

„MINING FOR ALTERNATIVES“
NEUE MIKROBIELLE WIRKSTOFFPRODUZENTEN
SOWIE
MOLEKULARBIOLOGISCHE STUDIEN ZUR BIOSYNTHESE DES COLLINOLACTONS

Dissertation

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

vorgelegt von

DANIEL VOLLMAR

aus Northeim

Göttingen 2009

D7

Referentin: Prof. Dr. S. Grond

Korreferentin: Prof. Dr. C. Steinem

Tag der mündlichen Prüfung: 23.10.2009

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Organische und Biomolekulare Chemie der Georg-August-Universität Göttingen in der Zeit von Januar 2006 bis September 2009 unter der Anleitung von Frau Prof. Dr. S. GROND und Herrn Prof. Dr. A. ZEECK angefertigt.

Frau Prof. Dr. S. GROND und Herrn Prof. Dr. A. ZEECK danke ich für die interessante Themenstellung und die vielen wertvollen Diskussionen, die den Weg zu dieser Arbeit begleitet haben.

So eine Arbeit wird eigentlich nie fertig.

Man muss sie für fertig erklären, wenn man nach Zeit und Umständen das Mögliche getan hat.

JOHANN WOLFGANG VON GOETHE, Italienreise (1787)

Inhalt

A. Theoretischer Teil

1	Einleitung	1
2	Aufgabenstellung	9
3	Naturstoffe aus Mikroorganismen neuer pflanzlicher Habitate	11
3.1	Isolierung von Mikroorganismen und Stammauswahl.....	11
3.1.1	Chinesische Heilpflanzen als Quelle neuer Mikroorganismen.....	11
3.1.2	Chemisches Screening.....	12
3.1.3	Biologisches Screening	14
3.1.4	Ergebnisse des Screenings und Stammauswahl	16
3.2	<i>Streptomyces venezuelae</i> Wa232 (GS DV232)	19
3.2.1	Quelle und taxonomische Charakterisierung	19
3.2.2	Variation der Kultivierungsparameter und Isolierung der Metaboliten	20
3.2.3	Charakterisierung der Metaboliten	23
3.3	4-Methyl-2-chinazolinamin (21) aus <i>Streptomyces venezuelae</i> Wa232.....	26
3.3.1	4-Methyl-2-chinazolinamin (21)	26
3.3.2	Bestimmung der Säurekonstante von 4-Methyl-2-chinazolinamin (21)	29
3.3.3	Analogon des 4-Methyl-2-chinazolinamins (22).....	30
3.3.4	Kultivierung im Fermenter (Scale-up)	33
3.3.5	Darstellung von 4-Methyl-2-chinazolinamin (21)	35
3.3.6	Röntgenographische Charakterisierung von 21	35
3.3.7	Versuche zur Reproduktion des möglichen Analogons (22) von 21	37
3.3.8	Untersuchungen am Chlorid-Salz (29) von 4-Methyl-2-chinazolinamin (21)	38
3.3.9	Chinazoline in der Forschung	43
3.3.10	Biosyntheseuntersuchungen an 4-Methyl-2-chinazolinamin (21).....	46
3.3.11	Biologische Aktivität von 21	64

3.4	<i>Actinomyces</i> sp. Wa283 (GS DV283)	68
3.5	<i>Actinomyces</i> sp. WaS4811 (GS DV4811)	70
3.6	<i>Actinomyces</i> sp. WWa18 und <i>Actinomyces</i> sp. WWa183	72
3.7	Diskussion und Ausblick	73
4	Biosyntheseuntersuchungen an <i>Streptomyces griseus</i> 3822-14F	76
4.1	Bafilomycin A ₁ (16) und B ₁ (17)	76
4.1.1	Plecomakrolide – Potente ATPase Inhibitoren mit biosynthetischen Besonderheiten	76
4.1.2	Bisherige Untersuchungen zur Biosynthese der Bafilomycine	81
4.1.3	Fütterungsexperimente	84
4.1.4	Diskussion der Biosyntheseexperimente	89
4.2	2,4-Dimethoxycarbonylfuran (19)	92
4.2.1	Fermentation und Isolierung von 2,4-Dimethoxycarbonylfuran (19)	92
4.2.2	Furan als Baustein niedermolekularer Naturstoffe	93
4.2.3	Fütterung unmarkierter Vorläufer zur Produktionssteigerung	95
4.2.4	Fütterung von ¹³ C-markierten Glycerinen	99
4.2.5	Diskussion der Biosyntheseexperimente	100
4.2.6	Darstellung von 2,4-Dimethoxycarbonylfuran (19)	106
4.2.7	Biologische Aktivität des 2,4-Dimethoxycarbonylfurans (19)	108
5	Molekularbiologische Studien zur Biosynthese des Collinolactons	110
5.1	Collinolacton (20) – ein neuartiges Cyclodecatrien aus <i>Streptomyces</i> sp.	110
5.1.1	Produzentenstämme <i>Streptomyces</i> sp. Gö 40/10 und Tü 1892	110
5.1.2	Taxonomische Charakterisierung von <i>Streptomyces</i> sp. Gö 40/10	113
5.2	Collinolacton (20) – Struktur und biologische Aktivität	115
5.3	Biosynthese des Collinolactons (20)	118
5.4	Die Baeyer-Villiger Oxygenase (BVO) als Grundlage molekulargenetischer Arbeiten am Collinolacton (20)	120
5.4.1	Naturstoff-Biosynthesen mit putativer Baeyer-Villiger Oxygenase	120

5.4.2	Aufbau einer Cosmid-Genbank von <i>Streptomyces</i> sp. Gö 40/10	123
5.4.3	Design von BVO-spezifischen Primern für die PCR	124
5.4.4	PCR-basiertes Screening des Gesamtgenoms und der Cosmid-Bank von <i>Streptomyces</i> sp. Gö 40/10	131
5.4.5	Ergebnisse der Sequenzierung von PCR-Amplifikaten	139
5.4.6	Transformation von <i>S. albus</i> und <i>S. lividans</i>	140
5.4.7	Resistenzprofil von <i>Streptomyces</i> sp. Gö 40/10 und Tü 1892	142
5.4.8	Transformationsversuche an <i>Streptomyces</i> sp. Gö 40/10 und Tü 1892	143
5.4.9	Identifizierung des Collinolacton-Biosynthesegenclusters mittels Insertionsinaktivierung ...	144
6	Zusammenfassung der Ergebnisse	148

B. Experimenteller Teil

7	Allgemeine Materialien und Methoden	154
7.1	Instrumentelle Analytik	154
7.2	Chromatographie	156
7.3	Mikrobiologische Methoden und Geräte	160
7.4	Untersuchungen auf biologische Aktivität	165
8	Naturstoffe aus Mikroorganismen neuer pflanzlicher Habitate	167
8.1	Isolierung pflanzlich assoziierter Mikroorganismen	167
8.2	Chemisches Screening von pflanzlich assoziierten Actinomyceten	168
8.3	Chemisches Screening von endophytischen Pilzen	168
8.4	Biologisches Screening	169
8.5	<i>Streptomyces venezuelae</i> Wa232 (GS DV232)	169
8.6	<i>Actinomyces</i> sp. Wa283 (GS DV283)	184
8.7	<i>Actinomyces</i> sp. WaS4811 (GS DV4811)	187
8.8	<i>Actinomyces</i> sp. WWa18 (GS DV18)	189
8.9	<i>Actinomyces</i> sp. WWa183 (GS DV183)	190

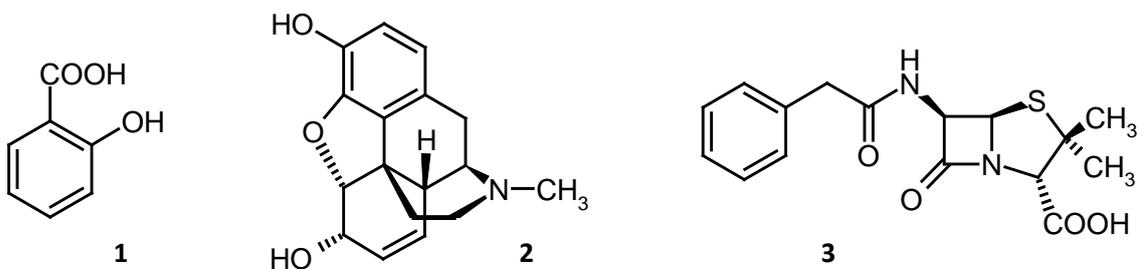
9	Biosyntheseuntersuchungen an <i>Streptomyces griseus</i> 3822-14F	192
9.1	Stammhaltung	192
9.2	Standard-Kultivierung und Aufarbeitung	192
9.3	Fütterungsexperimente zur Untersuchung der Biosynthese	192
9.4	Kultivierung zur Produktion von 2,4-Dimethoxycarbonylfuran (19).....	193
9.5	Isolierung der Metaboliten	193
9.6	Charakterisierung der Metaboliten	194
9.7	Fütterungsversuche zur Steigerung der Produktion von 2,4-Dimethoxycarbonylfuran (19)	197
9.8	Darstellung von 2,4-Dimethoxycarbonylfuran (19)	198
10	Genetische Studien zur Biosynthese des Collinolactons	200
10.1	Nährmedien, Puffer und Lösungen	200
10.2	Antibiotika	202
10.3	Enzyme.....	203
10.4	Weitere Reagenzien	204
10.5	<i>Escherichia coli</i> -Stämme und Plasmide.....	205
10.6	Kultivierung von <i>Streptomyces albus</i> und <i>Streptomyces lividans</i>	206
10.7	Kultivierung von <i>Streptomyces</i> sp. Gö 40/10 und Tü 1892	206
10.8	Isolierung und Reinigung von DNA	209
10.9	Charakterisierung von DNA.....	213
10.10	Amplifikation von DNA mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	214
10.11	Untersuchungen zur Primer-Spezifität mittels real-time PCR.....	219
10.12	Klonierungsexperimente und DNA-Transfer.....	220
11	Anhang.....	228
	C. Literaturverzeichnis.....	237

A. Theoretischer Teil

1 Einleitung

1.1 Naturstoffe als Quelle medizinischer Wirkstoffe

Bereits über Jahrhunderte hinweg vertraut der Mensch auf die Natur als Quelle für viele Grundbedürfnisse wie Nahrungsmittel, Kleidung, Baumaterialien und – nicht zuletzt – als Quelle für medizinische Wirkstoffe. Hierbei bilden besonders Pflanzen die Grundlage von traditionellen medizinischen Heilansätzen. Auch wenn einige dieser therapeutischen Ansätze manchmal als Irrglauben abgetan werden, stellt die (Heil-)Pflanzenkunde einen über Jahrtausende gewachsenen Wissenschaftszweig dar. Als einer der ersten Erwähnungen können Berichte aus Mesopotamien genannt werden, die auf ca. 2300 v. Chr. datieren. Hier wird von Ölen aus *Cedrus* sp. (Zeder), *Cupressus sempervirens* (Zypresse) oder *Commiphora* sp. (Myrrhe) berichtet.^[1] Bis heute werden diese Substanzen zur Behandlung von Krankheitssymptomen, wie Husten oder Erkältungen sowie parasitischen Infektionen und Entzündungen eingesetzt. Anfangs standen nur die Effekte auf den Körper im Fokus, wie die schmerzlindernde Wirkung der Weidenrinde (*Cortex salicis*) oder die narkotisierenden Anwendung des Schlafmohns (*Papaver somniferum*). In der modernen Forschung wurden diese aktiven Prinzipien als Reinsubstanz erhalten und charakterisiert: Salicylsäure (**1**) aus der Weidenrinde bzw. Morphin (**2**) aus dem Mohn. Wo anfangs nur Pflanzen als Wirkstoffquelle angenommen wurden, rückten ab der Entdeckung des antibakteriellen Penicillins (**3**) aus dem Schimmelpilz *Penicillium notatum* im Jahr 1928 auch Mikroorganismen in den Fokus der Forschung.



Naturstoffe leisten auf der Grundlage traditioneller Medizin auch heute bei über 80 % der Weltbevölkerung einen entscheidenden Beitrag bei der Gesundheitsvorsorge.^[1] Die Bedeutung von Naturstoffen für therapeutische Anwendungen ist gut dokumentiert.^[2] Vergleicht man die Informationen über Quellen, aus denen neue Arzneimittel zwischen 1981 und 2007 gewonnen wurden, so zeigt sich, dass über 50 % der absatzstärksten Produkte auf dem westlichen Markt Naturstoffe sind oder Naturstoffe als Leitstrukturen für das Wirkstoffdesign dienten.^[3,4]

Der Bedarf an neuartigen Substanzen besonders vor dem Hintergrund schnell auftretender Resistenzen ist unbestritten. Dabei nehmen die sekundären Naturstoffe, d.h. Substanzen, die für die primären Bedürfnisse eines Organismus und für sein Überleben keine unmittelbare Bedeutung haben, eine zentrale Stellung ein und entstammen ungewöhnlich komplexen Biosynthesewegen. Das Potential von sekundären Naturstoffen bei der Suche nach neuen Wirkstoffen liegt in der oft überraschenden Strukturdiversität, wobei der Einfallsreichtum der Natur die menschlichen Ideen oft übersteigt und neue Leitstrukturen aus natürlichen Quellen für die Wirkstoffentwicklung liefert^[5,6].

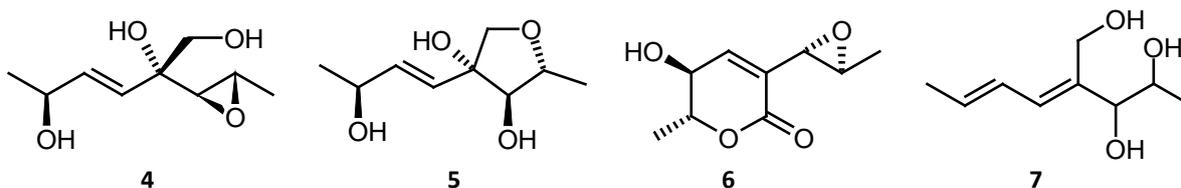
Das Interesse an neuen Naturstoffstrukturen für die Wirkstoffforschung hat bisher in den meisten Forschungsarbeiten die Suche nach den ursächlichen Zusammenhängen der mikrobiellen Sekundärstoffproduktion in den Hintergrund treten lassen. Das Bemühen, Details über biologische Zusammenhänge zu erfahren, kommt zu kurz. Fragen nach den ökologischen Zusammenhängen des mikrobiellen Sekundärstoffwechsels, die vergleichende Betrachtung des Habitats der Produzentenorganismen und die Charakterisierung der gebildeten Substanzen standen meist nicht im Mittelpunkt. Nach dem heutigen Kenntnisstand ist für die gefundenen Strukturen aus den unterschiedlichsten Quellen (u.a. Pflanzen, Mikroorganismen, Invertebraten) kein ursächlicher Zusammenhang zwischen ihrer Bildung und ihrem therapeutischen Nutzen erkennbar.^[3] Während für viele Sekundärstoffe aus Pflanzen ihr Nutzen für den Produzenten belegt werden kann (z.B. als Abwehrstoff gegen Fraßfeinde oder als Lockstoff für Insekten), gibt es für mikrobielle Sekundärstoffe (aus Bakterien und Pilzen) kaum Untersuchungsergebnisse.

Für die enorme Vielfalt des mikrobiellen Sekundärstoffwechsels, besonders aus der Gruppe der *Actinomycetales*, *Pseudomonas* ssp., der Myxobakterien oder *Aspergillus* als Vertreter der Pilze werden unterschiedliche Ursachen diskutiert, die von einer „Spielwiese der Natur“ bis hin zum evolutiven Prinzip des „survival of the fittest“ reichen.^[7] Dieses weite

Diskussionsforum hat vor dem Hintergrund der Aufklärung des Gesamtgenoms von Produzentenstämmen neue Aktualität gewonnen: Die Genome enthalten ungeahnt viele Informationen über bisher nicht erschlossenes Potential einer neuen Strukturdiversität, wobei die Regulationsmechanismen zur Realisierung dieser neuen Metaboliten bisher kaum verstanden werden. Außerdem gibt der Vergleich der Genome verschiedener Spezies völlig neue Impulse zu Fragen des Gentransfers zwischen Mikro- und Makroorganismen, besonders auch für die Bildung von Sekundärstoffen.^[8,9]

Aufgrund der Tatsache, dass mittlerweile mehr als 150 000 Naturstoffe bekannt sind, ist die Wahrscheinlichkeit, eine bereits bekannte Substanz zu finden, relativ groß geworden. Zurzeit bemüht sich die Forschung intensiv um neue Suchstrategien und die optimale Nutzung natürlicher Ressourcen. Viel Aufmerksamkeit wird neuen biogenen Quellen gewidmet, wie Extremstandorte (u.a. heiße Quellen, Antarktis), marine Habitate (wie Schwämme, Invertebraten) oder symbiotische Lebensgemeinschaften (z.B. Mikroorganismen an/in Insekten und Pflanzen). Die wenig untersuchten marinen Organismen lieferten in letzter Zeit zahlreiche neuartige Strukturen.^[10] Höchst evident ist jedoch das Problem der Ausbeutung der knappen Ressourcen empfindlicher Habitate, da z.B. Methoden zur Laborproduktion von Stoffen aus Schwämmen fehlen („sustainable development“) (s. folgendes Kapitel).

Eine zweite Strategie beruht auf der intensiven Bearbeitung von „gut handhabbaren“ Organismen, die durch Variation der Kultivierungsparameter (OSMAC-Methode – ‚One-Strain-Many-Compounds‘)^[11,12] eine Vielzahl von neuen Produkten zugänglich machen. So konnte beispielsweise anfangs nur ein Metabolit, Aspinonen (**4**), aus *Aspergillus ochraceus* DSM7428 als Hauptmetabolit mit Ausbeuten von 8 mg/L identifiziert werden.^[13] Durch Variation der Kultivierungsbedingungen und detaillierte Analyse des Metabolitenspektrums wurden 15 neue Sekundärstoffe (u.a. **5-7**) isoliert, teilweise mit Ausbeuten von 94 mg/L.^[14]



Die Fortschritte in der Genetik machen eine dritte Strategie reizvoll, wobei bekannte Naturstoffe mithilfe genetischer Methoden nach dem Verfahren der ‚Kombinatorischen Biosynthese‘ zu „unnatürlichen Naturstoffen“ führen sollen.^[15,16] Völlig neuartige Grundstrukturen sind mit letzterer Strategie allerdings nicht zu erwarten, ihr biologisches Wirkpotential ist häufig noch unbekannt.^[17]

Bei Versuchen einer Einteilung der Naturstoffe, die eine hohe strukturelle Diversität aufweisen, hat sich neben biologischen und chemischen Methoden vor allem die biogenetische Klassifizierung bewährt. Die Biogenesequellen des Primärstoffwechsels (Zucker-, Carbonsäure-, Aminosäurepool) liefern die Bausteine für bestimmte Sekundärmetaboliten. Grundlegende Einblicke in die Biosyntheseabläufe eines Produzenten können die Einordnung der Organismen in den natürlichen Zusammenhang voranbringen. Für bisher unbekannte Metaboliten, deren chemische Struktur neuartig ist, sind Biogeneseuntersuchungen die Grundlage für Fermentationsoptimierungen und zur Einordnung in Strukturklassen. Außerdem gewinnt man erste Hinweise zu Fragen der Regulation und der ökologischen Bedeutung dieser Stoffe.

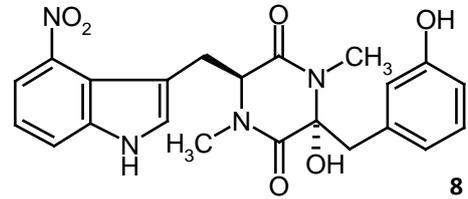
Die moderne Biosyntheseforschung bedient sich neben molekularbiologischen Methoden vor allem organisch-chemischer und spektroskopischer Methoden. Die Anwendung ¹³C-markierter Vorläufer für Biogeneseuntersuchungen ist deshalb so vorteilhaft, weil ein erfolgreicher Einbau im Zielmolekül direkt aus ¹³C-NMR-Experimenten hervorgeht.

1.2 Naturstoffe aus „Microcommunities“ – Heilpflanzen als Wirkstoffquelle

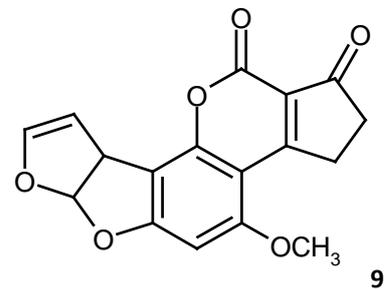
Wenig Aufmerksamkeit fand bisher die Lebensgemeinschaft von Pflanzen und erfolgreichen Sekundärstoffproduzenten, obwohl deren Anpassung an einen bestimmten Lebensraum für eine ungewöhnliche Spezialisierung und damit einen sehr individuellen Sekundärstoffwechsel sprechen. Hierzu wird derzeit begonnen, systematische Untersuchungen von Ökosystemen unter Einbeziehung ihrer Mikrohabitate sowie deren Wechselwirkungen aufzuklären. Der Vergesellschaftung mit den Pflanzen sollte eine natürliche Kommunikation zugrunde liegen, die zu spezifisch wirksamen Stoffen führen müsste.

Als Beispiel zur „Lebensgemeinschaft“ zwischen Pflanzen und begabten Sekundärstoffproduzenten sind hier die Interaktionen zwischen phytopathogenen Actinomyceten und

Kartoffeln zu nennen. Auch hier scheint die bakterielle Pathogenität stark vom individuellen Sekundärstoffwechsel abhängig zu sein. Eingehende Untersuchungen zur Biosynthese durch mikrobiologische und molekulargenetische Studien zeigten einen direkten Zusammenhang zwischen Pathogenität und der Produktion des Phytotoxins Thaxtomin A (**8**). Bei weitergehenden Untersuchungen zur Regulation der Thaxtominproduktion konnte ein fein justiertes Netz an Einflussfaktoren aufgezeigt werden.^[18]



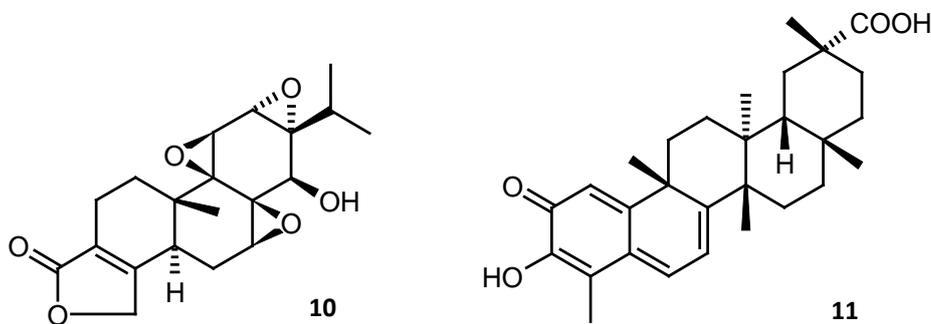
Dagegen werden traditionelle Arzneipflanzen hinsichtlich ihrer therapeutischen Anwendung ungleich wenig intensiv untersucht.^[19] Beispielsweise beschäftigte sich eine japanische Arbeitsgruppe mit mikrobieller Kontamination und mit der Isolierung des Mykotoxins Aflatoxin (**9**) aus *Aspergillus flavus* auf traditionellen Arzneipflanzen Indonesiens, jedoch ohne chemisch-analytische Weiterbearbeitung.^[20]



Um eine Lösung für das mehr und mehr aufkommende Problem „große Bemühungen – weniger Wirkstoffe“^[21] zu finden, orientieren sich immer mehr Forscher an traditioneller Medizin als Ideengeber für neuartige Wirkstoffe. Allerdings liegt das Problem in traditionellen Heilmitteln oftmals darin begründet, dass nicht eine Einzelkomponente eine biologische Aktivität besitzt, sondern Synergie-Effekte der Komponentenmischung ausschlaggebend sind.^[22] In einem Verständnis dieser Synergie liegt also ein möglicher Schlüssel zu neuartigen, aktiven Substanzen.

In den letzten Jahren hat die westliche Welt zaghafte Kenntnis der Traditionellen Chinesischen Medizin (TCM) als Quelle für potentielle Wirkstoffe genommen.^[23,24,25] Parallel dazu nahm auch die Übernahme der TCM auf weitere gesundheitliche Konzepte der westlichen Welt zu.^[26] Die TCM besitzt eine lange Geschichte und beschäftigt sich neben den eigentlichen Arzneimitteln aus der Natur auch mit deren Theorie und Methodologie. Sie wird in China als hohes kulturelles Erbe angesehen. Der ursprüngliche chinesische Bezeichnung ‚ben cao‘ rührt von der Quelle der meisten Heilstoffe her: Pflanzen.

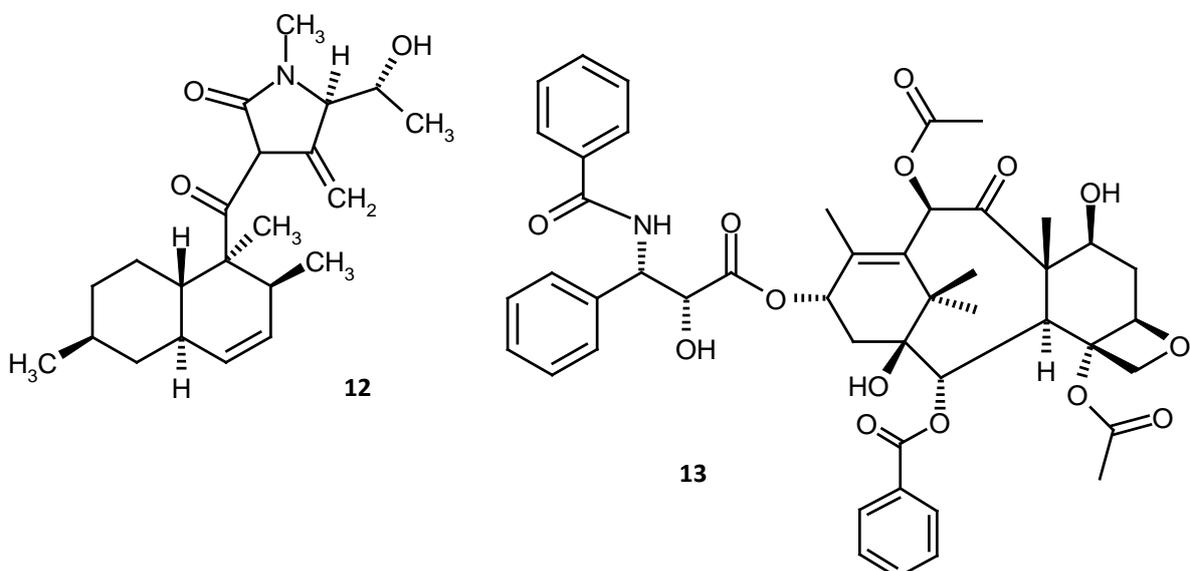
Natürlich kam es durch diesen Austausch der Kulturen auch zu einer Übernahme von – aus Chinas Sichtweise – ausländischen Heilpflanzen und Kräutern. Gebräuchliche Mittel sind hier z.B. Aloe, Myrrhe, Fenchel, Knoblauch oder Nelken.^[27] Besonders eine Mischung dieser Heilansätze führte zu wirksamen Arzneimitteln. Vor gut 80 Jahren kombinierte Z. XI-CHUN das westliche „Allheilmittel“ Aspirin mit *Gypsum fibrosum*, einer TCM Heilpflanze. Diese Mischung wurde beispielsweise bei fieberhafter Arthritis eingesetzt.^[28] Eine weitere in China gegen Arthritis verwendete TCM-Pflanze ist *Radix et Rhizoma Tripterygii*; sie gehört jedoch auch zu den toxischsten aller TCM-Pflanzen.^[29] Das daraus isolierte Triptolid (**10**) oder das Celastrol (**11**) stellen vielversprechende Immunosuppressiva bzw. Antiphlogistika (Entzündungshemmer) dar. Allerdings ist ein medizinischer Einsatz aufgrund starker Nebenwirkungen bisher nicht möglich.^[30] Generell liegt der Heilansatz der TCM aber auf Synergie-Effekten der eingesetzten Komponenten. Das Pionierwerk der TCM ‚Prescriptions for Fifty-two Diseases‘ (ca. 300 v. Chr. erstellt) beschreibt für ein Heilmittel beispielsweise eine Mischung von ein bis zwei Komponenten. In einem Folgewerk hatte man die Wirkung größerer „Komponenten-Cocktails“ erkannt; hier wurden bereits vier bis sieben Komponenten für ein Heilmittel beschrieben.^[29]



Der Bedarf an Heilpflanzen steigt. Dies liegt einerseits an der wachsenden Weltbevölkerung als auch an der Rückbesinnung auf die erwähnte Naturheilkunde. All dies führte zu der Auffassung, dass wirklich neuartige Naturstoffe besonders dann zu finden sind, wenn man immer häufiger sehr sensible oder seltene Habitate erschöpfend beprobt. Die Sammlung des natürlichen Materials erfolgt jedoch in den meisten Fällen nicht nachhaltig. Dieses Problem des großen Bedarfs an neuen Wirkstoffen unter Nutzung von nicht-regenerativen Ressourcen gilt es zu lösen. Ein Ansatzpunkt bieten „begabte“ Mikroorganismen, welche zumeist im Labor unbegrenzt oft zu kultivieren sind und daher als unerschöpfliche Quelle zur Produktion von Substanzen genutzt werden können.

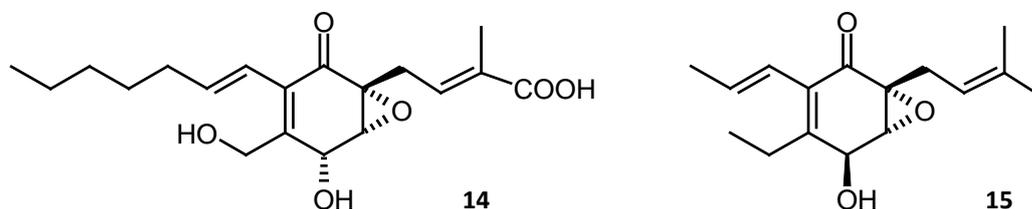
Systematische Untersuchungen für die Sekundärstoffbildung von „begabten“ Bakterien pflanzlicher Habitate gibt es zur Zeit allerdings nur vereinzelt. Es lässt sich nur annehmen, dass viele der isolierten und in den Labors genutzten Bodenbakterien z.B. aus Wurzelbereichen von Pflanzen isoliert wurden, den ökologischen Zusammenhängen wurde jedoch bisher wenig Bedeutung beigemessen.

Von einigen Pilzen, die als Endophyten mit höheren Pflanzen vergesellschaftet sind, gibt es hingegen einige wenige Beispiele für einen aktiven Sekundärstoffwechsel. In der Literatur sind beispielsweise Metaboliten aus Endophyten beschrieben, wie das antifungisch wirksame CR377 oder die Tetramsäure Cryptocin (**12**), die eine antimycotische Aktivität gegen den Reisschädling *Pyricularia oryzae* aufweist.^[31] Der bisher am meisten beachtete Metabolit eines Endophyten ist Paclitaxel (**13**), der Wirkstoff des Cytostatikums Taxol, der zuerst aus der Rinde der pazifischen Eibe *Taxus brevifolia* isoliert wurde und seit 1982 klinische Anwendung findet. Die Gewinnung des Stoffes in extrem geringen Mengen aus der Eibenrinde ist ökologisch sehr bedenklich. Taxol wird heutzutage häufig auf semisynthetischem Weg aus Baccatin III gewonnen. Baccatin III allerdings muss ebenfalls sehr kostspielig und aufwändig aus den Nadeln von *Taxus* sp. isoliert werden.^[32] 1993 fand man einen endophytischen Pilz, dessen Kultivierung die bisherige Produktionsweise ablösen könnte.^[33] Bis heute sind jedoch alle Alternativen in der Durchführung zu komplex oder führen nur zu geringen Ausbeuten an **13**. Neue Hoffnung wächst aus einem Ansatz von 2009, der die Gewinnung von Taxol aus dem endophytischen Pilz *Gliocladium* sp. – isoliert aus *Taxus baccata* – beschreibt.^[34]



Aus diesen Gründen rückt ein neuer Aspekt in die Zielsetzung der Naturstoffforschung: Das Auffinden von Sekundärstoffproduzenten in der Mikroumgebung traditionell genutzter Pflanzen.^[35] Dieser Ansatz wird auch als ‚ethnobotanischer Ansatz‘ beschrieben. Ethnobotanik ist eine Wissenschaft mit dem Ziel, historisch gewachsene Heilansätze und Heilmethoden zu untersuchen und die Erkenntnisse über die medizinische Pflanze in Wirkprinzipien zu übersetzen. Dabei ist ein möglicher Weg zu einem aktiven Naturstoff in mehrere Schritte gegliedert: 1. Auswertung von ethnobotanisch untersuchten Heilpflanzen, 2. Isolierung assoziierter Mikroorganismen, 3. Analyse des Wirkprinzips bzw. der Wirkmoleküle (auch aus Mikroorganismen), 4. Beschaffung der Wirkmoleküle in größerem Maßstab, 5. Untersuchung der Wirkung *in vitro/in vivo*, 5. Finale Entwicklung des medizinischen „Rohstoffs“.

Dieses einfach anmutende Prinzip ist jedoch bis heute nicht in einem großen Ansatz speziell in Hinblick auf Mikroorganismen von Heilpflanzen beschrieben worden. In einem Programm mit dem Ziel assoziierte Mikroorganismen tropischer (Heil-)Pflanzen zu isolieren und auf ihre Sekundärstoffproduktion zu untersuchen konnten erste Erfolge berichtet werden.^[36] So ist beispielsweise der Pilz *Pestalotiopsis microspora* als häufiger Endophyt von tropischen Regenwaldpflanzen anzutreffen. Je nach Habitat wies der Pilz ein anderes Metabolitenspektrum auf, was auf eine direkte Beziehung zum Wirt schließen lässt. In einigen Stämmen dieser Spezies konnte ein hochfunktionalisiertes Cyclohexenon (**14**) nachgewiesen werden, welches eine starke antifungale Aktivität besitzt.^[37] In einer kürzlich entdeckten *Pestalotiopsis* Spezies, *P. jesteri*, welche in einem Flussgebiet Papua-Neuguineas vorgefunden wurde, zeigt das strukturell verwandte Jesteron (**15**) eine starke Aktivität gegen pflanzenpathogene Pilze.^[38]



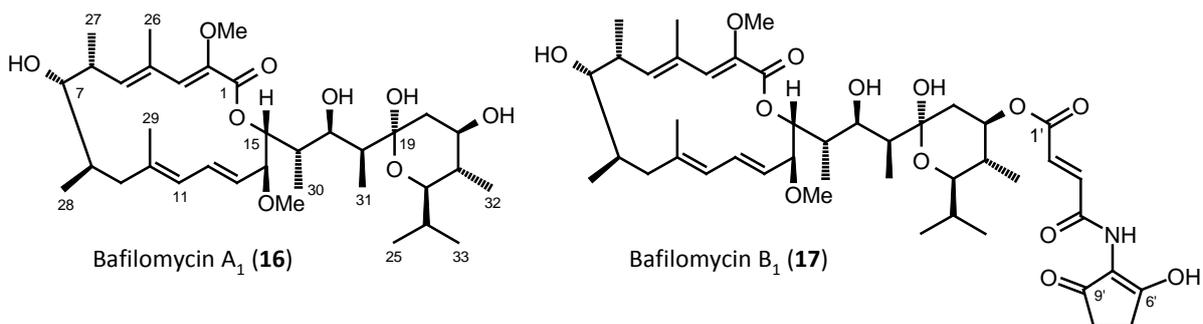
Wenn man sich vor Augen führt, dass jede der bisher 300 000 beschriebenen Pflanzenspezies nur einen Endophyten oder assoziierten Mikroorganismus beherbergt, birgt die Welt der Mikroorganismen noch eine enorme Vielzahl an biologischer und chemischer Vielfalt, die als Quelle für potentiell aktive Naturstoffe genutzt werden kann.^[39] Ein nachhaltiger Umgang mit dieser „natürlichen Apotheke“ ist dennoch unumgänglich.

2 Aufgabenstellung

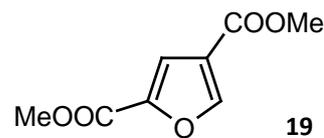
In dieser vorliegenden Arbeit werden sowohl mikrobiologische als auch molekulargenetische Schwerpunkte im Bereich der Erforschung mikrobieller Sekundärstoffe behandelt. Dabei gliedert sie sich in drei Teilgebiete, welche jeweils bestimmten Aspekten der modernen Naturstoffforschung gewidmet sind:

Thema des ersten Teils ist, Mikroorganismen erstmals aus pflanzlichen Mikrohabitaten der Traditionellen Chinesischen Medizin (TCM) zu isolieren und als Wirkstoffproduzenten in Kultur zu nehmen. Ausgewählt wurden die als „begabte Produzenten“ eingestuft Actinomyceten und Pilze. Die isolierten Mikroorganismen wurden einem breiten chemischen und biologischen Screening unterzogen, um eine Auswahl produktiver Stämme und geeigneter Kultivierungsparameter treffen zu können. Aus den anschließenden Fermentationen galt es, neuartige mikrobielle Sekundärmetaboliten zu isolieren, in ihrer Struktur aufzuklären und in ausreichender Menge der biologischen Aktivitätsprofilierung zur Verfügung zu stellen. An ausgewählten Sekundärmetaboliten sollten auf Grundlage von „klassischen“ Fütterungsexperimenten Hypothesen zu deren Biosynthese formuliert werden.

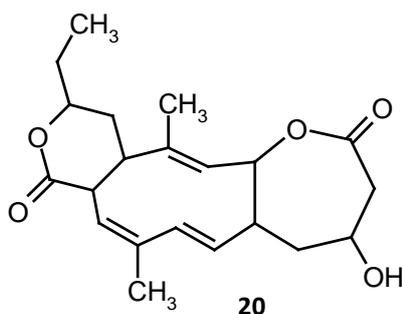
Die Untersuchungen zur Biosynthese der Plecomakrolide Bafilomycin A₁ (**16**) und B₁ (**17**) aus *Streptomyces griseus* 3822-14F bilden das zweite Thema dieser Arbeit. Im Rahmen der Dissertation von T. SCHUHMANN wurden hierzu bereits erste Experimente durchgeführt.^[40] Dabei fielen zwei C₂-Einheiten im Molekül auf, welche als „ungewöhnlich methoxylierte Einheiten“ beschrieben wurden. Es galt, Isotopen-markierte Vorläufer einzusetzen, um die bisher formulierte Biosynthese-Hypothese dieser „ungewöhnlichen Einheiten“ für **16** und **17** zu überprüfen und mit der für das strukturverwandte Concanamycin A (**18**) zu vergleichen.



Ein 2,4-substituiertes Furan (**19**) konnte von T. SCHUHMANN als Nebenprodukt von Fütterungsversuchen mit isotonenmarkiertem Glycerin isoliert werden. Im Fokus dieser Arbeit standen die Produktionssteigerung von **19** und Studien zu dessen biosynthetischen Ursprung mittels Vorläufer-dirigierte Biosynthese.



Des Weiteren beschäftigt sich diese Arbeit mit molekulargenetischen Untersuchungen zur Identifizierung des Biosynthesegenclusters von Collinolacton (**20**) aus dem Bakterium *Streptomyces* sp. Gö 40/10.^[41] Das aus diesem Stamm isolierte Cyclodecatrien Collinolacton (**20**) eröffnet mit seinem 7-10-6 Ringsystem eine neue Klasse an Sekundärmetaboliten. L. HOFFMANN formulierte auf Grundlage von Fütterungsexperimenten eine Hypothese zur Biosynthese von **20**. Demnach folgen der Polyketid-Biosynthese, welche durch eine Polyketidsynthase vom Typ I (PKS I) vermittelt werden soll, noch weitere post-PKS Modifikationen. Einer dieser Reaktionsschritte wurde als Baeyer-Villiger Oxidation postuliert.^[41] Im Rahmen dieser Arbeit sollten die Untersuchungen zum Auffinden des Biosynthesegenclusters mit Hilfe der zugehörigen Baeyer-Villiger Oxygenase (BVO) fortgesetzt werden. Unter Verwendung molekularbiologischer Arbeitstechniken sollten Vorarbeiten mit dem Fernziel des Designs einer BVO-spezifischen Sonde geleistet werden.



3 Naturstoffe aus Mikroorganismen neuer pflanzlicher Habitate

3.1 Isolierung von Mikroorganismen und Stammauswahl

3.1.1 Chinesische Heilpflanzen als Quelle neuer Mikroorganismen

Das Pflanzenmaterial, welches als Quelle der hier studierten Mikroorganismen diente, stammt aus der Stadt Harbin im Nordosten Chinas (Heilongjiang Provinz). Das dortige kontinental-sibirische Klima hat einen entsprechenden Einfluss auf die Vegetation.

Alle Pflanzen wurden vor Ort nach dem ethnobotanischen Ansatz ausgewählt; es handelt sich hierbei ausnahmslos um Pflanzen, welche in der chinesischen Heillehre verwendet werden. Die Pflanzen wurden gemeinsam mit M. WINK (Universität Heidelberg)ⁱ ausgewählt und unter sterilen Bedingungen gesammelt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden vier Pflanzen als Quelle der Mikroorganismen ausgewählt:

- *Caltha palustris sibirica* Regel: Diese Pflanze wird in Deutschland als Dotterblume (Familie *Ranunculaceae*) bezeichnet. In China ist sie unter dem Begriff 三角叶驴蹄草 (*san jiao ye lu ti cao*)^[42] bekannt und soll äußerlich angewandt z.B. gegen Bronchitis helfen.
- *Crataegus pinnatifida* Bge.: Die Gattung Weißdorn (*Crataegus*) zählt zur Familie der Rosengewächse. In der chinesischen Medizin werden die getrockneten Blüten, Blätter und Früchte von 山楂 (*shan zha*)^[43] als Tee oder alkoholischer Auszug bei Herz- und Kreislaufstörungen angewendet, weshalb der Weißdorn auch die Bezeichnung Herzpflanze trägt. Oligomere, Procyanidine und Flavanoide sind bekannte Inhaltsstoffe.^[44]
- *Filipendula palmata* (Pallas) Maximowicz: Dieses Rosengewächs (*Rosaceae*) trägt den deutschen Namen (sibirische) Mädesüß und ist ein typischer Vertreter der Flora in der Heilongjiang Provinz. Seine chinesische Bezeichnung 蚊子草 (*wen zi cao*)^[45] deutet auf eine mögliche Wirkung gegen Insekten.^[46] Einige Quellen bescheinigen *F. palmata* eine Anwendung in der TCM, wobei sie als bittere, kühlende Heilpflanze beschrieben wird. Mädesüß – speziell Kraut und Blüten – enthalten Gerbstoffe, die adstringierend, antibakteriell und keimtötend wirken. Die nachgewiesene Salicylsäure erklärt ihre Nutzung bei rheumatischen und entzündlichen Beschwerden.^[44]

ⁱ An dieser Stelle danke ich M. WINK für die Unterstützung bei der Auswahl und Bestimmung des Pflanzenmaterials.

- *Viola alisoviana* Kiss.: Ein Veilchengewächs (*Violaceae*), welches im Deutschen auch als Viola bezeichnet wird. In der chinesischen Medizin konnten aufgrund dieser Klassifizierung zwei Spezies zugeordnet werden: *Viola mandshurica* (东北堇菜, *dong bei jin cai*) bzw. *Viola philippica* var. *philippica* (紫花地丁 [原变种], *zi hua di ding [yuan bian zhong]*).^[47] *Viola* sp. als Tee oder Tinktur angewandt sollen heilende Wirkung bei Juckreiz und sogenannter Herbst-Kälte zeigen.^[44]

Insgesamt konnten 51 Bakterienstämme (Actinomyceten) und 20 Pilze aus diesen Pflanzen isoliert werden, die aufgrund ihres differenzierten Erscheinungsbildes (Wachstum, Mycel, Agarfärbung) als jeweils eigene Spezies vermutet wurden, wobei eine taxonomische Einordnung zunächst ausblieb. Die Bakterien wurden von Oberflächen der Pflanzen nach einem im Arbeitskreis etablierten Protokoll isoliert (vgl. Kapitel 8.1) und sind daher als assoziiert zu bezeichnen. Die Pilze wurden nach einer Methode zur Isolierung von echten endophytischen Organismen gewonnen.

3.1.2 Chemisches Screening

Für eine effiziente Suche nach neuen aktiven Naturstoffen wurden verschiedene, in der Forschung bewährte Verfahren angewandt. Durch das sogenannte chemische Screening soll der „metabolische Fingerabdruck“ eines Stammes in seiner ganzen Breite zugänglich gemacht werden, um dessen Potential abwägen zu können. Im Gegensatz zum biologischen Screening ist dieses Verfahren *a priori* nicht mit der biologischen Aktivität der Metaboliten verknüpft. Anfang der 70er Jahre nutzten YAGI *et al.* die Dünnschichtchromatographie und Sprühreagenzien, die zu einer wärmevermittelten Farbreaktion führten, zur Identifizierung von Sekundärstoffen auf Basis von Purin- und Pyrimidinbasen.^[48] Der Begriff und die Anwendung des chemische Screenings als solches wurden von den Arbeitsgruppen von A. ZEECK^[49,50], H. ZÄHNER^[51] sowie S. OMURA^[52] ausgearbeitet und geprägt. Hierbei liegt das Augenmerk auf chromatographischen Trennmethoden und den physikochemischen Eigenschaften der Metaboliten. Eine Detektion erfolgt über Polarität (R_f -Werte) und Eigenfarbe der Substanzen, UV-Löschung sowie Anfärbeverhalten durch Sprühreagenzien. Die eigene Erfahrung bei der Bewertung von Experimenten mit Dünnschichtchromatographie und Sprühreagenzien ist hier von hoher Bedeutung.

Durch Einbezug gekoppelter Trenn- und Analyseverfahren (HPLC-MS, HPLC-NMR) ist diese Methode, besonders im Rahmen des industriellen High-Throughput-Screenings (HTS),

weiterhin ein wichtiges Werkzeug bei der Erforschung von Naturstoffen.^[53,54] Hierbei ist der Einsatz großer und damit kostenspieleriger, spezifisch abgestimmter Datenbanken von herausragender Wichtigkeit.

Um das Biosynthesepotential eines Stammes möglichst auszuschöpfen, wurde das OSMAC-Verfahren (One Strain – Many Compounds)^[11,12] dem chemischen Screening zugrunde gelegt. Der OSMAC-Ansatz geht von der Beobachtung aus, dass einzelne Sekundärstoffproduzenten mehr Metaboliten bilden können, als sich bei der Untersuchung von Rohextrakten nach Kultivierung in nur einem Medium erkennen lässt. Somit führt die Fermentation von Stämmen unter vielfältigen Kultivierungsbedingungen häufig zu einer erheblichen Erweiterung des Substanzprofils eines einzelnen Stammes.

Durchführung: Die Kultivierung der Mikroorganismen fand im Rahmen dieser Arbeit parallel in vier unterschiedlichen Nährmedien statt. Bei den Actinomyceten (je 2× 50 mL Schüttelkultur) wurde neben den häufig im chemischen Screening verwendeten Medien M2 (Malz-Hefe-Glucose), HF (Hafer), SM (Soja-Mannit) und SGG (Stärke-Glucose-Glycerin) ein neues Medium aus Mikroalgen (Spirulina) eingesetzt. Ziel war es, durch Verwendung von Spirulina ein möglichst Pflanzen-ähnliches Medium zu schaffen. Allerdings führte die Kultivierung in diesem Medium zu keiner sichtbaren Vergrößerung des Metabolitenspektrums, weshalb nach einigen Versuchen nur noch die im Arbeitskreis etablierten Medien M2, HF, SM und SGG Verwendung fanden. Die jeweiligen Fermentationsansätze wurden nach 72 bzw. 96 Stunden aufgearbeitet. Die Kultivierungsdauer orientierte sich am pH-Wert, welcher zum Erntezeitpunkt mehr als 6.0 betragen sollte. Eine Aufarbeitung erfolgte bei allen Proben nach dem gleichen Verfahren (s. Abbildung 1). Insgesamt wurden 20 Actinomyceten-Stämme untersucht, die aufgrund unterschiedlichen Mycelbewuchses, Farbstoffbildung oder Exudat-Produktion ausgewählt wurden.

Die endophytischen Pilze wurden sowohl in Schüttelkulturen (2× 300 mL Medium) als auch in Ruhekulturen (2× 1 L Medium) fermentiert. Dabei fanden die Medien NL1158, BM (Biomalz), G20 und SGG Verwendung. Alle Schüttelkulturen wurden nach sechs Tagen aufgearbeitet, die Ruhekulturen nach 28 Tagen. Eine Aufarbeitung erfolgte bei allen Proben gemäß Abbildung 1. Es wurden vier Stämme endophytischer Pilze untersucht.

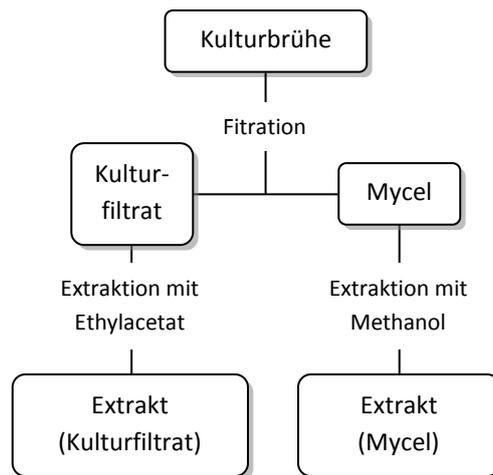


Abbildung 1: Aufarbeitungsschema der Kulturen im chemischen Screening.

Die erhaltenen Extrakte wurden dünn-schichtchromatographisch aufgetrennt (HPTLC, Chloroform/Methanol 9:1). Die Visualisierung der Metabolite erfolgte unter UV-Licht (254 nm und 350 nm) sowie durch Behandlung mit den Ansprühreagenzien Anisaldehyd (Farbreaktionen u.a. bei Zuckern, Steroiden, Terpenen), Ehrlichs-Reagenz (Farbreaktionen u.a. bei Aminen und Furanen) und Orcin (Farbreaktion bei Zuckern).

An dieser Stelle erfolgte eine Einstufung der Stämme, ob eine Kultivierung im größeren Maßstab stattfinden sollte. Anhaltspunkte hierzu stellten Anzahl und Intensität anfärbender Zonen auf dem Dünnschichtchromatogramm dar. Es wurde jedoch nicht die Isolierung und Charakterisierung des gesamten Metabolitenspektrums verfolgt, sondern nur einzelne, gut zu detektierende Substanzen selektiert. Eine derartige Auswahl beruht auf Erfahrungswerten und ist daher teilweise als subjektiv zu betrachten. Eine Übersicht über die Ergebnisse des chemischen Screenings aller untersuchten Stämme befindet sich im Anhang (Kapitel 11.2).

Ausgewählte Rohextrakte wurden im Anschluss einem biologischen Screening unterzogen. Es wurde jedoch entschieden, dass dies auf die Auswahl zur Kultivierung im größeren Maßstab zunächst keinen Einfluss hatte (s. folgendes Kapitel).

3.1.3 Biologisches Screening

Die Bewertung von Naturstoffen bzw. Extrakten orientiert sich beim biologischen Screening an Wechselwirkungen zwischen untersuchter Substanz und eingesetzten Testorganismen. Ausschließlich aktive Substanzen bzw. Extrakte werden daraufhin gereinigt und charakterisiert. Ein derartiges Screening auf der Basis antagonistischer Beziehungen brachte für die

Antibiotikaforschung bahnbrechende Resultate mit sich: Herauszustellen sind an dieser Stelle die Arbeiten an Mikroorganismen aus Erdproben von S. A. WAKSMAN^[55] und H. A. LECHEVALIER^[56]. Das Screening von Actinomyceten nach ihrer antibiotischen Wirkung führte 1940 zu der Entdeckung von Actinomycin. Weitere potente Antibiotika, wie Streptomycin (1943) und Neomycin (1948) konnten auf diesem Wege isoliert werden.^[57,58] 1952 wurden die Arbeiten WAKSMANS zu Streptomycin mit dem Nobelpreis geehrt. Auch im Bereich des biologischen Screenings wird heute häufig auf High-Troughput-Screening gesetzt. Hierbei werden beispielsweise Naturstoffbibliotheken gezielt auf bestimmte Aktivitäten analysiert.^[59]

Trotz aller Erfolge birgt dieser Ansatz auch das große Risiko falsch positiver bzw. falsch negativer Ergebnisse. Vor allem das Auffinden bereits bekannter, hochpotenter Naturstoffe, die in ihrer Wirkung besonders auffällig sind, ist durchaus häufig. Viele Naturheilmittel sind komplexe Substanzgemische und entfalten ihre Wirkung nur durch synergistische Effekte der Einzelkomponenten. Somit führt eine Isolierung von Einzelkomponenten manchmal zu einem Rückgang der zuvor beobachteten Aktivität. Des Weiteren kann ein als „nicht aktiv“ beurteiltes Extrakt dennoch aktive Substanzen enthalten, die während des Screenings im Extrakt in nicht ausreichender Menge vorlagen.

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte ein Test der im chemischen Screening gewonnenen Extrakte auf ihre antimikrobielle bzw. antifungische Aktivität. Die Untersuchung erfolgte als Plattendiffusionstest; eine Aussage über die Aktivität der Extrakte wurde über die Größe der Hemmhöfe (Tabelle 1) im Vergleich zu Hemmhöfen bekannter Antibiotika bzw. Antimykotika (Tabelle 2) getroffen.

Zusätzlich wurden ausgewählte Extrakte an die *BASF AG* geleitet. Dort fand eine Beurteilung hinsichtlich einer für den Pflanzenschutz relevanten biologischen Aktivität statt. Die Substanzen wurden in Mikrotestsystemen auf eine hemmende Wirkung gegen phytopathogene Pilze und schädigende Insekten geprüft. Bei größeren Probenmengen erfolgte zusätzlich eine Testung *in vivo* (Gewächshaus-Test). Biologisch aktive Extrakte wurden mittels HPLC aufgetrennt und die einzelnen Fraktionen hinsichtlich ihrer biologischen Aktivität erneut untersucht. Die Korrelation zwischen Retentionszeit und Aktivität kann so für eine spätere Isolierung der Metaboliten genutzt werden.

3.1.4 Ergebnisse des Screenings und Stammauswahl

Insgesamt wurden während des chemischen und biologischen Screenings 20 assoziierte Actinomyceten und vier endophytische Pilze untersucht. Durch Kultivierung in unterschiedlichen Nährmedien konnte ein Überblick über einen Großteil des Metabolitenspektrums gewonnen werden. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass vor allem Kultivierungen in den Nährmedien M2 und SM zu Zonen im Dünnschichtchromatogramm (DC) führten, welche als „interessant“ beurteilt wurden. Fast alle Fermentationen im Medium SGG zeigten ein dichtes Metabolitenspektrum im DC, welche z.T. auf Substanzen aus dem komplexen Medium zurückzuführen waren. Besonders viele fluoreszierende Zonen (bei 350 nm) konnten nach Kultivierung in SGG detektiert werden. Durch Erfahrungswerte lässt sich allerdings davon ausgehen, dass es sich hierbei meist um Minderkomponenten – d.h. Metaboliten in Konzentrationen $\ll 1$ mg/L – handelt. Eine Kultivierung in Hafer-Medium (HF) musste aufgrund des langsamen Wachstums der meisten Stämme in diesem Medium häufig für vier Tage durchgeführt werden. Dennoch lag der pH-Wert am Ende oftmals unter einem Wert von 6.0. Möglicherweise war das Medium zur Fermentation der untersuchten Stämme weniger geeignet. Dieses spiegelte sich im DC auch in einem „dünnen“ Metabolitenspektrum wieder, welches nach Kultivierung in HF-Medium zu beobachten war. Die Wahl des Spirulina-Mediums führte zwar zu hohen pH-Werten und der damit verbundenen Annahme, dass der Stamm sehr schnell seine Wachstumsphase beendet hatte. Allerdings fiel die Bewertung aufgrund der wenigen Zonen im DC, bis auf eine Ausnahme, als „uninteressant“ aus. In keinem der Mycel-Extrakte jeglicher eingesetzter Medien konnten Zonen bzw. Metaboliten detektiert werden, die als „interessant“ eingestuft wurden.

Wie bereits erwähnt, richtete sich die Beurteilung eines Stammes nach seinem „metabolischen Fingerabdruck“ im DC. Von Interesse war das Vorliegen von ein bis drei Hauptmetaboliten, welche sich als gut zu detektierende Zonen zeigen sollten. Dabei sollte die Polarität im mittleren Bereich liegen; sehr polare Substanzen im Bereich der Auftragsstelle (u.a. Aminosäuren, Zucker) und sehr unpolare Substanzen im Bereich der Laufmittelfront (u.a. Fettsäuren) blieben unberücksichtigt. Aufgrund der oben genannten Kriterien wurden acht der 20 Actinomyceten als „interessant“ und weitere fünf als „eingeschränkt interessant“ eingestuft. Im Rahmen dieser Arbeit konnten sechs Actinomyceten-Stämme bearbeitet werden, wobei es zusätzlich zur Variation der

Kultivierungsmedien bei einigen Stämmen kam. Da sich diese Arbeit nur den Studien von Actinomyceten widmet, wurden die drei als „interessant“ betrachteten endophytischen Pilze N. BEETZ zur Verfügung gestellt und von ihr in Absprache bearbeitet.^[60] Eine Übersicht der Ergebnisse aus beiden Screening-Projekten ist in Tabelle 1 dargestellt. Hierbei sind nur Stämme aufgelistet, die im chemischen oder biologischen Screening unser Interesse weckten.

Tabelle 1: Übersicht über die Mikroorganismen-Stämme, welche im Screening durch ihr Metabolitenmuster bzw. ihre biologische Aktivität auffielen. Fett gedruckte Stämme werden in dieser Arbeit besprochen. Chemisches Screening: interessant (+), eingeschränkt interessant (o). Die Anzahl der Zonen bezieht sich nur auf das Kulturfiltrat-Extrakt. Für das biologische Screening ist die Größe der Hemmhöfe [mm] im Plattendiffusionstest angegeben, wobei das benutzte Antibiotikatestplättchen einen Durchmesser von 6 mm besaß. Es wurden jeweils 15 µL einer 5 mg/mL Lösung der Extrakte des Kulturfiltrats aufgetragen. - = keine Aktivität; n.b. = nicht bestimmt; (M) = Extrakt des Mycels. BASF-Einstufung: F = fungizid; I = insektizid.

Stamm	Medium	Chem. Screening		Biologisches Screening				
		+ Zonen	o Zonen	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>	BASF
Actinomyceten								
HaB34	SM		1	-	-	-	-	n.b.
HaB351	SGG		1	-	-	-	-	n.b.
Wa21	Spirulina		1	-	-	-	-	n.b.
Wa232	M2	2		-	-	-	-	-
	SM		1	-	-	-	-	-
	SGG	3		9	8	-	-	-
	HF	4		7	-	-	-	F
Wa2621	SM		1	17	-	-	-	n.b.
	SGG	2		24	-	11	-	n.b.
Wa283	M2			14	10	9	14	-
	SM	2		-	-	-	-	F
	SGG			14 ^(M)	11 ^(M)	9 ^(M)	15 ^(M)	-
	HF			10 / 9 ^(M)	-	-	9 / 10 ^(M)	-
	SM	1		-	-	-	-	F
WaS4811	SGG			14	11	9	11	-
	Spirulina			12	9	-	9	-
	SM		1	-	-	-	-	n.b.
WW111	SGG		1	-	-	-	-	n.b.
WW121	M2	1		-	-	-	-	n.b.
WWa271	SM		1	-	10	-	-	n.b.
WWa141	M2	1		-	-	-	-	F
	SM	2		10	9	8	8	F
	SGG		1	16	-	10	9	-
WWa18	SM	1		-	-	-	-	n.b.
	HF	1		-	-	-	-	n.b.
WWa183	M2	1		13	-	8	9	n.b.
Pilze								
MeB	1158	1		-	-	-	-	n.b.
VeT11	1158	2		-	-	-	-	I ^(M)
WeB111	1158	3		12	-	8	-	-
	BM	2		9	-	-	-	-
	SGG	3		9	-	-	-	-

Tabelle 2: Plattendiffusionstests ausgewählter Wirkstoffe: Hemmhof-Durchmesser [mm] nach 24 Stunden zur Einordnung der biologischen Aktivität der im Screening untersuchten Extrakte. Es wurden jeweils 15 µL einer 0.5 mg/mL Lösung aufgetragen; bei *E. coli* 30 µL. Der Durchmesser des Antibiotikatestplättchens betrug 6 mm.

Wirkstoff	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>
Ampicillin	43	-	45	-
Chloramphenicol	23	18	16	-
Erythromycin	32	40	17	-
Nystatin	-	-	-	23
Penicillin	44	-	45	-
Tetracyclin	15	26	27	-

3.2 *Streptomyces venezuelae* Wa232 (GS DV232)

3.2.1 Quelle und taxonomische Charakterisierung

Der Bakterienstamm wurde als assoziierter Actinomycet vom Blatt (*Folium*) der Pflanze *Filipendula palmata* (Pall.) Maxim. isoliert. Als Festphasenkultur auf M2⁺-Agar bildet dieser Stamm ein grau-rosa gefärbtes Luftmycel unter Verdunkelung des Agars aus.

Die taxonomische Klassifizierung erfolgte in einem ersten Schritt durch die Firma *Biotecon Diagnostics* (Potsdam). Hierzu wurden Bereiche der 16S rDNA des Stammes sequenziert und im Alignment mittels BLAST^[61] mit bekannten Sequenzen verglichen. Hierbei gab es 100 % Übereinstimmung mit *Streptomyces venezuelae*^[62] und *Streptomyces zaomyceticus*^[63]. Eine weitere Unterscheidung war im untersuchten Sequenzbereich nicht möglich.

Ein Vergleich der Stämme im ‚Compendium of Actinomycetales‘^[64] zeigte, dass eine Differenzierung auf Grundlage der Zuckerverwertung möglich sein sollte. SHIRLING und GOTTLIEB konnten in ihren Studien zur Klassifizierung von Actinomyceten zeigen, dass die Nutzung von neun bestimmten Zuckern als Kohlenstoffquelle stammtypisch erfolgt.^[65,66] Die Verwertung dieser sogenannten ISP-Zucker („International *Streptomyces* Project“) wurde durch die DSMZ (Braunschweig) untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

Tabelle 3: Vergleich der Melaninproduktion und Zuckerverwertung der Stämme Wa232 (GS DV232), *Streptomyces venezuelae* (DSMZ-Nr. 40230) und *Streptomyces zaomyceticus* (DSMZ-Nr. 40196). Die Experimente erfolgten durch die DSMZ (Braunschweig). +: positiv; -: negativ.

	Wa232	<i>S. venezuelae</i>	<i>S. zaomyceticus</i>
Melaninproduktion auf			
Pepton-Eisen	-	+	+
Tyrosin	-	-	-
ISP-Zucker als C-Quelle			
Glucose	+	+	+
L-Arabinose	+	+	-
Saccharose	-	-	-
D-Xylose	+	+	+
Inositol	-	-	-
Mannitol	-	-	-
D-Fructose	+	+	-
Rhamnose	+	+	-
Raffinose	-	-	-

Im Gegensatz zu *S. venezuelae* werden L-Arabinose, D-Fructose und Rhamnose von *S. zaomyceticus* nicht verwertet. Eine Nutzung dieser drei ISP-Zucker konnte für den Stamm Wa232 (GS DV232) jedoch ganz klar aufgezeigt werden. Im Unterschied zu *S. venezuelae* zeigte Wa232 jedoch keine Melaninproduktion auf Pepton-Eisen Medium. Trotz dieser Tatsache wird der isolierte Actinomycet Wa232 im Folgenden als *Streptomyces venezuelae* angenommen. Des Weiteren konnte durch gaschromatographische Analyse des Fettsäuremusters eine Zugehörigkeit zum Genus *Streptomyces* bestätigt werden.^[67]

3.2.2 Variation der Kultivierungsparameter und Isolierung der Metaboliten

Im chemischen Screening wurden mehrere Zonen der Rohextrakte im Dünnschichtchromatogramm (DC) als „interessant“ eingestuft. Ferner zeigten die Extrakte der Kultivierung in M2- und SGG-Medium eine signifikante biologische Aktivität im Plattendiffusionstest. Daraus resultierte eine Kultivierung im größeren Maßstab unter Einsatz der Medien HF, M2 und SGG.

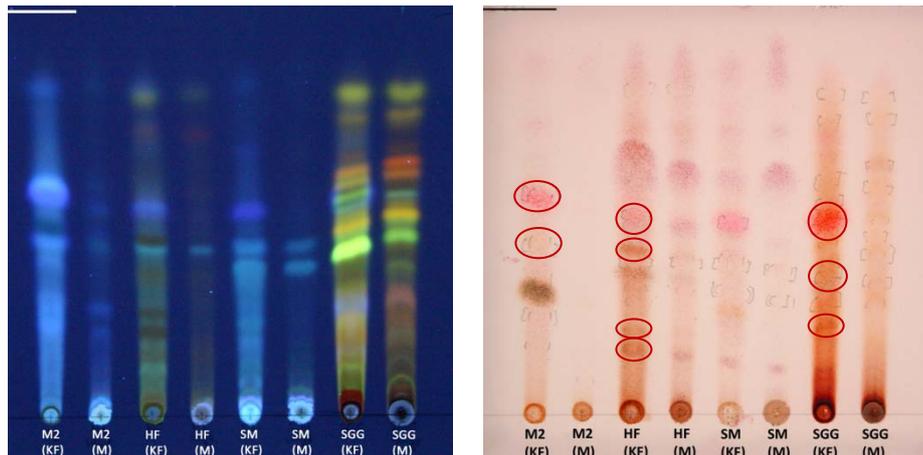


Abbildung 2: Dünnschichtchromatogramme (Kieselgel, Chloroform/Methanol 9:1) der im chemischen Screening aus *Streptomyces venezuelae* Wa232 gewonnenen Rohextrakte. Links: unter UV-Licht (350 nm); rechts: nach Anfärben mit Anisaldehyd. KF = Extrakt des Kulturfiltrats; M = Extrakt des Mycels. Eingezeichnet sind für eine weitere Bearbeitung relevante Zonen.

