸. Das neue Medium wurde für diese Kultivierung zusammen mit der Fütterung anderer Vorläufer für die Ansamitocin-Biosynthese eingesetzt. Die Fermentation erfolgte aber weiterhin bei 28°C und 120 spm, ohne DMSO-Zusatz. Gefüttert wurden folgende Vorläufer ieweils eigenen Kultivierungsansatz: (33),in einem 3A4ClBA 3-Amino-4hydroxybenzoesäure (3A4HBA) (46), 3-Amino-4-methylbenzoesäure (3A4MBA) (47), 3,4-Diaminobenzoesäure (3,4-DiABA) (48), 3,5-Diaminobenzoesäure (3,5-DiABA) (49) und 3-Aminobenzoesäure (3ABA) (50) (7.3 mM, nach 24, 48 und 72 Stunden), sowie weiterhin Natriumisobutyrat (5 mM) (Abbildung 18).



Abbildung 18: Das Angebot verschiedener Vorläufer für die Ansamitocin-Biosynthese mit HGF073: 3A4HBA (<u>46</u>), 3A4MBA (<u>47</u>), 3,4-DiABA (<u>48</u>), 3,5-DiABA (<u>49</u>), und 3ABA (<u>50</u>).

Die Aufarbeitung erfolgte, wie bei den anderen Fermentationen, über Extraktion der Kulturfiltrate mit Ethylacetat und über Extraktion des Mycels mit Aceton.

Die Rohprodukte wurden per HPLC-ESI-MS auf mögliche Ansamitocin-Derivate <u>42</u>, <u>51-56</u> (Abbildung 19) untersucht.



Abbildung 19: Denkbare Ansamitocin-Produkte bei Fütterung der Vorläufer, 3A4HBA (<u>46</u>), 3A4MBA (<u>47</u>), 3,4-DiABA (<u>48</u>), 3,5-DiABA (<u>49</u>) und 3ABA (<u>50</u>) (s. auch Abb. 18).

Das 20-Desmethoxyansamitocin (<u>42</u>) wurde aus dem Extrakt der Fütterung von 3A4ClBA (<u>33</u>) nachgewiesen. Daneben konnte keine der Massen gemäß Abbildung 19 detektiert werden. Prinzipiell wurde bei den Messungen kein Hauptprodukt gefunden, welches mit der Masse auf irgendein Ansamitocin-Derivat hindeuten könnte. Der Vorläufer 3ABA (<u>50</u>) wurde bereits bei früheren Experimenten ohne Ergebnis verfüttert. Offenbar ist die Loading domain des Ansamitocin-PKS-Systems doch auf die Akzeptanz weniger Moleküle beschränkt, so dass eine Umsetzung mit den hier angebotenen Vorläufern kein Ergebnis liefern kann.

Alle folgenden Fermentationen wurden dennoch in dem hier neu verwendeten Nährmedium durchgeführt.

ASM T: Da die Produktion des 20-Desmethoxyansamtocins (<u>42</u>) über die bisher beschriebenen Fermentationen immer weiter abgenommen hat, wurde mit dieser Kultivierung ein Produktionsvergleich zwischen HGF073 aus Göttingen und HGF073 aus der Kooperation mit dem AK KIRSCHNING aus Hannover vorgenommen. Des Weiteren wurden andere Kultivierungs- und Fütterungsbedingungen (Kooperation AK FLOSS, AK KIRSCHNING) übernommen.

Es wurden zwei verschiedene Kulturen angesetzt, eine mit HGF073 aus Göttingen, die andere mit HGF073 aus Hannover angeimpft. Die Inkubation der Kulturen erfolgte in 300 mL Erlenmeyerkolben (Dextrin-, Proflo-, Maltose-Medium) mit Schikane bei 30°C und 225 rpm für insgesamt 7 Tage. Gefüttert wurde weiterhin 3A4ClBA (1.5 mM) (<u>33</u>), aber statt Natriumisobutyrat kam Valin zum Einsatz. Die Substanzen wurden in DMSO/Wasser 1:1 gelöst und erst nach 72, 96 und 120 Stunden gefüttert. Das Valin wurde als 3%ige wässrige Lösung direkt nach dem Animpfen der Hauptkulturen gefüttert.

Nach der Ernte folgte die Aufarbeitung der beiden Kulturfiltrate per Ethylacetat-Extraktion. Die Analyse der Rohprodukte per HPLC (HPLC A, Säule A, Programm E (s. Kapitel 1.2)), mit reinem Ansamitocin P-3 (<u>27</u>) als Vergleichssubstanz, brachte ein eindeutiges Ergebnis hervor: Der Stamm HGF073 aus Göttingen hatte offenbar die Fähigkeit zur Ansamitocin-Produktion nahezu verloren. Demgegenüber zeigte der Stamm HGF073 aus Hannover eine sehr gute Ansamitocin (<u>42</u>)-Produktion, weshalb die folgenden Kultivierungen nur noch mit dem Stamm HGF073 aus Hannover durchgeführt wurden.

ASM U: Diese Fermentation sollte die Produktivität der neuen HGF073-Abimpfung aus Hannover unter den veränderten Kultivierungsbedingungen im optimierten Spezialmedium (Dextrin, Proflo, Maltose) unter Beweis stellen. Des Weiteren war die AP-3 (<u>27</u>)-Produktion im Vergleich zur Produktion des 20-Desmethoxy-Derivates <u>42</u> von Interesse.

In zwei verschiedenen Ansätzen wurden 3A4ClBA (1.5 mM) (<u>33</u>) und AHBA (1.5 mM) (<u>29</u>), jeweils plus Valin, gefüttert. Aufarbeitung erfolgte nach insgesamt 7 Tagen Kultivierung. HPLC-ESI-MS-Untersuchung der Extrakte von Kulturfiltrat und Mycel zeigte die Hauptmenge beider Metaboliten im jeweiligen Kulturfiltrat. Der Vergleich der Peakintegrale beider Substanzen ergab das Verhältnis Ansamitocin P-3 (<u>27</u>)/20-Desmethoxyansamitocin (<u>42</u>) ca. 8:1.

ASM V: Diese Fermentation diente rein zur Gewinnung von <u>42</u>. Kultivierung und Fütterung (nur 3A4ClBA (<u>33</u>) und Valin) erfolgte wie zuvor beschrieben. Da mit der Aufreinigung der Extrakte über Kieselgelsäulenchromatographie, wie in ASM T durchgeführt, eine unzureichende Trennung erreicht wurde, erfolgte hier wieder die Reinigung über Sephadex LH-20/MeOH. Das Ansamitocin-Derivat <u>42</u> wurde per HPLC-ESI-MS nachgewiesen.

ASM W: Wie bereits angesprochen, hat der Stamm HGF073 für die Ansamitocin-Produktion einen erhöhten Sauerstoffbedarf. Deshalb wurde diese Fermentation im Airliftfermenter (10 L Fassungsvermögen) mit 5 bar Überdruck durchgeführt. Zur Kontrolle erfolgte parallel eine Fermentation in Schüttelkolben. Die Fütterungsmenge von 3A4CIBA (<u>33</u>) wurde für dieses Experiment verdoppelt, die Menge an zugegebenem Valin blieb wie in vorigen Fermentationen. Die Ernte beider Ansätze fand nach 7 Tagen Kultivierung statt. Nach Aufarbeitung der Kulturfiltrate über Ethylacetat-Extraktion zeigte die Analyse per HPLC-ESI-MS in beiden Rohprodukten das gewünschte 20-Desmethoxyansamitocin (<u>42</u>). Ein Vergleich der Peak-Integrale ließ die Aussage zu, dass die Produktion im Airliftfermenter schlechter verlief als in Schüttelkulturen.

Nach Reinigung beider Rohprodukte an Sephadex LH-20/MeOH war das Derivat <u>42</u> nicht mehr in den Fraktionen aus der Airliftfermentation nachzuweisen. Die Ansamitocinenthaltenden Fraktionen der Schüttelkulturfermentation wurden vereint und weiter über Sephadex LH-20/Aceton gereinigt. Bei erneuter Analyse dieser Fraktionen konnte das 20-Desmethoxy-Derivat <u>42</u> auch nicht mehr detektiert werden. Offensichtlich ist das Ansamitocin-Produkt in den Extrakten der Fermentationen zerfallen. Der Grund hierfür blieb unklar, da sehr umsichtig und stets säurefrei gearbeitet wurde. **ASM X:** Alle bisher durchgeführten Fermentationen erbrachten nicht genug Ansamitocin-Derivat <u>42</u> für eine genauere Analytik und Biotests. Diese Fermentation sollte somit ein letzter Versuch sein, genügend dieser Substanz zu isolieren. Die Kultivierung erfolgte wieder unter Zufütterung von 3A4ClBA (3 mM) (<u>33</u>) und Valin mit Ernte nach 7 Tagen.

Das nach Ethylacetatextraktion erhaltene Rohprodukt des Kulturfiltrats wurde über eine neu präparierte Sephadex LH-20/MeOH-Säule (70 cm kürzer als zuvor angewendete Säulen) gereinigt. In Fraktion 2 konnte <u>42</u> per HPLC, sowie HPLC-ESI-MS detektiert werden. Eine präparative Reinigung (HPLC C, Säule A, Programm E (s. Kapitel 1.2)) dieser Fraktion erbrachte zum ersten Mal genug Substanzmenge (5.1 mg aus 2 L Kultur) für analytische Zwecke und Bioaktivitätstests.

3.3.3 Isolierung und Analytik des 20-Desmethoxyansamitocins (42)

Isolierung und Analytik von <u>42</u> stellten trotz geleisteter Vorarbeiten während der Diplomarbeit noch immer eine beträchtliche Herausforderung dar. Trotz der Komplexität des Moleküls mit konjugierten Doppelbindungssystemen und einem bereits bekannten UV-Maximum bei 247 nm war eine Detektion auf Kieselgelplatten im UV-Bereich (254 und 366 nm) bisher nicht möglich. Eine ebenso schlechte Anfärbbarkeit durch Sprühreagenzien machte die Isolierungsarbeiten nicht einfach. Eine HPLC-ESI-MS-Analyse war für jeden Schritt der Aufarbeitung unumgänglich, um die Anwesenheit des Derivats <u>42</u> nachzuweisen.

Der erste Isolierungsschritt führte über eine Sephadex LH-20/MeOH Säulenchromatographie. Ein zwischenzeitlicher Versuch der Aufreinigung über Kieselgel sorgte aber durch unbefriedigende Trennung für die Rückkehr zur bewährten Sephadex-Methode.

Nach der Auftrennung wurde jede Fraktion auf das Vorhandensein von <u>42</u> durch HPLCgekoppelte Massenspektrometrie überprüft. Dabei ließen sich die zum Derivat <u>42</u> gehörenden Massen m/z = 605 [M+H]⁺, m/z = 627 [M+Na]⁺ und m/z = 1231 [2M+Na]⁺ reproduzierbar bei einer Retentionszeit von 16 min detektieren (HPLC B, Säule A, Programm C (s. Kapitel 1.2)). Eine zweifelsfreie Identifikation war über die Betrachtung des spezifischen Chlor-Isotopenmusters möglich. Jeweils zum Molekülion mit dem Chlorisotop ³⁵Cl, findet sich in Nachbarschaft das Molekülion mit dem Chlorisotop ³⁷Cl (natürliche Häufigkeit ungefähr 1/3), der etwa 30 % der Höhe des Molekülpeaks mit dem ³⁵Cl-Isotop aufweist (Abbildung 20).



Abbildung 20: HPLC-ESI-MS-Chromatogramm von 20-Desmethoxyansamitocin (<u>42</u>). A) Massenchromatogramm: Auftreten aller detektierbarer Massen, B) UV-Chromatogramm bei 247 nm, C) Massenchromatogramm mit spezieller Suche von m/z = 605 und dem dazu gefundenen Signal, D) ESI-MS-Spektrum von <u>42</u>.

Die hier beschriebenen Isolierungsarbeiten mithilfe der präparativen HPLC wurden mit den Ansamitocin-haltigen Fraktionen aus den Fermentationen ASM L, O, S, U, V und X durchgeführt. Die Ansamitocin-haltigen Fraktionen aus ASM T führte man aufgrund der geringen Menge einer semipräparativen Trennung zu (HPLC A, Säule C, Programm E). Aus allen Trennungsversuchen, außer mit ASM X, gingen präparativ unbrauchbare Mengen (< 0.2 mg) an 20-Desmethoxyansamitocin (<u>42</u>) hervor. Eine präparativ wertvolle Menge von 5.1 mg des Derivats <u>42</u> ergab sich lediglich aus der Auftrennung der Fraktion ASM XK2 aus der Fermentation ASM X.

Die Isolierung von <u>42</u> erfolgte über präparative HPLC (HPLC C, Säule D, Programm E, $\lambda = 247$ nm). Die verwendete Standardsäule der HPLC-ESI-MS stand auch als präparative Variante zur Verfügung, so dass die Übertragung der HPLC-ESI-MS-Messbedingungen auf die präparative Analyse nach einigen Optimierungsversuchen recht gut möglich war. Um den

Zeitaufwand der Trennung möglichst gering zu halten, wurde versucht, eine isokratische Methode zu etablieren (HPLC C, Säule D, Programm F). Das Signal von <u>42</u> war jedoch nicht zu vereinzeln, so dass die Trennung kein sauberes Produkt ergab. Es wurde daraufhin beschlossen, die vorher etablierte Trennmethodik weiter anzuwenden (HPLC C, Säule D, Programm E, $\lambda = 247$ nm). Während der gesamten Trennung und späterer Handhabung erfolgte äußerste Vorsicht. Die Lösungsmittel wurden säurefrei gehalten, und die Temperatur beim Eindampfen der Fraktion betrug grundsätzlich nicht mehr als 40°C.



Abbildung 21: Chromatogramm der Fraktion ASM XK2 in der präparativen HPLC: Gewinnung von 20-Desmethoxyansamitocin (<u>42</u>).

Bei der Trennung der Fraktion ASM XK2 zeigte sich im HPLC-Chromatogramm ein großer Hauptpeak bei 16.3 min (Abbildung 21). Ein Vergleichslauf mit reinem AP-3 (<u>27</u>) zeigte dieses zu ähnlicher Retentionszeit, was die Vermutung nahe legte, dass es sich bei dem Hauptpeak im Chromatogramm von ASM XK2 um das gesuchte 20-Desmethoxy-Derivat <u>42</u> handelte. Eine Bestätigung der Vermutung brachte die ESI-MS- und die HR-MS-Analyse des isolierten Hauptpeaks. Aus der präparativen Trennung gingen 5.1 mg reines 20-Desmethoxyansamitocin (<u>42</u>) hervor. Eine vollständige chemisch-analytische Charakterisierung lieferten UV-, IR- und NMR-Analytik. Die NMR-Analyse (¹H-NMR, ¹³C-NMR, 600 MHz-Gerät, CDCl₃) bestätigte im Vergleich mit den Literaturdaten des Ansamitocin P-3⁸⁹ und den ¹H-NMR-Daten vom Derivat <u>42</u> aus der Diplomarbeit⁶⁹ das Ansamitocingrundgerüst, sowie das Fehlen der Methoxyfunktion in C-20-Position.

3.3.4 Biologische Aktivität

Im Rahmen dieser Arbeit gelang es zum ersten Mal, genügend Substanz des 20-Desmethoxyansamitocins (<u>42</u>) für bislang aufgrund ungenügender Menge nicht durchführbare Bioaktivitätstests zu isolieren. Dazu wurden ca. 0.5 mg des Derivats <u>42</u> zusammen mit Ansamitocin P-3 (<u>27</u>) und den aus der Kooperation mit AK KIRSCHNING gewonnenen Derivaten <u>57</u> und <u>58</u> (Abbildung 22) von W. BEIL (MH Hannover) und F. SASSE (HZI, Braunschweig) auf verschiedene, humane Krebszelllinien getestet (Tabelle 2).



Abbildung 22: Ansamitocin-Derivate der Kooperation von AK GROND und AK FLOSS/AK KIRSCHNING.

Zelllinie	Herkunft	AP-3 (<u>27</u>)	Chlor- Derivat (<u>42</u>)	Brom- Derivat (<u>57</u>)	Fluor- Derivat (<u>58</u>)
KB-3-1	Cervix- carcinom	0.11	0.35	0.3	0.18
U-937	Leukämie	0.0035	0.035	0.03	0.01
PC-3	Prostata-krebs	0.035	0.12	0.1	0.035
SK-OV-3	Ovarien- carcinom	0.03	0.1	0.05	0.035
A-498	Nierenkrebs	1.1	3	4	2
A-431	Hautkrebs	0.05	0.15	0.1	0.04
A-549	Lungenkrebs	0.1	0.4	0.3	0.11

Tabelle 2: Antiproliferative Aktivität der Ansamitocin-Derivate IC₅₀ [ng/mL].

Die 19-halogenierten 20-Desmethoxy-Derivate 42, 57 und 58 wurden im Vergleich zu AP-3 (27) auf ihren inhibitorischen Effekt auf das Zellwachstum von humanen Krebszelllinien getestet. Alle Derivate zeigten eine sehr starke Aktivität gegen Leukämie und Ovarienkrebszelllinien. Eine geringe Aktivität wurde gegen Nierenkrebszelllinien bestimmt, die von 58 zu 57 in gleichmäßigen Abständen weiter abnimmt. Offensichtlich spiegelt sich die Einführung verschiedener Substituenten ins Ansamitocin in dem Aktivitätsmuster gegen diese Zelllinie wieder.

Im Allgemeinen lässt sich das 19-Fluoro-20-desmethoxyansamitocin (<u>58</u>) als aktivstes Derivat aus dieser Reihe bestimmen, obwohl insgesamt die Aktivität aller Derivate enorm hoch ist, teilweise sogar gleich der Aktivität des AP-3 (<u>27</u>). Keines der Derivate <u>42</u>, <u>57</u> und <u>58</u> übertrifft jedoch die überaus starke Antitumoraktivität von <u>27</u>. Versuche zur Bestimmung der Nebenwirkungen scheiterten an unzureichenden Mengen der Derivate <u>42</u>, <u>57</u> und <u>58</u> für *in vivo* Tests (s. Kapitel 3.3.6), da sich *in vitro* Testsysteme zur Testung von Neurotoxizität zur Zeit noch in der Etablierungsphase befinden⁹⁰.

3.3.5 Diskussion der Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit konnte durch Fermentations- und Fütterungsoptimierung zum ersten Mal genügend Substanzmenge vom 20-Desmethoxyansamitocin (<u>42</u>) für analytische Zwecke und gezielte Bioaktivitätstests isoliert werden.

Es wurden zahlreiche, detaillierte Versuche zur Produktionssteigerung nach dem OSMAC-Ansatz (**O**ne **S**train **Ma**ny **C**ompounds)^{91,92} unternommen, die hier noch einmal aufgelistet seien:

- 1. Fermentation unter DMSO-Zusatz
- 2. Fermentation unter XAD-Zusatz
- 3. Wechsel der Schüttelbedingungen von 225 rpm auf 120 spm
- 4. Fermentation unter kombiniertem Zusatz von DMSO und XAD
- 5. Fermentation mit Zusatz von sterilem Pilzkulturfiltrat
- 6. Kultivierung in Kolben mit und ohne Schikane
- 7. Nährmedienwechsel
- 8. Kultivierung im Airliftfermenter
- 9. Wechsel der Kultivierungs- und Fütterungsbedingungen

In fast allen Fermentationen konnte zwar das Derivat <u>42</u> mittels HPLC-ESI-MS detektiert werden, jedoch waren die Mengen so gering, dass eine Isolierung nicht durchführbar war oder nach einer Isolierung fast keine Ausbeute (< 0.2 mg) erhalten wurde.

Durch vergleichende Fermentation wurde herausgefunden, dass der in Göttingen eingelagerte Stamm HGF073 seine Ansamitocin-produzierende Fähigkeit nahezu verloren hat, was die extrem schlechten Ausbeuten aus den Fermentationen ASM K-U erklärt. Die erprobte Fermentationsmethode im Airliftfermenter führte nicht zur gewünschten Produktionssteigerung und scheidet somit als verbesserte Kultivierungsbedingung für HGF073 aus.

Mit einer neuen Fermentationsmethode in einem speziell entwickelten Nährmedium konnte in Fermentation ASM X eine gute Ausbeute (5.1 mg) an 20-Desmethoxyansamitocin ($\underline{42}$) beobachtet werden. Umfassende chemische Analyse mittels HPLC, ESI-Massenspektrometrie, IR-, UV- und NMR-Spektroskopie zeigten das isolierte $\underline{42}$ als stabile Reinsubstanz.

Dadurch war es erstmals möglich, einige wichtige Fragen und Probleme bezüglich dieses Derivates zu klären. Dazu zählt z.B. die überaus schlechte Detektierbarkeit des Derivats, was eine extrem erschwerte Isolierungsarbeit bedeutete. Der Einsatz von HPLC-ESI-MS-Analysen war lange Zeit unumgänglich. Mit der isolierten Reinsubstanz von <u>42</u> konnte zum ersten Mal eine visualisierende Dünnschichtchromatographie erreicht werden (Abbildung 23).



Abbildung 23: 20-Desmethoxyansamitocin (<u>42</u>) (jeweils links) im Vergleich zu AP-3 (<u>27</u>) (jeweils rechts), von beiden Substanzen sind 5 µL einer Lösung der Konzentration von jeweils 1 mg/mL aufgetragen, linkes DC: 254 nm, rechtes DC: angefärbt mit dem MOPS-Sprühreagenz.

Die Abbildung 23 der Dünnschichtchromatogramme zeigt das 20-Desmethoxy-Derivat <u>42</u> im Vergleich zum AP-3 (<u>27</u>). Aufgetragen wurden ca. 5 μ L einer methanolischen Lösung (ca. 1 mg/mL) der jeweiligen Substanzen. Das linke Chromatogramm zeigt eine Aufnahme im UV-Licht bei 254 nm. Es ist zu sehen, dass sich <u>42</u> (links) ein wenig schwächer UV-löschend verhält als <u>27</u> (rechts). Das rechte Chromatogramm zeigt die beiden Ansamitocine durch Molybdatophosphorsäure visualisiert. Beide weisen mit diesem Sprühreagenz eine zwar verhältnismäßig schwache, aber dennoch deutlich zu erkennende grün-braune Zone auf.

Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die Detektion des Derivats $\underline{42}$ ungewöhnlich stark konzentrationsabhängig ist. Im Vergleich zu $\underline{27}$, welches strukturell sehr ähnlich und gut detektierbar ist, war dies ein unerwartetes Ergebnis. Die kleinste Kultivierungsmenge betrug 2 L. In einer Konzentration von 1 mg/mL ist das Derivat $\underline{42}$ gut zu detektieren. Auf das Volumen von 2 L umgerechnet, müsste also eine Menge von 2 g Ansamitocin ($\underline{42}$) gebildet werden, damit es sich direkt aus der Kulturbrühe gut optisch nachweisen lässt. Bei den geringen produzierten Mengen war es also nicht möglich, das Derivat per Dünnschichtchromatographie, im UV-Licht oder angefärbt, nachzuweisen. Auch der Einsatz von analytischer HPLC ist jetzt als Nachweismethode etabliert worden.

In Kooperation mit dem AK KIRSCHNING konnten durch Fütterungsexperimente insgesamt drei 19-halogenierte 20-Desmethoxyansamitocine ($\underline{42}$, $\underline{57}$ und $\underline{58}$) isoliert werden. Ein Vergleich der Produktionsmengen der Derivate mit der Produktionsmenge an AP-3 ($\underline{27}$) ergab, dass das 20-Desmethoxy-Derivat $\underline{42}$ im Vergleich zu $\underline{27}$ in einem Verhältnis von 1:8 gebildet wird. Das 19-Bromo-20-desmethoxy-Derivat $\underline{57}$ wird im Verhältnis 1:10 im Vergleich zu $\underline{27}$ gebildet. Über das 19-Fluoro-20-desmethoxy-Derivat $\underline{58}$ konnte bisher keine Aussage getroffen werden.

Des Weiteren wurde die Spezifität der PKS-Loading-domain des Ansamitocins untersucht, indem bei Fütterungsversuchen verschiedenste Vorläufer (3A4HBA (<u>46</u>), 3A4MBA (<u>47</u>), 3,4-DiABA (<u>48</u>), 3,5-DiABA (<u>49</u>) und 3ABA (<u>50</u>)) als Startereinheiten angeboten worden sind. Eine detaillierte Auswertung der Kultivierungsextrakte per HPLC-ESI-MS ergab jedoch keine neuen Derivate. In Anbetracht der vorher beschriebenen, schlechten Detektionsmöglichkeit, könnte es natürlich sein, dass neue, vielleicht in noch geringerem Umfang gebildete Derivate der durchgeführten, chemischen Analytik verschlossen geblieben sind.

Eine erstmals mögliche biologische Testung der 19-halogenierten 20-Desmethoxyansamitocine <u>42</u>, <u>57</u> und <u>58</u> ergab Aufschluss über deren Aktivität gegen verschiedene Tumorzelllinien. Alle Derivate zeigten eine außerordentliche Antitumoraktivität, vor allem gegenüber Leukämie, Ovarien- und Hautkrebszelllinien. Die erhoffte sehr gute Antitumoraktivität im Vergleich zum AP-3 (<u>27</u>) hat sich damit bestätigt. Über die Nebenwirkungen der Derivate <u>42</u>, <u>57</u> und <u>58</u> konnte aufgrund zu geringer Mengen für *in vivo* Tests bisher keine Aussage getroffen werden.

Die Familie der Ansamitocine ist und bleibt also auch weiterhin ein lohnenswertes Forschungsgebiet, auf dem es noch viel zu entdecken gibt.

3.3.6 Ausblick

Aufgrund der Schwierigkeiten mit der Produktivität von HGF073, konnte keine verlässliche Aussage über die Akzeptanz der neben 3A4ClBA (<u>33</u>) anderen gefütterten Aminobenzoesäuren als Vorläufer gemacht werden. Die erwiesene, geringer werdende Produktionsrate durch Einführung eines Halogensubstituenten in C-19-Position lässt Ähnliches für andere, stammfremde Startereinheiten vermuten. Eine Wiederholung der Fütterung der Vorläufer <u>46-50</u> wäre jedoch sehr reizvoll und könnte Aufschluss über die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse geben.

Da bisher auch nur eine Fermentation im Airliftfermenter vorgenommen wurde, ist eine Kultivierung in einem anderen Fermenter durchaus denkbar und als lohnenswertes Experiment anzusehen.

Es bleibt trotz der erreichten Produktionssteigerung eine weitere Optimierung der Fermentationsbedingungen von Interesse, um noch größere Mengen des 20-Desmethoxyansamitocins ($\underline{42}$) zu erhalten. Gleiches gilt auch für die anderen beiden 19halogenierten Derivate ($\underline{57}$ und $\underline{58}$), die im AK KIRSCHNING isoliert worden sind.

Der Grund hierfür ist die hochinteressante Testung auf deren Nebenwirkungen. Wie bereits im Kapitel 3.3.1 erwähnt, ist das Ziel dieser Derivatisierungsexperimente der Erhalt eines hochaktiven Ansamitocin-Analogons, welches jedoch geringere Nebenwirkungen aufweist, als das bisher getestete Ansamitocin P-3 (<u>27</u>). Das Hauptproblem der Neuro- und Gastrointestinaltoxizität soll möglichst minimiert werden, um den Ansamitocinen (<u>20</u>) den Einstieg als klinisch einsetzbare Therapeutika zu ermöglichen. Die hohe Antitumoraktivität der Derivate wurde im Rahmen dieser Arbeit bestätigt, nur fehlen die zugehörigen Angaben über die Nebenwirkungen. Die Testung toxischer Effekte auf das zentrale und periphere Nervensystem stellen eine recht schwierige Herausforderung dar und sind komplex in ihrer Durchführung. *In vitro* Testsysteme stecken zur Zeit noch in der Etablierungsphase⁹⁰. Daher müssen größere Substanzmengen (mindestens 100 mg) für *in vivo* Testungen zur Verfügung gestellt werden.

In Anbetracht der enormen Aktivität der hier betrachteten Ansamitocin-Derivate ist dies aber sicher eine lohnenswerte Herausforderung im Interesse der Wissenschaft und der gezielten pharmakologischen Forschung.

4 *Kitasatospora putterlickiae* F98-18: Pilzinduzierte Sekundärstoffbildung

4.1 Regulation der Sekundärstoffbildung durch Interaktion des Stammes F98-18 mit *Mucor* sp.

Der Stamm *Kitasatospora putterlickiae* F98-18 ist ein aus der Rhizosphäre der Pflanze *Putterlickia verrucosa* isolierter Streptomycet^{93,94}. Als Rhizosphäre wird die unmittelbare Umgebung um eine Pflanzenwurzel bezeichnet. Die Untersuchung des Erdreichs in diesem Bezirk ist von besonderem Interesse, da hier eine Interaktion von im Boden befindlichen Mikroorganismen mit der Pflanze stattfindet. Durch den Austausch von Nährstoffen und anderen Substanzen ist die ökologische Beschaffenheit dieses Bodenbereiches um die Pflanzenwurzeln einzigartig und ein ausgeprägt genutzter Lebensraum für Mikroorganismen aller Art.

P. verrucosa ist ein südafrikanisches, buschartiges Gewächs, artverwandt zur Pflanzenfamilie der *Celastraceae*, die zum Großteil in den Tropen zu finden sind. Aus einigen Pflanzen der *Celastraceae*-Familie (z.B. *Maytenus ovatus, Maytenus serrata* und *Maytenus buchananii*) wie auch aus *P. verrucosa* wurde das Maytansin (<u>21</u>) isoliert⁴¹. Möglicherweise zählt also der Stamm F98-18 ebenfalls zu den Maytansin- oder Ansamitocinproduzenten oder liefert Biosynthese-Vorläufer.

In vorangegangenen Arbeiten an der Universität Bonn im AK LEISTNER zeigte der Stamm im Biotest gegen den Pilz *Mucor* sp. starke Wachstumshemmung. Vergleichend wurde der Ansamitocinproduzent *Actinosynnema pretiosum* auf seine Aktivität gegen den Pilz getestet. In Abbildung 24 ist das Ergebnis dieses Tests dargestellt. Die Agarplatte zeigt ganz deutlich das gehemmte Wachstum des Pilzes *Mucor* sp. in der Region von F98-18 (1) und *A. pretiosum* (2). Der Vergleich des Effekts der beiden Bakterien untereinander zeigt ganz deutlich, dass F98-18 eine größere Hemmwirkung auf das Wachstum des *Mucor* sp. ausübt als *A. pretiosum*⁹³.



Abbildung 24: Interaktion zwischen Bakterien und Pilz: 1: K. putterlickiae F98-18, 2: Actinosynnema pretiosum, 3: Mucor sp., Quelle: AK LEISTNER.

Aus diesen Erkenntnissen entstand im AK LEISTNER die Idee zur Co-Fermentation des Pilzes *Mucor* sp. zur Kulturbrühe von F98-18. Es wurde der Gedanke verfolgt, der Bakterienstamm reagiere durch die Anwesenheit des Pilzes mit Abwehr und es kommt eventuell zur induzierten Produktion neuer Sekundärmetaboliten.

Um diese Vermutung zu überprüfen wurde dem Kulturfiltrat von F98-18 10 Stunden nach Animpfen etwas Sterilfiltrat einer frischen Pilzkultur hinzugefügt. Nach Ethylacetat-Extraktion des insgesamt 55 Stunden alten Kulturfiltrats zeigte die dünnschichtchromatographische Analyse einen zusätzlich gebildeten Metaboliten bei einem R_{f} -Wert von 0.42 (Chloroform/Methanol 95:5). Diese pilzinduzierte Substanz zeichnete sich durch intensive gelbe Färbung mit Ehrlichs Reagenz aus, d.h. sie enthält sehr wahrscheinlich eine Aminfunktion.

Diese neu gebildete Substanz erscheint im Zusammenhang mit der Ansamitocin-Biosynthese von besonderer Bedeutung, da alle Ansamitocine ($\underline{20}$) über den gemeinsamen natürlichen Vorläufer 3-Amino-5-hydroxybenzoesäure (AHBA) ($\underline{29}$) gebildet werden. Da der Stamm F98-18 aus der gleichen Pflanze isoliert wurde wie die bereits genannten Ansamitocinbildner, könnte es sich bei der neu gebildeten Substanz um $\underline{29}$ oder im Idealfall um eine fortgeschrittene Vorstufe des Ansamitocins in Form eines Di- ($\underline{34}$), Tri- ($\underline{31}$) oder Tetraketids ($\underline{32}$) handeln (Abbildung 25).