Nach Gewinnung der Kulturfiltratextrakte erfolgte in allen Fällen eine Chromatographie an Kieselgel (Chloroform/Methanol 9:1). Durch diese erste Fraktionierung konnten sehr polare (Zucker etc.) bzw. sehr unpolare Substanzen (Fettsäuren etc.) als störende Faktoren für weitere Trennschritte entfernt werden.

Kultivierung in HF-Medium: In diesem Medium wurden drei mit Ehrlich rot anfärbende und UV-löschende Zonen im DC ausgewählt. Zusätzlich stand eine blau-weiß fluoreszierende Zone ($R_f = 0.45$, Chloroform/Methanol 9:1) im Interesse, welche mit Anis in der Wärme über eine rote zu einer gelben Farbreaktion führte. Die Veränderung dieses bereits breiten Metabolitenmusters sollte durch Anwendung des OSMAC-Prinzips^[11,12] überprüft werden. Um jedoch die Zahl an Variationen zu begrenzen, erfolgte die Kultivierung immer in 1 L-Erlenmeyerkolben mit 250 mL Medium. Es wurden folgende Variationen vorgenommen:

- HF-Medium (Leitungswasser) unter Zusatz von ‚Spur 11‘
- HF-Medium (Leitungswasser) ohne Zusatz von ‚Spur 11‘
- HF-Medium (demineralisiertes Wasser) unter Zusatz von ‚Spur 11‘
- HF-Medium (demineralisiertes Wasser) ohne Zusatz von ‚Spur 11‘

Jede Variante wurde in Erlenmeyerkolben mit Schikane und ohne Schikane angesetzt. Zusätzlich wurden diese jeweils einmal unter Verwendung von Rundschüttlern (180 rpm) und einmal unter Verwendung von Längsschüttlern (120 spm) kultiviert. Somit ergaben sich insgesamt 16 unterschiedliche Kultivierungsansätze. Zur 72. Stunde lag der pH-Wert bei allen

Ansätzen bei durchschnittlich 5.5 und die Kulturen besaßen eine braune Farbe. Es zeigte sich, dass durch Verwendung von Leitungswasser bzw. demineralisiertem Wasser deutlich unterschiedliche Metabolitenspektren erhalten wurden. In demineralisiertem Wasser kam es zur Bildung von wesentlich weniger Metaboliten. Die weiteren Faktoren schienen keinen Einfluss zu besitzen.

Ausgewählte Fraktionen aus der Kultivierung in demineralisiertem Wasser wurden nach dem ersten Trennschritt an Kieselgel erneut einer Säulenchromatographie an Kieselgel unterzogen (Cyclohexan/Ethylacetat/Methanol 5:10:2). Durch Mitteldruckchromatographie (MPLC) konnte 4-Methyl-2-chinazolinamin (**21**) als weißer Feststoff in Ausbeuten von 2 mg/L gewonnen werden.

Aus dem Kultivierungsansatz in Leitungswasser konnten allerdings keine für die Charakterisierung ausreichenden Mengen an Substanzen isoliert werden. Eine Fermentationen im größeren Maßstab war daher konsequent (s. Kapitel 3.3.4).

Kultivierung in M2-Medium: Im chemischen Screening wurden zwei Zonen im DC für eine genauere Betrachtung ausgewählt: Beide zeigten UV-Löschung, von denen die polarere mit Ehrlich gelb, die unpolare rot-violett anfärbte. Der Kultivierungsansatz betrug 5 L, wobei keine weiteren Variationen vorgenommen wurden.

Nach der Vorfraktionierung des Rohprodukts erfolgten weitere Aufarbeitungsschritte unter Verwendung von Gelchromatographie, MPLC bzw. HPLC (s. Abbildung 3).

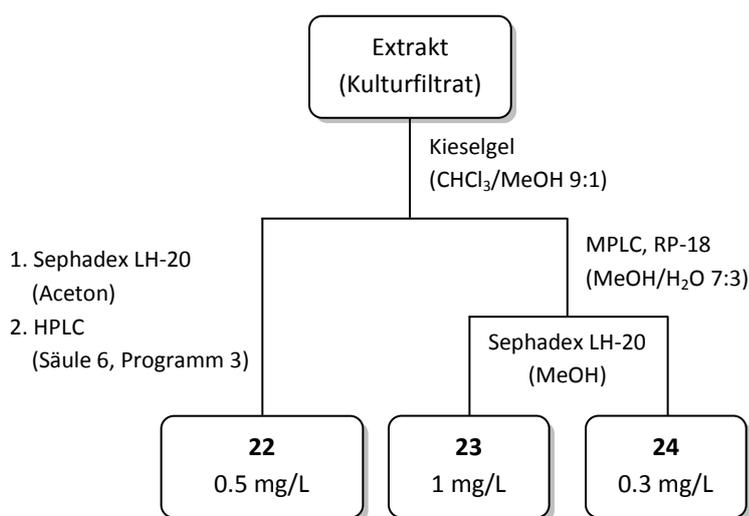


Abbildung 3: Isolierungsschema der Metaboliten aus *Streptomyces venezuelae* Wa232 aus der Fermentation in M2-Medium.

Kultivierung in SGG-Medium: Besonders unter UV-Licht (350 nm) zeigte sich ein breites Metabolitenspektrum. Häufig verbergen sich dahinter jedoch Minderkomponenten. Drei dieser Zonen im mittel-polaren Bereich wiesen zusätzlich ein Anfärbeverhalten sowohl mit Ehrlich (braun) als auch Anisaldehyd (rot) auf, so dass eine Kultivierung im 6 L-Maßstab durchgeführt wurde.

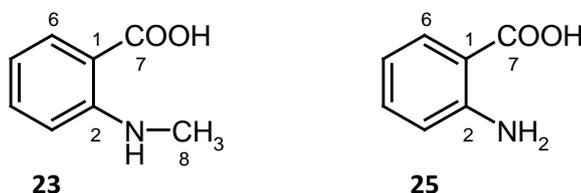
Trotz des größeren Ansatzvolumens konnte nach Chromatographie an Kieselgel und MPLC (RP-18, Methanol/Wasser 7:3) nur **21** in Ausbeuten von 1.5 mg/mL gewonnen werden. Die im DC auffallend fluoreszierenden Metaboliten wurden in zu geringen Mengen isoliert, so dass eine spektroskopische Charakterisierung nicht möglich war.

3.2.3 Charakterisierung der Metaboliten

Die sowohl aus M2-, HF- als auch SGG-Medium isolierte Substanz **21** wird ausführlich in Kapitel 3.3 diskutiert.

3.2.3.1 *N*-Methylantranilsäure (**23**)

Die Summenformel der blass gelben Substanz **23** konnte mittels HR-EI-MS als $C_8H_9NO_2$ bestimmt werden. Im 1H -NMR-Spektrum fand sich ein leicht tieffeldverschobenes Signal einer Methylgruppe ($\delta_H = 2.94$), welches die Gegenwart eines Heteroatoms vermuten ließ. Der Aromatenbereich des Protonenspektrums wies vier Signale im Bereich $\delta_H = 6.5-8.0$ auf. Aufgrund ihres Kopplungsmusters konnten die zugehörigen Protonen als benachbart bestimmt werden. Zusammen mit den spektroskopischen Daten und Recherche in der Naturstoffdatenbank *AntiBase*^[68] konnte die Substanz **23** als *N*-Methylantranilsäure identifiziert werden.

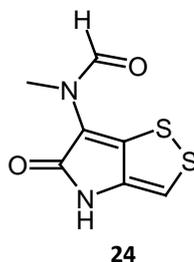


Anthranilsäure (**25**) ist biosynthetisch eng mit dem Shikimat-Weg verknüpft. Dieser in Actinomyceten häufig vorkommende Biosyntheseweg bildet u.a. die Grundlage für die Biosynthese der Aminosäuren L-Phenylalanin, L-Tyrosin oder L-Tryptophan. Viele Sekundärmetaboliten wurden ebenso hierauf zurückgeführt.^[69] Das *N*-methylierte Derivat

der Anthranilsäure (**25**) ist ein selten beschriebener mikrobieller Metabolit. **23** konnte beispielsweise aus einem marinen Streptomyceten isoliert werden.^[70] I.-S. CHEN *et al.* beschrieben kürzlich zum ersten Mal **23** als Metabolit aus dem Wurzelholz von *Zanthoxylum integrifolium*, einem Rautengewächs, das ebenfalls in der traditionellen (taiwanesischen) Medizin eingesetzt wird.^[71] Dennoch liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei **23** vorrangig um ein Zwischen- bzw. Abbauprodukt des Metabolismus komplexerer Substanzen handelt. Im Plattendiffusionstest führte **23** zu keiner Hemmhofbildung.

3.2.3.2 Thioaurin (**24**)

Die Substanz **24** konnte als gelber Feststoff isoliert werden. Diese Eigenfarbe erklärt auch die Auffälligkeit im DC während des chemischen Screenings. Die Summenformel $C_7H_6N_2O_2S_2$ konnte aus einem hochauflösenden ESI-Massenspektrum berechnet werden. Grundlage hierfür bilden die positiven Ionen mit $m/z = 215$ ($[M+H]^+$) und 237 ($[M+Na]^+$). Während erster Auswertungen des 1H -NMR fiel auf, dass es sich bei **24** um ein Isomerengemisch handeln muss. Diese Annahme liegt in einem doppelten Signalsatz begründet: Das Signal bei $\delta_H = 3.15$ bzw. 3.49 ließ auf das Vorhandensein einer an ein Heteroatom gebundenen Methylgruppe schließen, wobei aus dem Verhältnis der relativen Intensitäten das Isomer mit dem tieffeldverschobenen Signal als Hauptkomponente hervorging (Verhältnis 7:5). Ferner wurden zwei Methingruppen vermutet ($\delta_H = 7.12$ bzw. 7.21 und $\delta_H = 8.14$ bzw. 8.51). Keines dieser Protonensignale wies ein Kopplungsmuster auf, was ergänzend zur chemischen Verschiebung ins Tieffeld für sp^2 -gebundene Kohlenstoffatome sprach. Zusammen mit den erhaltenen Daten führte eine Datenbankrecherche^[68,72] zur Identifizierung von **24** als Thioaurin.



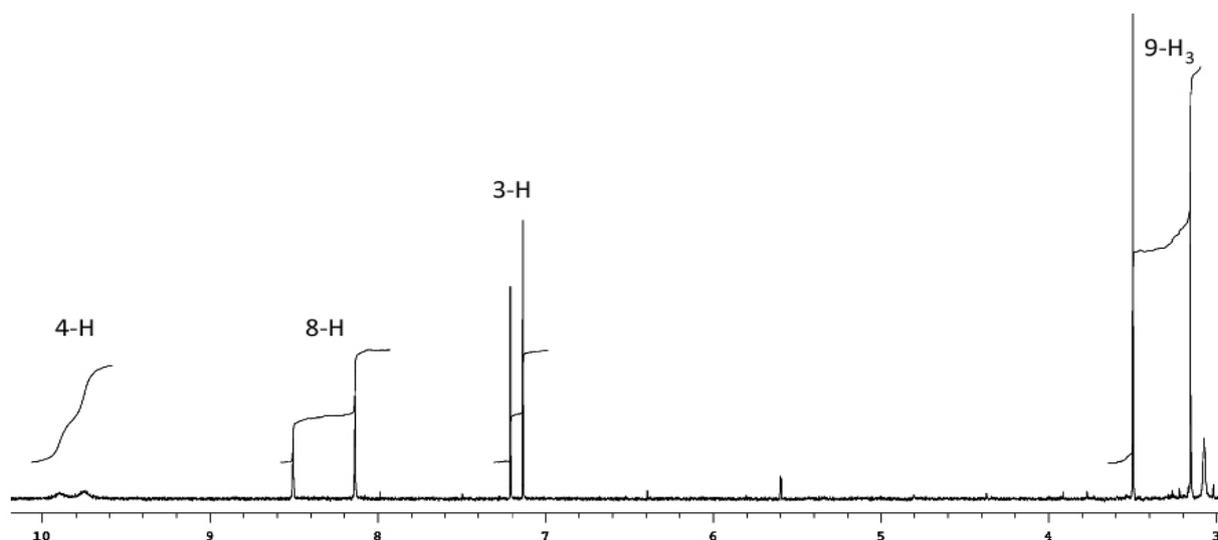


Abbildung 4: ^1H -NMR-Spektrum (300 MHz, Aceton- d_6) von Thioaurin (**24**).

Die erste Beschreibung von **24** stammt aus dem Jahre 1953, wo die Substanz durch seine breite Aktivität gegen verschiedene gram-positive und gram-negative Bakterien und Pilze auffiel.^[73] Aufgrund dieser biologischen Wirkung und vergleichbarer physikochemischer Eigenschaften wurde eine Verwandtschaft zu den kurze Zeit später ebenfalls aus Streptomyceten isolierten Antibiotika Thiolutin (**26**) und Aureothricin (**27**) vermutet.^[74,75] Eine endgültige Struktur für **24** konnte jedoch erst 13 Jahre später formuliert werden.^[76] Hierbei wurde bestätigt, dass **24** wie auch **26** und **27** der Klasse der Pyrrothin-Antibiotika – mit dem hierfür typischen 1,2-Dithiol[4,3-b]pyrrol-Ringsystem – angehören (s. Abbildung 5). Auch mehr als 50 Jahre nach ihrer Entdeckung bilden diese Substanzen ein lohnendes Forschungsziel. So fielen **24**, **26** und **27** durch ihr Inhibitionsvermögen von Tumorzellen-induzierter Angiogenese auf.^[77] Neben seiner antibiotischen Wirkung gegen verschiedene *Neisseria*-Stämme (Erreger von u.a. Meningitis und Gonorrhö) wurde für Thioaurin (**24**) häufig eine ausgeprägte antibakterielle Aktivität beschrieben.^[76] Diese konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit in Plattendiffusionstests gegen *E. coli* (26 mm Hemmhof) und *Staphylococcus aureus* (26 mm Hemmhof) bestätigt werden. Trotz des andauernden Interesses an diesen Substanzen wurden bis heute keine Untersuchungen zu deren Biosynthese beschrieben.

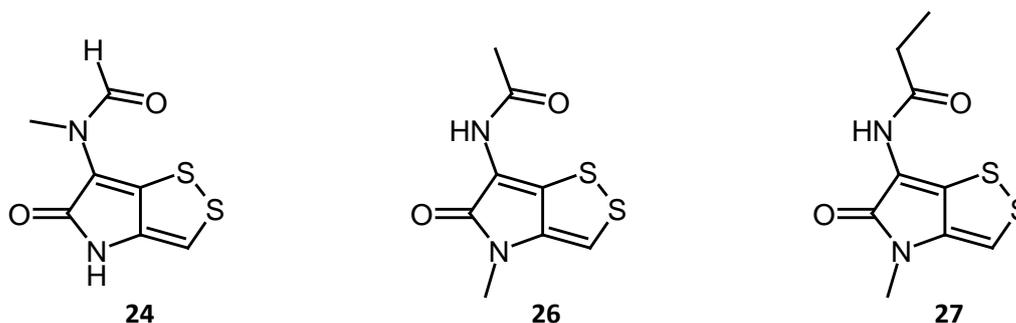


Abbildung 5: Aus *Streptomyces* sp. isolierte Vertreter der Pyrrothin-Antibiotika: Thioaurin (**24**), Thiolutin (**26**) und Aureothricin (**27**).

V. DAEHNE *et al.* postulierten aufgrund ihrer NMR-Studien eine Erklärung für das Auftreten des doppelten Signalsatzes im Spektrum.^[76] Aufgrund eines partiellen Doppelbindungscharakters sowohl der C-N Bindung der Formylaminogruppe als auch der Bindung von Formylamino-Stickstoff zum Heterozyklus ist eine Rotation um diese Bindungen gehemmt (s. Abbildung 6). Als Folge können beide existierenden Rotationsisomere auf der NMR-Zeitskala aufgelöst werden. Diese Annahme konnte durch die Kristallstruktur von **24** bestätigt werden, welche ebenfalls zu zwei unterschiedlichen Konformationen des Moleküls führte.^[78]

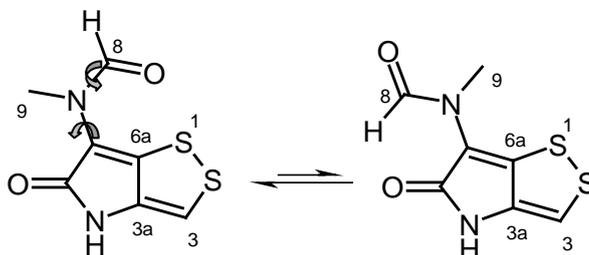


Abbildung 6: Rotationsisomere von Thioaurin (**24**), auf die sich der doppelte NMR-Signalsatz zurückführen lässt. Eine Drehung um die mit den Pfeilen gekennzeichneten Bindungen ist durch deren partiellen Doppelbindungscharakter eingeschränkt.

3.3 4-Methyl-2-chinazolinamin (**21**) aus *Streptomyces venezuelae* Wa232

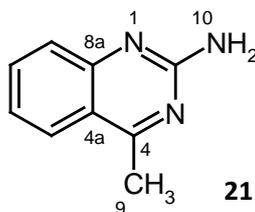
3.3.1 4-Methyl-2-chinazolinamin (**21**)

21 fiel im Dünnschichtchromatogramm durch UV-Löschung (254 nm) sowie durch hellblaue Fluoreszenz (350 nm) auf. Die Substanz zeigt mit Anisaldehyd in der Wärme ein intensiv rotes und anschließend gelbes Anfärbeverhalten.

Das EI-Massenspektrum von **21** weist bei $m/z = 159$ das Ion der höchsten Masse auf, aus dem sich eine Summenformel von $C_9H_9N_3$ ermitteln lässt. Diese wird durch ESI-Messungen

bestätigt, wobei hier Masse-zu-Ladungsverhältnisse von 160 und 319 – entsprechend $[M+H]^+$ bzw. $[2M+H]^+$ – charakteristisch sind. Im IR-Spektrum lassen sich drei charakteristische Bereiche ausmachen (s. Abbildung 12 im folgenden Kapitel): Absorbanz bei $3100\text{-}3400\text{ cm}^{-1}$ könnte auf das Vorhandensein einer Aminogruppe deuten, deren Streckschwingung ($\nu(\text{N-H})$) in diesem Bereich Resonanz zeigt. Eine Hydroxyfunktion wurde eher ausgeschlossen, da hierzu eine Absorbanz bei höheren Wellenzahlen zu erwarten wäre. Die weiteren Banden bei $1500\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$ bestätigen die Annahme einer Aminogruppe, da hier der typische Bereich für N-H Deformationsschwingungen ($\delta(\text{N-H})$) liegt. Des Weiteren sind im ‚Fingerprint-Bereich‘ neben typischen Banden einer Methylgruppe ($\delta(\text{C-H}) \approx 1400\text{ cm}^{-1}$) mögliche Hinweise auf ein aromatisches Ringsystem zu erkennen. Die Streckschwingungen von C-C-Doppelbindungen liegen bei $\nu(\text{C=C}) = 1510\text{-}1570\text{ cm}^{-1}$. Der sehr breiten Absorbanzpeak ab 3000 cm^{-1} bekräftigt diese Annahme; Streckschwingungen aromatischer C-H Verknüpfungen sind um 3040 cm^{-1} zu beobachten.

Die chemischen Verschiebungen (in Aceton- d_6) sowohl im $^1\text{H-NMR}$ ($\delta_{\text{H}} = 2.72$) als auch im $^{13}\text{C-NMR}$ ($\delta_{\text{C}} = 21.5$) lassen auf das Vorhandensein einer Methylgruppe schließen. Ferner können vier Signale im Bereich $\delta_{\text{H}} = 7.21\text{-}7.94$ aufgrund ihres Kopplungsmusters und $^1\text{H},^1\text{H-COSY}$ -Beziehungen einem aromatischen Ringsystem zugeordnet werden. In Kombination mit der Summenformel sollte das breite Singulett ($\delta_{\text{H}} = 6.08$, 2H) einer Aminofunktion zuzuordnen sein. Vier weitere $^{13}\text{C-NMR}$ Signale ($\delta_{\text{C}} = 120.3, 153.2, 161.4, 170.6$) wurden als quartär interpretiert. Mit Hilfe von 2D-NMR-Spektroskopie (COSY, HSQC und HMBC) gelang die Zuordnung der einzelnen Signale, weshalb die Substanz als 4-Methyl-2-chinazolinamin (**21**) formuliert wurde (s. Abbildung 7a). Dessen Struktur, mit dem ungewöhnlich substituierten Pyrimidinring (drei Stickstoffatome in Nachbarschaft), wurde bisher nicht aus mikrobiellen bzw. natürlichen Quellen isoliert, sondern nur auf synthetischem Weg gewonnen.^[79,80] Damit gelingt an dieser Stelle der erste Nachweis von **21** als Sekundärmetabolit eines Streptomyceten.



Für angestrebte Biosyntheseuntersuchungen war eine exakte Zuordnung der aromatischen Kohlenstoffatome unerlässlich. Aufgrund einer nahezu identischen chemischen Verschiebung ($\delta_C = 126.4$ und $\delta_C = 126.7$) sollte die aus den 2D-NMR-Spektren angenommene Position der CH-Gruppen im Ringsystem mittels NOESY abgesichert werden. Durch den NOE-Effekt ist die Magnetisierung eines Protons auf räumlich nahestehende Protonen übertragbar. Durch die NOE-Korrelation der Methylgruppe ($\delta_H = 2.72$) zu $\delta_H = 7.94$ konnte, in Kombination mit HSQC-Messungen, C-5 ($\delta_C = 126.4$) eindeutig zugeordnet werden (s. Abbildung 7b).

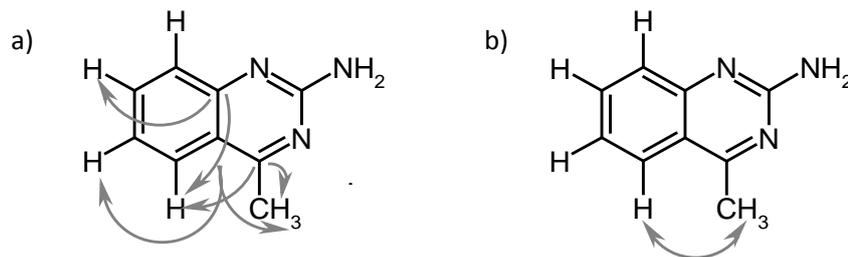


Abbildung 7: Zur Strukturaufklärung von **21** herangezogene NMR-Korrelationen: a) HMBC-Korrelationen quartärer C-Atome; b) NOE-Korrelation der Methylgruppe

In den aufgenommenen UV-Spektren zeigte **21** einen für Chinazolinamine typischen leicht basischen Charakter: Während in basischer methanolischer Lösung eine äußerst geringe Veränderung der Absorbanz gegenüber der neutralen Lösung beobachtet werden konnte, kam es zu einem Shift der Maxima in saurer Umgebung (s. Abbildung 8). Die Aufnahme von Säureprotonen muss zu einer Veränderung des Elektronensystems geführt haben, welches ein anderes Absorptionsverhalten von (UV-)Licht zur Folge hat.

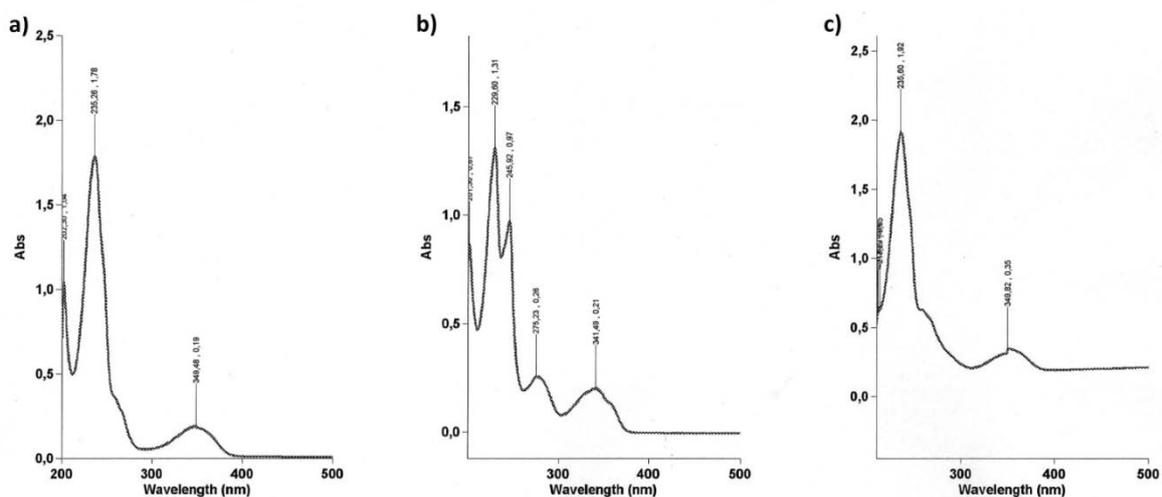


Abbildung 8: UV-Spektren von 4-Methyl-2-chinazolinamin (**21**) in methanolischer Lösung: a) neutral; b) sauer (HCl); c) basisch (NaOH).

3.3.2 Bestimmung der Säurekonstante von 4-Methyl-2-chinazolinamin (**21**)

Die Säurekonstante von **21** wurde mittels pH-metrischer Titration über einen pH-Bereich von 2.5-11 bestimmt. Die Messung erfolgte automatisiert im Kleinmaßstab (2 mL Volumen, 25 °C) mit einem *Metrohm* Titriersystem, wobei eine Konzentration von 1 mM an **21** eingesetzt wurde. Als Maßlösung kam 0.1039 M KOH zum Einsatz. Die Reinheit und exakten Konzentrationen der eingesetzten Lösungen wurden nach einer Methode von GRAN bestimmt.^[81] Die Berechnung des pK-Werts erfolgte mit Hilfe des Programms *Hyperquad*.^[82] Aus der damit gewonnenen Auftragung des Anteils an protonierter Spezies gegen den pH-Wert lässt sich ein pK-Wert von 5.43(4) ermitteln (s. Abbildung 9)ⁱⁱ. Die Standardabweichung resultiert vor allem aus statistischen Fehlern, dennoch kann dieser Wert näherungsweise in Bezug zur Reinheit der verwendeten Substanz verstanden werden. Entgegen den Erwartungen konnte kein weiterer pK-Wert berechnet werden bzw. er überlappt mit dem oben angegebenen, was aus den Rohdaten vermutet werden konnte. Somit müssen alle drei Protonierungsstellen im Molekül, welche an den Stickstoffatomen angenommen werden, ein ähnlich basisches Verhalten aufweisen. Der in diesem Versuch erhaltene pK-Wert steht im Einklang mit den Studien von ARMEROGO und SMITH; hier wurde der Wert mit pK = 5.36(4) angegeben.^[83] Auch in diesem Fall konnte kein weiterer pK-Wert gefunden werden.

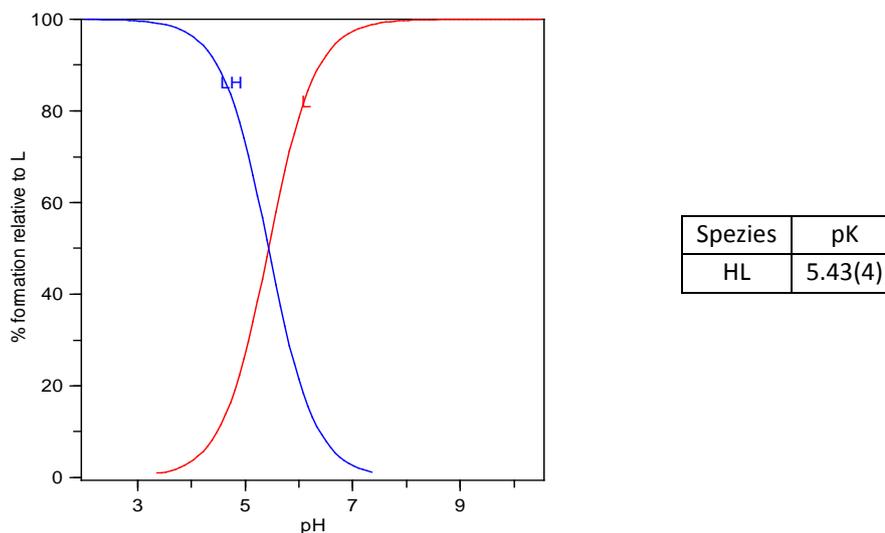


Abbildung 9: Säurekonstante von 4-Methyl-2-chinazolinamin (**21**) ermittelt aus einer Auftragung der relativen Bildung der unprotonierten Spezies gegen den pH-Wert. Die Messung erfolgte bei 25 °C in 0.1 M KCl-Lösung. LH = protonierte Spezies; L = unprotonierte Spezies.

ⁱⁱ Mein Dank gilt an dieser Stelle J. GALEZOWSKA (AK MEYER/Universität Göttingen) für die Bestimmung des pK-Werts.

3.3.3 Analogon des 4-Methyl-2-chinazolinamins (**22**)

Aus der Kultivierung in M2-Medium konnte **22** als weißer Feststoff isoliert werden. Die Substanz wies im Dünnschichtchromatogramm gleiches Lauf- und Anfärbeverhalten wie das Alkaloid 4-Methyl-2-chinazolinamin (**21**) auf. Im EI-Massenspektrum konnte ein Ion von $m/z = 159$ gemessen werden, aus dessen Hochauflösung die Summenformel $C_9H_9N_3$ abgeleitet wurde. Somit konnte an dieser Stelle eine mit **21** verwandte Substanz angenommen werden. Zusätzlich verstärkten NMR-spektroskopische Messungen diese Vermutung. Der Signalsatz entsprach dem des Chinazolinamins (**21**), wobei sämtliche Protonensignale leicht tieffeldverschoben erschienen. Im Unterschied zu den für **21** erhaltenen Daten war ein Fehlen des Signals der Aminofunktion ($\delta_H = 5.38$, CD_2Cl_2) zu beobachten. An dessen Stelle traten zwei breite Singulets ($\delta_H = 6.20$, 10.77) mit der Intensität jeweils eines Protons (s. Abbildung 10, Tabelle 4). Eine genaue Zuordnung der breiten Singulett-Signale war auch aus 2D-NMR-Datensätzen nicht möglich.

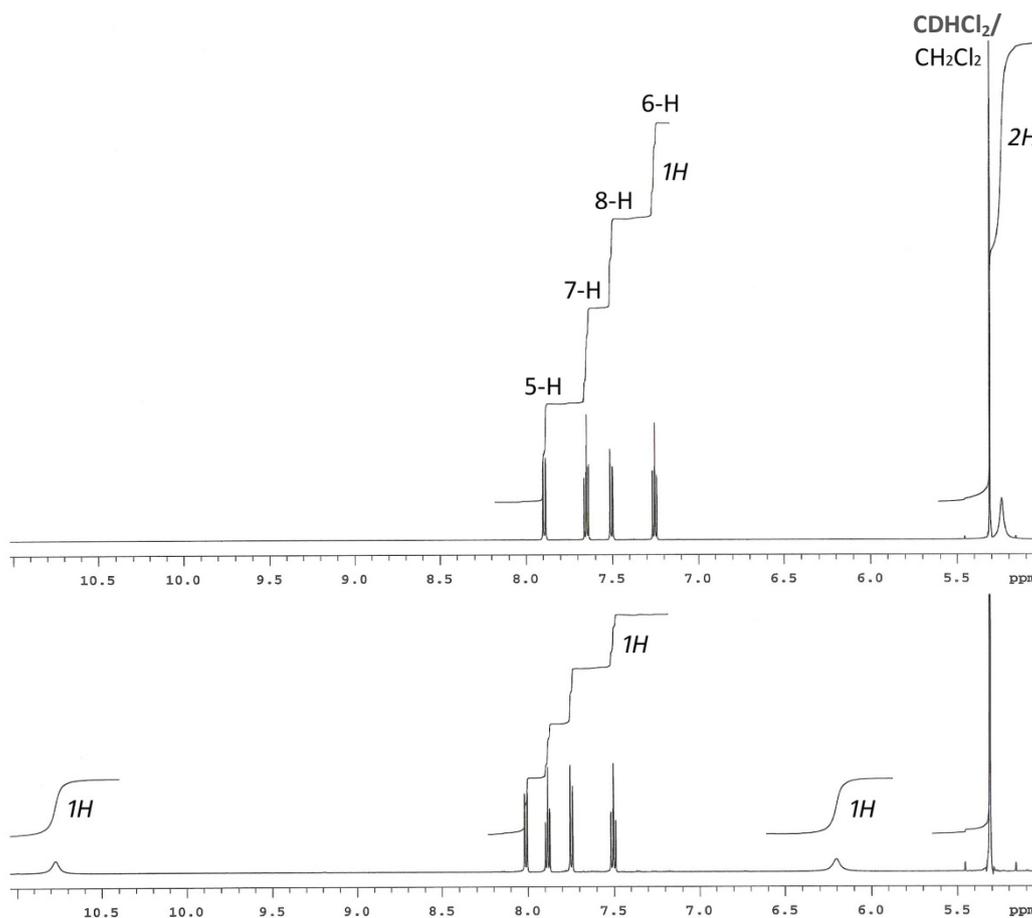


Abbildung 10: 1H -NMR-Spektren (600 MHz, CD_2Cl_2) von **21** (oben) und dessen vermutlichem Analogon **22** (unten). Die aus den Intensitäten abgeleitete Anzahl an Protonen ist kursiv angegeben.

Tabelle 4: Chemische Verschiebungen im NMR-Spektrum von 4-Methyl-2-chinazolinamin (**21**) und von einem vermutlichen Analogon (**22**) (CD₂Cl₂, ¹H-NMR: 600 MHz, ¹³C-NMR: 125.7 MHz). Multiplizitäten und Kopplungskonstanten (in [Hz]) sind in Klammern angegeben.

Atom	Aminoform (21)		Analogon (22)	
	¹ H-NMR	¹³ C-NMR	¹ H-NMR	¹³ C-NMR
2	-	159.8	-	155.6
4	-	170.8	-	178.7
4a	-	119.9	-	118.1
5	7.89 (dd; 8.5, 1.5)	125.7	8.01 (dd; 8.5, 1.5)	126.9
6	7.25 (ddd; 8.5, 7.0, 1.0)	123.0	7.50 (ddd; 8.5, 7.0, 1.0)	126.0
7	7.65 (ddd; 8.5, 7.0, 1.5)	134.1	7.88 (ddd; 8.5, 7.0, 1.5)	137.5
8	7.51 (dd; 8.5, 1.0)	125.8	7.75 (dd; 8.5, 1.0)	118.5
8a	-	151.7	-	140.0
9	2.76 (s)	21.7	2.91 (s)	23.1
1-N	-	-	10.77 (bs)	-
10-N	5.38 (bs)	-	6.20 (bs)	-

So können an dieser Stelle nur Vermutungen für eine mögliche Struktur aufgestellt werden. Im Unterschied zum Isolierungsschema von **21** aus HF- bzw. SGG-Medium wurde **22** aus M2-Medium mittels HPLC im letzten Schritt gereinigt. Die hierbei verwendete Ameisensäure könnte beim Einengen im Vakuum nicht vollständig entfernt worden sein, was eine mögliche Protonierung des Amins **21** als Folge hätte. Somit wurden als erste Annahme drei Strukturen formuliert (vgl. Abbildung 11):

1. Aufgrund des Vorliegens zwei breiter Singulett-Signale im ¹H-NMR und deren chemischer Verschiebung wäre eine Iminform des Chinazolins denkbar. Das Vorhandensein der Säure hätte jedoch dazu führen müssen, dass das Chinazolinamin seine Aromatizität verliert, was auf diesem Wege fragwürdig erscheint. In der Literatur ist ein derartiger Effekt für Chinazoline bisher nicht beschrieben worden. ARMAREGO und SMITH konnten in ihren Untersuchungen zur kovalenten Hydrierung der 3,4-Bindung von Chinazolinen allerdings zeigen, dass eine permanente Hydrierung von **21** nicht messbar war.^[83]
2. Die Anwesenheit der Säure könnte auch zu einer Salzbildung von **21** geführt haben. Allerdings sollte eine Protonierung nicht an der Aminofunktion von **21** stattgefunden haben, da sich zwei deutlich unterscheidbare Singulett-Signale (mit unterschiedlicher chemischer Umgebung) im ¹H-NMR-Spektrum erkennen ließen. Dass beide eine gleiche Intensität aufwiesen, mag sich durch die Unschärfe dieser Signale erklären lassen. Ergänzend soll an

dieser Stelle erwähnt werden, dass eine zusätzliche Protonierung des Chinazolins auch zu Elektronenpaar-Umlagerungen geföhrt haben könnte. Damit bestünde die Möglichkeit, dass die Aminofunktion fortan keine isochronen Protonen mehr aufwies. Das Signal des „neuen“ Wasserstoffs im Molekül könnte außerhalb des Messbereichs gelegen haben oder wurde nicht detektiert.

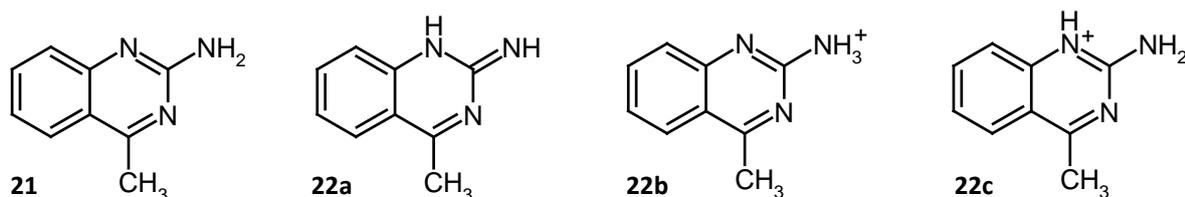


Abbildung 11: Strukturvorschläge für ein mögliches Analogon von 4-Methyl-2-chinazolinamin (**21**): Iminform (**22a**), Chinazolin-Salz (**22b/c**).

Im Vergleich zeigten die gemessenen UV-Spektren von **21** und **22** keinen offensichtlichen Unterschied, was eine nahe Verwandtschaft beider Substanzen bekräftigt. Die IR-Spektren beider Substanzen sind in Abbildung 12 dargestellt. Im Wesentlichen können gleiche Absorbanzbanden ausgemacht werden. Das Bandenmuster zwischen 3000-3500 cm⁻¹ lässt sich auf die verwendeten Substanzmengen zurückführen. Bei zusätzlichen Messungen mit einer geringeren Menge an **21** war dieser Bereich ebenfalls weniger aufgelöst und ähnelte dem vom **22**. Ein permanenter Unterschied konnte jedoch für den Bereich 2200-2400 cm⁻¹ festgestellt werden: Während hier für **21** keine Absorbanz beobachtet werden konnte, zeigten sich bei seinem Analogon (**22**) deutliche Banden. Diese liegen im Bereich der Streckschwingung $\nu(\equiv\text{N}^+\text{-H})$, was **22** als protonierte Spezies identifizieren würde. Da sich weder um 1500 cm⁻¹ ($\delta(\text{NH}_3^+)$) noch bei 3030-3130 cm⁻¹ ($\nu(\text{NH}_3^+)$) auffällige Banden finden, kann aufgrund des IR-Spektrums eine Protonierung an der Aminofunktion ausgeschlossen werden (vgl. Abbildung 11).

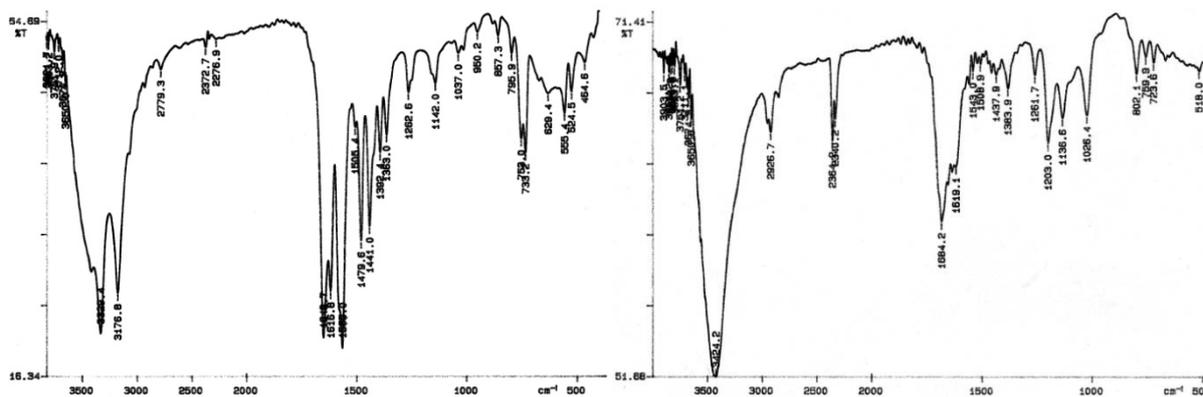


Abbildung 12: IR-Spektren von 4-Methyl-2-chinazolinamin (**21**) (links) und seinem möglichen Analogon (**22**) (rechts).

Dem Phänomen des Chinazolin-Analogons sollte in weiteren Untersuchungen nachgegangen werden. Mittels einer Scale-up Fermentation im 10 L-Maßstab und über einen zusätzlichen synthetischen Zugang sollten ausreichenden Mengen an **21** zur Verfügung gestellt werden. Ferner wurde erhofft, dass durch Nutzung der HPLC im letzten Aufarbeitungsschritt des Fermentationsansatzes erneut das Analogon **22** gewonnen bzw. erzeugt werden konnte.

3.3.4 Kultivierung im Fermenter (Scale-up)

Neben den Untersuchungen zu einem möglichen Analogon von **21** stand für die Wahl des Fermenters die Isolierung weiterer Metaboliten aus *S. venezuelae* Wa232 im Vordergrund. Da im ersten Fermentationsversuch nicht alle im chemischen Screening ausgewählten Metaboliten gewonnen werden konnten, wurde eine Kultivierung in HF-Medium erwägt. Jedoch führte in früheren Arbeiten des Arbeitskreises der Einsatz von Hafer-haltigem Medium im Fermenter oft zu Problemen (starke Schaumbildung, zu schnelles Erreichen der pH-Sperre etc.). Aus diesem Grund sollte in einem Vorversuch die Kultivierbarkeit des Stammes in ‚Medium S‘ überprüft werden. Dieses Medium erwies sich erfahrungsgemäß als gute Alternative. Der Vorversuch erfolgte als Schüttelkultur in 1 L-Erlenmeyerkolben mit Schikane. Es wurden pro Variante zwei Kolben inokuliert:

- HF-Medium (Leitungswasser) unter Zusatz von ‚Spur 11‘
- HF-Medium (demineralisiertes Wasser) unter Zusatz von ‚Spur 11‘
- Medium S (Leitungswasser)
- Medium S (demineralisiertes Wasser)

Alle Fermentationen wurden nach vier Tagen (bei 28 °C, 180 rpm) geerntet. Der Vergleich der Metabolitenspektren erfolgte mittels Dünnschichtchromatogramm (DC) (KG, Chloroform/Methanol 9:1 und RP-18, Methanol/Wasser 7:3). Es zeigte sich, dass die im chemischen Screening ausgewählten Metaboliten nur durch Kultivierung in HF-Medium erhalten werden konnten. Allgemein zeigten sich weniger Zonen im mittel-polaren Bereich des DCs nach Kultivierung in Medium S.

Die Kultivierung erfolgte somit im 10 L-Maßstab unter Verwendung von HF-Medium (Leitungswasser unter Zusatz von ‚Spur 11‘; genaue Bedingungen finden sich in Kapitel 8.5.4). Aus dem pH-Verlauf konnten jedoch keine der für ein Bakterienwachstum typischen Phasen interpretiert werden. Nach einem kurzen Anstieg zeigte sich bereits ab der zwölften Fermentationsstunde eine Konstanz von pH = 6.0. Die Fermentation wurde daher nach einer Dauer von drei Tagen beendet.

Um das große Volumen dieser Fermentation möglichst effizient aufzuarbeiten, wurde versucht, die Metaboliten durch Adsorption an XAD-16 zu gewinnen. Besonders für große Volumina ist dieses Verfahren leichter zu handhaben. Hierzu wurden 100 mL des Kulturfiltrats in einem Vorversuch eingesetzt. Als Vergleich wurde das gleiche Volumen an Filtrat zwei Mal mit Ethylacetat extrahiert. Ein Teil des Mycels wurde mit Aceton versetzt und im Ultraschallbad aufgeschlossen. Nach Entfernen der organischen Phasen wurden alle Extrakte vergleichend mittels DC analysiert. Im Gegensatz zur Aufarbeitung an XAD-16 zeigte sich nach Extraktion mit Ethylacetat ein breites Metabolitenmuster, weshalb eine derartige Aufarbeitung für die Folgeversuche vorgesehen wurde. Das durch die Extraktion des Mycels gewonnene Metabolitenspektrum wurde als nicht interessant eingestuft und das Mycel entsprechend verworfen.

Es zeigte sich allerdings, dass der Stamm unter den gewählten Bedingungen nicht zur Produktion angeregt wurde. Lediglich 0.2 mg/L an **21** konnten isoliert werden, was einem Rückgang um den Faktor 10 (im Gegensatz zur Fermentation in Schüttelkulturen) entsprach. Trotz Verwendung der HPLC konnte das Chinazolin-Analogon **22** nicht erhalten werden. Somit kann an dieser Stelle nicht beantwortet werden, ob **22** durch die Bedingungen der HPLC oder nur in Anwesenheit des Malz-Glucose-Mediums (M2) gebildet wurde. Weitere Metaboliten konnten aufgrund ihrer geringen Ausbeuten nach der Aufreinigung nicht chemisch charakterisiert werden.

3.3.5 Darstellung von 4-Methyl-2-chinazolinamin (**21**)

21 wurde synthetisch in Anlehnung an die Arbeiten von HYNES *et al.*^[80] hergestellt, wobei eine Ausbeute von 31 % zu erwarten war.

Die Darstellung erfolgte ausgehend von Guanidincarbonat und *ortho*-Fluoroacetophenon, welche unter Schutzgas (Argon) in *N,N*-Dimethylacetamid gelöst wurden (vgl. Abbildung 13). Eine Reaktionskontrolle erfolgte dünn-schichtchromatographisch. Nach neun Stunden bei 135 °C unter Rückfluss wurde die Reaktion beendet. Die Aufarbeitung ist in Kapitel 8.5.8.1 beschrieben, wobei **21** in einer Ausbeute von 22 % erhalten wurde.

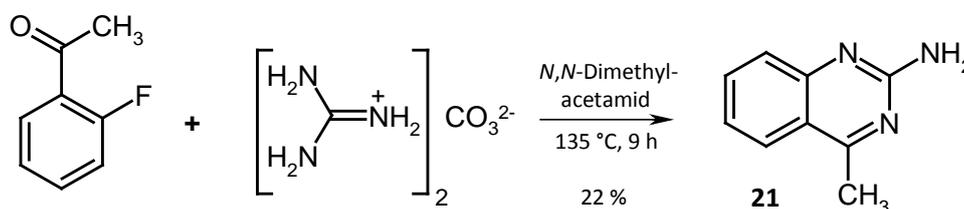


Abbildung 13: Darstellung von 4-Methyl-2-chinazolinamin (**21**) nach HYNES *et al.*^[80].

3.3.6 Röntgenographische Charakterisierung von **21**

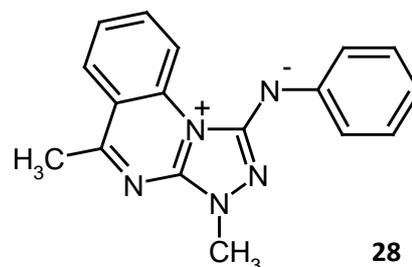
Kristalle von 4-Methyl-2-chinazolinamin (**21**) konnten durch Verdampfung aus Dichlormethan als weiß-gelbe Nadelpolster gewonnen werden. Die Kristallstruktur wurde von A. THORN (AK SHELDRICK/Universität Göttingen)ⁱⁱⁱ bestimmt, wobei der Kristall zur orthorhombischen Raumgruppe $P 2_1 2_1 2_1$ gehörte. Auf diesem Weg konnte die Struktur von **21** abgesichert werden. Die kristallographischen Daten wurden am *Cambridge Crystallographic Data Center (CCDC)* deponiert.^[84]

Von besonderem Interesse war, ob der Kristall neben der erwarteten Konstitution von **21** auch das Analogon **22** aufwies. Es zeigte sich, dass an Stickstoffatom N-10 zwei Wasserstoffe gebunden sind, deren Elektronendichte deutlich zu erkennen ist. Obwohl die im Modell dargestellte Konstitution unzweifelhaft den Hauptanteil im Kristall ausmacht, waren die zwei höchsten Restelektronendichten Q1 und Q2 an den beiden übrigen Protonierungsstellen an N-1 bzw. N-3 messbar ($0,13 \text{ e}^-/\text{\AA}^3$ bzw. $0,11 \text{ e}^-/\text{\AA}^3$; s. Abbildung 14a). Betrachtet man die räumliche Anordnung von **21** im Kristallgitter, so basiert dieses auf jeweils zwei Wasserstoffbrücken zwischen den einzelnen Molekülen (s. Abbildung 14b). Auf Basis

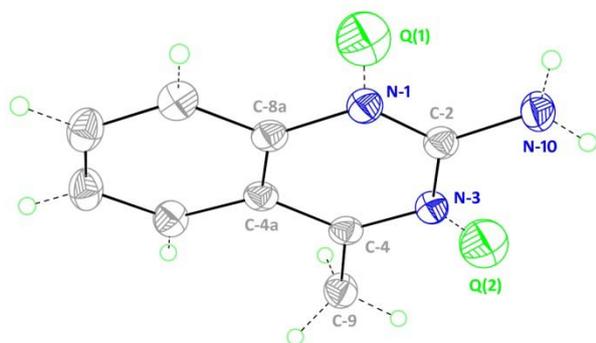
ⁱⁱⁱ Hiermit danke ich A. THORN für die Durchführung der Kristallographie-Messungen.

derzeitiger Berechnungen lässt sich jedoch ebenfalls nicht ausschließen, dass N-1 und N-3 Positionen geringer Besetzungswahrscheinlichkeit für Protonen sind (s. Abbildung 15). Hierbei scheint eine Besetzung an N-1 bevorzugt. Ein Molekül anderer Konstitution oder Konfiguration könnte daher einen geringen Anteil im Kristall ausmachen.

Derzeit findet sich in der *Cambridge Structural Database* des *CCDC* nur eine mit **21** verwandte Kristallstruktur, welche von einem [1,2,4]Triazolchinazolin-betain (**28**) stammt.^[85] Weitere Feststellungen zur Tautomerie von Chinazolininen können auf Basis röntgenographischer Daten allerdings nicht getroffen werden.



a)



b)

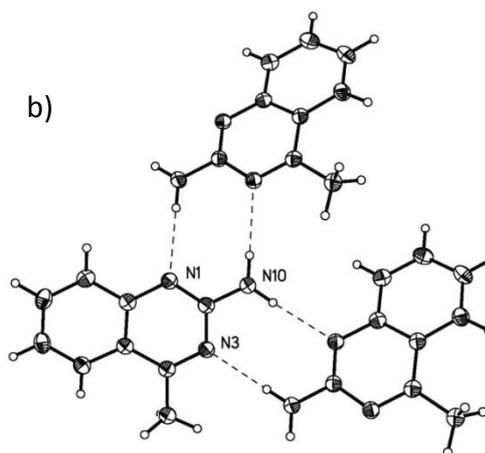


Abbildung 14: Struktur von 4-Methyl-2-chinazolinamin (**21**) auf Basis röntgenographischer Analysen: a) Restelextronendichte (Q) an N-1 bzw. N-3; b) Wasserstoffbrücken (gestrichelt), die zum Zusammenhalt des Kristallgitters beitragen. Auslenkungsellipsoide sind mit einer Aufenthaltswahrscheinlichkeit von 50 % dargestellt.^[86]

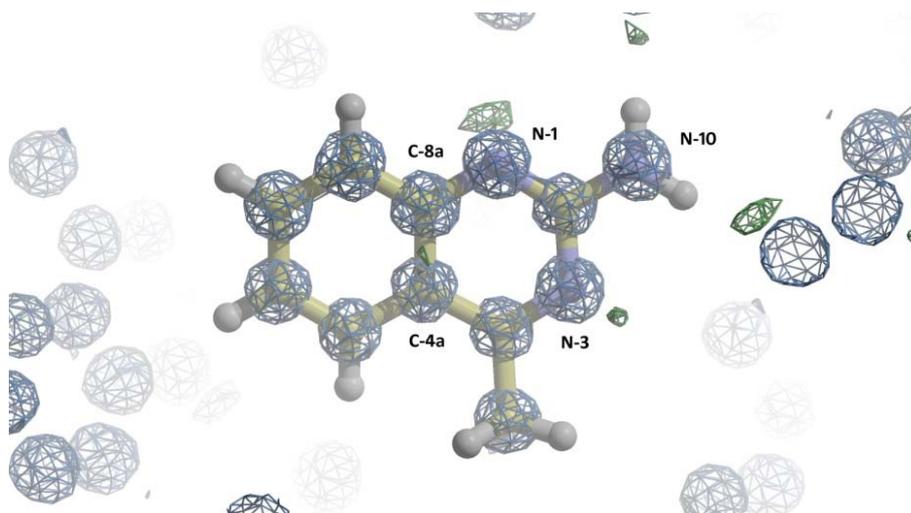


Abbildung 15: Dreidimensionale Darstellung auf Basis der Röntgenstruktur von **21**. Die Restelextronendichte ist grün, die Residualdichte ist blau dargestellt. Beide Protonierungsstellen N-1 und N-3 zeigen eine deutliche Restelextronendichte. Die Restelextronendichte zwischen C-4a und C-8a stammt von den im Modell unberücksichtigten Bindungselektronen. Die Abbildung wurde mit dem Programm *Coot* generiert.^[87]

3.3.7 Versuche zur Reproduktion des möglichen Analogons (**22**) von **21**

Ein Ansatzpunkt zur Reproduktion von **22** erschien die Beeinflussung eines möglichen Gleichgewichts zwischen Amino- und Iminoform. Hierzu wurden folgende Versuche an synthetisch gewonnenem Chinazolin (**21**) unternommen:

- Behandlung mit Säuren: Zu einer NMR-Probe von in CD_2Cl_2 wurden zwei Tropfen Ameisensäure bzw. Trifluoressigsäure (TFA) gegeben. Allerdings konnten in beiden Fällen keine Signale breiter Singulets im Protonenspektrum detektiert werden, die mit denen des Analogons übereinstimmten.
- Wechsel des NMR-Lösungsmittels: NMR-Spektren wurden im sauren (CDCl_3) bzw. basischen (Pyridin- d_5) Lösungsmittel aufgenommen, was zu keiner messbaren Umwandlung führte.
- Imitierung der HPLC-Bedingungen, welche bei der Isolierung von **21** herrschten: Dazu wurde eine methanolische Lösung (1 mg/mL) von **21** mehrere Male mit etwas 0.05 % (v/v) Ameisensäure versetzt und im Vakuum eingeengt. Parallel erfolgte eine Behandlung mit 0.1 M Natronlauge. Weder eine Zersetzung noch eine Umwandlung konnten unter Verwendung von NMR und Dünnschichtchromatographie beobachtet werden.
- Analyse der UV-Spektren: Spektren von 0.15 mg/mL **21** bzw. **22** in einer neutralen, sauren (HCl) bzw. basischen (NaOH) methanolischen Lösung wurden aufgenommen.

Gleiche Maxima konnten für beide Substanzen detektiert werden. Ebenso konnte die gleiche Verschiebung des Absorbanzmaximums bei Verwendung des sauren Lösungsmittels beobachtet werden.

3.3.8 Untersuchungen am Chlorid-Salz (**29**) von 4-Methyl-2-chinazolinamin (**21**)

Da eine Beeinflussung des möglichen Amin-Imin-Gleichgewichts nicht möglich erschien, wurde die Darstellung eines Salzes von 4-Methyl-2-chinazolinamin (**21**) angestrebt. In der Literatur finden sich bisher keine Studien über Salze von 2-Chinazolinaminen, weshalb an dieser Stelle weiterführende Untersuchungen erwägt wurden.

Scheinbar reichte die Verwendung von Ameisensäure nicht aus, um das Chinazolin dauerhaft zu protonieren (s. vorheriges Kapitel). Daher wurde **21** mit 0.5 M Salzsäure versetzt und im Vakuum bei 40 °C eingeeengt. In einem Vorversuch konnte im Dünnschichtchromatogramm keine Zersetzung der Substanz festgestellt werden. Das Chloridsalz (**29**) wurde als weiße Kristallnadeln gewonnen, welche im Gegensatz zu **21** nicht mehr in Dichlormethan löslich waren. NMR-Spektren wurden daher in DMSO- d_6 aufgenommen.

Im Vergleich zeigten die ^1H -NMR-Spektren von **21** und **29** eine Übereinstimmung der erwarteten diskreten Signale sowohl der Methylgruppe als auch des aromatischen Rings. Daher schien das Chinazolin-Grundgerüst durch den Umsatz mit Salzsäure unberührt zu bleiben. Deutlich sichtbar ist jedoch eine insgesamt Tieffeld-Verschiebung aller Signale der aromatischen Protonen von **29**. Dieser Effekt konnte auch für das Analogon (**22**) des Chinazolins festgestellt werden. Des Weiteren traten im NMR-Spektrum von **29** drei sehr breite Singulets ($\delta_{\text{H}} = 8.44, 9.32, 14.40$) an Stelle des diskreten Singulets ($\delta_{\text{H}} = 6.61$) von **21** auf.

Durch Aufnahme von ^1H -NMR-Daten bei unterschiedlichen Temperaturen (35 °C, 50 °C, 75 °C, 100 °C) konnte gezeigt werden, dass das sehr breite Singulett ($\delta_{\text{H}} = 14.40$) als erstes an Intensität verliert. Dieser Effekt der dynamischen Acidität konnte bereits bei $T = 50$ °C beobachtet werden (Austausch mit dem anwesenden $\text{D}_2\text{O}/\text{DHO}$). Die beiden Signale bei $\delta_{\text{H}} = 8.44$ und 9.32 zeigten dagegen gleiches Verhalten: Bei $T = 75$ °C konnte beide Signale nicht mehr getrennt detektiert werden, wohingegen ein breites Singulett ($\delta_{\text{H}} = 8.64$) einer Intensität von zwei Protonen sichtbar wurde (s. Abbildung 16).

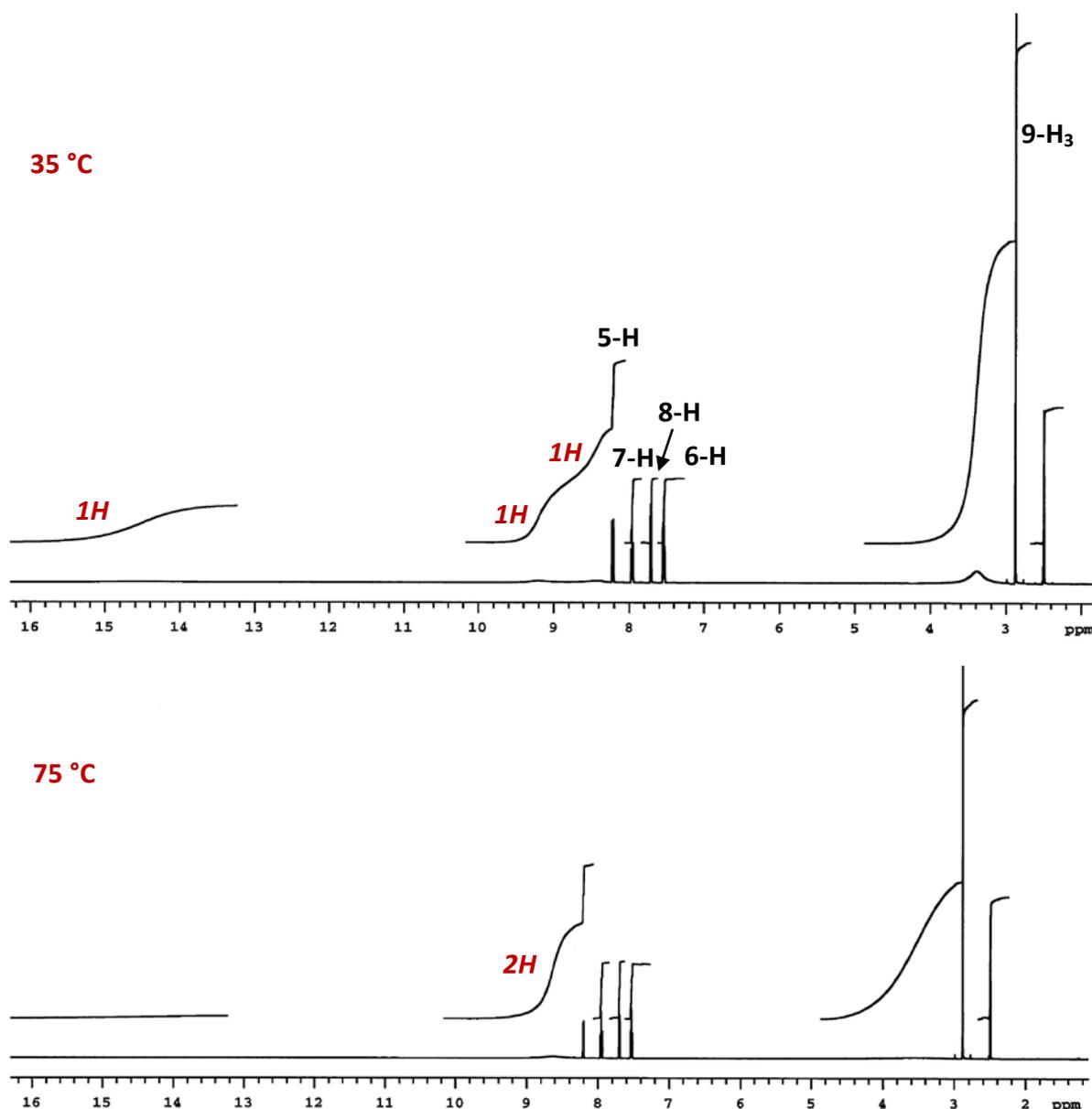


Abbildung 16: $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, DMSO-d_6) des Chinazolin-Salzes (**29**) bei $35\text{ }^\circ\text{C}$ (oben) und $75\text{ }^\circ\text{C}$ (unten). Die Bezeichnung der Positionen im Molekül ist analog zu 4-Methyl-2-chinazolinamin (**21**).

$^1\text{H-}^{15}\text{N-HMQC}$ Messungen^{iv} belegten eine Kopplung der Protonensignale bei $\delta_{\text{H}} = 8.44$ und 9.32 mit N-10 ($\delta_{\text{N}} = -282.8$), weshalb sie der Aminogruppe entstammen müssen (vgl. Abbildung 17). Da beide Wasserstoffatome ein anisochrones Verhalten aufweisen, scheint eine Drehung um die C-2-N-10 Bindung im Molekül gehindert, so dass beide eine unterschiedliche chemische Umgebung besitzen. Diese Annahme kann durch die Ergebnisse der Messungen bei unterschiedlichen Temperaturen bestätigt werden. Erst bei hohen

^{iv} Für die Durchführung der $^{15}\text{N-NMR}$ Messungen danke ich DR. T. PAULULAT (Universität Siegen).

Temperaturen konnte ein isochrones Verhalten beider Wasserstoffatome der Aminofunktion festgestellt werden. Somit scheint die Aminofunktion in Gegenwart von HCl nicht protoniert zu werden. Das Signal bei $\delta_{\text{H}} = 14.40$ wurde deshalb als Säureproton identifiziert, welches an eines der beiden heterozyklischen Stickstoffe gebunden sein muss. Das anisochrone Verhalten der Wasserstoffe (der Aminofunktion) lässt sich somit auf einen partiellen Doppelbindungscharakter der C-2–N-10 Bindung zurückführen, welcher durch mögliche Resonanzeffekte hervorgerufen wird.

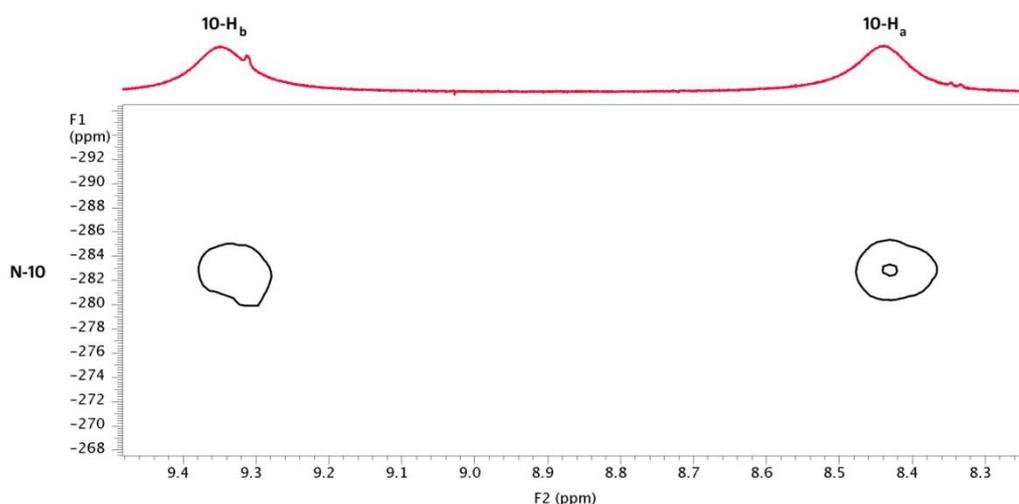


Abbildung 17: Ausschnitt aus dem ^1H - ^{15}N -HMOC (600 MHz (^1H), 60 MHz (^{15}N), DMSO-d_6) des Salzes von 4-Methyl-2-chinazolinamin (**29**): Signale der anisochronen Protonen (10-H_{a,b}) der Aminofunktion.

ROBERTS *et al.* zeigten mittels ^{15}N -NMR Messungen bei unterschiedlichen pH-Werten, dass protonierte Stickstoffatome in Pyridin- und Purin-Ringsystemen eine Resonanz ca. 50-100 ppm in Richtung Hochfeld ausweisen, als ihre unprotonierten Analoga (s. Abbildung 18).^[88] Am Beispiel von Purin (**30**) und Adenin (**31**) konnte gezeigt werden, dass eine Protonierung jeweils bevorzugt an den Stickstoffatomen des Pyrimidinrings stattfindet und nicht, wie es z.B. im Falle von **31** möglich wäre, an der Aminofunktion. Dies konnte durch deutliche Shifts der Pyrimidin-Stickstoffe (N-1, N-9) bei einem Wechsel von saurer zu basischer Umgebung beobachtet werden.^[89,90]

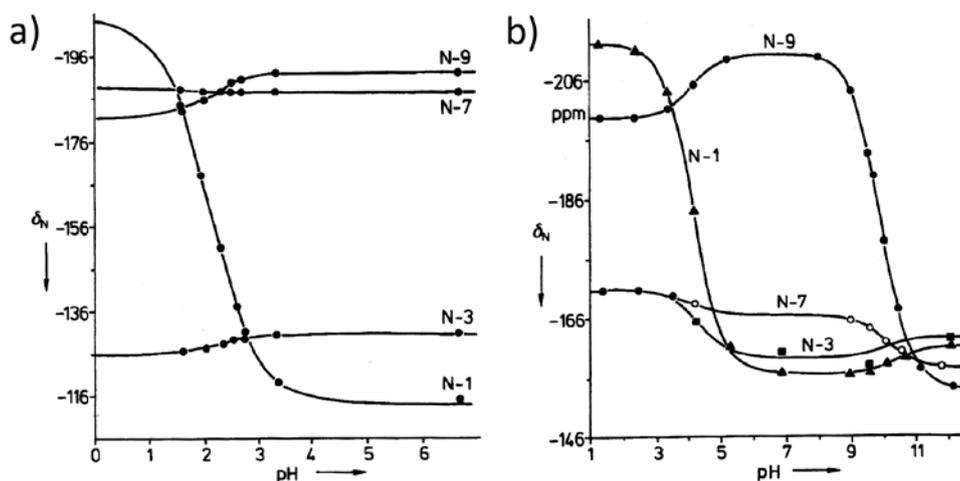


Abbildung 18: Änderung der chemischen Verschiebung im ^{15}N -NMR-Spektrum in Abhängigkeit vom pH-Wert: a) Purin (**30**); b) Adenin (**31**). Abbildung gemäß [114].

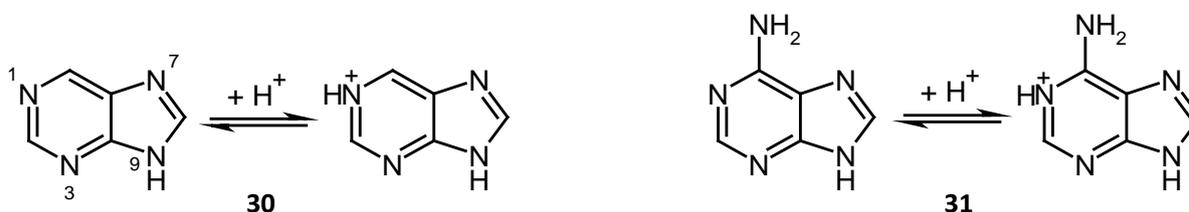


Abbildung 19: Protonierungsstellen in Purin (**30**) und Adenin (**31**). Das tautomere Gleichgewicht des Wasserstoffs von N-9 zu N-7 bleibt in dieser Darstellung unberücksichtigt.

Betrachtet man die ^{15}N -chemischen Verschiebungen von 4-Methyl-2-chinazolinamin (**21**) und seinem Salz (**29**), so kann eindeutig festgestellt werden, dass das N-1-Signal von **29** im Vergleich zu **21** um ca. 80 ppm ins Hochfeld verschoben ist. Im Gegensatz dazu ist ein derartiger Shift bei N-3 und N-10 nicht auszumachen, was Lösungsmittelleffekte – durch den Wechsel von CD_2Cl_2 zu DMSO-d_6 – ausschließt (s. Tabelle 5). Dies geht einher mit den Ergebnissen von ROBERTS *et al.*, so dass N-1 als Stickstoff höchster Basizität und damit als Protonierungsstelle angenommen wird.

Tabelle 5: Vergleich der ^{15}N -chemischen Verschiebungen (DMSO-d_6) von 4-Methyl-2-chinazolinamin (**21**) und seinem Salz (**29**).

	N-1	N-3	N-10
δ (21) [ppm]	-164.2	-110.4	-303.1
δ (29) [ppm]	-246.9	-117.5	-282.8
Differenz [ppm]	82.7	7.1	20.3

Kristalle des Salzes (**29**), welche für röntgenographische Untersuchungen geeignet waren, konnten durch Verdampfung aus Methanol gewonnen werden. Hierbei kristallisierte das Salz in weißen Nadelpolstern. Zusätzlich zum Kation des 1*H*-4-Methyl-2-chinazolinamins und seinem Gegen-Ion Chlorid ist pro asymmetrische Einheit ein Molekül Wasser einkristallisiert (sogenanntes Kristallwasser).

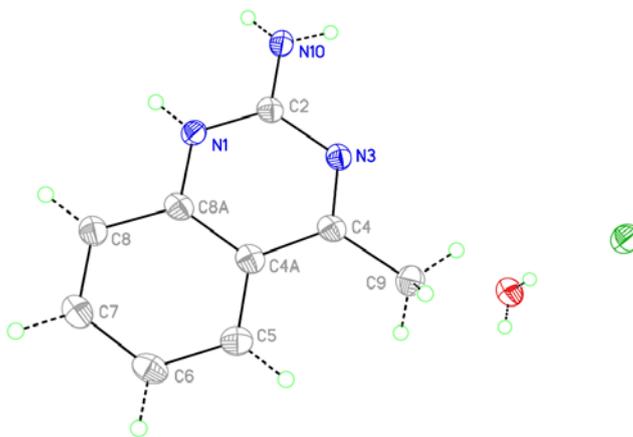


Abbildung 20: Struktur des Chlorid-Salzes (**29**) von 4-Methyl-2-chinazolinamin auf Basis röntgenographischer Untersuchungen. Neben dem Chinazolin-Gerüst sind ein Molekül Wasser (Kristallwasser, rot) und das Gegen-Ion Chlorid (grün) zu erkennen. Auslenkungsellipsoide sind mit einer Aufenthaltswahrscheinlichkeit von 50 % dargestellt.

In der Röntgenstruktur konnte das von der Säure stammende Proton eindeutig dem Stickstoffatom N-1 zugeordnet werden. Die aromatische Grundstruktur des Chinazolin-Bizyklus ist dabei erhalten geblieben, was beim Betrachten der Bindungslängen deutlich wird: Der Abstand C-8a–N-1 lag mit 1.38 Å im Bereich von Einfachbindungen, wobei der Abstand N-1–C-2 mit 1.33 Å als Doppelbindung angenommen wurde. Typische Bindungsabstände sind hier 1.40 Å für die C–C-Einfach- bzw. 1.29 Å für die C–C-Doppelbindung. Somit stehen die Ergebnisse der Röntgenstrukturanalyse im Einklang mit den Ergebnissen, die aus den NMR-Studien gewonnen werden konnten.

Die vorangegangenen Untersuchungen liefern wesentliche Beiträge zum Verständnis der Chinazoline. Allerdings konnte für das mögliche Analogon von **21**, das einmalig isolierte **22**, keine eindeutige Struktur formuliert werden. Es liegt jedoch nahe, dass es sich hierbei um eine protonierte Spezies handeln könnte. Es findet sich an dieser Stelle allerdings keine Erklärung, warum **22** als Feststoff – im Gegensatz zum Chinazolin-Salz – eine gute Löslichkeit

in CD_2Cl_2 aufwies. Evt. lagen im Gefäß noch Spuren von Säure (von der HPLC) vor, welche mit in die NMR-Probe überführt worden und so zu einer zeitweiligen Protonierung des Chinazolins führten. Eine dauerhafte Protonierung konnte durch nachträgliche Zugabe von Ameisensäure zu **21** jedoch nicht erreicht werden. Die deutlich getrennten Singulett-Signale im NMR-Spektrum von **22** sprechen für anisochrone Wasserstoffatome der Aminofunktion, was z.B. für das Chinazolin-Salz bestätigt werden konnte. Somit wird für **22** abschließend ein protoniertes 4-Methyl-2-chinazolinamin Grundgerüst analog zu **29** angenommen.

3.3.9 Chinazoline in der Forschung

Das Hauptstrukturelement der Chinazoline bildet das heterozyklische (1,3-Diazanaphthalen) Doppelringssystem, welches erstmals zum Ende des 19. Jahrhunderts auf synthetischem Wege erzeugt wurde. BISCHLER und LANG gelang es, durch Umsetzung von *o*-Amidobenzaldehyd mit Ammoniak zum Chinazolingerüst zu gelangen, welches anfangs noch als Phenmiazin bezeichnet wurde.^[91] Dies stellte den Startpunkt für die mittlerweile sehr vielfältigen synthetischen Chinazoline dar, wobei ARMAREGOS Beiträge zum physikalisch-chemischen Verständnis dieser Substanzklasse einen wichtigen Stellenwert einnehmen.^[92] In der Natur gründen die Chinazolin-Alkaloide auf dem bereits synthetisch beschriebenen Grundgerüst und bilden nur eine kleine Klasse von Sekundärmetaboliten. Dennoch sind sie in der Natur weit verbreitet, da diese Alkaloide nicht nur in höheren Pflanzen (z.B. *Malvaceae*, *Rutaceae*, *Palmaceae*) sondern auch in niederen Spezies, wie Pilzen (Ascomyceten) und Bakterien (Pseudomonaden, Streptomycceten) vorkommen. Auf der Ebene der Mikroorganismen sind jedoch vergleichsweise wenig Berichte über Chinazoline zu finden.^[93]

Aus dem Rautengewächs (*Rutaceae*) *Glycosmis arborea*, eine in der indisch-ayurvedischen Lehre genutzte Heilpflanze, konnten Arborin (**32**) als Hauptalkaloid^[94] sowie Glycorin (**33**), Glycosmicin (**34**) und Glycosminin (**35**) als Nebenalkaloide^[95] isoliert werden. Sie zählen zu den bekanntesten Vertretern der einfachen (bicyklischen) Chinazoline. Zum gleichen Strukturtyp gehören auch die im Wehrsekret des Saftkuglers *Glomeris marginata* vorkommenden Alkaloide Glomerin (**36**) und Homoglomerin (**37**).^[96]

Trizyklische Chinazoline finden sich hauptsächlich in höheren Pflanzen, wobei das Vasicin (**38**) – 1888 erstmals aus dem indischen Lungenkraut *Adhatoda vasica* isoliert – als klassisches Beispiel genannt werden kann.^[97] Peganin – isoliert aus der Steppenraute

Peganum harmala – weist die gleiche Struktur wie **38** auf, erhielt jedoch aufgrund seines Ursprungs eine andere Benennung.^[98] Die natürlichen Derivate von **38** – Vasicinon (**39**) und Desoxyvasicinon (**40**) – konnten ebenfalls aus *Peganum harmala* isoliert werden.

Bis 1997 wurden über 140 Chinazoline natürlichen Ursprungs beschrieben, wobei die meisten Ergebnisse aus der Zeit zwischen 1950 bis 1970 stammen.^[93] Zahlreiche Therapeutika, wenngleich nicht weltweit zugelassen, sind heutzutage Derivate von Chinazolinen: Doxazosin (**41**) (Antihypertensivum/Blutdrucksenker), Metaqualon (**42**) (Hypnotikum), Afloqualon (**43**) (Muskelrelaxans), Raltitrexed (**44**) (antineoplastisches Mittel) oder Ketanserin (**45**) (Serotonin-Antagonist).^[99] In einer aktuellen Studie^[100] wird die Tauglichkeit von 2-Guanidinochinazolinen als Adenosin-Rezeptor Antagonisten untersucht, was die Bedeutung dieser Substanzklasse auch für die medizinische Forschung verdeutlicht.

Auch wenn diese Alkaloide, speziell pflanzlichen Ursprungs, bereits breit erforscht erscheinen, bestätigen aktuelle Ergebnisse der Suche und Derivatisierung neuartiger Chinazoline deren Stellenwert für die Naturstoffforschung.^[101] Hierbei bietet die Natur eine breite Palette an Habitaten: LAATSCH *et al.* konnten neben einigen bekannten Alkaloiden neue C-2-substituierte Chinazolin-4-on-Alkaloide (**46**) aus *Streptomyces* sp. isolieren.^[102] Diese neuen Naturstoffe zeigten im Plattendiffusionstest allerdings keine Aktivität. Als weiteres Beispiel können die komplexeren Aurantiomide A-C (**47-49**) genannt werden, welche als Metaboliten des Schwamm-assoziierten Pilzes *Penicillium aurantiogriseum* charakterisiert wurden.^[103] Für **48** und **49** konnte eine zytotoxische Wirkung gegen mehrere Zelllinien (u.a. Leukämie, Bronchialkarzinom) mit IC₅₀-Werten um 50 µg/mL nachgewiesen werden.

Wie auch in der vorliegenden Arbeit führt das Screening nach neuen Naturstoffen häufig zu bereits synthetisch oder aus anderen Quellen gewonnenen Strukturen: 4-Methylchinazolin (**50**), ursprünglich aus Pseudomonaden isoliert^[104], wurde kürzlich als Sexualpheromon der parasitären Wespe *Nasonia vitripennis* identifiziert.^[105] Solche Entdeckungen stellen wichtige Beiträge für die Kenntnis über niedermolekulare Stoffe und deren Funktion in der chemischen Ökologie dar.

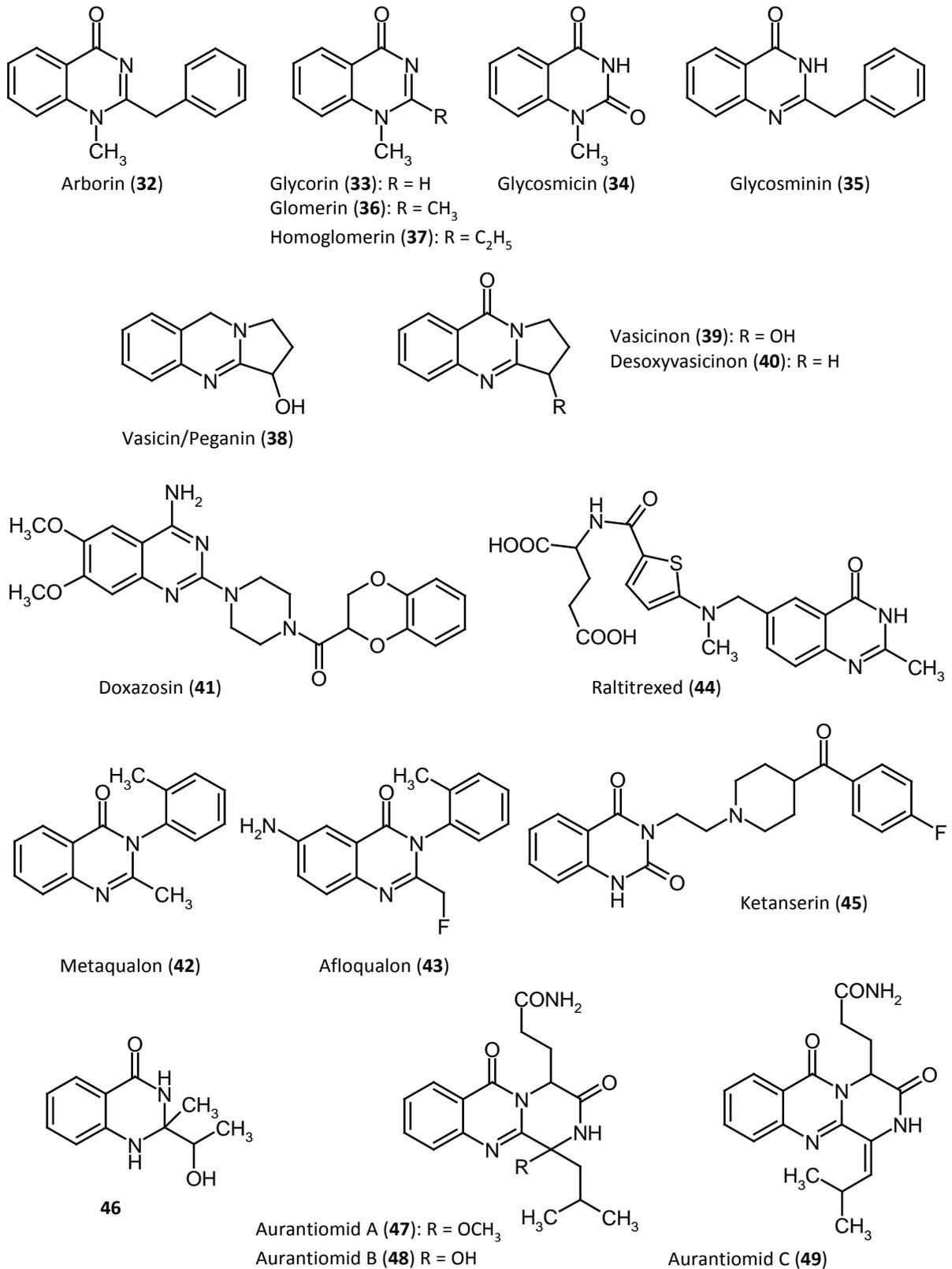


Abbildung 21: Übersicht über natürliche Chinazolin-Alkaloide und medizinisch verwendete Chinazolin-Derivate.

3.3.10 Biosyntheseuntersuchungen an 4-Methyl-2-chinazolinamin (21)

3.3.10.1 Bisherige Untersuchungen zur Biosynthese der Chinazoline

Bis heute finden sich nur sehr wenige Berichte über Biosynthesestudien an bityklischen Chinazolinen. Hierbei standen besonders die pflanzlichen Alkaloide Arborin (**32**) und Vasicin (**38**) im Fokus vieler *in vivo* Fütterungsexperimente.

Fütterungsversuche an *Glycosmis arborea* mit radioaktiv markierten, hypothetischen Vorläufern identifizierten Anthranilsäure (**25**) (im aromatisches Ringsystem) und Phenylalanin (im Pyrimidin-Fragment) als mögliche Bausteine des Arborins (**32**).^[106] Diese sind auch der Ursprung aller Stickstoffatome des Chinazolins **32**. Ein biochemisches Äquivalent von Ammoniak (wie Glutamat) konnte als N-Überträger ausgeschlossen werden. In zwei unabhängigen Arbeiten wurde die Biosynthese ausgehend von Anthranilsäure (**25**) und Phenylalanin über **51** zu **32** formuliert (s. Abbildung 22).^[106,107] Unklar war, in welcher Reihenfolge die Decarboxylierung von Phenylalanin und dessen Kondensation mit **25** zueinander stehen. Des Weiteren zeigten Fütterungsexperimente mit [¹⁴CH₃]Methionin, dass dieses die N-Methylgruppe in **32** liefert. Ob der Methylierungsschritt bereits vorab an der Anthranilsäure (**25**) oder erst nach Ringschluss stattfindet, blieb ebenfalls unbeantwortet.

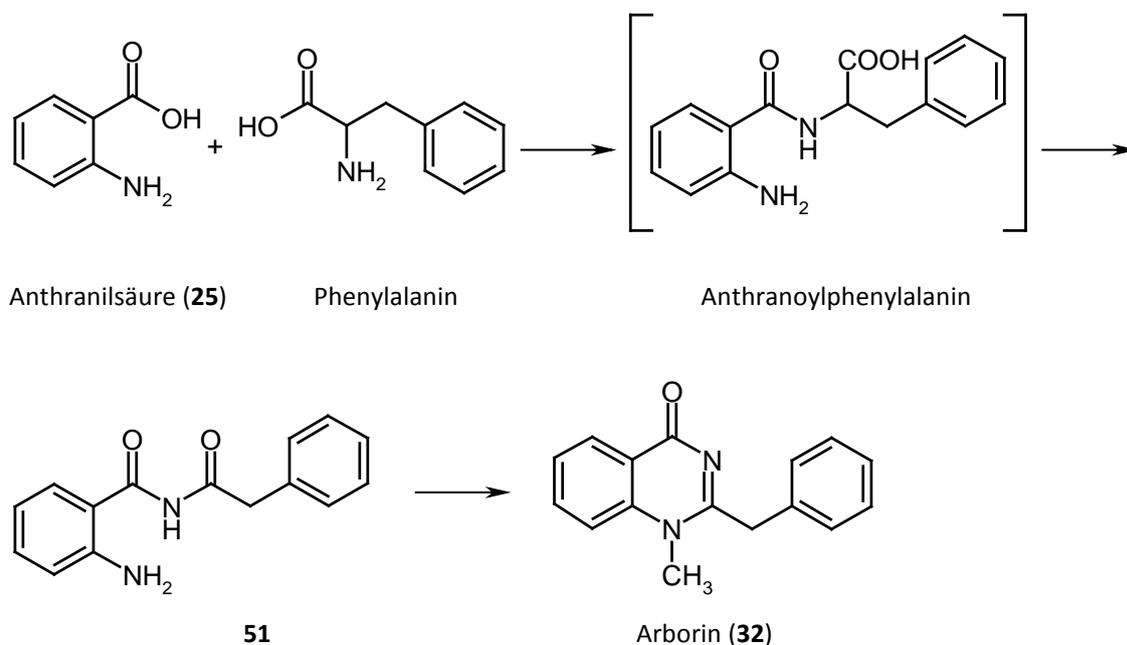


Abbildung 22: Hypothese zur Biosynthese von Arborin (**32**) in *Glycosmis arborea* nach GRÖGER und O'DONOVAN.^[106,107]

Für das Molekülgerüst der Chinazoline von Typ des Vasicins/Peganins (**38**) wurde Anthranilsäure (**25**) ebenfalls als Vorläufer postuliert.^[108,109] Ob **25** *in vivo* aus dem Shikimat-Weg hervorgeht oder aus dem Katabolismus des Tryptophans stammt, wurde erst in späteren Fütterungsversuche mit [Benzenring-U-¹⁴C₆]Tryptophan näher beleuchtet.^[110] Hierbei kam es zu der Hypothese, dass zumindest ein Teil der gebildeten Anthranilsäure (**25**) einem Abbau des Tryptophans entstammen muss, der Schwerpunkt jedoch auf der Bildung *via* Shikimat-Weg liegt.

Bei der Kultivierung bestimmter Pseudomonaden-Stämme kam es häufig zum Auftreten eines fruchtigen (Weintrauben- oder Jasmin-artigen) Geruchs. COX und PARKER identifizierten diesen Geruchstoff als 2-Aminoacetophenon (**52**).^[111] Bereits zwölf Jahre zuvor, 1967, postulierte MANN für Pseudomonaden einen neuen Abbauweg des Tryptophans über **52**, da auch er **52** in Zusammenhang mit dem Geruchstoff vermutete. Durch Fütterungsversuche konnte MANN nachweisen, dass einfache 4-Methylchinazoline biosynthetisch aus dem Katabolismus des Tryptophans hervorgehen müssen; dies führte zu der Bezeichnung ‚Chinazolin-Weg‘ (s. Abbildung 23).^[104]

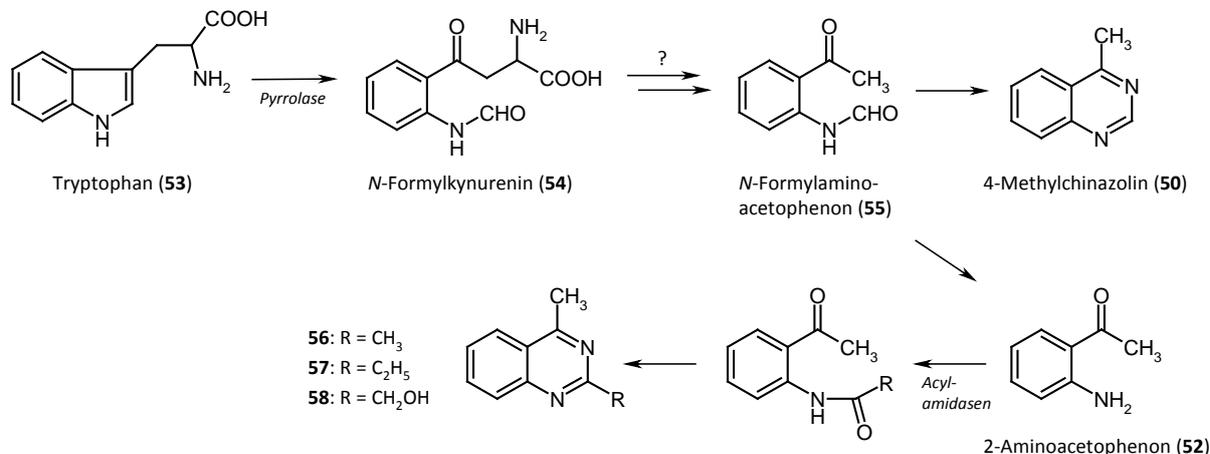


Abbildung 23: ‚Chinazolin-Weg‘ nach MANN^[104] : Katabolismus von Tryptophan als möglicher Biosyntheseweg von 4-Methylchinazolinen (**50, 56-58**).

Die durchgeführten Versuche zur Biosynthese von **21** gründeten auf diesen etablierten Fütterungsstudien, weshalb zum einen die Beteiligung von Anthranilsäure (**25**) überprüft und zum anderen dem Ursprung der Stickstoffatome nachgegangen werden sollte. Folglich wurden Glycerin – möglicher Vorläufer von Shikimisäure/Anthranilsäure – und Harnstoff –

eine Stickstoffquelle – als Fütterungssubstanzen ausgewählt. Des Weiteren sollte die Fütterung von Methionin – als mögliche Quelle der Methylgruppe – die Biosynthesestudien verdichten.

3.3.10.2 Erstellen der Fermentationskurve

Für Biosynthesestudien ist es essentiell, Kenntnisse über den zeitabhängigen Produktionsverlauf des zu untersuchenden Sekundärmetabolits zu besitzen. Der pH-Verlauf, welcher in Zusammenhang mit der Metabolitenproduktion steht, liefert notwendige Hinweise, um die Fermentationsdauer und den geeigneten Zugabezeitraum der (isotopenmarkierten) Vorläufer auszuwählen. Deren Fütterung erfolgt meist kurz vor Einsetzen der Sekundärstoffproduktion und endet mit dem Erreichen der maximalen Konzentration des Metaboliten. Eine gezielte Fütterung von isotopenmarkierten Substanzen in den spezifischen Stoffwechsel ist notwendig, um eine genügend hohe Anreicherung der Isotopenmarkierung im Zielmolekül zu erzielen und weitere katabolische Verteilung der markierten Atome („scrambling“), z.B. durch Einschleusen in andere Stoffwechselwege (Abbau- und Umbauprozesse), zu vermeiden.

Um Fütterungsexperimente am *S. venezuelae* Wa232 vorzunehmen, musste folglich der Produktionszeitraum von **21** durch die Aufnahme einer sogenannten Fermentationskurve gesichert werden. Ferner sollte eine effektive Aufarbeitungsstrategie entwickelt werden, da aufgrund der kostspieligen isotopenmarkierten Fütterungssubstanzen kleine Fermentationsvolumina eingesetzt worden.

Aufgrund der höheren Ausbeute an **21** war für Untersuchungen zur Biosynthese eine Fermentation des Stammes Wa232 in HF-Medium vorgesehen. Als Inokulum diente eine Glycerin-Einlagerung des Stammes. Hiermit wurde gewährleistet, dass das Zellmaterial der ursprünglichen Kultivierung verwendet wurde. Zur Aufnahme des zeitabhängigen Produktionsverlaufs von **21** sollten alle Kultivierungsansätze die gleichen Anfangsbedingungen besitzen. Dazu erfolgte zunächst eine Vorkultivierung für 48 h, aus der die eigentliche Schüttelkultur angeimpft wurde. Alle fünf bis sechs Stunden wurden jeweils drei Kolben entnommen und aufgearbeitet (s. Kapitel 8.5.7.1). Die Probenentnahme erfolgte bis zur 166. Stunde, so dass insgesamt 75 Kolben aufgearbeitet wurden. Die erhaltenen Extrakte wurden dünnschichtchromatographisch und mittels analytischer HPLC auf die Produktion von **21** überprüft. Zur Aufnahme der Fermentationskurve wurden die Flächenintegrale der

„Chinazolin-Signale“ im UV-Chromatogramm bestimmt und im zeitlichen Verlauf aufgetragen. Trotz dreifacher Wiederholung je betrachtetem Zeitpunkt konnte aus den Flächenintegralen und dem pH-Verlauf keine aussagekräftige Produktionskurve gewonnen werden. Es erweckte den Anschein, als ob die unterschiedlichen Kulturen zwei abweichende Metabolitenspektren aufwiesen. Ein derartiger Unterschied konnte für das HF-Medium bisher nur bei Anwendung des OSMAC-Verfahrens^[11,12] beobachtet werden (Fermentation in Leitungs- bzw. demineralisiertem Wasser; vgl. Kapitel 3.2.2). Möglicherweise waren die zum Inokulieren der Hauptkultur benutzten 48 h-Kulturen unterschiedlich angewachsen (trotz gleichem pH-Werts) oder die Menge an festen Medienbestandteilen (wie Hafermehl) variierte von Kolben zu Kolben, was somit die Medienzusammensetzung beeinflusste. Dieses kann bei größeren Ansatzmengen ein Problem sein, da bei der Vorbereitung des Mediums der verwendete Hafer sehr schnell im Ansatzgefäß zu Boden sinkt und somit (trotz Rührens) nicht gleichmäßig auf die Erlenmeyerkolben verteilt wird. Eine Kontamination kann ausgeschlossen werden, da die im Dünnschichtchromatogramm erhaltenen Metabolitenmuster denen des chemischen Screenings glichen.

Aufgrund dieser Tatsache wurden Variationen des Mediums der Vor- und Hauptkultur vorgenommen: Es wurden Vorkulturen von Wa232 in HF- und M2-Medium hergestellt, welche für 48 h inkubiert wurden. Hiermit wurden wechselseitig Hauptkulturen beimpft (s. Tabelle 6). Diese vier Kombinationen wurden jeweils zwei Mal wiederholt und nach 48 bzw. 60 Stunden aufgearbeitet und dünnschichtchromatographisch analysiert.

Tabelle 6: Verwendete Nährmedien zur Überprüfung des Metabolitenspektrums von *S. venezuelae* Wa232.

Medium Vorkultur	Kultivierungs- dauer	Medium Hauptkultur	Kultivierungs- dauer
HF	48 h	HF	48 h + 60 h
HF	48 h	M2	48 h + 60 h
M2	48 h	M2	48 h + 60 h
M2	48 h	HF	48 h + 60 h

Es konnte in den Variationen ein jeweils konstantes Metabolitenspektrum vorgefunden werden. Ein Effekt, wie bei der Aufnahme der Fermentationskurve in HF-Medium (s. oben), wurde nicht festgestellt. Im Dünnschichtchromatogramm zeigten sich bei Verwendung von HF-Medium als Hauptkultur zwei fluoreszierende Zonen in direkter Nachbarschaft zum

Chinazolin (**21**). Aus Gründen einer angestrebten effizienten Aufarbeitung wurde fortan für Biosyntheseuntersuchungen, sowohl für die Vor- als auch Hauptkultur, M2-Medium verwendet. Hier konnten keine flankierenden Zonen im Bereich von **21** festgestellt werden. Zusätzlich sollte durch eine Optimierung der Aufarbeitung die Ausbeute an **21** im Vergleich zum vorangegangenen Screening erhöht werden.

Die Fermentationskurve wurde analog zur ersten Fermentationskurve (HF-Medium) aufgenommen (s. oben), wobei in diesem Fall zur Analyse der Metabolitenproduktion auf die gekoppelte HPLC-MS zurückgegriffen wurde. Durch einen Vergleich von UV- und Massenspur wurde gewährleistet, dass die integrierten Peaks im UV-Chromatogramm nur von **21** stammen. Der Fermentationskurve ist zu entnehmen, dass die Chinazolin-Produktion zur 14. Stunde nach Inokulation einsetzt, dann kontinuierlich ansteigt und nach 54. Stunden ihr Maximum erreicht hat (vgl. Abbildung 24). Als Konsequenz wurden alle Vorläufer von der zwölften bis 23. Stunde durch kontinuierliches Zupumpen zur Kulturlösung gegeben und der Erntezeitpunkt nach 54. Stunden gewählt.

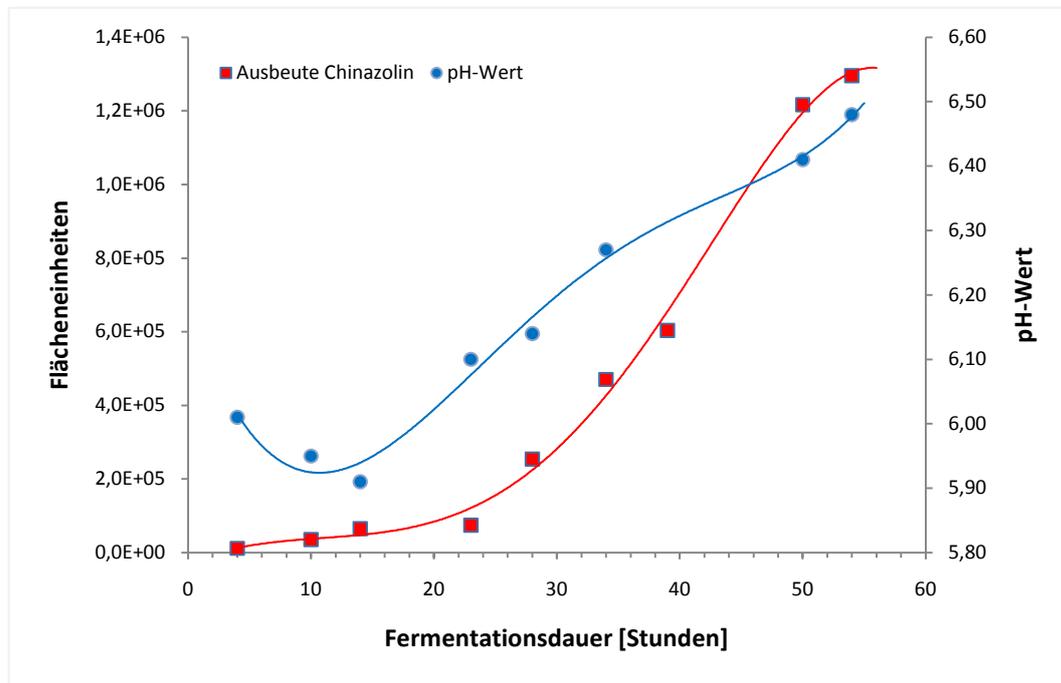


Abbildung 24: Fermentationskurve von 4-Methyl-2-chinazolinamin (**21**) aus dem Stamm Wa232 (M2-Medium): Dargestellt sind die mittels HPLC ermittelten Flächen der UV-Absorbanzpeaks von **21** und der pH-Wert gegen die Fermentationsdauer.

3.3.10.3 Fütterungsexperimente

Vorversuche

In einem ersten Schritt sollte überprüft werden, ob die zu fütternden Substanzen vom Stamm Wa232 überhaupt verstoffwechselt werden können. Häufig führt das Vorhandensein biosynthetisch naher Vorläufer bzw. Intermediaten zu einer Stimulierung des Stoffwechsels, was mit einer Steigerung der Sekundärstoffproduktion einhergeht.^[112] Da die Fütterungsexperimente in einem Fermenter durchgeführt werden sollten, dienten die Vorversuche ferner dazu, den Einfluss dieser neuen Bedingungen am Stamm Wa232 zu testen. Parallel erfolgte eine Fermentation in Schüttelkulturen, zu denen ebenfalls unmarkierte Vorläufer gegeben wurden.

Somit wurde der Stamm Wa232 zum einen im 1.5 Liter-Maßstab im Fermenter und zum anderen im 300 mL-Maßstab (2× 150 mL) in Erlenmeyerkolben kultiviert. Als Inokulum für beide Varianten diente eine 48 h-Vorkultur. Die zu fütternden Substanzen wurden mit Hilfe einer Schlauchpumpe von der zwölften bis 23. Stunde nach dem Beimpfen kontinuierlich zugepumpt. Als unmarkierte Vorläufer wurden Anthranilsäure (**25**) (7.3 mM), Glycerin (5.4 mM) und Harnstoff (4.0 mM) eingesetzt. Zusätzlich erfolgte eine Kultivierung unter den gleichen Bedingungen, jedoch ohne Zufütterung (Kontrolle). In diesem Fall musste jedoch aus Zeitgründen von einer Kontroll-Fermentation im Fermenter abgesehen werden. Die genauen Kultivierungsparameter und die Aufarbeitung sind in Kapitel 8.5.7.2 beschrieben. Die Auswertung erfolgte dünnschichtchromatographisch und mittels gekoppelter HPLC-MS. Die Flächenintegrale über den „Peaks“ im UV-Chromatogramm sind in Abbildung 25 dargestellt. Wie zu erkennen ist, war die Produktion an **21** in allen Schüttelkulturen konstant. Somit zeigten die zugefütterten Vorläufer keinen steigernden Effekt auf die Chinazolin-Produktion. Dennoch war davon auszugehen, dass diese vom Produzentenstamm gut toleriert worden sind, da es zu keinem Einbruch der Produktion kam. Im Gegensatz dazu zeigte die Kultivierung im Fermenter unterschiedlichen Ausbeuten. Während sie nach Fütterung von Harnstoff auf dem Niveau der Schüttelkulturen lag, kam es zu einem Rückgang der Produktion an **21** als Folge der Anthranilsäure- und Glycerin-Fütterung. Inwieweit hierbei die tatsächlichen Ausbeuten an **21** voneinander abweichen, müsste durch eine zusätzliche Eichmessung – Verhältnis von Peakfläche zu Chinazolin-Konzentration – ermittelt werden. Hiervon wurde jedoch abgesehen. Aufgrund der besseren Handhabbarkeit

und der guten Ausbeute im Falle der Harnstoff-Fütterung erfolgten die weiteren Biosyntheseuntersuchungen im Fermenter.

Die Fütterung von Anthranilsäure (**25**) bedarf eines zusätzlichen Kommentars: Aufgrund der in der Literatur beschriebenen Biosynthese-Hypothesen und der Tatsache, dass (*N*-Methyl-) Anthranilsäure (**23**) aus dem Stamm Wa232 isoliert werden konnte, wurde **25** als Vorläufer bzw. Intermediat in der Biosynthese von **21** postuliert. Daher bestand die Erwartung, dass die Größe des Anthranilsäure-Pools einen Einfluss auf die Menge an gebildetem Chinazolin (**21**) besitzt. Jedoch konnte dieser Effekt durch Zufütterung von Anthranilsäure (**25**) zum Produzentenstamm nicht beobachtet werden.

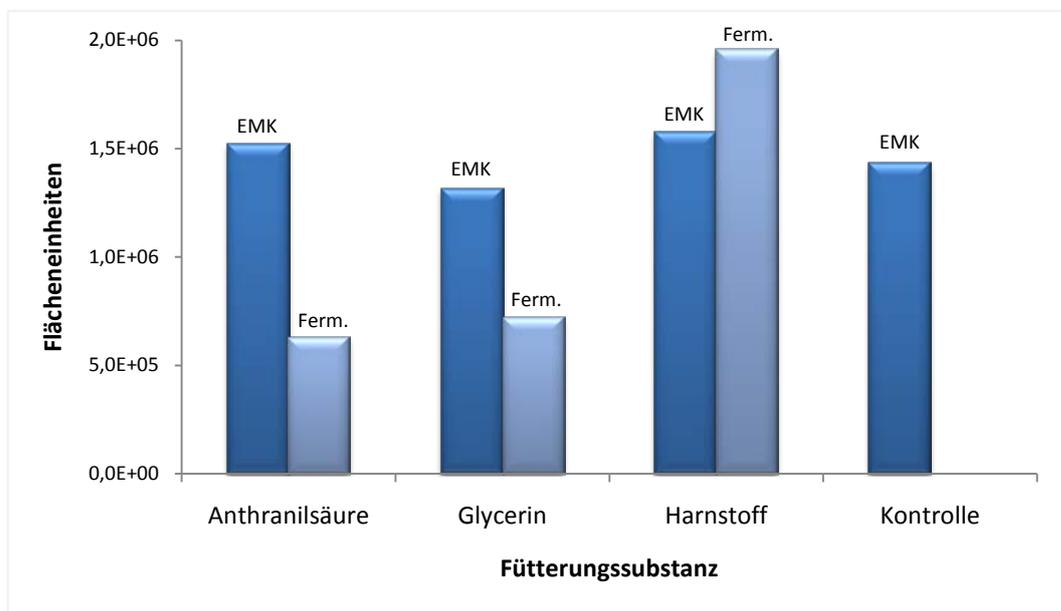


Abbildung 25: Ausbeute an 4-Methyl-2-chinazolinamin (**21**) in Fütterungsversuchen mit unmarkierten Vorläufern. Dargestellt sind die mittels HPLC ermittelten Flächen der UV-Absorbanzsignale von **21** in Abhängigkeit des zugefütterten Vorläufers. EMK = Schüttelkultur; Ferm. = Kultivierung im Fermenter.

Variation der Aufarbeitung

Um einen Zugang zum gesamten aus den Fütterungen gewonnen Metabolitenspektrum des Produzentenstammes zu erhalten und um die Ausbeute an **21** zu erhöhen, wurde ein variiertes Aufarbeitungsschema angewandt. Dieses sah im ersten Schritt eine Trennung des Rohprodukts mittels Gelchromatographie (Sephadex LH-20) vor. Als nächstes folgte Reinigung von **21** durch MPLC (RP-18). Durch diese „verkürzte“ Aufreinigung konnte **21** in Ausbeuten von 2 mg/L aus den Fütterungsansätzen isoliert werden.

Fütterung von [U-¹³C₃]Glycerin

Glycerin kann nicht direkt in den Shikimat-Weg eingeschleust werden, sondern wird nur verstoffwechselt akzeptiert. Es wird über Glycerin-Kinase unter ATP-Verbrauch zu Glycerin-3-phosphat (**G3P**) überführt und anschließend durch Glycerinphosphat-Dehydrogenase zu Dihydroxyacetonphosphat (**DHAP**) umgewandelt. **DHAP** steht im Gleichgewicht mit Glycerinaldehyd-3-phosphat (**GAP**), welches durch die Triosephosphat-Isomerase reguliert wird. Hier findet das ursprüngliche Glycerin seine Einschleusung in den anabolischen Stoffwechsel: **DHAP** wird über die Glycolyse verstoffwechselt und gelangt als Phosphoenolpyruvat (**PEP**) in den Shikimat-Weg, während **GAP** in den Pentosephosphat-Weg eingebunden wird und über Erythrose-4-phosphat (**E4P**) in Shikimat eingebaut werden kann. Das typische Einbaumuster von uniformmarkierten Glycerin in Shikimisäure (**59**) weist neben zwei intakten C₃-Einheiten eine zusätzliche Einzelmarkierung auf (vgl. Abbildung 26). Der Anteil von [U-¹³C₃]Glycerin im metabolischen Pool für **PEP** und **E4P** ist aufgrund der unterschiedlich komplexen Stoffwechselwege nicht gleichwertig. Hieraus resultieren abweichende Einbauraten des Glycerins in **59** (vgl. Abbildung 26). Speziell die Intensität der Einzelmarkierung aus **E4P** – eine Folge des Pentosephosphat-Wegs – ist oftmals geringer als dessen intakte C₃-Einheit.^[113]

[U-¹³C₃]Glycerin wurde dem Chinazolin-Produzenten Wa232 in einer Endkonzentration von 5.4 mM zugeführt. Intensive ¹J_{CC}-Kopplungen konnten zwischen C-4a/C-8a und C-5/C-6/C-7 gefunden werden. Dies indiziert das Vorhandensein intakter Einheiten, die jeweils aus einem isotoopenmarkierten Glycerin-Molekül stammen. Dass es sich bei C-5/C-6/C-7 definitiv um eine intakte Einheit handelt, bestätigt die zusätzlich beobachtbare ³J_{CC}-Kopplung (2.0 Hz) von C-5/C-7. Des Weiteren war eine Einzelanreicherung der Methylgruppe (C-9) feststellbar (vgl. Tabelle 7).

Zur Bestimmung der spezifischen Einbaurate muss die Referenzierung auf ein nicht isotoopenmarkiertes Atom erfolgen. Wie aus den berechneten Daten ersichtlich wird, fiel der Einbau für C-4 und C-8 „negativ“ aus. Aufgrund eines starken Intermediärstoffwechsels von Glycerin konnte nicht ausgeschlossen werden, dass das hier verwendete Referenzatom C-2 als unmarkiert postuliert und dennoch eine Isotoopen-Markierung trug.

Tabelle 7: Spezifischer Einbau (sp. Einb.) und ^{13}C - ^{13}C -Kopplungskonstanten für 4-Methyl-2-chinazolinamin (**21**) nach Fütterung von $[\text{U-}^{13}\text{C}_3]$ Glycerin. Die Einbauraten wurden auf die Signalintensität von C-2 referenziert. Fett dargestellte Werte stellen einen gesicherten Einbau dar.

C-Atom	δ_{C} [ppm]	Sp. Einb. (Singulett)	Sp. Einb. (Dublett)	J_{CC} [Hz]
2	161,4	0,00	-	
4	170,6	-0,10	-	
4a	120,3	-	0,72	54.0
5	126,4	-	0,89	59.0, 2.0
6	122,9	-	0,72	59.0, 53.0
7	134,3	-	0,82	53.0, 2.0
8	126,7	-0,13	-	
8a	153,2	-	0,80	54.0
9	21,5	0,62	-	

Zur Absicherung der Einbauraten sollte **21** durch Acetylierung an der Aminofunktion mit unmarkierten (^{12}C)-Kohlenstoffatomen als neue Referenz versehen werden. Diese Derivatisierung erfolgte durch Umsatz von **21** mit Essigsäureanhydrid in Pyridin (s. Kapitel 8.5.8.3). In einem Modellversuch mit **21** aus einem Fütterungsexperiment mit unmarkiertem Glycerin konnte 4-Methyl-2-chinazolinacetylamid (**60**) in Ausbeuten von 47 % gewonnen werden. Der Umsatz des aus der Fütterung erhaltenen **21** konnte zwar mittels HPLC-MS nachgewiesen werden, allerdings lag nach Reinigung von **60** nicht mehr genügend Substanz vor, um aus den NMR-Messungen eindeutige Einbauraten ermitteln zu können.

Aus dem Kopplungsmuster konnte dennoch, wie oben bereits erwähnt, auf in **21** eingebaute Einheiten geschlossen werden. Legt man Anthranilsäure (**25**) als Vorläufer von **21** zugrunde, wick das beobachtete vom erwarteten Einbaumuster ab. So zeigten sich nicht zwei durch Glycerin vermittelte C_3 -Einheiten, sondern es konnten nur eine intakte C_3 - und eine C_2 -Einheit vorgefunden werden. Eine Einzelanreicherung fehlte im aromatischen Ringsystem, dafür gab es eine zusätzliche in der Methylgruppe (C-9) (s. Abbildung 26).

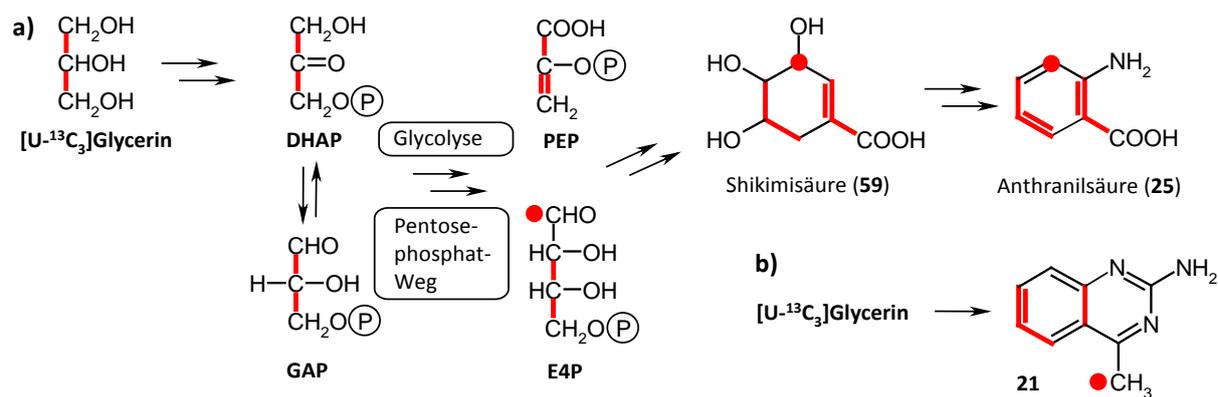


Abbildung 26: Fütterung von [U-¹³C₃]Glycerin: a) Theoretisch erwartetes Einbaumuster in Anthranilsäure (**25**) durch den Shikimat-Weg; b) tatsächlich gefundenes Einbaumuster in 4-Methyl-2-chinazolinamin (**21**). ¹³C-Markierungen im Molekül sind in Rot dargestellt.

Fütterung von [¹³C]Harnstoff, [¹⁵N₂]Harnstoff und [¹³C, ¹⁵N₂]Harnstoff

Die Stoffwechselwege von Harnstoff im Organismus sind sehr facettenreich. Es stellte sich zu Beginn der Fütterungsexperimente die Frage, ob Harnstoff *de novo* für die Biosynthese von **21** zur Verfügung gestellt wird oder durch einen aktiven Katabolismus als anorganisches Ammonium in den Stoffwechsel eingeht.

In unabhängigen Fütterungsexperimenten wurden je 4.0 mM [¹³C]Harnstoff, [¹⁵N₂]Harnstoff und [¹³C, ¹⁵N₂]Harnstoff dem Kultivierungsansatz zugegeben.

Dabei konnte nach Fütterung von [¹³C]Harnstoff keinerlei Anreicherung in **21** aus dem ¹³C-NMR-Spektrum ermittelt werden. Indessen wurden übereinstimmende Markierungsmuster im ¹H- und ¹³C-NMR-Spektrum durch Zugabe von [¹⁵N₂]Harnstoff und [¹³C, ¹⁵N₂]Harnstoff erhalten. Aufgrund der sehr geringen natürlichen Häufigkeit (0.37 %) und des geringen gyromagnetischen Verhältnisses von ¹⁵N ist eine Messung von ¹⁵N-NMR-Spektren häufig schwer möglich. So konnten auch in diesem Fall keine Aussagen mit Hilfe der reinen Stickstoff-Spektren gewonnen werden. Aus den Protonen- bzw. Kohlenstoff-NMR-Spektren kann nicht direkt auf den erfolgreichen Einbau von isotopenmarkiertem Stickstoff geschlossen werden; dies ist nur indirekt durch die erhaltenen Kopplungsmuster für die angereicherten Chinazoline möglich. Im ¹H-NMR-Spektrum von unmarkiertem **21** war das aufgrund der natürlichen ¹⁵N-Häufigkeit beobachtbare und zum Dublett aufgesplante Signal (¹J_{NH} = 88.5 Hz) der Aminofunktion zu erkennen. Nach Fütterung von ¹⁵N-markiertem Harnstoff waren diese Dublett-Signale verstärkt zu detektieren, woraus eine Einbaurrate des

^{15}N von 14 % in die Aminofunktion ermittelt wurde. Des Weiteren zeigten sich nach Fütterung von $^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}_2$ Harnstoff und $^{15}\text{N}_2$ Harnstoff zusätzliche Multipllett-Signale in den ansonsten gleichartigen ^1H -NMR-Spektren, welche auf ein weiteres Isotopomer zurückgeführt wurden. Der Hochfeld-Isotopenshift dieses zum Dublett vom Dublett aufgespaltenen Signals bestätigte diese Annahme. Hierbei könnte es zu einer Anreicherung zweier Stickstoffatome in **21** gekommen sein, so dass neben der Kopplung innerhalb der Aminofunktion eine weitere – zu einem benachbarten ^{15}N -Stickstoff – zu beobachten war ($^3J_{\text{NH}} = 5.5 \text{ Hz}$) (s. Abbildung 27).

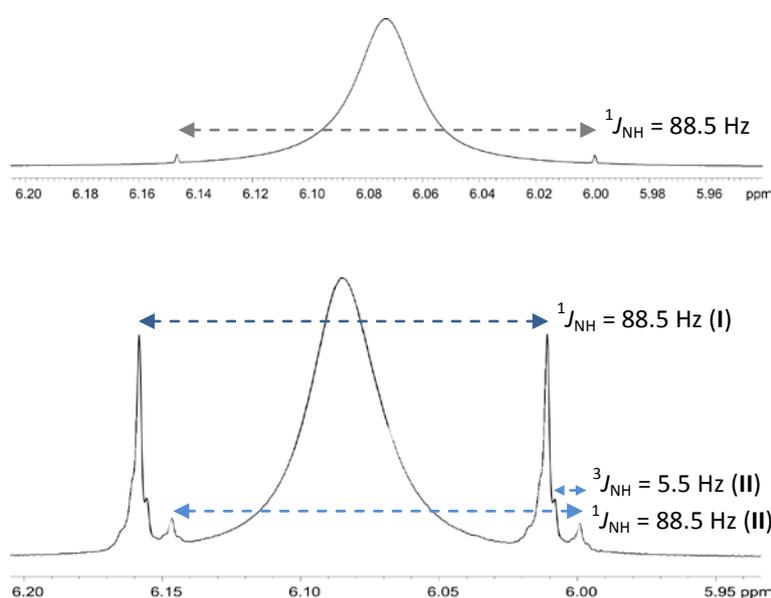


Abbildung 27: ^1H -NMR (600 MHz, Aceton- d_6) der Aminogruppe (2-NH $_2$) von 4-Methyl-2-chinazolinamin (**21**): Referenzspektrum (oben) und Spektrum nach Fütterung von $^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}_2$ Harnstoff (unten). Das aus der Fütterung erhaltene Spektrum zeigt Kopplungsmuster zweier Isotopomere (I/II).

Zusätzlich zeigten mehrere ^{13}C -NMR-Signale diskrete Kopplungen, welche aufgrund ihrer Größenordnung als J_{NC} -Kopplungen identifiziert wurden (s. Abbildung 28, Abbildung 30).^[114] Daraus wurde ein moderater Einbau von ^{15}N in alle Stickstoffatome von **21** geschlossen. Aus ^1H - ^{15}N -HMBC Studien – mit Optimierung auf $J_{\text{NH}} = 5 \text{ Hz}$ – wurde ein stärkerer Einbau in N-3 im Vergleich zu N-1 angenommen. Dies konnte aufgrund des Kreuzsignals von N-3 ($\delta_{\text{N}} = -110.4$) zu 9-CH $_3$ ($\delta_{\text{H}} = 2.72$) postuliert werden, welches von wesentlich höherer Intensität war als das Signal von N-1 ($\delta_{\text{N}} = -164.2$) auf 8-H ($\delta_{\text{H}} = 7.44$) (vgl. Abbildung 29).

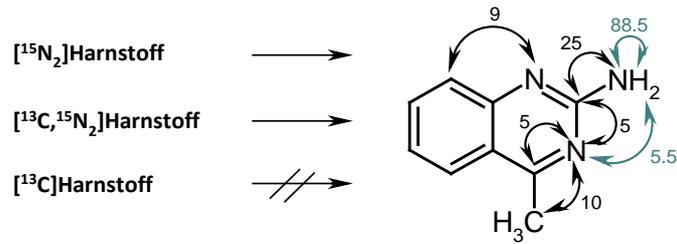


Abbildung 28: Kopplungskonstanten (in Hz) von **21** ermittelt aus ^1H -NMR (J_{NH} : grau) und ^{13}C -NMR (J_{NC} : schwarz) nach Fütterung von ^{15}N -markiertem Harnstoff.

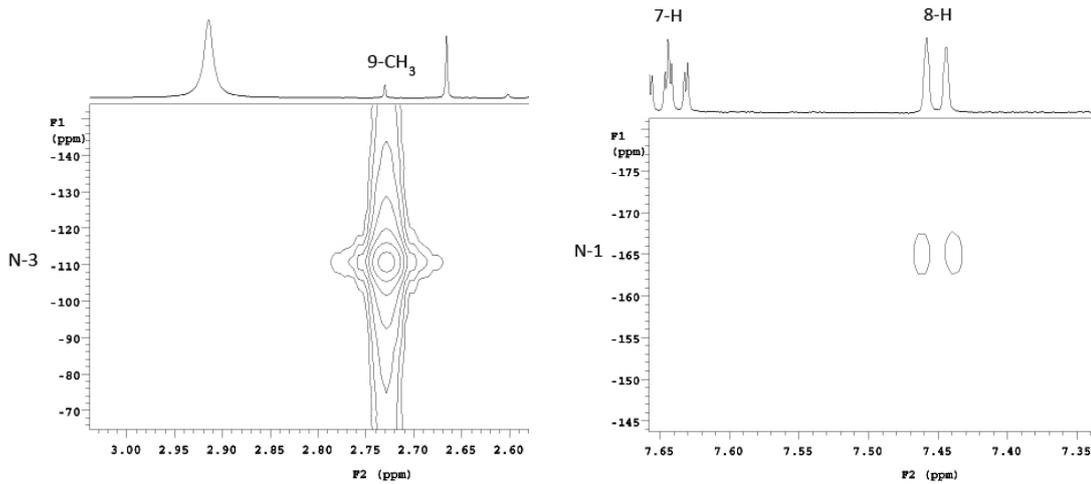


Abbildung 29: ^1H - ^{15}N -HMBC (60 MHz (^{15}N), 600 MHz (^1H), Aceton- d_6) von 4-Methyl-2-chinazolinamin (**21**) nach Fütterung von $[^{13}\text{C},^{15}\text{N}_2]\text{Harnstoff}$. Die HMBC-Experimente waren auf $J_{\text{NH}} = 5$ Hz optimiert.

Zusammen mit den Ergebnissen der $[^{13}\text{C}]\text{Harnstoff}$ -Fütterung wird jedoch der Einbau einer intakten Harnstoff-Einheit ausgeschlossen, was in Übereinstimmung mit einem vitalen Stoffwechsel des Harnstoffs steht.

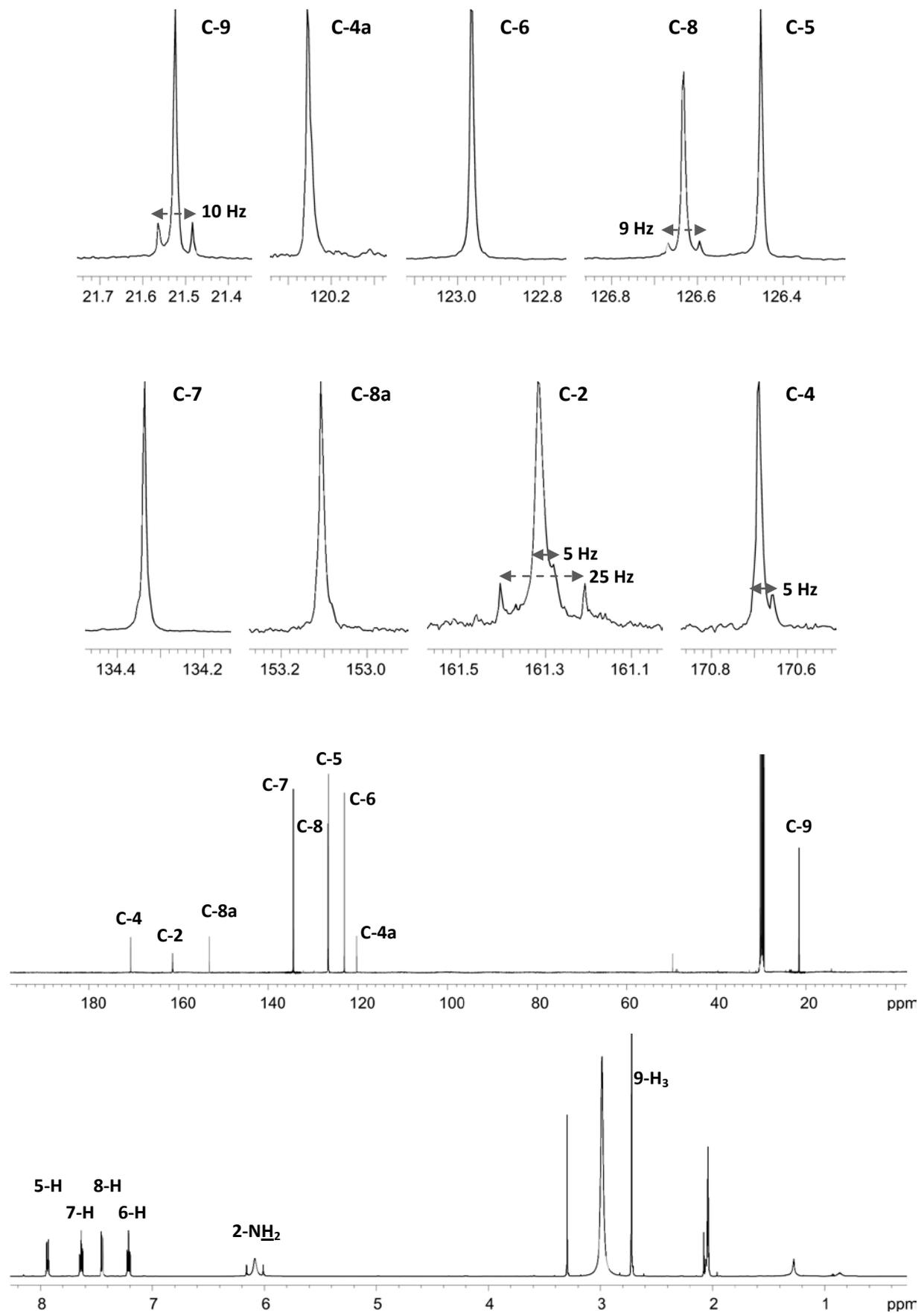


Abbildung 30: NMR-Spektren von **21** nach Fütterung von $[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}_2]$ Harnstoff: a) und b) ^{13}C -NMR (500 MHz, Aceton- d_6); c) ^1H -NMR (600 MHz, Aceton- d_6).

Fütterung von [Methyl-¹³C]Methionin

Methionin wird vom Organismus unter ATP-Verbrauch durch das Enzym Methionin-Adenosyltransferase zu S-Adenosylmethionin (**SAM**) umgewandelt. Diese Spezies erhöht die Aktivität der Methylgruppe des Methionins, womit **SAM** als biologischer Überträger von Methylgruppen fungiert.

Spekulationen über einen Einbau von Methionin in Chinazolin-Alkaloide drehten sich um den Ursprung der N-Methylgruppe in Arborin (**32**). GRÖGER *et al.* konnten markierte N-Methylantranilsäure (**23**) als Abbauprodukt während ihrer Fütterungsstudien an **32** mit [¹⁴CH₃]Methionin isolieren.^[106] Zusätzlich konnte radioaktiv gelabeltes **32** nachgewiesen werden, was eine Übertragung der Methylgruppe durch Methionin bestätigt.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte allerdings kein Einbau von [Methyl-¹³C]Methionin in **21** bestätigt werden, nachdem es in einer Konzentration von 1.2 mM zum Produzentenstamm gefüttert wurde.

N-Methylantranilsäure (**23**) ließ sich nicht während der Biosyntheseuntersuchungen re-isolieren, obwohl es im chemischen Screening gefunden werden konnte. In einer gaschromatographischen Untersuchung des aus der Methionin-Fütterung erhaltenen Rohprodukts konnte **23** eindeutig nachgewiesen werden (s. Abbildung 31). Der ¹³C-Isotopen-Peak lässt jedoch auf keinen signifikanten Einbau schließen. Daher kann nur aus den Ergebnissen der Glycerin-Fütterung eine Beteiligung von Antranilsäure (**25**) an der Chinazolin-Biosynthese angenommen werden. **25** selbst konnte mittels GC-MS dagegen nicht nachgewiesen werden.

Daher ist noch offen, ob **23** als Neben- bzw. Abbauprodukt der Chinazolin-Biosynthese zu betrachten ist; eher unwahrscheinlich ist, dass Antranilsäure nur N-methyliert zu **21** verstoffwechselt wird.