Abbildung 25: Das Di- (34), Tri- (31) und Tetraketid (32) aus der Ansamitocin-Biosynthese.

Ziel der hier beschriebenen Arbeiten war es daher, die Bildung der gelb anfärbenden Substanz zu reproduzieren und diese nach Möglichkeit zu isolieren und zu charakterisieren. Dazu wurde uns von E. LEISTNER (Universität Bonn) der zu den Streptomyceten gehörende Stamm *K. putterlickiae* F98-18 zusammen mit dem Pilz *Mucor* sp. überlassen⁹⁵.

4.2 Fermentationen des Stammes F98-18 und Mucor sp.

Die Kultivierung der Vorkulturen von F98-18 erfolgte parallel zur Anzucht des Pilzes *Mucor* sp. für insgesamt 72 Stunden. Alle Kultivierungen des Stammes F98-18 und des *Mucor* sp. wurden in Schüttelkolben mit Schikane bei 28°C und 180 rpm durchgeführt. Die Ernte der F98-18 Hauptkulturen sollte nach insgesamt 55 Stunden Kultivierung stattfinden, nachdem das *Mucor* sp.-Sterilfiltrat nach 10 Stunden Inkubation zugefügt worden ist.

Fermentation FI

Die Ernte der Hauptkulturen erfolgte nach "Bonner Bedingungen" nach 55 Stunden Gesamtkultivierungszeit. In der ersten Kultivierung in Göttingen sollte zunächst eine Prüfung der Zeitabhängigkeit der Metabolitenbildung erfolgen. Die Ernte der Hauptkulturen erfolgte nach 78 Stunden, um festzustellen, ob die gelb anfärbbare Substanz ein früher oder ein später Metabolit ist. Handelte es sich um einen späten Metaboliten, könnte eine Ausbeutesteigerung der gelb anfärbbaren Substanz durch eine längere Kultivierung erreicht werden.

Die dünnschichtchromatographische Analyse des Ethylacetat-Extrakts vom Kulturfiltrat zeigte nach Visualisierung mit Ehrlichs Reagenz keine gelb färbende Zone.

Offensichtlich wird die Substanz, die sich hinter der gelb anfärbbaren Zone verbirgt, relativ schnell nach ihrer Bildung wieder metabolisiert. Handelt es sich z.B. um einen Vorläufer der Ansamitocin-Biosynthese (Diketid o.ä.), könnte es sein, dass dieser schnell weiter zu einem Ansamitocin-Derivat umgesetzt wird und nur von begrenzter Dauer als freie Substanz im Kulturfiltrat zur Verfügung steht. Vielleicht handelt es sich auch um einen anderen Vorläufer, der wiederum in andere Biosynthesemechanismen einfließt.

Die Ernte sollte aus diesem Grund also möglichst genau nach den "Bonner Bedingungen" von 55 Stunden Kultivierung erfolgen.

Fermentation FII

Nachdem sich aus Fermentation FI ein kurzes Zeitfenster für das Vorhandensein der gelb anfärbbaren Verbindung im Kulturfiltrat ergeben hat, sollte bei dieser Fermentation eine strenge Einhaltung der Kultivierungszeit erfolgen.

Der Pilz *Mucor* sp. zeigte bei seiner Kultivierung jedoch ein schlechteres Wachstum als zuvor beobachtet, so dass den F98-18 Kulturen letztendlich nur ein stark verdünntes Sterilfiltrat des Pilzes zugesetzt werden konnte. Das nach Extraktion des Kulturfiltrats angefertigte Dünnschichtchromatogramm bestätigte die Vermutung, dass das Pilzsterilfiltrat offenbar nicht ausreichend gewesen ist, um eine Sekundärstoffbildung bei F98-18 zu induzieren.

Es konnte also davon ausgegangen werden, dass ein gutes Pilzwachstum nötig war, um den Stamm F98-18 zur Produktion der gesuchten, gelb anfärbbaren Substanz zu stimulieren.

Fermentation FIII

Um ein besseres Wachstum des Pilzes Mucor sp. in Flüssigkultur zu erreichen, wurden die Kulturen ab dieser Fermentation nur noch mit einer maximal drei Tage alten Agarplatte angeimpft. Zur Kontrolle erfolgte parallel die einzelne Fermentation des Stammes F98-18 bzw. des Mucor und des nicht inokulierten Nährmediums. Mittels sp. dünnschichtchromatographischer Analyse des Kulturfiltrat-Extrakts konnte im Gegensatz zu den Bonner Kultivierungen nach dem Anfärben mit Ehrlichs Reagenz jedoch nur eine sehr schwach gelb färbende Substanz detektiert werden. Die Ursache für die offensichtlich sehr schwache Bildung der gesuchten Verbindung bleibt unklar. Die Ernte erfolgte exakt nach 55 Stunden Kultivierung, der Pilz wies bei Anzucht ein normales Wachstum auf und die Kulturen selbst zeigten keine Anzeichen einer Fremdinfektion.

Um genügend Substanz der gelb färbenden Verbindung in reiner Form für die Analyse und die Strukturaufklärung zu erhalten, erfolgte eine weitere Fermentation.

Fermentation FIV

Die Fermentation FIV wurde analog zu Fermentation FIII durchgeführt. Die Kontrolle bildeten wieder F98-18, *Mucor* sp. und Nährmedium, die jeweils einzeln kultiviert wurden. Nach Ethylacetatextraktion der jeweiligen Kulturfiltrate von F98-18 + Mucor-Zusatz, F98-18, *Mucor* sp. und Nährmedium wurde wieder ein Dünnschichtchromatogramm angefertigt, in Chloroform/Methanol 95:5 entwickelt und mit Ehrlichs Reagenz angefärbt (Abbildung 26).



Abbildung 26: DC-Analyse der Extrakte aus Fermentation FIV. Von links nach rechts sind folgende Extrakte aufgetragen: A) Kulturfiltrat von F98-18 + Mucor-Zusatz, B) F98-18 Kontrolle ohne Pilzzusatz, C) Mucor, D) Nährmedium.

Abbildung 26 zeigt das angefärbte Dünnschichtchromatogramm der einzelnen Extrakte.

Im Kulturfiltrat-Extrakt von F98-18 + Mucor-Zusatz ist eine dunkelgelb anfärbende Zone (UV-löschend bei 254 nm) mit einem R_f -Wert von 0.42 zu erkennen (1). Bei genauerer Betrachtung fällt eine leicht gelbe Zone mit einem R_f -Wert von 0.38 (keine erkennbare UV-Aktivität) auch im Extrakt von F98-18 ohne Pilzzusatz auf (2). Alle Extrakte lassen im Vergleich erkennen, dass durch ungleichmäßiges Entwickeln des Chromatogramms ein verzögertes Laufverhalten der Substanzen entstanden ist. Gut zu sehen ist dieses Phänomen an der dunkelvioletten Zone bei $R_f = 0.23$ (3). Bei den beiden gelben Zonen (1) und (2) scheint es sich demnach um dieselbe Substanz zu handeln. Da nur eine leichte Gelbfärbung und keine UV-Löschung bei 254 nm zu beobachten ist, wird diese Substanz offenbar auch von F98-18 alleine produziert, wenn auch in sehr geringem Ausmaß. Die Pilzzugabe hat

hierbei einen stark produktionssteigernden Effekt auf die Bildung des dunkelgelb anfärbbaren Metaboliten (1) durch den Stamm F98-18.

Eine weitere leicht gelb anfärbende Zone (4) ist direkt unterhalb der dunkelgelben Zone mit einem R_f -Wert von 0.38 im Extrakt der Reinkultur von F98-18 als auch bei Zugabe von *Mucor* sp. zu finden (UV-löschend 254 nm und fluoreszierend bei 366 nm).

Fermentation FV

Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse von Fermentation FIV wurde eine weitere Fermentation angesetzt. Die Kultivierungsbedingungen beliefen sich auf dieselben von Fermentation FIV, nur wurde die Größe des Kultivierungsansatzes verdoppelt (4 L).



Abbildung 27: DC-Analyse des Kulturfiltrat-Extrakts aus Fermentation FV. Von links nach rechts: A) Extrakt von FV, B) Anthranilsäure (<u>59</u>).

Abbildung 27 zeigt die dünnschichtchromatographische Analyse des Kulturfiltrat-Extrakts von F98-18 + Mucor (Fermentation FV). Das Chromatogramm wurde wieder in Chloroform/Methanol 95:5 entwickelt und mit Ehrlichs Reagenz angefärbt. Vergleichend wurde Anthranilsäure (<u>59</u>) (5) aufgetragen. Der natürliche Ansamitocin-Vorläufer AHBA (<u>29</u>) wurde ebenfalls als Vergleich mit chromatographiert (nicht in der Abbildung aufgeführt), da es auch eine niedermolekulare Benzoesäure mit Aminfunktion darstellt. Sie zeigte jedoch ein stark polareres Laufverhalten als die gelb anfärbbare Substanz und konnte somit als mögliche Zielverbindung ausgeschlossen werden.

<u>59</u> ist bekannt für ihre intensive UV-Löschung und -Fluoreszenz sowie für charakteristisch dunkelgelbes Anfärbeverhalten mit Ehrlichs Reagenz. Sie erfüllt im Shikimisäure-Biosyntheseweg den Zweck als Vorläufer von Tryptophan⁹⁶ und ist ein in Streptomyceten häufig gebildeter Metabolit mit antifungischer Wirkung⁹⁷.



Abbildung 28: Anthranilsäure (59), ein aus Streptomyceten bekannter Metabolit.

Diese Indizien führten zu der Annahme, es könnte sich bei der gelb anfärbbaren Substanz um **59** handeln. Vergleichende Chromatographie sollte Aufschluss über diese Annahme geben. Im Chromatogramm der Fermentation FV ist wieder eine gelbe Zone (6) zu finden, die UV-löschend und fluoreszierend ist. Der unterschiedliche R_f -Wert im Vergleich zu Anthranilsäure legt die Vermutung nahe, dass es sich bei der gelben Zone (5) nicht um jene handelt, sondern um eine andere Substanz. Allerdings lässt sich nicht das gleiche Muster an gelben Zonen wie im Rohprodukt aus Fermentation FIV erkennen, bei welcher die Zone (4) unterhalb einer nur UV-löschenden Zone (1) liegt. Dies könnte an der größeren Menge an Rohprodukt liegen, da der Fermentationsansatz von FV im zweifachen Volumen von Fermentation FIV durchgeführt wurde.

Zur Isolierung und Analyse der gelben Verbindung wurden die Kulturfiltrat-Extrakte der Fermentationen FIV und FV weiter bearbeitet. Ein ständiger Vergleich mit dem Verhalten von <u>59</u> wurde weiter verfolgt, da das markante dunkelgelbe Anfärbeverhalten des pilzinduzierten Metaboliten auf eine derartige Struktur hindeutete.

4.3 Isolierungsstrategie und chemische Analytik

Die Untersuchung der Rohextrakte der Fermentationen FIV und FV per HPLC-ESI-MS lieferten keine eindeutigen Hinweise für das Vorhandensein von <u>59</u>. Die vergleichende HPLC-ESI-MS-Analyse von reiner Anthranilsäure (<u>59</u>) zeigte, dass diese Methode für deren Nachweis aufgrund nicht eindeutiger Massenzuordnung nicht optimal geeignet war. Auch eine Analyse per EI-MS lieferte keine eindeutigen Ergebnisse, so dass eine Aufreinigung der Extrakte nötig war.

Bearbeitung des Kulturfiltrat-Extrakts von Fermentation FIV

Auf der Suche nach dem geeigneten Lösungsmittelverhältnis von Chloroform/Methanol für die aufreinigende Kieselgelchromatographie wurden mehrere Dünnschichtchromatogramme angefertigt. Auffällig war dabei, dass die einstige dunkelgelbe, UV-löschende Zone ($R_f = 0.42$) (1) (Abbildung 26) nicht mehr zu erkennen war. Es existierte aber eine dunkelgelbe, UV-löschende und fluoreszierende Zone ($R_f = 0.38$) (4), die einen ähnlichen R_{f^-} Wert wie Anthranilsäure aufwies. Im folgenden wurde sich auf die Isolierung dieser gelb färbenden Substanz konzentriert.

Eine Kieselgelsäulenchromatographie (Chloroform/Methanol 97:3) des Kulturfiltrat-Extrakts ergab fünf Fraktionen (FIV-1 bis FIV-5). Die Fraktionen FIV-4 und -5 enthielten die gelb anfärbbare Zone ($R_f = 0.38$) (4). In Fraktion FIV-4 zeigte sich zusätzlich mit einem R_f -Wert von 0.2 eine weitere, leicht gelb färbende, UV-löschende und fluoreszierende Zone.

Vermutlich handelte es sich um Zersetzung einer Substanz. Aus diesem Grund, wurde ein 2dimensionales Dünnschichtchromatogramm von Fraktion FIV-4 angefertigt (Abbildung 29).


2. Laufrichtung: Tag 2, 8 Uhr

Abbildung 29: 2-dimensionales DC von FIV-4: 1. Laufrichtung: vertikal, 2. Laufrichtung: horizontal (13 Stunden nach 1. Entwicklung)

Entwicklung des 2-dimensionalen Kieselgel-DCs erfolgte nach Auftragen der Fraktion FIV-4 in Chloroform/Methanol 95:5. Unter ultraviolettem Licht wurden die vorhandenen aktiven Zonen mit Bleistift markiert. Es sind die zwei UV-löschenden und fluoreszierenden Zonen B und C ($R_f = 0.2$ und 0.38) sowie eine Startzone A zu sehen. Das entwickelte Chromatogramm lagerte über Nacht im Dunkeln bei Raumtemperatur. Nach 13 Stunden wurde das Chromatogramm im Uhrzeigersinn um 90° gedreht, ein zweites Mal in Chloroform/Methanol 95:5 entwickelt und mit Ehrlichs Reagenz gefärbt. Es wurde festgestellt, dass sowohl aus der Startzone, als auch aus der Zone mit einem R_f -Wert von 0.2 die gelbfärbende Substanz mit dem R_f -Wert von 0.38 entsteht. Bei der leicht gelben Zone mit einem R_f -Wert von 0.2 handelt es sich also offenbar um ein Zwischenprodukt, das möglicherweise durch oxidativen Zerfall nach einer gewissen Zeit zum Endprodukt mit R_f von 0.38 umgewandelt wird.

Anthranilsäure (<u>59</u>) zeigte in vergleichender Analyse zu FIV-4 den gleichen R_f -Wert von 0.38 wie die gelbe Zone in FIV-4 und FIV-5.

Zur weiteren Analyse wurden die beiden Fraktionen FIV-4 und -5 im Vergleich mit <u>59</u> per HPLC-ESI-MS analysiert. <u>59</u> ist per ESI praktisch nicht zu detektieren, durch die Kopplung der ESI mit einem DAD-UV-Detektor, konnte ihr aber eine Retentionszeit von ca. 6.3 min (HPLC B, Säule A, Programm C (s. Kapitel 1.2)) zugeordnet werden. Die beiden Fraktionen FIV-4 und -5 zeigten unter gleichen Bedingungen bei 6.2 min im UV-Chromatogramm auch ein Signal, das jedoch aufgrund schlechter Ionisierbarkeit durch die ESI keine interpretierbare Masse ergab. Die Vermutung, dass es sich bei dem gelb anfärbbaren Metaboliten um Anthranilsäure (<u>59</u>) handelte, wurde durch diese Analyse bestärkt.

Zur weiteren Analyse wurde Fraktion FIV-4 nochmals per Säulenchromatographie gereinigt. Die zweite Chromatographie an Kieselgel (Chloroform/Methanol 95:5) konnte zwar eine Antrennung der gelben Zonen erreichen, jedoch blieb neben der gesuchten gelb färbenden Zone ($R_f = 0.38$) weiterhin die leicht gelb färbende Zone mit einem R_f -Wert von 0.2 erhalten. Eine Analyse der neuen Fraktion FIV-42 (0.1 mg) war durch die sehr geringe Masse nur bedingt möglich. Durch die schlechte Detektion per ESI-MS erfolgte nun eine Massenbestimmung mittels EI der Fraktion FIV-42 sowie von Anthranilsäure als Referenz. Anthranilsäure zeigt das typische Peakmuster: m/z = 137 [M]⁺, 119 [M-H₂O]⁺, 92 [M-COOH]⁺. Dieses Peakmuster konnte in Fraktion FIV-42 ebenfalls gefunden werden. Ein zusätzliches Ion bei m/z = 107 deutete jedoch auf die Anwesenheit einer zweiten Substanz hin, bei welcher es sich möglicherweise um die Zone mit dem R_f -Wert von 0.2 handeln könnte. Um sicher zu gehen, dass es sich bei der isolierten Substanz um Anthranilsäure handelte, wurde ein ¹H-NMR aufgenommen. Durch die sehr geringe Masse der Fraktion war dies aber leider nur bedingt möglich, d.h. die Signale im Spektrum konnten aufgrund ihrer geringen Intensität nicht zweifelsfrei zugeordnet werden.

Bearbeitung des Kulturfiltrat-Extrakts von Fermentation FV

Die Aufreinigung des Extrakts von Fermentation FV sollte Aufschluss über die gesuchte, gelb anfärbende Substanz geben. Eine NMR-Analyse sollte den Beweis für das Vorhandensein von Anthranilsäure (<u>59</u>) oder einem instabilen Analogon liefern. Jedoch ließen die unterschiedlichen R_{f} -Werte im DC (Abbildung 27) immer noch am Vorhandensein von <u>59</u> zweifeln.

Die Aufreinigung des Kulturfiltrat-Extrakts erfolgte analog zur Bearbeitung des Extrakts von FIV. Eine Chromatographie an Kieselgel (Chloroform/Methanol 97:3) führte zu 10

Fraktionen FV-1-FV-10. Die Fraktionen FV-9 (17 mg) und -10 (12 mg) enthielten die gelb färbenden Substanzen ($R_f = 0.38$) sowie eine zusätzliche leicht gelb färbende Zone mit einem R_f -Wert von 0.35, die auch UV-Löschung und Fluoreszenz zeigte. Eine sehr polare, gelb färbende Zone war ebenfalls wieder vorhanden. Zum Vergleich mit den Ergebnissen aus der Analyse der Fraktionen FIV-4 und -5 erfolgte von den Fraktionen FV-9 und -10 eine HPLC-ESI-MS-Analyse (HPLC B, Säule A, Programm C (s. Kapitel 1.2)), in der ebenfalls ein Signal im UV-Chromatogramm bei ca. 6.2 min entdeckt werden konnte, das kein aussagekräftiges ESI-Massenspektrum lieferte. Allerdings war das UV-Signal trotz gleich eingestellter Konzentration der Fraktionen relativ klein im Vergleich zur Messung der Fraktionen FIV-4 und -5.

Für die weitere Analytik wurde das Verhalten der Metaboliten aus den Fraktionen FV-9 und -10 auf reversed-phase Kieselgel (RP-Kieselgel) untersucht. Dazu wurden mehrere Dünnschichtchromatogramme auf der Suche nach einem geeigneten Lösungsmittelgemisch angefertigt, wobei Anthranilsäure (**59**) als Vergleich diente. Bei diesen Analysen an RP-Kieselgel zeigten sich mehrere gelbe Zonen nach der Visualisierung mit Ehrlichs Reagenz. Die gesuchte Substanz war leicht anhand der extrem blauen Fluoreszenz bei 366 nm zu identifizieren.

Das Lösungsmittelgemisch Aceton/Wasser 1:1 zeigte optimal trennende Eigenschaften. Auch ließ die DC-Analyse wieder hoffen, dass es sich bei dem gesuchten Metaboliten eventuell doch nicht um <u>59</u> handelte, da das RP-DC (Aceton/Wasser 1:1) unterschiedliches Laufverhalten der Fraktionen FV-9 und -10 ($R_f = 0.46$) im Vergleich zu <u>59</u> ($R_f = 0.56$) zeigte. Es folgte Reinigung der vereinten Fraktionen FV-9 und -10 über die RP-Fertigsäule Lobar[®] B (Aceton/Wasser 1:1), aus der weitere vier Fraktionen hervor gingen: FV9/10-1 bis FV9/10-4. Alle vier Fraktionen wiesen eine gelbe Zone mit dem gleichen R_f -Wert im Vergleich zu Anthranilsäure (<u>59</u>) auf ($R_f = 0.38$ mit Chloroform/Methanol 95:5). Des Weiteren war in jeder Fraktion wieder eine gelb färbende, sehr polare Zone zu sehen. Alle Fraktionen dieser Aufreinigung wurden massenspektrometrisch untersucht (ESI und EI). Die ESI-Messung brachte keine Ergebnisse. Aus den EI-Messungen konnte das typische Peakmuster von Anthranilsäure (<u>59</u>) in den Fraktionen FV9/10-2 und -3 entnommen werden, jedoch fanden sich daneben noch weitere Massenpeaks. In Fraktion FV9/10-2 waren dies die Peaks m/z = 136 und 65, in Fraktion FV9/10-3 waren es m/z = 148, 147, 77, 65, 51 und 43. Für eine

¹H- NMR-Analyse konnten zum Abschluss nur die Fraktionen FV9/10-2 und -4 verwendet werden, die Mengen der anderen Fraktionen reichten hierfür nicht aus.

Ein Vergleich mit den genauen NMR-Literaturdaten von Anthranilsäure ergab keine entsprechenden Signale in Fraktion FV9/10-4⁹⁸. Durch die geringe Menge von Fraktion FV9/10-2 stand nur ein qualitativ schlechtes ¹H-NMR-Spektrum zur Verfügung. Aus diesem konnten zwar entsprechende Signale passend zu den Literaturdaten von <u>59</u> gewonnen werden, jedoch existierten weitere Signale im aromatischen Bereich, die sich nicht zuordnen ließen. Es zeigte sich ein weiteres Dublett vom Dublett bei $\delta = 8.02$ ppm sowie zwei Dubletts vom Dublett vom Dublett bei $\delta = 7.44$ und 7.60 ppm. Möglicherweise hat man es hier mit einer Mischung von Aromaten zu tun, die nicht nur ortho-, sondern auch meta-Anordnung der Substituenten zeigen. Eine weitere Klärung der Herkunft dieser Signale durch Messung von 2-dimensionalen NMR-Experimenten konnte aufgrund der zu geringen Menge nicht erfolgen.

4.4 Chemische Derivatisierung und Analytik

Um das Vorhandensein von Anthranilsäure oder interessanten Ansamitocin-Vorläufern bzw. Derivaten endgültig zu klären, erfolgte chemische Derivatisierung der Fraktion FIV-5 in Form von Acetylierung und Methylierung (Abbildung 30). Ziel sollte die Herstellung von Derivaten der eventuell vorhandenen Anthranilsäure (**59**) sein, um diese durch verändertes analytisches Verhalten von möglichen anderen Substanzen abzugrenzen. Somit war an eine leichtere Identifizierung bzw. zweifelsfreies Ausschließen von **59** in der Fraktion FIV-5 gedacht.



Abbildung 30: Chemische Derivatisierung von Fraktion FIV-5: Mögliche Produkte bei Vorhandensein von Anthranilsäure (<u>59</u>).

Für die Derivatisierungsarbeiten wurde die Fraktion FIV-5 (4.8 mg) in zwei ca. gleiche Portionen aufgeteilt. Die eine wurde zur Acetylierung mit Acetanhydrid/Pyridin umgesetzt, mit der anderen Portion erfolgte eine Methylierung mit Diazomethan⁹⁹. Zum Vergleich wurden dieselben Reaktionen mit reiner Anthranilsäure (<u>59</u>) durchgeführt. Nach beendeter Reaktion erfolgte zuerst eine Kieselgel-DC-Analyse (Chloroform/Methanol 9:1) der jeweiligen Edukte und Produkte.

Die Methylierung von <u>59</u> zum Anthranilsäuremethylester (<u>60</u>) führte zu einem einheitlichen Produkt mit R_f 0.88. Die Analysen per HPLC-ESI-MS (gefundene Masse im positiven Modus: $m/z = 152 [M+H]^+$, RT = 11.5 min) und ¹H-NMR bestätigten die gelungene Umsetzung zum entsprechenden Methyl-Ester <u>60</u>. Neben den Signalen der aromatischen Protonen fand sich eine zusätzliche CH₃-Gruppe bei 3.81 ppm.

Im Vergleich zur Referenzsubstanz führte Fraktion FIV-5 zu einem zusätzlichen Produkt mit einem R_f-Wert von 0.93. Eine folgende Analyse per HPLC-ESI-MS (HPLC B, Säule A, Programm C (s. Kapitel 1.2)) ergab im positiven Modus bei einer Retentionszeit von ca. 11.5 min die Masse m/z = 152 $[M+H]^+$, entsprechend der methylierten Anthranilsäure <u>60</u>. Das daraufhin gemessene ¹H-NMR-Spektrum zeigte jedoch weder Anthranilsäure- noch andere Signale im aromatischen Bereich.

Die Acetylierung der Anthranilsäure zur 2-Acetylaminobenzoesäure (<u>61</u>) verlief laut DC-Analyse erfolgreich zu einem Produkt ($R_f = 0.83$). Die HPLC-ESI-MS-Analyse zeigte im negativen und positiven Modus die entsprechende Masse des Produkts mit m/z = 178 $[M-H]^$ und 180 $[M+H]^+$ bei einer Retentionszeit von ca. 9.8 min. Das ¹H-NMR-Spektrum bestätigte die Bildung der 2-Acetylaminobenzoesäure (<u>61</u>). Neben den aromatischen Protonen tauchte eine zusätzliche CH₃-Gruppe bei 2.15 ppm im Spektrum auf.

Das acetylierte Produkt der Fraktion FIV-5 zeigte im Dünnschichtchromatogramm drei Hauptzonen im unpolaren Bereich mit den jeweiligen R_f -Werten von 0.80, 0.85 und 0.90. Durch HPLC-ESI-MS-Analyse konnte die Masse der acetylierten Anthranilsäure <u>61</u> im negativen und positiven Modus mit m/z = 178 [M-H]⁻ und 180 [M+H]⁺ bei RT = 9.9 min detektiert werden. Des Weiteren findet sich eine Masse entsprechend der zweifach acetylierten Anthranilsäure (<u>62</u>) mit m/z = 222 [M+H]⁺ (RT = 9.1 min).



Zur endgültigen Überprüfung auf den Anthranilsäuregehalt wurde die acetylierte Fraktion mittels ¹H-NMR analysiert. Auch hier zeigten sich keinerlei aromatische Anthranilsäuresignale.

Zum Abschluss wurde noch einmal Fraktion FIV-42 im Vergleich zu Anthranilsäure (<u>59</u>) dünnschichtchromatographisch analysiert. Hintergrund dafür war die pH-Abhängigkeit des Laufverhaltens der Substanzen während der Dünnschichtchromatographie. Über die DC-Analyse der Fraktion FIV-42 und <u>59</u> bei verschiedenen pH-Werten sollte die Aussagekraft der DCs erhöht werden. Dazu wurden Portionen von <u>59</u> und der Fraktion FIV-42 in Methanol gelöst (1 mg/mL) und mit Pufferlösungen bei pH 4 bzw. pH 9 versetzt. Die Dünnschichtchromatogramme der gepufferten und unbehandelten Proben wurden in Chloroform/Methanol 95:5 entwickelt und mit Ehrlichs Reagenz gefärbt. Das Laufverhalten war bei allen aufgetragenen Proben gleich, ebenso zeigten alle dieselbe UV-Löschung und Fluoreszenz.

4.5 Diskussion der Ergebnisse

Im Rahmen dieses Projektes konnte eine mit Ehrlichs Reagenz gelb anfärbende Substanz isoliert werden. Es ergaben sich jedoch überraschend sehr unterschiedliche Schwierigkeiten bei diesen Arbeiten. Bei der isolierten Substanz handelte es sich nicht um die dunkelgelb anfärbbare Substanz mit UV-Löschung (1) (Abbildung 26), wofür mehrere Gründe zu nennen sind.

Zunächst einmal konnte die Produktion der gelbfärbenden Substanz durch die Fermentationen nicht reproduzierbar erreicht werden. Nach Fermentation FIV zeigte sich eine große, mit Ehrlichs Reagenz dunkelgelb anfärbende Zone mit einem R_{f} -Wert von 0.42 (KG, Chloroform/Methanol 95:5), die bei 254 nm UV-löschend wirkte. Eine zweite, leicht gelbfärbende Substanz fand sich bei einem R_{f} -Wert von 0.38 (KG, Chloroform/Methanol 95:5) und UV-Löschung sowie Fluoreszenz.

Der Kulturfiltrat-Extrakt von Fermentation FV zeigte ein anderes Metabolitenspektrum als der Extrakt von FIV. Es war dünnschichtchromatographisch zwar auch eine gelbe Zone zu finden, allerdings nur bei einem R_f-Wert von 0.36 mit UV-löschenden und -fluoreszierenden Eigenschaften. Durch das unterschiedliche Muster an gebildeten Metaboliten im Vergleich zum Extrakt von FIV wurde angenommen, dass eventuell mehrere Substanzen mit einem R_f-Wert größer als 0.36 übereinander liegen. Die Substanz, die in FIV dunkelgelb anfärbt und nur UV-Löschung zeigt (R_f = 0.42, Chloroform/Methanol 95:5), könnte im Extrakt FV unter Umständen überlagert und zusätzlich vielleicht in geringerer Ausbeute als in Fermentation FIV gebildet worden sein.

Die Isolierungsarbeiten stellten sich als größere Herausforderung dar, als angenommen. Zwar konnten die anderen gebildeten Metaboliten von der gelb färbenden Substanz recht gut mittels Kieselgelsäulenchromatographie abgetrennt werden, aber nach der Aufreinigung zeigten sich zusammen mit der gelb färbenden Zone neue, leicht gelb färbende Zonen ($R_f = 0.36$ und 0.2). Auch eine gelb färbende, sehr polare Zone blieb erhalten. Die Vermutung auf Zersetzung oder Umwandlung bestätigte sich schließlich durch Anfertigung eines 2-dimensionalen Dünnschichtchromatogramms. Dabei wurde festgestellt, dass sich die Substanz mit dem R_f -Wert 0.2 sowie die gelb färbende, polare Zone in den gelb färbenden Metaboliten mit dem R_f -Wert von 0.38 umwandelte.

Es gelang die Isolierung einer gelb anfärbbaren Substanz, die UV-Löschung und Fluoreszenz zeigte. Versuche zur Aufklärung dieser Substanz wurden von verschiedenen problematischen Faktoren begleitet. Zum einen konnten zuerst nur Mischfraktionen von zwei bis drei gelb färbenden Substanzen analysiert werden, da die Zersetzung eine Isolierung erschwerte. Zum anderen war für problemklärende Analysen meist zu wenig Substanz vorhanden. Es gab durch Vergleich mit reiner Anthranilsäure (<u>59</u>) einige analytische Anhaltspunkte dafür, dass der gelb färbende Metabolit selbst <u>59</u> ist, jedoch wurden diese durch weitere Analysen auch gleichzeitig wieder in Frage gestellt.

Die chemische Derivatisierung gab z.B. recht eindeutige Hinweise auf das Vorhandensein von <u>59</u>, jedoch wurden diese Fakten durch NMR-Analyse nicht bestätigt.

Abschließend wurde die isolierte, gelb färbende Substanz dennoch als Anthranilsäure (<u>59</u>) identifiziert, die eventuell das Produkt einer Zersetzungs- oder Umwandlungsreaktion bildet. Die bei der ersten DC-Analyse dunkelgelb färbende Substanz mit einem R_f -Wert von 0.42 ist als solches nicht zu isolieren gewesen. Bereits ein Tag nach der ersten angefertigten Dünnschichtchromatographie konnte sie beim Laufmitteltest in erneuten DC-Analysen nicht mehr entdeckt werden. Auch in der nächsten Fermentation FV ergab sich solch eine dunkelgelbe Zone in der Form nicht mehr. Die gelb anfärbbare Substanz, die aus dem Extrakt isolierbar war, wurde analysiert und ergab Anthranilsäure (<u>59</u>).

Der Metabolit bei $R_f = 0.42$ ist offenbar so instabil, dass es nicht möglich war, diesen als Reinsubstanz zu gewinnen. Somit war die eigentliche Aufgabe, diesen zu isolieren und zu analysieren derzeit nicht möglich.