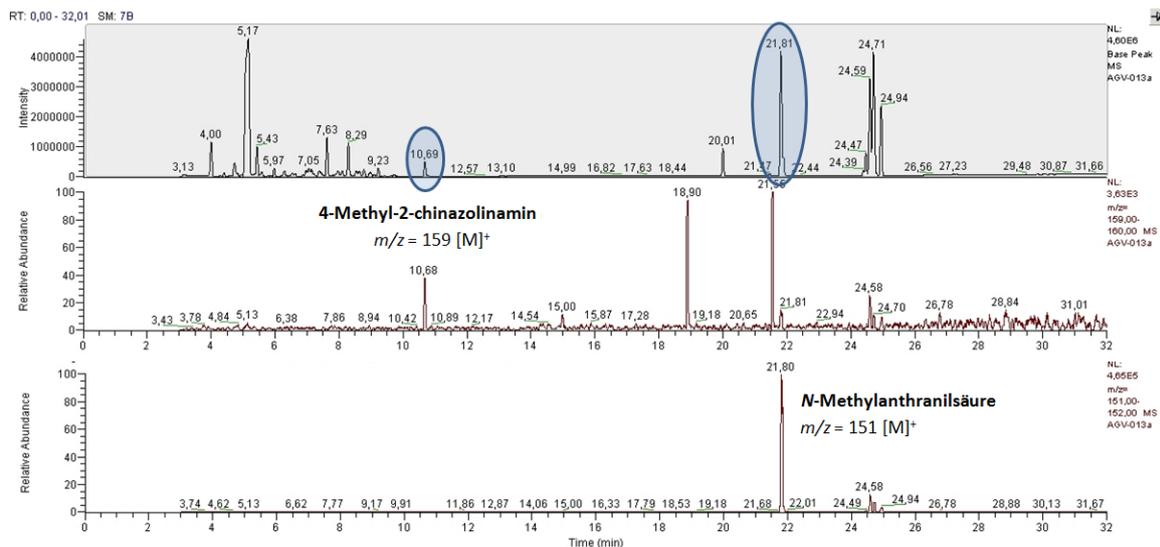


Abbildung 31: GC-MS-Chromatogramm des Rohprodukts aus *S. venezuelae* Wa232 nach Kultivierung in M2-Medium und Fütterung von [Methyl- ^{13}C]Methionin. Oben: ‚Base-Peak‘ über alle Massen; Mitte: Massenspur für $m/z = 159$ -160; Unten: Massenspur für $m/z = 151$ -152.

3.3.10.4 Diskussion und Hypothese zur Biosynthese des Chinazolins (21)

Aus den Ergebnissen der Fütterungen von [U - $^{13}\text{C}_3$]Glycerin, [^{13}C]Harnstoff, [$^{15}\text{N}_2$]Harnstoff, [^{13}C , $^{15}\text{N}_2$]Harnstoff und [Methyl- ^{13}C]Methionin lässt sich eine Biosynthese des mikrobiell neuartigen 4-Methyl-2-chinazolinamins (**21**) ableiten, die im Einklang mit einigen Hypothesen aus der Literatur steht und hier erstmalig den kompletten Biosyntheseweg eines mikrobiellen Chinazolin-Alkaloids aufdeckt:

Den Ausgangspunkt bildet Tryptophan (**53**), welches aus Anthranilsäure (**25**) durch den Shikimat-Weg hervorgeht. Hierbei wird Glycerin über **PEP** und **E4P** in den Stoffwechsel eingespeist. Ferner gelangt Glycerin noch über zwei weitere Wege in das Tryptophangerüst: Zum einen durch 5-Phosphoribosylpyrophosphat (**PRPP**) (*via* Pentosephosphat-Weg) und zum anderen durch Serin (*via* 3-Phosphoglycerat aus der Glycolyse). Unterschiedlich komplexe Biosynthesewege könnten zu verschiedenen starken Anreicherungen von markiertem Glycerin in **21** führen (s. Abbildung 32).

Ein Abbauweg von Tryptophan (**53**) durch Tryptophan-2,3-dioxygenase (Tryptophan-Pyrrolase) führt zu *N*-Formylkynurenin (**54**), welches über eine 2-Oxoglutarat-Aminotransferase in **61** umgewandelt werden könnte. Reduktion der 2-Ketofunktion liefert **62**, das – unter Annahme einer Ketohydroxyglutarat-Aldolase vermittelten Reaktion^[115] – in 2-Aminoacetophenon (**52**) und Glyoxylat gespalten werden könnte. Der Katabolismus von Tryptophan (**53**) zu **52** als wesentlicher Schritt der Biosynthese von Chinazolinen wird auch

im ‚Chinazolin-Weg‘ von MANN postuliert.^[104] Bisher fehlte jedoch eine detaillierte Beschreibung für die Zwischenstufen auf Grundlage von Fütterungsexperimenten.

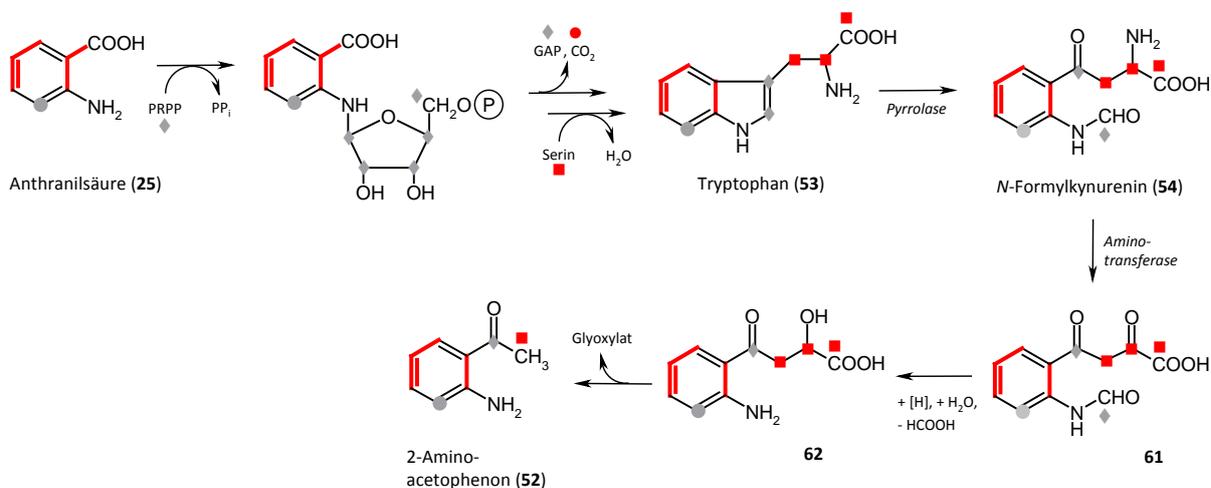


Abbildung 32: Erster hypothetischer Schritt der Biosynthese von 4-Methyl-2-chinazolinamin (**21**): Bildung des aromatischen Rings aus Anthranilsäure (**25**) mit Markierungsmuster aus [U-¹³C₃]Glycerin (rot: signifikanter Einbau; grau: schwacher Einbau).

Die signifikant hohe Anreicherung der Aminofunktion (N-10) durch isotopenmarkierten Harnstoff im Vergleich zu den Pyrimidin-Stickstoffen (N-1 und N-3) des Chinazolins (**21**) lässt auf einen starken Katabolismus des Harnstoffs schließen. Urease führt zur Spaltung von Harnstoff in NH₃ und CO₂. Das somit durch die Fütterung von ¹⁵N-markiertem Harnstoff erhaltene anorganische Ammonium könnte über unterschiedliche Stoffwechselrouten in **21** eingebaut werden (s. Abbildung 33). Damit kann auch erklärt werden, warum es zu keiner (messbaren) Anreicherung in C-2 nach Fütterung von ¹³C-markiertem Harnstoff kam; die Markierung geht über das CO₂ verloren. Ferner kann es auch nicht zu einem Einbau einer intakten [¹³C, ¹⁵N₂]Harnstoff-Einheit kommen.

Es liegt die Vermutung nahe, dass anorganisches Ammonium in Carbamoylphosphat (**63**) umgewandelt wird, welches für den weiteren ¹⁵N-Transfer verantwortlich ist. Neben 2-Aminoacetophenon (**52**) als Baustein des aromatischen Rings in **21** wird N-Carbamoylaspartat (**64**) als Teil der Pyrimidin-Einheit in **21** angenommen. Die beiden Stickstoffatome in **64** stammen dabei aus unterschiedlichen biosynthetischen Quellen: **63** liefert den späteren N-3 in **21**, während die Aminofunktion in **21** aus Aspartat hervorgeht (vgl. Abbildung 33). Eine ¹⁵N-Markierung des N-1 von **21** erscheint ebenfalls plausibel. Glutamat als universeller Stickstoffüberträger ist biosynthetisch eng mit dem Stickstoff-Pool

(via Harnstoffzyklus) verbunden. So könnte bereits Anthranilsäure (**25**) in einer frühen Stufe der Chinazolin-Biosynthese eine ^{15}N -Markierung durch Glutamat erhalten haben.

Ein doppelter nukleophiler Angriff – im ersten Schritt durch *N*-Carbamoylaspartat (**64**) an 2-Aminoacetophenon (**52**) und dann intramolekular – führt letztendlich zum Ringschluss. Der letzte Schritt der Biosynthese könnte durch Transaminierung und Abspaltung von Oxalacetat erklärt werden, woraus **21** hervorgeht.

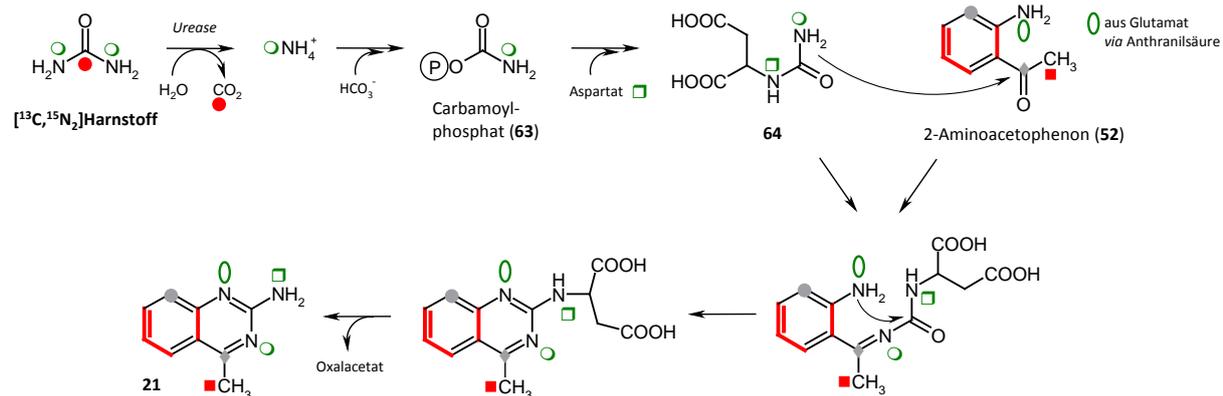


Abbildung 33: Hypothese zur Biosynthese von 4-Methyl-2-chinazolinamin (**21**): Markierungsmuster aus ^{13}C , $^{15}\text{N}_2$]Harnstoff (grün) und Bildung des bicyclischen Chinazolins aus Carbamoylaspartat (**64**) und 2-Aminoacetophenon (**52**) (mit Markierungen aus $[\text{U-}^{13}\text{C}_3]$ Glycerin: rot = signifikant; grau = schwach).

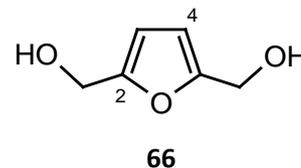
3.3.10.5 Neue Metaboliten aus den Fütterungsversuchen

Das Kulturfiltrat der Glycerin- und Methioninfütterung zeigte im Dünnschichtchromatogramm (RP-18) eine bisher nicht beobachtete, fluoreszierende Zone mit rosa Eigenfarbe, welche nicht aus den anderen Fütterungsansätzen isoliert werden konnte. Nach chromatographischer Auftrennung erhielt man **65** als roten Feststoff in einer geringen Ausbeute von 0.5 mg/L, dessen ESI-Massenspektrum zusammen mit HPLC-MS-Messungen auf eine Molmasse von 716 g/mol deutete. Hierbei ließ das Isotopenmuster ein Vorhandensein von Chlor oder Schwefel im Molekül vermuten. Aus der zugehörigen ESI-Hochauflösungs-Messung des Natrium-Addukts ($[\text{M-Na}]^+$) konnten drei Vorschläge für eine mögliche Summenformel ermittelt werden: $\text{C}_{28}\text{H}_{25}\text{N}_{16}\text{O}_6\text{Cl}_1$, $\text{C}_{32}\text{H}_{28}\text{N}_8\text{O}_{12}$, $\text{C}_{33}\text{H}_{48}\text{O}_5\text{S}_6$.

Aufgrund der geringen Ausbeute in Verbindung mit einem hohen Molekulargewicht standen nicht ausreichende Mengen zur Verfügung, die eine Charakterisierung von **65** mittels 2D-NMR-Spektroskopie ermöglichten. Das ^{13}C -NMR lässt auf 28 C-Atome schließen, was in Übereinstimmung mit der durch HR-ESI-MS Messung ermittelten Summenformel

$C_{28}H_{25}N_{16}O_6Cl_1$ stünde. Entgegen der Erwartungen zeigte das 1H -NMR keine Signale, die auf ein aromatisches Ringsystem bei **65** deuten. Lediglich zwei zum Multiplett aufgespaltene Signale ($\delta_H = 3.15$ - 3.20 , 4.38 - 4.47) und ein mögliches Dublett ($\delta_H = 3.65$) – alle von gleicher Intensität – sowie drei diskrete Singulett-Signale ($\delta_H = 10.09$, 10.19 , 10.24) konnten in allen gemessenen Protonenspektren (CD_3OD) bestätigt werden.

Alle Extrakte der Fütterungsansätze zeigten nach Dünnschichtchromatographie eine UV-inaktive Zone, die in der Wärme mit Anisaldehyd zu einer grün-braunen Farbreaktion führte. Nach Aufreinigung fiel die Substanz als weißer Feststoff in Ausbeuten von 7 mg/L an. Die Verbindung wies im 1H -NMR-Spektrum (Aceton- d_6) zwei diskrete ($\delta_H = 4.46$, 6.18) und ein sehr breites Singulett ($\delta_H = 4.34$) auf. Die diskreten Signale wurden aufgrund ihrer Intensität als Methylengruppe ($\delta_H = 4.46$) bzw. Methingruppe ($\delta_H = 6.18$) charakterisiert. Das EI-Massenspektrum führte zu einem Ion mit $m/z = 128$, was die Substanz zusammen mit den NMR-Daten und Datenbankrecherche^[68] als Furan-2,5-dimethanol (**66**) identifizierte.



66 konnte im Arbeitskreis häufig in Zusammenhang mit Fermentationen in M2-Medium isoliert werden.^[40,116] Aus diesem Grund wird **66** als Nährmedienbestandteil vermutet. In der Literatur wurde dieser Furan-Alkohol allerdings auch als Metabolit aus Streptomyceten bzw. Pilzen beschrieben.^[117,118] Im ersten Falle fand die Kultivierung jedoch auch in M2-Medium statt. **66** kann z.B. bei Hefen als Detoxifizierungsprodukt des Hydroxymethylfurfurals (**HMF**) gefunden werden, wobei **HMF** in Anwesenheit von Zuckern gebildet wird und inhibierend auf das Kulturwachstum wirkt.^[119] Ob an dieser Stelle ein Zusammenhang zwischen dem zuckerhaltigen M2-Medium und der Produktion von **66** besteht und ob Streptomyceten generell über einen derartigen Detoxifizierungsmechanismus verfügen, lässt sich an dieser Stelle zunächst nicht beantworten.

3.3.11 Biologische Aktivität von **21**^v

Im biologischen Screening zeigte das Rohprodukt des Produzentenstammes *Streptomyces venezuelae* Wa232 eine gewisse Inhibierung von *Bacillus subtilis* und *Escherichia coli*. Dahingegen konnte im Plattendiffusionstest keine Wachstumsinhibierung durch **21** festgestellt werden.

In einem ersten *in vitro* Zytotoxizitäts-Test (durch W. BEIL, MHH/Hannover) gegen verschiedene Tumorzelllinien wies **21** eine moderate Aktivität auf (s. Tabelle 8). Des Weiteren zeigte **21** in einem Klonbildungsraten-Assay eine deutliche antiproliferierende Aktivität gegen Bronchialkarzinom-Zellen der Linie A549, wobei der IC₅₀-Wert bei 0.15 µmol/L lag (s. Abbildung 34) (in Zusammenarbeit mit der Abteilung ZELLKULTUR/Universität Göttingen). Dieser Wert liegt in vergleichbarer Größenordnung mit den aktuell in der Chemotherapie eingesetzten Zytostatika Doxorubicin (**67**) und Melphalan (**68**).

Tabelle 8: Zytotoxizität von Chinazolin (**21**) gegen verschiedene Tumorzelllinien: AGS (Magen-Adenokarzinom), HM02 (Magen-Adenokarzinom), Hep G2 (Leberkarzinom), MCF 7 (Mammakarzinom). GI₅₀: Konzentration, die eine halbmaximale Hemmung des Zellwachstums bewirkt; TIC: Konzentration für eine vollständige Hemmung des Zellwachstums.

Linie	AGS		HM02		Hep G2		MCF7	
	GI ₅₀	TIC						
µg/ml	1.3	4.1	1.25	9.1	4.9	> 10	2.5	4.9
µmol/l	8.18	25.8	7.86	57.2	30.8	> 63	15.7	30.8

^v Hiermit möchte ich mich bei allen Beteiligten der Bioaktivitäts-Test für die Durchführung und Bereitstellung der Ergebnisse bedanken: Zytotoxizitäts-Tests durch W. BEIL (MHH/Hannover); Klonbildungsraten-Assay in der Abteilung Zellkultur (Universität Göttingen); morphologische Studien durch F. SASSE (Helmholtz-Zentrum/Braunschweig); *in vitro* Untersuchungen zu Tropenkrankheiten durch M. KAISER (Schweizer Tropeninstitut/Basel).

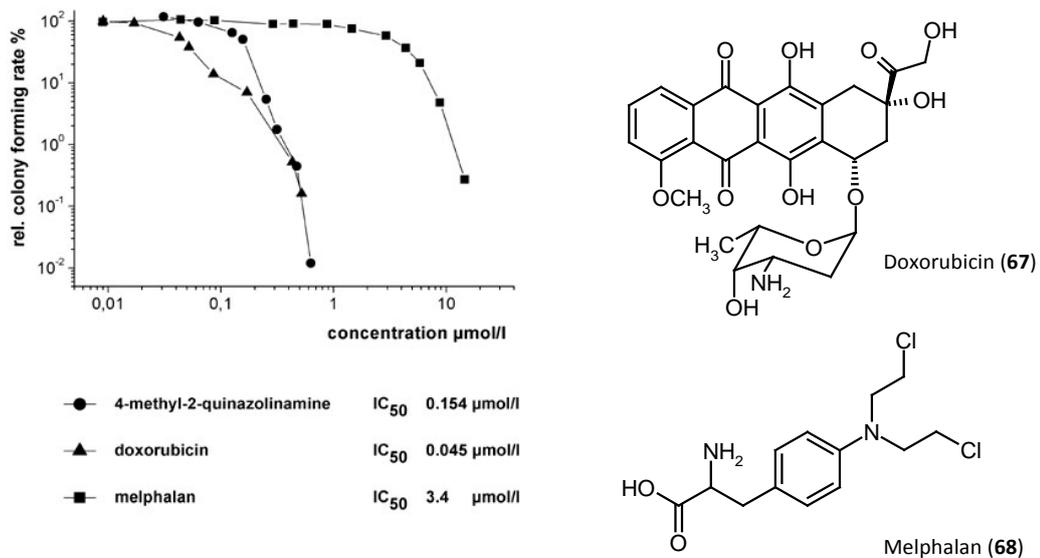


Abbildung 34: Ergebnisse des Klonbildungsrate-Assay (Brustkarzinomzellen, Linie A549) von 4-Methyl-2-chinazolinamin (**21**) im Vergleich zu den Zytostatika Doxorubicin (**67**) und Melphalan (**68**). Angegeben ist die relative Klonbildungsrate in Gegenwart von unterschiedlichen Konzentrationen der untersuchten Substanz (durchgeführt in Zusammenarbeit mit der Abteilung ZELLKULTUR/Universität Göttingen).

Aktuell wird der mögliche Wirkort von **21** in weiteren Studien untersucht. In einem Vorversuch durch F. SASSE (HZI/Braunschweig) wurde **21** gegen L929-Mausfibroblasten und Brustkrebszellen (Linie MCF 7) auf seine Proliferationshemmung getestet. Hierbei konnte IC₅₀-Werte von 0.99 μg/mL (L929) bzw. 0.79 mg/mL (MCF 7) festgestellt werden. Als nächster Schritt wurde der morphologische Phänotyp der MCF 7-Zellen näher beleuchtet. Auffallend sind eine Verformung der Zellkerne und runde Aussparungen im Mikrotubuli-Netz ab einer Konzentration von 5 μg/mL an **21** (s. Abbildung 35). Ein ähnlicher Effekt zeigte sich auch in den Studien am neuartigen Naturstoff Collinolacton (**20**) (s. Kapitel 5).

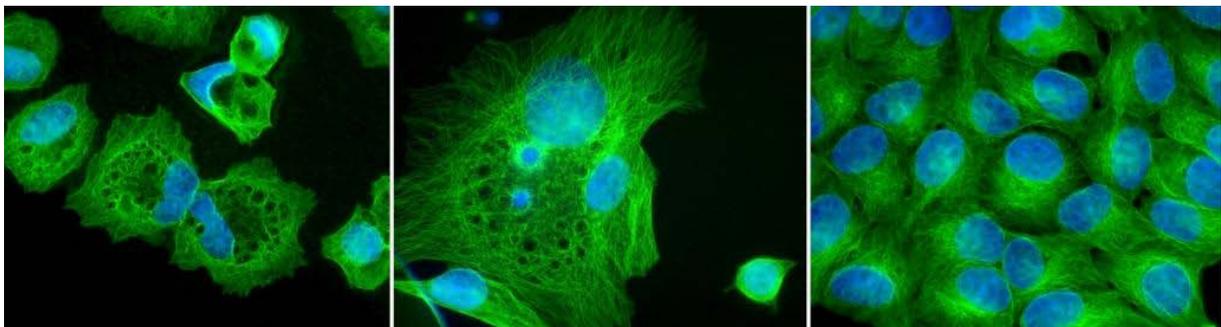


Abbildung 35: Phänotyp von Brustkrebszellen (Linie MCF 7) nach Inkubation mit 5 μg/mL Chinazolin (**21**) für einen Tag. Mikrotubuli wurden durch Immunofluoreszenz grün markiert, während Zellkerne mit DAPI blau gefärbt wurden. Links und Mitte: Zellen nach Applikation von **21** ; rechts: Kontrolle.

In vitro-Assays mit tropischen Parasiten durch M. KAISER (Tropeninstitut/Basel) identifizierten für **21** eine schwache Wirkung gegen *Plasmodium falciparum* ($IC_{50} > 5 \mu\text{g/mL}$) – dem Erreger der *Malaria tropica* – und *Leishmania donovani* ($IC_{50} = 22 \mu\text{g/mL}$) – dem Erreger der Leishmaniose (s. Tabelle 9). Als Referenzwirkstoffe können an dieser Stelle Chloroquin ($IC_{50} = 0.072 \mu\text{g/mL}$) als Anti-Malaria-Wirkstoff und Miltefosin ($IC_{50} = 0.21 \mu\text{g/mL}$), einem Inhibitor von Leishmanien-Protozoen angeführt werden. Beide sind jedoch um etwa den Faktor 100 aktiver, verbunden mit geringer Zytotoxizität.

Tabelle 9: Ergebnisse des *in vitro* Screenings von 4-Methyl-2-chinazolinamin (**21**) an tropischen Parasiten. Alle IC_{50} -Werte sind in [$\mu\text{g/mL}$] angegeben. Als Referenzen kamen zum Einsatz: Miltefosin (*Plasmodium falciparum*), Chloroquin (*Leishmania donovani*), Melarsoprol (*Trypanosoma rhodesiense*) und Benznidazol (*Trypanosoma cruzi*).

	<i>P. falciparum</i>	<i>L. donovani</i>	<i>T. rhodesiense</i>	<i>T. cruzi</i>
21	> 5	22.06	41.1	> 90
Referenz	0.072	0.206	0.003	0.032

Untersuchungen zum Einfluss des Chinazolins **21** auf die Keimung des Modellorganismus *Arabidopsis thaliana* ‚Columbia Zero‘ (Acker-Schmalwand) wurden in Zusammenarbeit mit P. KÖSSLER (AK KARLOVSKY/Universität Göttingen)^{vi} durchgeführt. Als Grundlage des Bio-Assays wurden Untersuchungen von SPLIVALLO *et al.*^[120] herangezogen, welche den Einfluss von Sekundärmetaboliten auf die Keimung sowie das Wurzelwachstum von *Arabidopsis thaliana* näher beleuchten. Aufgrund der eingeschränkten Verfügbarkeit von **21** wurde ein miniaturisierter Assay im 96-Vail Plattenformat herangezogen.

Die inkubierten Mikrotiterplatten wurden zunächst visuell auf das Sprosswachstum bonitiert (s. Abbildung 36). Es war festzustellen, dass der Sekundärmetabolit das primäre Längenwachstum von *Arabidopsis thaliana* nicht beeinflussen konnte. Bei der daran anschließenden Bonitur des Wurzelwachstums konnten, wie bereits bei der Sprossbonitur, keine eindeutigen Hinweise auf phytotoxische Eigenschaften des getesteten Metaboliten gefunden werden.

Zur abschließenden Untersuchung der gebildeten Biomasse wurden die Pflanzen in der Mikrotiterplatte zunächst eingefroren und anschließend gefriergetrocknet. Die Kontrolle auf

^{vi} Ich danke P. KÖSSLER (AK KARLOVSKY/Universität Göttingen) für die Einweisung und Hilfe bei der Durchführung der Phytotoxizitäts-Assays.

Biomasseproduktion erfolgte mittels Feinwaage. Analog zu den visuellen Bonituren konnte auch hier kein signifikanter Unterschied zwischen den eingesetzten Metabolitenkonzentrationen (5 nM bis 100 μ M) sowie zu den Negativkontrollen hergestellt werden. Eine phytotoxische Aktivität gegenüber *Arabidopsis thaliana* konnte in diesem Assay nicht belegt werden.

Um eine genauere Darstellung zur Wirkung der Metaboliten auf das Wurzelwachstum zu erhalten, müsste der Assay in einem größeren Maßstab wiederholt werden. In diesem Fall könnten digitale Bildanalysen zur Wurzelhaarbildung, Verzweigungen der primären und sekundären Wurzel sowie die Bestimmung der Wurzellänge nähere Aufschlüsse über die biologische Aktivität des Metaboliten liefern.

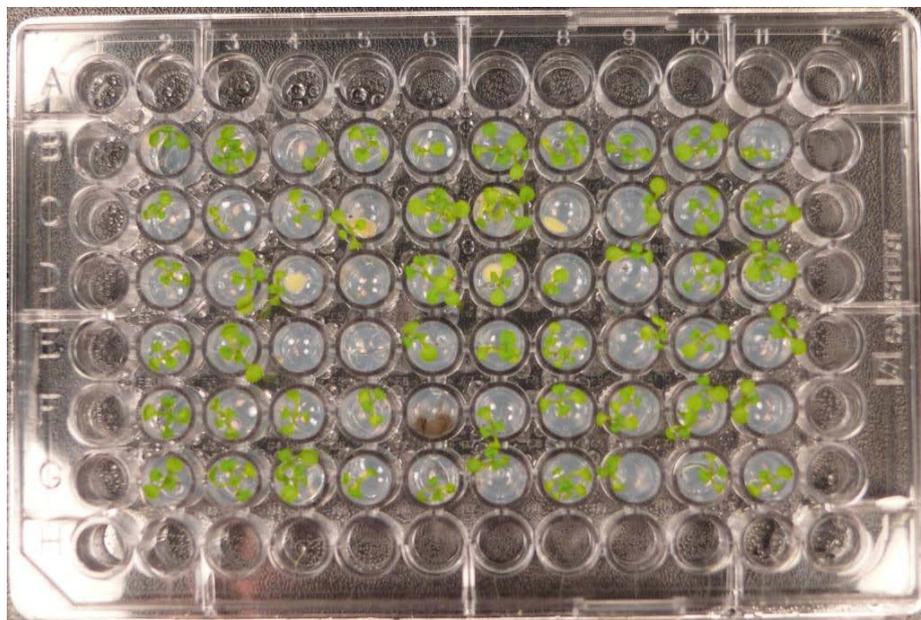


Abbildung 36: Bio-Assay zur phytotoxischen Aktivität von **21** gegenüber *Arabidopsis thaliana*. Mikrotiterplatte mit gekeimten Samen auf MS-Festphasen-Medium 14 Tage nach Inokulation.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass 4-Methyl-2-chinazolinamin (**21**) ein vielversprechendes Tool in der Forschung werden könnte, da es signifikante biologische Wirkung zeigt. In einem nächsten Schritt müssen vertiefende Untersuchungen Aufschlüsse über eine zytotoxische Wirkung in Kombination mit Struktur-Wirkungsbeziehungen geben.

3.4 *Actinomyces* sp. Wa283 (GS DV283)

Bei diesem Bakterium handelt es sich um einen assoziierten Actinomyceten, welcher vom Blatt (*Folium*) der Pflanze *Filipendula palmata* (Pall.) Maxim. isoliert wurde.

Auch wenn die Extrakte des Mycels im biologischen Screening eine gewisse Aktivität aufwiesen, konnte kein vielfältiges Metabolitenspektrum im Dünnschichtchromatogramm (DC) ausgemacht werden. Auf eine weitere Bearbeitung wurde verzichtet.

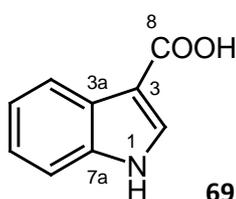
Im DC zeigten nur die Rohextrakte aus den Kultivierungsansätzen in M2- und SM-Medium ein breites Metabolitenspektrum, wobei der Extrakt aus M2-Medium im Plattendiffusionstest zusätzlich eine leichte Aktivität aufwies. Jedoch konnten hier bei Verwendung von Anfärbereagenzien keine deutlichen Farbreaktionen ausgemacht werden. Ferner wurde gegen eine intensive Bearbeitung entschieden, da sich die meisten Zonen mit denen der Leerkontrolle deckten (folglich Substanzen des M2-Mediums). Dazu im Gegensatz zeigten sich bei der Analyse des Extrakts aus SM-Medium zwei deutliche Farbreaktionen: Im polaren Bereich des DC konnte eine sowohl UV-löschende als auch fluoreszierende Zone ($R_f = 0.22$) ausgemacht werden, die mit Ehrlich-Reagenz zu einer intensiv violettfarbenen Farbreaktion führte. Des Weiteren färbte eine Zone ($R_f = 0.39$), nebst UV-Löschung, mit Orcin in der Wärme auffallend Blau.

Die ‚Scale-up‘-Kultivierung erfolgte in SM-Medium im 7 L-Maßstab, wobei anschließend nur das Kulturfiltrat aufgearbeitet wurde. Die im chemischen Screening aufgrund ihrer Farbreaktion ausgewählten Metaboliten konnten im Rohextrakt nicht erneut identifiziert werden. So orientierte sich die Trennung vorrangig an den vom Screening bekannten R_f -Werten im DC. Es konnten zwei Metaboliten isoliert werden. Weitere Metaboliten fielen nur in Massen < 1 mg an, so dass eine vollständige Reinigung und Charakterisierung hier nicht mehr möglich war.

3.4.1 Indol-3-carbonsäure (69)

Die Substanz fiel im DC durch ihre rote Fluoreszenz bei 350 nm auf und konnte als hellbrauner Feststoff in einer Ausbeute von 0.2 mg/L isoliert werden. Das EI-Massenspektrum deutete auf ein Ion höchster Masse mit $m/z = 161$. $^1\text{H-NMR}$ -Spektren wurden in CD_2Cl_2 und CD_3OD gemessen, wobei das breite Singulett bei $\delta_{\text{H}} = 8.79$ nur in

CD_2Cl_2 detektiert werden konnte, was auf ein austauschendes Proton hindeutet. Ferner waren fünf Signale im aromatischen Bereich ($\delta_{\text{H}} = 7\text{-}8$) messbar, welche alle die Intensität eines Protons aufwiesen. Aufgrund ihres Kopplungsmusters wurden vier der Signale benachbarten Protonen zugeordnet. Das fünfte dieser Signale zeigte nur in CD_2Cl_2 die Multiplizität eines Dubletts, weshalb das zugehörige Proton in der Nachbarschaft des austauschenden Protons vermutet wurde. Ein Signal im ^{13}C -NMR-Spektrum ($\delta_{\text{C}} = 170.3$) ließ aufgrund seiner chemischen Verschiebung auf die Existenz einer Carboxylgruppe schließen. Zusammen mit den spektroskopischen Daten und einer Datenbanksuche (AntiBase)^[68] konnte die Substanz sehr rasch als Indol-3-carbonsäure (**69**) charakterisiert werden.

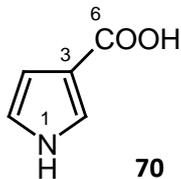


69 konnte bereits in vielen Mikroorganismen als Metabolit nachgewiesen werden, darunter Actinomyceten, *Azotobacter*-Spezies und *Rhizobiaceae*.^[121] Für *Chromobacterium violaceum* wurde **69** aus dem Katabolismus von Tryptophan hervorgehend angenommen, was heute für viele pflanzliche und mikrobielle Indole ebenfalls der Fall ist. Ebenso fiel **69** neben anderen Indolen als Metabolit aus Screening-Ansätzen von u.a. anaeroben, halophilen Bakterien^[122] oder marinen Rotalgen^[123] an.

3.4.2 Pyrrol-3-carbonsäure (**70**)

Aus dem Fermentationsansatz von Wa283 konnten 0.4 mg/L eines blass gelben Feststoffs (**70**) isoliert werden, der mit Anisaldehyd in der Wärme zu einer gelb-braunen Farbreaktion führte. Auffällig war das Fragmentierungsmuster ($\Delta m/z = 45$) im EI-Massenspektrum, welches die Anwesenheit einer Carboxylgruppe vermuten ließ. Insgesamt zeigte diese Substanz ein Masse-zu-Ladungsverhältnis von $m/z = 111$. Zusammen mit dem DCI-Massenspektrum wurde auf eine leicht zu deprotonierende Spezies geschlossen, da ein Ion der Masse 110 g/mol in allen Spektren deutlich zu erkennen war. Aufgrund der geringen Ausbeute waren die Signale im NMR-Spektrum sehr schlecht aufgelöst, weshalb die Bestimmung von Multiplizitäten bzw. Kopplungskonstanten nicht eindeutig war. Die chemischen Verschiebungen in Zusammenhang mit Datenbankrecherchen^[68,72] und dem

charakteristischen Massen-Fragmentierungsmuster^[124] identifizierten **70** als Pyrrol-3-carbonsäure.



3.5 *Actinomyces* sp. WaS4811 (GS DV4811)

Dieser assoziierte Actinomycet wurde von der Sprossachse der Pflanze *Filipendula palmata* (Pall.) Maxim. isoliert.

Der Stamm WaS4811 fiel im chemischen Screening durch eine bei 254 nm stark UV-löschende Zone im Dünnschichtchromatogramm auf, welche in der Wärme mit Ehrlich zu einer orangen Färbung und mit Orcin zu einer auffallend braunen Färbung führten. Des Weiteren wiesen die Extrakte des Kulturfiltrats aus den Kultivierungen in SGG- bzw. Spirulina-Medium eine moderate Aktivität im Plattendiffusionstest auf. Allerdings konnten hier im mittel-polaren Bereich keine Metaboliten, die mit den Sprühreagenzien zu einer Farbreaktion führten, ausgemacht werden. Vermutlich rührte die festgestellte Aktivität von sehr polaren Metaboliten, die an der Auftragsstelle des Dünnschichtchromatogramms versammelt waren.

Aus diesem Grund wurde eine Kultivierung im 4 L-Maßstab nur unter Verwendung von M2-Medium durchgeführt. Hieraus konnte die im Screening „ausgewählte“ Substanz **71** in einer Ausbeute von 3.5 mg/L isoliert werden.

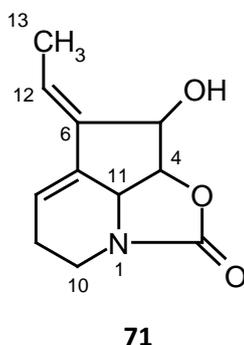
3.5.1 Streptazolin (71)

Während der chromatographischen Aufarbeitung fiel auf, dass die Substanz **71** in konzentrierter Form ihre gute Löslichkeit in den verwendeten organischen Lösungsmitteln, vor allem in Methanol, verlor. Nach Entfernen des organischen Lösungsmittels und bei erneutem Lösen der gewonnenen zähflüssige Substanz fiel immer ein Teil als weißes Pulver aus. Dieses war zwar in DMSO (Dimethylsulfoxid) löslich, konnte aber aufgrund der geringen Menge nicht charakterisiert werden.

Schließlich konnte **71** als gelbes Öl isoliert werden, welches ausreichend in Chloroform für eine weitere Charakterisierung löslich war. Im ¹H-NMR-Spektrum waren Signale von zwölf

Protonen zu erkennen; hierbei konnte aufgrund der chemischen Verschiebung für die Signale bei $\delta_{\text{H}} = 4.26$ (Dublett), 4.71 (Dublett), 4.83 (Singulett), welche die relative Intensität jeweils eines Protons aufwiesen, eine Nachbarschaft von Heteroatomen (Sauerstoff oder Stickstoff) angenommen werden. Neben zwei Signalen ($\delta_{\text{H}} = 2.11-2.24$, 2.41-2.54), welche auf aliphatische Strukturelemente deuteten, konnte ein zum Dublett aufgespaltenes Signal durch seine Intensität als Methylgruppe interpretiert werden. Im hochauflösenden ESI-Massenspektrum wurde das Ion höchster Intensität mit $m/z = 208$ ($[M+H]^+$) zur Berechnung der Summenformel $\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{NO}_3$ zugrunde gelegt. In Kombination mit den aus der Datenbank *AntiBase*^[68] erhaltenen Strukturvorschlägen und den gemessenen spektroskopischen Daten wurde **71** als Streptazolin identifiziert.

71 besaß im Plattendiffusionstest keine antibakterielle oder antifungale Wirkung.



Dieser Metabolit wurde 1981 erstmals im Rahmen eines chemischen Screenings aus *Streptomyces viridochromogenes* Tü 1678 isoliert und charakterisiert.^[125] Auch hier wurde das Ausfallen eines weißen Feststoffes beschrieben, welcher als Polymerisationsprodukt von **71** vermutet wurde. Streptazolin (**71**) ist ein beim chemischen Screening nach neuen Naturstoffen aus Streptomyceten recht häufig anzutreffender Metabolit, was vermutlich im Zusammenhang mit seiner guten Detektierbarkeit liegt.^[126,127] So konnten beispielsweise unter dem Gesichtspunkt des OSMAC-Verfahrens^[11,12] aus *Streptomyces* sp. A1 allein durch Variation der Kultivierungsparameter vier neue Streptazolin-Derivate (u.a. **72-74**) isoliert werden, darunter glykosylierte (**73**) oder epoxidierte (**74**) Spezies.^[128]

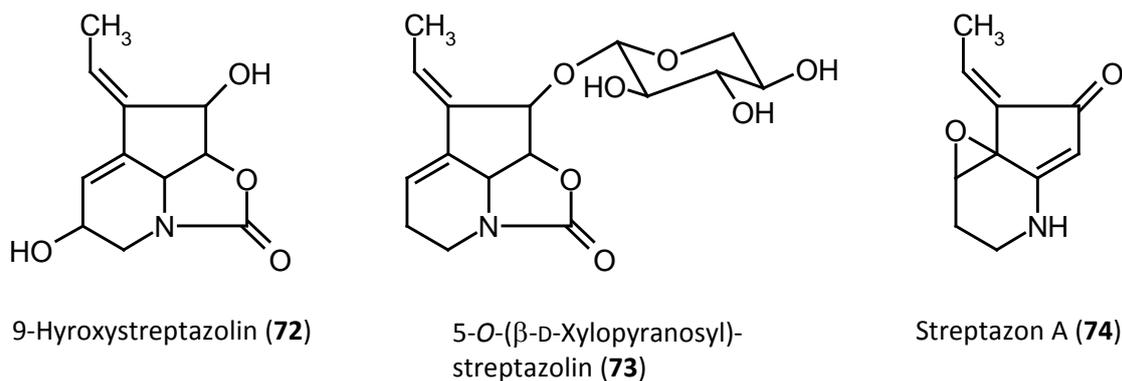


Abbildung 37: Durch Variation der Kultivierungsparameter aus *Streptomyces* sp. A1 isolierte Derivate des Streptazolins (**71**).

3.6 *Actinomyces* sp. WWa18 und *Actinomyces* sp. WWa183

Beide Bakterien konnten als assoziierte Actinomyceten von der Wurzel der Mädesüß *Filipendula palmata* (Pall.) Maxim. isoliert werden.

Das Metabolitenspektrum des Kulturfiltrat-Extrakts vom Stamm WWa18 zeigte im Dünnschichtchromatogramm nach Kultivierung in SM-Medium eine mittel-polare Zone, die mit Anisaldehyd in der Wärme zu einer gelb-braunen Farbreaktion führte. Außerdem löschte sie bei 254 nm UV-Licht und fluoreszierte bei 350 nm dunkelblau. Ferner wies das Extrakt der Kultivierung in HF-Medium eine UV-löschende Zone auf, die mit Anisaldehyd rot anfärbte. Keines der Extrakte zeigte eine biologische Aktivität im Plattendiffusionstest.

Aus einem 3 L-Fermentationsansatz in SM-Medium konnte ein gelbes Öl in einer Ausbeute von 5.0 mg/L isoliert werden, welches nach Aufnahme der physikochemischen Daten als Streptazolin (**71**) identifiziert wurde. Zusätzliche, im chemischen Screening nicht ausgewählte Metaboliten fielen aus diesem Ansatz in zu geringen Mengen an, um eine Charakterisierung erfolgreich durchzuführen. Von einer weiteren Kultivierung in M2-Medium wurde abgesehen.

Im Screening wies der Kulturfiltrat-Extrakt vom Produzentenstammes WWa183 nur nach Kultivierung in M2-Medium ein gewisses Metabolitenspektrum auf. Ferner besaß dieser Extrakt im Plattendiffusionstest eine geringe Hemmwirkung gegen *B. subtilis*, *S. aureus* und *C. albicans*. Als Ziel für einen größeren Kultivierungsansatz wurde ein Metabolit ($R_f = 0.45$) ausgewählt, der im DC eine UV-löschende und mit Ehrlich in der Wärme rot anfärbende

Zone aufwies. Um möglichst auch weitere Metaboliten in ausreichender Menge isolieren zu können, erfolgte die Fermentation im 6 L-Maßstab.

Jedoch konnte das im Screening beobachtete Metabolitenspektrum nicht derart reproduziert werden, dass der anvisierte Metabolit erhalten wurde. Stattdessen fiel als Hauptmetabolit des Stammes WWa183 erneut das bereits zuvor isolierte Streptazolin (**71**) in Ausbeuten von 3.0 mg/L an.

3.7 Diskussion und Ausblick

Wenig Aufmerksamkeit fand bisher die Lebensgemeinschaft von Pflanzen und erfolgreichen Sekundärstoffproduzenten, obwohl deren Anpassung an einen bestimmten Lebensraum für eine ungewöhnliche Spezialisierung und damit einen sehr individuellen Sekundärstoffwechsel sprechen. Erst jetzt wird begonnen, systematische Untersuchungen von Ökosystemen unter Einbeziehung ihrer Mikrohabitate anzustrengen. Systematische Untersuchungen für die Sekundärstoffbildung von ‚begabten‘ Bakterien pflanzlicher Habitate gibt es zur Zeit nur vereinzelt. Es lässt sich nur annehmen, dass viele der isolierten Bodenbakterien auch aus Wurzelbereichen von Pflanzen isoliert wurden; den ökologischen Zusammenhängen wurde jedoch bisher wenig Bedeutung beigemessen.

Der im Rahmen dieser Arbeit verfolgte Ansatz fokussierte deshalb auf die direkte Suche von Sekundärstoffproduzenten in der Mikroumgebung höherer Pflanzen. Da bisher keine solche systematischen Untersuchungen detailliert in der Literatur zu finden sind, wurden Heilpflanzen der Traditionellen Chinesischen Medizin (TCM) ausgewählt, die durch ihre therapeutische Anwendung *a priori* besonders interessant sind (‚ethnobotanischer Ansatz‘).

Da das Konzept der Traditionellen Chinesischen Medizin (TCM) mittlerweile nicht nur als ganzheitliche Heillehre des alten China sondern auch in der westlichen Welt intensiv erforscht und beschrieben wird, findet man es auf verschiedene Weisen ausgelegt. Damit ist nicht sichergestellt, dass alle Pflanzen als Heilkräuter im Sinne der altertümlichen TCM verstanden werden können und in identischer Weise vollständig mit ihren Wirkungen beschrieben sind. Hier liegen unterschiedliche Beschreibungen in der Literatur vor.

Die aus dem pflanzlichen Mikrohabitat isolierten Mikroorganismen-Stämme wurden nach der OSMAC-Methode^[11,12] und dem Verfahren des chemischen und biologischen Screenings in Kultur genommen und auf Sekundärstoffbildung überprüft.

Von den 51 Bakterienstämmen und 20 Pilzen wurde im Rahmen dieser Arbeit bisher etwa die Hälfte einem Screening unterzogen. Sechs der Actinomyceten konnten detailliert untersucht werden. Auffällig war hierbei eine häufige Abweichung der Ergebnisse zwischen chemischen und biologischen Screening. So konnte eine biologische Aktivität teilweise nicht in Verbindung mit einem auffälligen, breiten Metabolitenspektrum gebracht werden. Somit wurde der Schwerpunkt zur Auswahl von Stämmen für eine mögliche Kultivierung im größeren Maßstab auf das chemische Screening gelegt. Ziel war es, zu jedem detektierten Naturstoff möglichst rasch und effektiv die für die chemische Charakterisierung notwendige Menge in Reinform zu isolieren, so dass nur wenige Metaboliten gezielt isoliert werden sollten. Daraus resultierte konsequenterweise eine gewisse Ignorierung der restlichen Metaboliten bei der Wahl der Reinigungsschritte. Die Vielzahl der produzierten Substanzen behinderte jedoch teilweise eine schnelle Reinigung der ausgewählten Metaboliten. Des Weiteren standen zumeist Ausbeute und Auffälligkeit im chemischen Screening in keiner ausgewogenen Relation zueinander. Weitere Metaboliten konnten „nebenbei“ nur selten in ausreichender Ausbeute für eine chemische Charakterisierung isoliert werden. Generell zeigten alle bearbeiteten Stämme unter den eingesetzten Fermentationsbedingungen ein geringes Potential zur Produktion großer Substanzmengen. Dieses Problem könnte jedoch durch Optimierung der Kultivierungsparameter umgangen werden; allerdings stand dies nicht im Fokus der durchgeführten Arbeiten.

Zur Zeit müssen Naturstoffe – wenn man nicht den häufig diskutierten Ansatz eines High-Throughput-Screenings wählt – noch mit einigem Aufwand gereinigt werden, um ausreichende Daten für eine Suche in *AntiBase*^[68] oder dem *Dictionary of Natural Products*^[72] zur Verfügung zu haben. Um eine Re-Isolierung bekannter Sekundärstoffe zu vermeiden, müssten einem breit angelegten „klassischen“ Screening anders konzipierte Datenbanken zugrunde gelegt werden. Hierbei wäre eine HPLC-DAD/MS-gestützte Datenbank denkbar. Allerdings müsste dann das individuell durchgeführte Screening einem standardisierten Konzept weichen, um die erhaltenen Daten überhaupt miteinander vergleichen zu können.

In diesem Zusammenhang wäre ein globaleres Verständnis der produzierten Sekundärstoffe als Fernziel zu betrachten. Neben der reinen Isolierung und Identifizierung sollte auch ihre eigentliche Aufgabe im Wechselspiel zwischen Wirtspflanze und besiedelndem Mikroorganismus hinterfragt werden.

Abschließend lässt sich sagen, dass das chemische Screening an Produzentenstämmen aus bisher nicht bearbeiteten Quellen als Konzept einer modernen Naturstoffforschung verstanden werden kann. Hier können Entscheidungen, auf welchem Weg zu Naturstoffen gelangt werden soll, nach individuellen Gesichtspunkten variiert werden. Des Weiteren stellt vor allem der Einbezug neuer Habitats einen zukunftsweisenden Ansatz dar, welcher bisher wenig verfolgt wurde und somit Fragen der chemischen Ökologie in den Vordergrund rückt.

4 Biosyntheseuntersuchungen an *Streptomyces griseus* 3822-14F

4.1 Bafilomycin A₁ (16) und B₁ (17)

4.1.1 Plecomakrolide – Potente ATPase Inhibitoren mit biosynthetischen Besonderheiten

Die Plecomakrolide – früher auch als Hygrolidine^[129] bezeichnet – sind eine bedeutende Gruppe innerhalb der Naturstoffe. Als strukturelle Gemeinsamkeit weisen sie einen 16- oder 18-gliedrigen Makrolactonring mit vier olefinischen Einheiten auf, welcher über einen C₃-Körper häufig mit einem Tetrahydropyranring oder einer hemiketalen Seitenkette verbrückt ist. Ihre Struktur führte auch zu der Bezeichnung ‚Plecomakrolid‘, was dem griechischen ‚pleco‘ („ich falte“) entstammt.^[130]

Ein Großteil dieser Substanzen ist besonders aufgrund ihrer biologischen Wirkung (z.B. antibakteriell, antifungal, insektizid, immunsuppressiv) von Interesse. Häufig wird diese Aktivität auf eine Besonderheit zurückgeführt: Viele Plecomakrolide besitzen die Eigenschaft, vakuolare ATPasen (V-ATPasen/H⁺-ATPasen) selektiv zu inhibieren.^[131,132] Enzyme dieses Typs sind ubiquitäre Protonenpumpen im Endomembran-System aller eukaryotischen Zellen sowie in der Plasmamembran einiger spezialisierter Zellen (z.B. Nierentubuli oder Osteoclasten).^[133] V-ATPasen arbeiten ausschließlich als ATP-abhängige Ionenpumpen. Ihre Aufgabe liegt in der Regulation der bei Hydrolyse von ATP freiwerdenden Energie, welche über einen an der Zellmembran anliegenden pH-Gradienten gekoppelt ist. Als Folge der so gebildeten Potentialdifferenz können die elektrochemischen Triebkräfte für wichtige Transportprozesse zwischen Cytosol und Zellorganell bzw. Extrazellulärraum genutzt werden.^[134] Aufgebaut sind V-ATPasen aus dem membrangebundenen V_o-Komplex und einem katalytischen, cytosolischen V₁-Komplex. Die Aktivität der V-ATPasen ist u.a. über einen reversiblen Dissoziationsschritt der beiden Komplexe geregelt (s. Abbildung 38).^[135]

Wie bei nahezu jeder Proteinfamilie gibt es auch für die V-ATPasen spezifische Inhibitoren. Bis heute am besten untersucht sind die Plecomakrolide Bafilomycin A₁ (16), Bafilomycin B₁ (17) und Concanamycin A (18), welche bereits in nanomolekularen Konzentrationen (IC₅₀ ≈ 10 nM) zu einer spezifischen Inhibierung von V-ATPasen führen.^[132,136] Dahingegen konnte bei anderen ATPasen (F-Typ, P-Typ) nur eine geringe oder keine Hemmwirkung in Anwesenheit von 16, 17 und 18 festgestellt werden.^[137]

Für mehr als eine Dekade war die Bindungsstelle an der V-ATPase unbekannt. Schließlich wurde in zwei unabhängigen Untersuchungen eine Interaktion der Plecomakrolide mit der c-Untereinheit des V_0 -Komplexes nachgewiesen: In Studien an V-ATPasen aus dem Mitteldarmepithel des Tabakswärmers *Manduca sexta* ist es gelungen, die Bindungstasche von Concanamycin A (**18**) mit Hilfe eines photoaffinitätsmarkierten Derivats zu lokalisieren.^[138] Durch einen Austausch von Aminosäuren innerhalb dieser Untereinheit wurde die Sensitivität der V-ATPasen beim Pilz *Neurospora crassa* gegenüber Bafilomycin A₁ (**16**) drastisch gesenkt.^[139] Hierbei wurden erste Hinweise laut, dass **16** und **18** scheinbar unterschiedliche Bindungstaschen besetzten. Erst kürzlich wurde dieses Bild durch die Kristallstruktur des bakteriellen Na^+ - V_0 -Rings aus *Enterococcus hirae* plastisch untermauert.^[140]

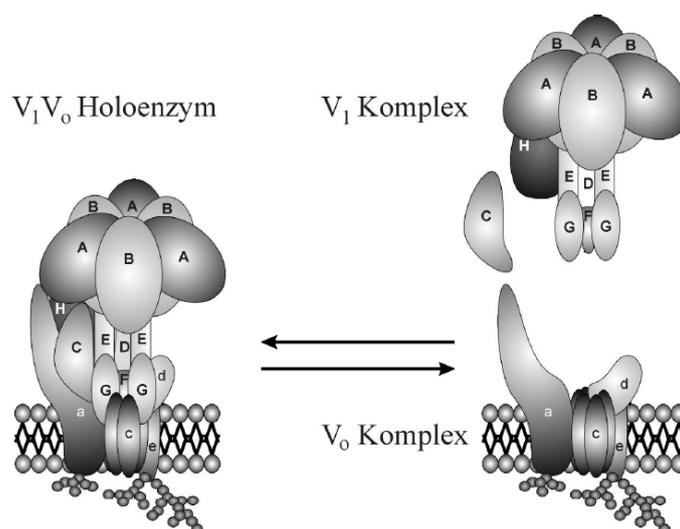


Abbildung 38: Die V-ATPase und ihre reversible Dissoziation in die beiden Subkomplexe V_1 und V_0 . Abbildung entnommen aus [141].

Neben den aktiven Plecomakroliden – zu denen auch das bereits erwähnte Hygrolidin (**75**) sowie Formamicin (**76**)^[142], Virustomycin A (**77**)^[143] oder Elaiophylin (**78**)^[144] zählen – rücken seit kurzem weitere Substanzklassen als V-ATPase Inhibitoren in den Fokus der Forschung. Als Beispiel soll das Makrolacton Archazolid A (**79**)^[145] – isoliert aus den Myxobakterien *Archangium gephyra* und *Cystobacter violaceus* – genannt werden, welches u.a. zu einer Bildung von Vakuolen im Endoplasmatischen Retikulum führt. Diese treten im Zusammenhang mit einer Inhibierung der V-ATPasen auf. **79** zielt ebenfalls auf die c-Untereinheit, besetzt allerdings nicht die gleiche Bindungstasche wie Concanamycin A (**18**), was durch parallele Behandlung der Testzellen mit **79** und **18** festgestellt wurde.^[146]

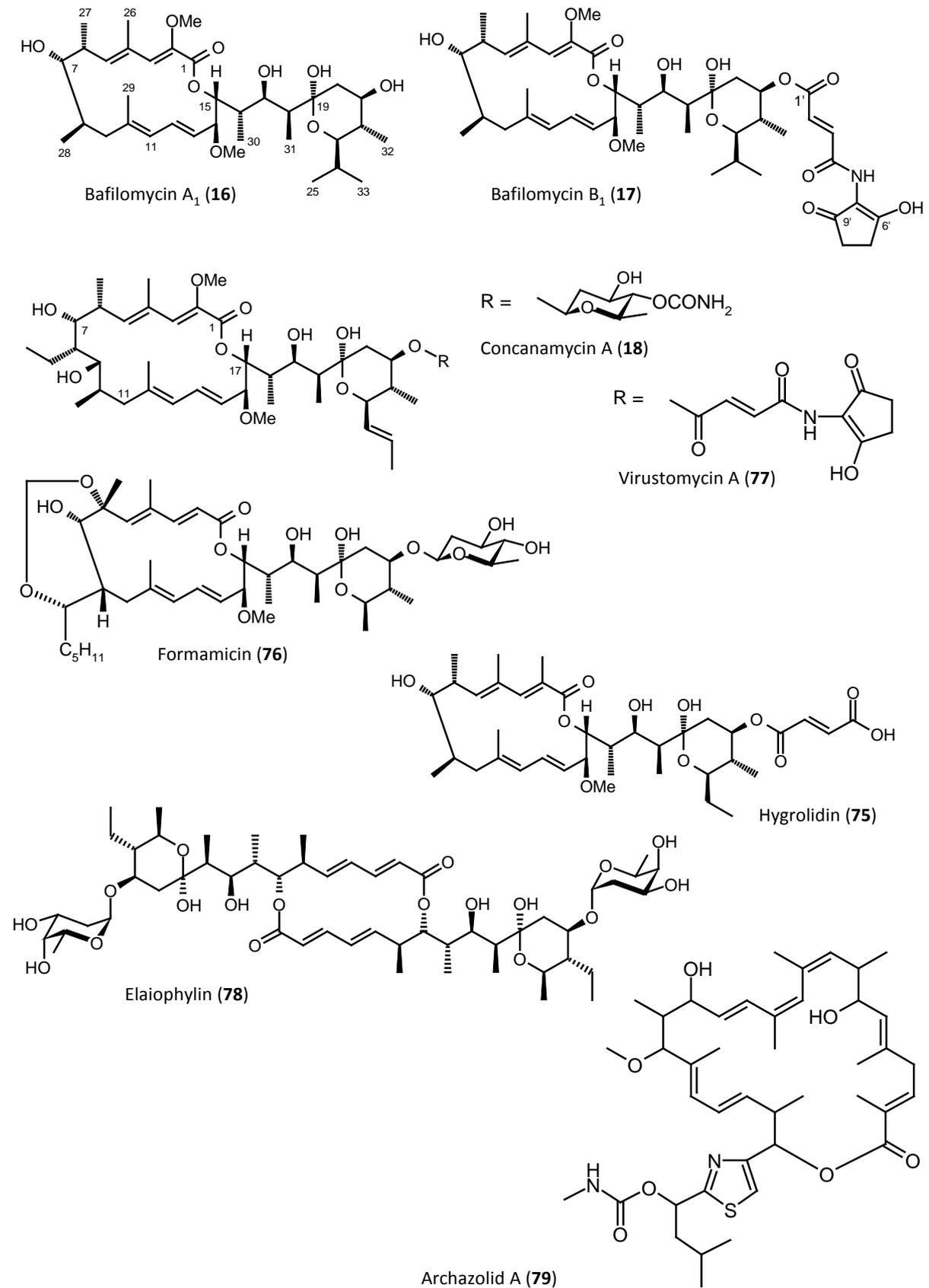


Abbildung 39: Inhibitoren von V-ATPasen: Ausgewählte Plecomakrolide (16-18 und 75-78) sowie das neue Makrolacton Archazolid A (79).

In den letzten Jahren wurde deutlich, dass eine Fehlfunktion der V-ATPasen mit einer immer größer werdenden Anzahl an Krankheiten in Verbindung gebracht werden kann; hierzu zählen u.a. Osteoporose, männliche Unfruchtbarkeit oder Nierenazidose.^[147] Des Weiteren konnten Plasmamembran-ständige V-ATPasen in Tumormetastasen identifiziert werden. Im Vergleich zu den Krebszellen MCF 7, deren Fähigkeit zur Metastasenbildung eher gering ist, exprimieren die invasiven Tumorzelllinien MB231 in großer Zahl V-ATPasen. *In vitro* Assays belegen, dass **16** und **18** gezielt zu einer Inhibierung der MB231-Zellen in der Lage sind, wohingegen MCF 7-Zellen davon weitestgehend unberührt blieben.^[148]

Diese Eigenschaften, zusammen mit einer zusätzlichen antifungalen und antiparasitären Aktivität, machen die Plecomakrolide Bafilomycin (**16, 17**) und Concanamycin (**18**) zu einem vielversprechenden Tool in der Arzneimittelforschung. Einer Anwendung *in vivo* steht jedoch zur Zeit noch ihre hohe Toxizität entgegen. Semi-synthetische Ansätze zur Struktur-Wirkungs-Beziehung, welche hauptsächlich auf **16** zielten, führten bislang zu keinem Gleichgewicht zwischen Aktivität und Verträglichkeit.^[149,150]

Als möglicher Ansatz neben der synthetischen Derivatisierung ist eine Veränderung auf biosynthetischem Weg in Betracht zu ziehen. Hierbei könnten verwandte Makrolide durch Manipulation einzelner Biosyntheseschritte generiert werden („biosynthetic engineering“), beispielsweise mittels Mutasynthese oder kombinatorischer Biosynthese. In einem ersten Schritt muss folglich die Biosynthese dieser Substanzen soweit verstanden sein, dass biochemische Manipulationsversuche überhaupt einen Erfolg erzielen können.

Durch Fütterungsversuche mit ¹³C-markierten Vorläufern konnte die Biosynthese der Bafilomycine A₁ und B₁ (**16, 17**) und des Concanamycins A (**18**) bis heute weitestgehend formuliert werden.^[130,151] Die Grundstrukturen von **16, 17** bzw. **18** mit ihren Acetat- und Propionateinheiten deuten bereits auf einen Aufbau durch eine Polyketidsynthese vom Typ I (PKS I) hin. Diese für PKS vom Typ I kennzeichnenden Kettenverlängerungsschritte ließen sich in den durchgeführten Einbauversuchen bestätigen. Ferner sind zwei weitere Biosyntheseschritte involviert, welche einen bisher unbekanntem Vorläufer mit Ursprung im Kohlenhydratstoffwechsel vermuten ließen. Diese sogenannten „ungewöhnlichen Einheiten“ („unusual extender units“), die auch als „Glykolat- oder Glycerat-Einheiten“^[152] bezeichnet werden, liegen in den Metaboliten **16, 17** und **18** als methoxylierte C₂-Einheiten vor. Diese „ungewöhnlichen Einheiten“ sind keineswegs eine Besonderheit nur der Bafilomycine und

Concanamycine; in den mikrobiellen Sekundärstoffen Leucomycin (**80**)^[153], Geldanamycin (**81**)^[154], Soraphen (**82**)^[155], Ansamitocin P-3 (**83**)^[152], FK520 (**84**)^[156], Tautomycin (**85**)^[157] sowie Oxazolomycin (**86**)^[158] können derartige C₂-Einheiten ebenfalls vorgefunden werden. Versuche mit ¹³C-markiertem D- und L-Glycerat sowie Glykolat führten zu Anreicherungen in den betreffenden ‚extender units‘ von **81**, was konträr für **80** und **18** nicht bestätigt wurde. Vielmehr konnte durch Fütterungsversuche für **16**, **17** und **18** Glycerin als biosynthetischer Vorläufer dieser C₂-Einheiten angenommen werden (s. Kapitel 4.1.2).^[151] Aufgrund des immer wieder beobachteten Vorkommens derartiger ‚extender units‘ kann für ihre Biosynthese ein relativ allgemeingültiges Prinzip postuliert werden. Deren Verständnis wäre ein weiterer „Schlüssel“ zum Aufbau modifizierter Sekundärmetaboliten bzw. Plecomakrolide im Rahmen eines ‚biosynthetic engineering‘.

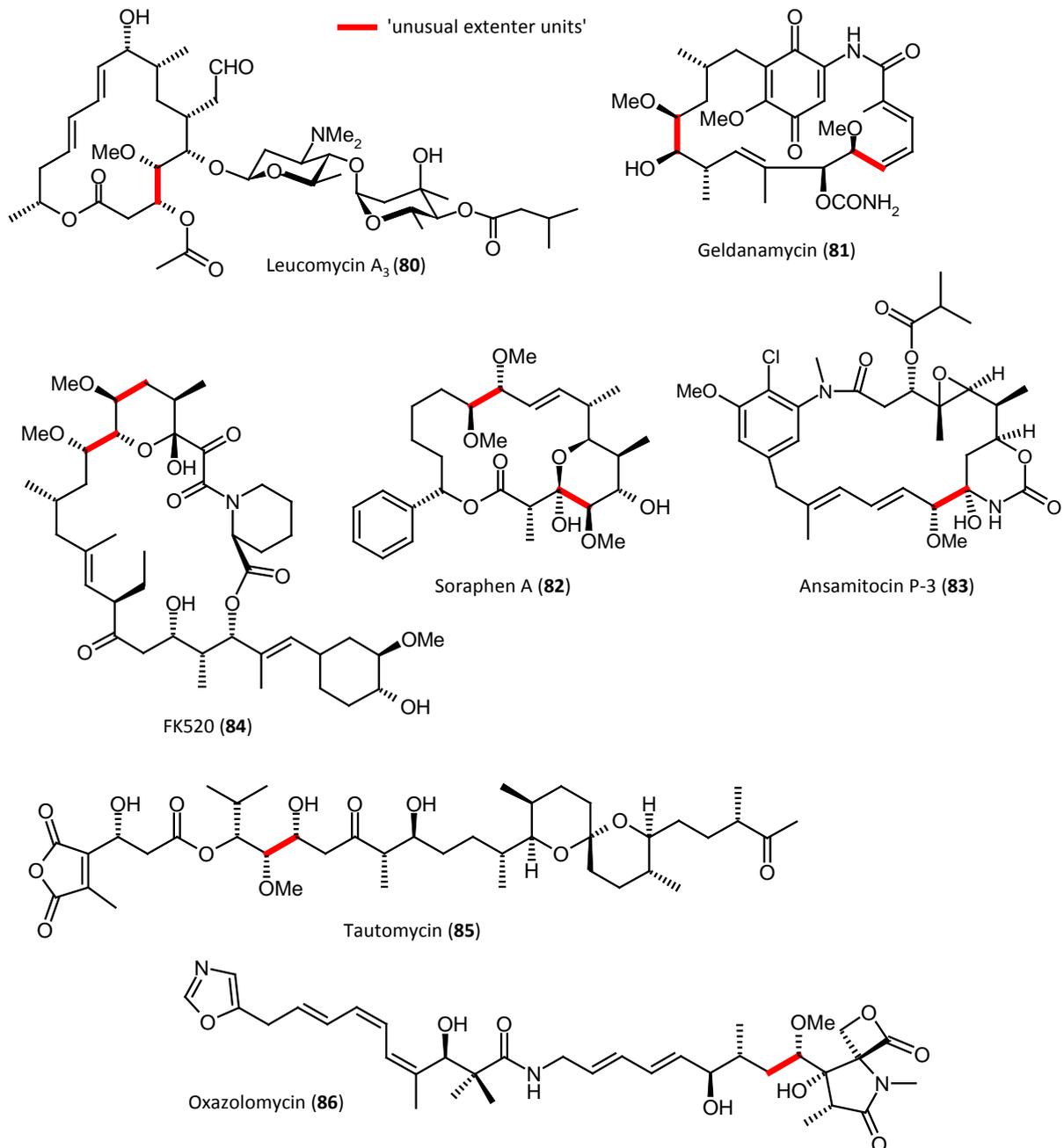


Abbildung 40: Mikrobielle Sekundärstoffe mit ‚ungewöhnlichen C₂-Einheiten‘ (‚unusual extender units‘).