4.6 Ausblick

Anthranilsäure (59) ist nur einer von mindestens zwei gelb färbenden Metaboliten, dessen Bildung durch Pilzzugabe zum Stamm F98-18 induziert wird. Durch erneute Fermentationen können weitere Einblicke in die pilzinduzierte Sekundärstoffbildung von F98-18 gewonnen werden, die u.a. eine Etablierung der Isolierungs- und Analyseverfahren ermöglichen können. Der nicht isolierbare dunkelgelb färbende Metabolit ($R_f = 0.42$) bleibt weiterhin sehr interessant und wird weiterhin als möglicher Vorläufer der Ansamitocin- bzw. Maytansinbiosynthese vermutet. Es wäre auf jeden Fall von großem Interesse zu erfahren, ob dahinter vielleicht ein reaktionsfähiges Intermediat aus dem Biosyntheseweg der Ansamitocine (20) steckt. Denkbar wäre auch, dass Anthranilsäure (59) nur das bei Raumtemperatur und Luft isolierbare Prinzip eines komplexen Metaboliten darstellt. Eine neue Fermentation unter Pilzzusatz ist letztlich unumgänglich für weitere Erkenntnisse und eine umfangreichere Analytik. Des Weiteren müsste ein größerer Kultivierungsansatz durchgeführt werden, um die Chance auf eine größere Ausbeute an gesuchter, gelb färbender Substanz zu erhöhen. Eine Zufütterung von Glycerin oder anderer Vorläufer, wie z.B. Glutamin als Stickstoffquelle könnten hierbei hilfreich sein. Damit ließe sich ebenfalls die Möglichkeit der Isolierung verbessern und die Frage nach der Instabilität der gelb färbenden Unter Umständen ist der Substanz beantworten. Metabolit stark lichtund temperaturempfindlich oder zerfällt bei einer Aufreinigung an Kieselgel, so dass Materialien wie Sephadex zur Trennung besser geeignet wären. Des Weiteren wäre eine HPLC-ESI-MS-Analyse Rohprodukt Ernte der Kulturen vom sofort nach der unter Lichtausschlussbedingungen sowie ein bis zwei Tage später und nach Lichteinstrahlung wertvoll für die Stabilitätsanalyse der gesuchten Verbindung.

Interessant wäre auch die Auswirkung der Zugabe von mehr oder weniger Pilzsterilfiltrat zur F98-18 Kulturbrühe. Vielleicht ließe sich durch solch einen Versuch die Ausbeute an gelb anfärbbarer Substanz noch weiter erhöhen.

Ein anschließender Test der isolierten Verbindungen gegen den Pilz *Mucor* sp. stellt auch einen interessanten und lohnenswerten Versuch für zukünftige Arbeiten dar.

5 *Streptomyces antimycoticus* FZB53: Mikroorganismen für den Einsatz im biologischen Pflanzenschutz

5.1 Die Bedeutung des biologischen Pflanzenschutzes

Die Landwirtschaft wird seit je her durch ein beständiges Schädlingsproblem dazu angehalten, auf verschiedene Arten des Pflanzenschutzes zurückzugreifen. Dabei zählen zu den Schadorganismen nicht nur tierische Parasiten, sondern auch der Befall durch pflanzenpathogene Bakterien, Viren oder Pilze.

Im Ackerbau stellen Pilze wie Weizensteinbrand, Mehltau und Fusarien die größten und herausforderndsten Probleme in unseren Breitengraden dar. Der den Basidiomyceten angehörende Pilz *Tilletia caries* löst den sogenannten Steinbrand bei Weizen aus und ist, genau wie die Fusariosen, ausgelöst durch *Fusarium culmorum* und *Fusarium graminearum*, nur sehr schwer zu behandeln. Vorbeugende Maßnahmen, wie z.B. vermehrtes Düngen, sind zur Zeit die einzigen einsetzbaren Möglichkeiten, da für diese beiden Erkrankungen in Deutschland keine Pflanzenschutzmittel zur Verfügung stehen¹⁰⁰. Gegen den Befall durch

Mehltaupilze sind Pflanzenschutzmittel auf Schwefelbasis zugelassen und gegen *T. caries* stehen prophylaktische Pflanzenstärkungsmittel zur Verfügung. Das größte Problem der phytopathogenen Pilze stellen aber die Fusarien-Stämme dar. Diese Schimmelpilze befallen nahezu jede Getreideart und bilden verschiedene Mykotoxine, wie z.B. das



Deoxynivalenol ($\underline{63}$), die letztlich für die Saatgutschädigung durch Giftung verantwortlich sind.

Die Forschung beschäftigt sich schon seit Jahrzehnten mit der Entwicklung geeigneter Antimykotika gegen Fusarien. In verschiedenen Studien wurden zunächst bekannte Fungizide und ihre Wirkung auf unterschiedliche Fusarien-Stämme bzw. deren Metaboliten untersucht¹⁰¹⁻¹⁰³. Der Einsatz von Pflanzenschutzmitteln konfrontierte die Forschung jedoch wieder mit neuen Aufgaben. Umwelt- und Rückstandsproblematik machten die Suche nach anderen Bekämpfungsmöglichkeiten attraktiv. In der heutigen Zeit rückt deshalb die Idee des ökologischen Landbaus immer mehr in den Vordergrund. Der Grundgedanke stellt daher eher vorbeugende Maßnahmen zur Gesunderhaltung der Pflanzen dar, wie z.B. Stärkung des pflanzeneigenen Abwehrsystems durch vermehrtes Düngen sowie der Einsatz von natürlichen Nützlingen gegen auftretende Schadorganismen. Chemisch synthetische Pflanzenschutzmittel werden im ökologischen Landbau strikt abgelehnt.

Ungefähr seit Anfang der 80er Jahre stieg das wissenschaftliche Interesse am Verfahren des biologischen Pflanzenschutzes. Mehr und mehr Studien beschäftigten sich mit der allgemeinen Entwicklung von mikrobiologischen Pestiziden, um ein genaueres Verständnis der eigentlichen Interaktion zwischen dem Mikroorganismus und dem Wirt zu erlangen¹⁰⁴⁻¹⁰⁶.

Zu einigen der registrierten Biopestizide gehören z.B. *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis* FZB24 und *Streptomyces griseoviridis* K61¹⁰⁶. Letzterer wurde bereits 1991 als Patent angemeldet und wird seit dem großflächig für landwirtschaftliche Areale als antifungisches Wirkprinzip eingesetzt¹⁰⁷. Zu den aktiven Substanzen, die u.a. für die Wirkung von *P. fluorescens* verantwortlich sind, gehören z.B. das Pyoluteorin (<u>64</u>), Pyrrolnitrin (<u>65</u>) sowie verschiedene Phenazine, u.a. <u>66</u>, <u>67</u> und <u>68</u> (Abbildung 31)¹⁰⁵.



Abbildung 31: Antifungische Metaboliten aus P. fluorescens.

Pseudomonas sp. wurden auch vielfach gegen Fusariosen erprobt, konnten aber den Befall nur geringfügig eindämmen^{108,109}. Es wird also weiterhin aktiv nach neuen Mikroorganismen mit antifungischer Wirksamkeit für den biologischen Pflanzenschutz gesucht.

Der Stamm Streptomyces antimycoticus FZB53

Die Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft (BBA) in Darmstadt hat es sich zur Aufgabe gemacht, für den gesunden Anbau von Nutzpflanzen sowie deren Gesunderhaltung zu sorgen¹¹⁰.

Auf der Suche nach Saatgutbehandlungsmitteln gegen den schwer kontrollierbaren Steinbrand (*T. caries* und *T. foetida*) wurden von KOCH, WEIL und EIBEL (BBA) 153 Bakterien allgemein, außerdem 49 Aktinomyceten und 41 *Trichoderma*-Isolate gescreent. Dabei fiel der Stamm *S. antimycoticus* FZB53 aus der Aktinomyceten-Gruppe durch seine herausragende Aktivität gegen *T. caries* auf. Er führte in vier von fünf Experimenten zu einer erheblichen Befallsminderung der Pflanzen¹¹¹.

Diese herausragenden Eigenschaften von FZB53 führten zu einer umfangreicheren Testreihe gegen verschiedene andere Schadorganismen unter der Leitung von E. KOCH (BBA).

5.2 Hemmwirkung des Stammes FZB53 auf *Tilletia caries* und *Fusarium culmorum*

Im Zeitraum 2003-2005 fanden im Institut für biologischen Pflanzenschutz der BBA in Darmstadt Versuche zur Wirksamkeit des Stammes *S. antimycoticus* FZB53 gegen samenbürtige Krankheiten an Getreide statt.

In Tabelle 3 sind die wichtigsten Aktivitäten gegen *T. caries* und *F. culmorum*, getestet in Gewächshaus- und Feldversuchen, aufgelistet.

	Wirksamkeit [%]	
Krankheit/Pathogen	Gewächshaus	Feld
T. caries (Steinbrand)	50-100	< 85
F. culmorum	< 90	Nicht getestet

 Tabelle 3: Wachstumshemmende Aktivität von FZB53 in Gewächshaus- und Feldversuchen gegen

 T. caries und F. culmorum.

Biologische Tests an T. caries und F. culmorum

Im Folgenden werden Bioaktivitätstests, *in vivo* und *in vitro* durchgeführt, beschrieben. *In vivo* bezeichnet hier die Tests mit *T. caries-* und *F. culmorum-*infiziertem Saatgut, *in vitro* Tests erfolgten am schädigenden Mikroorganismus (*T. caries* und *F. culmorum*) direkt.

In vivo: Das mit *T. caries* und *F. culmorum* infizierte Saatgut wurde mit verschiedenen Formen von Kultivierungsansätzen des Stammes FZB53 nach Dosierungsanleitung aus Tabelle 4 behandelt und ausgesät. Von der Flüssigkultur erfolgte getrennte Testung von Kulturfiltrat und Zellpellet. Von den Agarplatten wurde eine Tween 80 (0.0125 %)-Sporensuspension (1.2 mL/Agarplatte) zur Saatgutbehandlung hergestellt. Als Kontrolle diente das Öko-Standard Pflanzenstärkungsmittel Tillecur (Gelbsenfmehl) und eine unbehandelte Saatgutprobe. Der jeweilige Befall wurde an den Blattsymptomen der gewachsenen Pflanzen abgelesen.

Saatgutbehandlung	Dosierung	
Unbehandelt	15 mL Wasser	
Tillecur	3.3 g + 11.7 mL Wasser	
FZB53 (Agarplatte)	3 g + 12 mL Wasser	
FZB53 (Lyophilisat)	5 % + 15 mL Wasser	
FZB53 (Flüssigkultur)	6 g + 9 mL Wasser	

Tabelle 4: Dosierungen zur Behandlung von 300 g Saatgut in den biologischen Tests.

In vitro: Der Überstand einer Flüssigkultur von FZB53 (2 Wochen Anzucht bei 20°C) wurde nach Sterilfiltration in Agar (nach dem Autoklavieren) gemischt. Die Mischung der Bestandteile erfolgte so, dass die in den Ergebnissen genannten Endkonzentrationen erreicht wurden. Anschließend erfolgte Beimpfen der präparierten Agarplatten mit den jeweiligen Testorganismen (*T. caries* und *F. culmorum*).

Wirkung von FZB53 gegen Steinbrand: Der Stamm FZB53 zeigte in den *in vivo* Tests gegen den Steinbrand (*T. caries*) eine verlässliche und gute Wirkung, vergleichbar mit der Wirkung der Kontrolle Tillecur. Die größte Wirkung erreichte in allen Tests die

Sporensuspension der Agarplatte. Die Wirkungen von Lyophilisat sowie Kulturfiltrat und Pellet der Flüssigkultur waren vergleichsweise gering.

In vitro zeigte FZB53 (bei einer Konzentration von 1 % FZB53-Flüssigkultur im Agar-Nährmedium) eine stark hemmende Wirkung auf die Sporenkeimung von *T. caries*.

Wirkung von FZB53 gegen *F. culmorum*: FZB53 (Kulturfiltrat sowie Zellmaterial) zeigte in den Versuchen eine verlässliche und stärkere Wirkung gegen *F. culmorum* als Tillecur. Aus den *in vitro* Tests ergab sich eine 83-98 %ige Hemmwirkung von 10 % Kulturfiltrat

FZB53 auf das Wachstum von F. culmorum.

Autoklavieren der Kulturbrühe von FZB53 vor der Mischung mit dem Agar-Nährmedium reduzierte die Hemmwirkung auf *F. culmorum* um 3-27 %. Einfrieren zeigte nur geringe Reduktion der Hemmwirkung.

Weitere Tests zur Hemmwirkung von FZB53 auf F. culmorum

Nach Ethylacetat-Extraktion von Kulturfiltrat (pH 8) und Pellet von FZB53 bleibt die Hemmwirkung auf *F. culmorum* erhalten. Der Pellet-Extrakt weist dabei eine 10mal höhere Aktivität auf, als der Kulturfiltrat-Extrakt.

Die Extrakte wurden dünnschichtchromatographisch (Chloroform/Methanol 9:1, Anfärbereagenz: 10 %ige Schwefelsäure) analysiert. Eine stark orange anfärbende Zone mit $R_f = 0.64$, sehr schwach UV-löschend und wasserabweisend, konnte mittels präparativer Dünnschichtchromatographie mit Ethylacetat extrahiert und isoliert werden. Im Agartest wurde eine antifungische Aktivität festgestellt, jedoch etwas schwächer als erwartet.

5.3 Extrakte des Stammes FZB53: Isolierung und Analytik

Zur Isolierung und Analyse des aktiven Prinzipes (<u>69</u>) aus FZB53 wurden uns verschiedene Extrakte (Kulturfiltrate und Pellets) aus Darmstadt (E. KOCH) zur Verfügung gestellt, im folgenden FZB1, 2 und 3 bezeichnet.

FZB1

Bei dem Extrakt FZB1 handelte es sich um eine vorgereinigte Fraktion (aus dem Kulturfiltrat von FZB53) aus einer präparativen Dünnschichtchromatographie, durchgeführt in Darmstadt.

Die aktive Substanz (69) konnte dort bereits auf dem Dünnschichtchromatogramm als relativ unpolarer Metabolit bei einem Rf-Wert von 0.64 (KG, Chloroform/Methanol 9:1) lokalisiert werden. Die vorgereinigte Fraktion aus Darmstadt wurde zunächst per Dünnschichtchromatographie (KG, Chloroform/Methanol 9:1; RP-KG, Aceton/Wasser 4:1, Orcin) analysiert. 69 färbte mit Orcin braun an und war wie erwartet auf Kieselgel mit $R_f = 0.64$ zu finden. Auf RP-Kieselgel konnte <u>69</u> mit $R_f = 0.2$ als braune Zone detektiert werden. Im RP-DC zeigte sich eine zusätzliche braun anfärbbare Zone mit einem Rf-Wert von 0.73. Ein Trennungsgang mittels Schwerkraftsäulenchromatographie (RP-KG, Aceton/Wasser 4:1) ergab zwei Fraktionen (FZB1K1 und FZB1K2). Mit Fraktion K1 konnte ein Großteil der polaren Substanz abgetrennt werden. Die aktive Zone (69) fand sich in Fraktion K2 wieder, jedoch mit einer Restverunreinigung der polaren Substanz.

Zunächst sollte die Vermutung ausgeschlossen werden, dass es sich bei der aktiven Substanz ($\underline{69}$) um eine Verbindung aus der Familie der Antimycine ($\underline{70}$) handelte. Diese sind in Streptomyceten weit verbreitete Metaboliten mit einem antifungischen Wirkspektrum¹¹²⁻¹¹⁵.

Strukturaufklärung für

C40H68O11





Antimycin A_{1a} : $R^1 = -COCH(CH_3)CH_2CH_3$, $R^2 = (CH_2)_5CH_3$

Antimycine (<u>70</u>) fallen bei Bestrahlen mit UV-Licht der Wellenlänge 366 nm durch starke Fluoreszenz auf, was bei der aktiven Zone aus FZB53 nicht zu beobachten war. Die Messung

eines ¹H-NMR-Spektrums, in dem keine aromatischen Signale zu verzeichnen waren, bestätigte das Vorhandensein einer anderen Substanzklasse als die der Antimycine (**70**). Nachfolgende DC-Analysen mit der Substanz wiesen eine neue, leicht braun färbende Zone mit $R_f = 0.23$ auf. Die Vermutung, dass sich die Substanz zersetzen könnte, wurde durch die Anfertigung eines 2-dimensionalen Dünnschichtchromatogramms überprüft. Verfahren wurde hierbei wie in Kapitel 4.3, das Zeitintervall zwischen den beiden Chromatogramm-Entwicklungen betrug im ersten Versuch 10 min, dann 30 min und beim letzten Versuch 24 Stunden. Die ersten beiden 2-dimensionalen DCs zeigten keinen Hinweis auf Zersetzung der Substanz. Erst das letzte Chromatogramm mit der längsten Zeitspanne von einem Tag zwischen erster und zweiter Entwicklung zeigte nach Anfärben mit Orcin eine schwache zusätzliche, leicht braun anfärbende Zone.

Der abschließende Reinigungsschritt verlief mit einer Mitteldrucksäulenchromatographie (RP-KG, Aceton/Wasser 4:1) und ergab zwei Fraktionen FZB1K24 (2.0 mg) und FZB1K26 (1.7 mg), wobei es sich bei letzterer um die aktive Substanz (**69**) handelte. Es erfolgte Analyse der beiden Fraktionen per ESI-MS, EI-MS und ¹H-NMR-Messung (600 MHz, CDCl₃). Fraktion FZB1K24 zeigte im ESI-Massenspektrum keinen definierten Molekülpeak, in der EI-MS-Analyse war ebenfalls kein Molekülpeak detektierbar. Das ¹H-NMR-Experiment lieferte ein sehr signalreiches Spektrum ausschließlich im Bereich zwischen 0 und 4.3 ppm.

Die Fraktion FZB1K26 zeigte im ESI-Massenspektrum die Massen m/z = 747.6 $[M+H]^+$, 1493.6 $[2M+2Na]^{2+}$. Die hochauflösende Massenspektrometrie ergab m/z = 742.5 $[M+NH_4]^+$, entsprechend einer Molmasse von 724.5 g/mol, mit einer Summenformel von C₄₀H₆₈O₁₁. Das ¹H-NMR-Spektrum zeigte ebenfalls viele Signal im Hochfeldbereich, die auf Methylengruppen, wie z.B. bei einer Fettsäurestruktur, schließen ließen. Eine EI-MS-Messung sollte Aufschluss über das Vorhandensein einer biologisch aktiven Fettsäure geben¹¹⁶⁻¹¹⁹. Es zeigte sich jedoch nicht das für eine Fettsäure typische Muster vieler abgespaltener Methyleneinheiten im EI-MS-Spektrum.

Um für weitere Untersuchungen genügend Material zu erhalten, erfolgte die Reinigung des Extraktes FZB2.

FZB2

Der aus 1.5 L Gesamtkultur von FZB53 gewonnene Ethylacetat-Extrakt des Kulturfiltrats (47.8 mg) wurde ohne Vortrennung per Mitteldrucksäulenchromatographie an RP-Kieselgel zum Reinstoff aufgearbeitet. Die aktive Zone (<u>69</u>) konnte per Dünnschichtchromatographie in der Fraktion FZB2K4 (5.1 mg) detektiert werden, dies zeigte allerdings keine UV-Löschung wie zuvor beobachtet. Analyse per HPLC-ESI-MS ergab im negativen Modus m/z = 723.68 [M-H]⁻, entsprechend der vorher bestimmten Molmasse von 724.5 g/mol. Gleichzeitig war die Überprüfung des UV-Spektrums von <u>69</u> durch Kopplung der HPLC-ESI-MS mit einem DAD-Detektor möglich, <u>69</u> zeigte jedoch keine Absorption und bestätigte daher die dünnschichtchromatographische Beobachtung.

Mit 1 mg der isolierten Substanz (69) wurden biologische Tests (vgl. Kapitel 5.2) in der BBA in Darmstadt (E. KOCH) durchgeführt. Der Vergleich der Ergebnisse mit denen aus vorigen Tests des FZB-Extrakts und der aus präparativer DC stammenden gereinigten Substanz bestätigte die Isolierung der gesuchten, aktiven Verbindung (69). Allerdings zeigte sich eine geringere Aktivität gegen *F. culmorum* als aus vorigen Testresultaten zu erwarten war. Dasselbe Phänomen war bereits nach Testung der aus präp. DC stammenden Substanz aufgefallen.

Ein ¹H-NMR-Spektrum in CD₃OD und CDCl₃ zeigte sehr viele überlagernde Signale im Hochfeldbereich. Aufgrunddessen ergaben sich auch im 2-dimensionalen NMR-Experiment überlappende Korrelationen, die zu einem sehr komplexen Signalmuster führten.

Eine Datenbanksuche^{120,121} mittels Molmasse und Summenformel sowie der Signalfülle im Hochfeldbereich des NMR-Spektrums konnte die Verbindung in die Klasse der Polyether einordnen.

Um die Datenbankvorschläge zu verifizieren, sollte mehr Substanzmenge aus dem Extrakt FZB3 erhalten werden.

FZB3

Aus FZB3 standen der Kulturfiltrat- und der Pellet-Ethylacetat-Extrakt zur Aufreinigung zur Verfügung. Es konnte in den vorherigen Isolierungen beobachtet werden, dass im Zellmaterial der Fermentationen am meisten der aktiven Substanz (<u>69</u>) zu finden war. Aus diesem Grund wurde auch der Pellet-Extrakt zunächst bearbeitet.

Aufgrund der großen Rohproduktmenge von fast 1.5 g erfolgte zuerst eine Vortrennung über Kieselgel (Chloroform/Methanol 9:1). Diese ergab insgesamt sieben Fraktionen (FZB3P1-7), **69** konnte in den Fraktionen P2 und P3 detektiert werden. Es blieb jedoch trotz der Vortrennung eine polare Komponente in den Fraktionen erhalten, so dass zur weiteren Trennung die Mitteldrucksäulenchromatographie mittels der Lobar[®] B Fertigsäule (RP-Kieselgel) nicht geeignet war. Deshalb folgte zunächst ein Reinigungsschritt der vereinten Fraktionen P2 und P3 über eine RP-Kieselgel-Schwerkraftsäulenchromatographie, woraus weitere sieben Fraktionen erhalten wurden (FZB3P2/3-1 bis -7). Der aktive Metabolit **69** war in Fraktion FZB3P2/3-5 zu finden. Die Ausbeute dieser Fraktion belief sich auf 2.4 mg, jedoch konnte trotz weiterer Aufreinigung wieder eine sehr unpolare Substanz in den Fraktionen gefunden werden, so dass auf weitere Trennung verzichtet wurde.

Um auf schnellerem Wege zu mehr Substanz der aktiven Verbindung zu kommen, sollte eine Fermentationsoptimierung im Rahmen eigener Arbeiten in Göttingen stattfinden¹²².

5.4 Optimierung von Fermentation, Isolierung und Analytik

Die Kultivierung des Stammes FZB53 erfolgte bei der BBA in Darmstadt für 20 Tage in Schüttelkulturen bei Raumtemperatur und 175 rpm. Die maximale Ausbeute an aktiver Verbindung (<u>69</u>) betrug dabei bisher 3.4 mg/L. In eigenen Experimenten sollte eine Fermentationsoptimierung mittels einer verkürzten Kultivierungsdauer sowie einer höheren Ausbeute an <u>69</u> durchgeführt werden.

FZB4

Die Fermentation wurde analog zur Darmstädter Variante ohne Vorkulturen durchgeführt. Die Kultivierung erfolgte bei in Göttingen erprobten Standardbedingungen für Streptomyceten, in Erlenmeyerkolben mit Schikane bei 28°C und 180 rpm. Nach 6.5 Tagen wurde eine 50 mL-Probe aufgearbeitet, um den Fortschritt der Fermentation zu verfolgen. Dünnschichtchromatographische Kontrolle zeigte nach Anfärben mit Orcin deutlich die braun färbende, aktive Substanz (<u>69</u>) mit einem R_f-Wert von 0.64. Die Fermentation wurde daraufhin abgebrochen und die Kulturen, separiert in Kulturfiltrat und Mycel, durch Ethylacetat-Extraktion aufgearbeitet. Eine dünnschichtchromatographische Analyse der Extrakte zeigte eine deutlich größere Menge an aktiver Substanz im Mycel-Extrakt als im Kulturfiltrat-Extrakt, was die Kultivierungsergebnisse aus Darmstadt bestätigten. Daher wurde der Mycel-Extrakt zunächst für weitere Aufreinigungsschritte verwendet.

Im DC zeigte sich mit einem gleichem R_f -Wert wie die aktive Verbindung (<u>69</u>) eine weitere Substanz, die UV-Licht der Wellenlänge 254 nm absorbierte. Diese wurde bereits bei den Kultivierungen in Darmstadt beobachtet. Anfangs wurde fälschlicherweise angenommen, dass es sich bei der UV-löschenden und der aktiven Substanz (<u>69</u>) um ein und dieselbe handelte, da keine unterschiedliche Anfärbung beider Verbindungen mit Sprühreagenzien erreicht werden konnte.

Durch die Überlagerung dieser zwei Substanzen konnte eine Aufreinigung per Kieselgelsäulenchromatographie nicht in Betracht gezogen werden. Es folgte ein Trennungsgang an Sephadex LH-20/Methanol, aus welchem sechs Fraktionen resultierten. Die Substanzen, die auf Kieselgel den R_f -Wert von 0.64 aufwiesen, wurden an Sephadex getrennt, die gesuchte aktive Zone wurde eher (Fraktion 3 und 4) eluiert, als die UV-löschende (Fraktion 6). Eine abschließende Mitteldrucksäulenchromatographie an RP-Kieselgel (Aceton/Wasser 4:1) ergab insgesamt eine erfreulich hohe Ausbeute von 86 mg/L der gesuchten Substanz (<u>69</u>).

Die Messung per HPLC-ESI-MS ergab eine Masse von m/z = 747.64 $[M+Na]^+$ im positiven Modus und m/z = 723.68 $[M-H]^-$ im negativen Modus bei einer Retentionszeit von 21.6 min. Die hochauflösende ESI-Massenspektrometrie bestätigte den vermutlichen Polyether (**69**) mit der Molmasse von 724.5 g/mol und der Summenformel von C₄₀H₆₈O₁₁. Es folgten NMR-Experimente mit C₆D₆ anstatt mit CD₃OD, wodurch eine bessere Signalschärfe im Spektrum erzielt werden sollte. Zwar lieferte das NMR-Experiment in C₆D₆ ein besser aufgelöstes Spektrum (Abbildung 32) als die Messung in CDCl₃ oder CD₃OD, es war dennoch weiterhin eine starke Signalüberlagerung im Hochfeldbereich zu erkennen, durch deren Komplexizität sich eine Strukturaufklärung äußerst schwierig gestaltete. Abhilfe sollten chemische Derivatisierungen (Methylierung und Acetylierung) von **69** bringen. Es sollte damit eine spezifische Verschiebung einzelner Signale im NMR-Spektrum als Beitrag zur Strukturaufklärung erreicht werden.



Abbildung 32: ¹H-NMR-Spektrum (600 MHz, C₆D₆) der aktiven Substanz (<u>69</u>).

Analyse der UV-löschenden Verbindung

Im Zusammenhang mit der Isolierung eines Polyethers namens Nigericin (<u>71</u>) wurde Ende der 90er Jahre von TREJO-ESTRADA et al. auch die Isolierung des Geldanamycins (<u>43</u>) beschrieben¹²³. Das Metabolitenmuster des Stammes FZB53 wurde daraufhin auf die Bildung von Geldanamycin (<u>43</u>) per Dünnschichtchromatographie überprüft.

Es stellte sich heraus, dass <u>43</u> das gleiche Laufverhalten aufwies, wie die bei der DC-Analyse des FZB4-Rohprodukts von der aktiven Verbindung (<u>69</u>) überlagerte Substanz. Auch das Anfärbeverhalten mit verschiedenen Sprühreagenzien und die UV-Absorption bei 254 nm beider Substanzen war gleich.

Um genauere Aussagen über die Identität machen zu können, wurde die Fraktion mit der unbekannten, Geldanamycin-ähnlichen Substanz über RP-Kieselgelsäulenchromatographie aufgereinigt. Die Ausbeute der Fraktion mit zu analysierender Substanz belief sich jedoch nur auf 0.1 mg. Ein NMR-Experiment misslang. Eine ESI-MS-Analyse ergab mit m/z = 561.28 $[M+H]^+$ und durch hochauflösende ESI-Massenspektrometrie eine Molmasse von 560.6 g/mol mit der Summenformel C₂₉H₄₀N₂O₉. Diese Werte stimmen mit denen des Geldanamycins (<u>43</u>) überein, es wurde gefolgert, dass es sich bei der UV-löschenden Substanz, die die aktive Verbindung (<u>69</u>) überlagerte, um Geldanamycin (<u>43</u>) handeln musste.

Es konnte hiermit gezeigt werden, dass die UV-Löschung der aktiven Substanz von einer zweiten Substanz, dem Geldanamycin (<u>43</u>) stammt. Die vormals gemessene biologische Aktivität der aktiven Zone setzte sich demzufolge aus den Aktivitäten von <u>43</u> und dem vermutlichen Polyether (<u>69</u>) zusammen. Die beobachtete UV-Löschung des Geldanamycins war jedoch nicht in jedem Extrakt bei den Fermentationen in Darmstadt aufgefallen. Auch wurde aus den Extrakten neben <u>69</u> kein <u>43</u> mit isoliert, was eigentlich der Fall hätte sein

müssen, da beide Substanzen den gleichen R_f -Wert aufweisen. Mögliche Ursache kann eine Zersetzung des sehr lichtempfindlichen Geldanamycins vor Durchführung der Biotests und vor Bearbeitung der Extrakte in Göttingen sein. Eine biologische Testung des vermutlichen Polyethers (<u>69</u>) sowie des Geldanamycins (<u>43</u>) sollte Aufschluss über das Wirkpotential beider Substanzen geben.

5.5 Chemische Derivatisierung

Um die Strukturaufklärung zu ermöglichen, wurden chemische Derivatisierungen des vermutlichen Polyethers durchgeführt. Durch die Methylierung bzw. Acetylierung vorhandener OH-Funktionen im Molekül sollten spezifische Signalverschiebungen im ¹Hund ¹³C-NMR-Spektrum erkennbar sein, welche Indizien für die Strukturaufklärung liefern könnten.

Acetylierung

Zur Umsetzung wurden 9.6 mg des vermutlichen Polyethers (**<u>69</u>**) mit Acetanhydrid in Pyridin in der Kälte gelöst. Nach ca. drei Stunden war die Reaktion beendet und wurde durch Zugabe von Natriumhydrogencarbonatlösung aufgearbeitet. Die Reinigung des erhaltenen Rohprodukts über Kieselgelsäulenchromatographie ergab die drei Fraktionen FZB-A1 bis FZB-A3, die einer HPLC-ESI-MS und einer NMR-Analyse unterzogen wurden. Die Acetylierungsmethode erwies sich als ungeeignet, da per ESI-MS kein acetyliertes Produkt detektiert werden konnte und die NMR-Experimente nur viele überlagernde Signale im Spektrum lieferten.

Eine Alternative stellte die Methylierung mit Diazomethan als weitere chemische Derivatisierung dar.

Methylierung

9.5 mg der Ausgangssubstanz (<u>69</u>) wurden mit Diazomethan in der Kälte umgesetzt, bis eine leichte Gelbfärbung der Lösung zu beobachten war. Nach 1.5 Stunden konnte die Reaktion abgebrochen und aufgearbeitet werden. Die DC-Kontrolle zeigte eine vollständige Umsetzung des Edukts, so dass keine weiter Reinigung nötig war. Eine ESI-MS-Analyse ergab $m/z = 761.9 [M_2+Na]^+$ im positiven Modus und $m/z = 723.7 [M_1-H]^-$ im negativen Modus.

Die gemessene Masse im negativen Modus stimmt mit der des Edukts von 724.5 g/mol überein. Die im positiven Modus detektierte Masse könnte ein einfach methyliertes Natriumaddukt des Edukts sein. ¹H- und ¹³C-NMR-Experimente lieferten jedoch keine lösbaren Spektren. Das ¹H-NMR-Spektrum zeigte deutlich zwei neue CH₃-Signale bei 1.55 und 3.60 ppm, nicht übereinstimmend mit der Massenanalyse. Im ¹³C-NMR-Spektrum zeigt sich eine Verschiebung zu vieler ¹³C-NMR-Signale, so dass von einer unselektiven Methylierung des Edukts ausgegangen werden konnte, womit keine vergleichende Strukturaufklärung möglich war.

5.6 Beiträge zur Strukturaufklärung von <u>69</u>

Bei der isolierten, aktiven Verbindung <u>69</u> handelt es sich um eine optisch aktive Substanz (+36°, c = 1, Methanol) mit der Molmasse 724.5 g/mol und einer Summenformel von $C_{40}H_{68}O_{11}$, bestimmt durch hochaufgelöste ESI-Massenspektrometrie. Aus der Summenformel lassen sich sieben Doppelbindungsäquivalente berechnen. Dem IR-Spektrum sind Hydroxy- (3420 cm⁻¹), eine Carbonsäure- (1729 cm⁻¹) sowie Ethergruppierungen (1115-1020 cm⁻¹) zu entnehmen. Eine UV-Analyse ergab, wie zu erwarten, kein messbares UV-Spektrum für <u>69</u>.

Das ¹³C-NMR-Spektrum zeigt, entsprechend der Summenformel, Signale von vierzig Kohlenstoff-Atomen. Ein Signal weist eine chemische Verschiebung von 177.4 ppm auf, repräsentativ für eine Carbonsäure, ein weiteres Signal ist bei $\delta = 108.6$ ppm zu finden, die restlichen achtunddreißig Signale im aliphatischen Hochfeldbereich. Im ¹H-NMR-Spektrum sind Signale für insgesamt 68-72 Wasserstoff-Atome im aliphatischen Bereich zwischen 0 und 4.5 ppm zu erkennen, die teilweise sehr stark überlagert sind (Abbildung 32).

¹³ C-NMR-Daten [ppm] in C ₆ D ₆				
Polyether (<u>69</u>)	Nigericin	Epinigericin		
11.44	10.9	10.7		
13.19	13.3	13.1		
13.44	13.3	13.2		
14.87	13.4	13.4		
16.20	15.7	15.6		
16.88	16.8	15.7		

17.04	17.2	17 4
22 77	22.9	22.9
22.77	22.7	22.9
23.19	25.9	25.1
26.04	20.3	26.1
26.77	26.4	26.5
27.96	27.9	27.6
29.32	28.4	28.5
29.83	31.3	30.9
31.80	32.0	31.7
32.26	32.6	32.2
32.41	33.0	26.5
35.27	35.5	35.6
36.20	36.1	35.8
37.04	37.3	32.0
37.43	37.6	37.5
37.82	38.3	36.4
39.75	39.5	39.3
41.95	43.0	43.0
46.06	44.5	44.7
59.68	57.6	57.5
60.93	60.9	60.9
67.87	68.9	69.5
68.38	69.5	67.1
73.67	73.4	73.3
76.88	74.8	75.4
77.04	77.5	77.7
79.55	78.3	78.2
81.66	82.0	81.8
82.31	82.9	82.9
84.87	83.8	83.7
85.46	86.3	86.1
97.81	97.7	98.3
107.82	108.7	108.7
184.08	177.1	177.4

Tabelle 5: ¹³C-NMR-Daten von <u>69</u> vergleichend mit den Literaturdaten von Nigericin (<u>71</u>) und Epinigericin (<u>76</u>)¹²⁴. Bei den für <u>71</u> und <u>76</u> aufgeführten Werten innerhalb einer Zeile handelt es sich um das jeweils gleiche Kohlenstoffatom.

Die Datenbanksuche mittels *Antibase*¹²⁰ sowie *DNP*¹²¹ mit der Summenformel C₄₀H₆₈O₁₁ führte zu insgesamt sieben Strukturvorschlägen: Nigericin (<u>71</u>), Abierixin (<u>72</u>), IM-1 (<u>73</u>), TM582 (<u>74</u>), SS49 (<u>75</u>), Epinigericin (<u>76</u>) sowie IM-2 (<u>77</u>). Die Struktur von <u>77</u> gleicht dem Aufbau von Nigericin (<u>71</u>), jedoch ist hier die exakte stereochemische Struktur weder in der Datenbank noch in der Literatur angegeben. Bei allen Strukturen handelt es sich um aus *Streptomyces* sp. isolierte Antibiotika der Polyether-Verbindungsklasse, die sich bis auf das cyclische Makrolacton SS49 (<u>75</u>) von der Nigericinstruktur (<u>71</u>) ableiten lassen.



Vier der vorgeschlagenen Strukturen, Abierixin¹²⁵ (<u>72</u>), IM-1 (<u>73</u>), TM 582 (<u>74</u>) und SS49 (<u>75</u>) können als Struktur der aktiven Verbindung <u>69</u> ausgeschlossen werden, da dessen ¹H-NMR-Spektrum keine Signale im Doppelbindungsbereich aufweist, wie es die genannten Verbindungen zeigen.

Zum Vergleich bleiben die Strukturen von Nigericin^{124,126,127} (<u>71</u>), Epinigericin^{124,126} (<u>76</u>) und IM-2 (<u>77</u>)¹²⁶ (nicht detailliert strukturaufgeklärtes Stereoisomer von <u>71</u>). Sie weisen alle ein nahezu identisches NMR-Spektrum auf, da sie eine gleiche Verknüpfung der Ringsysteme, aber eine unterschiedliche Stereochemie besitzen (s. Markierung in den Molekülen).

Ein Vergleich der NMR-Daten der aktiven Substanz (<u>69</u>) mit den Nigericin-NMR-Literaturdaten zeigt zehn CH₃-Signale für Nigericin (<u>71</u>), zahlenmäßig ähnlich ca. neun bis elf CH₃-Signale für die aktive Verbindung. Ein genauerer Vergleich der NMR-Daten ist jedoch durch die Überlagerung vieler Signale und die Qualität der 2-dimensionalen Spektren nicht möglich.

Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass es sich bei dem aktiven Prinzip (<u>69</u>) des Stammes FZB53 um Nigericin (<u>71</u>) handelt, da sowohl Molmasse, Summenformel als auch Drehwert von <u>69</u> vergleichbar mit <u>71</u> sind¹²⁴. Da eine endgültige Strukturaufklärung über die NMR-Daten bisher nicht möglich war, kann aber auch kein Beweis für das Vorhandensein von <u>71</u> erbracht werden. Weitere Derivatisierungen und NMR-Experimente zur abschließenden Strukturaufklärung stehen noch aus.

5.7 Diskussion der Ergebnisse und Ausblick

Die gesuchte Substanz mit einem Rf-Wert von 0.64 (Chloroform/Methanol 9:1) konnte durch Aufreinigung der Ethylacetat-Extrakte von Kulturfiltrat und Zellmaterial isoliert werden. Biologische Aktivitätstests bestätigten das Vorhandensein der aktiven Substanz (69) durch Vergleich der bestimmten Aktivitäten mit denen aus früheren Tests. Es ließ sich eine hohe Aktivität gegen T. caries bestimmen und eine etwas niedrigere Aktivität gegen F. culmorum, als aus den Tests mit dem gesamten Kulturfiltrat-Extrakt erwartet wurde. Diese Beobachtung konnte bereits mit aktiven der Substanz, isoliert aus präparativer Dünnschichtchromatographie, gemacht werden.

Durch eine Optimierung der Fermentationsbedingungen konnte eine Produktionssteigerung von 3.4 auf 86 mg/L an <u>69</u> erreicht werden.

Eine Datenbanksuche^{120,121} ordnete <u>69</u> in die Klasse der Polyether ein. Von den erhaltenen sieben Strukturvorschlägen blieben durch Ausschlussverfahren nur drei Möglichkeiten übrig, die sich auf Nigericin (<u>71</u>) und zwei seiner Stereoisomere begrenzten. Durch Vergleich mit den NMR-Literaturdaten von <u>71</u>¹²⁴ konnte jedoch keine abschließende Strukturaufklärung erfolgen, da eine Zuordnung der Signale durch Überlagerung im aliphatischen Bereich bisher nicht abschließend möglich war. Auch eine chemische Derivatisierung der aktiven Substanz (<u>69</u>) (Methylierung und Acetylierung) konnte nicht zur Strukturaufklärung beitragen. Die Anwesenheit von <u>71</u> oder eines Stereoisomers kann also nicht ausgeschlossen werden.

Durch Etablierung einer verbesserten Aufreinigungstechnik wurde eine überlagerte, UVlöschende Verbindung mit dem gleichem R_f-Wert von 0.64 wie dem der aktiven Verbindung (<u>69</u>) isoliert. Durch vergleichende Dünnschichtchromatographie und HR-ESI-MS-Messung konnte diese als Geldanamycin (<u>43</u>) identifiziert werden. Aus der Literatur ist die gleichzeitige Produktion von Nigericin (<u>71</u>) und <u>43</u> bekannt¹²³, ein weiteres Indiz für das Vorhandensein von <u>71</u>.

Ein lohnenswertes Ziel für die Zukunft wäre eine genaue Bestimmung des Aktivitätsspektrums der isolierten Substanz (69). Da frühere Aktivitätstests mit überlagertem Geldanamycin (43) stattgefunden haben müssen, stünde eine Testung des vermutlichen Polyethers (69) sowie des Geldanamycins (43), jeweils einzeln und in Mischung (synergistische Effekte), miteinander an. Aus der Literatur ist 43 als Antibiotikum mit nur leichter antifungischer Wirkung bekannt^{84,123}, so dass die schwächer gemessene Aktivität von 69 gegen F. culmorum, im Gegensatz zur Aktivität des gesamten Kulturfiltrats, wahrscheinlich nicht durch die Überlagerung der aktiven Zone (69) mit 43 zustande kommt. Eine weitere Analyse des Metabolitenspektrums von FZB53 wäre deshalb von großer Bedeutung. Offenbar existiert in dessen Kulturfiltrat- und Zellmaterial-Extrakt eine oder mehrere Substanz(en), die in ihrer natürlichen Mischung im Extrakt für eine höhere Aktivität gegen F. culmorum verantwortlich sind. Eine genaue Erforschung des Metabolitenmusters eines Stammes mit der Aufklärung einzelner Substanzen ist für derartige Erfahrungen wertvoll. Der endgültige Einsatz des ganzen Mikroorganismus im Pflanzenschutz würde jedoch die von der Natur bereitgestellte Mischung aktiver Substanzen im Gegensatz zur einzelnen Verbindung liefern.

6 Piriformospora indica: Induktion des verzweigten Wurzelwachstums der Modellpflanze Arabidopsis thaliana

6.1 Symbiosen zwischen Pilzen und Pflanzen: Effekte auf das Pflanzenwachstum

Im Jahr 1998 wurden von VAN DER HEIJDEN et al. in *Nature* zum ersten Mal Experimente vorgestellt, die bewiesen, dass unterirdische Pilze (Mycorrhizapilze) einen entscheidenden Faktor für die Biodiversität der oberirdischen Pflanzenwelt darstellen¹²⁸. Dazu wurde die Entwicklung verschiedener Pflanzen beobachtet, die auf einem künstlich mit Mycorrhiza-Pilzen ausgestatteten Boden angezogen wurden. Mycorrhizen (griech.: Pilzwurzeln) sind Symbiosen zwischen Pilzen und den Wurzeln anderer Pflanzen, wobei der Pilz die Wurzeln der Pflanzen intra- oder extrazellulär besiedeln kann. Am häufigsten sind arbuskuläre Mycorrhizen vertreten. Dabei penetriert der Pilz die Wurzelzellen von vaskulären Pflanzen, die über spezielles Gewebe zur Nährstoffaufnahme verfügen und hilft den Pflanzen so bei der Aufnahme von Mineralien und Nährstoffen (insbesondere Phosphate) aus dem Boden¹²⁹. Die verbesserte Nährstoffzufuhr spiegelt sich dann im Pflanzenwachstum wieder.

6.1.1 Der endophytische Pilz *Piriformospora indica* als Wachstums-Promotor für Pflanzen

Mittlerweile wurden viele andere endophytische Pilze als Wachstumspromotoren von Pflanzen entdeckt. Einer davon ist der *Piriformospora indica*, der während eines Screenings nach arbuskulären Mycorrhizen in der Wüste Thar in Indien isoliert worden ist. Phylogenetisch ist *P. indica* nahe mit den mycorrhizalen Endosymbionten von Orchideenwurzeln verwandt. *P. indica* ist bekannt als Wachstumsinduktor für verschiedene Pflanzenspezies¹³⁰⁻¹³⁴, wie z.B. durch zur Co-Kultivierungsexperimente von *P. indica* mit Spinat- und Senfpflanzen (*Spinacia oleracea* und *Brassica juncera*) bewiesen wurde. Des

Weiteren haben WALLER et al. herausgefunden, dass dieser endophytische Pilz in Gerste eine systemische Resistenz gegen Brand und *Fusarium culmorum* induziert¹³⁵.

Die Ursache dieser beschriebenen Effekte von *P. indica* auf die verschiedenen Pflanzen blieb bislang ungeklärt. Allerdings scheint nicht die verbesserte Nährstoffzufuhr wie bei der mycorrhizalen Symbiose der Grund für das verbesserte Pflanzenwachstum zu sein, denn eine Studie mit Gerste zeigte, dass *P. indica* sogar gezielt Wurzelzellen der besiedelten Pflanzen abtötet¹³⁶. Vermutlich interferiert der Pilz mit dem Zelltodprogramm der Wirts, um seinen eigenen Fortbestand zu sichern und eine symbiotische Interaktion mit den Wirtspflanzen einzugehen.

Trotz dieses beobachteten Abtötungsmechanismus induziert *P. indica* durch Wurzelbesiedlung in einigen Pflanzen deren Wachstum zu einem stark verzweigten, buschartigen Wurzelgeflecht^{130,136-138}. Beobachtet wurde dies bei der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana*, allerdings nicht nur bei direktem Kontakt der Wurzel mit dem Pilz, sondern auch wenn *P. indica* ein wenig entfernt davon wuchs¹³⁹. Aus diesem Grund wurde davon ausgegangen, dass ein diffusionsfähiger Metabolit von *P. indica* für die Interaktion zwischen Pilz und Wurzel verantwortlich ist. Außerdem ist das spezifische verzweigte Wurzelwachstum ein bereits bekannter Effekt, der bei Anwesenheit von Auxinen beobachtet wurde.

6.1.2 Auxine: Phytohormone als Wachstumsregulatoren in höheren Pflanzen

Auxine sind natürliche und synthetische Phytohormone mit einer Indolstruktur, die das Wachstum höherer Pflanzen positiv stimulieren. Wegen ihres speziellen Effekts auf das Wurzelwachstum werden sie als Bewurzelungshormone für die Stecklingsvermehrung bei schlecht wurzelnden Pflanzen eingesetzt.Indol-3-essigsäure (IAA) (<u>78</u>) wird hierbei als Auxin (<u>78</u>) bezeichnet und ist das einzige, bisher als weit verbreitet bekannte, pflanzeneigene Phytohormon. Es gibt aber weitere synthetische Phytohormone, die auxin-ähnliche Effekte bei Pflanzen hervorrufen, wie z.B. die 1-Naphtylessigsäure (NAA) (<u>79</u>), die aufgrund leichterer Handhabung für einige Versuche als IAA-Ersatz verwendet wurde (Abbildung 33).



Abbildung 33: Die Phytohormone IAA (78) und das Analogon NAA (79).

6.2 Vorarbeiten zur Analyse des diffusionsfähigen Metaboliten mit Auxin-Effekt

In Kooperationsarbeiten mit A. SIRRENBERG (Institut für Pflanzenpathologie und Pflanzenschutz, AK KARLOVSKY, Universität Göttingen) sollte der diffusionsfähige Metabolit von *P. indica* analysiert werden. Dabei stellte sich die Frage, ob es sich um IAA ($\underline{78}$), ein anderes Auxin oder sogar um einen ganz neuen Metaboliten handelte, der einen auxinähnlichen Effekt auf die Pflanzen ausübte.

Alle Kultivierungsarbeiten, wie Auswahl der Medien, Fermentationszeit und Aufarbeitungsstrategien, samt Biotests wurden von A. SIRRENBERG und S. GROND durchgeführt. Die HPLC-ESI-MS- sowie dünnschichtchromatographische Analysen fanden im Rahmen eigener Arbeiten im AK GROND statt.

Biotests zur Bestimmung des Effekts von P. indica auf Arabidopsis thaliana

PI1: Test mit *P. indica*-Agarstückchen als direktes Inoculum auf Schrägagar: Eine Schrägagarplatte wurde mit sterilen Arabidopsis-Samen inokuliert. Unter die Samen wurden ein kleines Agarstück einer *P. indica* Kultur gelegt.

Als Kontrolle diente ein Agarstück vom reinen Nährmedium ohne P. indica.

PI2: Test mit *P. indica*-Sterilfiltrat direkt im Agar: Aus einer Mischung von 15 mL einer 8 Wochen alten, steril filtrierten *P. indica*-Kultur mit 15 mL Medium und Agar wurden Schrägagarplatten gegossen und mit sterilen Arabidopsis-Samen inokuliert.

Als Kontrollversuch diente eine mit Arabidopsis-Samen angeimpfte Agarplatte ohne *P. indica* Sterilfiltrat.

PI3: Test mit *P. indica*-sterilfiltrathaltigen Filterplättchen auf Schrägagar: Insgesamt 135 μ L von steril filtriertem *P. indica* Kulturfiltrat wurden auf kleine Filterpapierscheiben ($\emptyset = 9 \text{ mm}$) in 3 Portionen aufgetragen. Das getrocknete Filterpapier wurde anschließend unter die sterilen Arabidopsis-Samen auf einer Schrägagarkultur platziert. Als Kontrollen diente nicht-inokuliertes Medium.

PI4: Test mit ethylacetat-extrakthaltigen Filterplättchen des *P. indica* Kulturfiltrats auf Schrägagar: Der Ethylacetat-Extrakt von 10 mL Pilz-Kulturfiltrat wurde in 200 μL Methanol resuspendiert. Ein Filterplättchen erhielt 90 μL dieser Lösung und wurde nach Trocknung unter den sterilen Arabidopsis-Samen auf einer Schrägagarkultur platziert.

Als Kontrolle diente ein mit 90 µL Methanol getränktes, trockenes Filterplättchen.

Des Weiteren wurden Vergleichsexperimente mit IAA ($\underline{78}$) auf Schrägagar mit Arabidopsis-Samen durchgeführt. Dazu wurden Filterplättchen mit 180 µL einer 10 µM oder einer 100 µM ethanolischen IAA-Lösung getränkt. Als Kontrolle diente ein mit 180 µL Ethanol versehenes Filterpapierplättchen.

Die Inkubation dieser Agarplatten erfolgte dann vertikal für drei Wochen im Brutraum bei 8 Stunden Licht und 21°C.

Zur Auswertung der Experimente wurde mithilfe des Programms *ImageJ*¹⁴⁰ die Länge des Hypotocyls der Pflanzen gemessen. Das Hypotocyl ist die Bezeichnung für das Mittelstück zwischen den oberen Blättern und dem unteren Wurzelteil eines Keimlings.

In allen hier beschriebenen Experimenten (PI1-PI4) war ein deutlich verzweigtes Wurzelwachstum (kurz und buschig) der Arabidopsis-Pflanzen zu verzeichnen. Der stärkste Effekt war bei Anwendung des Ethylacetat-Extrakts auf Filterpapierplättchen zu beobachten. Das bestätigte die Idee, dass es sich um eine diffusionsfähige Substanz als Verursacher des induzierten Wurzelwachstums der Pflanzen handelte, wobei das positive Vergleichsexperiment mit IAA (<u>78</u>) auf dessen Anwesenheit hindeutete.

Abbildung 34 zeigt den Effekt von *P. indica* auf das Wurzelwachstum von *Arabidopsis thaliana* auf Schrägagar nach vierwöchiger Inkubation. Der linke Teil des Bildes zeigt das stark verzweigte Wurzelwachstum der Pflanzen durch Besiedlung der Wurzeln mit *P. indica*-Mycel. In der Mitte ist zu erkennen, wie die Wurzeln trotz Distanz zum Pilz noch ein verzweigtes Wurzelwachstum aufweisen. Ganz rechts ist dem Bild das normale Wachstum von *Arabidopsis thaliana* zu entnehmen.



Abbildung 34: *Arabidopsis thaliana*: induziertes Wurzelwachstum durch *P. indica* nach 4 Wochen Inkubation. Links: Stark verzweigtes Wurzelwachstum durch Interaktion mit *P. indica*. Rechts: Normales, langes und wenig verzweigtes Wurzelwachstum ohne *P. indica*. Quelle: A. SIRRENBERG.

Nach diesen Vorversuchen stand die Analyse und die Charakterisierung des diffusionsfähigen Metaboliten an. Dazu sollten Ethylacetat-Extrakte des Pilzes *P. indica* per HPLC-ESI-MS im AK GROND untersucht und aufgrund der vermuteten Anwesenheit von Auxin nach <u>78</u> analysiert werden. Alle Proben wurden normalerweise in einer Lösung mit 100% Methanol (HPLC-grade) für die Analytin vorbereitet. Gleichzeitig sollte eine dünnschichtchromatographische Analyse der Ethylacetat-Extrakte sowie der wässrigen Pilz-Kulturfiltrate unter eines speziellen Anfärbereagenzes für Indole zum Nachweis von <u>78</u> erfolgen.

6.3 HPLC-ESI-MS-Analytik

Experiment A1

Im ersten Versuch wurden die wässrigen Kulturfiltrate des Pilzes vermessen. Als Kontrolle dienten zum einen das Kulturfiltrat des Mediums ohne Pilz und zum anderen eine Lösung von reinem IAA (<u>78</u>) in einer Konzentration von 1 mg/mL in Methanol.

- 1. Nährmedium M⁺ ohne Pilz
- 2. *P. indica* Kulturfiltrat nach Zentrifugation
- 3. *P. indica* Kulturfiltrat nach Zentrifugation mit anschließender Sterilfiltration
- 4. IAA (c = 1 mg/mL)

<u>**78**</u> mit einer exakten Masse von 175 ließ sich problemlos aus der 1 mg/mL konzentrierten Lösung per HPLC-ESI-MS nachweisen. Im positiven Modus zeigte sich der Auxin-Peak mit $m/z = 176.07 [M+H]^+$ bei einer Retentionszeit von Rt = 8.2 min. Im negativen Modus ließ sich <u>**78**</u> überraschenderweise nicht massenspektrometrisch detektieren.

Beim Vergleich mit den erhaltenen Auxin-Daten wurde für die anderen Proben keine nachweisbare Auxinproduktion festgestellt, bei der Retentionszeit von ca. 8 min fand sich keine entsprechende Auxinmasse.

Experiment A2

Da der Pilz *Piriformospora indica* im M⁺-Medium (= M2-Medium) ein geringes Wachstum zeigte, wurden vergleichend Kulturen im MS2-Medium (Murashige & Skoog Medium) angesetzt. Dieses Medium enthält jedoch 20 g/L Saccharose. Die reinen wässrigen

Kulturfiltrate sind somit für die Analytik unbrauchbar, was auch der Grund für die ausweichende Kultivierung im M^+ -Medium war.

Es erfolgte HPLC-ESI-MS-Analytik folgender Proben in Methanol (je 200 µL):

- 1. lyophilisiertes Medium M⁺
- 2. lyophilisiertes *P. indica* Kulturfiltrat aus M⁺-Medium
- 3. lyophilisiertes Medium MS2
- 4. lyophilisiertes *P. indica* Kulturfiltrat aus MS2-Medium
- 5. Ethylacetat-Extrakt des MS2-Mediums
- 6. Ethylacetat-Extrakt des *P. indica* Kulturfiltrats aus MS2-Medium
- 7. Ethylacetat-Extrakt des M⁺-Mediums
- 8. Ethylacetat-Extrakt des *P. indica* Kulturfiltrats aus M⁺-Medium

Das Ausgangsmaterial der Lyophilisat-Proben waren je 500 µL Kulturfiltrat des Pilzes in dem jeweiligen Medium. Für die Ethylacetat-Extrakte wurden 5 mL Kulturfiltrat mit 5 mL Ethylacetat extrahiert und eingedampft.

Die für die Analytik ausschlaggebende Saccharose-Problematik der Proben aus dem MS2-Medium wurde durch Analyse der Proben in reinem Methanol umgangen, in welchem Saccharose weitestgehend unlöslich war. Bei den Ethylacetat-Extrakten stellte sich die Problematik durch die Unlöslichkeit der Saccharose in Ethylacetat nicht.

Die Auswertung der Proben zeigte jedoch wiederholt keine, per ESI-MS detektierbare Auxin-Masse. Es konnten auch keine anderen Metaboliten, ähnlich des Auxins, detektiert werden.

Experiment A3

Der Pilz wurde nochmals in M⁺-Medium kultiviert und die Ethylacetat-Extrakte per HPLC-ESI-MS analysiert. Zusätzlich folgte Analyse einer IAA (78)-Probe in einer Konzentration von 3 mg/mL. Das Probenvolumen betrug für die Messungen jeweils 200 µL.

- 1. Ethylacetat-Extrakt des M⁺-Mediums
- 2. Ethylacetat-Extrakt des *P. indica* Kulturfiltrats aus M⁺-Medium
- 3. IAA (c = 3 mg/mL)

Ausgangsmaterial für die Ethylacetat-Extrakte waren wieder 5 mL Kulturfiltrat.

Durch die höhere Konzentration der IAA-Probe zeigte sich bei dieser Messung nicht nur der IAA-Molekülpeak im positiven Modus, sondern es war auch das Massensignal im negativen Modus zu finden $m/z = 174.03 [M-H]^{-}$ bei Rt = 8 min.

Der Ethylacetat-Extrakt des Pilzkulturfiltrats zeigte wieder keine Auxin-ähnliche Masse.

Experiment A4

Da in den bisherigen Experimenten kein Auxin ($\underline{78}$) oder ähnliche andere Substanzen aus den Kulturfiltraten oder den Ethylacetat-Extrakten nachgewiesen werden konnte, reines $\underline{78}$ jedoch detektierbar war, wurde versucht, die genaue Nachweisgrenze für $\underline{78}$ zu bestimmen.

In den Biotests zeigten die Kontrollversuche ab einer Konzentration von 1 μ M IAA einen Effekt auf das Wurzelwachstum. Deutlich war der Effekt bei einer IAA-Konzentration von 10 μ M im Nährmedium.

Deshalb wurden eine 1 μ M und eine 10 μ M IAA-Lösung in Ethylacetat und zum Vergleich eine 1 μ M und eine 10 μ M Lösung von IAA im M⁺-Medium hergestellt.

Es wurden insgesamt folgende Proben vermessen (je 100 μ L):

- 1. M^+ -Medium mit 1 μ M IAA
- 2. M^+ -Medium mit 10 μ M IAA
- 3. M^+ -Medium
- 4. $1 \mu M$ IAA in Ethylacetat
- 5. $10 \,\mu\text{M}$ IAA in Ethylacetat

Die Analyse ergab, dass IAA ($\underline{78}$) aus einer 10 μ M Lösung massenspektrometrisch bereits nicht mehr nachgewiesen werden kann. Zwar ist der UV-Peak noch zu erkennen, aber die Masse von $\underline{78}$ kann weder im positiven noch im negativen Modus detektiert werden. Die Messung der 1 μ M IAA-Lösung lässt nicht einmal mehr den UV-Peak von $\underline{78}$ erkennen.

Experiment A5

P. indica-Ethylacetat-Extrakte vom Kulturfiltrat im M⁺-Medium wurden per HPLC-ESI-MS analysiert. Das Pilz-Kulturfiltrat wurde bei diesem Versuch im sauren Milieu mit Ethylacetat extrahiert, was bei der Extraktion der vorigen Proben nicht der Fall war. Somit ist denkbar, dass IAA (**78**) im Kulturfiltrat der Proben von Experiment A1-A3 als Salz vorlag und nicht in

die Ethylacetat-Phase überging. Grundlage für die Extraktion waren wieder 5 mL Pilz-Kulturfiltrat.

Proben aus gleichem Ansatz, aber unterschiedlichen Kolben (je 100 µL):

- 1. Ethylacetat-Extrakt (saures Milieu) 1 (P1)
- 2. Ethylacetat-Extrakt (saures Milieu) 2 (P2)
- 3. Ethylacetat-Extrakt (saures Milieu) 3 (P3)

Die HPLC-ESI-MS-Analyse zeigte jedoch wieder keine detektierbare Auxin-ähnliche Masse.

6.4 Dünnschichtchromatographische Analytik

Die Proben aus Experiment A4 wurden neben der HPLC-ESI-MS-Analyse auch mittels Dünnschichtchromatographie analysiert. Dazu wurden ca. 10 µL der einzelnen Proben auf eine Kieselgel-DC-Alufolie aufgetragen, in Chloroform/Methanol/Wasser 84:14:1 entwickelt und mit dem Salkowski-Reagenz (Nr. 131) visualisiert. Das Salkowski-Reagenz eignet sich speziell für den Nachweis von Indolen, die damit rosa gefärbt werden.

Abbildung 35 zeigt von links nach rechts folgende Proben: A) M⁺-Medium, B) M⁺-Medium mit 1 μ M IAA, C) 1 μ M IAA (<u>78</u>) in Ethylacetat, D) M⁺-Medium mit 10 μ M IAA, E) 10 μ M IAA in Ethylacetat.



Abbildung 35: DC-Analyse von IAA (<u>78</u>) in unterschiedlichen Konzentrationen: A) M⁺-Medium, B) M⁺-Medium mit 1 μ M IAA, C) 1 μ M IAA (<u>78</u>) in Ethylacetat, D) M⁺-Medium mit 10 μ M IAA, E) 10 μ M IAA in Ethylacetat. IAA (<u>78</u>) ist auf dem Dünnschichtchromatogramm sehr gut als rosa-färbende Zone zu erkennen. Aus einer 10 μ M Lösung ist IAA per dünnschichtchromatographischer Analyse noch recht gut zu detektieren, die aufgetragene 1 μ M Lösung zeigt jedoch nur noch eine sehr schwach rosa gefärbte IAA-Zone.

In Abbildung 36 wurden die Proben aus Experiment A5 im Vergleich zu den unterschiedlich konzentrierten IAA-Lösungen dünnschichtchromatographisch analysiert. Von links nach rechts sind folgende Proben aufgetragen worden: A) M⁺-Medium, B) 1 μ M IAA in Ethylacetat, C) 10 μ M IAA in Ethylacetat, D) M⁺-Medium mit 1 μ M IAA, E) M⁺-Medium mit 10 μ M IAA, F) Ethylacetat-Extrakt (saures Milieu) 1 (P1), G) Ethylacetat-Extrakt (saures Milieu) 2 (P2), H) Ethylacetat-Extrakt (saures Milieu) 3 (P3).



Abbildung 36: DC-Analyse von IAA (<u>78</u>) im Vergleich zu den Extrakten aus Experiment A5: A) M⁺-Medium, B) 1 μ M IAA in Ethylacetat, C) 10 μ M IAA in Ethylacetat, D) M⁺-Medium mit 1 μ M IAA, E) M⁺-Medium mit 10 μ M IAA, F) Ethylacetat-Extrakt (saures Milieu) 1 (P1), G) Ethylacetat-Extrakt (saures Milieu) 2 (P2), H) Ethylacetat-Extrakt (saures Milieu) 3 (P3).

In den Ethylacetat-Extrakten des Pilzes (P1-P3) ist im Vergleich zu den aufgetragenen IAA-Lösungen keine rosa färbende Zone zu erkennen.
6.5 Problemlösung durch GC-MS-Analytik

Aufgrund der Ergebnisse der Biotests wurde die Anwesenheit eines Auxins angenommen. Da die angewendeten Analysemethoden offensichtlich nicht empfindlich genug waren, wurde die Möglichkeit einer GC-MS-Analytik im AK KARLOVSKY in Betracht gezogen. Die Arbeiten dazu wurden von A. SIRRENBERG und C. GÖBEL durchgeführt und erbrachten letztlich den Nachweis der IAA-Produktion durch *P. indica*. Bei einer Retentionszeit von 13 min wurde <u>78</u> per GC-MS detektiert.