4.1.2 Bisherige Untersuchungen zur Biosynthese der Bafilomycine

Die makrolidischen Antibiotika Bafilomycin A₁ (16) und B₁ (17) sowie vier weitere Derivate wurden erstmals 1983 von WERNER, HAGENMAIER *et al.* aus Kulturen von *Streptomyces griseus* ssp. *sulphurus* isoliert.^[159] Vier Jahre später konnte die Struktur mittels röntgenographischer Untersuchungen abgesichert werden.^[160]

T. SCHUHMANN gelang es, im Rahmen seiner Dissertation die wesentlichen Schritte der Biosynthese von **16** und **17** durch Einbauversuche zu belegen.^[40,151] Fütterungen von [$1-^{13}\text{C}$]- und [$1,2-^{13}\text{C}_2$]Acetat sowie [$3-^{13}\text{C}$]Propionat und [$1-^{13}\text{C}$]Isobutyrat identifizierten eine PKS I-vermittelte Biosynthese der Bafilomycine, wobei Isobutyrat die Startereinheit darstellt (s. Abbildung 41). Zusätzlich wurde gezeigt, dass Succinat und 5-Aminolävulinsäure wesentliche Bausteine der Seitenkette von **17** sind.

Eine mögliche Quelle der ‚ungewöhnlichen C₂-Einheiten‘ wurde in Glycerin gesehen, welches ([U- $^{13}\text{C}_3$]-markiert) bei Fütterungsversuchen zu einem dortigen Einbau führte. Fortführende Untersuchungen zum biosynthetischen Ursprung der methoxylierten C₂-Bausteine werden im Rahmen dieser Arbeit beschrieben.

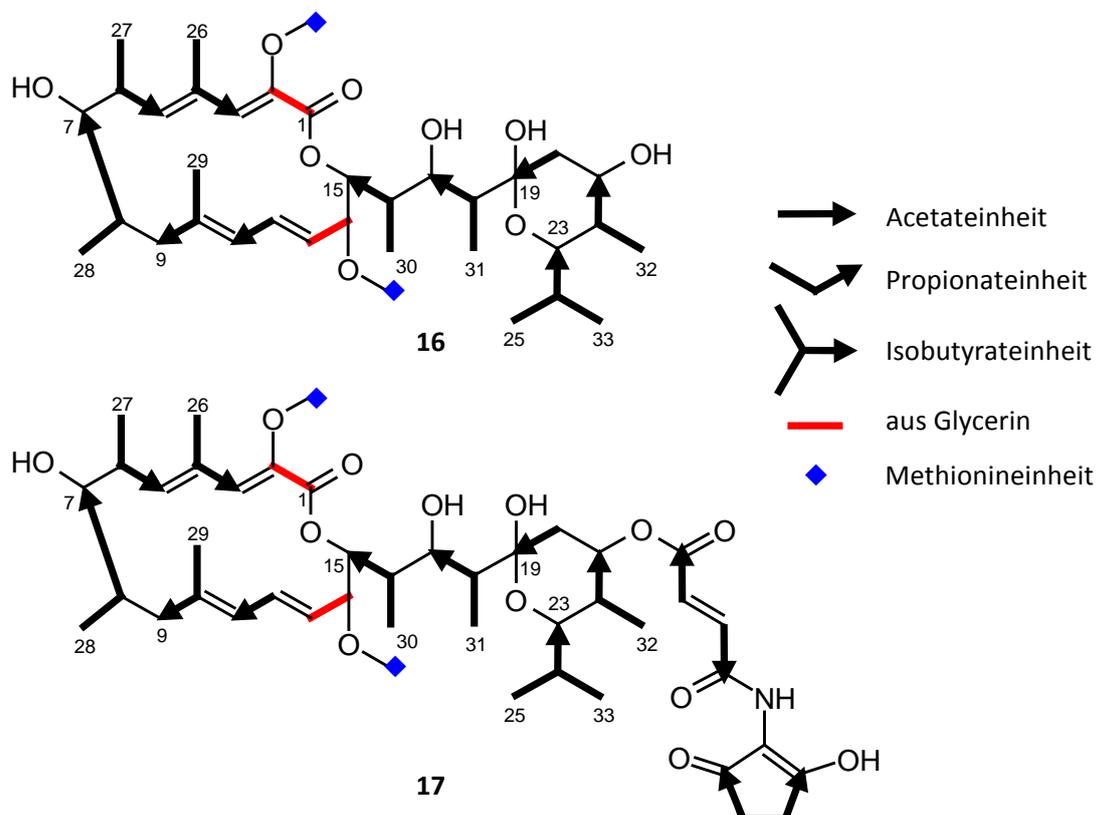


Abbildung 41: Durch Einbaustudien bestätigtes Biosyntheschema von Bafilomycin A₁ (**16**) und B₁ (**17**).^[40,151] Farbige markierte Einheiten sind detailliert in dieser Arbeit besprochen.

Weiterführende Einbaustudien am strukturell verwandten Concanamycin A (**18**) mit 2-Hydroxy- und 2-Methoxy-[$1-^{13}\text{C}$]malonyl-SNAC-estern führten zu keinen Anreicherungen der C₂-Einheiten, weshalb Hydroxymalonyl- bzw. Methoxymalonyl-CoA als direkte Vorläufer ausgeschlossen wurden.

Durch Sequenzierung des Biosynthese-genclusters von Concanamycin A (**18**)^[161] konnten fünf Gene der Bildung eines Methoxymalonyl-Bausteins zugeordnet werden, die Ähnlichkeit zum Gencluster des Makrolids FK520 (**84**) zeigen (s. Abbildung 42). Erst kürzlich wurden Biosynthesegene des Phosphatase-Inhibitors Tautomycin (**85**) aus *Streptomyces spiroverticillatus* sequenziert und die Funktionen ihrer Expressionsprodukte zugeordnet.^[162] Mittels phylogenetischer Analyse konnte auch für **85** ein Subcluster aus fünf Genen – *ttmABCDE* – der Bildung eines Methoxymalonyl-Bausteins zugeordnet werden. Ebenso wie Concanamycin (**18**) weist **85** die ‚ungewöhnliche C₂-Einheit‘ auf, was eine biosynthetische Analogie auf genetischer Ebene zusätzlich bestätigt.

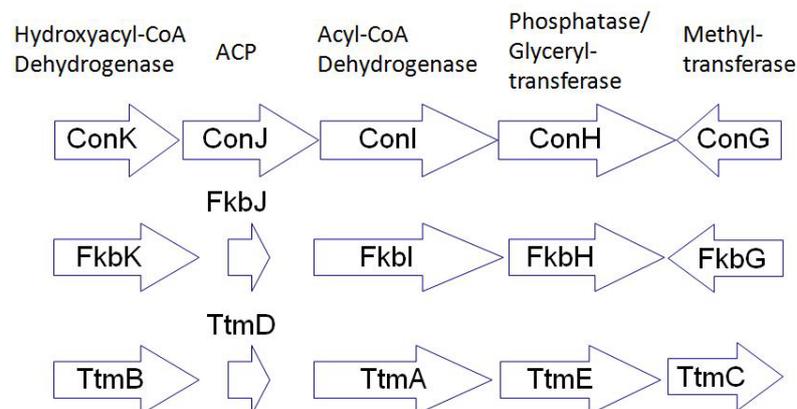


Abbildung 42: Vermutete Analogie der putativen Biosynthese-Gene von Concanamycin A (**18**), FK520 (**84**) und Tautomycin (**85**), welche an der Biosynthese einer Methoxymalonyl-Einheit beteiligt sind.^[156,161,162]

REEVES *et al.*^[156] sowie FLOSS *et al.*^[163] postulierten einen möglichen Weg für die Bildung eines solchen Methoxymalonyl-Bausteins, welcher im Einklang mit den ermittelten Genfunktionen steht (s. Abbildung 43). Hierbei erfolgt die Biosynthese über ein an das Acyl-Carrier-Protein (ACP) gebundenes Intermediat, welches nach Oxidation und Methylierung als Methoxymalonyl-ACP (**87**) vorliegt.

Glycerin kommt durch die erfolgreichen Einbauversuche als möglicher Vorläufer der ‚ungewöhnlichen Einheiten‘ in Betracht. Dies konnte analog für die Bafilomycine (**16**, **17**) und Concanamycin A (**18**) gezeigt werden, was im Einklang mit Studien an den ebenfalls ‚ungewöhnlich methoxylierten‘ Ansamitocin P-3 (**83**), Soraphen A (**82**)^[164] bzw. FK520 (**84**)^[165] steht. T. SCHUHMANN formulierte auf Grundlage dieser Ergebnisse für **18** eine Biosynthese der ‚ungewöhnlichen Einheiten‘: Glycerin ist hier die Quelle des

Methoxymalonyl-ACP (**87**), welches auf die ACP-Domäne des entsprechenden PKS-Moduls der Polyketidsynthese vom Typ I übertragen wird, wo die weitere Biosynthese von **18** stattfindet.^[40] Diese Hypothese wird in dieser Arbeit für die Bafilomycine (**16**, **17**) diskutiert.

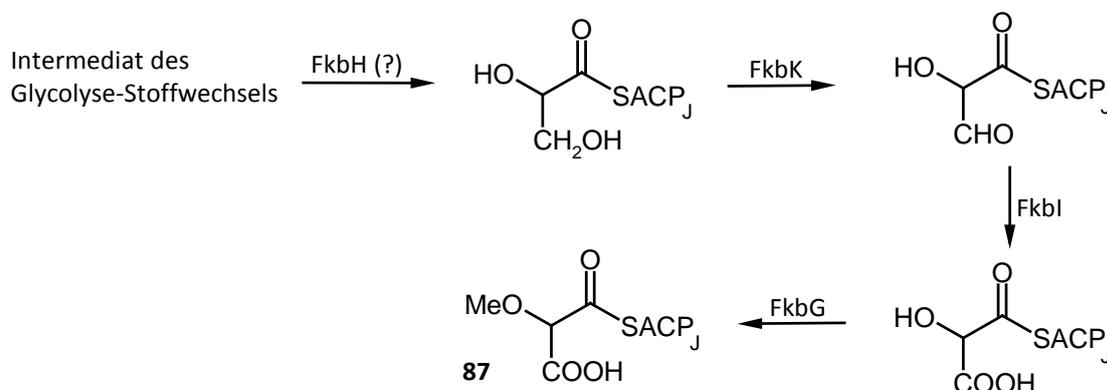


Abbildung 43: Postulierte Bildung von Methoxymalonyl-ACP (**87**) in *Streptomyces hygroscopicus* während der Biosynthese von Fk520 (**84**) nach REEVES *et al.*^[156]

4.1.3 Fütterungsexperimente

Als Produzentenstamm der Bafilomycine (**16**, **17**) kam *Streptomyces griseus* Gö 3822-14F zum Einsatz, der bereits von H. B. BODE im Rahmen eines chemischen Screenings als talentierter Produzent eingestuft wurde.^[166] Um die erzielten Ergebnisse in Relation zu den bereits vorliegenden Daten setzen zu können, orientierten sich Kultivierung und Aufarbeitung an den von T. SCHUHMANN optimierten Parametern.^[40] Eine hohe Ausbeute an **16** und **17** ist gewöhnlich bei Kultivierung in SM-Medium zu erwarten. Da dieses komplexe, fetthaltige Medium eine umfangreiche chromatographische Aufreinigung mit sich bringt, fand das synthetische Medium NL 1358f Verwendung in den Fütterungsversuchen. Diese wurden im 500 mL-Maßstab durchgeführt und die (markierten) Vorläufer mit Hilfe einer Schlauchdosierpumpe kontinuierlich zugeführt. Der Fütterungszeitraum richtete sich nach den verwendeten Vorläufern.

Die Aufarbeitung und Isolierung der Metaboliten ist in den Kapiteln 9.2 und 9.5 beschrieben, wobei darauf geachtet wurde, dass die Bafilomycine aufgrund ihrer Empfindlichkeit nicht an Methanol exponiert wurden. Aus den 500 mL-Ansätzen konnten nach Chromatographie an Kieselgel (Cyclohexan/Aceton 3:2) und Sephadex LH-20 (Aceton) jeweils 1-3 mg an **16** sowie 7-10 mg an **17** aus dem Kulturfiltrat erhalten werden.

4.1.3.1 Fütterung von [Methyl-¹³C]Methionin

Als Ausgangspunkt dieser Arbeiten wurde an die letzten Untersuchungen von T. SCHUHMANN angeknüpft. Daher stand in einem ersten Fütterungsversuch die Reproduzierbarkeit und Validierung mit dem hier verwendeten Produzentenstamm im Vordergrund.

Zu diesem Zweck erfolgte ein erster Einbauversuch mit 1.2 mM [Methyl-¹³C]L-Methionin, welches in diversen Biosynthesen als Methylgruppen-Überträger fungiert. Die Fütterung erfolgte von der 32.-56. Inkubationsstunde, wobei der Erntezeitpunkt in der 70. Stunde lag.

Die Zugabe von Methionin zum Produzentenstamm führte zu dem erwarteten Einbau in die Methoxy-Kohlenstoffatome an C-2 bzw. C-14 der ‚ungewöhnlichen C₂-Einheiten‘ in **16** und **17**. Somit konnte Methionin als Quelle dieser Methoxygruppen bestätigt werden, was im Einklang mit den bereits vorliegenden Ergebnissen steht.^[40]

4.1.3.2 Fütterung von (2R)-[1,2-¹³C₂]Glycerin (**88**) und (2S)-[1,2-¹³C₂]Glycerin (**89**)

Als mögliche Quelle der ‚ungewöhnlichen C₂-Einheiten‘ kommt Glycerin in Betracht, da dieses zu einer starken Anreicherung der betreffenden Kohlenstoffatome C-1/C-2 bzw. C-13/C-14 von **16** und **17** führte.^[40] Von besonderem Interesse ist folglich, welche zwei Kohlenstoffatome des C₃-Körpers ‚Glycerin‘ zur Markierung der C₂-Einheit führten und welches die beteiligten Intermediate auf dem Weg zu den methoxylierten Einheiten sind.

Hierzu wurde die Eigenschaft des Enzyms Glycerin-Kinase genutzt, welches Glycerin unter ATP-Verbrauch ausschließlich zu L-Glycerin-3-phosphat (**G3P**) umsetzt. Dadurch kann das prochirale Molekül Glycerin durch die Einführung von jeweils zwei benachbarten ¹³C-Markierungen in seine enantiomeren Formen überführt werden. In Bezug auf die Markierung im Molekül kann (2S)-[1,2-¹³C₂]Glycerin (**89**) nach IUPAC auch als [1,2-¹³C₂]-*sn*-Glycerin (**89**) bezeichnet werden, wobei ‚*sn*‘ für ‚*stereospecific numbering*‘ steht. Konsequenterweise entspricht das (2R)-[1,2-¹³C₂]Glycerin (**88**) dem [2,3-¹³C₂]-*sn*-Glycerin (**88**). Durch die ¹³C-Isotopenmarkierung und nach Umwandlung durch Glycerin-Kinase liegen nun chirale Moleküle vor: [1,2-¹³C₂]-*sn*-Glycerin-3-phosphat (**90**) bzw. [2,3-¹³C₂]-*sn*-Glycerin-3-phosphat (**91**) (vgl. Abbildung 44).

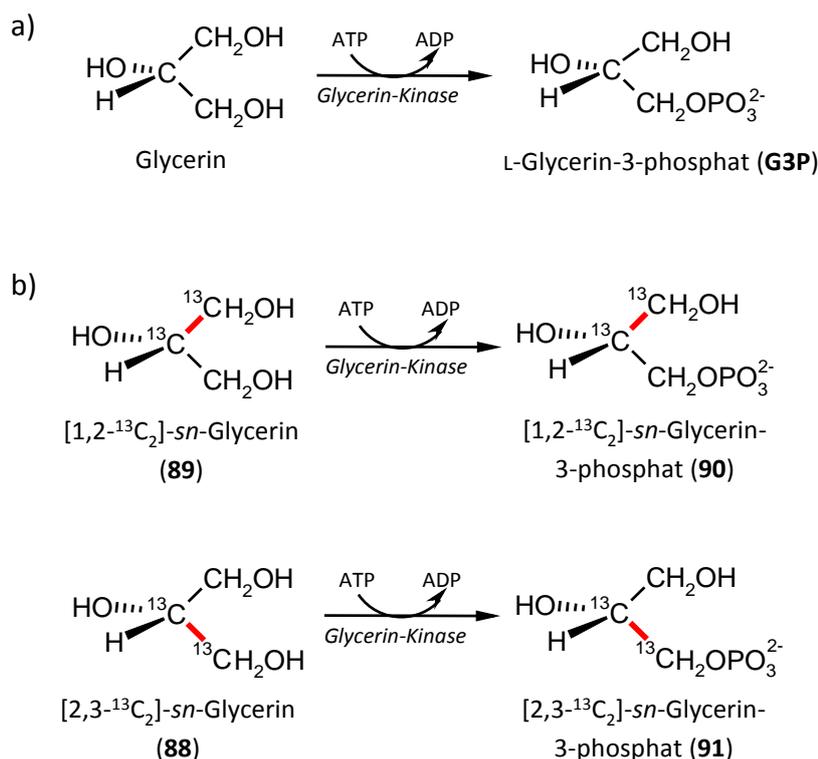


Abbildung 44: Stereospezifität der Glycerin-Kinase: a) Glycerin wird ausschließlich in L-Glycerin-3-phosphat (**G3P**) umgewandelt; b) Stereoselektiv markierte Glycerin-Enantiomere (**88**, **89**) und ihre Produkte.

Sollte Glycerin-Kinase tatsächlich an der Biosynthese des ‚ungewöhnlichen C₂-Bausteins‘ beteiligt sein, dürfte nur Zufütterung von einem der beiden *sn*-Glycerine (**88**, **89**) zu einer intakten, angereicherten C₂-Einheit in den Bafilomycinen (**16**, **17**) führen.

Zu diesem Zweck wurden **89** und **88** in separaten Ansätzen von der 30.-42. Inkubationsstunde dem Stamm Gö 3822-14F zugeführt. Die Zugabe der Vorläufer begann in diesem Fall etwas früher, um ein Einschleusen von Glycerin in den Intermediärstoffwechsel zu verringern. Ebenfalls wurde der Erntezeitpunkt auf die 56. Stunde ‚vorverlegt‘. Das zu fütternde Glycerin (0.8 mM) wurde mit etwa der doppelten Menge an unmarkiertem Glycerin (2 mM) verdünnt; hierdurch sollte der Entstehung statistischer Kopplungen entgegengewirkt werden, die aus einem Einbau intakter ¹³C₂-Einheiten in benachbarte Positionen resultieren können.

Die ¹³C-NMR-Spektren der isolierten Bafilomycine (**16**, **17**) zeigten starke ¹³C-¹³C-Kopplungen zwischen C-1/C-2 und C-13/C-14 nur nach Fütterung von **89**, welche auf einen intakten Einbau schließen ließen. Im Unterschied dazu konnten nach Zugabe von **88** nur Einzelanreicherungen von C-2 und C-14 in den methoxylierten Einheiten beobachtet werden (s. Abbildung 45). Ferner führte der Einsatz von **88** als Vorläufer zu starken Kopplungen in

den Acetat- und Isobutyrat-Einheiten von **16** und **17**. Außerdem konnten sehr schwache Kopplungssignale im ^{13}C -NMR für die Atome C-19/C-20 und C-24/C-33 sowie C-1'/C-2' (bei **17**) ausgemacht werden. Diese sind vermutlich auf den geringen Anteil an *R*-Enantiomer im Vorläufer **89** zurückzuführen (s. Kapitel 4.1.4).

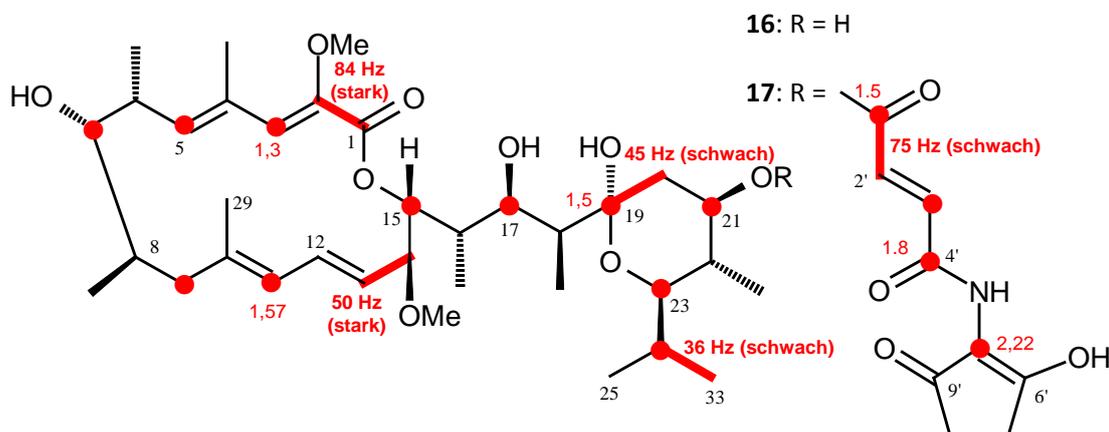


Abbildung 45: Beobachteter Einbau in **16** und **17** nach Fütterung von $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ -*sn*-Glycerin (**89**). Kopplungskonstanten sind für intakte Einheiten angegeben. Ausgewählte Einzelanreicherungen wurden durch Referenzierung auf 2-OMe sowie 14-OMe berechnet.

Da Glycerin in unterschiedlichsten Biosynthesewegen verstoffwechselt wird, war die Referenzierung zur Bestimmung der Einbaurate^[228] auf wenige Kohlenstoffatome beschränkt. Für die Fütterung von (2*S*)- $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ Glycerin (**89**) wurden die C-Atome der Methoxygruppen an C-2 und C-14 als Referenz gewählt, wobei hier kein Einbau von Glycerin durch Verstoffwechslung zu Methionin zu erwarten sein sollte.^[167] Dazu im Gegensatz führte die Verwendung von (2*R*)- $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ Glycerin (**88**) sehr wohl zu einer Markierung von 2-OCH₃ bzw. 14-OCH₃, da Glycerin über Serin signifikant in Methionin eingebaut wird. Deshalb wurden in diesem Fall C-1 und C-13 für die Referenzierung herangezogen.

Das Kulturfiltrat der Glycerinfütterungen zeigte im Dünnschichtchromatogramm neben den bekannten Metaboliten eine weitere, im Vergleich zu **16/17** relativ unpolare Zone mit auffälliger UV-Löschung bei 254 nm. Diese war in allen anderen Fermentationen des Stammes Gö 3822-14F nicht aufgetreten. Eine ausführliche Untersuchung und Diskussion des zugehörigen Metaboliten (**19**) ist in Kapitel 4.2 beschrieben.

4.1.3.3 Fütterung von (2R)-[1,2-¹³C₂]Glycerat (**92**) und (2S)-[1,2-¹³C₂]Glycerat (**93**)

In der Literatur beschriebene Einbauversuche mit [1-¹³C]Glycerat an Geldanamycin (**81**)^[154] sowie mit (2R)-[1,2-¹³C₂]Glycerat (D-[1,2-¹³C₂]Glycerat) (**92**) an Soraphen A (**82**) aus *Sorangium cellulosum*^[164] führten zu einer Markierung der in diesen Molekülen enthaltenen ‚ungewöhnlichen Einheiten‘. Geht man von einem Intermediat der Glycolyse aus, welches zu Methoxymalonyl-APC (**87**) führt, so stellt sich an dieser Stelle die Frage, ob dieses einzig aus Glycerin hervorgeht oder – wie im Fall von **81** oder **82** – ebenfalls über Glycerat in den Stoffwechsel gelangen kann. Dazu im Gegensatz stehen jedoch Fütterungsversuche mit Glycerat am Produzenten von Leucomycin (**80**); hier konnte kein Einbau von Glycerat nachgewiesen werden.^[153]

Glycerat könnte über eine aktivierte 3-Phosphat-Spezies den Weg in die Glycolyse (und damit in **87**) finden; oder es hat eine direkte Aktivierung zum Thioester an der C-1 Carboxylgruppe des Glycerats stattgefunden, ohne dass zuvor die Glycolyse durchlaufen wurde. Fütterung von Glycerat zum Bafilomycin-Produzenten sollte die Frage beantworten, ob Glycerat als solches zu einem Einbau in die ‚methoxylierten Einheiten‘ von **16** bzw. **17** führen kann und damit direkt in einen der Biosyntheseschritte von **87** eingeschleust wurde. Ist dieses der Fall, so müssten unterschiedlich stereospezifisch markierte Glycerate zu abweichenden Einbaumustern in **16** und **17** führen, wie es bereits bei der Glycerin-Fütterung festzustellen war.

In einem Vorversuch wurden Fütterungsexperimente mit unmarkiertem D- bzw. L-Glycerat (je 4.2 mM) am Stamm Gö 3822-14F durchgeführt, um den Einfluss dieser Vorläufer auf die Produktion von **16** bzw. **17** zu überprüfen. Da hierbei weder ein Rückgang noch eine signifikante Steigerung der Produktion beobachtet wurden, erfolgte die Fütterung von jeweils 3.9 mM (2R)-[1,2-¹³C₂]Glycerat (**92**) bzw. (2S)-[1,2-¹³C₂]Glycerat (**93**) zum Produzentenstamm. Dieses wurde von H. G. Floss (University of Washington, Seattle/USA) synthetisiert^[164] und zur Verfügung gestellt.^{vii}

Die aufgenommenen ¹³C-NMR-Spektren nach Fütterung von **92** bzw. **93** ließen jedoch weder Einzelanreicherungen noch Kopplungsmuster erkennen. Somit korrelieren diese Ergebnisse mit den für **80** durchgeführten Fütterungen. Hiermit wird deutlich, dass Glycerat als direkter

^{vii} An dieser Stelle danke ich H. G. Floss für die Bereitstellung ausreichender Mengen der stereospezifisch markierten Glycerate.

Vorläufer während der Makrolidproduktion nicht verwertet werden kann. Ob dieses mit der Substratspezifität der an der Biosynthese von **87** beteiligten Enzyme zusammenhängt oder ob sowohl im Bafilomycin- als auch Leucomycin-Produzenten das Enzym Phosphoglycerat-Kinase in seiner Funktion zumindest teilweise deaktiviert ist, kann auf Grundlage der vorliegenden Ergebnissen nicht beantwortet werden.

Tabelle 10: Spezifischer Einbau (sp. Einb.) von (2R)-[1,2-¹³C₂]Glycerat (**92**) und (2S)-[1,2-¹³C₂]Glycerat (**93**) für Bafilomycin A (**16**). Die Referenzierung erfolgte auf den Durchschnittswert der Intensitäten von 2-OMe und 14-OMe.

Position	[ppm]	sp. Einb. 92	sp. Einb. 93	Position	[ppm]	sp. Einb. 92	sp. Einb. 93
1	167,6	-0,65	-0,26	14	82,6	-0,61	0,01
2	141,4	-0,72	-0,26	14-OMe	55,7	-0,63	0,05
2-OMe	60,1	-0,67	-0,06	15	77	-0,61	-0,08
3	133,9	-0,75	-0,29	16	37,5	-0,64	-0,08
4	133,1	-0,63	-0,41	16-Me	9,8	-0,66	-0,20
4-Me	14	-0,63	-0,15	17	71	-0,53	0,16
5	143,5	-0,69	-0,36	18	42,3	-0,62	0,00
6	37	-0,57	-0,05	18-Me	7,1	-0,70	-0,19
6-Me	17,3	-0,63	-0,16	19	99,3	-0,60	-0,25
7	81,1	-0,66	-0,07	20	43,8	-0,58	-0,06
8	41,4	-0,56	0,01	21	70,9	-0,58	-0,04
8-Me	21,70	-0,59	-0,01	22	40,4	-0,64	-0,15
9	41,5	-0,62	-0,13	22-Me	12,1	-0,58	-0,03
10	143,6	-0,72	-0,30	23	76,1	-0,64	-0,04
10-Me	20,1	-0,64	-0,29	24	28,2	-0,59	-0,01
11	125,3	-0,68	-0,35	25	21,3	-0,64	-0,19
12	133,5	-0,65	-0,28	26	14,3	-0,59	-0,09
13	127,1	-0,65	-0,20				

4.1.4 Diskussion der Biosyntheseexperimente

Der Einbau ausschließlich des (2S)-Enantiomers **89** in beide Kohlenstoffatome der ‚methoxylierten C₂-Einheiten‘ steht im Einklang mit den für eine Beteiligung von Glycerin-Kinase erwarteten Ergebnissen. Hiermit wird deutlich, dass nur C-1/C-2 des *sn*-Glycerins für die Bildung der ‚extender units‘ verwendet werden, wohingegen C-3 – welches durch Glycerin-Kinase phosphoryliert wird – während der Biosynthese verlorengeht.

Um in den Stoffwechsel einzugehen, muss Glycerat durch eine vergleichbare Kinase-vermittelte Reaktion phosphoryliert werden. Die Substratspezifität ist in diesem Fall so ausgeprägt, dass normalerweise nur D-Glycerate durch diese Kinasen umgesetzt werden (vgl. [164]). Jedoch konnte im Rahmen dieser Arbeit für den Bafilomycin-Produzenten *S. griseus* eindeutig gezeigt werden, dass eine solche Kinase-Aktivität nicht vorhanden bzw. abgeschwächt zu sein scheint.

In Anlehnung an die bereits auf genetischer Ebene und für Concanamycin A gemachten Beobachtungen kann die Biosynthese der ‚ungewöhnlichen Einheiten‘ wie folgt formuliert werden: Im Primärmetabolismus wird Glycerin durch Glycerin-Kinase ausschließlich zu L-Glycerin-3-phosphat (**G3P**) verstoffwechselt, welches dann *via* 3-Phospho-D-glycerat (**3PG**) zu 1,3-Bisphospho-D-glycerat (**BPG**) umgesetzt wird. Dieses tritt nun in den Sekundärstoffwechsel ein und wird, ACP-gebunden, dephosphoryliert. Zwei weitere Oxidationsschritte und anschließende oder zwischenzeitliche Methylierung führen zu Methoxymalonyl-ACP (**87**) (s. Abbildung 46). Hier liegt nun der Verknüpfungspunkt zur Bafilomycin-Biosynthese, welche PKS I-vermittelt die Plecomakrolide **16** bzw. **17** ergibt.

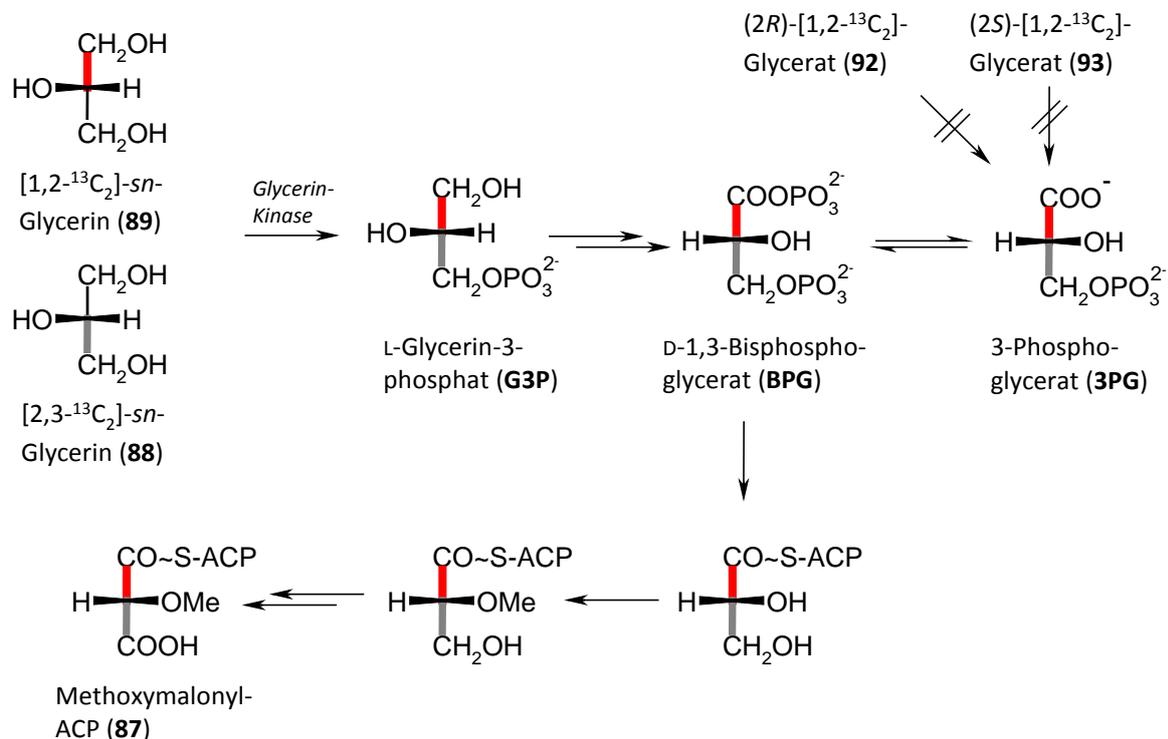


Abbildung 46: Hypothese zur Biosynthese von Methoxymalonyl-ACP (**87**), welches als Vorläufer der ‚extender units‘ in den Bafilomycine (**16,17**) vermutet wird. Rot dargestellt sind Markierungen, welche als intakte Einheit in **16** und **17** zu finden sind.

Der Einbau intakter Einheiten von $[2,3-^{13}\text{C}_2]$ -*sn*-Glycerin (**88**) in alle Acetat-Bausteine der Bafilomycine kann ebenfalls anhand des Metabolismus von **88** in der Glycolyse erklärt werden. Dieser führt über Pyruvat (**94**), als eigentliches Endprodukt der Glycolyse, durch das Enzym Pyruvat-Dehydrogenase zu Acetyl-CoA (**95**).^[167] Der gleiche Stoffwechselweg führt analog auch für $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ -*sn*-Glycerin (**89**) zu **95**; im Unterschied zum (2*R*)-Enantiomer trägt **95** hierbei nur eine ^{13}C -Markierung, welche im ^{13}C -NMR als Einzelanreicherung in den Acetat-Einheiten detektierbar war (s. Abbildung 47).

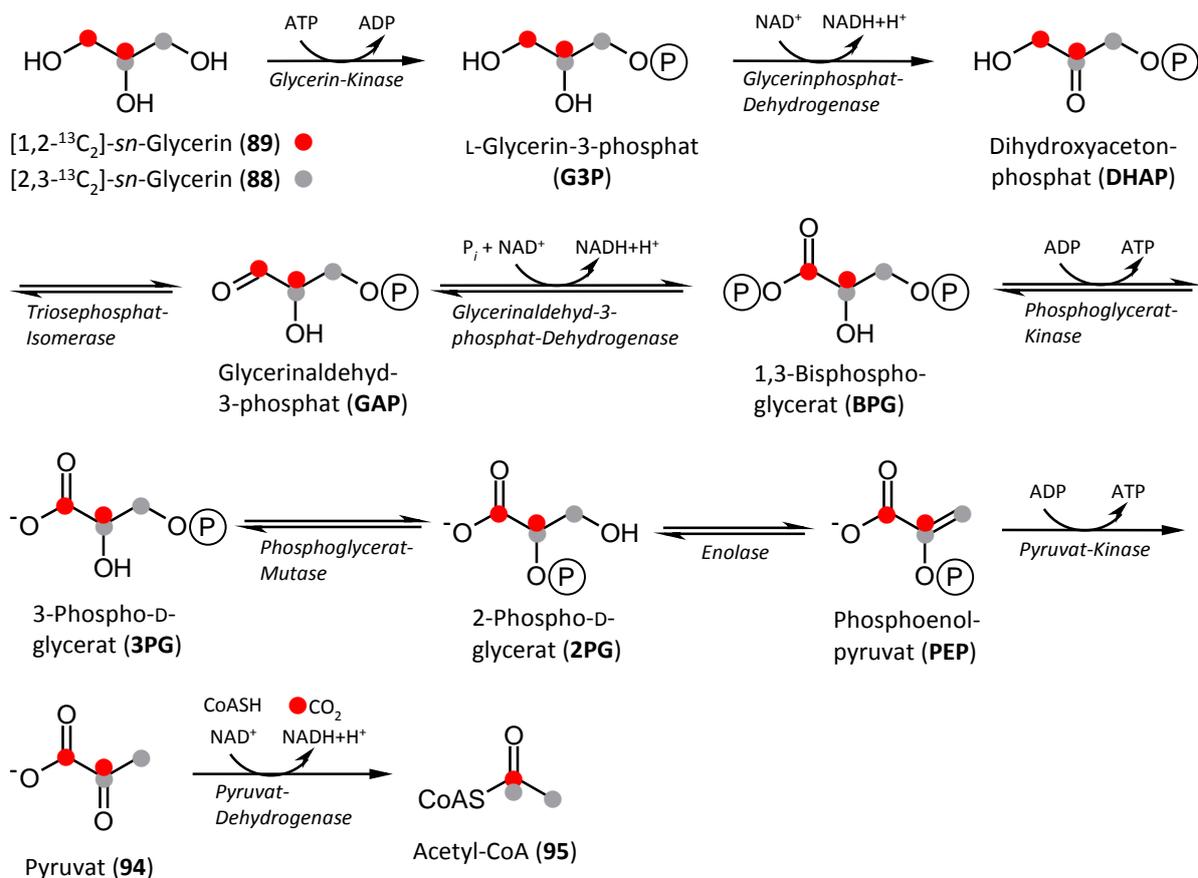


Abbildung 47: Biosynthetische Umwandlung der stereoselektiv markierten Glycerine (**88**, **89**) zu Acetyl-Co (**95**) und resultierendes ^{13}C -Markierungsmuster. Nur die Fütterung von **88** führt zu einer intakten C_2 -Einheit in **95**.

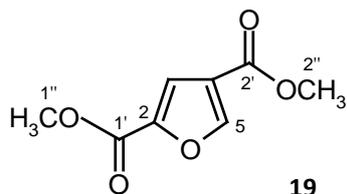
Die Anreicherung von C-24/C-33 als Bestandteil der Isobutyryl-Einheit kann ebenfalls über Pyruvat (**94**) als Zwischenstufe erklärt werden.^[167] Das hieraus in Zuge des Valin-Anabolismus gebildete α -Ketoisovalerat kann unter dem katalytischen Einfluss der Verzweigt-kettigen- α -Ketosäure-Dehydrogenase in Isobutyryl-CoA überführt werden.

4.2 2,4-Dimethoxycarbonylfuran (19)

4.2.1 Fermentation und Isolierung von 2,4-Dimethoxycarbonylfuran (19)

Einzig im Kulturfiltrat aus den Fütterungsversuchen mit ^{13}C -markiertem Glycerin zeigte sich im Dünnschichtchromatogramm eine zusätzliche UV-löschende (254 nm) Zone, welche unter den normalen Fermentationsbedingungen nicht detektiert werden konnte. Konzentriert kam es mit Anisaldehyd in der Wärme zu einer blassrosa Farbreaktion. Hierbei erfolgte eine Kultivierung in dem Glycerin-freiem Medium NL 1358f, wobei Glycerin von der 30.-42. Inkubationsstunde kontinuierlich dem Produzentenstamm zugeführt wurde. Die Aufreinigung erfolgte analog zu den Bafilomycinen (**16,17**); nach einem ersten Chromatographie-Schritt an Kieselgel (Cyclohexan/Aceton 3:2) konnte **19** mittels Gelchromatographie an Sephadex LH-20 (Eluent: Aceton) als weißer Feststoff in einer Ausbeute von 1.5 mg/L gewonnen werden.

Im EI-Massenspektrum zeigte **19** ein Ion höchster Masse bei $m/z = 184$, woraus sich in einer hochauflösenden Messung die Summenformel $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_5$ bestimmen ließ. Das ^1H -NMR-Spektrum weist vier Signale auf, wobei jeweils zwei von ihnen eine vergleichbare chemische Verschiebung und Intensität besitzen. Die Signale bei $\delta_{\text{H}} = 7.42$ und 8.11 , denen aufgrund ihrer Intensität je ein Protonen zugeordnet wurde, deuten auf aromatische Wasserstoffe. Es konnte kein Kopplungsmuster ausgemacht werden, was auf eine voneinander „isolierte“ Lage im Molekül schließen lässt. Ferner finden sich im Hochfeldbereich des Spektrums zwei 3H-Sigulets ($\delta_{\text{H}} = 3.83, 3.87$), welche in Kombination mit den zugehörigen Resonanzen im ^{13}C -NMR ($\delta_{\text{C}} = 52.1, 52.4$) als Methoxygruppen identifiziert wurden. Tieffeldverschiebungen im ^{13}C -NMR ($\delta_{\text{C}} = 158.7, 162.5$) deuten auf Carbonyl-Kohlenstoffatome hin. Es liegt die Vermutung nahe, dass es sich hierbei um zwei Methylester gebunden an ein aromatisches Ringsystem handelt. Zusammen mit den 2D-NMR-Datensätze wurde **19** als 2,4-Dimethoxycarbonylfuran (Furan-2,4-dicarbonsäuremethylester) identifiziert.



In dieser Arbeit wird die erste Isolierung von **19** aus einem Streptomyceten bzw. generell aus einem Mikroorganismus beschrieben.^[168] Vornehmlich ist dieses 2,4-substituierte Furan (**19**) in der Literatur als Syntheseprodukt beschrieben, wobei es meist nur als

Zwischenprodukt^[169,170] vorkommt oder als Derivat der 2,4-Furandicarbonsäure (**96**) genannt wird. In letzterem Fall fand eine erste Erwähnung bereits 1901 statt, in der FEIST die Synthese von **96** ausgehend von Cumalinsäure (**97**) beschrieb.^[171] Die erste spektroskopische Charakterisierung von **19** erfolgte durch WINTERFELDT im Jahr 1965.^[172]

Aus natürlichen Quellen wurde **19** bisher nur als flüchtige Komponente bzw. Geruchsstoff identifiziert: So konnten beispielsweise KIM *et al.* **19** im Jahr 2006 mittels GC-MS-Analyse als einen der Duftstoffe vom Matsutake-Pilz („Kiefern-pilz“) *Tricholoma matsutake* Sing. nachweisen.^[173] Des Weiteren wurde **19** kurze Zeit später von BALDIRAN *et al.* als Abbauprodukt vom Laub (Streu) der Eiche *Quercus petraea* durch streuabbauende Basidiomyceten identifiziert.^[174]

4.2.2 Furan als Baustein niedermolekularer Naturstoffe

Furan-Derivate sind in der Natur weit verbreitet und können oftmals in eine von drei Gruppen klassifiziert werden (vgl. Abbildung 48):

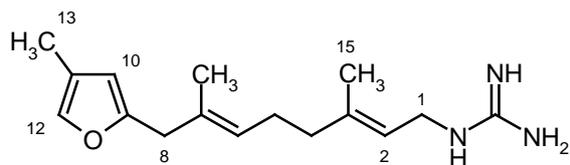
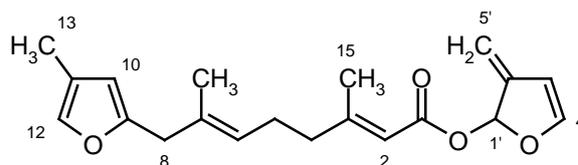
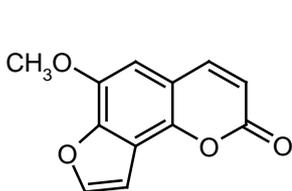
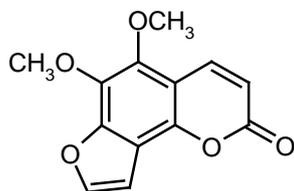
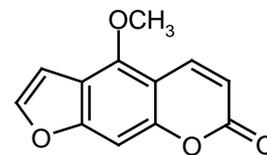
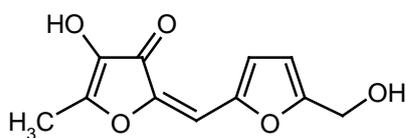
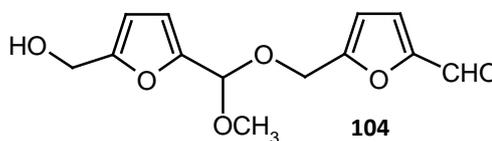
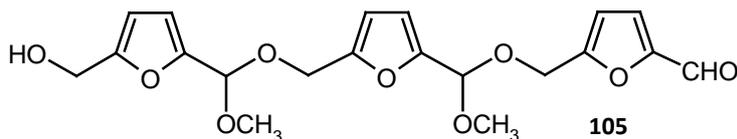
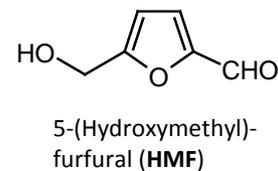
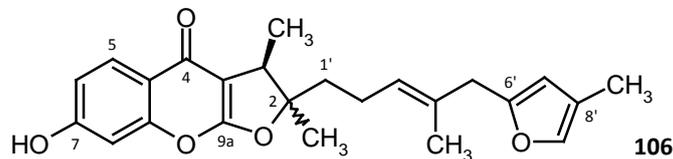
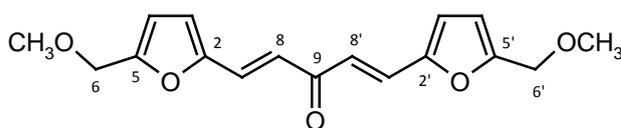
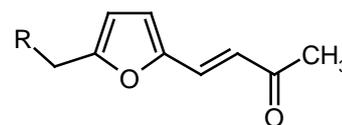
- Furanterpenoide, mit einem oder mehreren mono-, di- oder tri-substituierten Furanringen. Als Beispiel sei hier Siphonodictidin (**98**)^[175] genannt, welches als Sekundärstoffe aus dem Schleim des marinen Schwamms *Siphonodictyon* sp. isoliert wurden. Dieses Furanterpenoid wurde als Schutzstoff gegen ein zu starkes Wachstum der Koralle, welche der Schwamm besiedelt, charakterisiert. Als verwandte Substanzen gilt das Marislin (**99**)^[176], das aus der Nacktschnecke *Chromodoris marislae* isoliert wurde.
- Furanocumarine, in denen C-2 und C-3 des Furanrings mit weiteren Aromaten verknüpft sind. Als „klassisches“ Beispiel können die Untersuchungen von H. G. FLOSS mit *Pimpinella magna* genannt werden, aus deren Wurzelholz zahlreiche Furanocumarine – wie Sphondin (**100**), Pimpinellin (**101**) oder Bergapten (**102**) – isoliert wurden.^[177] Derartige Furanocumarine finden sich z.B. auch im Saft von Bergamotten (*Citrus bergamia*).^[178]
- Fettsäure-ähnliche Furane bzw. Furan-Ketten, die vornehmlich 2,5-substituiert vorkommen. Viele Furane dieser Klasse konnten bisher aus Pflanzen isoliert werden. Jedoch wird immer wieder von Furanen mikrobiellen Ursprungs berichtet. LAATSCH *et al.* isolierten aus einem bodenbürtigen Streptomycceten die Dimere **103** und **104** sowie das Trimer **105**, wobei nicht geklärt werden konnte, ob diese durch

den Aufarbeitungsprozess aus 5-(Hydroxymethyl)furfural (**HMF**) gebildet wurden oder „echte“ Sekundärmetaboliten repräsentieren. Keine dieser Furane zeigte eine antibakterielle oder antifungale Aktivität.^[118]

Eine derartige Kategorisierung lässt sich nicht in jedem Fall vornehmen. Im erstmals aus dem Doldenblütler *Ferula ferulaeoides* (einer mongolischen Heilpflanze) isolierten Sesquiterpenoid **106** liegt beispielsweise zwischen Furanring und Cumaringerüst eine zusätzliche Terpenoid-Einheit.^[179] Über eine biologische Aktivität wurde hier jedoch nicht berichtet.

Dahingegen sind „einfache“ Furane von seltener Natur. In der Literatur finden sich nur sehr wenige systematische Untersuchungen zur Chemie dieser Furan-Naturstoffe. Li *et al.* berichteten über die Isolierung von Rehmanon A (**107**), Rehmanon B (**108**) und Rehmanon C (**109**).^[180] Diese neuen „einfachen“ Furane stammen aus dem Wurzelholz von *Rehmannia glutinosa*, einer in der chinesischen Heillehre eingesetzten Pflanze. **109** konnte ebenfalls in einer weiteren chinesischen Heilpflanze, *Salvia miltiorrhiza*, nachgewiesen werden.^[181] Besonders **107** stellt einen attraktiven neuen Naturstoff dar, da es als Thrombozytenaggregationshemmer in Frage kommt. Erste synthetische Arbeiten hierzu sind kürzlich beschrieben wurden.^[182]

Des Weiteren liegen bis heute nur sehr wenige Beispiele zur Biosynthese der „einfachen“ 2,4-substituierten Furane vor. Dieser Fakt stellt folglich eine besondere Motivation für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur Biosynthese von 2,4-Dimethoxycarbonylfuran (**19**) dar.

Siphonodictidin (**98**)Marislin (**99**)Sphondin (**100**)Pimpinellin (**101**)Bergapten (**102**)**103****104****105**5-(Hydroxymethyl)-
furfural (**HMF**)**106**Rehmanon A (**107**)Rehmanon B (**108**): R = CH₃Rehmanon C (**109**): R = OH**Abbildung 48:** Furan-Derivate aus natürlichen Quellen.

4.2.3 Fütterung unmarkierter Vorläufer zur Produktionssteigerung

Die erste Isolierung von 2,4-Dimethoxycarbonylfuran (**19**) gelang nach Fütterung von ¹³C-markiertem Glycerin zum Produzentenstamm GÖ 3822-14F. Es stellte sich die Frage, ob

die geringe Ausbeute (1.5 mg/L) durch Variation der Kultivierungsbedingungen bzw. Fütterung anderer, direkter Vorläufer gesteigert werden konnte.

Es ist davon auszugehen, dass es sich bei der Bildung von **19** um einen fein regulierten Mechanismus handelt, immerhin konnte **19** nicht bei alleiniger Verwendung von Glycerinhaltigem Medium im Dünnschichtchromatogramm beobachtet werden. Ferner wurde ein solches Furan-Derivat im chemischen Screening des Stammes GÖ 3822-14F durch H. B. BODE nicht beschrieben.^[166] Allein die Zufütterung eines Vorläufers scheint die Biosynthese von **19** im Produzentenstamm zu aktivieren bzw. derart zu verstärken, dass die Substanz überhaupt detektierbar ist.

Da im Dünnschichtchromatogramm kein **19** im Extrakt des Mycels beobachtet werden konnte, wurde nur das Kulturfiltrat weiter bearbeitet. Aufarbeitung und Isolierung sind in Kapitel 9.4 beschrieben. In allen Fütterungen mit unmarkiertem Glycerin wurde dieses in Konzentrationen von 5.4 mM eingesetzt.

Variation des Fütterungszeitraumes von Glycerin

- In einem ersten Versuch (2 L-Ansatz) wurde der Fütterungszeitraum von unmarkiertem Glycerin verlängert und die Zugabe von der 32.-56. Inkubationsstunde (analog zu den Bafilomycinen) gewählt. Die Ernte erfolgte nach der 70. Stunde. Es wurden 0.9 mg/L an **19** isoliert.
- Für einen weiteren 2 L-Ansatz wurde die Fütterung nur sehr kurz – von der 30.-32. Inkubationsstunde – durchgeführt. Die Ernte erfolgte nach der 56. Stunde. Hierbei konnte **19** in einer Ausbeute von 0.7 mg/L vorgefunden werden.
- In zwei weiteren Ansätzen (jeweils 6 Liter) erfolgte die Zugabe des Glycerins nicht kontinuierlich sondern in zeitlichen Abständen: Im ersten Versuch vier Mal (auf 10 mL Portionen verteilt) alle drei Stunden, in einem zweiten Versuch acht Mal (je 5 mL Portionen) alle 1.5 Stunden. Dabei blieb der Fütterungszeitraum unverändert (30.-42. Stunde) und die Ernte erfolgte nach der 56. Stunde. Im Dünnschichtchromatogramm konnte **19** in beiden Fällen identifiziert werden, jedoch ließ sich aus der ersten Fermentation (viermalige Zugabe von Glycerin) kein Furan (**19**) isolieren. Aus der zweiten Fermentation (achtmalige Zugabe von Glycerin) wurde **19** in einer Ausbeute von 1 mg/L isoliert.

Wie man aus den gewonnenen Daten erkennt, wurde die Produktion des Furans **19** durch Zugabe von Glycerin induziert. Dennoch muss bei derart kleinen Ausbeuten die Menge an gebildetem Furan vorsichtig interpretiert werden. Somit ist schwer zu beantworten, ob die beobachteten Schwankungen der Ausbeute als Folge der Aufarbeitung zu betrachten sind oder ob derartige Unterschiede tatsächlich auf die Wahl des Fütterungszeitraumes zurückzuführen sind. Somit konnte aus den durchgeführten Versuchen kein idealer Fütterungszeitraum interpretiert werden. Fest steht dennoch, dass nur bei Zugabe von Glycerin während der Fermentation eine deutliche Produktion an 2,4-Dimethoxycarbonylfuran (**19**) auszumachen war. Da die Aufnahme einer Produktionskurve des Metaboliten ohne zuvor festgelegte Fütterungszeit nicht möglich erschien, orientierte sich die Glycerin-Zugabe aller weiteren Kultivierungen an dem für die Einbaustudien gesetzten Zeitfenster (30.-42. Inkubationsstunde).

Fütterung anderer Vorläufer zur Steigerung der Produktion von 19

Da Glycerin im Metabolismus als Baustein vieler Substanzen eine Verwendung findet, stellte sich die Frage, ob Glycerin als alleiniger Vorläufer von **19** in Frage kommt oder ob Intermediate des Stoffwechsels ebenfalls für die Furan-Produktion akzeptiert werden. Es wurden daher sowohl direkte Intermediate der Glycolyse, wie D-Glycerat, als auch die daraus hervorgehenden Aminosäuren Alanin und Serin als mögliche Vorläufer in Betracht gezogen. Des Weiteren wurde Shikimisäure (**59**) als möglicher Vorläufer erachtet. Denkbar wäre hier die Bildung des Furans über eine intramolekulare Reaktion von **59** vom Typ einer Baeyer-Villiger Oxidation (vgl. Kapitel 4.2.5).

Die Kultivierung erfolgte jeweils im 500 mL-Maßstab, wobei jeder Vorläufer in einer Konzentration von 4 mM eingesetzt wurde. Bei racemischen Mischungen (DL-Alanin und DL-Serin) wurde für jedes Enantiomer eine Konzentration von 4 mM verwendet (somit 8 mM Endkonzentration des Racemats). Die Fütterung erfolgte in jedem Fall kontinuierlich mittels Schlauchdosierpumpe von der 30.-42. Inkubationsstunde. Der Erntezeitpunkt lag in der 56. Stunde. Parallel erfolgte die Fermentation des Stammes GÖ 3822-14F in den Medien NL 1358s (Glycerin-haltig) und NL 1358f (ohne Glycerin-Zusatz) ohne Zufütterung von möglichen Vorläufern. Die gewonnenen Extrakte des Kulturfiltrats wurden auf eine Konzentration von 4 mg/L eingestellt und mittels Dünnschichtchromatogramm sowie HPLC-MS (Säule 1/Programm 1) auf die Produktion von **19** analysiert (s. Abbildung 49).

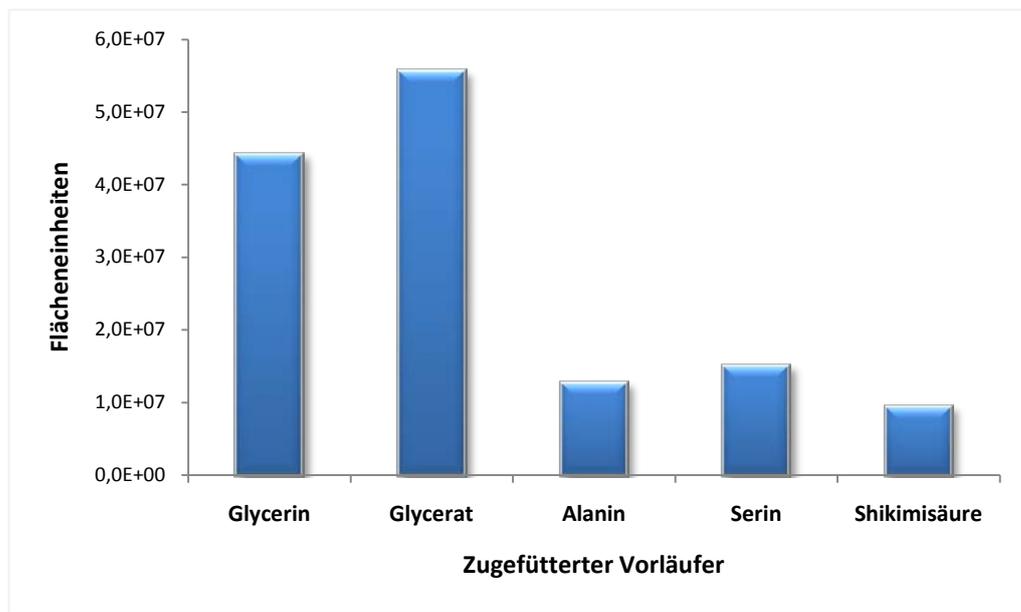


Abbildung 49: Gehalt an 2,4-Dimethoxycarbonylfuran (**19**) im Extrakt des Stamms Gö 3822-14F nach Zufütterung unterschiedliche Vorläufer. Dargestellt sind die mittels HPLC ermittelten Flächen von **19** im Massen-Chromatogramm.

Aus dem Dünnschichtchromatogramm konnte keine Aussage über die Änderung der Produktion von **19** aufgrund der Intensität der UV-Löschung bzw. Größe der „Furan-Zone“ gemacht werden. Dagegen ließ die Analyse mittels HPLC-MS auf Glycerin bzw. Glycerat als direkten Vorläufer des Furans **19** schließen. Hierbei konnten annähernd gleiche Werte sowohl im UV-Chromatogramm als auch in der Massenspur detektiert werden, welche in Zusammenhang mit der Produktion an **19** gesetzt wurden. Alanin, Serin und Shikimisäure führten scheinbar auch zur Bildung des Furans, verbunden mit einem deutlichen Rückgang der Produktion. Die Extrakte aus den Fermentationen in den Medien NL 1358s bzw. NL 1358f zeigten keine eindeutige Bildung des Furans, was in Analogie zu den bisherigen Beobachtungen von H. B. BODE und T. SCHUHMANN steht. Da es zu keiner deutlichen Produktionssteigerung kam, wurde der Zugang zu **19** *via* Fermentation weiter durch Zufütterung von Glycerin favorisiert.

Von einer Kultivierung im Großvolumen-Fermenter wurde abgesehen. Die Produktion von **19** wurde als derart fein reguliert erachtet, dass aus Gründen der Zeiteffizienz hier keine Versuche unternommen wurden. Sollte das Furan **19** in verschiedenen Bioaktivitätstests als

potenter Metabolit eingestuft werden, erscheinen weitere Versuche zur Produktionssteigerung als angebracht.

4.2.4 Fütterung von ^{13}C -markierten Glycerinen

Die erste Isolierung von 2,4-Dimethoxycarbonylfuran (**19**) gelang während der Einbaustudien von ^{13}C -markiertem Glycerin in die Bafilomycine (**16,17**).^[168] Aus diesem Grund lagen parallel bereits Informationen über Einbaumuster von Glycerin in **19** vor. Fütterung von $[\text{U-}^{13}\text{C}_3]\text{Glycerin}$ (**110**) führte zu einer Anreicherung von C-1'/C-2/C-3 sowie C-2'/C-4/C-5, wobei die Kopplungsmuster im ^{13}C -NMR auf den Einbau zweier intakter C_3 -Einheiten hinwiesen. Die Signalintensität der zum Dublett vom Dublett aufgespaltenen Signale entsprach in etwa der Intensität der Zentrallinie, was auf einen deutlichen Einbau von Glycerin hinwies. Innerhalb einiger Kopplungssignale waren zusätzlich weitere Resonanzen geringerer Intensität zu erkennen. Hierbei wiesen C-2/C-3 ($^1J_{\text{CC}} = 73 \text{ Hz}$) und C-4/C-2'' ($^1J_{\text{CC}} = 87 \text{ Hz}$) die Multiplizität eines Dubletts auf, wobei die Werte ihrer Kopplungskonstanten den aus den $^{13}\text{C}_3$ -Einheiten ermittelten Werten entsprachen. Dieses deutete auf das Vorhandensein eines zusätzlichen Isotopomers hin, da statistische Kopplungen nur zwischen C-3 und C-4 zu erwarten gewesen wären.

Fütterung von $[2,3\text{-}^{13}\text{C}_2]\text{-sn-Glycerin}$ (**88**) führte zu ^{13}C - ^{13}C Kopplungssignalen bei C-2/C-3 und C-4/C-2'', welche in Übereinstimmung zu dem vermutlichen Isotopomer der Fütterung von **110** waren. Somit wurden **110** und **88** im Metabolismus derart umgesetzt, was zum Verlust einer ^{13}C -Markierung von **110** führte. Als Folge konnten für beide Vorläufer vergleichbare Einbaumuster festgestellt werden.

Nach Fütterung von $[1,2\text{-}^{13}\text{C}_2]\text{-sn-Glycerin}$ (**89**) konnte ein Einbau in C-2/C-1' sowie C-4/C-5 beobachtet werden. Auch hier waren die zum Dublett aufgespaltenen Signale von vergleichbarer Intensität mit der Zentrallinie, was **89** als direkten Vorläufer vermuten ließ.

Da **88** und **89** nicht enantiomerenrein eingesetzt wurden, ließ sich im ^{13}C -NMR von **19** nach Fütterung des einen Enantiomers jeweils auch ein Isotopomer mit einem Markierungsmuster ausmachen, das dem des jeweils anderen Enantiomers glich.

Alle beobachteten Einbaumuster sind in Abbildung 50 zusammengefasst.

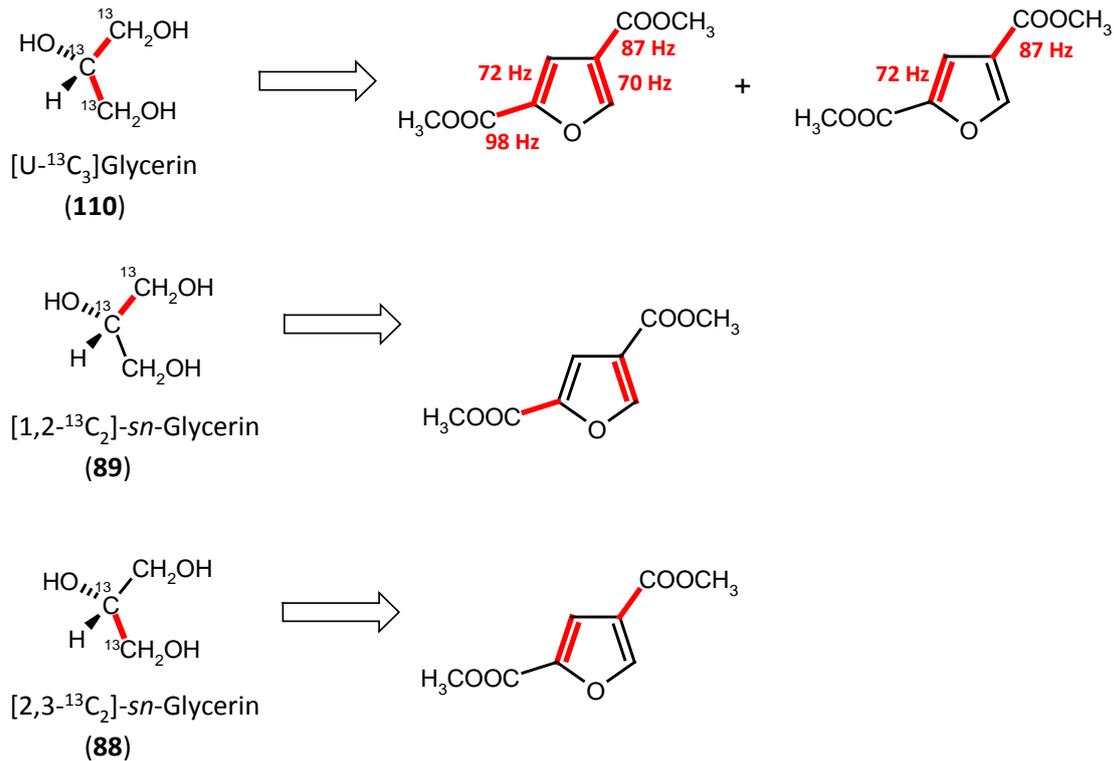


Abbildung 50: Einbaumuster in 2,4-Dimethoxycarbonylfuran (**19**) nach Fütterung von unterschiedlich ^{13}C -markiertem Glycerin. Kopplungskonstanten sind exemplarisch für die aus der Fütterung von **110** erhaltenen Isotopomere angegeben. In den anderen Fütterungsexperimenten konnten analoge Kopplungskonstanten ermittelt werden.