Zur Quantifizierung der produzierten IAA (<u>78</u>) wurden Analysen mit einem empfindlicheren HPLC-ESI-MS/MS-Gerät in Darmstadt vorgenommen. Durch Vergleich der Auxin-Peakintegrale der analysierten *P. indica* Extrake mit einer Eichkurve, erstellt durch HPLC-ESI-MS-Messung reiner IAA, konnte die gebildete Menge an <u>78</u> bestimmt werden. In einer 4.5 Wochen alten *P. indica* Kultur im M⁺-Medium wurde daraus eine Konzentration von 1.36 μ M Auxin bestimmt. Des Weiteren wurde bei diesen Messungen die Anwesenheit zweier weiterer möglicher Phytohormone, Abscisinsäure (<u>80</u>) und Jasmonsäure (<u>81</u>) (Abbildung 37), mit auxin-ähnlichem Effekt auf Pflanzen ausgeschlossen.



Abbildung 37: Die Phytohormone Abscisin- (80) und Jasmonsäure (81).

6.6 Diskussion der Ergebnisse und Ausblick

In fünf verschiedenen HPLC-ESI-MS Messreihen wurden sowohl wässrige Kulturfiltrate als auch Ethylacetat-Extrakte des Pilzes *P. indica* auf gebildetes Auxin (<u>78</u>) überprüft. Es konnte jedoch in keiner der aufgeführten Proben <u>78</u> nachgewiesen werden, obwohl die Ergebnisse

der Biotests für das Vorhandensein von <u>78</u> sprachen. Reine IAA (<u>78</u>) war in einer Konzentration von 1 mg/mL noch sehr gut zu detektieren. Die Vermutung, evtl. gebildete IAA sei durch nicht-saure Extraktionsmethoden möglicherweise nicht in die Ethylacetatphase übergegangen, konnte durch vergleichende Extraktion unter sauren Bedingungen widerlegt werden.

Da die Biotests jedoch recht eindeutige Hinweise auf das Vorhandensein von Auxin oder einem auxin-ähnlichen Derivat gaben, wurde davon ausgegangen, dass letztlich die Konzentration eines gebildeten Auxins (**78**) in den Kulturfiltraten so niedrig war, dass sie weit unterhalb der Nachweisgrenze der HPLC-ESI-MS bzw. der Dünnschichtchromatographie lag. In den Biotests war bereits eine Konzentration von 1 μ M IAA (**78**) ausreichend für einen sichtbaren Effekt am Wurzelwachstum der Pflanzen. 1 μ mol IAA pro Liter entspricht umgerechnet einer Menge von 175 μ g/L. Die Proben zur Extraktion hatten ein Volumen von 5 mL, d.h. darin wäre minimal eine Menge von 0.875 μ g IAA enthalten, um den beobachteten Effekt am Wurzelwachstum auszulösen. Für die Messungen per HPLC-ESI-MS wurden die Extrakte in 100 μ L Methanol gelöst. Es entsteht also eine minimale Endkonzentration von 8.75 μ g/mL in den Proben. Bei einer Konzentration von 1 mg/mL konnte **78** noch gut detektiert werden. Die Menge an Auxin (**78**) in den Extrakten läge somit erheblich unterhalb der Nachweisgrenze der HPLC-ESI-MS in Göttingen und wäre mittels dieser und der dünnschichtchromatographischen Analytik nicht nachweisbar.

Da die Analyse per GC-MS eine um einiges empfindlichere Messmethode für so eine Problematik darstellt, wurde beschlossen, die Extrakte im Vergleich zu reiner IAA ($\underline{78}$) per GC-MS zu vermessen (AK KARLOVSKY). Auf diese Weise konnte tatsächlich $\underline{78}$ in den *P. indica* Extrakten nachgewiesen werden.

Das ESI-MS-Gerät in Darmstadt zeigte höhere Empfindlichkeit als das Gerät in Göttingen, weshalb weiterführende Analysen dort durchgeführt worden sind. Quantifizierung per HPLC-ESI-MS/MS-Analyse in Darmstadt ergab eine Konzentration von $1.36 \,\mu$ M IAA in den *P. indica* Kulturen. Dieser Wert bestätigt die vorherige Annahme, dass die IAA-Konzentration der im AK GROND bearbeiteten Proben weit unter der Nachweisgrenze lag. Mit dieser Methode konnte auch die Anwesenheit der denkbaren Phytohormone Abscisinsäure (**80**) und Jasmonsäure (**81**) ausgeschlossen werden.

Die hiermit nachgewiesene auxinproduzierende Fähigkeit des Pilzes *Piriformospora indica* ist eine völlig neuartige Erkenntnis und für diese Art von Pilzen bisher nicht bekannt¹⁴¹.

Da der Pilz *P. indica* phylogenetisch stark mit den mycorrhizalen Endophyten von Orchideen verwandt ist, stellt sich nun die Frage, ob eventuell auch bei anderen Beispielen eine Auxinproduktion der Pilze eine Rolle bei diesen mycorrhizalen Symbiosen spielt.

Unabhängig davon würde interessieren, ob IAA ($\underline{78}$) der einzige Wachstumsfaktor in *P. indica* darstellt, oder ob noch andere Induktoren für das Pflanzenwachstum von diesem Pilz produziert werden. Aufgrund bisheriger Forschungsergebnisse konnte hierfür jedoch kein Hinweis gefunden werden.

7 Zusammenfassung der Ergebnisse

7.1 Untersuchungen zur Ansamitocin-Biosynthese

7.1.1 Heterologe Expression der Diketide in C. glutamicum

Um Aufschluss über die Ansamitocin-Biosyntheseschritte zu erhalten, wurden mit *C. glutamicum* R163 pWLQ2c: asm A (Modul 1)/*TE*, einem Konstrukt mit allen genetischen Informationen für den Aufbau des Diketids, diverse Fütterungsexperimente in Flüssigkultur durchgeführt (X1-X11). In den Versuchen X1-X6 sowie in X8 und X10 wurde jeweils der natürliche Ansamitocin-Vorläufer AHBA (**29**) gefüttert. Die Fütterung des stammfremden Vorläufers 3-Amino-4-chlorbenzoesäure (**33**) wurde in den Experimenten X7 und X9-X11 durchgeführt.

Die Zugabe des natürlichen Vorläufers <u>29</u> führte im Experiment X1 zur erfolgreichen Produktion des acetylierten Diketids <u>35</u>, in den Experimenten X3-X5 und X8 konnte das nicht-acetylierte Diketid <u>34</u> nachgewiesen werden. Durch Zufütterung des stammfremden Vorläufers <u>33</u> konnte in Versuch X9 ebenfalls das jeweilige nicht-acetylierte Diketid <u>36</u> per HPLC-ESI-MS nachgewiesen werden, während durch die Fütterung des SNAC-Esters von <u>33</u> keine Diketidproduktion verzeichnet werden konnte.

Mit diesen Versuchen konnte gezeigt werden, dass eine erfolgreiche heterologe Expression von asmA (Modul 1)/*TE* zur Ausbildung der Diketide im Wirt *C. glutamicum* möglich ist. Die Loading domain ist intakt und prozessiert die Vorläufer <u>29</u> und <u>33</u> zum entsprechenden Diketid. Das Konstrukt asm A (Modul 1 und 2)/*TE* steht zur Ausbildung des Triketids bereits zur Verfügung. Nach gelungener Transformation in *C. glutamicum* stehen weitere Fütterungsexperimente an.

Die Proteinanalytik zu den Diketidexperimenten konnte Aufschluss über die minimale Produktionsmenge der Diketide geben. Ein Zellaufschluss mit anschließender SDS-PAGE zeigte die Aggregation des PKS-Proteins für die Diketidbiosynthese im Zellmaterial. Der Grund für die Überproduktion wird in einem zu starken Promotor vermutet. Experimente zur Klonierung des schwächeren Arabinose-Promotors stehen noch aus. Ein anderer Grund für die geringen Produktionsmengen der Diketide könnte ein fehlerhafter Phosphopantetheinarm des Acyl Carrier Proteins (ACP) der PKS sein. Dieser Arm ist für die Ladung des Vorläufermoleküls an die PKS-Enzyme notwendig und wird in Corynebakterien durch eine spezifische Phosphopantetheinase (PPTase) ans ACP angebracht. Möglicherweise ist die PPTase nur auf die PKS-Enzyme der Corynebakterien spezialisiert und nicht in der Lage den Phosphopantetheinarm auf das ACP der Ansamitocin-PKS zu transferieren. Weitere Experimente zur Lösung dieses Problems konnten bisher nicht abgeschlossen werden.

7.1.2 Vorläufer-dirigierte Biosynthese mit der *Actinosynnema pretiosum* Mutante HGF073

Die Produktion des 20-Desmethoxyansamitocins ($\underline{42}$) konnte reproduzierbar durch Vorläuferdirigierte Biosynthese mit der *A. pretiosum*-Knockout-Mutante HGF073 unter Fütterung des stammfremden Vorläufers 3-Amino-4-chlorbenzoesäure ($\underline{33}$) erreicht werden. Da seit der Entdeckung der Ansamitocine ($\underline{20}$) ein weltweites Problem mit deren geringer Produktion bestand, wurde sich intensiv mit produktionssteigernden Experimenten befasst. Zur Produktionssteigerung von $\underline{42}$ wurden verschiedene Optimierungsansätze durchgeführt:

- Fermentation unter DMSO-Zusatz
- Fermentation unter XAD-Zusatz
- Wechsel der Schüttelbedingungen von 225 rpm auf 120 spm
- Fermentation unter kombiniertem Zusatz von DMSO und XAD
- Fermentation mit Zusatz von sterilem Pilzkulturfiltrat
- Kultivierung in Kolben mit und ohne Schikane
- Nährmedienwechsel
- Kultivierung im Airliftfermenter
- Wechsel der Kultivierungs- und Fütterungsbedingungen

Der komplette Wechsel der Kultivierungs- und Fütterungsbedingungen mit dem Einsatz eines speziellen Nährmediums führte zur gesteigerten Produktion von <u>42</u>. Alle anderen Optimierungsversuche zeigten zwar Produktion von <u>42</u>, jedoch in ungenügender Ausbeute. Erstmals konnte vom 20-Desmethoxy-Derivat <u>42</u> genügend Substanzmenge für Bioaktivitätstests erhalten werden, welche eine sehr gute Antitumoraktivität von <u>42</u>, insbesondere gegen Leukämie und Eierstockkrebs, ergaben.

Auch das Detektionsproblem des Derivats <u>42</u> konnte untersucht werden. Die Anfärbbarkeit (Molybdatophosphorsäure) und die UV-Löschung von <u>42</u> ist etwas schlechter als die des AP-3 (<u>27</u>). Eine ausreichende visuelle Detektion per UV-Licht oder Färbung im Dünnschichtchromatogramm ist nur ab einer Konzentration von 1 mg/mL möglich.

Die Fütterung der stammfremden Vorläufer 3-Amino-4-hydroxybenzoesäure (<u>46</u>), 3-Amino-4-methylbenzoesäure (<u>47</u>), 3,4-Diaminobenzoesäure (<u>48</u>), 3,5-Diaminobenzoesäure (<u>49</u>) und 3-Aminobenzoesäure (<u>50</u>), bestätigte eine hohe Substratspezifität der PKS-Loading domain und führte nicht zur Produktion weiterer Ansamitocin-Derivate.

7.2 *Kitasatospora puttelickiae* F98-18: Pilzinduzierte Sekundärstoffproduktion



Die pilzinduzierte Produktion des mit Ehrlichs Reagenz gelb färbenden Metaboliten ($R_f = 0.42$, Chloroform/Methanol 95:5) vom Stamm F98-18 konnte in fünf Fermentationen durch Zusatz von *Mucor* sp.-Sterilfiltrat nicht reproduzierbar erreicht werden, da der gelb färbende Metabolit ein vermutlich sehr instabiles Produkt darstellt.

Eine separate Kultivierung des Pilzes *Mucor* sp. zeigte nur eine miminale Bildung eines instabilen, gelb färbenden Metaboliten ($R_f = 0.42$). Die Pilzzugabe wirkte sich offensichtlich stark produktionssteigernd auf diesen Metaboliten aus.

Ein weiterer, gelb färbender Metabolit ($R_f = 0.38$, Chloroform/Methanol 95:5) wurde zu isolieren versucht. Eine 2-dimensionale Dünschichtchromatographie zeigte den Zerfall von zwei gelb färbenden Metaboliten zu der Verbindung mit dem R_f -Wert von 0.38.

Ein Vergleich mit AHBA (29) konnte diese Verbindung als mögliche gelb färbende Substanz durch abweichendes Laufverhalten im Dünnschichtchromatogramm ausschließen. Vergleichende Analysen mit Anthranilsäure (59) zeigten zunächst keine Ähnlichkeit mit dem gelb färbenden Metaboliten ($R_f = 0.38$). Mit einer chemischen Derivatisierung (Methylierung und Acetylierung) eines vorgereinigten F98-18-Extrakts sollte die Anwesenheit von <u>59</u> überprüft werden. Massenspektrometrisch konnte in den Derivatisierungsprodukten des vorgereinigten Extrakts methylierte bzw. acetylierte Anthranilsäure nachgewiesen werden. ¹H-NMR-Experimente dieser Derivatisierungsprodukte zeigten jedoch keine Signale im aromatischen Bereich und konnten das Vorhandensein von Anthranilsäure (<u>59</u>) nicht zweifelsfrei bestätigen.

Der gelb färbende Metabolit mit dem R_f -Wert von 0.38 zeigte in vergleichender DC-Analyse unter sauren und basischen Bedingungen gleiches Laufverhalten und gleiche UV-Aktivität zu Anthranilsäure (<u>59</u>). Nach Messung eines ¹H-NMR-Spektrums wurde die Substanz als Anthranilsäure bestimmt.

Unklar blieb jedoch in den vorliegenden Untersuchungen die Identität des durch Pilzsterilfiltrat induzierten, offensichtlich äußerst instabilen Metaboliten ($R_f = 0.42$).

7.3 Streptomyces antimycoticus FZB53

Der in einem von E. KOCH (Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft) durchgeführten Screening aufgefallene Stamm FZB53 zeigte außergewöhnliche Aktivität gegen die Erreger *T. caries* (Weizensteinbrand) und *F. culmorum*. Nach Ethylacetat-Extraktion von Kulturfiltrat und Zellmaterial konnte die aktive Substanz (<u>69</u>) dünnschichtchromatographisch lokalisiert werden ($R_f = 0.64$, braune Anfärbung mit Orcin, wasserabweisend).

Die gesuchte Verbindung (<u>69</u>) wurde durch Entwicklung einer Isolierungsstrategie in reiner Form und guter Ausbeute (86 mg/L) erhalten und analysiert. Eine hochauflösende ESI-



Massenspektrometrie lieferte die Molmasse von 724.5 g/mol mit der Summenformel $C_{40}H_{68}O_{11}$, die durch Abgleich mit Datenbankvorschlägen in die Klasse der Polyether eingeordnet werden konnte. Von den insgesamt sieben Strukturvorschlägen konnten

vier anhand von enthaltenen Doppelbindungen ausgeschlossen werden, da das NMR-

Spektrum des aktiven Prinzipes keine Signale im Doppelbindungsbereich aufwies. Bei den übrigen Strukturvorschlägen aus der Datenbank handelte es sich um Nigericin ($\underline{71}$) und zwei seiner Stereoisomere $\underline{76}$ und $\underline{77}$.

Eine abschließende Strukturaufklärung war auch durch Vergleich mit Literaturdaten von <u>71</u> durch Überlagerung zu vieler Signale im aliphatischen Bereich nicht möglich. Auch die chemische Derivatisierung von <u>69</u> (Methylierung und Acetylierung) konnte keine Anhaltspunkte für die Aufklärung der Struktur liefern.

Neben <u>69</u> konnte durch Etablierung einer Aufreinigungsmethode eine durch die aktive Verbindung (<u>69</u>) überlagerte (beiden weisen identischen R_f -Wert von 0.64 auf), UV-



löschende Substanz isoliert und als Geldanamycin (<u>43</u>) bestimmt werden.

Die Testung auf Bioaktivität der beiden isolierten Substanzen <u>69</u> und <u>43</u> im Gemisch (synergistische Effekte) steht noch aus. Die biologische Testung von <u>69</u> zeigte die erwartete, starke Aktivität gegen *T. caries* (Weizensteinbrand) und die etwas schwächere Aktivität gegen *F. culmorum*. Mit der Isolierung der gesuchten, hochaktiven Substanz (<u>69</u>) konnte ein gewinnbringender Beitrag zum biologischen Pflanzenschutz geleistet werden.

7.4 Induziertes Pflanzenwurzelwachstum durch P. indica



Abbildung 38: Links: Induziertes Wurzelwachstum bei *Arabidopsis thaliana* durch Interaktion mit dem Auxin-produzierenden Pilz *Piriformospora indica*. Links: Normales Wurzelwachstum bei *A. thaliana* ohne Interaktion mit *P. indica*. Quelle: A. SIRRENBERG.

Für das induzierte, verzweigte Wurzelwachstum der Modellpflanze Arabidopsis thaliana, ausgelöst durch die Anwesenheit des Pilzes *Piriformospora indica*, konnte ein diffusionsfähiger Metabolit verantwortlich gemacht werden.

Eine Untersuchung der Kulturfiltrat-Extrakte des Pilzes per HPLC-ESI-MS sollte Aufschluss über die vermutliche Anwesenheit des charakteristischen Wachstumsindikators Auxin (78) geben. Weder die HPLC-ESI-MS-Analyse der wässrigen Kulturfiltrate, noch die Kontrolle deren Ethylacetat-Extrakte erbrachte einen Nachweis für das Vorhandensein von 78. Die Vermutung, ein eventuell vorhandenes Auxin sei durch Extraktion bei alkalischem pH-Wert nicht in die Ethylacetatphase aufgenommen worden, konnte durch Extraktion des Kulturfiltrats unter sauren Bedingungen widerlegt werden, denn auch in diesem Extrakt fand sich per HPLC-ESI-MS kein Auxin. Vergleichende dünnschichtchromatographische Kontrollen zeigten ebenso kein 78 in den verschiedenen Extrakten. Eine Berechnung der minimalen Konzentration eines möglicherweise vorhandenen Auxins ergab eine Menge weit unterhalb der Nachweisgrenze von DC- und HPLC-ESI-MS-Analytik. Abschließend konnte 78 mit der empfindlicheren GC-ESI-MS-Methode nachgewiesen werden (AK KARLOVSKY).

Hiermit konnte erstmals für die seit längerer Zeit bekannte wachstumsfördernde Eigenschaft des Pilzes *P. indica* der charakteristische Wachstumspromotor Auxin ($\underline{78}$) verantwortlich gemacht werden.

B EXPERIMENTELLER TEIL

1 Allgemeines

1.1 Instrumentelle Analytik

Massenspektren:

ESI-MS: *Finnigan* LC-Q. EI-MS: *Finnigan* MAT 95, 70 eV. Hochauflösungen wurden mit Perfluorkerosin als Vergleichssubstanz gemessen. DCI-MS: *Finnigan* MAT95 200 eV (Reaktandgas: NH₃). HR-ESI-MS: *Bruker* Apex-Q III, 7 Tesla.

Infrarotspektren:

Alle IR-Spektren wurden mit einem FT-IR Spektromenter der Firma *Perkin-Elmer* Modell 1600 gemessen. Die Substanzen wurden in Form von KBr-Presslingen vermessen. Abkürzungen: br = breit, sh = Schulter.

UV-Vis-Spektren:

Alle Elektronenspektren wurden mit einem Spektrometer der Firma *Varian* Modell Cary 3E gemessen. Die UV-Spektren wurden im sauren und basischen Milieu nach Zugabe von einem Tropfen 2 N HCl bzw. 2 N NaOH zu 2 mL einer methanolischen Lösung der Substanzen vermessen. Die Wellenlänge (λ) ist in ⁸⁶ angegeben, sh = Schulter. Der molare Extinktionskoeffizient ε ist in [1000 cm² mol⁻¹] angegeben, und wurde unter Berücksichtigung gerätespezifischer Konstanten mit nachfolgender Gleichung berechnet:

$$\mathcal{E}[1000 \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1}] = \frac{E * Molmasse * 10}{Einwaage[mg]}$$

Drehwerte:

Die Drehwerte wurden mit einem *Perkin-Elmer* Polarimeter Modell 343 gemessen und sind in $[10^{-1}$ grad cm²g⁻¹] angegeben. Die Konzentration c ist in [g/100 mL] aufgeführt.

¹H-NMR-Spektren:

Varian Inova-600 (600 MHz), *Varian* Mercury 300 (300 MHz), *Bruker* AMX 300 (300 MHz). Chemische Verschiebungen wurden in δ -Werten (ppm) relativ zum jeweiligen Lösungsmittel als internem Standard angegeben; Kopplungskonstanten (*J*) in Hertz (Hz). Soweit nicht anders angegeben, handelt es sich bei den Kopplungen um skalare ³*J*(H,H)-Kopplungen. Die ¹H-NMR-Spektren wurden näherungsweise als Spektren erster Ordnung interpretiert. Abkürzungen: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, dd = Dublett vom Dublett, dt = Dublett vom Triplett, tt = Triplett vom Triplett, qt = Quartett vom Triplett, m = Multiplett, br = breit.

¹³C-NMR-Spektren:

Varian Inova 600 (150.8 MHz), *Varian* Inova 500 (125.7 MHz). Alle chemischen Verschiebungen wurden in δ -Werten (ppm) relativ zum jeweiligen Lösungsmittel als internem Standard angegeben. Multiplizitäten wurden aus ${}^{1}J_{CH}$ -Korrelationsexperimenten oder APT-Spektren entnommen. Abkürzungen: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett, APT = <u>A</u>ttached <u>Proton Test</u>: CH (d) und CH₃ (q) stehen nach oben, C (s) und CH₂ (t) stehen nach unten.

2D-NMR-Spektren:

Abkürzungen: ${}^{1}H, {}^{1}H-COSY$ (${}^{1}H, {}^{1}H-\underline{Co}$ rrelated <u>spectroscopy</u>), HSQC (<u>H</u>eteronuclear <u>S</u>ingular Quantum <u>C</u>oherence), HMBC (<u>H</u>eteronuclear <u>M</u>ultiple <u>B</u>ond <u>C</u>onnectivity).

1.2 Chromatographische Methoden

Lösungsmittel:

Die Lösungsmittel für die Chromatographie wurden zuvor destilliert. Für die HPLC wurden nur analysenreine Lösungsmittel (*Merck*) und bidestilliertes Wasser verwendet. Vor Benutzung entgaste man die Lösungsmittel für die HPLC durch jeweils 15 Minuten langes Behandeln im Ultraschallbad und anschließendes Durchleiten von Helium.

Dünnschichtchromatographie (DC):

Merck HPTLC-Fertigplatten Kieselgel 60 F_{254} , 10 x 10 cm, Schichtdicke 0.2 mm; *Merck* DC-Alufolien Kieselgel 60 F_{254} , 20 x 20 cm, Schichtdicke 0.2 mm; *Merck* DC-Alufolien RP-18 F_{254s} , 20 x 20 cm, Schichtdicke 0.2 mm. Angegeben sind R_f-Werte (Laufhöhe relativ zur Laufmittelfront).

Anfärbereagenzien:

Nach *Merck*, Anfärbereagenzien für die Dünnschichtchromatographie¹⁴². Die DC-Platten wurden nach dem Ansprühen auf ca. 100°C erwärmt.

Anisaldehyd (Nr. 21):

1.0 mL Anisaldehyd in einer Lösung aus 85 mL Methanol, 10 mL Eisessig und 5 mL konz. Schwefelsäure.

Ehrlichs Reagenz (Nr. 91):

1 g 4-Dimethylaminobenzaldehyd in einer Lösung aus 25 mL Salzsäure (36 %) und 75 mL Methanol.

Orcin-Sprühreagenz (Nr. 120 – 122):

1 g Eisen-(III)-chlorid in 100 mL Schwefelsäure gelöst wurden mit gleichen Anteilen einer Orcinlösung (6 % in Ethanol) gemischt.

Molybdatophosphorsäure (Nr. 204):

Eine 5-10 %ige Lösung von Molybdatophosphorsäure in Ethanol.

Salkowski-Reagenz (Nr. 131):

3 mL einer wässrigen Eisen(III)-chloridlösung (1.5 M) werden mit 100 mL Wasser gemischt und 60 mL Schwefelsäure (konz.) zugegeben.

Adsorberharz:

Serva Amberlite[®] XAD-2.

Säulenchromatographie:

Für Schwerkraftchromatographie wurde *ICN* Kieselgel 60, 0.032-0.064 nm, verwendet. *Pharmacia* Sephadex LH-20 fand Einsatz bei der Gelchromatographie.

Mitteldrucksäulenchromatographie:

Pumpe: *Knauer* HPLC Pumpe 64, Säule: *Merck* Lobar[®]-Fertigsäule, Größe B (310 x 25 mm), Säulenfüllmaterial: *Merck* LiChroprep[®] RP-18 (40 - 63 µm).

High Performance Liquid Chromatography (HPLC):

Analytische/Semipräparative HPLC mit DAD-Kopplung:

HPLC A: Pumpe: *Jasco* PU-2080plus; Mischkammer: *Jasco* LG-2080-02; Entgaser: *Jasco* DG-2080-53; PDA-Detektor: *Jasco* MD-210plus; Autosampler: *Jasco* AS-2055plus mit *Rheodyne* 100 μL Aufgabeschleife; Säulenofen: *Jasco* CO-2065; Fraktionensammler: *Jasco* SF-3120; Datensystem: *Jasco* Borwin[®] mit *Jasco* Borwin[®] PDA Version 1.50 (Chromatographie), *Jasco* Borwin[®] HSS-2000 Version 3.5.2. (Steuerung).

Analytische HPLC mit ESI-MS-Kopplung:

HPLC B: Pumpe und Mischkammer: *Flux Instruments* Rheos 4000; Entgaser: *Flux Instruments* ERC-3415α; Autosampler: *Jasco* 851-AS mit variabler Aufgabeschleife
0-100 μL; PDA-Detektor: *Finnigan* Surveyor; Massendetektor: *Finnigan* LC-Q; Datensysteme: HPLC: *Flux Instruments* Janeiro (Steuerung); PDA- und MS-Detektor: *Finnigan* Xcalibur[®] Version 1.3 (Chromatographie- und Steuerung).

Präparative HPLC:

HPLC C: Pumpe: *Jasco* PU-1587 (0-50 mL/min), Mischkammer: *Jasco* 1000 μL; UV-Detektor: *Jasco* UV 1575; manuelles Probenaufgabeventil: *Rheodyne*, präparative 2.0 mL Aufgabeschleife; Datensystem: *Jasco* Borwin[®] Ver. 1.50 (Chromatographie), *Jasco* Borwin[®] HSS-200 Version 3.5.2 (Steuerung).

HPLC-Säulen:

Analytisch:

Säule A: (Standardsäule für HPLC-ESI-MS) Grom Superspher 100 RP-18, endcapped, 100 x 2 mm, 4 μ m, mit Vorsäule Grom Superspher 100 RP-18, endcapped, 10 x 2 mm, 4 μ m, Flussrate: 0.3 mL/min.

Säule B: Phenomenex Synergi Hydro-RP, 250 x 3 mm, 4 µ, Flussrate: 0.3 mL/min.

Semipräparativ:

Säule C: *Grom* Superspher 100 RP-18 endcapped, 100 x 8 mm, 4 μm, mit Vorsäule *Grom* Superspher 100 RP-18, endcapped, 10 x 8 mm, 4 μm, Flussrate: 2.5 mL/min.

Präparativ:

Säule D: *Grom* Superspher 100 RP-18, endcapped, 100 x 20 mm, 4 μm, Flussrate: 14.0 mL/min.

Programme für die HPLC:

Programm A: (Standardprogramm 1 für die Analytik) Laufmittelsystem: Wasser (A) / Methanol (B), jeweils mit 0.05 % Ameisensäure; Gradient: von 20 % auf 100 % B in 20 min, 5 min bei 100 % B, von 100 % auf 20 % B in 2 min, 8 min bei 20 % B.

Programm B: (Standardprogramm 2 für die Analytik) Laufmittelsystem: Wasser (A) / Acetonitril (B) mit 1 % Wasser, jeweils mit 0.01 % Trifluoressigsäure (TFA); Gradient: von 20 % auf 100 % B in 20 min, 5 min bei 100 % B, von 100 % auf 20 % B in 2 min, 8 min bei 20 % B.

Programm C: (Standardprogramm für die HPLC-ESI-MS) Laufmittelsystem: Wasser (A) / Methanol (B), jeweils mit 0.05 % Ameisensäure; Gradient: von 20 % auf 100 % B in 20 min, 10 min bei 100 % B, von 100 % auf 20 % B in 2 min, 8 min bei 20 % B.

Programm D: Laufmittelsystem: Wasser (A) / Acetonitril (B) mit 1 % Wasser; Gradient: von 20 % auf 100 % B in 20 min, 5 min bei 100 % B, von 100 % auf 20 % B in 2 min, 8 min bei 20 % B.

Programm E: Laufmittelsystem: Wasser (A) / Methanol (B); Gradient: von 20 % auf 100 %B in 20 min, 5 min bei 100 % B, von 100 % auf 20 % B in 2 min, 8 min bei 20 % B.

Programm F: (isokratisch) Laufmittelsystem: Wasser (A) / Acetonitril (B) mit 1 % Wasser; 65 % B.

1.3 Mikrobiologische Methoden

Alle mikrobiologischen Arbeiten wurden unter den üblichen sterilen Bedingungen durchgeführt¹⁴³.

1.3.1 Nährmedienbestandteile

Alle Nährmedien wurden durch Autoklavieren (feuchte Hitze, 121°C, 1 bar Überdruck, 30 min) sterilisiert. Der pH-Wert wurde vor der Sterilisation mit 0.5 N HCl bzw. 0.5 N NaOH eingestellt. Für alle Nährmedien wurde demineralisiertes bzw. bidestilliertes Wasser verwendet. Die Zugabe der jeweiligen Antibiotika erfolgte nach Sterilisation und Abkühlung der Medien auf ca. 40°C. Zur Herstellung von Agarplatten wurden 20 g/L Agar hinzugefügt.

Die verwendeten Nährmedienbestandteile wurden von folgenden Firmen bezogen: Malzextrakt, KH₂PO₄ und Mannit von der Fa. *Merck*, D-Glucose von der Fa. *Roth*, D-Maltose und Dextrin (aus Kartoffelstärke) von der Fa. *Fluka*, Agar und Trypton von der Fa. *Difco*, Glycerin von der Fa. *AppliChem*, Hefeextrakt von der Fa. *Oxoid*, Sojamehl fettarm von der Fa. *Henselwerk GmbH*, Proflo von der Fa. *Traders Protein*, CaCO₃ von der Fa. *AppliChem*, FeSO₄ * 7 H₂O von der Fa. *Fluka*, Kartoffelpüreepulver von der Fa. *Pfanni*.

Verwendete Nährmedien:

Korea-Medium: (HGF073) Dextrin 60 g/L, Proflo 5.25 g/L, K₂HPO₄ 0.3 g/L, D-Maltose 30 g/L, Hefeextrakt 4.5 g/L, FeSO₄*7 H₂O 2 mg/L, CaCO₃ 5 g/L.

M2: (Bakterien) Hefeextrakt 4 g/L, Malzextrakt 10 g/L, Glucose 4 g/L, pH 7.0.

M2 Glycerin: (Bakterien) Hefeextrakt 4 g/L, Malzextrakt 10 g/L, Glycerin 20 g/L, CaCO₃ 20 mg, pH 7.0.

LB_{kan}: (*C. glutamicum*) Trypton 10 g/L, Hefeextrakt 5 g/L, NaCl 10 g/L, Kanamycin 25μ g/mL Medium, pH 7.0 – 7.2.

SM: (Bakterien) Sojamehl fettarm 20 g/L, Mannit 20 g/L, pH 7.0.

Kartoffelpüree-Medium: (Bakterien und Pilze) *Pfanni* Kartoffelpüreepulver "Das Lockere" 40 g/L, Glucose 20 g/L.

1158: (Pilze) Malzextrakt 20 g/L, D-Glucose 10 g/L, Hefeextrakt 2 g/L, NH₄HSO₄ 0.5 g/L, pH 6.0.

Malzmedium: (Pilze) Malzextrakt 10 g/L, pH 7.0.

Antibiotika:

Kanamycin-Stammlösung: Lösung von 50 mg Kanamycin in 1 mL bidest. Wasser (steril).

Induktoren:

Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)-Stammlösung: 0.1 mol/L IPTG in bidest. Wasser.

1.3.2 Schüttler und Fermenter

Braun Certomat BS-1, *Braun* Inkubationsschüttelschrank BS4, *Braun* Certomat HK, *Braun* Certomat RM, Schüttelbrett Universität Göttingen (Längsschüttler mit 120 Schüttelbewegungen pro Minute (120 spm)), 10 L Airliftfermenter, gebaut: *Uni Dortmund*, *Fischer & Porter* Gasflowmeter (45711M), *The Analytical Development Co Ltd.* CO₂-Analysator, *Ingold* O₂-Elektrode.

1.3.3 Zentrifugen

Eppendorf Centrifuge 5415D, Sigma Labaratory Centrifuge 4K15.

1.3.4 Stammhaltung

Langzeiterhaltung in flüssigem Stickstoff:

Von einer gut bewachsenen Agarplatte wurden mit einseitig zugeschweißten und mit einem Bleistück beschwerten sterilen Polypropylen-Halmen Agarstückchen ausgestanzt, bis der Halm gefüllt war. Der Halm wurde in einen zweiten äußeren Halm gesteckt, der an beiden Enden zugeschmolzen wurde. Mehrere Halme in einem Kryoröhrchen wurden in einem Dewargefäß über flüssigem Stickstoff eingelagert.

Langzeiterhaltung als Lyophilisat:

Für die langfristige Lagerung wurden Sporen-Magermilchpulver-Lyophilisat-Einlagerungen hergestellt. Dafür wurden 2 mL einer Skim-Milk-Lösung auf einer Agarplatte verteilt und die Sporen dabei mit einer Impföse gelöst. Mit einer Spritze (1 mL, breite Kanüle, steril) wurde die Suspension (ca. 1 mL) aufgenommen, auf 4-5 kleine Glasampullen (steril) verteilt (je 0.2 mL) und eingefroren (-78°C, 5 min). Nach Lyophilisation über Nacht wurden die Ampullen unter Vakuum mittels einer Lötlampe abgeschmolzen und bei Raumtemperatur gelagert.

Skim-Milk Lösung für die Lyophilisat-Stammhaltung: 6.3 g skim milk powder in 100 mL bidest. Wasser auflösen.

Stammhaltung auf Agarplatten:

Für die Bakterien wurden die Nährmedien M2, SM und das Kartoffelpüree-Medium verwendet. Für die Stammhaltung der Pilze diente Medium 1158 sowie Malz- und Kartoffepüree-Medium. Die beimpften Agarplatten wurden 4-7 Tage bei 28°C kultiviert. Bewachsene Agarplatten wurden mit Verschlussfolie (*Brand* Parafilm[®] M) versiegelt und bei 4°C für maximal 4 Monate gelagert.

Stammhaltung als Sporensuspension (Glycerin-Einlagerung):

Bei Kultivierung der jeweiligen Mikroorganismen in Flüssigkultur wurde ein Teil der Kulturbrühe (1-3 Tage alt) für die Weiterverarbeitung zur Sporensuspension zurückbehalten. Man pipettierte ca. 0.8-1 mL der jeweiligen Kulturbrühe in ein 2 mL Kryoröhrchen und fügte dieselbe Menge an Glycerin (steril) hinzu. Die Suspension wurde gut durchmischt und anschließend bei -20 bis -80°C gelagert.

2 Heterologe Expression: Die Diketide

2.1 Kultivierung und Aufarbeitung

2.1.1 Kultivierung von C. glutamicum R163 pWLQ2c: asm A (Modul 1)/TE

Für die Vorkulturen dienten 300 mL Erlenmeyerkolben mit drei Schikanen, befüllt mit jeweils 33 mL LB_{kan}-Medium, verschlossen mit einer Schaumstoffkappe als Sterilbarriere. Nach Animpfen mit einer 100 μ L-Pipettenspitze einer Glycerineinlagerung der Zellen wurde 18 h bei 30°C und 180 rpm inkubiert. Die Fermentation der Hauptkulturen erfolgte in 1000 mL Erlenmeyerkolben, gefüllt mit je 250 mL LB_{kan}-Medium, verschlossen durch eine Schaumstoffkappe. Diese wurden mit 3 mL der Vorkultur angeimpft und bis zu einer optischen Dichte (bei 600 nm, OD₆₀₀) von 0.7-0.8 (nach ca. 3-4 h) bei 30 C und 180 rpm inkubiert. Zu dem Zeitpunkt folgte die Zufütterung der jeweiligen Vorläufer und anschließend wurde bei 28°C und 150 rpm noch maximal 120 h inkubiert.

2.1.2 Fütterung der Vorläufer

3-Amino-4-chlorbenzoesäure (3A4ClBA) (<u>33</u>)/3-Amino-4-chlorbenzoesäure-SNAC-Ester (3A4Cl-SNAC) (38)/3-Amino-5-hydroxybenzoesäure (AHBA) (29):

Die Synthese des 3-Amino-4-chlorbenzoesäure-SNAC-Esters (<u>38</u>) ist in Kapitel 3.1.3.1 beschrieben.

Die je nach Fermentationsansatz benötigte Menge der Säure (375 µmol pro 250 mL Nährmedium) wurde in DMSO gelöst und steril filtriert. Das Volumen der Lösung wurde so gewählt, dass 2 mL pro Schüttelkolben (250 mL Nährmedium) gefüttert werden konnten.

Zur Induktion der Proteinexpression wurde IPTG (0.1 mM pro Erlenmeyerkolben) zum Fütterungszeitpunkt zusätzlich hinzugefügt. Dabei wurde immer ein Erlenmeyerkolben mit IPTG und dem jeweiligen Vorläufer, sowie zur Kontrolle ein Erlenmeyerkolben ohne IPTG und mit dem jeweiligen Vorläufer gefüttert.

Die einzelnen Fermentationen wurden mit X betitelt und von 1-11 durchnummeriert.

Die Kultivierungen X1-X9 wurden in Kooperation mit J. VOSS aus der Arbeitsgruppe LIEBL durchgeführt.

		AHBA	3A4CIBA	3A4CI-SNAC	IDTC	
		(<u>29</u>)	(<u>33</u>)	(<u>38</u>)	IFIG	
X1-7	je 100 mL	+	-	-	+	
je						
200 mL	ia 100 mI					
Ansatz	Je 100 mL	+	-	-	-	
X8-9	je 100 mL	+	-	-	+	
	je 100 mL	+	-	-	-	
	je 100 mL	-	+	-	+	
	je 100 mL	-	+	-	-	
X10-11	je 250 mL	-	+	-	+	
	je 250 mL	-	+	-	-	
	je 250 mL	-	-	+	+	
	je 250 mL	-	-	+	-	

Tabelle 6: Fermentationsüberblick X1-11 zur Diketidproduktion (+: mittels HPLC-ES-MS nachweisbar, -: nicht detektierbar).

2.1.3 Probenentnahme zur Analyse

Für HPLC-ESI-MS Messungen und die Proteinanalytik wurden Proben der Fermentation nach 24, 48 und 72 h und teilweise nach 120 h genommen. Nach 24 h Kultivierung wurden für die Proteinanalytik 10 mL aus jedem Erlenmeyerkolben entnommen, ab der 48. Stunde wurden hierfür nur noch 5 mL benötigt. Für die HPLC-ESI-MS-Analyse folgte eine 25 mL Probenentnahme aus jedem Erlenmeyerkolben.

2.1.4 Aufarbeitung der Proben

Proben für die Proteinanalytik:

Die 10 bzw. 5 mL Proben wurden sofort nach der Entnahme zentrifugiert (8000 U/min, RZB: 3743, 4°C, 5 min) und der Überstand anschließend verworfen. Die Zellpellets wurden bis zur Analytik bei –20°C gelagert.

Proben für die HPLC-ESI-MS-Analytik:

Die 25 mL Proben (pH > 8) wurden mit 2 N HCl auf pH 5 eingestellt. Nach Extraktion mit Ethylacetat (2 x, Volumina Ethylacetat/Kulturbrühe 1:1) wurden die organischen Phasen vereint und im Vakuum eingeengt.

2.1.5 Probenvorbereitung für HPLC-ESI-MS-Messungen

Für die Vermessung per HPLC-ESI-MS wurden die Rohextrakte jeweils mit Methanol (für HPLC-MS) bis zu einer Konzentration von ca. 5 mg/mL angelöst und zentrifugiert. Die Messungen fanden unter den angegebenen Standardbedingungen statt (HPLC B, Säule A, Programm C, vgl. Kapitel 1.2)

3 Vorläufer-dirigierte Biosynthese mit der *Actinosynnema pretiosum* Mutante HGF073

3.1 Kultivierung und Aufarbeitung

3.1.1 Kultivierung in Schüttelkolben

Variante A: (Kultivierung in Schikanekolben im Rundschüttler)

Die Vorkulturen wurden in 300 mL Erlenmeyerkolben mit 3 Schikanen, gefüllt mit jeweils 50 mL M2-Medium, kultiviert. Inkubation erfolgte nach Sterilisation und Animpfen mit einem ca. 1 cm² großen Agarstück einer gut bewachsenen Agarplatte bei 28°C und 225 rpm 24 h lang. Die Fermentation der Hauptkulturen erfolgte in 1 L Erlenmeyerkolben mit 3 Schikanen und 150 mL M2-Medium, verschlossen durch eine Schaumstoffkappe. Diese wurden nach der Sterilisation mit 7.5 mL der Vorkultur angeimpft und zwischen 96 h und 160 h bei 28 C und 225 rpm inkubiert.

Variante B: (Kultivierung in Schikanekolben im Längsschüttler)

Für die Vorkulturen wurden 300 mL Erlenmeyerkolben mit 3 Schikanen, befüllt mit jeweils 50 mL M2-Medium, verwendet. Inkubation erfolgte nach Sterilisation und Animpfen mit einem ca. 1 cm² großen Agarstück einer gut bewachsenen Agarplatte bei 28°C und 225 rpm 24 h lang. Die Fermentation der Hauptkulturen erfolgte in 1 L Erlenmeyerkolben mit 3 Schikanen und 150 mL M2-Medium, verschlossen durch eine Schaumstoffkappe. Diese wurden nach der Sterilisation mit 7.5 mL der Vorkultur angeimpft und zwischen 96 h und 140 h bei 28 C und 120 spm inkubiert.

Variante C: (Kultivierung in Kolben ohne Schikane im Längsschüttler)

Die Vorkulturen wurden in 300 mL Erlenmeyerkolben, gefüllt mit jeweils 50 mL M2-Medium, kultiviert. Inkubation erfolgte nach Sterilisation und Animpfen mit einem ca. 1 cm² großen Agarstück einer gut bewachsenen Agarplatte bei 28°C und 225 rpm 24 h lang. Die Fermentation der Hauptkulturen erfolgte in 1 L Erlenmeyerkolben und 150 mL M2-Medium, verschlossen durch eine Schaumstoffkappe. Diese wurden nach der Sterilisation mit 7.5 mL der Vorkultur angeimpft und zwischen 96 h und 140 h bei 28 C und 120 spm inkubiert.

Variante D: (Kultivierung im neuen Nährmedium in Schikanekolben im Längsschüttler) Die Bebrütung der Vorkulturen erfolgte in 300 mL Erlenmeyerkolben, die jeweils mit 50 mL M2-Medium befüllt und mit einer Schaumstoffkappe als Sterilbarriere versehen wurden. Inkubation erfolgte nach Sterilisation und Animpfen mit einem ca. 1 cm² großen Agarstück einer gut bewachsenen Agarplatte bei 28°C und 225 rpm 24 h lang. Die Fermentation der Hauptkulturen erfolgte in 1 L Erlenmeyerkolben und 150 mL Korea-Medium, verschlossen durch eine Schaumstoffkappe. Diese wurden nach der Sterilisation mit 12 mL der Vorkultur angeimpft und zwischen 96 h und 120 h bei 28 C und 120 spm inkubiert.

Variante E: (Kultivierung im neuen Nährmedium in Schikanekolben im Rundschüttler)

Die Vorkulturen wurden in 300 mL Erlenmeyerkolben mit drei Schikanen, befüllt mit jeweils 50 mL M2-Medium und mit Schaumstoffkappen verschlossen, kultiviert. Von einer M2-Agarplatte, beimpft mit einer einzigen Kolonie HGF073 (48 h bei 30°C), löste man die Sporen mit 2-3 mL M2-Medium, überführte diese Sporensuspension als Inoculum in die sterilisierten Vorkulturkolben und inkubierte für 48 h bei 30°C und 225 rpm. Die Fermentation der Hauptkulturen erfolgte in 300 mL Erlenmeyerkolben mit 3 Schikanen, befüllt mit jeweils 25 mL Korea-Medium, verschlossen durch eine Schaumstoffkappe. Diese beimpfte man nach Sterilisation mit 2 mL der Vorkultur und kultivierte 7 d bei 30°C und 225 rpm.

Variante F: (Kultivierung mit Schikanekolben + Stahlfedern)

Für die Vorkulturen wurden 300 mL Erlenmeyerkolben mit drei Schikanen mit jeweils 50 mL M2-Medium befüllt und mit Schaumstoffkappen verschlossen. Inkubation erfolgte nach Animpfen mit 1/8 einer gut bewachsenen Agarplatte für 24 h bei 30°C und 225 rpm. Die Fermentation der Hauptkulturen erfolgte in 300 mL Erlenmeyerkolben mit drei Schikanen sowie in 300 mL Erlenmeyerkolben mit 3 Schikanen und zusätzlicher Stahlfeder, befüllt mit jeweils 50 mL Korea-Medium, verschlossen durch eine Schaumstoffkappe. Diese wurden nach Sterilisation mit 4 mL der Vorkultur beimpft und 7 d bei 30°C und 225 rpm inkubiert.

Variante G: (Vgl. Variante F, aber hier Schikanekolben ohne Stahlfedern)

Die Vorkulturen wurden in 300 mL Erlenmeyerkolben mit drei Schikanen, gefüllt mit jeweils 50 mL M2-Medium und verschlossen durch Schaumstoffkappen, kultiviert. Inkubation erfolgte nach Animpfen mit 1/8 einer gut bewachsenen Agarplatte für 24 h bei 30°C und 225 rpm. Die Kultivierung der Hauptkulturen erfolgte in 300 mL Erlenmeyerkolben mit drei Schikanen, befüllt mit jeweils 50 mL Korea-Medium, verschlossen durch eine Schaumstoffkappe. Diese wurden nach Sterilisation mit 4 mL der Vorkultur beimpft und 7 d bei 30°C und 225 rpm inkubiert.

3.1.2 Kultivierung im 10 L-Airliftfermenter

Für die Kultivierung des Stammes HGF073 im 10 L-Airliftfermenter wurde das Fermentergefäß mit 8 L Korea-Medium befüllt, verschlossen und sterilisiert. Die Menge des Inoculums betrug ca. 6 Vol-% des gesamten Fermentervolumens, angeimpft wurde mit einer 24 h alten Vorkultur (vgl. Kapitel 3.1.1). Die Fermentation erfolgte bei 5 bar Überdruck (Belüftung von 4 vvm) und 30°C für 6 d. Dabei wurden pH-Verlauf sowie O₂- und CO₂- Druckänderungen überwacht.

3.1.3 Fütterung von Vorläufersubstanzen und andere Zusätze

Folgende Substanzen wurden als Vorläufer in den verschiedenen Fermentationen verwendet: 3-Amino-5-hydroxybenzoesäure (AHBA) (**<u>29</u>**), 3-Amino-4-chlorbenzoesäure (3A4ClBA) (<u>**33**</u>), 3-Amino-4-chlorbenzoesäure als N-Acetylcysteaminthioester (3A4Cl-SNAC) (<u>**38**</u>), 3-Amino-4-hydroxybenzoesäure (3A4HBA) (<u>**46**</u>), 3-Amino-4-methylbenzoesäure (3A4MBA) (<u>**47**</u>), 3,4-Diaminobenzoesäure (3,4-Diamino-BA) (<u>**48**), 3,5-Diaminobenzoesäure (3,5-Diamino-BA) (<u>**49**), 3-Aminobenzoesäure (3ABA) (<u>**50**), Natriumisobutyrat und Valin. Die Substanzen wurden in gelöster Form zugefüttert, wobei alle Lösungen einen pH-Wert von etwa pH = 6.5 - 7.5 besaßen. Als weitere Zusätze kamen DMSO, XAD-2, sowie das Sterilfiltrat des Pilzes 6556 zum Einsatz. Die Fütterungslösungen wurden wie folgt hergestellt:</u></u></u>

3-Amino-4-chlorbenzoesäure (33):

Variante A: Die je nach Fermentationsansatz benötigte Menge der Säure (Endkonzentration im Schüttelkolben (150 mL Nährmedium): 7.3 mM) wurde in möglichst wenig NaOH (2 N) gelöst und der pH-Wert (pH = 6.5 - 7.5) mit HCl (2 N) unter gutem Rühren (Magnetrührer) tropfenweise eingestellt. Die Lösung der Säure in NaOH (2 N) und HCl (2 N) wurde steril filtriert und bis zum benötigten Volumen mit bidest. Wasser (steril) aufgefüllt. Das Volumen der Lösung wurde so gewählt, dass bis zur Endkonzentration des Vorläufers im Fermentationsansatz 3 x 1 mL Lösung pro Schüttelkolben gefüttert werden konnten.

Variante B: Die je nach Fermentationsansatz benötigte Menge der Säure (37.5 µmol bzw. 75 µmol pro 25 mL Nährmedium) wurde zu gleichen Teilen in DMSO und bidestilliertem Wasser gelöst und steril filtriert. Das Volumen der Lösung wurde so gewählt, dass 3 x 0.3 mL pro Schüttelkolben (25 mL bzw. 50 mL Nährmedium) gefüttert werden konnten.

3-Amino-4-chlorbenzoesäure-SNAC-Ester (38):

Die Synthese des Esters ist in Kapitel 3.1.3.1 beschrieben.

Die je nach Fermentationsansatz benötigte Menge an SNAC-Ester <u>38</u> (7.3 mM) wurde zu gleichen Teilen in DMSO und bidest. Wasser gelöst. Der Ester wurde dazu zuerst in DMSO gelöst, danach fügte man langsam das bidest. Wasser hinzu, da der SNAC-Ester bei schneller Wasserzugabe wieder auskristallisierte. Die Lösung wurde anschließend steril filtriert. Das Volumen der Lösung wurde so gewählt, dass man in drei Portionen zu je 1 mL pro Schüttelkolben (150 mL Nährmedium) füttern konnte.

3-Amino-5-hydroxybenzoesäure $(\underline{29})/3$ -Amino-4-hydroxybenzoesäure $(\underline{46})/3$ -Amino-4methylbenzoesäure $(\underline{47})/3,4$ -Diaminobenzoesäure $(\underline{48})/3,5$ -Diamino-benzoesäure $(\underline{49})/3$ -Aminobenzoesäure (50):

Die Präparation der Lösungen erfolgte analog zur Variante A der Herstellung der Fütterungslösung von 3-Amino-4-chlorbenzoesäure (<u>33</u>) (s.o.).

Natriumisobutyrat:

Die benötigte Menge Natriumisobutyrat (5 mM) wurde einer Stammlösung (1 M, pH = 6.8) entnommen, steril filtriert und mit bidest. Wasser (steril) auf das benötigte Volumen

aufgefüllt, so dass 3 x 1 mL Lösung pro Schüttelkolben (150 mL Nährmedium) bis zur Endkonzentration zugefüttert werden konnten.

Valin:

Es wurde eine 3 %ige Lösung von D,L-Valin in bidestilliertem Wasser hergestellt und steril filtriert. Das Volumen der Lösung wurde so gewählt, dass 3 mL Valinlösung zu 25 mL Nährmedium hinzugefügt werden konnten.

DMSO:

1 Vol-% steril filtriertes DMSO (bezogen auf das Volumen an Nährmedium) wurde eine Stunde vor Beginn der Fütterung der Vorläufersubstanzen dem Nährmedium zugesetzt.

XAD:

Es wurden ca. 15 g XAD-2 und 20 mL bidest. Wasser in einen 300 mL Erlenmeyerkolben gefüllt und zweimal autoklaviert. Bei den betreffenden Fermentationsansätzen wurden dann das sterile XAD-2 12 - 16 Stunden nach Fütterung der Vorläufersubstanzen einem Fermentationskolben (150 mL Nährmedium) zugesetzt.

Pilz Chaetomium sp. 6556⁸⁸:

Kultivierung: Die Kultivierung des Pilzes erfolgte in 1 L Erlenmeyerkolben, die mit je 150 mL Medium 1158 gefüllt und durch eine Schaumstoffkappe verschlossen waren. Nach Sterilisation wurde mit 1/8 einer frischen Agarplatte angeimpft und anschließend 7d bei 24°C und 180 rpm inkubiert.

Aufarbeitung: Zunächst wurde das Kulturfiltrat durch Filtration vom Mycel getrennt. Danach erfolgte Sterilfiltration des Kulturfiltrats.

Fütterung: Es wurden 3 mL Sterilfiltrat des Pilzes zu 150 mL HGF073 Kulturbrühe ca. 40 h nach Kultivierungsbeginn (= 16 h nach erster Fütterung) hinzugefügt.

3.1.3.1 Synthese des N-Acetylcysteaminthioesters (<u>38</u>) von 3-Amino-4-chlorbenzoesäure (<u>33</u>)

Zu einer Lösung von 2.66 g (0.022 mol, 1 Äquiv.) N-Acetylcysteamin (**41**) in 90 mL trockenem Dichlormethan wurden 5.7 g (0.033 mol, 1.5 Äquiv.) 3-Amino-4-chlorbenzoesäure (**33**), 6.3 g *N*-Ethyl-*N*'-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimidhydrochlorid (EDCI, 0.033 mol, 1.5 Äquiv.) und katalytische Mengen DMAP hinzugefügt. Die Mischung rührte 21 Stunden bei Raumtemperatur. Nach abgeschlossener Reaktion wurde die Lösung in Dichlormethan (400 mL) und Wasser (400 mL) aufgenommen. Die wässrige Phase wurde abgetrennt und nochmals mit Dichlormethan (200 mL) extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden anschließend mit Ammoniumchloridlösung (gesättigt, 300 mL) und Natriumhydrogencarbonatlösung (1 N, 300 mL) gewaschen. Nach Entfernung des Lösungsmittels im Vakuum wurden 5.91 g Rohprodukt erhalten. Aufreinigung mittels Kieselgelsäulenchromatographie (in 3 Portionen je ca. 2 g, Chloroform/Methanol 9:1, Säule: 35 x 6 cm) ergab 4.91 g des N-Acetylcysteaminthioester (**38**) der 3-Amino-4-chlorbenzoesäure (**33**) (0.018 mol, 82 %).

3.1.4 Fermentationsoptimierung

Die einzelnen Fermentationen wurden mit Buchstaben nach dem Alphabet fortführend betitelt, angefangen mit dem Buchstaben K. Vorherige Fermentationen waren Vorarbeiten, die im Rahmen meiner Diplomarbeit durchgeführt wurden.

ASM K:

- Ansatz: 4950 mL
- Kultivierung: Variante A (vgl. Kapitel 3.1.1)
- Vorläufer: 3A4Cl-SNAC (<u>38</u>) (7.3 mM, Endkonzentration im Kolben), Natriumisobutyrat (5 mM, Endkonzentration im Kolben)
- Zusätze: DMSO (1 Vol-%)
- Fütterung der Vorläufer: nach 24, 48 und 85 h

ASM L:

- Ansatz: 5 L
- Kultivierung: Variante A (vgl. Kapitel 3.1.1)

- Vorläufer: 3A4Cl-SNAC (<u>38</u>) und 3A4ClBA (<u>33</u>) (jeweils 7.3 mM, Endkonzentration im Kolben), Natriumisobutyrat (5 mM, Endkonzentration im Kolben)
- Zusätze: DMSO (1 Vol-%)
- Aufteilung der Kultur: 600 mL Kultur + 3A4Cl-SNAC, 4350 mL Kultur + 3A4ClBA, Natriumisobutyrat sowie DMSO wurden der gesamten Kultur zugesetzt
- Fütterung der Vorläufer: nach 24, 48 und 72 h

ASM M:

- Ansatz: 2.1 L
- Kultivierung: Variante A (vgl. Kapitel 3.1.1)
- Vorläufer: 3A4ClBA (<u>33</u>) (7.3 mM, Endkonzentration im Kolben), Natriumisobutyrat (5 mM, Endkonzentration im Kolben)
- Zusätze: DMSO (1 Vol-%), XAD-2
- Aufteilung der Kultur: 900 mL Kultur + XAD-2 16 h nach der ersten Fütterung, davon wurden 450 mL ebenfalls mit DMSO versetzt; 1200 mL Kultur + XAD-2 16 h nach der zweiten Fütterung, davon wurden 600 mL ebenfalls DMSO zugesetzt, 3A4ClBA (<u>33</u>) und Natriumisobutyrat wurden der gesamten Kultur hinzugefügt; zur Kontrolle wurde der Stamm HGF073 mit XAD-2 (16 h nach erster Fütterung hinzugefügt) und der Stamm alleine ohne weitere Zufütterung kultiviert
- Fütterung der Vorläufer: jeweils nach 24, 48 und 72 h

ASM N:

- Ansatz: 5 L
- Kultivierung: Variante A (vgl. Kapitel 3.1.1)
- Vorläufer: 3A4ClBA (<u>33</u>) (7.3 mM, Endkonzentration im Kolben), Natriumisobutyrat (5 mM, Endkonzentration im Kolben)
- Zusätze: DMSO (1 Vol-%), XAD-2
- Aufteilung der Kultur: 2250 mL Kultur + XAD-2 12 h nach der ersten Fütterung, 2250 mL Kultur + DMSO
- Fütterung der Vorläufer: nach 24, 48 und 72 h

ASM O:

- Ansatz: 3.6 L
- Kultivierung: Variante B (vgl. Kapitel 3.1.1)
- Vorläufer: 3A4ClBA (<u>33</u>) (7.3 mM, Endkonzentration im Kolben), Natriumisobutyrat (5 mM, Endkonzentration im Kolben)
- Zusätze: DMSO (1 Vol-%), XAD-2
- Aufteilung der Kultur: 1800 mL Kultur + XAD-2 18 h nach der ersten Fütterung, die restlichen 1800 mL Kultur + DMSO, 3A4ClBA und Natriumisobutyrat wurden der gesamten Kultur zugesetzt
- Fütterung der Vorläufer: nach 24, 48 und 72 h

ASM P:

- Ansatz: 1.2 L
- Kultivierung: Variante B (vgl. Kapitel 3.1.1)
- Vorläufer: 3A4ClBA (<u>33</u>) (7.3 mM, Endkonzentration im Kolben), Natriumisobutyrat (5 mM, Endkonzentration im Kolben)
- Zusätze: Sterilfiltrat des Pilzes *Chaetomium* sp. 6556 (3 mL/150 mL Medium) 16 h nach der ersten Fütterung
- Zur Kontrolle wurde zusätzlich der Pilz separat sowie gefüttert mit den obigen Vorläufern kultiviert
- Fütterung der Vorläufer: nach 24, 48 und 72 h

ASM Q:

- Ansatz: 6 L
- Kultivierung: Variante B (vgl. Kapitel 3.1.1)
- Vorläufer: 3A4ClBA (<u>33</u>) (7.3 mM, Endkonzentration im Kolben), Natriumisobutyrat (5 mM, Endkonzentration im Kolben)
- Zusätze: DMSO (1 Vol-%)
- Fütterung der Vorläufer: nach 24, 48 und 72 h

ASM R:

- Ansatz: 6.5 L
- Kultivierung: Variante B und C (vgl. Kapitel 3.1.1)
- Vorläufer: 3A4ClBA (<u>33</u>) (7.3 mM, Endkonzentration im Kolben), Natriumisobutyrat (5 mM, Endkonzentration im Kolben)
- Zusätze: DMSO (1 Vol-%)
- Aufteilung der Kultur: 5100 mL Kultur wurden in Kolben <u>mit</u> Schikane, 1350 mL Kultur in Kolben <u>ohne</u> Schikane kultiviert; die Vorläufer wurden zur gesamten Kultur hinzugefügt
- Fütterung der Vorläufer: nach 24, 48 und 72 h

ASM S:

- Ansatz: 3 L
- Kultivierung: Variante D (vgl. Kapitel 3.1.1)
- Vorläufer: 3A4ClBA (<u>33</u>), 3A4HBA (<u>46</u>), 3A4MBA (<u>47</u>), 3,4-Diamino-BA (<u>48</u>), 3,5-Diamino-BA (<u>49</u>), 3ABA (<u>50</u>) (jeweils 7.3 mM, Endkonzentration im Kolben), Natriumisobutyrat (5 mM, Endkonzentration im Kolben)
- Aufteilung der Kultur: Natriumisobutyrat wurde zur gesamten Kultur hinzugefügt, die anderen Vorläufer wurden jeweils zu 450 mL Kultur zugefüttert
- Fütterung der Vorläufer: nach 24, 48 und 72 h

ASM T:

- Ansatz: 250 mL
- Inoculum für die Vorkulturen: 1 x Agarplatte mit HGF073 von Uni Göttingen

1 x Agarplatte mit HGF073 von Uni Hannover (AK KIRSCHNING) (zum Vergleich der Produktivität)

- Kultivierung: Variante E (vgl. Kapitel 3.1.1)
- Vorläufer: 3A4ClBA (<u>33</u>) (37.5 µmol/25 mL Medium), Valin (3 mL 3 %ige D,L-Valin-Lsg./25 mL Medium)
- Aufteilung der Kultur: 125 mL Kultur mit HGF073 aus Göttingen, 125 mL Kultur mit HGF073 aus Hannover, zur gesamten Kultur wurden beide Vorläufer zugefüttert
- Fütterung der Vorläufer: nach 72, 96 und 120 h

ASM U:

- Ansatz: 500 mL
- Kultivierung: Variante E (vgl. Kapitel 3.1.1)
- Vorläufer: AHBA (<u>29</u>) und 3A4ClBA (<u>33</u>) (37.5 µmol/25 mL Medium), Valin (3 mL 3 %ige D,L-Valin-Lsg./25 mL Medium)
- Aufteilung der Kultur: 250 mL Kultur wurden mit 3A4ClBA gefüttert, 250 mL Kultur wurden mit AHBA gefüttert, Valin wurde der gesamten Kultur zugesetzt
- Fütterung der Vorläufer: nach 72, 96 und 120 h

ASM V:

- Ansatz: 2 L
- Kultivierung: Variante F (vgl. Kapitel 3.1.1)
- Vorläufer: 3A4ClBA (<u>33</u>) (37.5 µmol/25 mL Medium), Valin (3 mL 3 %ige D,L-Valin-Lsg./25 mL Medium)
- Aufteilung der Kultur: 1350 mL Kultur wurden in Schikanekolben <u>mit</u> Stahlfedern kultiviert, 650 mL Kultur wurden in Schikanekolben <u>ohne</u> Stahlfedern kultiviert
- Fütterung der Vorläufer: nach 72, 96 und 120 h

ASM W:

- Ansatz: 11 L
- Kultiverung: 10 L im Airliftfermenter und 1 L nach Variante F (vgl. Kapitel 3.1.1)
- Vorläufer: 3A4ClBA (<u>33</u>) (75 µmol/25 mL Medium), Valin (3 mL 3 %ige D,L-Valin-Lsg./25 mL Medium)
- Fütterung der Vorläufer: nach 72, 96 und 120 h

ASM X:

- Ansatz: 2 L
- Kultivierung: Variante G (vgl. Kapitel 3.1.1)
- Vorläufer: Vorläufer: 3A4ClBA (<u>33</u>) (75 μmol/25 mL Medium), Valin (3 mL 3 %ige D,L-Valin-Lsg./25 mL Medium)
- Fütterung der Vorläufer: nach 72, 96 und 120 h

	K	L	М	Ν	0	Р	Q
Ansatz	5 L	5 L	2.1 L	5 L	3.6 L	1.2 L	6 L
Kultivierungs-	А	А	А	А	В	В	В
3A4CIBA (33)	-	7.3 mM	7.3 mM	7.3 mM	7.3 mM	7.3 mM	7.3 mM
3A4CI-							
SNAC	7.3 mM	7.3 mM	-	-	-	-	-
(<u>38</u>)							
Na-Iso-	5 mM	5 mM	5 mM	5 mM	5 mM	5 mM	5 mM
Butyrat	5 11111	5 11111	5 11111	J IIIVI	5 11111	5 111111	5 11111
Sterilfiltrat						3 mL/150 mL	
Pilz 6556	-	-	-	-	-	Medium	-
Zoitnunkt don	nach 24,	nach 24,	nach 24,	nach 24, 48	nach 24,	nach 24, 48 und	nach 24, 48
	48 und	48 und	48 und	11acii 24, 40	48 und	72 h	1 70 1
Fütterung	85 h	72 h	72 h	und 72 h	72 h		und 72 h
DMSO			1 Vol-%	1 Vol-%	1 Vol-%		
(Zusatz 1 h vor	1 37 - 1 - 07	1 Vol-%	(nur in	(keine	(keine	-	1 Vol-%
Fütterungs-	1 VOI-%		Kombi	Kombi mit	Kombi mit		
beginn)			mit XAD)	XAD)	XAD		
	-	-	in Kombi				
			mit	<u>keine</u>	<u>keine</u>		
XAD-2			DMSO	Kombi mit	Kombi mit	-	-
			und	DMSO	DMSO		
			alleine				
1			1				1

Tabelle 7: Fermentationsüberblick ASM K-Q

	R	S	Т	U	V	W	X
Ansatz	6.5 L	3 L	250 mL	500 mL	2 L	11 L	2 L
Kultivierungs- variante	B und C	D	Е	Е	F	10 L im Airlift- fermenter und 1 L nach Variante F	G
3A4CIBA (<u>33</u>)	7.3 mM	7.3 mM	37.5 µmol	37.5 µmol	37.5 µmol	75 µmol	75 µmol
AHBA (<u>29</u>)	-	7.3 mM	-	-	-	-	-
3A4HBA (<u>46</u>)	-	7.3 mM	-	-	-	-	-
3A4MBA (<u>47</u>)	-	7.3 mM	-	-	-	-	-
3,4-Diamino- BA (<u>48</u>)	-	-	-	37.5 µmol	-	-	-
3,5-Diamino- BA (<u>49</u>)	-	7.3 mM	-	_	_	-	-
3ABA (<u>50</u>)	-	7.3 mM	-	-	-	-	-
Na-Iso- Butyrat	5 mM	5 mM	-	-	-	-	-
Valin	-	-	3 %ige Lsg.	3 %ige Lsg	3 %ige Lsg	3 %ige Lsg	3 %ige Lsg.
Zeitpunkt der Fütterung	nach 24, 48 und 72 h	nach 24, 48 und 72 h	nach 72, 96 und 120 h	nach 72, 96 und 120 h	nach 72, 96 und 120 h	nach 72, 96 und 120 h	nach 72, 96 und 120 h
DMSO (Zusatz 1 h vor Fütterungs- beginn)	1 Vol-%	-	-	-	-	-	-

Tabelle 8: Fermentationsüberblick ASM R-X

3.1.5 Aufarbeitung

Variante A:

Die Kulturbrühe wurde mit 2 N HCl auf pH = 5 eingestellt, mit Celite (ca. 1 gehäuften EL auf 1 L Kulturbrühe) versetzt und filtriert. Das Kulturfiltrat wurde in mehrere 1 L Rundkolben (max. 400 mL Kulturfiltrat pro Kolben) überführt und lyophilisiert (36 h). Das erhaltene Rohprodukt löste man in bidestilliertem Wasser (140 mL/1 L Kulturbrühe-Lyophilisat, Ultraschallbad) und extrahierte dieses mit Ethylacetat (3 x, Volumina Ethylacetat:Kulturfiltrat ca.1:1). Die organischen Phasen wurden vereint, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Mycel verworfen.