4.2.5 Diskussion der Biosyntheseexperimente

Alle bisher vorliegenden Ergebnisse, insbesondere die Intensitäten der Kopplungssignale im ^{13}C -NMR, lassen Glycerin als direkten Vorläufer in Betracht kommen. Die Ergebnisse der Fütterung von unmarkiertem Glycerat und die daraus folgende Produktionssteigerung verstärken zusätzlich die Annahme, dass die Biosynthese von **19** über die Glycolyse verlaufen könnte. Sowohl Glycerin als auch Glycerat werden hierüber eingeschleust. Die Fütterung von uniform markiertem Glycerin (**110**) führte zum Einbau von zwei intakten C_3 -Einheiten, weshalb keine komplexen Stoffwechselwege angenommen werden, aus denen **19** hervorgeht. Käme es zu einer Spaltung der ^{13}C - ^{13}C -Bindung des Vorläufers, ist die Wahrscheinlichkeit einer späteren Wiederverknüpfung von ^{13}C -Atomen im selben Molekül verhältnismäßig klein, so dass die zuvor beobachtete ^{13}C - ^{13}C -Kopplung verloren gegangen wäre.

In einem der wenigen Beispiele aus der Literatur beschreibt WHITE Einbaustudien an der Furan-Einheit des in Archaeobakterien produzierten Methanofurans.^[183] Fütterung von

[1,2-¹³C₂]Acetat führte zu einem Einbau intakter Einheiten. Er postulierte, dass Acetat über Pyruvat (**94**) in die Gluconeogenese eingeschleust wird, wo es zu Dihydroxyacetonphosphat (**DHAP**) metabolisiert wird. **94** und **DHAP** zusammen bilden den Furan-Ring des Methanofurans.

Im Falle des 2,4-Dimethoxycarbonylfurans (**19**) kann von einer ähnlichen Biosynthese ausgegangen werden. Hierbei werden ebenfalls Pyruvat (**94**) und **DHAP** als Bausteine des Furans betrachtet. Glycerin wird durch Glycerin-Kinase zu L-Glycerin-3-phosphat (**G3P**) umwandelt, welches durch das Enzym Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase zu **DHAP** umgesetzt wird. Des Weiteren kann **94** mit der intakten Glycerin-Markierung als Endprodukt der Glycolyse gewonnen werden. Ringbildung könnte durch Addition der Methylgruppe von **94** an die Ketogruppe des **DHAP** und rückgerichteten nukleophilen Angriff der Hydroxygruppe von **DHAP** an den Carbonyl-Kohlenstoff von **94** erfolgen. Weitere Reaktionsschritte werden als Dehydratisierung, Dephosphorylierung und Oxidation des verbleibenden Alkohols zur Carbonsäure postuliert (s. Abbildung 51). Eine abschließende Methylierung der Furan-2,4-dicarbonsäure (**96**) wäre durch Methionin denkbar. Es konnte jedoch kein **19** während der Fütterungsversuche mit [Methyl-¹³C]Methionin an den Bafilomycinen (**16,17**) isoliert werden, um diese These zu untermauern. Diese Vermutung kann jedoch mit den Daten zur Berechnung der spezifischen Einbauraten in **19** gestützt werden. Zur Berechnung dieser Einbauraten dienten die vermeintlich unmarkierten Methoxygruppen als Referenz. Hierbei konnte festgestellt werden, dass die restlichen C-Atome einen nur unwesentlich höheren Einbau aufwiesen. Aufgrund des Signalverhältnisses (Dublett zu Zentrallinie) im ¹³C-NMR-Spektrum war jedoch von einem deutlichen Einbau auszugehen. Sollte Methionin tatsächlich als Methylgruppen-Überträger fungieren, so ist der Einbau von Glycerin über den allgemeinen Metabolismus Glycerin – Serin – Methyltetrahydrofolat – Methionin zu erklären.^[167]

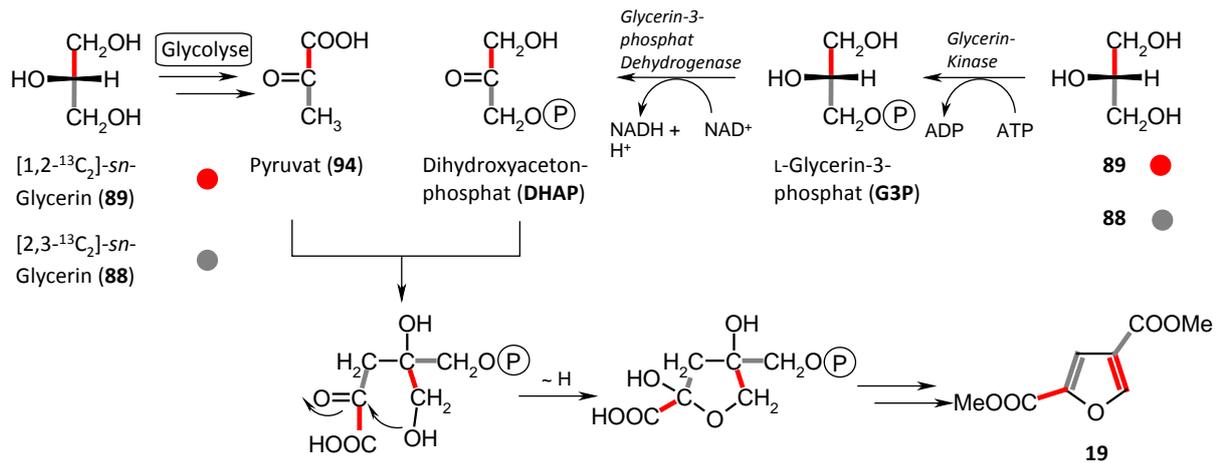


Abbildung 51: Hypothese zur Biosynthese von 2,4-Dimethoxycarbonylfuran (**19**).

Das ¹³C-NMR-Spektrum von **19** nach Fütterung [U-¹³C₃]Glycerin (**110**) zeigte einen zweiten Satz an Dublett-Signalen bei C-2/C-3 sowie C-4/C-2'' (s. Abbildung 50). Diese lassen sich aufgrund oben genannter Biosynthese-Hypothese jedoch nicht erklären, da es hierbei zu dem Verlust einer ¹³C-Markierung des Glycerins bzw. eines verwandten Stoffwechsel-Intermediats gekommen sein muss. Es ist davon auszugehen, dass ein Teil des aus Glycerin gebildeten – und damit markierten – **DHAP** nicht zu **19** reagierte und weiter verstoffwechselt wurde. Über das Enzym Triosephosphat-Isomerase stehen **DHAP** und Glycerinaldehyd-3-phosphat (**GAP**) in einem direkten Gleichgewicht zueinander. Das Enzym Aldolase katalysiert in der Gluconeogenese die Reaktion von **DHAP** und **GAP** zu Fructose-1,6-bisphosphat (**FBP**), welches anschließend zu Fructose-6-phosphat (**F6P**) dephosphoryliert wird. Sowohl **FBP** als auch **F6P** tragen zwei intakte C₃-Einheiten, die aus Glycerin stammen. Aufgrund der verzweigten Stoffwechselwege sind nun zwei Reaktionen von **F6P** denkbar (s. Abbildung 52): Weg 1: Reduktion von **F6P** führt zu Glucose-6-phosphat (**G6P**), welches *via* Pentosephosphat-Weg zu Ribose-5-phosphat (**R5P**) umgesetzt wird. Dieses trägt nur noch eine intakte C₃-Markierung sowie – als Folge der Decarboxylierung von 6-Phosphogluconat (**6PG**) – eine verbleibende ¹³C₂-Einheit.

Weg 2: Alternativ kann **F6P** durch das Enzym Transketolase unter Aufnahme von **GAP** (¹³C₃-markiert) in Xylulose-5-phosphat (**Xu5P**) und Erythrose-4-phosphat (**E4P**) gespalten werden. Hieraus resultiert eine Einzelmarkierung in C-1 von **E4P**.

Im nicht-oxidativen Teil des Pentosephosphat-Wegs katalysiert eine Transketolase die Übertragung von einem C₂-Fragment (C-1 und C-2) des **Xu5P** auf **R5P**, wodurch das

C₇-Produkt Sedoheptulose-7-phosphat (**S7P**) entsteht. Das zurückbleibende Fragment der Xylulose ist **GAP**, wiederum ¹³C₃-markiert. Transaldolase katalysiert im Folgenden die Abspaltung eines C₃-Fragments von **Xu5P**, welches mit **GAP** zu Fructose-6-phosphat (**F6P**) kondensiert. Bei dem zurückbleibenden Fragment handelt es sich um Erythrose-4-phosphat (**E4P**). Phosphorylierung und anschließende Spaltung von **F6P** durch Aldolase führt zu **DHAP** und **GAP**. Das **DHAP** trägt im Gegensatz zu dem direkt aus Glycerin gewonnenen Analogon nun keine intakte ¹³C₃-Einheit mehr, sondern eine Einzelmarkierung in C-1 und die verbliebene intakte ¹³C₂-Einheit in C-2/C-3. Durchläuft dieses **DHAP** nun die Glycolyse, so ergibt sich ein Pyruvat (**94**), welches ebenfalls eine Einzelanreicherung (C-1) und eine intakte ¹³C₂-Einheit trägt. Kondensation dieses Pyruvats (**94**) mit seinem Vorläufer **DHAP** führt folglich zu einem Furan (**19**), das nur zwei intakte C₂-Markierungen (C-2/C-3 sowie C-4/C-2'') trägt. Die zusätzlichen Einzelanreicherungen in C-1' und C-5 konnten aus den erhaltenen NMR-Daten nicht interpretiert werden, da ein garantiert nicht angereichertes Atom für eine verlässliche Referenzierung fehlte.

Folglich führt nur die Fütterung von [U-¹³C₃]Glycerin (**110**) und [2,3-¹³C₂]-*sn*-Glycerin (**88**) zu Isotopomeren mit intakten ¹³C₂-Einheiten. Trotz des vermuteten sehr komplexen Stoffwechsels, den das markierte Glycerin durchläuft, war ein sehr gutes „channeling“ festzustellen, was sich in dem messbaren zweiten NMR-Signalsatz widerspiegelte.

Abschließend bleibt jedoch die Frage unbeantwortet, ob **19** ausschließlich nach dem Prinzip der Vorläufer-dirigierten Biosynthese gebildet wird (Aktivierung eines „stillen“ Biosynthesewegs durch Glycerin) oder ob es prinzipiell als Minderkomponente des Stamms Gö 3822-14F vorkommt und Fütterung von Glycerin nur zu einer Erhöhung der Produktion führte. Vorsichtig soll an dieser Stelle auch die Vermutung aufgeworfen werden, ob dieses Furan als Detoxifizierungsprodukt des Stammes nach Glycerin-Zugabe fungiert, wie es für andere, „einfache“ Furane (z.B. Hydroxymethylfurfural) der Fall ist (vgl. Kapitel 3.3.10.5).

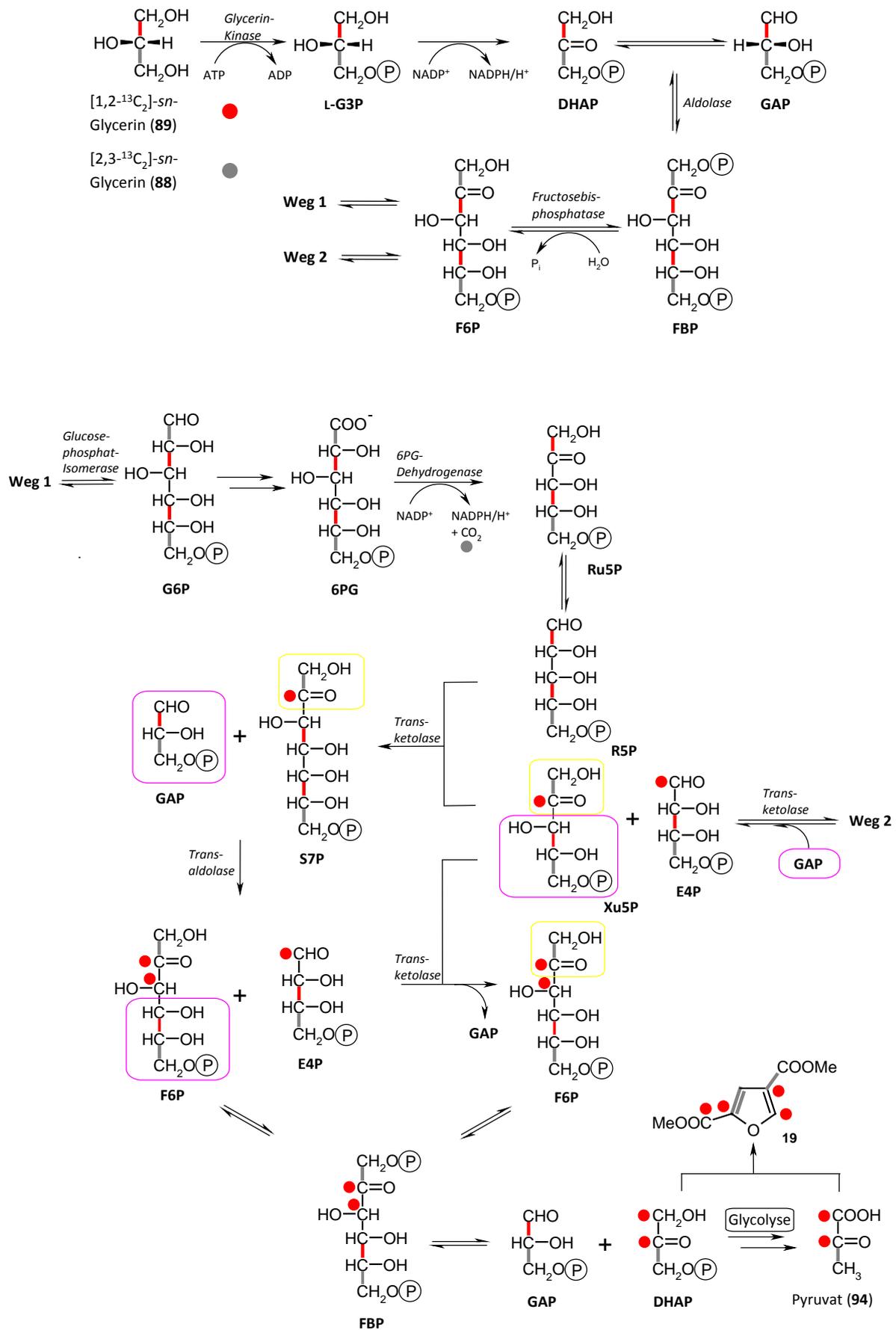


Abbildung 52: Hypothese zur Biosynthese von 2,4-Dimethoxycarbonylfuran (19). Markierungsmuster eines möglichen Isotopomers aufgrund des verzweigten Intermediärstoffwechsels.

An dieser Stelle soll noch kurz auf eine erste Vermutung zur Biosynthese von **19** eingegangen werden, welche als ein Ansatzpunkt für die Fütterungsversuche zur Produktionssteigerung genutzt wurde (vgl. Kapitel 4.2.3). Phosphoenolpyruvat (**PEP**) (Glycolyse) bzw. Erythrose-4-phosphat (**E4P**) (Pentosephosphat-Weg) „speisen“ direkt den Shikimat-Weg^[69], dessen Produkt Shikimisäure (**59**) durch Fütterung von ¹³C-markiertem Glycerin ein typisches Einbaumuster erhält. Geht man von einem Abbau zu 4-Hydroxybenzoesäure (**111**) und anschließender Oxidation aus, liegt ein symmetrisches Molekül vor. Erste Vermutungen zielten auf eine symmetrische Zwischenstufe, anhand derer Resonanzen von verschiedenen Isotopomeren im ¹³C-NMR zu klären wären. Als mögliche Reaktion, welche zur Bildung eines 5-Rings geführt hätte, wurde eine Baeyer-Villiger Oxidation angenommen. Jedoch stimmten postuliertes und experimentell erhaltenes Einbaumuster von **19** nicht überein, so dass der in Abbildung 53 dargestellte Biosyntheseweg ausgeschlossen wurde. Des Weiteren sprachen die Ergebnisse aus den Fütterungsversuchen zur Produktionssteigerung von **19** gegen Shikimisäure (**59**) als direkten Vorläufer.

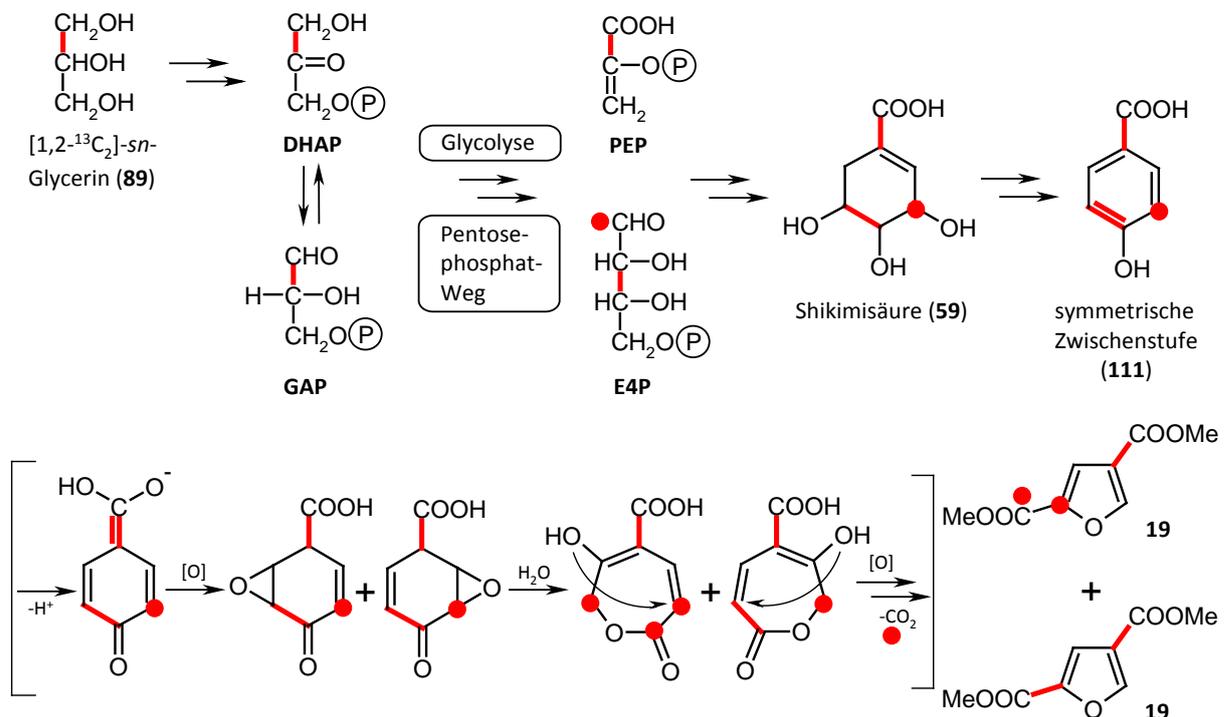


Abbildung 53: Widerlegte Hypothese der Biosynthese von 2,4-Dimethoxycarbonylfuran (**19**) mit Shikimisäure als Vorläufer. Das Einbaumuster entspricht in diesem Fall nicht den experimentellen Befunden.

4.2.6 Darstellung von 2,4-Dimethoxycarbonylfuran (19)

Besonders im Hinblick auf Untersuchungen zur biologischen Aktivität von **19** war es unerlässlich, ausreichende Mengen der Substanz vorliegen zu haben. Theoretisch wäre es möglich gewesen, durch ein großes Ansatzvolumen genügend **19** zu produzieren. Jedoch war die parallele Fermentation in mehreren Erlenmeyerkolben durch die Anzahl der Ausgänge der Schlauchdosierpumpe begrenzt. Aus diesem Grund wurde ein synthetischer Zugang zu **19** erwogen. Hierzu finden sich in der Literatur verschiedene Ansätze, welche zumeist auf Furan-2,4-dicarbonsäure (**96**) als Syntheseprodukt zielen.

Im Allgemeinen lassen sich alle synthetischen Arbeiten auf die Versuche von FEIST^[171] und v. PECHMANN^[184] zurückführen. Hierbei ging die Synthese von Cumalinsäure (**97**) aus, welche nach Veresterung, Bromierung und Kochen in wässriger KOH-Lösung zu **96** führt.

Als eine der wenigen Alternativen lässt sich die Darstellung von **19** ausgehend von Vanillin anführen.^[185] PEARL und BARTON setzten dieses mit Natriumchlorit unter sauren Bedingungen um und fraktionierten anschließend nach unterschiedlicher Löslichkeit. Aus einer Natriumhydrogensulfit-löslichen Fraktion konnte **96** zur weiteren Aufreinigung isoliert werden. Allerdings ist die Ausbeute sehr gering beschrieben; aus 76 g Vanillin konnte auf diesem Weg 1 g an **96** gewonnen werden. Aus diesem Grund und angesichts der komplexen Aufarbeitung wurde diesem Ansatz nicht nachgegangen.

Da auch in der aktuelleren Literatur^[170] die Synthesevorschriften von FEIST und v. PECHMANN als Grundlage verwendet werden, orientierte sich die hier beschriebene Darstellung von **19** ebenfalls an selbigen Vorschriften. Cumalinsäure (**97**) wurde in Methanol durch leichtes Erwärmen gelöst und durch Zugabe etherischer Diazomethan-Lösung zum Cumalinsäuremethylester (**112**) verestert. Zur Vermeidung von Nebenreaktionen im folgenden Reaktionsschritt wurde **112** chromatographisch an Kieselgel (CHCl₃/MeOH 9:1) gereinigt. Die Bromierung von **112** erfolgte mit elementarem Brom in Eisessig unter Zugabe katalytischer Mengen an Iod. Nach einer Woche konnten klare Kristallnadeln erhalten werden, welche mit Eisessig gewaschen wurden. Der nächste Schritt wird in den existierenden Vorschriften unterschiedlich erfolgreich angegeben. Die hier beschriebene Darstellung erfolgte unter Einbezug der Arbeiten von JOHNSTONE *et al.*^[186]. Sie gaben an, dass nur durch exakte Kontrolle der Reaktionsbedingungen ein deutlicher Umsatz des Bromcumalinsäuremethylesters (**113**) festzustellen war. Zu diesem Zweck wurde **113** in wässriger KOH-Lösung auf 60 °C erhitzt und für 35 Minuten gerührt. Der Umsatz lag hierbei bei 83 % was sich mit den Angaben von

JOHNSTONE *et al.* deckte (dort: 90 %). Die erhaltene Furan-2,4-dicarbonsäure (**96**) wurde mit etherischer Diazomethan-Lösung zu **19** umgesetzt. Für die Folgeuntersuchungen erfolgte ein abschließender Reinigungsschritt mittels HPLC (Säule 11, Programm 1 ohne Säurezusatz).

Aus 3 g Cumalinsäure (20.1 mmol) konnten 30 mg (0.16 mmol) Furan **19** gewonnen werden, was einer Ausbeute von 0.8 % entspricht. Dieser geringe Wert lässt sich vor allem auf die erste Stufe der Synthese zurückführen; eine vollständige Löslichkeit von **97** in Methanol ist nicht gegeben. Der Anteil an unlöslichem **97** blieb bei der Bestimmung der Ausbeute allerdings unberücksichtigt. Somit würde sich diese entsprechend erhöhen, wiederholte man den ersten Syntheseschritt mit der verbleibenden Cumalinsäure (**97**).

Weitere Versuche zielten auf eine Optimierung der ersten Stufe: Stärkeres Erwärmen der Lösung von **97** in Methanol führte jedoch nur zu einer teilweisen Behebung des Problems. Ebenso brachte ein Wechsel des Lösungsmittels zu Ether keinen Erfolg. Als weitere Variante wurde **97** direkt mit Diazomethan-Lösung versetzt und nur die flüssige Phase weiter behandelt. In allen Fällen blieb die Gesamtausbeute unter dem Wert aus oben beschriebener Methodik. Dennoch konnten aufgrund der durchgeführten Synthese ausreichende Mengen an Furan **19** gewonnen werden, um dieses auf seine biologische Aktivität hin zu untersuchen.

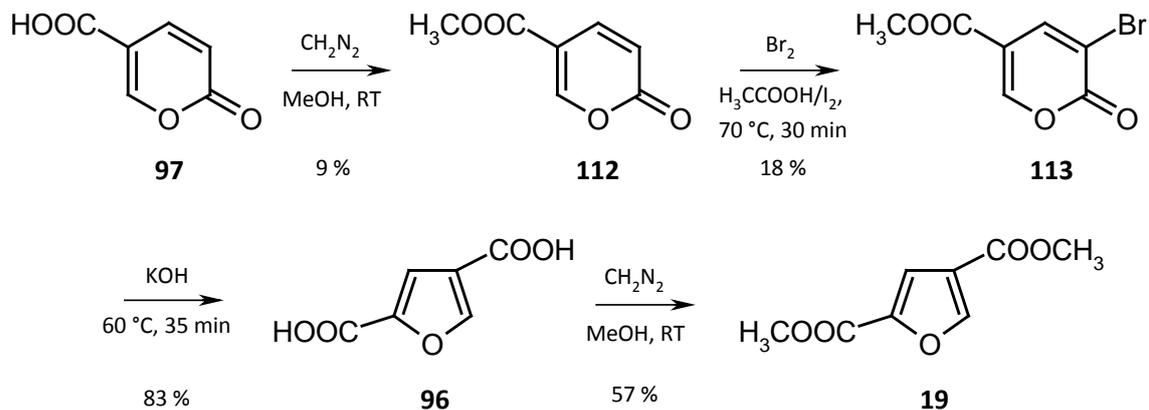


Abbildung 54: Darstellung von 2,4-Dimethoxycarbonylfuran (**19**) auf Grundlage der Arbeiten von FEIST^[171], v. PECHMANN^[184] und JOHNSTONE^[186].

Im Rahmen der Diplomarbeit von N. BURKARD sollte eine Optimierung der Darstellung von **19** unter neuen synthetischen Gesichtspunkten vorgenommen werden.^[187] Allerdings führte diese nicht zu einer angestrebten Steigerung der Ausbeute – 0.02 % wurden hier insgesamt erzielt – bzw. Abweichung von den bereits beschriebenen Synthesewegen von FEIST^[171] und

v. PECHMANN^[184]. Somit muss zum jetzigen Zeitpunkt diese ursprüngliche Vorschrift mit einigen Variationen, trotz der sehr geringen Gesamtausbeute, als ausreichend betrachtet werden, um ausreichend Substanz für biologische Untersuchungen zur Verfügung stellen zu können.

4.2.7 Biologische Aktivität des 2,4-Dimethoxycarbonylfurans (**19**)

Die bereits für andere Furan-Derivate beschriebene biologische Aktivität^[188] wurde zum Anlass genommen, verschiedene Wirkungen von **19** in ausgewählten Bio-Assays zu untersuchen.

Im Plattendiffusionstest auf antibakterielle bzw. antifungale Aktivität zeigte 2,4-Dimethoxycarbonylfuran (**19**) keine Aktivität gegen die verwendeten Testkeime *E. coli*, *B. subtilis*, *S. aureus* sowie *C. albicans*.

Sowohl der Naturstoff als auch das auf synthetischem Wege erzeugte Furan **19** wurden durch W. BEIL (MHH/Hannover) auf ihre zytotoxische Wirkung gegen unterschiedliche Krebszelllinien *in vitro* untersucht. Trotz dreifacher Wiederholung des Tests für den Naturstoff bzw. zweifacher Wiederholung des HPLC-gereinigten Syntheseprodukts konnten keine validierbaren Daten gewonnen werden. Aus den erhaltenen Werten lässt sich jedoch die Vermutung äußern, dass **19** keine oder nur eine sehr geringe zytotoxische Aktivität besitzt. Aus Zeitgründen wurde eine weitere Synthese von **19** im Rahmen dieser Arbeit nicht angestrebt sondern es sollte auf das von N. BURKARD hergestellte Furan als unabhängiges synthetisches Produkt zurückgegriffen werden. Wie bereits erwähnt, konnten auf diesem Wege jedoch keine ausreichenden Mengen an **19** bereitgestellt werden.

Im Rahmen einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe K. JUNG (Universität München) wurde für die Suche nach neuen Quorum-Sensing (QS)- und Anti-Quorum-Sensing (AQS)-Molekülen das Furan **19** zum Aufbau einer Substanzbibliothek ausgewählt.^[189] Für die Analyse der einzelnen Naturstoffe wurde ihr Einfluss auf die QS-kontrollierte Biolumineszenz in dem Reporterstamm *Vibrio harveyi* BB120 überprüft. Jedoch zeigte **19** hier keinen Effekt auf das Biolumineszenzverhalten.

Bei Untersuchungen zum Einfluss des Furans **19** auf die Keimung des Modellorganismus *Arabidopsis thaliana* ‚Columbia Zero‘ (Acker-Schmalwand) wurden die inkubierten Mikrotiterplatten zunächst visuell auf das Sprosswachstum bonitiert. Es war festzustellen, dass der Sekundärmetabolit das primäre Längenwachstum von *Arabidopsis thaliana* nicht beeinflussen konnte. Bei der daran anschließenden Bonitur des Wurzelwachstums konnten, wie bereits bei der Sprossbonitur, keine eindeutigen Hinweise auf phytotoxische Eigenschaften des getesteten Metaboliten gefunden werden.

Zur abschließenden Untersuchung der gebildeten Biomasse wurden die Pflanzen in der Mikrotiterplatte zunächst eingefroren und anschließend gefriergetrocknet. Die Kontrolle auf Biomasseproduktion erfolgte mittels Feinwaage. Analog zu den visuellen Bonituren konnte auch hier kein signifikanter Unterschied zwischen den eingesetzten Metabolitenkonzentrationen (5 nM bis 100 µM) sowie zu den Negativkontrollen hergestellt werden. Eine phytotoxische Aktivität gegenüber *Arabidopsis thaliana* konnte in diesem Assay nicht belegt werden.

5 Molekularbiologische Studien zur Biosynthese des Collinolactons

Bei Pilzen und Pflanzen liegen oftmals die Gene, die für die Produktion von Sekundärmetaboliten verwendet werden, über das gesamte Genom verteilt vor. Im Gegensatz dazu finden sich Biosynthesegene von Bakterien in den allermeisten Fällen „geclustert“ im Genom, d.h. sie liegen in unmittelbarer Nachbarschaft zueinander. Diese Tatsache kann ebenso wie das Vorliegen zahlreicher hochkonservierter Domänen innerhalb solcher (Biosynthese-)Gene zu einer effizienten Lokalisierung des kompletten Biosynthesegenclusters genutzt werden. Voraussetzung dafür ist eine Hypothese zur Bildung des Sekundärmetaboliten, d.h. zum verantwortlichen Biosyntheseweg und der beteiligten Enzyme. Zum Auffinden der codierenden Gene verwendet man häufig sogenannte DNA-Sonden. Diese bestehen aus 30 bis 50 Nukleotiden, deren Basensequenz aus der Primärstruktur des Biosynthese-Enzyms abgeleitet wurde. Für das eigentliche Screening in Gen-Banken oder Cosmid-Banken sind diese Sonden meist radioaktiv oder Lumineszenzmarkiert.

Das hier verfolgte Ziel ist die Identifizierung, Sequenzierung und Annotation des Biosynthesegenclusters von Collinolacton (**20**). Jedoch finden sich in der postulierten Biosynthese keine spezifischen Funktionalitäten, für die ausgearbeitete Sonden zum Screening zur Verfügung stehen. Um eine neue Sonde zu entwickeln, müssen in einem ersten Schritt spezifische Primerpaare für ein bestimmtes hypothetisches Gen entwickelt werden. Kann dieses tatsächlich auf Grundlage der entwickelten Primer aufgefunden werden, können die Sequenzen von Primern und vorgefundenem Gen für die Erstellung einer spezifischen Sonde genutzt werden.

5.1 Collinolacton (**20**) – ein neuartiges Cyclodecatrien aus *Streptomyces* sp.

5.1.1 Produzentenstämme *Streptomyces* sp. Gö 40/10 und Tü 1892

Die beiden Streptomyceten-Stämme Gö 40/10 und Tü 1892 wurden hinsichtlich ihres Metabolitenspektrums von B. BETHE^[190], R. KIND^[191] und H.-J. SCHIEWE^[192] während ihrer Dissertationen eingehend untersucht. Beide Stämme können als „talentiertere“ Produzenten eingestuft werden und zeigten im chemischen Screening große Ähnlichkeiten bezüglich der produzierten Metaboliten. Aus beiden Streptomyceten konnte der in dieser Arbeit

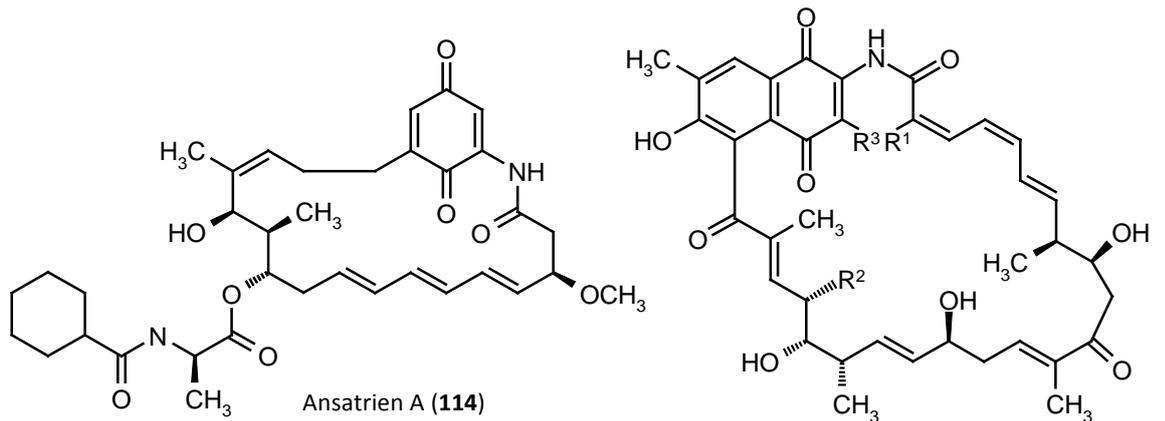
besprochene, neuartige Sekundärmetabolit Collinolacton (**20**) isoliert werden, wobei sich die hier dargestellten Untersuchungen vornehmlich auf den Stamm Gö 40/10 beziehen.

Dieser stammt aus einer bolivianischen Bodenprobe und ist Teil einer Stammsammlung, die zum Zweck eines Screenings auf anti-HIV-Aktivität angelegt wurde. Hierbei konnte jedoch keine antivirale oder toxische Wirkung im MT-4 Zelltest^[193] festgestellt werden. Dennoch wurde der Stamm als „talentiert“ eingestuft, da er im chemischen Screening ein sehr breitgefächertes Metabolitenspektrum aufwies.^[190] Eine taxonomische Klassifizierung ist erstmals im Rahmen der hier durchgeführten Arbeiten vorgenommen wurden (s. folgendes Kapitel).

Bei dem Stamm Tü 1892 handelt es sich ebenfalls um ein Bodenbakterium, welches bei Kamakura (Präfektur Kanagawa/Japan) isoliert wurde. Eine taxonomische Zuordnung klassifizierte Tü 1892 als *Streptomyces collinus* ssp. *collinus*.^[194] Während eines Screenings auf abnormes Hyphenwachstum beschrieben H. ZÄHNER und W. WEBER gelbe Komponenten, die eine breite antifungale Aktivität zeigten. In einem chemischen Screening wurde das breite Metabolitenspektrum näher charakterisiert.^[191]

Vornehmlich lassen sich die aus beiden Stämmen isolierten Metaboliten in vier Gruppen einordnen: Ansamycine (**114-118**), 14-gliedrige Makrolide (**119-121**), γ -Butyrolactone (**126, 127**) und das Collinolacton (**20**), das eine ganz neue Substanzklasse eröffnet.

Ansamycine bilden eine große Gruppe an Makrolactam-Antibiotika. Diese weisen als gemeinsames Element einen Chromophor vom Chinon- oder Naphtochinon-Typ auf, welcher durch Amidbindung über eine aliphatische Kohlenstoffkette verbrückt ist. Dieses Merkmal führte zu dem Namen ‚Ansamycine‘, da die überbrückende Kohlenstoffkette die Gestalt eines „Henkels“ (griechisch ‚ansa‘) besitzt.^[195] Als prominente Beispiele an Metaboliten aus Gö 40/10 können die Makrolactame Ansatrienin A (**114**), Diastovaricin I (**115**) sowie Naphthomycin B (**116**), C (**117**) und K (**118**) angeführt werden.



Diastovaricin I (**115**): R¹ = CH₃, R² = CH₃, R³ = Cl
 Naphtomycin B (**116**): R¹ = H, R² = CH₃, R³ = Cl
 Naphtomycin C (**117**): R¹ = H, R² = CH₃, R³ = H
 Naphtomycin K (**118**): R¹ = H, R² = CH₂OH, R³ = OH

Abbildung 55: Aus *Streptomyces* sp. Gö 40/10 isolierte Metaboliten aus der Gruppe der Ansamycine.^[192]

Unter die Klasse der Makrolide fallen 12-, 14-, 16- oder 17-gliedrige makrocyclische Lactone.^[196] Im chemischen Screening zeigte sich Gö 40/10 als Produzent zahlreicher 14-gliedriger Makrolide, die alle der Gruppe der Cineromycine angehören. Hierbei wurden sowohl glykosylierte (**119**, **120**) als auch nicht-glykosylierte (**121**) Cineromycin-Derivate vorgefunden.

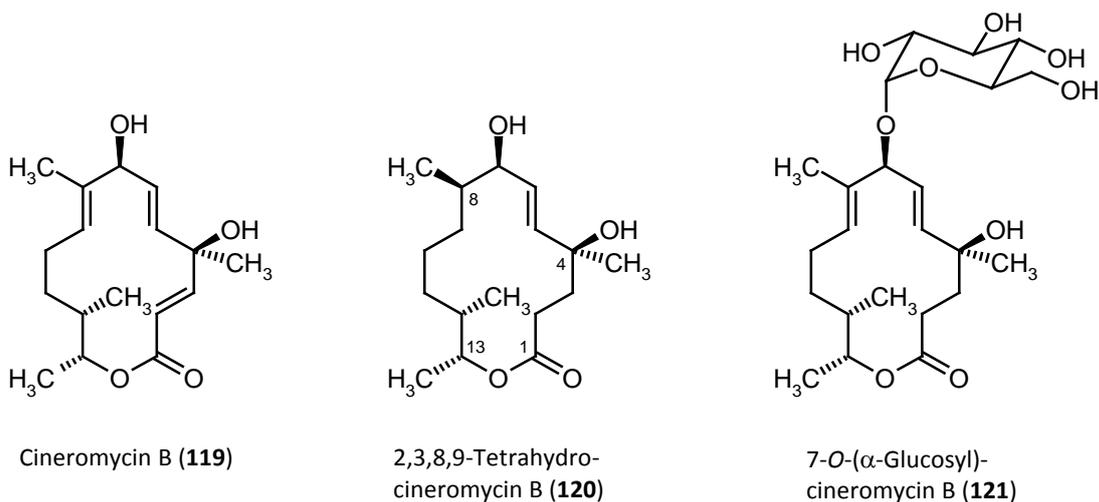
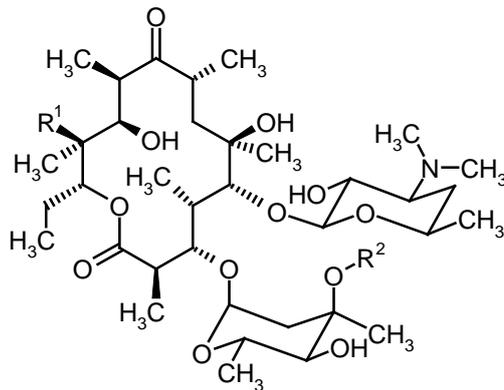


Abbildung 56: Aus *Streptomyces* sp. Gö 40/10 isolierte 14-gliedrige Makrolide.^[192]

An dieser Stelle sei kurz der wohl bekannteste Vertreter der Makrolide, das Erythromycin A (**122**) erwähnt. **122** stellt eine der bedeutendsten Leitsubstanzen der Makrolidantibiotika dar. Es dient – in Mischung mit Erythromycin B (**123**) und C (**124**) – als Alternativ-

Antibiotikum, das vornehmlich dann angewendet wird, wenn gegenüber Penicillinen oder Cephalosporinen Resistenzen oder Allergien bestehen.^[197]



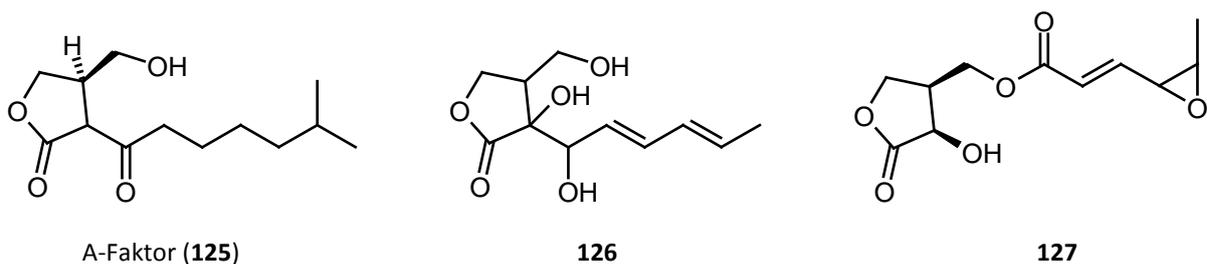
Erythromycin A (**122**): R¹ = OH, R² = CH₃

Erythromycin B (**123**): R¹ = H, R² = CH₃

Erythromycin C (**124**): R¹ = OH, R² = H

Abbildung 57: Die aus *Streptomyces erythreus* isolierten Makrolidantibiotika der Erythromycin-Familie.

Von allen bekannten Naturstoffen beinhalten ca. 10 % eine γ -Butyrolacton-Einheit als charakteristisches Strukturelement.^[198] Die Mehrzahl dieser Lactone gehören der Klasse der Sesquiterpene an und viele der mehr als 6000 bekannten Lactone zeichnen sich besonders durch ihre biologische Aktivität aus, wie z.B. der A-Faktor (Autoregulatory Factor) (**125**).^[199] **125** wurde erstmals 1976 aus *Streptomyces griseus* isoliert, wo er die Biosynthese des Antibiotikums Streptomycin und die Sporenbildung in speziellen Perioden des Lebenszyklus induziert. Der A-Faktor wird daher als „mikrobielles Hormon“ angesehen. Aus dem Stamm Gö 40/10 konnten zwei neue γ -Butyrolactone (**126**, **127**) isoliert werden, für die bisher allerdings keine biologische Aktivität gefunden werden konnte.



A-Faktor (**125**)

126

127

Abbildung 58: Der als „mikrobielles Hormon“ bezeichnete A-Faktor (**125**) aus *Streptomyces griseus* sowie aus Gö 40/10 isolierte γ -Butyrolactone^[192] **126** und **127**.

5.1.2 Taxonomische Charakterisierung von *Streptomyces* sp. Gö 40/10

Als Auftragsarbeit wurden Bereiche der 16S rDNA des Stamms Gö 40/10 durch die Firma *Biotecon Diagnostics* (Potsdam) sequenziert. In einem Alignment mittels BLAST^[61] konnte

eine jeweils 100 %ige Übereinstimmung mit *Streptomyces coelestis* bzw. *Streptomyces cinerochromogenes* festgestellt werden. Eine weitere Unterscheidung war aufgrund des untersuchten Genbereichs nicht möglich. Ein Vergleich dieser Spezies im ‚Compendium of Actinomycetales‘^[64] zeigte, dass eine weitere Differenzierung auf Grundlage der Zuckerverwertung möglich sein sollte. Die Verwertung dieser sogenannten ISP-Zucker (‚International *Streptomyces* Project‘) wurde durch die DSMZ (Braunschweig) untersucht. Zusätzlich wurde der Stamm Tü 1892 in dieses Experiment mit einbezogen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 11 zusammengefasst.

Tabelle 11: Vergleich der Melaninproduktion und Zuckerverwertung der Stämme Gö 40/10 und Tü 1892 sowie *Streptomyces collinus* (DSMZ-Nr. 40129), *Streptomyces coelestis* (DSMZ-Nr. 40421) und *Streptomyces cinerochromogenes* (DSMZ-Nr. 41651). Die Experimente erfolgten durch die DSMZ (Braunschweig). +: positiv; -: negativ; v: variable Ergebnisse; n.b.: nicht bestimmt.

	Gö 40/10	Tü 1892	<i>S. collinus</i>	<i>S. coelestis</i>	<i>S. cinerochromogenes</i>
Melaninproduktion auf					
Pepton-Eisen	+	+	n.b.	n.b.	n.b.
Tyrosin	+	+	n.b.	n.b.	n.b.
ISP-Zucker als C-Quelle					
Glucose	+	+	-	n.b.	+
L-Arabinose	+	+	-	+	-
Saccharose	+	+	-	v	+
D-Xylose	+	+	-	+	-
Inositol	+	+	+	+	+
Mannitol	+	+	-	n.b.	+
D-Fructose	+	+	-	+	+
Rhamnose	+	+	+	+	-
Raffinose	+	+	+	v	+

Besonders auffällig ist die vollständige Übereinstimmung der Ergebnisse von Gö 40/10 und Tü 1892 sowohl für die Melanin-Produktion auf unterschiedlichen Medien als auch der Zuckerverwertung. Diese Tatsache ist besonders verwunderlich, da eine große Abweichung der Ergebnisse von Tü 1892 zu *S. collinus* besteht, obwohl der Stamm in diese Spezies klassifiziert wurde. An dieser Stelle können dafür zwei Erklärungsversuche angeführt werden: Zum einen entsprechen die vorliegenden Daten von *S. collinus* dem von der DSMZ als „Typ-Stamm“ bezeichneten Streptomyceten. Um welche Subspezies es sich hierbei

handelt, ist nicht angegeben; eine Abweichung der Kohlenstoffquellen bei verschiedenen Subspezies ist denkbar. Für weitere Stämme vom Typ *S. collinus* liegen bei der DSMZ keine Daten über die Zuckerverwertung vor. Ein zweiter Erklärungsversuch mag trivial erscheinen, soll aber an dieser Stelle nicht unerwähnt bleiben. Durch die bereits über mehrere Jahre erfolgte Nutzung des Stamm-Materials kann es irgendwann schlichtweg zu einer Verwechslung von Gö 40/10 und Tü 1892 gekommen sein. Beide Stämme weisen ein identisches Erscheinungsbild beim Wachstum auf Festphasen-Medium auf. Eine abschließend durchgeführte 16S rDNA Analyse des Stamms Tü 1892 durch die Firma *Biotecon Diagnostics* (Potsdam) bestätigte seine Zugehörigkeit zur Klasse *S. cinerochromogenes*. Hieraus kann abschließend vermutet werden, dass es bei der ursprünglichen taxonomischen Klassifizierung zu einer Fehleinordnung gekommen war, da diese ohne eine Analyse des Genoms erfolgte.

Für den Stamm Gö 40/10 ist eine größere Übereinstimmung der Zuckerverwertung mit *Streptomyces coelestis* festzustellen. Hierbei können besonders die Zucker L-Arabinose, D-Xylose und Rhamnose hervorgehoben werden, welche von *S. cinerochromogenes* nicht verwertet werden. Somit wird im Folgenden davon ausgegangen, dass der Stamm Gö 40/10 der Spezies *S. coelestis* angehört.

5.2 Collinolacton (20) – Struktur und biologische Aktivität

Bei Collinolacton (**20**) handelt es sich um einen sowohl aus Tü 1892 als auch aus Gö 40/10 isolierten Sekundärmetaboliten. **20** eröffnet mit seinem „ungewöhnlichen“ Molekülgerüst eine neue Substanzklasse von Naturstoffen. Zeitweise auch als „Makrolid mit Taille“ bezeichnet, besitzt **20** ein 7-10-6-Ringgerüst, welches aus einem Cyclodecatrien sowie zwei Lactonringen besteht.

Dieser Metabolit wurde im Arbeitskreis ZEECK bereits über mehrere Jahre bearbeitet und eröffnet dabei immer neue Perspektiven. Die erste Charakterisierung erfolgte 1991 durch R. KIND im Rahmen eines chemischen Screenings des Stammes Tü 1892.^[191] Jedoch konnten aufgrund fehlender heteronuklearer Korrelationsexperimente nur zwei Strukturelemente von **20** postuliert werden. Während eines Screenings des Streptomyceten Gö 40/10 durch H.-J. SCHIEWE wurde eine Substanz mit gleichen physikochemischen Eigenschaften wie **20** isoliert. Diese wies im NMR-Spektrum einen doppelten Signalsatz auf, der auf ein Isomerenverhältnis von 4:1 schließen ließ. H.-J. SCHIEWE formulierte einen ersten

Strukturvorschlag für **20** und begründete das Auftreten des doppelten Signalsatzes mit dem Vorhandensein eines *E/Z*-Isomergemisches von **20**.^[192] Diese Behauptung konnte durch anschließende temperaturabhängige NMR-Experimente widerlegt werden, wodurch L. HOFFMANN zu dem Schluss kam, dass der doppelte Signalsatz durch eine dynamische Rotationsisomerie von **20** begründet werden kann (s. Abbildung 59).^[41] Dabei handelt es sich bei der Minderkomponente im NMR-Spektrum um eine Verbindung gleicher Stereokonfiguration, die durch Rotation des Molekülfragments C-14/C-15/C-19 um die Bindungen C-13a/C-14 und C-15/C-15a mit seiner Hauptkomponente im dynamischen Gleichgewicht steht.

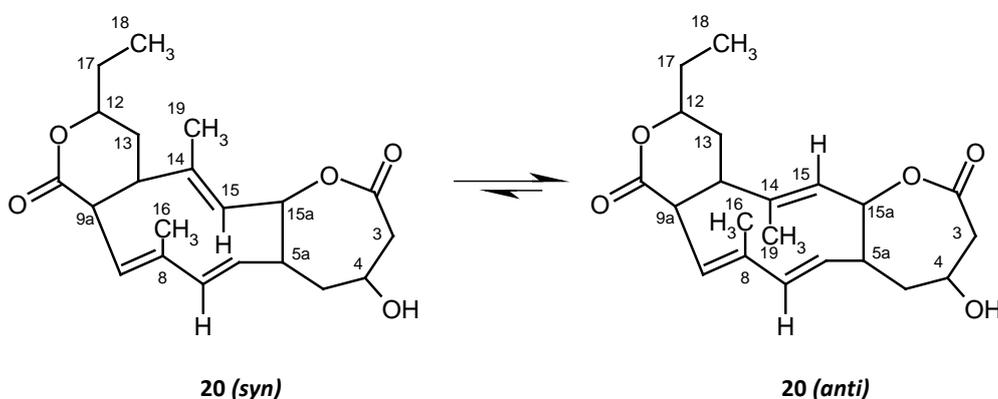


Abbildung 59: Collinolacton (**20**), erster Vertreter einer neuen Naturstoffklasse. Dargestellt sind die beiden Rotamere von **20**, wobei das Gleichgewicht auf der Seite der *anti*-Form liegt.^[41]

Eine Bestimmung der absoluten Stereokonfiguration von **20** sollte mittels röntgenographischer Untersuchungen vorgenommen werden. Da von Collinolacton (**20**) selbst keine für die Röntgenstrukturanalyse geeigneten Kristalle gewonnen werden konnten, führte L. HOFFMANN umfangreiche Derivatisierungen, vornehmlich an der 4-Hydroxygruppe, durch. Eine Kristallisation, auf dessen Grundlage die Stereokonfiguration ermittelt wurde, gelang allerdings nur mit einem Derivat ohne intaktes Cyclodecatrien-Grundgerüst (hier nicht dargestellt).

In den Untersuchungen zur biologischen Aktivität von **20** zeigten dagegen die 4-Hydroxy-Derivate ein besonderes Potential. Auch wenn weder Collinolacton (**20**) selbst noch seine Derivate eine antibakterielle noch antifungale Aktivität im Plattendiffusionstest aufwiesen, fielen besonders die 4-Hydroxy-Derivate durch ihre Zytotoxizität (im μM -range) gegenüber Mammakarzinom-Zellen (Zelllinie MCF 7) auf. In weiteren Bio-Assays wurde der Einfluss der aktiven Derivate auf eine proliferationshemmende Wirkung untersucht. Besonders

interessant waren Veränderungen im Mikrotubulinetzwerk der eingesetzten PtK2-Zellen, die mit 4-*O-p*-Brombenzoylcollinolacton (**128**) behandelt wurden. Hierbei konnte reproduzierbar eine monoastrale Halbspindelbildung anstatt des normalen, bipolaren Spindelapparates festgestellt werden (s. Abbildung 60). Dieses Phänomen wurde erstmals durch MAYER *et al.*^[200] an Monoastrol (**129**) beschrieben und trat bisher nur bei Inhibitoren des Motorproteins Eg5 auf.

Aufgrund einer möglichen Nutzbarkeit für die Krebstherapie und für Zellzyklus-Untersuchungen rückte das Target von **128** ins Interesse der Untersuchungen. Es stellte sich die Frage, ob das Collinolacton-Derivat **128** als weiterer Inhibitor von Eg5 eingeordnet werden kann oder ob ein bisher unbekanntes Target adressiert wird.

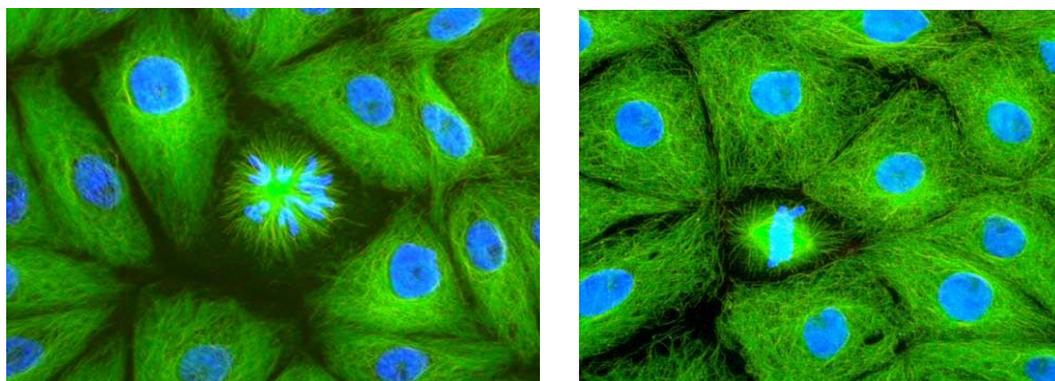
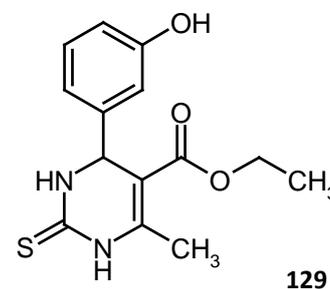
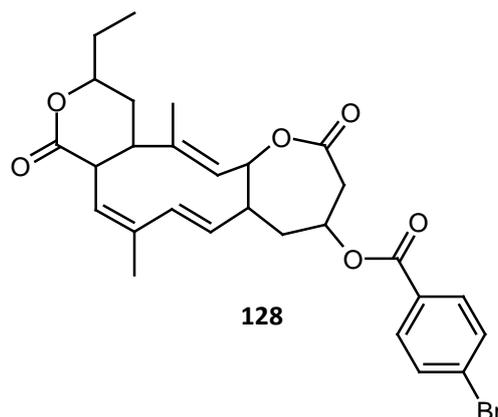


Abbildung 60: PtK2-Zellen nach Inkubation mit 4-*O-p*-Brombenzoylcollinolacton (**128**): monoastrale Spindelbindung (links) und normale bipolare mitotische Spindeln der PtK2-Zellen (rechts, Kontrolle). Mikrotubuli wurden durch Immunfluoreszenz grün markiert, Zellkerne und Chromosomen mit DAPI blau.

Während der Diplomarbeit von J.-N. FRICKE konnte das Spektrum an Collinolacton-Derivaten erweitert werden (s. Abbildung 61) und es wurden Untersuchungen bezüglich eines möglichen Targets vorgenommen.^[201] Weiterhin wird dem 4-*O-p*-Brombenzoyl-Derivat (**128**) die bedeutendste biologische Aktivität zugemessen. Dabei konnte festgestellt werden, dass **128** ein Eg5-unabhängiges – und damit vermutlich neuartiges – Target adressiert. Folglich liegt der Schlüssel zu weiteren, potentiell aktiven Derivaten in einem tiefgreifenden

Verständnis von Struktur und biochemischer Funktion des Collinolactons (**20**). Neben einem synthetischen Konzept ist hierbei ebenso eine Manipulation auf biosynthetischem Weg erstrebenswert. Aus diesem Grund finden die von L. HOFFMANN zur Aufklärung der Biosynthese von **20** durchgeführten Vorarbeiten im Rahmen dieser Arbeit ihre konsequente Fortsetzung.

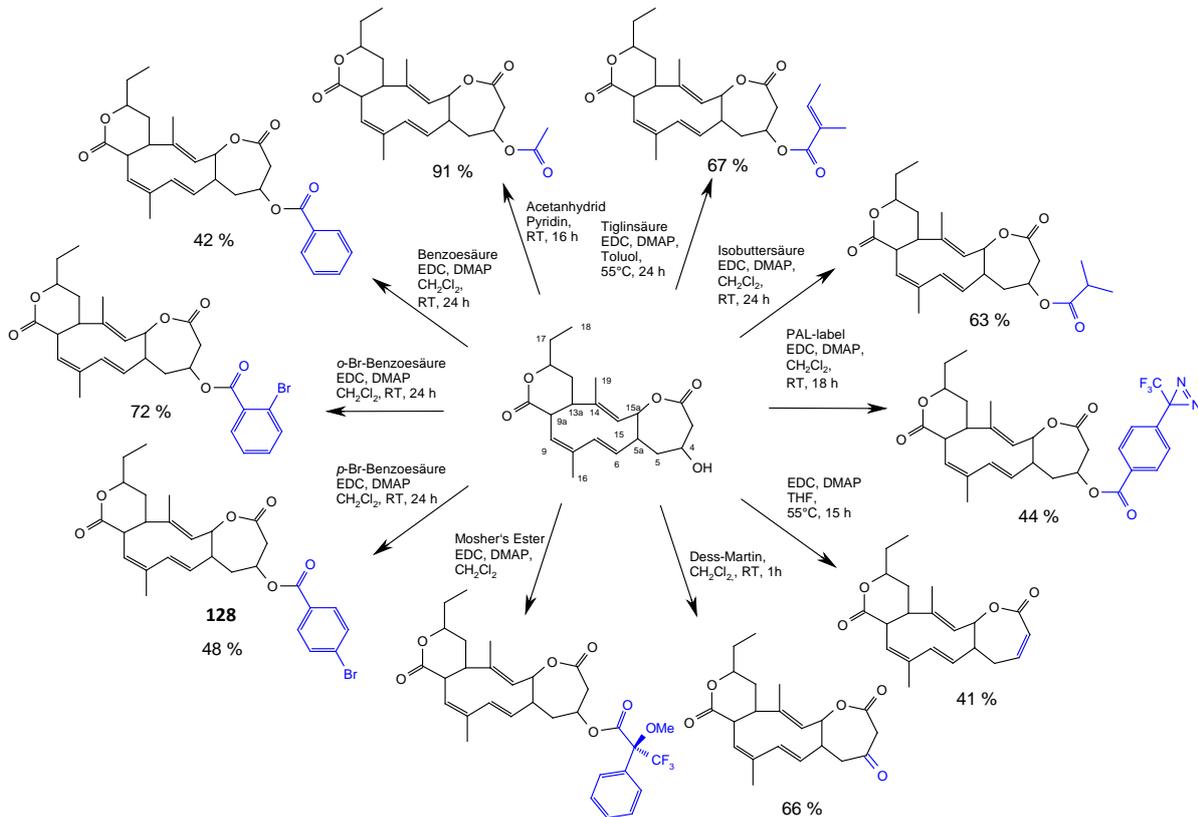


Abbildung 61: Im Arbeitskreis synthetisch hergestellte Derivate des Collinolactons (**20**).^[41,201]

5.3 Biosynthese des Collinolactons (**20**)

Bisher konnte die Biosynthese des Collinolactons (**20**) aufgrund von Fütterungsexperimenten mit isotope-markierten Vorläufern nur postuliert werden. Basierend auf diesen Ergebnissen wird eine Biosynthese vermittelt durch eine Polyketidsynthese von Typ I (PKS I) angenommen.^[41] Hierbei bildet Propionat die Startereinheit und es erfolgen Kettenverlängerungsschritte durch sechs Acetat- und zwei weiteren Propionat-Einheiten, die zur Bildung eines Nonaketids führen (**130**). Ungewöhnlich für einen Mechanismus vom PKS I-Typ war die Tatsache, dass die Acetat- bzw. Propionat-Einheiten in **20** als C=C-Doppelbindung vorgefunden wurden, was gewöhnlich selten der Fall ist. Nach Ausbildung des Makrolactons (**131**) durch die PKS I werden zwei Ringschlüsse zur Ausbildung des 7-10-6-

Trizuklus angenommen, die in der Summe wie eine [6+4]Cycloaddition postuliert werden. Dieser Schritt ist bisher jedoch noch für keinen Sekundärmetaboliten aus Mikroorganismen sowie Pflanzen formuliert worden. Ferner konnte das gebildete Intermediat Collinoketon (**132**) bisher in keiner Kultivierung von Gö 40/10 bzw. Tü 1892 nachgewiesen werden. Durch Fermentation in $^{18}\text{O}_2$ angereicherter Atmosphäre konnte Luftsauerstoff als Quelle des O-1 von **20** vermutet werden. Dieses insertierte in eine intakte Acetat-Einheit, was aus dem Einbaumuster deutlich wird (vgl. Abbildung 62). Der Einbau von Luftsauerstoff ließ den Schluss zu, dass das 7-Ring-Lacton während der späten Biosynthese, vermutlich als post-PKS Reaktion, durch oxidative Ringerweiterung aufgebaut wird. Für diese Biosynthese-Stufe wurde eine Baeyer-Villiger Oxidation postuliert, deren Mechanismus die Befunde plausibel erscheinen lässt.

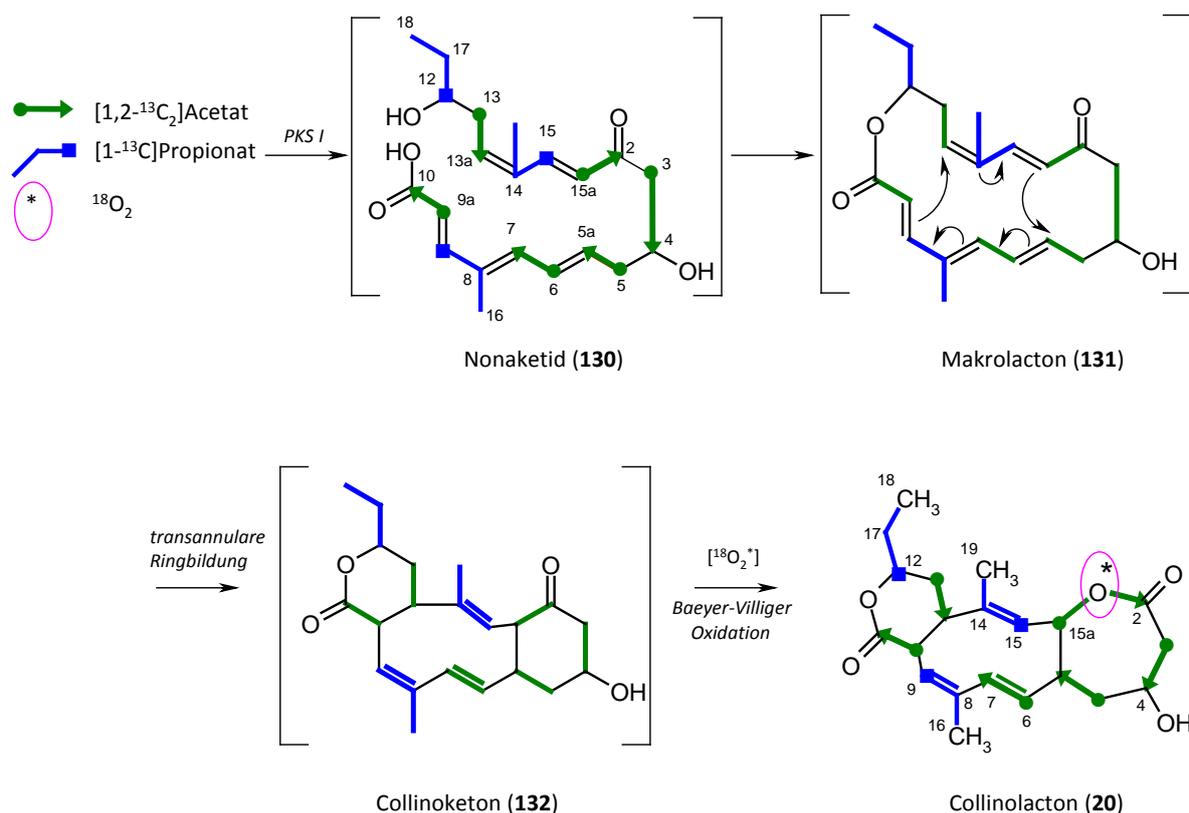


Abbildung 62: Auf der Grundlage von Fütterungsexperimenten mit isotopenmarkierten Vorläufern postulierte Biosynthese des neuartigen Sekundärmetaboliten Collinolacton (**20**).^[41]

5.4 Die Baeyer-Villiger Oxygenase (BVO) als Grundlage molekulargenetischer Arbeiten am Collinolacton (20)

5.4.1 Naturstoff-Biosynthesen mit putativer Baeyer-Villiger Oxygenase

Oxygenasen sind Enzyme, die reaktiv Sauerstoff aktivieren und diesen in Substrate einbauen. Baeyer-Villiger (Mono)Oxygenasen (BV(M)O) gehören zur Klasse der Oxidoreduktasen und überführen aliphatische, arylaliphatische und cyclische Ketone in Ester bzw. Lactone.^[202,203] Bei den Monooxygenasen, wie z.B. im Falle des Collinolactons (**20**), vermutet man, dass nur ein O-Atom des molekularen Sauerstoffs übertragen wird.