Variante B:

Die Aufarbeitung erfolgte analog zu Variante A. Zusätzlich wurde das Mycel mit Aceton (2 x 60 mL/1 L Kulturbrühe) im Ultraschallbad (2 x 30 min) extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereint und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Variante C:

Die Kulturbrühe wurde mit 2 N HCl auf pH = 5 eingestellt, mit Celite (ca. 1 gehäuften EL auf 1 L Kulturbrühe) versetzt und filtriert. Die Extraktion des Kulturfiltrats erfolgte mit Ethylacetat (3 x, Volumina Ethylacetat:Kulturfiltrat ca.1:1). Anschließend vereinte man die organischen Phasen und entfernte das Lösungsmittel im Vakuum. Das Mycel wurde mit Aceton (2 x 60 mL/1 L Kulturbrühe) im Ultraschallbad (2 x 30 min) extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereint und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Variante D:

Die Aufarbeitung des Kulturfiltrats erfolgte analog zu Variante C. Das Mycel wurde verworfen.

Variante E:

Die Kulturbrühe wurde mit 2 N HCl auf pH = 5 eingestellt, mit Celite (ca. 1 gehäuften EL auf 1 L Kulturbrühe) versetzt und zentrifugiert (3400 U/min, 15 min, 15°C). Die Extraktion des Kulturfiltrats erfolgte mit Ethylacetat (3 x, Volumina Ethylacetat:Kulturfiltrat ca.1:1). Anschließend vereinte man die organischen Phasen und entfernte das Lösungsmittel im

Vakuum. Das Mycel wurde mit Aceton (2 x 60 mL/1 L Kulturbrühe) im Ultraschallbad (2 x 30 min) extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereint und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Variante F:

Die Aufarbeitung des Kulturfiltrats erfolgte analog zu Variante D. Das Mycel wurde verworfen.

Aufarbeitung der verschiedenen Fermentationsansätze:

Bei Fütterung unterschiedlicher Vorläufer und Zusätze in einem Fermentationsansatz wurden die unterschiedlichen Fütterungsansätze getrennt voneinander aufgearbeitet. Die verschiedenen Fermentationen wurden folgendermaßen aufgearbeitet: ASM K und L: Variante A ASM M und N: Variante B ASM O – S: Variante C ASM T: Variante D ASM U: Variante E ASM V: Variante F ASM W: Kulturbrühe aus Airliftfermenter: Variante D Kulturbrühe aus Schüttelkulturen: Variante F

ASM X: Variante F

Die aus den verschiedenen Aufarbeitungsmethoden erhaltenen Rohprodukte wurden über Sephadex LH-20 (Säule: 100 x 2.5 cm, Methanol) vorgereinigt. Von den Fraktionen wurden Dünnschichtchromatogramme auf Kieselgel DC-Alufolien angefertigt, in Chloroform/Methanol 85:15 entwickelt und mit Molybdatophosphorsäure angefärbt. Des Weiteren erfolgte eine Detektion der Metabolite per HPLC-ESI-MS (Proben in Methanol (für HPLC-MS), 247 nm).

3.2 Isolierung des 20-Desmethoxyansamitocins P-3 (42)

Die nach der Säulenchromatographie mittels Sephadex LH-20 erhaltene Fraktion, in der sich massenspekrometrisch das Ansamitocin-Derivat nachweisen ließ, wurde mittels präparativer HPLC aufgetrennt, um das 20-Desmethoxyansamitocin P-3 (**42**) zu erhalten. Man löste die Probe dazu in Methanol (für HPLC), filtrierte die unlöslichen Anteile ab und entfernte das Lösungsmittel im Vakuum. Anschließend stellte man mit dem methanollöslichen Anteil eine Konzentration von ca. 60 mg/mL ein. 10 μ L dieser Lösung dienten dann für eine analytische HPLC-Untersuchung mit dem präparativen System vor der Trennung. Die Auftrennung erfolgte mit jeweils 100 μ L Probenlösung über Säule D an HPLC C mit Programm E (vgl. Kapitel 1.2). Die getrennten Fraktionen wurden vorsichtig im Vakuum und Wasserbad (unter 40°C) eingedampft. Die erhaltenen Fraktionen wurden massenspektrometrisch auf Vorhandensein des Ansamitocin-Derivates überprüft.

3.3 Charakterisierung des 20-Desmethoxyansamitocins P-3 (42)

Die Charakterisierung des 20-Desmethoxyansamitocin P-3 (<u>42</u>) erfolgte mittels Massenspektrometrie, HPLC-ESI-MS, UV-, IR-, ¹H-, ¹³C und 2D-NMR-Spektroskopie.



C₃₁H₄₁ClN₂O₈ (605.13, exakte Masse: 604)

Weißer Feststoff

UV-löschend (254 nm)

Anfärbeverhalten: grün-braun (Molybdatophosphorsäure)

 $\mathbf{R}_{\mathbf{f}} = 0.25$ (Chloroform/Methanol 85:15)

ESI-MS: m/z: 605 [M + H]⁺, 627 [M + Na]⁺.

HR-ESI-MS: berechnet: $m/z = 605.26242 [M+H]^+$.

gefunden: $m/z = 605.26209 [M+H]^+$.

UV-VIS: (MeOH): λ_{max} (lg ϵ) = 247 (0.25) nm.

IR (KBr): $\tilde{v}_{\text{max}} = 3410, 2926, 2356, 1700, 1669, 1458, 1384, 1080 \text{ cm}^{-1}$.

 $[\alpha]_{D}^{20} = -40^{\circ} (c = 0.04 \text{ in Methanol})$

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ = 0.81 (3 H, s, C-4 CH₃), 1.15-1.25 (1 H, m, C-8 H), 1.19 (3 H, d, J = 6.5 Hz, C-4' CH₃), 1.26 (3 H, d, J = 6.5 Hz, C-6 CH₃), 1.27 (3 H, d, $J_{2',3'} = 7.0$ Hz, C-3' CH₃), 1.36-1.48 (1 H, m, C-6 H), 1.57-1.62 (1 H, m, C-8 H), 1.65 (3 H, s, C-14 CH₃), 2.20 (1 H, dd, $J_{2,2} = 13.5$ Hz, $J_{2,3} = 3.0$ Hz, C-2 H), 2.50 (1 H, dd, $J_{2,2} = 14$ Hz, $J_{2,3} = 12.0$ Hz, C-2 H), 2.59 (1 H, septett, $J_{2',3'/2',4'} = 7.0$ Hz, C-2' H), 2.93 (1 H, d, $J_{5,6} = 9.5$ Hz, C-5 H), 3.15 (3 H, s, C-1 N-CH₃), 3.22 (1 H, d, $J_{15,15} = 13.0$ Hz, C-15 H), 3.34 (3 H, s, C-10 OCH₃), 3.46 (1 H, d, $J_{15,15} = 13.0$ Hz, C-15 H), 3.47 (1 H, d, $J_{2,3} = 12.0$ Hz, C-9 OH), 4.25 (1 H, m, C-7 H), 4.78 (1 H, dd, $J_{2,3} = 12.0$ Hz, $J_{2,3} = 3.0$ Hz, C-3 H), 5.44 (1 H, dd, $J_{10,11} = 9.0$ Hz, $J_{11,12} = 15.5$ Hz, C-11 H), 6.14 (1 H, d, $J_{12,13} = 11.0$ Hz, C-12 H), 7.23 (1 H, d, $J_{20,21} = 9.0$ Hz, C-21 H), 7.26 (1 H, s, C-17 H), 7.45 (1 H, d, $J_{20,21} = 8.0$ Hz, C-20 H) ppm.

¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃): $\delta = 12.01$ (q, C-4 CH₃), 14.53 (q, C-3'), 15.61 (q, C-14 CH₃), 17.82 (q, C-4'), 19.94 (q, C-6 CH₃), 32.62 (t, C-2), 33.78 (d, C-2'), 35.61 (q, C-1 NCH₃), 35.73 (t, C-8), 38.70 (d, C-6), 46.44 (t, C-15), 56.63 (q, C-10 OCH₃), 60.27 (s, C-4), 66.30 (d, C-5), 74.22 (d, C-7), 77.40 (d, C-3), 80.80 (s, C-9), 88.33 (d, C-10), 124.20 (d, C-13), 127.53 (d, C-11), 130.32 (d, C-21), 130.46 (d, C-20), 130.59 (d, C-17), 131.08 (s, C-16), 132.70 (d, C-12), 140.05 (s, C-19), 140.31 (s, C-14), 141.39 (s, C-18), 152.20 (s, C-7'), 168.64 (s, C-1), 175.64 (s, C-1') ppm.
4 Kitasatospora putterlickiae F98-18

4.1 Kultivierung und Aufarbeitung

4.1.1 Kultivierung des Stammes F98-18

Die Vorkulturen wurden in 300 mL Erlenmeyerkolben mit drei Schikanen, gefüllt mit jeweils 100 mL SM-Medium, kultiviert. Inkubation erfolgte nach Animpfen mit 1/8 einer gut bewachsenen Agarplatte für 72 h bei 28°C und 180 rpm. Die Fermentation der Hauptkulturen erfolgte in 300 mL Erlenmeyerkolben mit drei Schikanen, befüllt mit jeweils 100 mL M2 Glycerin-Medium, verschlossen durch eine Schaumstoffkappe. Diese wurden nach Sterilisation mit 1 mL der Vorkultur beimpft und 55 h bei 28°C und 180 rpm inkubiert.

4.1.2 Kultivierung und Aufarbeitung des Pilzes *Mucor* sp.

Die Fermentation des Pilzes *Mucor* sp. erfolgte ohne Vorkulturen in 300 mL Erlenmeyerkolben mit drei Schikanen, gefüllt mit jeweils 100 mL Malz-Medium, verschlossen durch eine Schaumstoffkappe. Nach Animpfen mit 1/8 einer gut bewachsenen Agarplatte wurden diese für 72 h bei 28 °C und 180 rpm inkubiert.

Der Pilz wurde zeitgleich mit den Vorkulturen des Stammes F98-18⁹⁵ geerntet. Die Kulturbrühe des Pilzes wurde zur Trennung von Kulturfiltrat und Mycel zunächst zentrifugiert (14000 U/min, 20°C). Anschließend folgte Sterilfiltration des Überstandes, die Zellen wurden verworfen. Das Sterilfiltrat wurde bis zum weiteren Gebrauch bei 4°C gelagert. Hierbei wurden fünf Kultivierungsansätze durchgeführt, die mit FI bis FV nummeriert sind. Sie sind im Folgenden tabellarisch zusammengefasst:

	FI	FII	FIII	FIV	FV
Ansatz	500 mL	2 L	2 L	2 L	4 L
Ernte der	Nach	Nach	Nach	Nach 55 h	Nach 55 h
Hauptkulturen	64 h	56 h	55 h		
Produktion der gelb anfärbbaren Substanz	Nein	Nein	Nein	Ja	Ja
Aufreinigung I	-	-	-	Rohprodukt: Kieselgel (Chloroform/Methanol 97:3)	Rohprodukt: Kieselgel (Chloroform/Methanol 97:3)
Fraktion mit gelb anfärbbarer Substanz nach Aufreinigung I	-	-	-	FIV-4 (8.5 mg) und FIV-5 (4.8 mg) (FIV-5 wurde zur chem synth. Derivatisierung verwendet)	FV-9 (17.0 mg) und FV-10 (12.6 mg)
Aufreinigung II	-	-	-	FIV-4: Kieselgel (Chloroform/Methanol 95:5)	FV-9 und –10 (vereint): Mitteldrucksäulen- Chromatographie (Aceton/Wasser 1:1)
Fraktion mit gelb anfärbbarer Substanz nach Aufreinigung II	-	-	-	FIV-42	FV9/10-2 (1.2 mg) FV9/10-3 (0.1 mg) FV9/10-4 (3.1 mg)

Tabelle 9: Fermentationsübersicht FI bis FV.

4.1.3 Zufütterung des Mucor-Sterilfiltrats zum Stamm F98-18

Je 100 mL Hauptkultur des Stammes F98-18 wurde nach 10 h Kultivierungszeit mit 10 mL des sterilen Pilzüberstandes versetzt. Anschließend wurden die Kulturen für weitere 45 h bei 28°C und 180 rpm inkubiert.

Des Weiteren wurden zur Kontrolle der Stamm F98-18 ohne Pilzzugabe sowie der Pilz separat kultiviert.

4.1.4 Aufarbeitung der Hauptkulturen des Stammes F98-18

Die Kulturen (pH ca. 4.5) wurden bei ähnlichem pH-Wert und Aussehen vereint. Die mit Ameisensäure auf pH 4 eingestellte Kulturbrühe wurde durch Filtration in Kulturfiltrat und Mycel getrennt. Extraktion des Kulturfiltrats erfolgte mit Ethylacetat (3 x, Volumina Ethylacetat/Kulturfiltrat 1:1). Das Lösungsmittel der vereinigten organischen Phasen wurde im Vakuum entfernt und das Mycel verworfen.

Zur Überprüfung des Rohprodukts auf die Produktion der gelb anfärbbaren Substanz wurden Dünnschichtchromatogramme auf Kieselgel DC-Alufolien angefertigt, in Chloroform/Methanol 95:5 entwickelt und mit Ehrlichs Reagenz angefärbt.

4.2 Isolierung und Analyse des induzierten Metaboliten

Das aus dem Kulturfiltrat erhaltene Rohprodukt wurde zunächst über Kieselgel (Chloroform/Methanol 97:3) vorgereinigt. Von den erhaltenen Fraktionen wurden wieder Dünnschichtchromatogramme auf Kieselgel DC-Alufolien angefertigt (Chloroform/Methanol 95:5, Ehrlichs Reagenz). Des Weiteren wurden von den Fraktionen, die die gelb anfärbbare Substanz enthielten, Dünnschichtchromatogramme auf reversed-phase Kieselgel DC-Alufolien angefertigt. Dabei wurde das Laufmittelsystem Aceton/Wasser in verschiedenen Zusammensetzungen verwendet (Aceton/Wasser 4:1, 3:2 und 1:1). Mit diesen Fraktionen erfolgte dann ein weiterer Trennungsgang per Mitteldrucksäulenchromatographie über reversed-phase Kieselgel (Aceton/Wasser 1:1, Lobar[®] B, vgl. Kapitel 1.2). Die vorgereinigte Fraktion mit der gelb anfärbbaren Substanz wurde einer analytischen HPLC-Messung unterzogen (HPLC A, Säule A mit Programm A und Säule B mit Programm B, vgl. Kapitel 1.2). Weiterhin folgten Messungen per HPLC-ESI-MS (HPLC B, Säule A, Programm C, vgl. Kapitel 1.2), EI-MS und NMR-Experimenten.

4.3 Chemische Derivatisierung

4.3.1 Acetylierung von Anthranilsäure (59)

13.7 mg Anthranilsäure (59) (0.10 mmol, 1 Äquiv.) wurden bei 0°C in Pyridin (1 mL) gelöst und mit 20.4 mg Acetanhydrid (0.20 mmol, 20 μ L, 2 Äquiv.) versetzt. Nach dem Auftauen auf Raumtemperatur wurde noch 4 Stunden gerührt. Anschließend wurden bei 0°C unter Rühren Natriumhydrogencarbonatlösung (3 mL, ges.) und Wasser (5 mL, zur Verdünnung) zugesetzt. Extraktion der wässrigen Phase erfolgte mit Chloroform (10 mL). Nach Entfernung des Lösungsmittels im Vakuum wurde der Extrakt bis zur Pyridinfreiheit mit Toluol (3 x je ca. 5 mL) behandelt. Nach wiederholter Entfernung des Lösungsmittels im Vakuum wurden 10.4 mg (0.06 mmol, 60 %) des Produkts (61) erhalten.

4.3.2 Charakterisierung von 2-Acetylaminobenzoesäure (61)



¹**H-NMR (600 MHz, CDCl₃):** $\delta = 2.15$ (3H, s, COCH₃) 2.72 (1 H, s, NH), 7.12 (1 H, ddd, J = 1 Hz, J = 7.5 Hz, J = 8 Hz, 5-H), 7.57 (1 H, ddd, J = 1 Hz, J = 7.5 Hz, J = 8.5 Hz, 4-H), 8.02 (1 H, dd, J = 1.5 Hz, J = 8 Hz, 3-H), 8.68 (1 H, dd, J = 1 Hz, J = 8 Hz, 6-H) ppm.

4.3.3 Methylierung von Anthranilsäure

13.7 mg Anthranilsäure (59) (0.100 mmol, 1 Äquiv.) wurden bei 0°C in Methanol/Wasser 19:1 (1 mL) gelöst und tropfenweise unter Rühren mit etherischer Diazomethanlösung (0.4 M, ca. 1.5 mL, ca. 0.600 mmol, 6 Äquiv.) bis zur bleibenden Gelbfärbung der Lösung versetzt. Anschließend wurde die Lösung bei Raumtemperatur noch 45 Minuten gerührt. Nach Einengen des Reaktionsgemisches im Vakuum wurden 14.9 mg (0.098 mmol, 98 %) des Produkts (<u>60</u>) erhalten.

4.3.4 Charakterisierung des Anthranilsäuremethylesters (60)

 $C_8H_9NO_2$ (151.17) Weißer Feststoff UV-löschend (254 nm) Anfärbeverhalten: leicht gelb (Ehrlich) $R_f = 0.88$ (Chloroform/Methanol 9:1) ESI-MS: *m/z*: 151.9 [M + H]⁺.



¹**H-NMR (600 MHz, CDCl₃):** δ = 3.81 (3 H, s,COOCH₃), 6.40 (2 H, s, NH₂), 6.55 (1 H, ddd, J = 1 Hz, J = 7.5 Hz, J = 8 Hz, 5-H), 6.79 (1 H, dd, J = 1 Hz, J = 8.5 Hz, 3-H), 7.24 (1 H, ddd, J = 1.5 Hz, J = 7.5 Hz, J = 8.5 Hz, 4-H), 7.76 (1 H, dd, J = 1.5 Hz, J = 8 Hz, 6-H) ppm.

4.3.5 Acetylierung der Fraktion FIV-5

2.2 mg der Fraktion FIV-5 wurden bei 0°C in Pyridin (0.5 mL) gelöst und mit 20.4 mg Acetanhydrid (0.20 mmol, 20 µL) versetzt. Nach dem Auftauen auf Raumtemperatur wurde gerührt. Anschließend bei $0^{\circ}C$ noch 2 Stunden wurden unter Rühren Natriumhydrogencarbonatlösung (1.5 mL, ges.) und Wasser (2.5 mL, zur Verdünnung) zugesetzt. Extraktion der wässrigen Phase erfolgte mit Chloroform (5 mL). Nach Entfernung des Lösungsmittels im Vakuum wurde der Extrakt bis zur Pyridinfreiheit mit Toluol (3 x je ca. 2.5 mL) behandelt. Nach wiederholter Entfernung des Lösungsmittels im Vakuum wurden 1.2 mg Produkt (FIV-5A) erhalten.

Die acetylierte Fraktion FIV-5A wurde per HPLC-ESI-MS, HPLC und NMR-Experimenten analysiert.

4.3.6 Methylierung der Fraktion FIV-5

2.4 mg der Fraktion FIV-5 wurden bei 0°C in Methanol/Wasser 19:1 (0.5 mL) gelöst und tropfenweise unter Rühren mit etherischer Diazomethanlösung (0.4 M, ca. 1 mL, ca. 0.4 mmol) bis zur bleibenden Gelbfärbung der Lösung versetzt. Anschließend wurde die Lösung bei Raumtemperatur noch eine Stunde gerührt. Nach Einengen des Reaktionsgemisches im Vakuum wurden 2.4 mg Produkt (FIV-5M) erhalten.

Die methylierte Fraktion FIV-5M wurde per HPLC-ESI-MS, HPLC und NMR-Experimenten analysiert.

5 Streptomyces antimycoticus FZB53

Im Rahmen dieses Kooperationsprojektes mit E. KOCH von der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft (BBA) in Darmstadt wurden vier Fermentationen gemacht (bezeichnet als FZB1-4). Die Kultivierungen FZB1-3 erfolgten in Darmstadt, die daraus gewonnenen Extrakte wurden in Göttingen weiter bearbeitet. Die Kultivierung FZB4 wurde in Göttingen durchgeführt.

5.1 Bearbeitung der Extrakte des Stammes FZB 53

Die Extrakte von den Kultivierungen aus Darmstadt wurden zunächst dünnschichtchromatographisch (KG, Chloroform/Methanol 9:1, reversed-phase (RP) KG, Methanol/Wasser 7:3 und Aceton/Wasser 4:1, Anis, Ehrlichs Reagenz und Orcin) untersucht. Es folgte eine Schwerkraftsäulenchromatographie (RP-KG, Aceton/Wasser 4:1) zur Aufreinigung, mittels der jedoch keine Reinsubstanz erhalten werden konnte. Eine mitteldrucksäulenchromatographische Trennung (Säule: Lobar[®] B, Aceton/Wasser 4:1) ergab 5.1 mg der aktiven Verbindung (<u>67</u>) als Reinsubstanz.

Es folgte Analyse per ESI-MS, HR-ESI-MS und NMR-Experimenten.

	FZB1	FZB2	FZB3
Art des Extraktes	Vorgereinigter Extrakt aus dem Kulturfiltrat	Rohextrakt aus dem Kulturfiltrat	Rohextrakt aus dem Kulturfiltrat (FZB3Ü) und Rohextrakt aus dem Pellet (FZB3P)
Kultivierungsansatz	1 L	1.5 L	450 mL
Extrakte	22.8 mg	47.8 mg	FZB3Ü = 1.86 g FZB3P = 1.34 g
Reinsubstanz von <u>69</u>	-	FZB2K4 (5.1 mg)	-

Tabelle 10: Fermentationsübersicht FZB1-3

5.2 Eigene Kultivierungsarbeiten

5.2.1 Kultivierung und Aufarbeitung

Kultivierung:

Die Kultivierungen erfolgten ohne Vorkulturen. Die Hauptkulturen (insgesamt 1 L) wurden in 300 mL Erlenmeyerkolben mit drei Schikanen, befüllt mit je 50 mL Kartoffelpüree-Medium, verschlossen durch eine Schaumstoffkappe, kultiviert. Zum Animpfen wurden 100 μ L einer Sporensuspension einer frischen Agarplatte pro 50 mL Medium verwendet. Dazu wurden die Sporen von einer Agarplatte mit 2 mL bidest. Wasser und einer Impföse gelöst. Anschließende Inkubation erfolgte bei 28°C und 180 rpm für 7 Tage.

Aufarbeitung:

Die Kulturbrühe (pH 7.2) wurde zunächst durch Zentrifugation (4500 U/min, 20°C, 15 min) in Kulturfiltrat und Mycel aufgetrennt. Kulturfiltrat und Mycel wurden jeweils mit Ethylacetat extrahiert (Kulturfiltrat: 3 x, Mycel: 2 x im Ultraschallbad, Volumina Ethylacetat/Kulturfiltrat 1:1, das Mycel aus ca. 250 mL Kulturbrühe wurde mit 200 mL Etylacetat extrahiert). Eine anschließend dünnschichtchromatographische Analyse (KG, Chloroform/Methanol 9:1, Orcin und reversed phase KG, Aceton/Wasser 4:1, Orcin) der beiden Extrakte (Kulturfiltrat:

FZB4KF = 612.5 mg, Mycel: FZB4M = 646.1 mg) zeigte den größeren Anteil der aktiven Verbindung im Extrakt des Mycels, welcher im folgenden auch weiter bearbeitet wurde.

5.2.2 Isolierung der aktiven Substanz (69)

Der Mycel-Extrakt wurde zunächst über Sephadex LH-20 (70 x 3 cm, Methanol) gelsäulenchromatographisch vorgereinigt. Eine DC-Analyse (KG, Chloroform/Methanol 9:1, Orcin und RP-KG, Aceton/Wasser 4:1, Orcin) der daraus hervorgegangenen Fraktionen FZB4M-1 bis FZB4M-6 zeigte die aktive Substanz (<u>69</u>) in den Fraktionen FZB4M-3 (108.9 mg) und -4 (247.4 mg). Fraktion FZB4M-4 wurde einer weiteren Bearbeitung unterzogen und portionsweise (je ca. 30 mg) per Mitteldrucksäulenchromatographie (Säule: Lobar[®] B, Aceton/Wasser 4:1, 0.09 mL/min) gereinigt. Dazu wurden vorher die in

Aceton/Wasser 4:1 unlöslichen Anteile des Extraktes abfiltriert. Es wurden letztlich ca. 86 mg der aktiven Verbindung (<u>69</u>) in reiner Form erhalten.

Die Analyse erfolgte per HPLC-ESI-MS, HR-ESI-MS, ¹H-NMR-, ¹³C-NMR-, 2-D NMR-Experimenten.

	Kultivierungsansatz	Extrakte	Reinsubstanz
FZB4	1 Т	FZB4KF (612.5 mg)	Aus dem Mycel isoliert:
	I L	FZB4M (646.1 mg)	FZB4M44 (86 mg)

Tabelle 11: Fermentationsüberblick FZB4

5.2.3 Charakterisierung der aktiven Substanz (69)

HR-MS: C₄₀H₆₈O₁₁ (724)

UV:-

IR (**KBr**): \tilde{v}_{max} = 3420, 1729, 1636, 1459, 1379, 1189, 1113, 1046, 1019, 956,

 928 cm^{-1} .

ESI-MS: Positive Ionen: $m/z = 725 [M+H]^+$, 747 $[M+Na]^+$

Negative Ionen: $m/z = 723 [M-H]^{-1}$

 $\mathbf{R}_{\mathbf{f}} = 0.64 (\text{KG}, \text{Chloroform/Methanol 9:1})$

 $[\alpha]_{D}^{20} = +36^{\circ}$ (c = 1 in Methanol)

¹³C-NMR (500 MHz, C₆D₆): δ = 11.44, 13.19, 13.44, 14.87, 16.20, 16.88, 17.04, 22.77, 23.79, 26.04, 26.77, 27.96, 29.32, 29.83, 31.80, 32.26, 32.41, 35.27, 36.20, 37.04, 37.43, 37.82, 39.75, 41.95, 46.06, 59.68, 60.93, 67.87, 68.38, 73.67, 76.88, 77.04, 79.55, 81.66, 82.31, 84.87, 85.46, 97.81, 107.82, 184.08 ppm.

Nigericin (71)-Literatur-Vergleichsdaten¹²⁴

¹³C-NMR (500 MHz, C₆D₆): $\delta = 10.9$, 13.3, 13.3, 13.4, 15.7, 16.8, 17.2, 22.9, 23.9, 26.3, 26.4, 27.9, 28.4, 31.3, 32.0, 32.6, 33.0, 35.5, 36.1, 37.3, 37.6, 38.3, 39.5, 43.0, 44.5, 57.6, 60.9, 68.9, 69.5, 73.4, 74.8, 77.5, 78.3, 82.0, 82.9, 83.8, 86.3, 97.7, 108.7, 177.1 ppm.

5.2.4 Chemische Derivatisierung

5.2.4.1 Acetylierung der aktiven Substanz (69)

9.6 mg der Fraktion FZB4M44 (**<u>69</u>**) (0.013 mmol) wurden bei 0°C in Pyridin (1 mL) gelöst und portionsweise mit 2.716 mg Acetanhydrid (0.027 mmol, 5 μ L) versetzt. Nach dem Auftauen auf Raumtemperatur wurde noch 3 Stunden gerührt. Anschließend wurden bei 0°C unter Rühren Natriumhydrogencarbonatlösung (1 mL, ges.) und Wasser (1.5 mL, zur Verdünnung) zugesetzt. Extraktion der wässrigen Phase erfolgte mit Chloroform (4 mL). Nach Entfernung des Lösungsmittels im Vakuum wurde der Extrakt bis zur Pyridinfreiheit mit Toluol (3 x je ca. 2 mL) behandelt. Nach wiederholter Entfernung des Lösungsmittels im Vakuum wurden 11.4 mg Rohprodukt (FZB-A) erhalten.

Die Reinigung des Rohprodukts FZB-A (11.4 mg) über Kieselgelsäulenchromatographie (30x1 cm, Cyclohexan/Ethylacetat/Methanol 5:10:0.5) ergab die drei Fraktionen FZB-A1 (1.1 mg), FZB-A2 (2.2 mg) und FZB-A3 (7.1 mg).

Die Fraktionen FZB-A1-3 wurden per ESI-MS und NMR-Experimenten analysiert.

5.2.4.2 Methylierung der aktiven Substanz (<u>69</u>)

9.5 mg der Fraktion FZB4M44 (<u>69</u>) (0.0131 mmol) wurden bei 0°C in Methanol/Wasser 19:1 (1 mL) gelöst und tropfenweise unter Rühren mit etherischer Diazomethanlösung (0.4 M, ca. 2 mL, ca. 0.8 mmol) bis zur bleibenden Gelbfärbung der Lösung versetzt. Anschließend wurde die Lösung bei Raumtemperatur noch 1.5 Stunden gerührt. Nach Einengen des Reaktionsgemisches im Vakuum wurden 9.8 mg Produkt (FZB-M) erhalten.