1948 wurde die erste „biologische“ Baeyer-Villiger Oxidation für die Biotransformation von Steroiden in Pilzen beschrieben.^[204] Seither wurden viele Baeyer-Villiger Reaktionen in biosynthetischen Abläufen beschrieben.^[205] Alle heute bekannten bakteriellen BMVOs sind NAD(P)H- oder NADH-abhängige Flavinproteine. Flavinadenindinukleotid (FAD) und Flavinmononukleotid (FMN) sind die beteiligte Coenzyme dieser Flavin-abhängigen Monooxygenasen. BVMOs werden in zwei Gruppen unterteilt, wobei die Kategorisierung anhand ihres Coenzym-Gebrauchs vorgenommen wird: Typ I-BVMOs gebrauchen NADPH und FAD, wohingegen Typ II-BVMOs NADH und FMN benötigen. Fast alle bisher beschriebenen BVMO gehören zum Typ I; nur zwei Typ II-BVMOs sind bisher für den Stamm *Pseudomonas putida* PpG1 charakterisiert worden.^[206]

Die Reaktionen entsprechen der chemischen Baeyer-Villiger Oxidation, die normalerweise durch Peroxosäuren katalysiert wird und über einen zweistufigen Mechanismus verläuft.^[207]

Der allgemein akzeptierte Mechanismus auf enzymatischer Ebene basiert auf Untersuchungen zur Cyclohexanon-Monooxygenase (CHMO), welche erstmals aus *Acinetobacter calcoaceticus* isoliert wurde.^[208] Der Mechanismus ist in Abbildung 63 dargestellt.

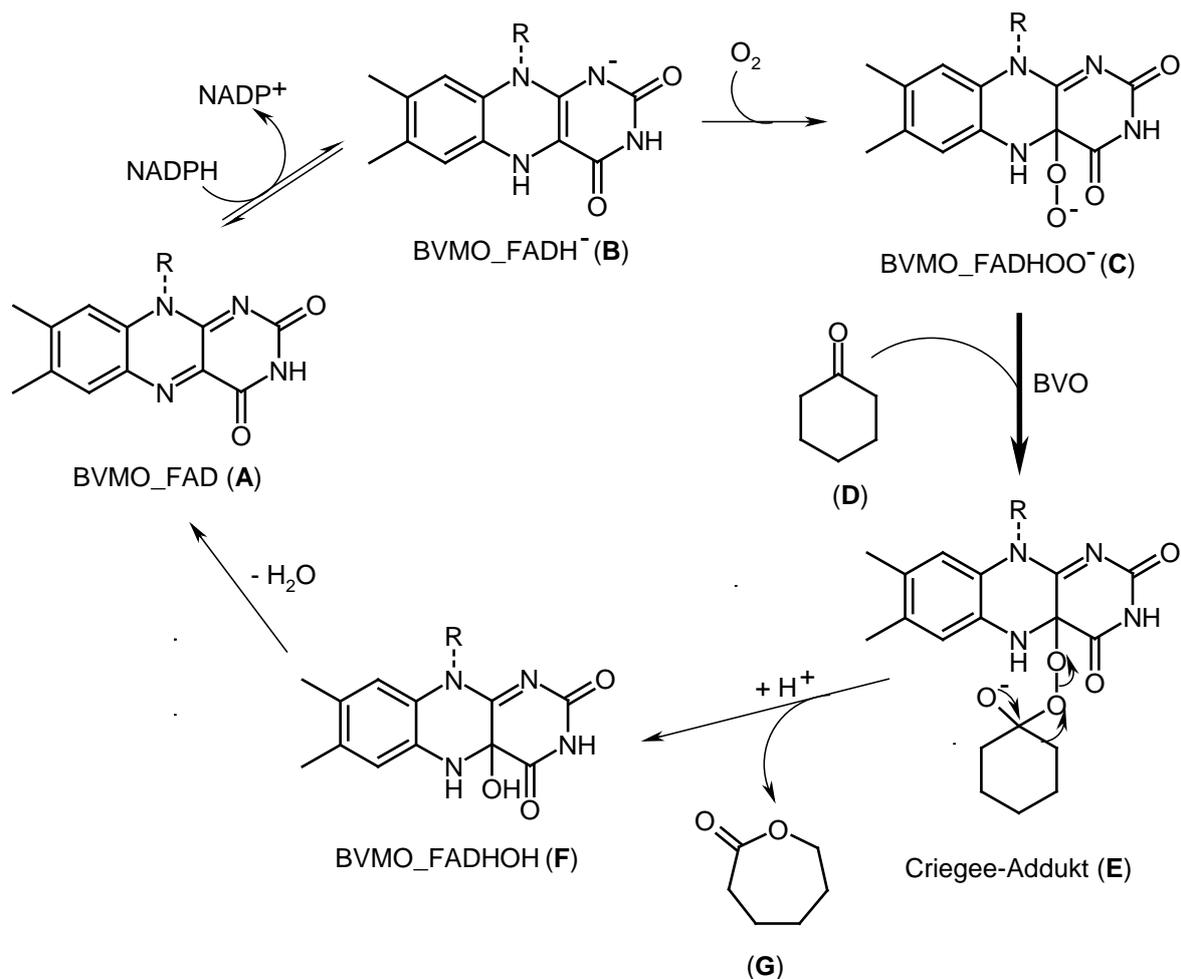


Abbildung 63: Mechanismus der Baeyer-Villiger Oxidation bei Flavin-abhängigen Monooxygenasen.^[202]

Für Biosynthesen von Sekundärstoffen aus Streptomyceten wurden bereits eine Reihe von BVO-Genen charakterisiert. Als Beispiel sei hier kurz die Biosynthese von Urdamycin L (**133**), einem Sekundärstoff aus der Klasse der Angucycline^[209] erwähnt. Die Biosynthese von **133** verläuft über den instabilen Vorläufer UWM 6 (**134**), welcher über eine Baeyer-Villiger Oxidation in **135** umgewandelt wird (vgl. Abbildung 64). Molekularer Sauerstoff wird dabei zwischen C-12b und C-1 unter Bildung des Siebenring-Lactons **135** eingeführt. Durch weitere Oxidation und Wasserabspaltung wird **133** gebildet. Für die BVO konnte das Gen *urdM* charakterisiert werden.^[210]

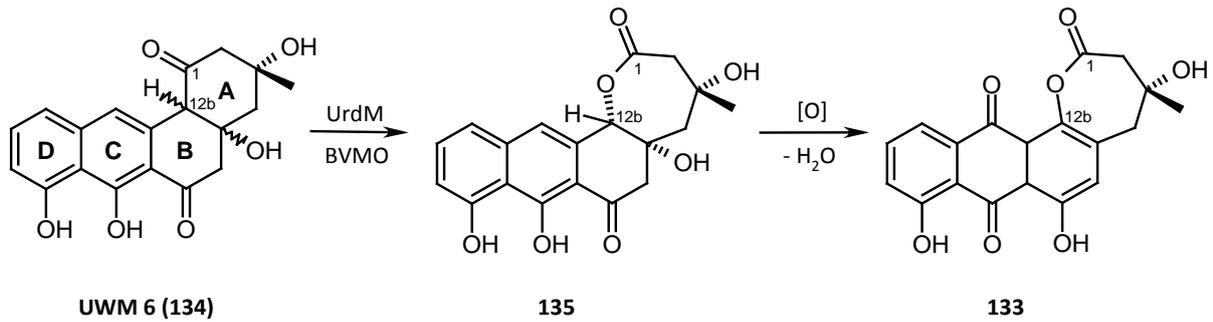


Abbildung 64: Postulierte Biosynthese für die Bildung von Urdamycin L. Ein Reaktionsschritt wird als Baeyer-Villiger Oxidation angenommen.^[210]

In der Literatur ließen sich weitere Vertreter der Angucycline finden, die eine BVO zum Aufbau ihrer Struktur nutzen. Dazu zählen beispielsweise Jadomycin B (**136**)^[211] oder Landomycin E (**137**)^[212]. Auch für den Aufbau der Naturstoffe Mithramycin (**138**) und β -Rubromycin (**139**) wurden Gene postuliert, die eine Baeyer-Villiger Monooxygenase codieren sollten.

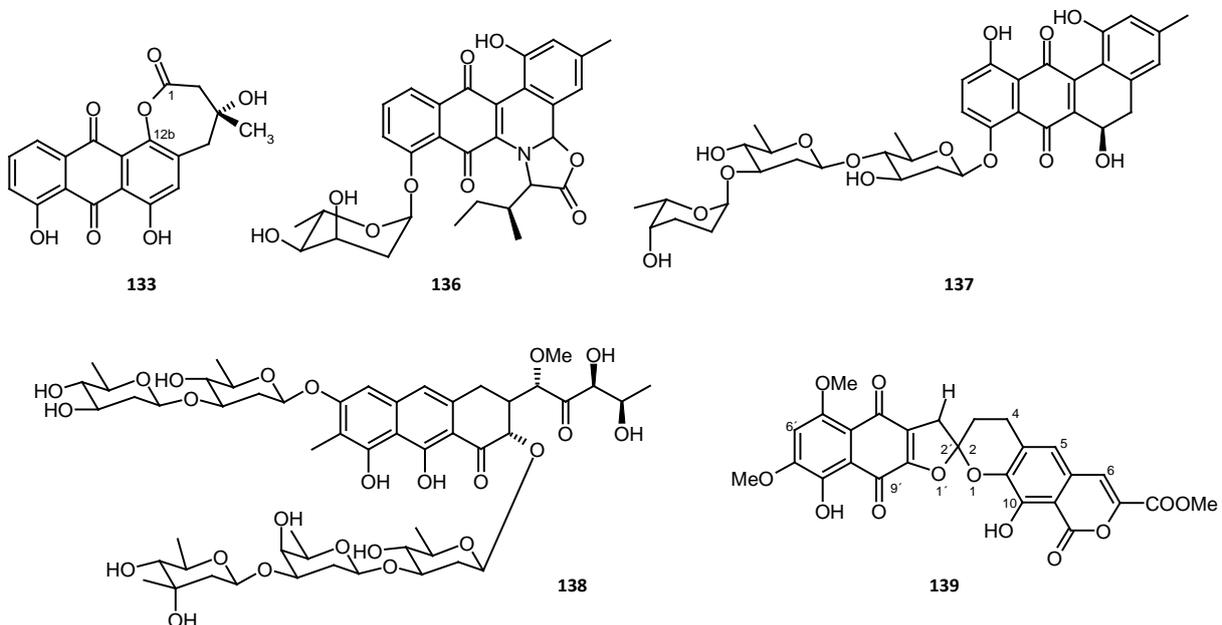


Abbildung 65: Literaturbekannte Vertreter, für deren biosynthetischen Aufbau eine Baeyer-Villiger Monooxygenase postuliert wurde.

5.4.2 Aufbau einer Cosmid-Genbank von *Streptomyces* sp. Gö 40/10

Die Sequenzierung des Gesamtgenoms eines Streptomyceten ist prinzipiell möglich, wenngleich auch extrem kostspielig. Dies wird deutlich, wenn man eine durchschnittliche Größe des Genoms von 8-10 Mb berücksichtigt, was ca. 7000-8000 Genen entspricht. Bis heute sind 82 Genome von Mikroorganismen komplett sequenziert, von denen drei der Gruppe der Streptomyceten angehören (*S. avermitilis*, *S. coelicolor* und *S. griseus*).^[213]

Ziel der Arbeiten am Collinolacton (**20**) ist das Auffinden des Biosyntheseclusters, um einerseits die Hypothese zur Biosynthese zu bestätigen und ferner gezielte Modifikationen an **20** in Hinblick auf bioaktive Derivate vornehmen zu können.

Aus diesem Grund wurde in Zusammenarbeit mit der Firma *Combinature* (Berlin) eine Genombibliothek des Produzentenstammes Gö 40/10 in dem integrativen Vektor pOJ436^[214] angelegt. Die genomische DNA des Stammes wurde hierzu partiell mit dem Restriktionsenzym *Sau3A* gespalten, wodurch DNA-Fragmente einer Größe von ca. 35 kb entstanden. Diese wurden über eine *Bam*HI-Schnittstelle in das 11.1 kb große Integrations-system (pOJ436) ligiert, welches zur späteren Selektion eine Apramycin-Resistenzkassette vorweist. Die Amplifikation erfolgte mittels *E. coli* DH5 α . Zur Reduktion der großen Anzahl an Cosmid-Klonen wurde die Genbank mit Fragmenten von Typ I-Polyketidsynthasen gescreent (KS-AT-Sonde PKS1-2214). Hierbei wurde die Annahme zugrunde gelegt, dass Collinolacton (**20**) biosynthetisch durch eine PKS I aufgebaut wird. Als weitere Einschränkung erfolgte ein zusätzliches Sonden-Screenings auf Biosynthesegene der Ansamycine, die ebenfalls von Gö 40/10 produziert werden. Diese werden biosynthetisch durch AHBA (Aminohydroxybenzoesäure) als Startereinheit aufgebaut, weshalb im Screening eine AHBA-Sonde (DEG-AHF2) Verwendung fand. Als Konsequenz konnte die Anzahl an Cosmid-Klonen auf 81 reduziert werden, welche sowohl PKS I-positiv als auch AHBA-negativ gescreent wurden. Die Genabschnitte von Gö 40/10 in diesen Cosmiden sind allerdings nicht abschnittsweise verteilt, sondern sollten stellenweise Überlappungen besitzen. Da bei einem Verdau von Cosmid-DNA mit Restriktionsenzymen charakteristische Bandenmuster entstehen, können diese identischen oder zum Teil überlappenden Cosmide über einen Vergleich der Restriktionsmuster identifiziert und so die Zahl der näher zu untersuchenden Cosmide weiter verringert werden. Hierzu wurde ein Verdau der Cosmide mit dem Enzym *Bam*HI durchgeführt und die Cosmide über ihre Restriktionsmuster im Agarosegel in acht

Familien kategorisiert. Im Rahmen dieser Arbeit wurden hiervon vier (Gö2214-57, Gö2214-61, Gö2214-70, Gö2214-102) für eine weitere Bearbeitung ausgewählt.

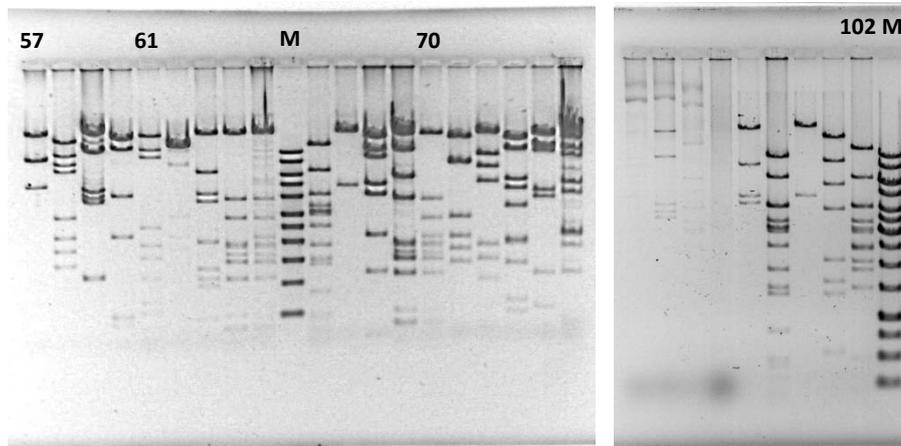


Abbildung 66: Cosmide der Genbank des Stamms Gö 40/10 nach *Bam*HI-Verdau. Die Auftrennung erfolgte per Agarosegel und Anfärben mit Ethidiumbromid bei 302 nm. 57/61/70/102: Laufende Nummern der Cosmide; M: DNA-Marker Typ ‚1 kb‘ (1000-10000 bp).

Als auffällig erwies sich das Fehlen der gemeinsamen Vektorbande einer Größe von 11.1 kb, die nach „Ausschneiden“ der Inserts im Agarosegel zu erkennen sein müsste. Vermutlich ist die *Bam*HI-Schnittstelle während der Ligation so modifiziert, dass kein Verdau mehr durch das Restriktionsenzym erfolgen konnte. Somit entstammt die größte Bande im Agarosegel dem eigentlichen Vektor plus einem Stück des Inserts (von Klonierungsstelle bis zur nächsten *Bam*HI-Schnittstelle).

5.4.3 Design von BVO-spezifischen Primern für die PCR

Unter Primern versteht man kurze Oligonukleotide, die als Startpunkt für die DNA-Replikation dienen. Da fast alle DNA-Polymerasen nicht *de novo* in der Lage sind, einen neuen DNA-Strang zu synthetisieren, benötigen sie eine 3'-Hydroxygruppe als Startpunkt für die DNA-Synthese. Diese 3'-OH-Gruppe kann durch passende Primer zur Verfügung gestellt werden. *In vivo* wird diese Aufgabe durch eine RNA-Polymerase (Primase) übernommen, wobei ein kurzes RNA-Startmolekül erzeugt wird, welches der DNA-Polymerase als Primer für die Elongation dient. Bei *in vitro* Amplifikationsreaktionen, wie der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) werden ebenfalls Primer benötigt. Der Vorteil liegt darin, dass durch Design passender Primer gewünschte DNA-Abschnitte gezielt vervielfältigt werden.

Voraussetzung hierfür bildet die Spezifität der Primer, denn die Primer müssen zu einer möglichst einmaligen Sequenz im Genom komplementär sein, um falsche Amplifikate zu vermeiden. Die typische Länge von Primern für die PCR liegt bei 18-30 Basen. Zu kurze Primer (< als 15 Nukleotide) binden zwar effizienter, weisen aber häufig eine zu geringe Spezifität auf. Sehr lange Primer erhöhen wiederum die Spezifität, jedoch geht hier eine niedrigere Annealing-Effizienz mit einer verringerten Produktausbeute einher. Als Konsequenz des hohen GC-Gehaltes (Guanin/Cytosin) des Streptomyces-Genoms ($70 \pm 10\%$) sollte auch der GC-Gehalt der Primer bei ca. 60% liegen. Allerdings sollten Poly-G- und Poly-C-Bereiche in den Primern vermieden werden, da dies zu einer verminderten Spezifität führen würde. Als wesentliches Kriterium beim Design von Primern wird ihre Schmelztemperatur angesehen, da hieran die Annealing-Temperatur während der PCR festgelegt wird. Die verwendeten Primer sollten eine Schmelztemperatur besitzen, die ein Annealing im Bereich von 55-65 °C erlaubt. Als grobes Maß wurde für die in dieser Arbeit designten Primer versucht, eine Schmelztemperatur 2-6 °C höher als die PCR-Annealing-Temperatur zu erhalten.

Sequenzen von bekannten Baeyer-Villiger Monooxygenasen (BVMOs) sind im Durchschnitt zwischen 500 und 550 Aminosäuren lang und enthalten charakteristisch zwei sogenannte Rossmann-Motive (GXGXX(G/A)) für die Bindung der Adenosin-Einheit der Cofaktoren.^[215] Eines hiervon liegt nahe dem N-Terminus und ein zweites ca. 200 Aminosäuren davon entfernt. Jedoch stellt das Rossmann-Motiv keine rein für BVMOs spezifische Domäne dar, da hierdurch generell alle FAD-abhängigen Enzyme codiert werden. Erfolgte das Primer-Design allein auf Grundlage dieses Motivs, wären die Primer sehr unspezifisch; alle Gene, die für FAD-abhängige Enzyme codieren, könnten damit in der PCR amplifiziert werden. FRAAIJ *et al.* postulierten auf Grundlage von Arbeiten an *Pseudomonas fluorescens* einen für BVMOs charakteristischen Fingerprintbereich (FXGXXXHXXXW(P/D)), der eine Unterscheidung von anderen Flavin-abhängigen Monooxygenasen (FMOs) ermöglicht.^[216] Dieser konnte durch eine ‚Multiple-Sequence-Alignment‘ von diversen Flavoprotein-Monooxygenasen identifiziert werden.

Für die hier ermittelten Primer wurden die Vorarbeiten von L. HOFFMANN^[41] zugrunde gelegt, die sich ebenfalls mit dem Design von BVO-Primern beschäftigten. Da bei den dort durchgeführten Amplifikationsversuchen jedoch keine eindeutigen Amplifikate gewonnen

wurden, sollte das Primerdesign an dieser Stelle neu durchdacht werden. Als Anknüpfungspunkt diene ein Alignment von Aminosäure-Sequenzen putativer BVMOs. Dabei wurde auf Sequenzähnlichkeiten in Hinblick auf vermutlich konservierte Bereiche geprüft.

Relativ zu Beginn der Sequenz (Richtung *N*-Terminus) lässt sich das in der Literatur beschriebene Rossmann-Motiv wiederfinden (vgl. Abbildung 67). Allerdings konnten das zweite Rossmann-Motiv sowie der von FRAAIJE *et al.* postulierte BVMO-Fingerprintbereich nicht mit einer erkennbaren Homologie identifiziert werden. ROHR *et al.* gingen von der Annahme aus, dass speziell für BVMOs vom Typ I zusätzlich zu den drei Glycin-Einheiten im Rossmann-Motiv Asparaginsäure (D) – fünf Aminosäuren Richtung *N*-Terminus entfernt – als Adenosin-Bindungsmotiv von FAD in Frage kommt.^[211] In dem hier dargestellten Alignment (vgl. Abbildung 67) fällt auf, dass diese Aminosäure nur teilweise in den Sequenzen vorkommt. Aufgrund des nicht homologen Zwischenbereichs (zwischen Asparaginsäure und Rossmann-Motiv) erschien es nicht sinnvoll, diesen Bereich für ein Primer-Design auszuwählen. Dem Alignment ist jedoch zu entnehmen, dass *C*-terminal direkt an das Rossmann-Motiv angrenzend eine auffällig homologe Sequenz aus sieben Aminosäuren (LMLAGEL) vorliegt. Diese ist bisher noch nicht in der Literatur als konservierte Region für BVMOs beschrieben worden. Unter Einbezug des Rossmann-Motivs wurde dieser Bereich für das Design des Forward-Primers ausgewählt.

Zwei weitere Bereiche – ca. 150 bzw. ca. 215 Aminosäuren in Richtung *C*-Terminus – wiesen eine für das Primer-Design geeignete Homologie auf, so dass hiermit Reverse-Primer erstellt wurden. Die so entwickelten Primerpaare sollten bei ausreichender Spezifität zu Amplifikaten einer Größe von 450 bzw. 645 bp führen.

CLUSTAL W (2.0.10) multiple sequence alignment

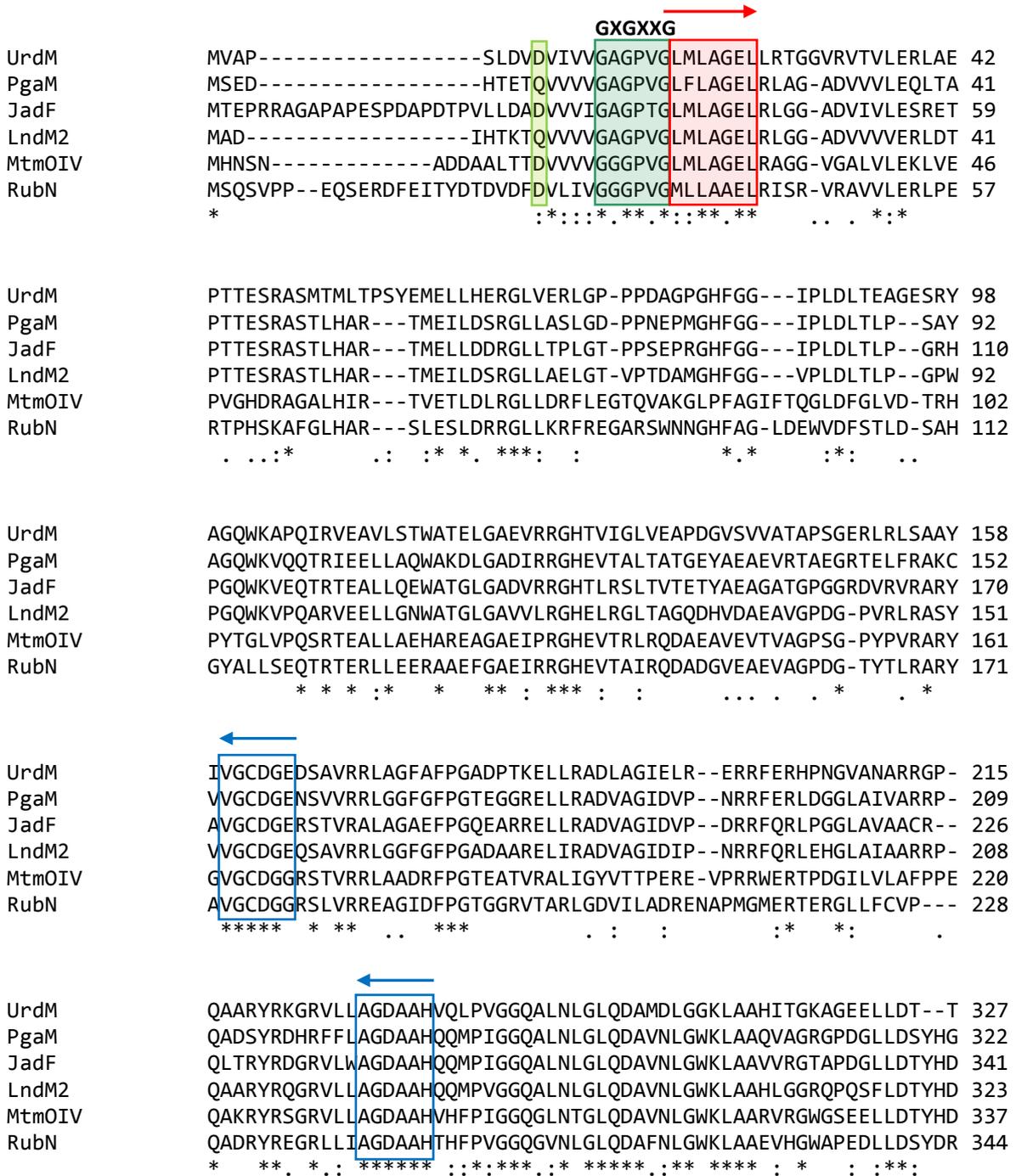


Abbildung 67: Alignment von Aminosäuren-Sequenzen, die putativ Baeyer-Villiger Monooxygenasen codieren. Die Darstellung erfolgte mit Hilfe des Internet-basierten Programms ClustalW.^[217] Homologien werden durch Symbole angegeben: * = 100 % Übereinstimmung; : = Übereinstimmung > 50 %; . = Übereinstimmung ≈ 50 %. Grün dargestellt sind Aminosäuren, die als FAD-Bindestelle in Frage kommen. Das Rossmann-Motiv ist rot unterlegt; weitere als homolog angesehene Sequenzabschnitte sind blau markiert. Pfeile markieren Aminosäuren, die dem Primer-Design zugrunde gelegt wurden.

Forward-Primer

Grundlage für diesen Primer bildet der Abschnitt 5'-GLMLAGEL-3' der Aminosäuresequenz, anknüpfend an das Rossmann-Motiv. Die Aminosäure Leucin (L) kann gemäß genetischem Code durch sechs Codons (CTC/G/T/A und TTG/A) codiert werden. Aufgrund des Nukleotid-Alignments konnte die Verwendung der Codons TTG und TTA jedoch ausgeschlossen werden (vgl. Abbildung 69). Aus diesem Grund reduzierte sich die Anzahl sogenannter ‚Wobble-Positionen‘ im Primer. Hierunter versteht man Positionen, die von mehr als einer Nukleotidbase besetzt werden können. Im Fall des Leucins betrifft das die dritte Base des Triplets. Der eingesetzte Primer besteht dann aus einer Mischung dieser vier Kombinationen (CTC/G/T/A), was die Bindungsmöglichkeit während der PCR erhöht, jedoch zu Lasten der Spezifität gehen könnte.

Anhand der ‚Codon Usage‘ konnte ebenfalls ermittelt werden, dass die dritte Base im Triplett zumeist Cytosin (C) bzw. Guanin (G) ist. Dies wurde bei der Festlegung der ‚Wobble-Positionen‘ ebenfalls berücksichtigt, so dass ein zusätzlicher Primer abgeleitet wurde, der als dritte nur C bzw. G (C/G = S, laut Nukleotid-Code) besitzt. Alle abgeleiteten Primer sind in Kapitel 10.10.1 angegeben.



Abbildung 69: Alignment von Nukleotidbasen, die putativ Baeyer-Villiger Monoxygenasen codieren. Die Darstellung erfolgte mit Hilfe des Internet-basierten Programms ClustalW.^[217]

Reverse-Primer

Es wurden zwei homologe Bereiche der Aminosäure-Sequenz zugrunde gelegt: 5'-VGCDGE-3' und 5'-AGDAAH-3'. Beim Design dieser Primer muss bedacht werden, dass jeder Primer nicht

identisch mit dem späteren DNA-Template sein darf, sondern komplementär dazu. Andernfalls kommt es zwar zur Bindung der Primer, es wird jedoch nicht die zwischen den Primern liegende Sequenz amplifiziert. Da Sequenzen in den Datenbanken nicht vom Doppelstrang hinterlegt sind, sondern jeweils nur ein Strang in 5′–3′-Richtung angegeben wird, bindet der abgeleitete Forward-Primer am – in den Datenbanken nicht vermerkten – Komplementärstrang. Somit muss der ebenfalls aus dem 5′–3′-Einzelstrang abgeleitete Reverse-Primer zu diesem komplementär sein (andernfalls hätte man einen weiteren Forward-Primer). Hierbei ist darauf zu achten, dass der erhaltene, komplementäre Primer nun in 3′–5′-Richtung vorliegt (und somit noch „umgedreht“ („reverse“) gelesen werden muss).

Die wird am Beispiel des Primer für 5′-VGCDGE-3′ exemplarisch gezeigt:

Aminosäure-Sequenz:	5′–V	G	C	D	G	E	–3′
Nukleotid-Sequenz:	5′–GTG/C/T/A	GGG/C/T/A	TGC/T	GAC/T	GGG/C/T/A	GAG/A–3′	
komplementär:	3′–CAC/G/A/T	CCC/G/A/T	ACG/A	CTG/A	CCC/G/A/T	CTC/T–5′	
	3′–CAN	CCN	ACR	CTR	CCN	CTY–5′	
reverse-kompl.:	5′–YTC	NCC	RTC	RCA	NCC	NAC–3′	

Alle abgeleiteten Primer sind in Kapitel 10.10.1 angegeben. Die Primer wurden durch die Firma *Sigma-Aldrich* als Auftragsarbeit synthetisiert. Vor der eigentlichen Synthese erfolgte eine Kontrolle, ob die Primer zur Dimerisierung oder Ausbildung von Sekundärstrukturen neigen können. Dieses konnte nicht festgestellt werden.

CodeHop-Primer

Für das eigentliche Primer-Design stehen mittlerweile verschiedene Softwareprogramme zur Verfügung. Aus diesem Grund wurde das Internet-basierte Programm CodeHop (COnsensus-DEgenerate Hybrid Oligonucleotide Primers)^[219] als zusätzliches Design-Tool verwendet. Das Programm erzeugt eine Art ‚Hybrid-Primer‘, die aus einem sogenannten ‚consensus clamp‘ (ohne ‚Wobble-Positionen‘ am 5′-Ende) und einem kurzen, degenerierten 3′-Ende bestehen (s. Abbildung 70). Dieses „codiert“ drei bis vier hochkonservierte Aminosäuren im zugrundeliegenden Alignment. Dabei erfolgt das Annealing in den ersten PCR-Zyklen über das degenerierte Ende, wobei eine gewissen Stabilisierung durch das 5′-Ende gegeben sein soll. Der längere 5′-nicht-degenerierte Teil des Primers berücksichtigt nur die

wahrscheinlichste Basentriplett-Kombination (ähnlich der ‚codon usage‘). Diese hohe Stringenz soll in späteren Amplifikations-Zyklen zu spezifischen Produkten führen und falsch-positive Amplifikate vermeiden.

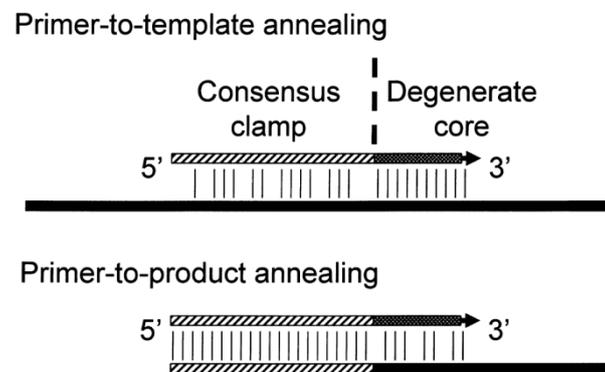


Abbildung 70: Prinzip der Hybrid-Primer, die mit dem Internet-basierten Programm CodeHop erzeugt wurden.^[219]

Sämtliche im Alignment für das Design der BVO-spezifischen, selbst abgeleiteten Primer enthaltenen Sequenzen wurden auch dem Programm CodeHop zur Ableitung von Primern zugrunde gelegt (vgl. Kapitel 10.10.1). Hierbei wurden dieselben homologen Bereiche im Alignment ausgewählt und vom Programm für das Primer-Design herangezogen. Die zu amplifizierenden Produkte sollten folglich die gleiche Größe wie bei Verwendung der selbst abgeleiteten Primer besitzen. Mithilfe des Programms wurden zwei Forward-Primer (BVCHA1_for, BVCHA2_for) sowie vier Reverse-Primer (BVCHD1_rev, BVCHD2_rev, BVCHE1_rev, BVCHE2_rev) mit möglichst identischer Länge und Schmelztemperatur ausgewählt.

5.4.4 PCR-basiertes Screening des Gesamtgenoms und der Cosmid-Bank von *Streptomyces* sp. Gö 40/10

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) kann selektiv ein Teil eines DNA-Stranges vervielfältigt werden. Die Länge der Amplifikate ist bei der PCR – im Gegensatz zum lebenden Organismus – begrenzt. Es werden DNA-Stücke kopiert, welche eine mögliche Länge von ca. 3 kb besitzen können. Das Template (DNA) wird im ersten Schritt durch Hitze denaturiert, wodurch Einzelstränge vorliegen. Durch Absenken der Temperatur ist es chemisch erzeugten Oligonukleotiden (Primern) möglich, an die Einzelstränge anzulagern (Annealing). Es werden zwei Primer zugegeben, wobei ein Primer für die Bindung an das

5'-Ende des einen Einzelstranges zuständig ist und der zweite Primer an das 3'-Ende des komplementären Stranges bindet. Sie bilden den Startpunkt für die Elongation, welche durch ein thermostabiles Enzym (Polymerase) erfolgt. Der Elongationsschritt wird durch den Denaturierungsschritt beendet, dem ein erneuter Annealingschritt und eine weitere Elongation folgen. Diese drei Schritte (Denaturierung, Annealing und Elongation) bezeichnet man als Zyklen, sie werden ca. 20-30 mal wiederholt, wodurch es zu einer exponentiellen Vervielfältigung des zu amplifizierenden DNA-Stücks kommt.

Um die Primer auf ihre Spezifität zu untersuchen, wurde in einem ersten Ansatz nur die genomische DNA des Stammes Gö 40/10 in PCR-Experimenten eingesetzt. Auf die Cosmid-Bank sollte erst zurückgegriffen werden, wenn optimale PCR-Bedingungen durch die Vorversuche mit genomischer DNA ermittelt wurden. Als Positivkontrolle wurde zusätzlich die genomische DNA des Stammes *Streptomyces fradiae* Tü 2717^[210] in die Untersuchungen mit einbezogen. Putative Bayer-Villiger Oxygenase (BVO)-Gene dieses Urdamycin-Bildners wurden dem Alignment zum Design der Primer zugrundegelegt, so dass „richtige“ BVO-Primer in Verbindung mit optimalen PCR-Bedingungen zu einem korrekten Amplifikat führen sollten.

Je nach gewähltem Primerpaar musste eine geeignete Temperatur für das Annealing gewählt werden. Ungünstige Annealing-Temperaturen können zu einer unspezifischen Bindung an unterschiedliche Stellen des Templates führen, was diverse Amplifikate zur Folge hat (falsch positives Ergebnis). Andernfalls kann eine Anlagerung komplett ausbleiben und es wird kein Produkt erzeugt (falsch negatives Ergebnis).

PCR mit Temperaturgradient

Zur Ermittlung der optimalen Annealing-Temperatur erfolgten zunächst PCR-Versuche mit Temperaturgradient. Unter Berücksichtigung der Schmelztemperaturen der eingesetzten Primerpaare wurde ein Temperaturfenster von 60 ± 6 °C gewählt. Die einzelnen Abstufungen wurden durch den *Eppendorf* Thermocycler automatisch festgelegt: 55.1, 55.5, 56.4, 57.6, 59.1, 60.7, 62.4, 63.9 °C. Alle möglichen Kombinationen der BVO-spezifischen Primer wurden getestet (s. Kapitel 10.10). Die mit dem Programm ‚CodeHop‘ generierten Primer wurden hierbei nicht eingesetzt. Des Weiteren wurde der Einfluss der Konzentration an $MgCl_2$ auf die Produktbildung untersucht. Magnesiumchlorid dient der DNA-Polymerase als Cofaktor und

ist daher essentiell für eine erfolgreiche Produktbildung. Die Konzentration an Template, Primern und vor allem dNTPs reduziert die verfügbare Menge an $MgCl_2$ im PCR-Mix. In getrennten Versuchen wurden Magnesiumchlorid-Konzentrationen von 2.5 mM und 3.5 mM eingesetzt. Die Analyse der PCR-Produkte erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese.

Bei keinem der untersuchten Primerpaare kam es zur Bildung vom Amplifikaten, die annähernd die erwartete Größe (450 bzw. 645 bp) aufwiesen. Auch ein Einsatz der genomischen DNA von Tü 2717 als eigentliche Positivkontrolle führte zu keinem deutlichen Amplifikat. In wenigen Ansätzen konnten lediglich Produkte der Größenordnung von 150 bp festgestellt werden. Dieses ließ sich in keiner der in jedem Versuch zusätzlich eingesetzten Negativkontrollen (PCR-Ansatz mit Primern, jedoch ohne Template) finden.

Die Primer wurden erneut mit Internet-basierten Programmen^[220] auf ihre Neigung zur Dimerisierung oder Selbst-Amplifikation überprüft. Hierbei konnten keine Auffälligkeiten festgestellt werden, die für eine Modifikation der Primer sprachen. Theoretisch sollte somit ausgeschlossen sein, dass diese Amplifikate als falsch-positive Produkte der Primer angesehen werden können.

Real-time PCR

Im Rahmen der Untersuchungen zur Optimierung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde neben den Versuchen im Gradienten-Cycler eine real-time PCR (Real-Time-Thermocycler, iCycler Bio Rad) in Zusammenarbeit mit P. KÖSSLER (AK KARLOVSKY/Universität Göttingen)^{viii} durchgeführt. Hintergrund dieser Überlegungen war einerseits die Überprüfung des abteilungseigenen Gradienten-Cyclers auf korrekte Funktion, speziell des Heizblockes für die PCR-Tubes, zum anderen konnten im iCycler eine weitaus größere Probenzahl mit einem Lauf gefahren werden. Ferner konnte in der Abteilung KARLOVSKY auf bereits für *Streptomyces* spp. optimierte Mastermixe und Programme zurück gegriffen werden.

Für die real-time PCR-Läufe wurden alle abgeleiteten BVO-spezifischen Forward- und Reverse-Primer in einem einheitlichen Mastermix miteinander kombiniert. Die entsprechenden Temperaturgradienten wurden an die primerspezifischen Annealing-Temperaturen angeglichen und lagen zwischen 55 °C und 65 °C.

Die Resultate der real-time PCR-Versuche führten zu einem vergleichbarem Ergebnis. Abbildung 71 zeigt die quantitative Darstellung des in die dsDNA interkalierten Farbstoffes

^{viii} Mein Dank gilt P. KARLOVSKY für die Bereitstellung der real-time PCR.

SybrGreen I, dessen Fluoreszenz proportional zur Menge des PCR-Produktes zunimmt. Der Zyklus, zu dem das Signal einen definierten Schwellenwert („Treshold line“) überschreitet wird als „Treshold cycle“ (C_T -Wert) bezeichnet. Während bei hohem Ausgangsgehalt an Template-DNA dieser C_T -Wert früher erreicht wird, erfolgt die Überschreitung des Schwellenwertes bei geringer Template-DNA-Menge erst bei späteren Zyklen. Aus Abbildung 71 wird ersichtlich, dass die Treshold line in den meisten Fällen überschritten wurde, es fand also eine Amplifikation statt. Der beobachtete Reaktionsverlauf gibt jedoch keinerlei Auskunft über die Art der Amplifikate.

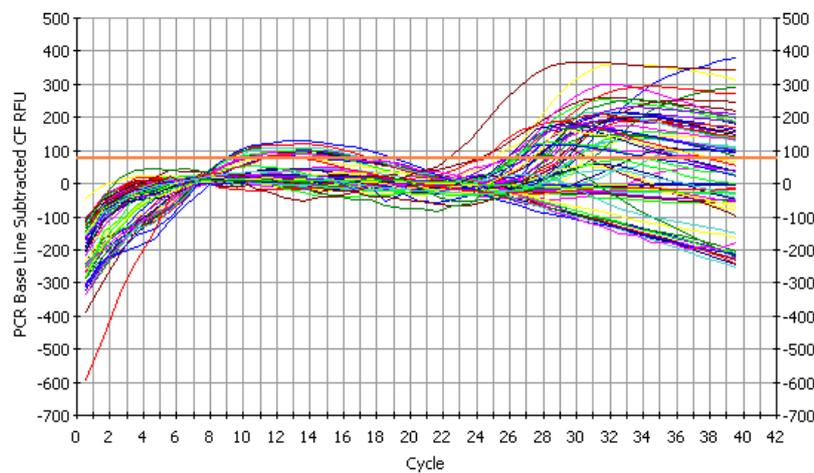


Abbildung 71: Darstellung des Reaktionsverlaufes der real-time PCR: Jede der verschiedenfarbigen Kurven zeigt die Fluoreszenz während des Reaktionsverlaufes in einem Reaktionsgefäß an. Die horizontale Linie (orange) stellt die von der Software errechnete „Treshold line“ dar.

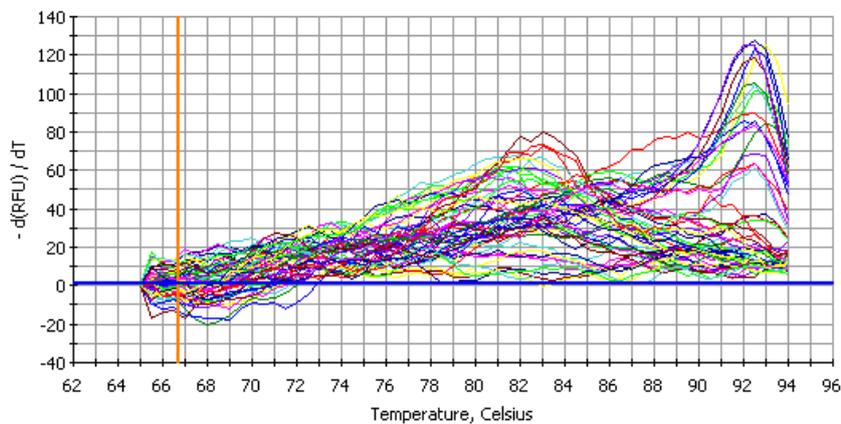


Abbildung 72: Darstellung der ersten Ableitung der Schmelzkurve.

Näheren Aufschluss gibt hierbei die dazu gehörige spezifische Schmelzkurve (Abbildung 72), welche am Ende des real-time PCR-Laufes aufgenommen wurde: Da der Farbstoff SybrGreen I nicht produktspezifisch ist und sich somit in jedes doppelsträngige DNA-Molekül einlagert, wird die Spezifität der Amplifikationsprodukte mittels einer Schmelzkurvenanalyse überprüft. Jedes doppelsträngige DNA-Molekül besitzt aufgrund der Länge und Basenzusammensetzung eine spezifische Schmelztemperatur, bei der die DNA-Stränge denaturieren. Durch das Trennen der DNA-Stränge hört das Fluoreszenzsignal aufgrund der Freisetzung des Farbstoffs und der damit verbundenen Änderung der Struktur des Farbstoffes auf. Anhand dieser spezifischen Temperatur können falschpositive DNA-Amplifikationsprodukte oder Primerdimere von den gewünschten Fragmenten unterschieden werden. Die Schmelzkurve ist der Verlauf der Fluoreszenz bei stetig steigender Temperatur, der Wendepunkt dieser Kurve liegt dann bei der spezifischen Schmelztemperatur. Die bevorzugte Darstellung ist allerdings die erste Ableitung der Fluoreszenz, da so der Wendepunkt als Maximum dargestellt wird, was die Auswertung vereinfacht.

In Abbildung 72 ist kein einheitliches Maximum bei der ersten Ableitung der Schmelzkurve der PCR-Produkte erkennbar. Dies lässt darauf schließen, dass kein spezifisches Produkt amplifiziert wurde. Es wurde deutlich, dass es sich bei den Amplifikaten um mehrere unterschiedliche Amplifikate handelte, die sich ebenso in der Negativkontrolle (Ansatz ohne Template) fanden. Zusammenfassend ist festzustellen, dass die abgeleiteten Primer offenbar keine Affinität zur Target-DNA besitzen und PCR-Ansatz sowie das verwendete Programm überarbeitet werden müssen. Ggf. müssen in zukünftigen Arbeiten zusätzliche, neue Primer in die Untersuchungen mit einbezogen werden.

PCR mit Primern des Programms CodeHop

Der Einsatz der ‚CodeHop-Primer‘ erforderte für jedes Primerpaar angepasste Bedingungen bzgl. des PCR-Programms; diese sind in Kapitel 10.10.2 aufgeführt. Gegen ein einheitliches Programm sprachen die sehr abweichenden Schmelztemperaturen der einzelnen Primer. Obwohl eine Schmelztemperatur mit Optimum bei 60 °C durch das Programm CodeHop^[219] berücksichtigt sein sollte, betrogen die Differenzen dieser Temperaturen teilweise bis zu 18 °C. Trotz dieser Tatsache wurden einige PCR-Versuche unternommen. Zusammenfassend lässt sich hier feststellen, dass wiederum keine der erwarteten Amplifikate erhalten wurden.

PCR mit definierter Annealing-Temperatur

Da bei Verwendung der selbst abgeleiteten, BVO-spezifischen Primer bisher kein eindeutiges Ergebnis erzielt wurde, erfolgte die PCR nunmehr für ausgewählte Primerpaare bei einer definierten Annealing-Temperatur (s. Tabelle 12): Es wurde angenommen, dass sich diese an der Schmelztemperatur der Primer orientiert. Sie wurde 2-6 °C geringer gewählt als der Durchschnittswert der Schmelztemperaturen beider Primer. Außerdem sollte die Annealing-Temperatur möglichst unter 68 °C gehalten werden, da ab dieser Temperatur die Polymerase aktiviert ist. Für die Dauer der Elongation galt die Annahme, dass durch die Polymerase ca. 1000 Basenpaare pro Minute synthetisiert werden können. Neben den BVO-spezifischen Primern wurden zusätzlich der vom Programm ‚CodeHop‘^[219] abgeleitete Primer ‚BVCHD1_rev‘ mit verwendet. Dieser wies als einziger eine Schmelztemperatur auf, die in der Größenordnung der selbst entwickelten Primer lag. In getrennten Experimenten wurden zwei unterschiedliche MgCl₂-Konzentrationen für den PCR-Reaktionsansatz zugrunde gelegt: 2.5 mM und 3.5 mM für die hier erarbeiteten Programme ‚BVO-Standard‘.

Tabelle 12: Annealing-Temperaturen des Programms ‚BVO-Standard‘ für die eingesetzten Primerpaare. Grau unterlegt sind Kombinationen, die zu Amplifikaten im Größenbereich (400-700 bp) führten (bei Verwendung von 3.5 mM MgCl₂ im PCR-Reaktionsansatz); - = nicht durchgeführt.

	BVD1a_for	BVD1b_for	BV63_for
BVD1a_rev	57 °C	56 °C	-
BVD1b_rev	63 °C	57 °C	57 °C
BVD2a_rev	57 °C	57 °C	-
BVCHD1_rev	-	57 °C	57 °C

Nur bei Verwendung einer MgCl₂-Konzentration von 3.5 mM konnten bei drei der neun eingesetzten Primerkombinationen einige Amplifikate mittels Gelelektrophorese festgestellt werden, die im Größenbereich 400-700 bp lagen (s. Abbildung 73). Dieser Bereich entsprach den im Alignment ermittelten, theoretischen Produktgrößen.

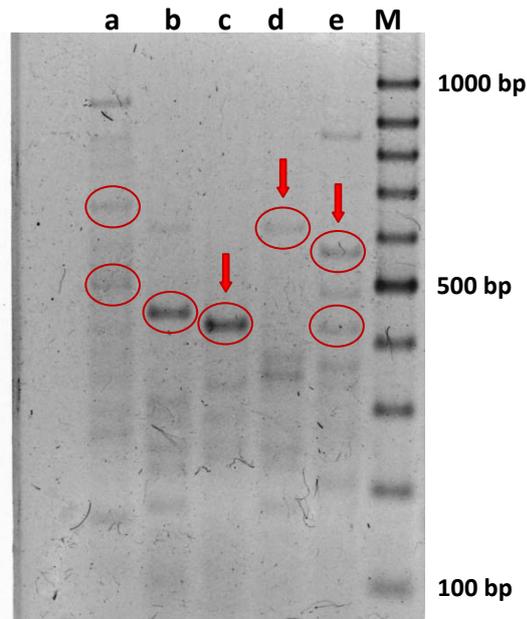


Abbildung 73: Amplifikate der PCR unter Verwendung von BVO-spezifischen Primern. Die Auftrennung erfolgte per Agarosegel und Anfärben mit Ethidiumbromid bei 302 nm. a: genom. DNA Tü 2717, Primerpaar BVD1b_for + BVCHD1_rev; b: genom. DNA Gö 40/10, BV63_for + BVCHD1_rev; c: genom. DNA Tü 2717, BV63_for + BVCHD1_rev; d: genom. DNA Gö40/10, BV63_for + BVD1b_rev; e: genom. DNA Tü 2717, BV63_for + BVD1b_rev; M: DNA-Marker Typ ‚100 bp‘ (100-1000 bp). Markiert sind DNA-Fragmente, die für eine weitere Bearbeitung ausgewählt wurden. Pfeile markieren bei Fertigstellung dieser Arbeit sequenzierte DNA-Fragmente.

Um größendefinierte DNA-Fragmente in Reinform für Klonierungsarbeiten darzustellen, wurde die DNA aus den PCR-Experimenten mittels Agarosegel getrennt. Im Unterschied zur Standard-Gelelektrophorese wurde ein Geltisch größerer Laufstrecke (20 cm) eingesetzt und das Gel nach erfolgter Gelelektrophorese in der Mitte geteilt. Die eine Hälfte des Gels wurde mit Ethidiumbromid behandelt und diente als Referenz, die zweite Hälfte wurde nicht angefärbt und diente zur Extraktion. Acht der erhaltenen Amplifikate wurden durch Extraktion aus dem Agarosegel isoliert und gereinigt. Dazu wurde das ‚QIAquick Gel Extraction Kit‘ (Qiagen) verwendet (s. Kapitel 10.12.1). Die erhaltenen DNA-Fragmente wurden in den Vektor pDrive (Abb. s. Kapitel 11.1) kloniert und anschließend der ‚Vervielfältigungs-‘ *E. coli* DH5 α mit pDrive transformiert.

Unter Transformation versteht man die Aufnahme gelöster DNA durch fremde Zellen. Allerdings ist diese aufgrund der Ladung von Zellmembran und DNA erschwert. Bestimmte Bakteriengruppen, wie *E. coli* und *Streptomyces* sp., besitzen außerdem kein aktives Aufnahmesystem für Fremd-DNA. Aus diesem Grund wurden Techniken entwickelt, um dennoch eine effiziente Transformation zu ermöglichen.

Als besonders effizient, selbst bei größeren DNA-Molekülen wie Cosmiden, gilt die Transformation mittels Elektroporation. Auch wenn das Verfahren nicht vollständig geklärt ist, gilt es als universelle Methode für den DNA-Transfer. Salzfremde, sogenannte kompetente *E. coli*-Zellen werden zusammen mit der DNA einem kurzen Spannungspuls ausgesetzt. Hierbei soll sich die Zellwand aufweiten, wodurch es zur Aufnahme der DNA kommt. Da nicht alle Zellen am Ende erfolgreich transformiert worden, erfolgt im Anschluss ein Selektionsschritt. Hierbei wurde die *via* pDrive vermittelte Resistenz gegen Ampicillin und Kanamycin ausgenutzt, um nur erfolgreich transformierte *E. coli* zu selektieren. Bei Transformationen mit Vektoren (wie pDrive), die das *lacZ*-Gen zur Komplementation der β -Galactosidase des *E. coli* besitzen, wurde eine Blau/Weiß-Selektion zur Detektion rekombinanter Plasmide vorgenommen. Das für die Komplementation notwendige Protein wird auf dem Plasmid kodiert und enthält einen multiplen Klonierungsbereich. Durch den Einbau eines Inserts in diesen Klonierungsbereich wird die kodierende Sequenz unterbrochen und die Bildung des notwendigen Proteins unterbleibt. Als Nachweis für das Vorhandensein von aktiver β -Galactosidase diente das Substrat X-Gal, welches dem LB-Festmedium zugesetzt wurde. Zur Induktion des *lacZ*-Promotors wurde zusätzlich IPTG zugegeben. Bei erfolgreicher Expression des *lacZ*-Gens erscheinen die Kolonien blau, was auf ein Fehlen des Inserts hindeutet. Dabei kann es allerdings vorkommen, dass sich – besonders nach längerer Inkubationszeit – sogenannte Satelliten um die eigentliche Kolonie ausbilden.

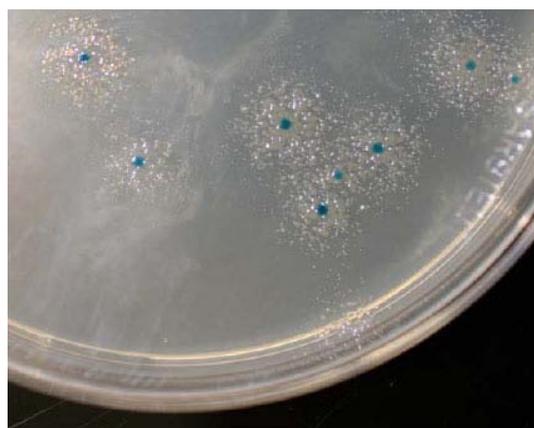


Abbildung 74: Bildung von Satelliten-Kolonien. Abgebildet ist eine 24 Stunden-Kultur auf LB_{amp}-Medium nach Transformation von *E. coli* DH5 α mit dem Plasmid pDrive. Durch Blau/Weiß-Screening erscheinen Plasmide ohne Ligations-Insert blau. Um die eigentliche Kolonie (blau) bilden sich weitere, kleine Kolonien aus (weiß). Diese enthalten jedoch kein Plasmid.

Diese Satelliten-Kolonien enthalten dabei jedoch kein Plasmid – also auch keine Resistenzkassette. Sie konnten auf einem Teil der Agarfläche überleben, die nur bakteriostatische nicht aber bakterizide Konzentrationen des Antibiotikums enthielten. Solche Konzentrationen können durch die β -Lactamase-Aktivität der zentralen Kolonie verursacht werden, wodurch es zu einem Abbau des Antibiotikums kam.

„Weiße“ Kolonien (mit Plasmid-Insert) von *E. coli* DH5 α wurden in Flüssigkultur angezogen und die Plasmid-DNA mit Hilfe eines „Kits“ isoliert (s. Kapitel 10.8).

5.4.5 Ergebnisse der Sequenzierung von PCR-Amplifikaten

Mit Fertigstellung dieser Arbeit konnten bisher drei der neun DNA-Fragmente erfolgreich kloniert und als Auftragsarbeit durch die Firma *Agowa* sequenziert werden. Hierbei handelt es sich um zwei Amplifikate (ca. 430 bp und ca. 580 bp, Abbildung 73) des Stammes Tü 2717 und ein Amplifikat des Stammes Gö 40/10 (ca. 620 bp, Abbildung 73). Diese werden im Folgenden als pDrive_Tü2717-3 (430 bp Insert), pDrive_Tü2717-5 (580 bp Insert) bzw. pDrive_Gö4010-4 (620 bp Insert) bezeichnet.

Alle erhaltenen Nukleotid-Sequenzen wurden auf Übereinstimmung mit bisher publizierten Sequenzen in der Datenbank BASTN (Basic Local Alignment Search Tool-Nucleotide)^[221] überprüft. Entgegen der Erwartungen wiesen pDrive_Gö4010-4 und pDrive_Tü2717-5 nur die Sequenz des Vektors pDrive auf; ein Insert konnte hier nicht festgestellt werden. Vermutlich liegt hier der Fehler bei einer falschen Selektion nach dem Blau/Weiß-Screening. Dagegen führte die Suche in BLASTN für die Sequenz von pDrive_Tü2717-3 zu einer Übereinstimmung von 99 % mit den Genen *urde,F,A,B,C,D* (423 bp) aus *Streptomyces fradiae* (vgl. Abbildung 75). In diesem Fall stammte das eingesetzte DNA-Template auch vom Kontrollstamm *S. fradiae* Tü 2717. Diese Tatsache kann als großer Erfolg für den gewählten Ansatz gewertet werden, da hiermit gezeigt werden konnte, dass die designten Primer geeignet sind, den gewünschten Genabschnitt zu amplifizieren. In einem nächsten Schritt muss nun das DNA-Fragment aus Gö 40/10 erfolgreich in den Vektor pDrive kloniert und anschließend ansequenziert werden.

Hierbei müsste in einem Alignment der aus Gö 40/10 und aus Tü 2717 erhaltenen Sequenzen mit einer gewissen Übereinstimmung – zumindest für die angenommenen, homologen Bereiche der BVMO – zu rechnen sein. Des Weiteren erscheint nun auch ein Einsatz der Cosmid-Bank erstrebenswert.

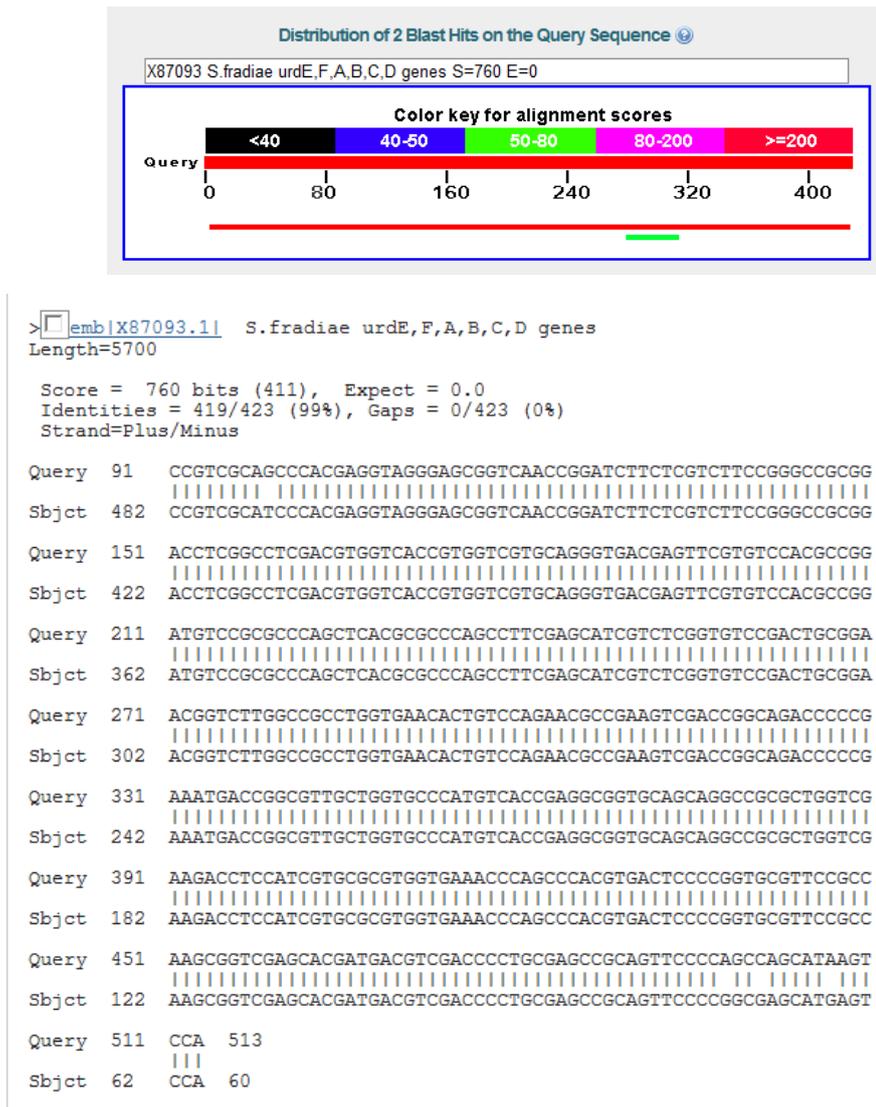


Abbildung 75: Ausschnitt aus dem BLASTN-Analysenreport, der für die eingegebene Sequenz 99 % Übereinstimmung mit den Genen *urdE,F,A,B,C,D* aus *Streptomyces fradiae* liefert.^[221] Query = Durch PCR-Versuche mit BVO-spezifischen Primern erhaltenes und sequenziertes DNA-Fragment pDrive_Tü2717-3.

5.4.6 Transformation von *S. albus* und *S. lividans*

Da die Cosmid-Bank des Stammes Gö 40/10 bisher nicht in die PCR-Versuche mit einbezogen wurde, sollte auf andere Weise von ihr „profitiert“ werden. Die Cosmid-Bank enthält rein PKS I-positive Klone, so dass alle genetischen Grundlagen für die Biosynthese von Collinolacton (**20**) darin enthalten sein könnten. Vier Cosmide (Gö2214-57, Gö2214-61, Gö2214-70, Gö2214-102) wurden ausgewählt und sollten in die Modellorganismen *Streptomyces albus* und *Streptomyces lividans* mittels intergenerischer Konjugation eingebracht werden. Die Zielsetzung lag in der Erzeugung von Mutanten, die erste Biosynthesestufen von **20** exprimieren könnten.

Prinzip

Bei der interspezifischen Konjugation^[222] können Plasmide (Fremd-DNA) in einen Streptomyceten eingebracht werden. Hierbei fungiert ein *E. coli* mit dem Plasmid als Donor und der Streptomyceten-Stamm entsprechend als Rezipient. Hierbei wird die Transferfunktion eines RP4-Plasmids in *E. coli* ausgenutzt, um den Transfer in andere Spezies zu ermöglichen. Die Plasmide müssen hierzu einen RP4 Origin of Transfer (*oriT*) besitzen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der methylierungsdefiziente *E. coli* ET12567^[232] mit dem Mobilisierungsplasmid pUB307 (ein RP4-Derivat) verwendet.

Durchführung und Auswertung

Die jeweilige Cosmid-DNA wurde mittels Elektroporation in den *E. coli* ET12576 (pUB307) eingebracht. Eine erfolgreiche Transformation konnte über die dreifach vermittelte Resistenz – Apramycin durch pOJ436 sowie Chloramphenicol und Kanamycin durch pUB307 – kontrolliert werden. Die intergenerische Konjugation erfolgte wie in Kapitel 10.12.6 beschrieben und konnte mit den Cosmiden Gö2214-57, Gö2214-61 und Gö2214-70 erfolgreich für beide Streptomyceten durchgeführt werden. Hierbei wurden Mutanten erhalten, die sowohl die DNA des Cosmids als auch die Apramycin-Resistenzkassette aus pOJ468 aufgenommen haben sollten. Das Mobilisierungsplasmid pUB307 diente nur zur „Vermittlung“ und wurde nicht in das Genom der Streptomyceten integriert.