Die methylierte Fraktion FZB-M wurde per HPLC-ESI-MS, HR-ESI-MS und NMR-Experimenten analysiert.

5.2.5 Isolierung der UV-löschenden Substanz (43)

Die Fraktion FZB4M-6 enthielt mit einem R_f -Wert von 0.64 (Chloroform/Methanol 9:1) eine Substanz (<u>43</u>), die UV-Licht der Wellenlänge 254 nm absorbiert und mit Orcin rosa-braun

anfärbte. Eine Aufreinigung der Fraktion FZB4M-6 per Mitteldrucksäulenchromatographie (Lobar[®] B, Aceton/Wasser 3:1) ergab 0.1 mg des UV-löschenden <u>43</u>. Eine Analyse mittels ESI- und hochauflösender ESI-Massenspektrometrie ergab eine Masse von m/z = 561 $[M+H]^+$ mit der Summenformel C₂₉H₄₀N₂O₉, entsprechend des Geldanamycins (<u>43</u>).

6 Piriformospora indica

6.1 HPLC-ESI-MS Analytik

Insgesamt wurden 5 verschiedene Messreihen A1-A5 mit dem wässrigen Kulturfiltrat sowie mit Etylacetat-Extrakten des Pilzes *P. indica* durchgeführt. Die Kultivierungsarbeiten, aus der die einzelnen Proben stammten, wurden von A. SIRRENBERG (AK KARLOVSKY) durchgeführt. Ausgangsmaterial für lyophilisierte Proben waren 500 µL Kulturfiltrat des Pilzes *P. indica* im M^+ (= M2-Medium)- oder MS2-Medium (Murashige & Skoog Medium). Kontrollprobe war 500 µL lyophilisiertes Medium ohne Pilz. Experiment A2-A4: Ethylacetat-Extrakte wurden von 5 mL Pilz-Kulturfiltrat angefertigt. Die Kulturen wurden jeweils einmal mit 5 mL Ethylacetat extrahiert und eingedampft. Zur Kontrolle wurden 5 mL Medium ohne Pilz ebenfalls mit Ethylacetat extrahiert. Experiment A5: Die Ethylacetat-Extrakte wurden analog zu Experiment A2-A4 hergestellt, nur wurde das Kulturfiltrat hierbei vor der Extraktion mit 2 N HCl auf pH 3 angesäuert.

Die trockenen Proben wurden alle auf ein Gesamtvolumen von $100 \,\mu\text{L}$ mit Methanol aufgefüllt, zentrifugiert (5 min, 13000 U/min) und für die Messung in Einsätze mit 200 μL Fassungsvolumen überführt. Für die Messung der wässrigen Kulturfiltrat-Proben wurde 50 μL Kulturfiltrat mit 50 μL Methanol gemischt, zentrifugiert (5 min, 13000 U/min) und ebefalls in HPLC-Gläschen mit Inlet gefüllt.

Die Vermessung der Proben erfolgte per HPLC-ESI-MS (HPLC B, Säule A, Programm C (s. Kapitel 1.2)) im positiven und negativen Modus.

Experiment A1

Analysiert wurden wässrige Kulturfiltrat-Proben und reines Auxin (Indolessigsäure, IAA) (<u>78</u>):

- 1. Nährmedium M⁺ ohne Pilz
- 2. P. indica Kulturfiltrat nach Zentrifugation
- 3. P. indica Kulturfiltrat nach Zentrifugation mit anschließender Sterilfiltration
- 4. IAA (c = 1 mg/mL)

Experiment A2

Analyse von lyophilisierten, wässrigen Proben und Ethylacetat-Extrakten der Kulturfiltrate:

- 1. lyophilisiertes Medium M⁺
- 2. lyophilisiertes *P. indica* Kulturfiltrat aus M⁺-Medium
- 3. lyophilisiertes Medium MS2
- 4. lyophilisiertes P. indica Kulturfiltrat aus MS2-Medium
- 5. Ethylacetat-Extrakt des MS2-Mediums
- 6. Ethylacetat-Extrakt des P. indica Kulturfiltrates aus MS2-Medium
- 7. Ethylacetat-Extrakt des M⁺-Mediums
- 8. Ethylacetat-Extrakt des *P. indica* Kulturfiltrates aus M⁺-Medium

Experiment A3

Analyse von Auxin (78) und Ethylacetat-Extrakten der Kulturfiltrate:

- 1. IAA (c = 5 mg/mL)
- 2. Ethylacetat-Extrakt des M⁺-Mediums
- 3. Ethylacetat-Extrakt des P. indica Kulturfiltrats aus M⁺-Medium

Experiment A4

Analyse von IAA (78) in unterschiedlichen Konzentrationen:

- 1. 1 µM IAA in Ethylacetat
- 2. 10 µM IAA in Ethylacetat
- 3. M⁺-Medium
- 4. M^+ -Medium mit 1 μ M IAA
- 5. M^+ -Medium mit 10 μ M IAA

Experiment A5

Analyse von Ethylacetat-Extrakten der Kulturfiltrate von *P. indica*. Die Proben wurden vor der Extraktion mit Ethylacetat angesäuert. Die Proben stammen aus einer Fermentation, aber aus unterschiedlichen Kolben:

- 1. Ethylacetat-Extrakt (saures Milieu) aus Kolben 1 (P1)
- 2. Ethylacetat-Extrakt (saures Milieu) aus Kolben 2 (P2)
- 3. Ethylacetat-Extrakt (saures Milieu) aus Kolben 3 (P3)

6.2 Dünnschichtchromatographische Analytik

Die Proben von Experiment A4 und A5 sowie 1 μ M und 10 μ M IAA (<u>78</u>) wurden auch dünnschichtchromatographisch untersucht. Dazu wurden ca. 10 μ L der jeweiligen Ethylacetat-Extrakte auf Kieselgel-DC-Alufolien aufgetragen, in Chloroform/Methanol/Wasser 84:14:1 entwickelt und mit dem Salkowski-Reagenz (Nr. 131) sichtbar gemacht.

C LITERATUR

- 1. Tang, W., Eisenbrand, G. *Chinese drugs of plant origin, chemistry, pharmacology and use in traditional and modern medicine*; Springer: Berlin, Heidelberg, 1992.
- 2. Birch, B. Alexander Fleming-Penicillin; Georg Bitter Verlag: Recklinghausen, 1993.
- 3. Rachakonda, S.; Cartee, L. Curr Med Chem 2004, 11, 775-93.
- 4. Clark, N. M.; Hershberger, E.; Zervosc, M. J.; Lynch, J. P., 3rd. *Curr Opin Crit Care* **2003**, *9*, 403-12.
- 5. Newman, D. J.; Cragg, G. M.; Snader, K. M. J Nat Prod **2003**, *66*, 1022-37.
- 6. Newman, D. J.; Cragg, G. M. *J Nat Prod* 2007, *70*, 461-77.
 7. *Bild-Quelle:*

http://www.bmb.leeds.ac.uk/mbiology/ug/ugteach/gene2020/transpos.html

- 8. Butler, M. S. *J Nat Prod* **2004**, *67*, 2141-53.
- 9. Butler, M. S. *Nat Prod Rep* **2005**, *22*, 162-95.
- 10. Koehn, F. E., Carter, G.T. Nat. Rev. Drug Discovery 2005, 4, 206-20.
- 11. Firn, R. D.; Jones, C. G. Nat Prod Rep 2003, 20, 382-91.
- 12. Walsh, C. Nature 2000, 406, 775-81.
- 13. Wright, G. D. Curr Opin Chem Biol 2003, 7, 563-9.
- 14. Wenzel, R. P.; Edmond, M. B. *N Engl J Med* **2000**, *343*, 1961-3.
- 15. DiMasi, J. A.; Hansen, R. W.; Grabowski, H. G. J Health Econ 2003, 22, 151-85.
- 16. Reichert, J. M. Nat. Rev. Drug Discovery 2003, 2, 695-702.
- 17. Service, R. F. Science 2004, 303, 1796-9.
- 18. Corey, E. J., Hopkins, P.B., Yoo, S.K.S., Nambiar, K.P., Falck, J.R. . *J Am Chem Soc* **1979**, *101*, 7131-34.
- 19. Woodward, R. B. J Am Chem Soc 1981, 103, 3215-17.
- Cuevas, C.; Perez, M.; Martin, M. J.; Chicharro, J. L.; Fernandez-Rivas, C.; Flores, M.; Francesch, A.; Gallego, P.; Zarzuelo, M.; de La Calle, F.; Garcia, J.; Polanco, C.; Rodriguez, I.; Manzanares, I. Org Lett 2000, 2, 2545-8.
- 21. Proksch, P.; Edrada, R. A.; Ebel, R. In Appl Microbiol Biotechnol, 2002; pp. 125-34.
- 22. Rinehart, K. L. Pure and Appl. Chem. 1977, 49, 1361-1384.
- 23. Clark, T., Weiss, R. J. Org. Chem. 1980, 45, 1790.
- 24. Lammertsma, K., Schleyer, P. von R., . J. Am. Chem. Soc. 1990, 112, 7935.
- 25. Wong, M. W., Radom, L. J. Mol. Struct. 1989, 198, 391.
- 26. Hiramatsu, K.; Hanaki, H.; Ino, T.; Yabuta, K.; Oguri, T.; Tenover, F. C. *J Antimicrob Chemother* **1997**, *40*, 135-6.
- 27. Hiramatsu, K.; Okuma, K.; Ma, X. X.; Yamamoto, M.; Hori, S.; Kapi, M. *Curr Opin Infect Dis* **2002**, *15*, 407-13.
- Weigel, L. M.; Clewell, D. B.; Gill, S. R.; Clark, N. C.; McDougal, L. K.; Flannagan, S. E.; Kolonay, J. F.; Shetty, J.; Killgore, G. E.; Tenover, F. C. *Science* 2003, *302*, 1569-71.
- 29. Weist, S., Bister, B., Puk, O., Bischoff, D., Pelzer, S., Nicholson, G.J., Wohlleben, W., Jung, G., Süssmuth, R.D. *Angewandte Chemie* **2002**, *114*, 3531-3534.
- 30. Weist, S.; Bister, B.; Puk, O.; Bischoff, D.; Pelzer, S.; Nicholson, G. J.; Wohlleben, W.; Jung, G.; Sussmuth, R. D. *Angew Chem Int Ed Engl* **2002**, *41*, 3383-5.

- 31. Ziehl, M.; He, J.; Dahse, H. M.; Hertweck, C. Angew Chem Int Ed Engl 2005, 44, 1202-5.
- 32. Hastings, J. W.; Greenberg, E. P. J Bacteriol 1999, 181, 2667-8.
- 33. Schauder, S.; Bassler, B. L. *Genes Dev* **2001**, *15*, 1468-80.
- 34. <u>http://www.che.caltech.edu/groups/fha/quorum.html</u>.
- 35. Bild-Quelle: <u>http://www.che.caltech.edu/groups/fha/quorum.html</u>.
- 36. Panstruga, R. Jahrbuch des Max-Planck-Instituts für Züchtungsforschung 2006.
- 37. Panstruga, R. *Biochem Soc Trans* **2005**, *33*, 389-92.
- 38. Cueto, M.; Jensen, P. R.; Kauffman, C.; Fenical, W.; Lobkovsky, E.; Clardy, J. *J Nat Prod* **2001**, *64*, 1444-6.
- 39. Thorwest, M. Dissertation, Universität Göttingen 2002.
- 40. Plitzko, I. Dissertation, Universittät Göttingen 2007.
- 41. Kupchan, S. M.; Komoda, Y.; Court, W. A.; Thomas, G. J.; Smith, R. M.; Karim, A.; Gilmore, C. J.; Haltiwanger, R. C.; Bryan, R. F. *J Am Chem Soc* **1972**, *94*, 1354-6.
- 42. Kupchan, S. M., Komoda, Y., Thomas, G. J., Hintz, H. P. J. J. Chem. Soc. 1972, 1065.
- 43. Kupchan, S. M., Komoda, Y., Branfman, A. R., Dailey, R. G. Jr., Zimmerly, V. A. J. *Am. Chem. Soc.* **1974**, *96*, 3706-08.
- 44. Kupchan, S. M.; Branfman, A. R.; Sneden, A. T.; Verma, A. K.; Dailey, R. G., Jr.; Komoda, Y.; Nagao, Y. *J Am Chem Soc* **1975**, *97*, 5294-5.
- 45. Ikeyama, S., Takeuchi, M. Biochem. Pharmacol. 1981, 30, 2421-5.
- 46. Remillard, S.; Rebhun, L. I.; Howie, G. A.; Kupchan, S. M. *Science* **1975**, *189*, 1002-5.
- 47. Mandelbaum-Shavit, F.; Wolpert-DeFilippes, M. K.; Johns, D. G. *Biochem Biophys Res Commun* **1976**, *72*, 47-54.
- 48. Hamel, E. *Pharmac. Ther.* **1992**, *55*, 31-51.
- 49. Issel, B. F., Crooke, S.T. Canc. Treat. Rev. 1978, 5, 199-207.
- 50. Thigpen, J. T., Ehrlich, C.E., Creasman, W.T., Curry, S., Blessing, J.A. Am J Clin Oncol **1985**, *6*, 273-275.
- 51. Thigpen, J. T., Ehrlich, C.E., Conroy, J., Blessing, J.A. Am. J. Clin. Oncol. **1985**, 6, 427-30.
- 52. Kalser, M. H. e. a. *Cancer Treatment Rep.* **1985**, 69, 417-20.
- 53. Ravry, M. J.; Omura, G. A.; Birch, R. Am J Clin Oncol 1985, 8, 148-50.
- 54. Higaside, E., Asai, M. Ootsu, K., Tanida, S., Kozai, Y., Hasegawa, T., Kishi, T., Sugino, Y., Yoneda, M. *Nature* **1977**, *270*, 721-722.
- 55. Hanka, L. J., Barnett, M. S. Antimicrob. Agent. Chemother. 1974, 6, 651-652.
- 56. Geran, R. I., Greenberg, N. H., Macdonald, M. M., Schumacher, A. M., Abbott, B. J. *Cancer Chemother. Rep.* **1972**, *3*, 1-103.
- 57. Suwanborirux, K., Chang, C.J., Spjut, R.W., Cassady, J.M. *Experientia* **1990**, *46*, 117-20.
- 58. Bandi, S., Kim, Y., Chang, Y., Shang, G., Yu, T., Floss, H.G. J. Microbiol. Biotechnol. 2006, 16, 1338-46.
- Yu, T. W.; Bai, L.; Clade, D.; Hoffmann, D.; Toelzer, S.; Trinh, K. Q.; Xu, J.; Moss, S. J.; Leistner, E.; Floss, H. G. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, *99*, 7968-73.
- 60. Komoda, Y., Kishi, T. Anticancer Agents based on Natural Product Models; Academic Press: New York, 1980.
- 61. Reider, P. J., Roland, D.M. *The Alkaloids*; Academic Press: New York, 1984; Vol. 23.
- 62. Smith, C. R., Powell, R.G. *Alkaloids*; John Wiley and Sons: New York, 1984; Vol. 2.

- 63. Cassady, J. M.; Chan, K. K.; Floss, H. G.; Leistner, E. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 2004, 52, 1-26.
- 64. Kupchan, S. M.; Sneden, A. T.; Branfman, A. R.; Howie, G. A.; Rebhun, L. I.; McIvor, W. E.; Wang, R. W.; Schnaitman, T. C. *J Med Chem* **1978**, *21*, 31-7.
- 65. Chari, R. V.; Martell, B. A.; Gross, J. L.; Cook, S. B.; Shah, S. A.; Blattler, W. A.; McKenzie, S. J.; Goldmacher, V. S. *Cancer Res* **1992**, *52*, 127-31.
- 66. Okamoto, K.; Harada, K.; Ikeyama, S.; Iwasa, S. Jpn J Cancer Res 1992, 83, 761-8.
- Liu, C.; Tadayoni, B. M.; Bourret, L. A.; Mattocks, K. M.; Derr, S. M.; Widdison, W. C.; Kedersha, N. L.; Ariniello, P. D.; Goldmacher, V. S.; Lambert, J. M.; Blattler, W. A.; Chari, R. V. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1996**, *93*, 8618-23.
- 68. Wir bedanken uns für die freundliche Überlassung des Plasmids pHGF7669 bei T. Wein Yu und Prof. H. G. Floss, NiH Seattle.
- 69. Czempinski, N. Diplomarbeit Universität Göttingen 2003.
- 70. Pfeifer, B. A.; Khosla, C. *Microbiol Mol Biol Rev* **2001**, *65*, 106-18.
- 71. Liebl, W.; Sinskey, A. J.; Schleifer, K. H. J Bacteriol 1992, 174, 1854-61.
- 72. Amann, E.; Brosius, J.; Ptashne, M. Gene **1983**, 25, 167-78.
- 73. Brosius, J.; Ullrich, A.; Raker, M. A.; Gray, A.; Dull, T. J.; Gutell, R. R.; Noller, H. F. *Plasmid* **1981**, *6*, 112-8.
- 74. Khosla, C., Cane, D.E., Kudo, F., Kinoshita, K. Chem. Biol. 2003, 9, 131-142.
- 75. Ballschmiter, M. Dissertation, Universität Göttingen 2005.
- 76. Ben-Samoun, K., Leblon, G., Reyes, O. FEMS Microbiol. Lett. 1999, 174, 125-130.
- 77. Chalut, C.; Botella, L.; de Sousa-D'Auria, C.; Houssin, C.; Guilhot, C. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2006**, *103*, 8511-6.
- 78. Liu, Q.; Ma, Y.; Zhou, L.; Zhang, Y. Arch Microbiol 2005, 183, 37-44.
- 79. Kubota, T.; Brunjes, M.; Frenzel, T.; Xu, J.; Kirschning, A.; Floss, H. G. *Chembiochem* **2006**, *7*, 1221-5.
- 80. Nakahama, K.; Izawa, M.; Asai, M.; Kida, M.; Kishi, T. J Antibiot (Tokyo) 1981, 34, 1581-6.
- 81. Wir bedanken uns für die freundliche Überlassung des Stammes HGF073 bei Prof. H.G. Floss, NiH Seattle.
- Le Brazidec, J. Y.; Kamal, A.; Busch, D.; Thao, L.; Zhang, L.; Timony, G.; Grecko, R.; Trent, K.; Lough, R.; Salazar, T.; Khan, S.; Burrows, F.; Boehm, M. F. *J Med Chem* 2004, 47, 3865-73.
- 83. Xu, L.; Eiseman, J. L.; Egorin, M. J.; D'Argenio, D. Z. *J Pharmacokinet Pharmacodyn* **2003**, *30*, 185-219.
- 84. <u>www.invivogen.com</u>.
- 85. Chen, G.; Wang, G. Y.; Li, X.; Waters, B.; Davies, J. J Antibiot (Tokyo) 2000, 53, 1145-53.
- 86. Kunze, B.; Steinmetz, H.; Hofle, G.; Huss, M.; Wieczorek, H.; Reichenbach, H. J Antibiot (Tokyo) 2006, 59, 664-8.
- 87. Tanida, S.; Hasegawa, T.; Hatano, K.; Higashide, E.; Yoneda, M. *J Antibiot (Tokyo)* **1980**, *33*, 192-8.
- 88. Wir bedanken uns für die freundliche Überlassung des Pilzes Chaetomium sp. 6556 bei Dr. J. Bitzer, Universität Göttingen.
- Kupchan, S. M.; Komoda, Y.; Branfman, A. R.; Sneden, A. T.; Court, W. A.; Thomas,
 G. J.; Hintz, H. P.; Smith, R. M.; Karim, A.; Howie, G. A.; Verma, A. K.; Nagao, Y.;

Dailey, R. G., Jr.; Zimmerly, V. A.; Sumner, W. C., Jr. J Org Chem 1977, 42, 2349-57.

- 90. Coecke, S., Eskes, C., Gartlon, J, Kinsner, A., Price, A., van Vliet, E., Prieto, P., Boveri, M., Bremer, S., Adler, S., Pellizzer, C., Wendel, A., Hartung, T. *Environmental Toxicology and Pharmacology* **2006**, *21*, 153-167.
- 91. Höfs, R., Walker, M. Angew. Chem. 2000, 112, 3400-03.
- 92. Bode, H. B.; Bethe, B.; Hofs, R.; Zeeck, A. Chembiochem 2002, 3, 619-27.
- 93. Groth, I.; Schutze, B.; Boettcher, T.; Pullen, C. B.; Rodriguez, C.; Leistner, E.; Goodfellow, M. *Int J Syst Evol Microbiol* **2003**, *53*, 2033-40.
- 94. Böttcher, T. Dissertation, Universität Bonn 2003.
- 95. Wir bedanken uns für die freundliche Überlassung des Stammes K. putterlickiae F98-18 bei Prof. E. Leistner, Universität Bonn.
- 96. Torssell, K. B. G. Natural Product Chemistry; Apotekarsocieteten: Stockholm, 1997.
- 97. Hoffmann, L. Dissertation, Universität Göttingen 2006.
- 98. Liang, L. Dissertation Universität Göttingen 2003.
- 99. Kind, R. Dissertation, Universität Göttingen 1991.
- 100. Koch, E. Persönliche Mitteilung 2006.
- 101. Baghdadi, A. M. Transactions of the british mycological society 1970, 54, 473-7.
- 102. Holmes, S. J. I. Grass and Forage Science **1983**, *38*, 209-214.
- 103. Ellner, F. M. Cereal Research Communications 1997, 25, 735-37.
- 104. Cook, R. J. Annu. Rev. Phytopathol. 1993, 31, 53-80.
- 105. Handelsman, J.; Stabb, E. V. Plant Cell 1996, 8, 1855-1869.
- 106. Montesinos, E. Int Microbiol 2003, 6, 245-52.
- 107. Raatkainen, O., Tuomisto, J., Tahvonen, R., Lahdenpera, M.L., Rosenqvist, H., Seiskari, P., Suokas, E. . In *Eur. Pat. Appl.*, 1991.
- 108. Bello, G. M. D., Monaco, C.I., Simon, M.R. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2002**, *18*, 627-636.
- 109. Khan, M. R., Fischer, S., Egan, D., Doohan, F.M. *Phytopathology* **2006**, *96*, 386-94.
- 110. <u>www.bba.de</u> 2007.
- 111. Koch, E., Weil, B., Eibel, P. Journal of Plant Diseases and Protection 2004, 111, 470-483.
- 112. Barrow, C. J.; Oleynek, J. J.; Marinelli, V.; Sun, H. H.; Kaplita, P.; Sedlock, D. M.; Gillum, A. M.; Chadwick, C. C.; Cooper, R. *J Antibiot (Tokyo)* **1997**, *50*, 729-33.
- 113. Pauncz, J. K. J Chromatogr 1985, 322, 386-90.
- 114. Abidi, S. L. J Chromatogr 1989, 464, 453-8.
- 115. Haegele, K. D.; Desiderio, D. M. J Antibiot (Tokyo) 1973, 26, 215-22.
- 116. Kabara, J. J.; Vrable, R. Lipids 1977, 12, 753-9.
- 117. Sontag, B., Dasenbrock, J., Arnold, N., Steglich, W. Eur. J. Org. Chem. 1999, 1051-1055.
- 118. Srobarova, A., Bukovcakova, M., Novosadova, D. Journal of Plant Diseases and Protection 1994, 101, 400-5.
- 119. Bowers, W. S., Hoch, H.C., Evans, P.H., Katayama, M. Science 1986, 232, 105-6.
- 120. Laatsch, H. *Antibase-a database for the identification of natural products* Chemical Concepts: Weinheim, 2007.
- 121. Chapman&Hall/CRC *Dictionary of Natural Products on CD-ROM*; Boca Raton (FL) 2007.

- 122. Wir bedanken uns für die freundliche Überlassung des Stammes FZB53 bei Dr. E. Koch, BBA Darmstadt.
- 123. Trejo-Estrada, S. R., Paszczynski, A., Crawford, D.L. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 1998, 21, 81-90.
- 124. Berrada, R., Dauphin, G., David, L. J. Org. Chem. 1987, 52, 2388-2391.
- 125. David, L.; Leal Ayala, H.; Tabet, J. C. J Antibiot (Tokyo) 1985, 38, 1655-63.
- 126. Seto, H.; Mizove, K.; Nakayama, H.; Furihata, K.; Otake, N.; Yonehara, H. *J Antibiot* (*Tokyo*) **1979**, *32*, 239-43.
- 127. Mouslim, J.; Cuer, A.; David, L.; Tabet, J. C. J Antibiot (Tokyo) 1995, 48, 1011-4.
- 128. van der Heijden, M. G. A., Klironomos, J.N., Ursic, M., Moutoglis, P., Streitwolf-Engel, R., Boller, T., Wiemken, A., Sanders, I.R. *Nature* **1998**, *396*, 69-72.
- 129. Harrison, M. J. Ann. Rev. Microbiol. 2005, 59, 19-42.
- 130. Varma, A., Verma, S., Sudha, Sahay, N., Bütehorn, B., Franken, P. Appl. Env. *Microbiol.* **1999**, *65*, 2741-2744.
- 131. Weiß, M., Selosse, M.-A., Rexer, K.-H., Urban, A., Oberwinkler, F. *Mycol. Res.* 2004, *108*, 1003-1010.
- 132. Singh, A., Sharma, J., Rexer, K.-H., Varma, A. Curr. Sci. 2000, 79.
- 133. Kumari, R., Kishan, H. Bhoon, Y.K., Varma, A. Curr. Sci. 2003, 85, 1672-1674.
- 134. Rai, M., Archarya, D., Singh, A. *Mycorrhiza* **2001**, *11*, 123-128.
- 135. Waller, F.; Achatz, B.; Baltruschat, H.; Fodor, J.; Becker, K.; Fischer, M.; Heier, T.; Huckelhoven, R.; Neumann, C.; von Wettstein, D.; Franken, P.; Kogel, K. H. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2005**, *102*, 13386-91.
- 136. Deshmukh, S.; Huckelhoven, R.; Schafer, P.; Imani, J.; Sharma, M.; Weiss, M.; Waller, F.; Kogel, K. H. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2006**, *103*, 18450-7.
- 137. Shahollari, B.; Varma, A.; Oelmuller, R. J Plant Physiol 2005, 162, 945-58.
- 138. Kaldorf, M.; Koch, B.; Rexer, K. H.; Kost, G.; Varma, A. *Plant Biol (Stuttg)* **2005,** *7*, 210-8.
- 139. Peskan-Berghöfer, T., Shahallori, B., Giong, P.H., Hehl, S., Markert, C., Blanke, V., Kost, G., Varma, A., Oelmüller, R. *Physiol. Plant* **2004**, *122*, 465-477.
- 140. ImageJ. <u>http://rsb.info.nih.gov/ij/</u>.
- 141. Sirrenberg, A., Göbel, C., Grond, S., Czempinski, N., Ratzinger, A., Karlovsky, P., Santos, P., Feussner, I., Pawlowski, K. *Physiol. Plant.* **2007**, *131* (4), 581-589.
- 142. Merck Anfärbereagenzien für die Dünnschichtchromatographie: Darmstadt, 1980.
- 143. Schlegel, H. G. Allgemeine Mikrobiologie; Georg Thieme Verlag: Stuttgart, 1992.

Danksagung

Als erstes möchte ich meiner Mentorin PD Dr. Stephanie Grond für die Überlassung der interessanten Themen, die die vorliegende Dissertation füllen, danken. Ebenfalls vielen Dank für das Engagement, diese Arbeit permanent mit vollem Einsatz zu begleiten und zu unterstützen.

Ein weiterer besonderer Dank gilt Hans-Jörg Langer, der durch einige kurzfristige Unterstützungen zu den Ergebnissen dieser Dissertation beigetragen hat.

Des Weiteren danke ich dem NMR-Team - Herrn Machinek, Martin Weitemeyer, Carola Zolke und Christiane Siebert - für die Aufnahme von NMR-Spektren, die oft schnell, kurzfristig und am besten vorgestern schon hätten gemessen werden sollen. Gleiches gilt natürlich auch für die abteilungseigene NMR-Truppe - Inken Plitzko, Sandra Lösgen und Melanie Quitschau - die immer, vor allem an den Wochenenden ihre Freizeit für die Messung und Bearbeitung meiner Spektren opferte. Vielen Dank an Frank Surup für viele zusätzliche NMR-Ausdrucke und Spreizungen.

Herzlichen Dank an die Abteilung Massenspektrometrie - György Udvarnoki, Frau Krökel und Herr Frauendorf - für die Aufnahme der Massenspektren und die stetige Hilfe bei jeglichen Problemen und Fragestellungen rund um die Massenspektrometrie.

Ein RIESEN Dankeschön an alle Korrekturleser dieser Arbeit! Ihr habt es erst möglich gemacht, dass diese Arbeit so ist, wie sie ist und dafür so einige freie Stunden geopfert, vor allem in sehr kurzer Zeit! Danke dafür an Marko Gentzsch, du hast den "gelben" Teil echt gerettet. Danke an Sandra Lösgen, deine Hilfe war wirklich Rettung in letzter Sekunde! Danke an Daniel Vollmar, du hattest wirklich am meisten in kürzester Zeit zu lesen und hast es auch noch gemacht! Danke an Philip Kössler für den Einsatz als "Fachfremder"! Danke an Adriana Textor, du hast den langweiligsten Part über dich ergehen lassen müssen! Danke an Frank Surup fürs super-schnelle Lesen! DANKE an euch alle, ihr seid super!!!

1000 Dank an Daniela Weiskopf. Wie oft hattest du mich während der Schreibphase am Telefon mit dem Satz: "Hilfe, mein Rechner spinnt!" Du hattest immer Zeit für mich, sogar bis spät abends und in die Nacht hinein, bis alles wieder lief. Ohne deine Hilfe wäre ich echt verzweifelt. Danke!

Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe GROND/ZEECK ein ganz liebes Dankeschön für eure ständige Hilfsbereitschaft, das absolut super Arbeitsklima und die schönen Mittage in der Mensa sowie die gemeinsamen Kaffeepausen. Auch außerhalb der Uni war es immer ein Riesen-Spaß mit euch! Bleibt so wie ihr seid... einfach super! Ohne euch wäre die Uni nicht

das gewesen, was sie ist und der tägliche Gang zur Arbeit hätte nur halb so viel Freude gemacht! Ein spezieller Dank noch an meinen direkten Schreibtischnachbarn Daniel... danke, dass du mich jeden Tag ertragen hast! Ohne dich, wäre es im "Chaos-Labor" ganz schön schwer gewesen ;-)

Herzlichen Dank an dieser Stelle an die Labornachbarn zur Rechten von G1: Frau Gastrock und Marianne Wagener. Vielen, vielen Dank für das ständige Heraus- und Zusammensuchen von Medi-Kram. Danke für das nette Pläuschchen am Morgen und die Leckerlies, die meist als Nervenfutter genau richtig kamen!

Großes Danke an meine Fitcom-Mädels (zuerst Diana Rehwaldt, später Melli, Temi, Christine und Nina)! Mit euch ist das sporteln immer ein Mega-Spaß! In den vielen Step-Stunden mit euch konnte ich so oft meine Anspannung und meinen Frust aus der Uni hinter mir lassen... denn Step ist einfach nur genial, nicht wahr?! ...und Toastbrot mit Nutella sind auch Frustvertreiber ;-)

Ein ganz liebes Dankeschön an meine Nachbarin Manuela Noack. Ohne dich wäre der Otto-Wels-Weg nichts! Ob eine Runde durch den Park, Rad-/Wandertour, Inline skaten, Freibad oder einfach nur ein Ohr zum Reinnörgeln... du warst für alles da! ...und wenn mich die Chemie nicht haben will, werde ich einfach deine persönliche Fotografin und Managerin ;-) Du wirst mir sehr fehlen!

Nun zu denen, die diesen Tag sehnsüchtig erwartet haben. Die Arbeit ist geschrieben, die Promotion beendet: Mama und Papa – habt ganz vielen, lieben Dank! Ich denke, ich brauche wohl nicht zu sagen, was ihr mir bedeutet! Hab euch unendlich lieb und bin froh, dass es euch gibt!