Alle Mutanten wurden unter Selektionsdruck (mit Apramycin) als 48 h-Vorkultur in Medium S angezogen und zum Inokulieren der eigentlichen Kultur in Medium SM* (mit Apramycin) verwendet. Jeder Ansatz wurde in vierfacher Wiederholung durchgeführt. Die Wild-Typ Stämme von *S. albus*, *S. lividans* und Gö 40/10 wurden parallel als Kontrolle in demselben Medium ohne Antibiotikum-Zusatz kultiviert. Die Ernte erfolgte bei *S. lividans* und Gö 40/10 nach vier Tagen, *S. albus* Mutanten wurden aufgrund ihres zu diesem Zeitpunkt geringen pH-Werts für weitere 24 Stunden kultiviert. Kulturfiltrat und Mycel wurden getrennt aufgearbeitet (s. Kapitel 10.12.8). Hierbei erfolgte die Extraktion der Kulturfiltrate mit Ethylacetat und die Extraktion der Mycelien mit Aceton. Die Analyse der durch die Aufarbeitung erhaltenen Extrakte erfolgte mittels Dünnschichtchromatogramm (Kieselgel und RP-18) sowie durch HPLC-MS in Hinblick auf ein verändertes Metabolitenspektrum bzw. neue Metaboliten. Jedoch konnte auf Grundlage dieser Untersuchungen nicht auf ein deutlich verändertes Metabolitenspektrum geschlossen

werden. Exemplarisch ist dies in Abbildung 76 dargestellt. Auch bei Verwendung unterschiedlicher Ansprühreagenzien (Anisaldehyd, Ehrlich) konnte nicht auf ein verändertes Metabolitenmuster geschlossen werden. Von weiteren Versuchen mit *S. albus* und *S. lividans* wurde abgesehen.

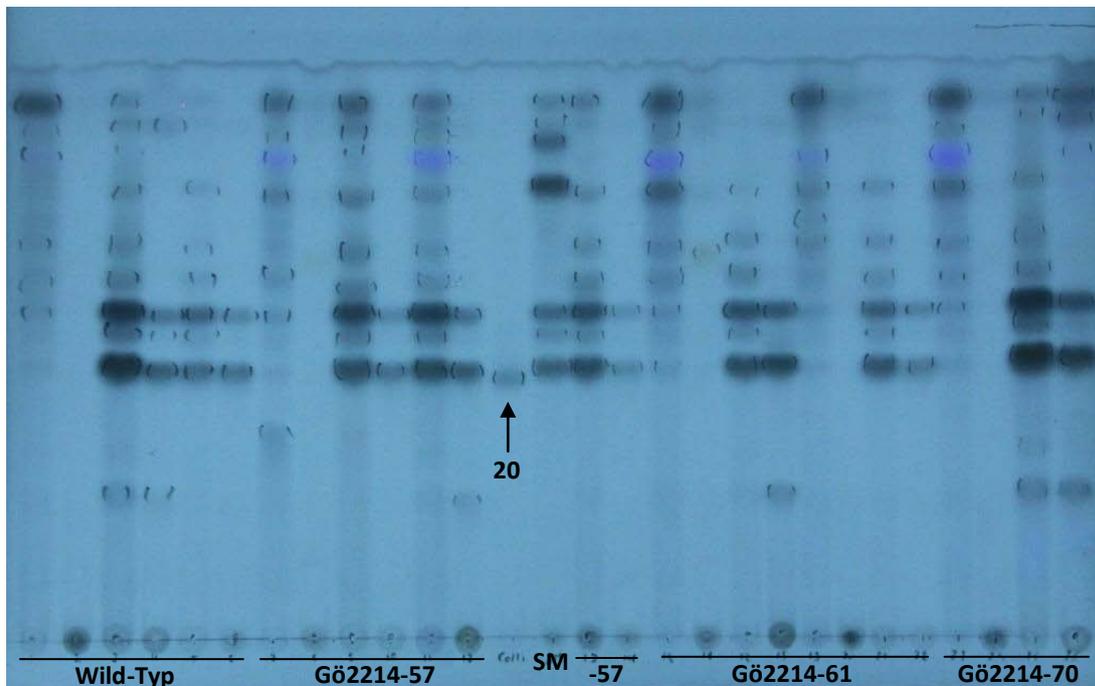


Abbildung 76: Dünnschichtchromatogramm (RP-18, Laufmittel Methanol/Wasser 7:3) von Extrakten aus *Streptomyces lividans* Mutanten (erzeugt mit den Cosmiden Gö2214-57, Gö2214-61 und Gö2214-70). Zusätzlich sind als Referenz die Extrakte vom Wild-Typ und vom verwendeten SM-Medium („Hintergrund“), sowie Collinolacton (20) aufgetragen.

5.4.7 Resistenzprofil von *Streptomyces* sp. Gö 40/10 und Tü 1892

Um nach erfolgter Konjugation garantieren zu können, dass ein Wachstum auf Antibiotika-haltigem Medium nur von den erzeugten Mutanten ausgeht, erfolgte vor der eigentlichen Konjugation die Erstellung eines Resistenzprofils der Stämme Gö 40/10 und Tü 1892. Untersucht wurden mögliche Resistenzen gegenüber folgenden Antibiotika: Apramycin, Chloramphenicol, Kanamycin, Thiostrepton und Nalidixinsäure. Dazu wurden zum einen Antibiotika-haltige SM-Agarplatten mit den beiden Streptomycceten beimpft und bei 28 °C inkubiert. Des Weiteren wurden SM-Agarplatten (ohne Antibiotikum) inokuliert, für 24 Stunden bei 28 °C inkubiert und anschließend das Antibiotikum *via* Overlay aufgetragen. Über mehrere Tage wurde das Wachstum der beiden Stämme verfolgt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 13 angegeben.

Tabelle 13: Resistenzprofil von *Streptomyces* sp. Gö 40/10 und Tü 1892 auf SM-Agar. Kam es bei einem Teil der untersuchten Kulturen zum Wachstum von wenigen Einzelkolonien, ist dieses mit „geringe Resistenz“ angegeben.

Antibiotikum	Konzentration [µg/mL]	Gö 40/10	Tü 1892
Apramycin	50	sensitiv	sensitiv
Chloramphenicol	25	geringe Resistenz	geringe Resistenz
Kanamycin	50	sensitiv	sensitiv
Thiostrepton	30	geringe Resistenz	geringe Resistenz
Nalidixinsäure	40	resistent	resistent

Es konnte kein Unterschied zwischen direkter Zugabe des Antibiotikums zum Medium und Overlay festgestellt werden. Mit Ausnahme von Thiostrepton und Nalidixinsäure führten alle Antibiotika zu einer Wachstumsinhibierung von Gö 40/10 bzw. Tü 1892, weshalb die Verwendung entsprechender Resistenzkassetten als Selektionsmarker möglich erschien. Die beobachtete Resistenz bei Nalidixinsäure liegt im Rahmen der Erwartungen, da diese in den folgenden Konjugations-Arbeiten zur Inhibierung von *E. coli* verwendet wird.

5.4.8 Transformationsversuche an *Streptomyces* sp. Gö 40/10 und Tü 1892

Ein experimenteller Nachweis, dass die postulierten Gene tatsächlich *in vivo* exprimiert werden und ihre Transkripte für die Bildung von Collinolacton (**20**) verantwortlich sind, sollte über die Konstruktion von Deletionsmutanten erbracht werden. Voraussetzung hierfür ist neben der Erarbeitung eines Konjugationsprotokolls, das die Einschleusung geeigneter Genabschnitte in das Bakteriengenom erlaubt, auch das Vorhandensein eines Bakterienstamms, der eine generelle Transformationsfähigkeit aufweist. Hierfür wurde als Modell das Plasmid pSET152 verwendet, das eine Apramycin-Resistenzkassette enthält. Dieses Konstrukt wurde nach dem Prinzip der interspezifischen Konjugation^[222] in die Collinolacton-Produzentenstämme Gö 40/10 und Tü 1892 eingebracht (s. Kapitel 10.12). Als Donor wurde *E. coli* ET12567 mit dem Mobilisierungsplasmid pUB307 verwendet. In einem weiteren Versuch wurde ein pSET152-Konstrukt verwendet, das neben der Apramycin-Resistenz auch das grüne Fluoreszenzprotein ‚EGFP‘ (‚Enhanced Green Fluorescence Protein‘)^[223] vermittelt.

Die Konjugation konnte für beide Streptomycceten erfolgreich durchgeführt werden. Es wurden deutlich gewachsene Kolonien sowohl nach einem Overlay mit Antibiotika-Lösung

als auch auf Apramycin-haltigem Agarmedium beobachtet, was für die erfolgreiche Vermittlung des Resistenzgens spricht.

Zusätzlich konnte das *via* pSET152ermE+egfp+rrnB vermittelte ‚EGFP‘ mittels Fluoreszenzspektroskopie auf erfolgreiche Konjugation geschlossen werden. Dazu wurde eine einzelne Kolonie aus dem Agar ausgestochen und auf einen Objektträger überführt. Die Emission des GFP liegt bei 508 nm, daher konnten erfolgreiche Exkonjuganten durch eine grüne Fluoreszenz identifiziert werden (s. Abbildung 77). Die Messungen am Fluoreszenzmikroskop erfolgten in Zusammenarbeit mit D. WEISKOPF (AK STEINEM/Universität Göttingen)^{ix} an einem Zeiss AxioTech Vario (Bandpass-Filtersatz 44: 475 nm Absorption, 530 nm Emission).

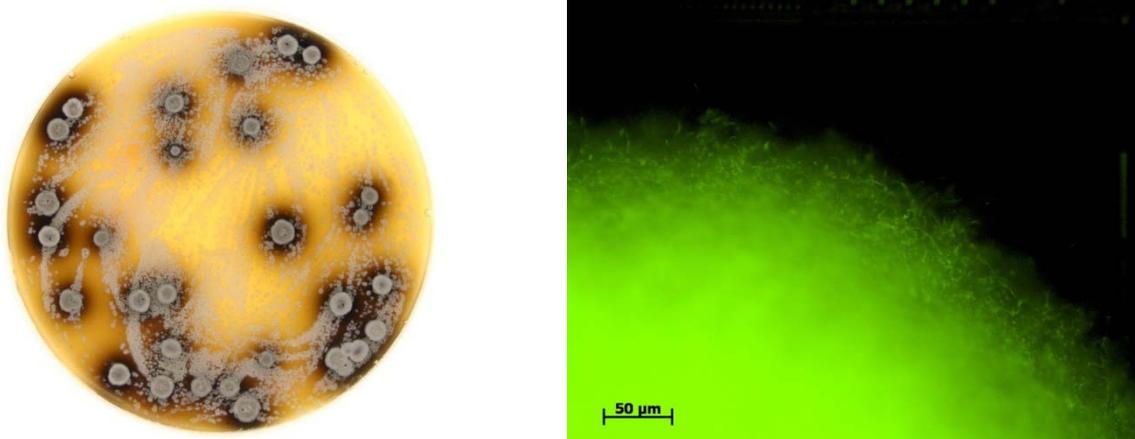


Abbildung 77: Transformationsversuche an *Streptomyces* Gö 40/10. Durch intergenerische Konjugation vermittelte Resistenz und Fluoreszenz-Eigenschaften: Links: Gö 40/10 auf apramycinhaltigem SM-Medium; rechts: Fluoreszenzaufnahme einer einzelnen Kolonie (Zeiss AxioTech Vario) bei 530 nm (Emission).

5.4.9 Identifizierung des Collinolacton-Biosynthesegenclusters mittels Insertionsinaktivierung

Bei dieser Methode wird ein DNA-Fragment über einen Vektor durch interspezifische Konjugation in das Genom *via* Single-Crossover integriert. Hierbei werden sowohl das DNA-Fragment als auch eine Resistenzkassette übertragen. Stimmen die Sequenzen von Fragment und Ziel-Genom überein (hier z.B. *genB*), so lagert sich der Vektor (mit Fragment und Resistenzkassette) an diese Stelle im Genom an.

^{ix} Hiermit möchte ich D. WEISKOPF (AK STEINEM/Universität Göttingen) für die Aufnahmen am Fluoreszenzmikroskop danken.

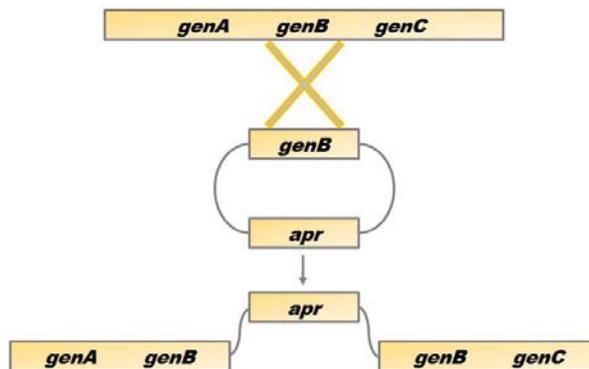


Abbildung 78: Insertionsinaktivierung *via* Single-Crossover. Hierbei integriert die Resistenzkassette (*apr*) in die Genomsequenz *ABC* und unterbricht die vormals intakte Gensequenz.

Nach Transkription und Replikation ist der Vektor in das Genom integriert, was zu einer Unterbrechung der ursprünglichen Gensequenz führt. Somit kann das entsprechende Enzym im folgenden nicht mehr exprimiert werden.

Für die Biosynthese von Collinolacton (**20**) wird ein PKS I-vermittelter Mechanismus angenommen. Aus diesem Grund wurde ein PCR-basiertes ‚Genetic scanning‘ durchgeführt, wobei Primer zum Einsatz kamen, die aus Alignments hochkonservierter Bereiche (KS- und AT-Domänen) von PKS I-Genen abgeleitet wurden. Die PCR-Versuche wurden von T. WEBER (Universität Tübingen)^x mit genomischer DNA des Stamms Gö 40/10 durchgeführt. Die erhaltenen Amplifikate (ca. 1.3-1.5 kb) wurden in den Vektor pJET1.2 kloniert und für diese Arbeit in *E. coli*-Kulturen bereitgestellt.

Da der Stamm Gö 40/10 noch weitere Metaboliten auf dem PKS I-Biosyntheseweg produziert, finden sich im Genom vermutlich mehrere PKS I-codierende Genabschnitte. Als Folge ist unbekannt, welchen Genabschnitten die einzelnen Amplifikate angehören. Dennoch wurden die PKS I-Amplifikate aufgrund ihrer Größe nach Umklonierung zu direkten Geninaktivierungs-Versuchen eingesetzt. Nach Isolierung der Plasmid-DNA aus den bereitgestellten *E. coli* wurden die Amplifikate aus pJET1.2 über die *Bgl*II-Vektorschneidstellen ausgeschnitten und in den mit *Bam*HI geöffneten Geninaktivierungsvektor pA18mob kloniert. Aus ca. 40 *E. coli*-Kolonien wurde die Plasmid-DNA isoliert und das darin

^x Ich danke T. WEBER (Universität Tübingen) für die Durchführung der Versuche und die Bereitstellung der Vektoren.

enthaltene PKS I-Amplifikat auf dem beschriebenen Weg in pA18mob kloniert. Dieses war notwendig, um sicherzustellen, dass eine möglichst breite Anzahl an unterschiedlichen PKS I-Fragmenten für die Geninaktivierung eingesetzt werden konnte. Theoretisch konnten allerdings auch mehrere *E. coli*-Kolonien das gleiche Amplifikat enthalten.

Alle so erhaltenen pA18mob-Konstrukte wurden durch intergenerische Konjugation in *Streptomyces* sp. Gö 40/10 eingebracht. Insgesamt wurde die Konjugation ca. 150 Mal wiederholt, da die erzeugten Mutanten in den meisten Fällen keine korrekte Apramycin-Resistenz aufwiesen. Es konnten bisher drei resistente Gö 40/10-Mutanten erzeugt werden. Diese wurden in Kultur genommen und die Extrakte mittels HPLC-MS auf eine Inaktivierung der Collinolacton (**20**)-Produktion analysiert. Allerdings zeigten alle untersuchten Klone weiterhin eine unveränderte Produktion von **20**, was darauf hindeutet, dass die durch Plasmidintegration inaktivierten PKS-Enzyme nichts mit der Collinolacton-Biosynthese zu tun haben. Jedoch konnte durch Analyse der HPLC-Chromatogramme auf eine andere erfolgreiche Geninaktivierung geschlossen werden. Alle untersuchten Klone zeigten das Fehlen eines Metaboliten mit einem Masse-zu-Ladungsverhältnis von $m/z = 687$ (s. Abbildung 79: Spur b-d). Aufgrund des Fragmentierungsmusters konnte hierfür das bereits für den Stamm Gö 40/10 beschriebene Diastovaricin (**115**) identifiziert werden.

In zwei der drei Klone konnte zusätzlich das Fehlen eines Metaboliten mit $m/z = 898$ (s. Abbildung 79: Spur b+c) festgestellt werden. Die Masse $m/z = 898$ konnte keinem bisher für Gö 40/10 charakterisierten Metaboliten zugeordnet werden.

Da die Produktion von **115** in allen Fällen inaktiviert wurde, ist zu vermuten, dass alle zur Inaktivierung genutzten Amplifikate dem gleichen Biosynthesegencluster entstammen müssten. Dies würde bedeuten, dass eine Verwandtschaft zwischen den beiden inaktivierten Metaboliten besteht. Warum – unter dieser Annahme – dennoch Spuren des Metaboliten mit $m/z = 898$ in einer der drei Mutanten detektiert wurden, lässt sich zum jetzigen Zeitpunkt nicht abschließend klären. Immerhin konnte ein deutlicher Produktionsrückgang im Vergleich zum Wild-Typ beobachtet werden.

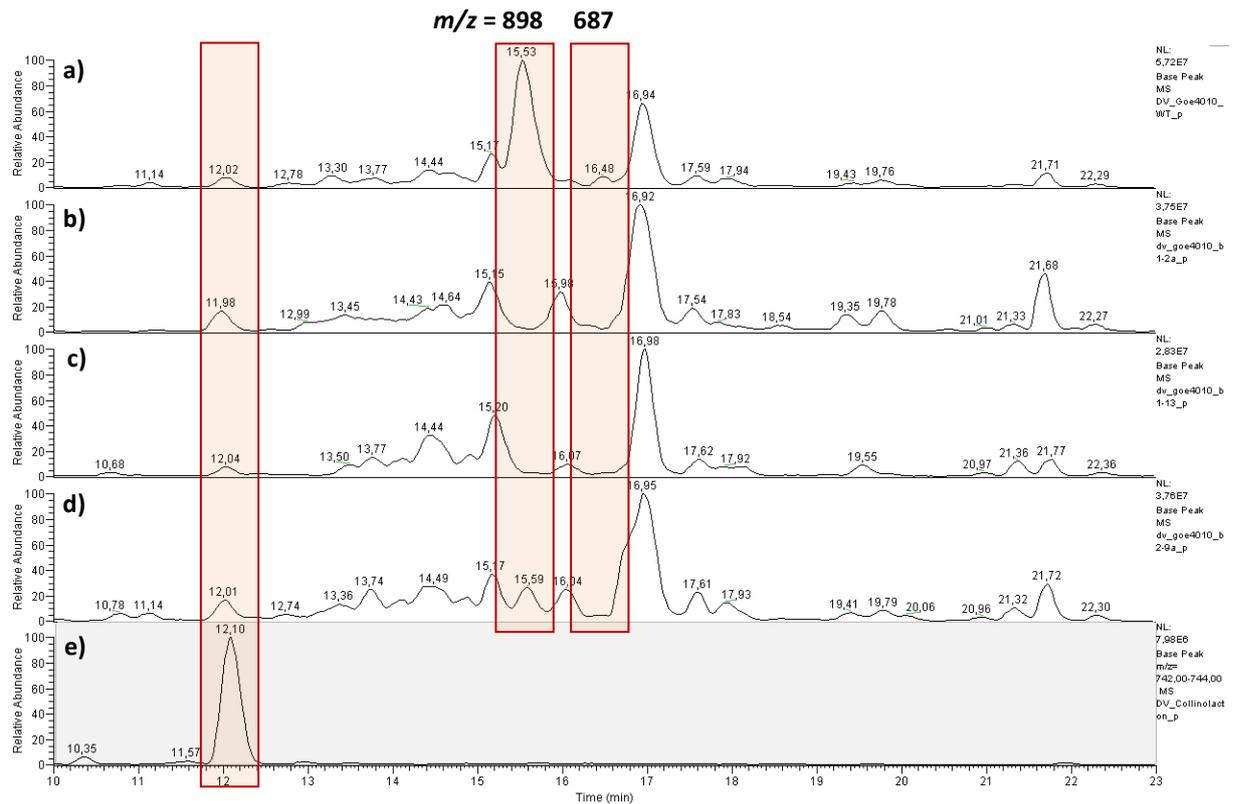


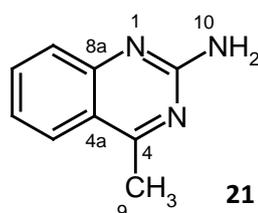
Abbildung 79: HPLC-MS Chromatogramm von Extrakten der durch Geninaktivierung erhaltenen Mutanten (b-d) von *Streptomyces* sp. Gö 40/10. Zusätzlich wurden der Extrakt des Wild-Typs (a) und Collinolacton (**20**) (e) als Referenzen analysiert. Dargestellt sind die Intensitäten über alle Massen („Base-Peak“) sowie die Massenspur mit $m/z = 742-744$ für **20** ($m/z = 743 [2M+Na]^+$).

In zukünftigen Versuchen müssen weitere pA18mob-Konstrukte eingesetzt werden, da an dieser Stelle bereits eine erfolgreiche Inaktivierung für **115** bestätigt werden konnte. Bei erfolgreicher Inaktivierung der Collinolacton-Biosynthese kann das dafür verwendete DNA-Fragment als Grundlage zum Design „Collinolacton-spezifischer“ PCR-Primer verwendet werden. Ein Einsatz an der Gö 40/10 Cosmid-Bank erscheint dann erst im Folgenden erfolgsversprechend, um das Biosynthese-Gencluster von **20** zu identifizieren.

6 Zusammenfassung der Ergebnisse

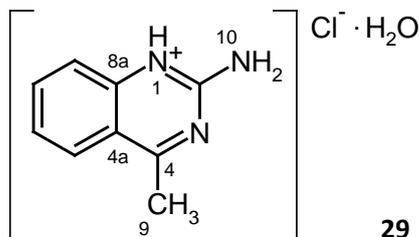
6.1 Naturstoffe aus Mikroorganismen neuer pflanzlicher Habitate

- Der im Rahmen dieser Arbeit verfolgte Ansatz fokussierte auf die direkte Suche von Sekundärstoffproduzenten im Mikrohabitat höherer Pflanzen. Da bisher keine solcher systematischen Untersuchungen detailliert in der Literatur zu finden sind, wurden hier erstmals Heilpflanzen der Traditionellen Chinesischen Medizin (TCM) in ihrem natürlichen Habitat selektiert und vergesellschaftete Mikroorganismen (Actinomyceten und Pilze) isoliert. Somit findet sich hier die erste in dieser Form detailliert beschriebene Umsetzung dieses Konzepts.
- Insgesamt konnten 51 Bakterienstämme und 20 Pilze selektiert werden, von denen im Rahmen dieser Arbeit 20 Actinomyceten und vier Pilze einem breiten chemischen Screening unterzogen wurden. Zusätzlich wurden in einem biologischen Screening die gewonnenen Extrakte auf antibakterielle bzw. antifungale Aktivität im Plattendiffusionstest getestet. Sechs hinsichtlich ihres Metabolitenmusters auffällige Actinomyceten wurden für eine Weiterbearbeitung ausgewählt.
- Auffällig war eine zum größten Teil sehr geringe Produktionsrate der einzelnen Stämme bezüglich ihrer Sekundärmetaboliten. Nichtsdestoweniger konnten acht Naturstoffe unter Zuhilfenahme spektroskopischer Methoden identifiziert werden. Weitere isolierte Metaboliten waren aufgrund ihrer geringen Ausbeute nicht ausreichend zu analysieren und wurden in dieser Arbeit nicht diskutiert.
- Das Alkaloid 4-Methyl-2-chinazolinamin (**21**) und ein mögliches Analogon (**22**) wurden erstmals aus einem Mikroorganismus isoliert. **21** ist bisher nur als synthetisches Produkt beschrieben.^[79,80] Der zugehörige Produzentenstamm Wa232 (GS DV232) konnte taxonomisch als *Streptomyces venezuelae* charakterisiert werden.



- 4-Methyl-2-chinazolinamin (**21**) wurde in einer umfassenden Studie detailliert charakterisiert. Die Struktur von **21** konnte röntgenographisch bestätigt werden. In verschiedenen Ansätzen wurde versucht, das mögliche Analogon **22** zu reproduzieren

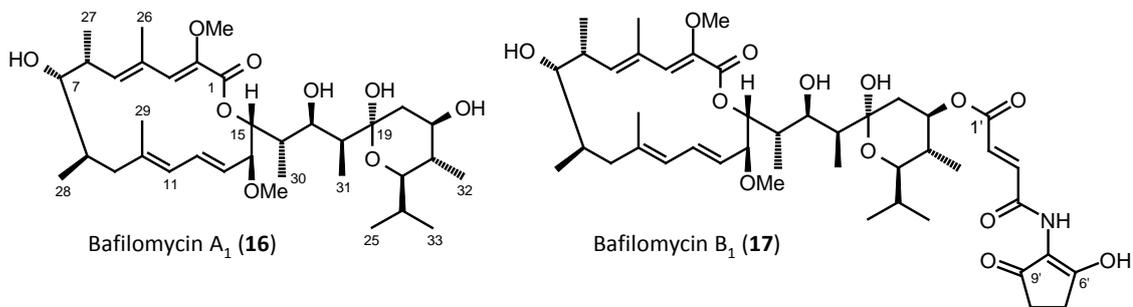
und zu charakterisieren. Vermutlich handelt es sich dabei um eine protonierte Spezies, was durch vergleichende Analysen am hergestellten Chlorid-Salz (**29**) gezeigt wurde. Die Protonierungsstelle im Molekül wurde identifiziert und mittels Kristallstruktur validiert. Es ist die erste Kristallstruktur eines derartigen Chinazolins überhaupt.



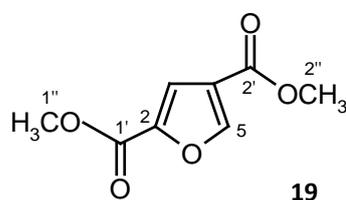
- Durch Fütterungsexperimente mit isotonenmarkiertem Glycerin, Harnstoff und Methionin wurde eine Hypothese zur Biosynthese formuliert, welche aus dem Shikimat-Weg hervorgeht und über einen Katabolismus von Tryptophan zu **21** führt.^[224] Zusätzlich konnten die bisher unbekanntes Zwischenschritte des sogenannten ‚Chinazolin-Wegs‘^[104] aufgeklärt werden.
- Aus den Fütterungsansätzen konnte Furan-2,5-dimethanol (**66**) als vermutlicher Nährmedienbestandteil oder Detoxifizierungsprodukt des Stammes beschrieben werden. Des Weiteren wurde ein roter Farbstoff (**65**) der Masse 716 g/mol detektiert und zum Teil charakterisiert. **65** ist gemäß dem Prinzip der Vorläufer-dirigierten Biosynthese nur bei Fütterungsexperimenten mit Glycerin und Methionin gebildet worden.
- Biologische Assays belegten eine gute bis moderate Bioaktivität des Chinazolins **21** in Hinblick auf seine zytotoxische Wirkung bei Krebszelllinien. Im Plattendiffusionstest und in einer Untersuchung zur Phytotoxizität an *Arabidopsis thaliana* zeigte **21** keine Wirkung.
- Weitere aus *S. venezuelae* Wa232 (GS DV232) isolierte Metaboliten wurden als *N*-Methylantranilsäure (**23**) und Thioaurin (**24**) identifiziert.
- Als Sekundärmetaboliten aus *Actinomyces* sp. Wa283 (GS DV283) konnten Indol-3-carbonsäure (**69**) und Pyrrol-3-carbonsäure (**70**) isoliert werden.
- Der Hauptmetabolit der drei Actinomyceten WaS4811, WWa18 und WWa183 wurde als Streptazolin (**71**) identifiziert. **71** fiel im chemischen Screening besonders durch seine auffällige Farbreaktion mit allen drei verwendeten Ansprühreagenzien auf.

6.2 Biosyntheseuntersuchungen an *Streptomyces griseus* 3822-14F

- In weiterführenden Einbaustudien wurde die von T. SCHUHMANN^[40,151] aufgestellte Hypothese zur Biosynthese der Bafilomycine (**16**, **17**) aus *S. griseus* Gö 3822-14F validiert und der Ursprung der ‚ungewöhnlich methoxylierten‘ Einheiten aufgeklärt.
- Durch Fütterung von [Methyl-¹³C]L-Methionin konnte diese Aminosäure als Überträger der Methylgruppe in den methoxylierten Einheiten an C-2 und C-14 identifiziert werden.
- Die für das strukturverwandte Concanamycin (**18**) postulierte Beteiligung des Enzyms Glycerin-Kinase an der Bildung der ‚ungewöhnlichen Einheiten‘ wurde durch Fütterungsversuche mit stereospezifisch markierten Glycerin – (2R)-[1,2-¹³C₂]Glycerin sowie (2S)-[1,2-¹³C₂]Glycerin – auch für **16/17** zweifelsfrei gezeigt.^[225]



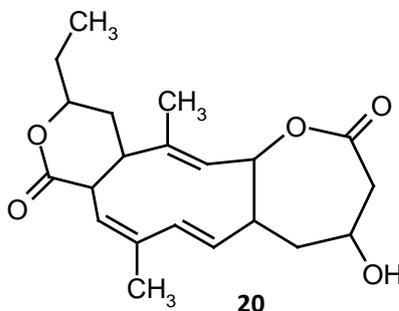
- Glycerin wurde als direkter Vorläufer der ‚ungewöhnlichen Einheiten‘ angenommen; deren Biosynthese beginnt im Primärstoffwechsel und verläuft über 1,3-Bisphosphoglycerat (**BPG**). Fütterungsversuche mit stereospezifisch ¹³C-markiertem Glycerat führten zu keinem Einbau in die Bafilomycine (**16,17**). Somit wird die Substratspezifität des Enzyms Glycerat-Kinase im Stamm Gö 3822-14F als sehr eng eingestuft und ist damit klar unterschiedlich von z.B. der des Geldanamycins (**81**).
- Aus den Fütterungsversuchen mit uniform^[168] und stereoselektiv ¹³C-markiertem Glycerin am Produzentenstamm Gö 3822-14F konnte 2,4-Dimethoxycarbonylfuran (**19**) erstmals aus einem Streptomyceten isoliert werden. **19** konnte in diesem Stamm nur auf dem Weg der ‚Vorläufer-dirigierten Biosynthese‘ als Metabolit nachgewiesen werden.



- Durch Variation der Fütterungsbedingungen und Einsatz anderer, mit Glycerin biosynthetisch verwandter Vorläufer (Glycerat, Alanin, Serin, Shikimisäure) wurde das Produktionsverhalten des Stammes in Bezug auf **19** untersucht. Nur eine kontinuierliche Zufütterung von Glycerin und Glycerat führten zu verlässlichen Ausbeuten von 1.5 mg/L des Furans **19**. Aus diesem Grund wurde eine sehr empfindlich regulierte Biosynthese postuliert.
- Aufgrund des aus den Fütterungen mit ^{13}C -markiertem Glycerin erhaltenen Einbaumusters konnten ein Biosyntheseweg, der zur Bildung von **19** führt, klar formuliert werden, wobei gezeigt werden konnte, dass die Bausteine aus zwei unterschiedlichen biosynthetischen Pools stammen. Dabei wird angenommen, dass Pyruvat (**94**) und Dihydroxyacetonphosphat (**DHAP**) jeweils einen Baustein des Furans **19** darstellen. Die Bildung erfolgt zum einen bevorzugt auf direktem Weg durch **94** und **DHAP**; des Weiteren wird eine Bildung von **19** aus den gleichen Bausteinen, jedoch als Resultat eines komplexeren Intermediärstoffwechsels angenommen.
- Durch Optimierung etablierter Synthesevorschriften von FEIST^[171] und v. PECHMANN^[184] wurde **19** auf synthetischem Weg mit ausreichender Ausbeute dargestellt und konnte dadurch vergleichend zum Naturstoff auf eine mögliche biologische Aktivität überprüft werden.
- 2,4-Dimethoxycarbonylfuran (**19**) wurde auf seine biologische Aktivität in ausgewählten Bio-Assays untersucht. Hierbei zeigte **19** keine antibakterielle bzw. antifungale Aktivität im Plattendiffusionstest. Ferner zeigte **19** in *in vitro*-Assays weder zytotoxische Aktivität gegenüber verschiedenen Krebszelllinien noch phytotoxisches Potential gegenüber *Arabidopsis thaliana*.

6.3 Genetische Studien zur Biosynthese des Collinolactons

- Der in diesem Teil der Arbeit verwendete, talentierte Produzentstamm Gö 40/10 konnte erstmals taxonomisch eingeordnet werden. Durch Beurteilung von Auftragsarbeiten zur Analyse der 16S rDNA und der Zuckerverwertung konnte Gö 40/10 als *Streptomyces coelestis* charakterisiert werden.
- Im Rahmen dieser Arbeit wurden weiterführende molekularbiologische Studien zum Auffinden des Biosynthesegenclusters des neuartigen Naturstoffs Collinolacton (**20**) vorgenommen. Die Untersuchungen stützen sich dabei auf eine Baeyer-Villiger Oxygenase (BVO), welche in der Biosynthese von **20** als post-PKS Enzym angenommen wird.



- In einem ersten Schritt wurde ein PCR-basiertes Screening des Gesamtgenoms von Gö 40/10 vorgenommen. Als positive Kontrolle wurde DNA des Produzentstamms *Streptomyces fradiae* Tü 2717 mit putativen BVO-Biosynthesegenen^[210] eingesetzt. Hierzu wurde das von L. HOFFMANN^[41] vorgeschlagene Primerdesign unter neuen Aspekten überarbeitet und sechs neue Oligonukleotide (Primer) für die PCR abgeleitet. Als Vorlage diente ein Alignment von literaturbekannten BVO-Sequenzen, in dem drei vermutlich konservierte Bereiche identifiziert wurden. Zusätzlich wurden sechs Primer in die Untersuchungen mit einbezogen, die mit dem Internet-basierten Programm „CodeHop“^[219] ermittelt wurden.
- PCR-Versuche mit Temperaturgradient für die Annealing-Temperatur wurden sowohl unter Nutzung eines Gradienten-Thermocyclers als auch mittels real-time PCR vorgenommen. Hierbei wurde kein Primerpaar gefunden, welches zu den erwarteten Amplifikaten führte. Dagegen konnten unter Verwendung definierter Annealing-Temperaturen wenige Amplifikate erhalten werden, von denen bisher drei sequenziert sind. Das DNA-Fragment, welches aus PCR-Versuchen mit genomischer DNA von Tü 2717 (Positivkontrolle) hervorging, zeigte in der Datenbank BLASTN^[221]

eine 99 %ige Übereinstimmung mit den Genen *urdE,F,A,B,C,D* aus *S. fradiae*. Damit konnte gezeigt werden, dass die entwickelten Primer zu dem gewünschten Amplifikat führen. Die noch ausstehende Sequenzierung der Amplifikate von Gö 40/10 erscheint unter diesem Aspekt erfolgversprechend. In einem weiteren Ansatz kann nun auf eine Cosmid-Bank von *S. coelestis* Gö 40/10 zurückgegriffen werden, welche aus rein PKS I-positiven Klonen besteht. Ferner kann nun das Design einer BVO-spezifischen Sonde auf Grundlage weiterer positiver Ergebnisse in Betracht gezogen werden.

- Ausgewählte Cosmide der Cosmid-Bank des Stammes Gö 40/10 wurden durch intergenerische Konjugation erfolgreich in die Modellorganismen *Streptomyces albus* sowie *Streptomyces lividans* eingebracht. Zielsetzung waren Mutanten, die den Initiationsschritt der Collinolacton (**20**)-Biosynthese umsetzen und damit für eine Anschluss-Sequenzierung in Frage kommen. Die aus Produktionstests dieser Mutanten erhaltenen Extrakte wurden mittels HPLC-MS auf mögliche neue Metaboliten untersucht. Es konnten jedoch keine Rückschlüsse auf einen Zusammenhang zwischen möglicherweise in die Mutanten eingeführte Biosynthesegene und der Collinolacton (**20**)-Biosynthese geschlossen werden.
- Es wurde ein erfolgreiches Resistenzprofil der Stämme Gö 40/10 und Tü 1892 erstellt, wobei beide Stämme sehr sensitiv gegenüber den verwendeten Antibiotika sind. Ferner konnten in Vorversuchen zur Konjugationsfähigkeit dieser Stämme erfolgreich *via* Plasmid pSET152 eine Apramycin-Resistenz sowie das ‚enhanced green fluorescence protein‘ (egfp) vermittelt werden.
- Durch Insertionsinaktivierung von Polyketidsynthasen mittels PKS I-Fragmenten wurde ein zusätzlicher Ansatz zur Identifizierung des Biosynthesegens von **20** vorgenommen. Dazu wurden Plasmide durch intergenerische Konjugation in den Stamm Gö 40/10 inseriert. Collinolacton (**20**) konnte in allen Extrakten der untersuchten Klone mittels HPLC-MS weiterhin nachgewiesen werden. Dagegen fehlten in allen Mutanten im Vergleich zum Wild-Typ die Metaboliten mit $m/z = 687$ sowie z.T. auch mit $m/z = 898$. Ersterer wird als Diastovaricin I (**115**) vermutet. Die Konstruktion weiterer Mutanten ist derzeit noch in Bearbeitung.

B. Experimenteller Teil

7 Allgemeine Materialien und Methoden

7.1 Instrumentelle Analytik

Circulardichroismus-Spektren (CD): Spektropolarimeter *Jasco* Modell J-810. Alle molaren Elliptizitäten θ sind in $10^{-1} \text{ deg cm}^2 \text{ mol}^{-1}$ angegeben.

Drehwerte: Polarimeter *PerkinElmer* Modell 343. Drehwerte $[\alpha]_D^{20}$ sind in $10^{-1} \text{ deg cm}^2 \text{ g}^{-1}$ angegeben.

Elektronenspektren (UV): Spektrometer *Varian* Modell Cary 3E. Alle Spektren wurden mit Methanol als Lösungsmittel aufgenommen. Die Wellenlänge λ ist in Nanometern [nm] angegeben und bezieht sich im allgemeinen auf das Absorptionsmaximum. In einigen Fällen sind zusätzlich „Schultern“ des Absorbanzpeaks angegeben (Abkürzung: sh).

Der molare dekadische Absorptionskoeffizient ε berechnet sich wie folgt:

$$\varepsilon = \frac{A}{c \cdot d} \quad (6.1)$$

Hierbei bezeichnet A die Absorbanz, c die Konzentration und d die Schichtdicke der Küvette. Durch Umformen erhält man:

$$\varepsilon = \frac{A \cdot M \cdot V}{m \cdot d} \quad (6.2)$$

Dabei bezeichnet M die Molmasse der untersuchten Substanz und m deren Einwaage.

Die Probe (0.1-0.2 mg) wurde in einem Volumen von 10 mL gelöst. Die Schichtdicke der verwendeten Küvette betrug 1 cm. Die Werte für ε besitzen damit die Dimension $10^{-1} \text{ m}^2 \text{ mol}^{-1}$ und sind in dieser Arbeit logarithmiert angegeben.

Angabe Methanol/HCl bzw. Methanol/NaOH: Pro Küvette mit 2 mL methanolischer Lösung wurde jeweils ein Tropfen 1 M Salzsäure bzw. 1 M Natronlauge gegeben.

Infrarotspektren (IR): IR-Spektrometer *Perkin-Elmer* Modell 1600. Alle IR-Spektren wurden als KBr-Presslinge aufgenommen.

Kernresonanzspektren

^1H -NMR-Spektren: *Varian Inova-600* (600 MHz); *Varian Mercury-300* (300 MHz); *Varian Unity-300* (300 MHz). Chemische Verschiebungen sind in δ -Werten [ppm] relativ zum jeweiligen Lösungsmittel als internen Standard angegeben. Kopplungskonstanten J sind in Hertz [Hz] angegeben. Alle ^1H -NMR-Spektren sind als Spektren erster Ordnung interpretiert, soweit Signalaufspaltung und Kopplungskonstanten angegeben sind. Abkürzungen: s = Singulett, bs = breites Singulett, d = Dublett, dd = Dublett vom Dublett, ddd = Dublett vom doppelten Dublett, t = Triplett, td = Triplett vom Dublett, dq = Dublett vom Quartett, m = Multipllett.

^{13}C -NMR-Spektren: *Varian Inova-600* (150.8 MHz); *Varian Inova-500* (125.7 MHz) ausgestattet mit *Varian PFG Cold Probe* (Heliumkühlung); *Varian Mercury-300* (75.5 MHz); *Varian Unity-300* (75.5 MHz). Chemische Verschiebungen sind in δ -Werten [ppm] relativ zum jeweiligen Lösungsmittel als internen Standard angegeben. Multiplizitäten: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett.

^{15}N -NMR-Spektren: *Varian VNMR-S* (60 MHz (^{15}N), 150 MHz (^{13}C), 600 MHz (^1H)). Chemische Verschiebungen δ [ppm] relativ zum Lösungsmittel als internen Standard. Alle Stickstoff-Kernresonanzspektren wurden von T. PAULULAT (AK IHMELS/Universität Siegen) aufgenommen.

NOE-Differenzspektren: *Varian Inova-600* (600 MHz).

2D-NMR-Spektren: $^1\text{H},^1\text{H}$ -COSY ($^1\text{H},^1\text{H}$ -Correlated Spectroscopy), HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence), HMQC (Heteronuclear Multiple Quantum Coherence), HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Connectivity).

Massenspektren

Angegeben sind jeweils die Quotienten aus Masse zu Ladung (m/z) sowie die relativen Intensitäten bezogen auf den Basispeak.

DCI-MS: *Finnigan MAT 95*, 200 eV, Reaktandgas: NH_3 .

EI-MS und **HR-EI-MS:** *Finnigan MAT 95*, 70 eV. Summenformeln wurden aus den gemessenen präzisen Massen berechnet (Abweichung < 5 ppm).

ESI-MS: *Finnigan LCQ* (Ionenfalle).

HR-ESI-MS: *Bruker Apex IV* (FTICR-MS), 7 Tesla; *Bruker micrOTOF II* (TOF-MS). Summenformeln wurden aus den gemessenen präzisen Massen berechnet (Abweichung < 1 ppm). Sofern nicht anders angegeben, erfolgten die Messungen am FTICR-MS.

Röntgenstrukturanalyse: Diffraktometer *Bruker SMART 6000*. Zur Datenintegration wurde das Programm SAINT^[226] verwendet, für die Absorptionskorrektur das Programm SADABS^[226]. Phasierung erfolgte mit SHELXS^[86] und Modellbau/Verfeinerung mit SHELXL^[86]. Die Messungen wurden von A. THORN (AK SHELDRIK/Universität Göttingen) durchgeführt.

Schmelztemperatur-Messungen (Smp.): Schmelzpunkte wurden mit Hilfe eines *Reichert* (Österreich) Heiztischmikroskops bestimmt und sind nicht korrigiert.

Bestimmung der Säurekonstanten (pK-Wert): Das Protonierungsverhalten wurde mittels pH-metrischer Titration bei 25 °C über einen pH-Bereich von 2.5-11.0 gemessen. Die zu untersuchende Substanz wurde in einer Konzentration von 1 mM eingesetzt und in 0.1 M KCl gelöst. Als Maßlösung diente 0.1039 M KOH, welche über eine (zuvor mit Standardlösungen kalibrierte) 2 mL-Spritze zugegeben wurde. Die Reinheit und exakten Konzentrationen aller eingesetzten Lösungen wurden nach einer Methode von GRAN überprüft.^[81] Die eigentliche pH-Titration erfolgte automatisiert mit Hilfe eines *Metrohm* Titriersystems, wobei eine kombinierte Mikroelektrode (*Metrohm 6.0224.100*) verwendet wurde. Zur Auswertung wurde das Programm ‚*Hyperquad*‘ verwendet.^[82] Die Bestimmung der Säurekonstanten wurde in Zusammenarbeit mit J. GALEZOWSKA (AK MEYER/Universität Göttingen) durchgeführt.

7.2 Chromatographie

Lösungsmittel: Für die Chromatographie benötigte Lösungsmittel wurden zuvor destilliert. Für die HPLC finden analysenreine Lösungsmittel und Reinstwasser (*Millipore Milli-Q*) Verwendung, welche zuvor im Ultraschallbad (10-15 min) bzw. mittels Durchleiten von Helium (5-10 min) entgast wurden.

Dünnschichtchromatographie: *Merck* HPTLC-Fertigplatten, Kieselgel (KG) 60 F₂₅₄, 10×10 cm, Schichtdicke 0.2 mm; *Merck* DC-Alufolien, Kieselgel (KG) 60 F₂₅₄, 20×20 cm, Schichtdicke 0.2 mm; *Merck* DC-Alufolien, RP-18 60 F₂₅₄, 20×20 cm, Schichtdicke 0.2 mm. Angegeben sind R_F-Werte (Laufhöhe relativ zur Lösungsmittelfront).

Sprühreagenzien: Nach *Merck*, Anfärbereagenzien für die Dünnschicht- und Papierchromatographie.^[227] Nach dem Ansprühen wurden die DC-Platten 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 (Ehrlich) (Nr. 91): 1 g 4-Dimethylaminobenzaldehyd in einer Lösung aus 75 mL Methanol und 25 mL Salzsäure (36 %).

Orcin-Sprühreagenz (Nr. 120-122): 1 g Eisen-(III)-chlorid in 100 mL Schwefelsäure gelöst und mit dem gleichen Volumen an Orcinlösung (6 % in Ethanol) versetzt.

Adsorberharz: *Supelco (USA)* Amberlite XAD-2, *Sigma* Amberlite XAD-16.

Säulenchromatographie: Für Schwerkraftsäulen wurde *Macherey-Nagel* Kieselgel (KG) 60, 0.040-0.063 nm verwendet. Für die Gelchromatographie kam *Sigma-Aldrich* Sephadex LH-20 zum Einsatz.

Mitteldruckchromatographie (MPLC): Pumpe *Knauer* HPLC Pumpe 64. *Merck* Lobar RP-18 Fertigsäulen LiChroprep (40-63 µm): Typ A (240×10 mm), Typ B (310×25 mm), Typ C (450×50 mm).

Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC):

Analytische/Semipräparative HPLC mit DAD-Kopplung:

Pumpe *Jasco* PU-2080plus; Mischkammer *Jasco* LG-2080-02; Entgaser *Jasco* DG-2080-53; PDA-Detektor *Jasco* MD-210plus; Säulenofen *Jasco* CO-2065 (Messungen wurden bei 25 °C durchgeführt).

Analytisch: Autosampler *Jasco* AS-2055plus mit *Rheodyne* 100 µL Auftragsschleife.

Semipräparativ: Manuelles Probenaufgabeventil mit *Rheodyne* 500 µL Auftragsschleife.

Software: *Jasco* Borwin mit Borwin-PDA Version 1.50 (Chromatographie); HSS-2000 Version 3.5.2 (Steuerung).

Analytische HPLC mit DAD- und ESI-MS-Kopplung (HPLC-MS): Pumpe und Mischkammer *Flux Instruments* Rheos 4000; Entgaser *Flux Instruments* ERC-3415α; Autosampler *Jasco* 851-AS; PDA-Detektor *Finnigan* Surveyor; Massendetektor *Finnigan* LCQ (ESI-MS).

Software: *Flux Instruments* Janeiro Version 1.10.0 (Steuerung Pumpe); *Thermo/Finnigan* TunePlus Version 1.3 (Steuerung ESI-MS); *Finnigan* Xcalibur Version 1.3 (Chromatographie, Steuerung).

Präparative HPLC mit DAD-Kopplung: Pumpe und Mischkammer *Jasco* PU-1587; PDA-Detektor *Jasco* UV-1575; Manuelles Probenauftragsventil mit *Rheodyne* 2 mL Auftragsschleife.

Software: *Jasco* Borwin mit Borwin-PDA Version 1.50 (Chromatographie); HSS-2000 Version 3.5.2 (Steuerung).

Analytische HPLC-Säulen:

Säule 1 (Standard für Analytik und HPLC-MS): *Grom (Grace)* Superspher RP-18 endc., 100 Å, 4 µm, 100×2 mm; Vorsäule: *Grom (Grace)* Superspher Guard column RP-18 endc., 100 Å, 10×2 mm; Flussrate 0.3 mL/min.

Säule 2: *Macherey-Nagel* Nucleodur Sphinx RP-18 endc., 5 µm, 250×3 mm; Vorsäule: *Macherey-Nagel* ChromCart, 8×3 mm; Flussrate 0.5 mL/min.

Säule 3: *Phenomenex* Synergi Hydro-RP C18 endc., 80 Å, 4 µm, 250×3 mm; Vorsäule: *Phenomenex* SecurityGuard AQ C18, 4×2 mm; Flussrate 0.5 mL/min.

Säule 4: *Phenomenex* HyperClone C18-BDS, 130 Å, 5 µm, 250×4 mm; Vorsäule: *Phenomenex* SecurityGuard AQ C18, 4×2 mm; Flussrate 0.5 mL/min.

Semipräparative HPLC-Säulen:

Säule 5: *Jasco* Kromasil (RP) C18, 100 Å, 5 µm, 250×8 mm; Flussrate 2.7 mL/min.

Säule 6: *Macherey-Nagel* Nucleosil (RP) C8 endc., 100 Å, 5 µm, 250×8 mm; Vorsäule: *Macherey-Nagel* Nucleosil C8 endc., 100 Å, 5 µm, 40×8 mm; Flussrate 2.5 mL/min.

Säule 7: *Macherey-Nagel* Nucleodur (RP) C18 endc., 110 Å, 5 µm, 250×8 mm; Flussrate 2.5 mL/min.

Säule 8: *Phenomenex* Aqua (Hydro-RP) C18 endc., 200 Å, 250×10 mm; Vorsäule: *Phenomenex* SecurityGuard AQ C18, 10×10mm; Flussrate 2.7 mL/min.

Säule 9: *Macherey-Nagel* Nucleosil (RP) C18 endc., 100 Å, 250×8 mm; Flussrate 2.5 mL/min.

Säule 10: *Macherey-Nagel* Nucleodur Sphinx RP-18 endc., 5 µm, 250×8 mm; Vorsäule: *Macherey-Nagel* ChromCart 8×3 mm; Flussrate 2.5 mL/min.

Säule 11: *Grom (Grace)* Superspher RP-18, 100 Å, 4 µm, 100×8 mm; Vorsäule: *Grom (Grace)* Saphir Guard column C18, 110 Å, 5 µm, 10×8 mm; Flussrate 2.5 mL/min.

Präparative HPLC-Säulen:

Säule 12: *Jasco* Kromasil (RP) C18, 100 Å, 7 µm, 250×20 mm; Flussrate 17 mL/min.

Programme und Laufmittelsysteme für die HPLC:

Sofern nicht anders angegeben, erfolgte die UV-Detektion bei 254 nm.

Programm 1 (Standard für Analytik und HPLC-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 2 (Aufreinigung von Collinolacton (**20**)): Laufmittelsystem Wasser (A)/Acetonitril (B). Isokratisch: 40 min bei 30 % B.

Programm 3: Laufmittelsystem Wasser (A)/Acetonitril (B), jeweils 0.05 % Ameisensäure. Gradient: von 20 % auf 30 % B in 15 min; zum Spülen von 30 % auf 100 % B in 5 min, 5 min bei 100 % B, von 100 % auf 20 % B in 2 min, 8 min bei 20 % B.

Programm 4: Laufmittelsystem Wasser (A)/Acetonitril (B), jeweils 0.05 % Ameisensäure. Gradient: von 20 % auf 60 % B in 15 min; zum Spülen von 60 % auf 100 % B in 5 min, 5 min bei 100 % B, von 100 % auf 20 % B in 2 min, 8 min bei 20 % B.

Programm 5 (Fermentationskurve des Chinazolins (**21**), HF-Medium): Laufmittelsystem Wasser (A)/Acetonitril (B), jeweils 0.05 % Ameisensäure. Isokratisch: 10 min bei 5 % B; anschließend Gradient: von 5 % auf 100 % B in 15 min, von 100 % auf 5 % B in 5 min, 5 min bei 5 % B. UV-Detektion bei 274 bzw. 339 nm.

Programm 6 (Fermentationskurve/Analyse des Chinazolins (**21**), M2-Medium): Laufmittelsystem Wasser (A)/Methanol (B), jeweils 0.05 % Ameisensäure. Gradient: von 5 % auf 100 % B in 20 min, 5 min bei 100 % B, von 100 % auf 5 % B in 5 min, 10 min bei 5 % B. UV-Detektion bei 274 bzw. 339 nm.

Programm 7: Laufmittelsystem Wasser (A)/Methanol (B). Gradient: von 20 % auf 70 % B in 35 min.

Programm 8: Laufmittelsystem Wasser (A)/Acetonitril (B). Isokratisch: 15 min bei 40 % B.

Gaschromatographie mit EI-MS-Kopplung (GC-MS): *Thermo* TRACE GC/MS (EI-MS, 70 eV); Säule *Varian* CP-Sil 8 CB (30 m × 0.25 mm, Schichtdicke (Df) 0.25 µm). Programm (Säulenofen): Anfangstemperatur 40 °C für 1 min, Gradient 10 °C/min, Endtemperatur 300 °C für 5 min; Injektor (Split/Split-less): Temperatur 250 °C, ‚Splitflow‘ (Helium) 10 mL/min mit Splitverhältnis 1:10; Flussrate 1 mL/min.

7.3 Mikrobiologische Methoden und Geräte

7.3.1 Nährmedien

Nährmedienbestandteile:

Die verwendeten Nährmedienbestandteile wurden von folgenden Firmen bezogen:

AppliChem: Glycerin wasserfrei

Merck: Malzextrakt; Caseinpepton

Difco: Agar; Bacto Nutrient Broth

Neuform: Hafermehl (Holo Hafergold)

Henselwerk GmbH: Sojamehl (fettarm und vollfett)

Oxoid: Hefeextrakt

La Vita: Spirulina (blaugrüne Mikroalge)

Roth: D-Glucose; Stärke aus Kartoffeln

Marcor: Cornsteep Powder

Villa Natura: Biomalt Gerstenmalzextrakt

Spurenelement-Lösung ‚Spur 11‘:

Für einen Liter demineralisiertes Wasser: $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ 3 g, Fe(III)-citrat 1 g, MnSO_4 0.2 g, ZnCl_2 0.1 g, $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ 0.025 g, $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \times 10 \text{H}_2\text{O}$ 0.02 g, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ 0.01 g, CoCl_2 0.004 g.

Nährmedienzusammensetzung:

Für alle Nährmedien wurde – sofern nicht anders angegeben – Leitungswasser verwendet und der pH-Wert vor dem Autoklavieren mit 0.5 M Salzsäure bzw. 0.5 M Natronlauge eingestellt (sofern angegeben). Zur Herstellung von Agarplatten wurden 22 g/L Agar zugesetzt. Alle Nährmedien wurden durch Autoklavieren (feuchte Hitze, 121 °C, 1 bar Überdruck, 30 min) sterilisiert.

Die folgenden Angaben beziehen sich auf ein Endvolumen von einem Liter:

Hafer (HF)	Hafermehl	20 g
	Spurenelement-Lösung ‚Spur 11‘	2.5 mL
		pH = 7.0
M2, M2⁺ (YMG, YMG ⁺)	Malzextrakt	10 g
	Hefeextrakt	4 g
	D-Glucose	4 g
	M2 ⁺ zusätzlich: CaCO ₃	0.5 g
		pH = 7.0
Soja/Mannit (SM)	Sojamehl (fettarm)	20 g
	D-Mannit	20 g
		pH = 7.0
Soja/Mannit (SM*)	Sojamehl (vollfett)	20 g
	D-Mannit	20 g
		pH = 7.0
SGG	D-Glucose	10 g
	Glycerin	10 g
	Stärke aus Kartoffeln	10 g
	Caseinpepton	5 g
	CaCO ₃	3 g
	Cornsteep-Powder	2.5 g
	Hefeextrakt	2 g
	NaCl	1 g
		pH = 7.0
NL 1358s (Standard)	Glycerin	30 g
	Caseinpepton	2 g
	K ₂ HPO ₄	1 g
	NaCl	1 g
	MgSO ₄ × 7 H ₂ O	0.5 g
	Spurenelement-Lösung ‚Spur 11‘	5 mL
		pH = 7.0

NL 1358f (Fütterungsversuche)	Stärke aus Kartoffeln	10 g
	D-Glucose	2 g
	Caseinpepton	2 g
	K ₂ HPO ₄	1 g
	NaCl	1 g
	MgSO ₄ × 7 H ₂ O	0.5 g
	Spurenelement-Lösung ‚Spur 11‘	5 mL
		pH = 7.0
NL 1158	Malzextrakt	20 g
	D-Glucose	10 g
	Hefeextrakt	2 g
	NH ₄ HSO ₄	0.5 g
		pH = 6.0
G20	Glycerin	20 g
	Malzextrakt	10 g
	Hefeextrakt	4 g
Biomalz (BM)	Biomalt Gerstenmalzextrakt	20 g
		pH = 5.6
Spirulina-Medium	Spirulina-Pulver	20 g
	Glucose	5 g
	Stärke	5 g
	Spurenelement-Lösung ‚Spur 11‘	2.5 mL
	Caseinpepton	2.5 g
		pH = 7.0
Stärke/Casein	Stärke	10 g
	Casein	3 g
	KNO ₃	2 g
	NaCl	2 g
	MgSO ₄ × 7 H ₂ O	50 mg
	CaCO ₃	10 mg
	FeSO ₄ × 7 H ₂ O	10 mg

7.3.2 Stammhaltung

Die Stammhaltung erfolgte auf Agarplatten. Sofern nicht anders angegeben, wurden Actinomyceten-Stämme auf M2⁺-Medium für vier bis sieben Tage bei 28 °C und Dunkelheit inkubiert, Pilz-Stämme auf Medium NL 1158 für sieben bis zehn Tage bei 25 °C und

Dunkelheit. Bewachsene Agarplatten wurden mit Parafilm (Fa. *Pechiney*) verschlossen und sind bei 4 °C Lagertemperatur für mindestens vier Monate haltbar.

7.3.3 Kultivierung in Flüssigkulturen

Die Bedingungen für eine Kultivierung in Flüssigmedium sind gesondert für jeden Produzentenstamm angegeben (s. zugehörige Kapitel). In allen Fällen – auch wenn nicht weiter angegeben – fand die Kultivierung bei Dunkelheit statt.

7.3.4 Langzeiterhaltung

Glycerin-Einlagerung: Steriles Glycerin wurde mit dem gleichen Volumen einer 48- Stunden-Kultur (Bedingungen s. Standardkultivierung der einzelnen Stämme) in Kryoröhrchen (Fa. *Sarstedt*) gemischt und bei -28 °C bzw. -70 °C gelagert. Diese 50 %ige Glycerin-Einlagerung ist je nach Stamm ca. sechs bis 48 Monate haltbar.

Stickstoff-Einlagerung: Von einer gut bewachsenen Agarplatte wurden mit einseitig zugeschweißten und mit Bleistück beschwerten sterilen Polypropylen-Halmen Agarstückchen ausgestanzt, bis der Halm gefüllt war. Zur Einlagerung von Pilz-Stämmen wurde die bewachsene Agarplatte vor dem Ausstechen mit einer 15 %igen Glycerin-Lösung bedeckt. Der Halm wurde in einem zweiten äußeren Halm gesteckt und dann an beiden Enden zugeschmolzen. Die Einlagerung erfolgt in einem Dewargefäß über flüssigem Stickstoff.

7.3.5 Schüttler und Fermenter

Thermomixer für Reaktionsgefäße *Eppendorf* Thermomixer compact; Inkubationsschüttelschränke *B.Braun* BS-1 und BS-4; Inkubationsschüttelschrank *B.Braun* Certomat HK mit Rundschüttler *B.Braun* Certomat U; Rundschüttler *B.Braun* Certomat RM; Längsschüttler (gebaut von den Werkstätten der Universität Göttingen).

Fermenter *B.Braun* Biostat B (1.5 L und 5 L) und *B.Braun* Biostat E (10 L) mit *Ingold* O₂-Elektroden.

7.3.6 Zentrifugen

Tischzentrifuge *Eppendorf* Typ 5415D; Zentrifugen *Sigma* 3K30, 4K10 und 4K15; Vakuumentrifuge *Eppendorf* Concentrator 5301.

7.3.7 Plattendiffusionstests

Als Testkeime dienten *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* und *Candida albicans*. Mit 15 µL Testsubstanz-Lösung (Rohprodukt 5 mg/mL, Reinsubstanz 1 mg/mL) versetzte Filterpapierplättchen (*Macherey-Nagel*, 6 mm Durchmesser, 0.5 mm Dicke) wurden unter sterilen Bedingungen getrocknet und auf die mit den verschiedenen Testkeimen beimpften Agarplatten gelegt. Diese wurden bei 37 °C (*E. coli*, *B. subtilis* und *S. aureus*) bzw. 25 °C (*C. albicans*) inkubiert. 24 h und 48 h nach Inkubation erfolgte eine Kontrolle auf Hemmung des Wachstums der Testkeime (Messung der Hemmhöfe).

Zur Einordnung der Aktivität der untersuchten Substanzen (ermittelt über die Hemmhof-Größe) wurden zusätzlich Antibiotika (c = 0.5 mg/mL) mit aufgetragen.

Bei *B. subtilis*, *S. aureus* jeweils 15 µL und bei *E. coli* 30 µL pro Filterpapierplättchen:

Ampicillin	in Wasser	(Roth)
Chloramphenicol	in Methanol	(Roth)
Erythromycin	in Methanol	(Fluka)
Penicillin	in Wasser	(ICN Biomedicals)
Tetracyclin	in Methanol	(Fluka)

Bei *C. albicans* wurden 15 µL des Antimykotikums Nystatin (*Merck*), gelöst in DMF, aufgetragen.

Zusammensetzung der Nährböden für Plattendiffusionstests:

Zum Ansetzen der Nährböden wurde demineralisiertes Wasser verwendet. Glucose wurde erst nach dem Autoklavieren hinzugegeben. Die folgenden Angaben beziehen sich auf einen Liter Medium:

B. subtilis und *E. coli*: D-Glucose 5 g, Trinatriumcitrat × 2 H₂O 0.5 g, KH₂PO₄ 3 g, K₂HPO₄ 7 g, MgSO₄ × 7 H₂O 0.1 g, (NH₄)₂SO₄ 1 g, Agar 15 g.

S. aureus: Bacto Nutrient Broth 8 g, NaCl 5 g, Agar 15 g.

C. albicans: Malzextrakt 10 g, Hefeextrakt 4 g, D-Glucose 4 g, Agar 15 g, pH = 5.5.

7.3.8 Zufütterung isotopenmarkierter Vorläufer

Die jeweiligen Bedingungen finden sich in den zugehörigen Kapiteln. Alle Zufütterungen zum Kulturansatz erfolgten kontinuierlich mittels *Ismatec* Schlauchpumpe. Die Berechnung der Anreicherung wurde auf Grundlage folgender Gleichungen vorgenommen:^[228]

$$\text{Anreicherung [\%]} = 1.1 \cdot \frac{\text{Intensität Signal markierte Verbindung}}{\text{Intensität Signal der Referenz}} - 1.1 \quad (6.3)$$

$$\text{Spezifischer Einbau} = \frac{\text{Anreicherung [\%]} \cdot 100}{\text{Anreicherung des zugefütterten Isotops [\%]}} \quad (6.4)$$

7.4 Untersuchungen auf biologische Aktivität

In vitro Untersuchungen zur zytotoxischen/zytostatischen Wirkung

Die Untersuchungen wurden gemäß den Richtlinien des *NCI (National Cancer Institute/USA)*^[229] mit den Tumorzelllinien AGS (Magen-Adenokarzinom), HM02 (Magen-Adenokarzinom), HepG2 (Leberkarzinom), MCF 7 (Mammakarzinom) durchgeführt.

Die Zellen wurden auf 96-well Mikrotiterplatten kultiviert. Medium: RPMI 1640 mit 10 % fetalem Kälberserum. 24 Stunden nach Aussaat wurden die Prüfsubstanzen zugegeben und die Zellen für weitere 48 Stunden kultiviert. Nach dieser Zeit wurde die Zellzahl (Proteinbestimmung mit Sulforhodamin) bestimmt. Das Lösungsmittel für die Stammlösungen richtete sich nach den Prüfsubstanzen, vorrangig wurde Methanol verwendet. Die Methanolkonzentration im Testansatz betrug jeweils 0.1 %. Es wurde die halbmaximale (GI₅₀) und maximale (TGI) Hemmung des Zellwachstums ermittelt.

Alle Versuche wurden durch W. BEIL (MHH/Hannover) durchgeführt.

In vitro Untersuchungen zur Klonbildungsrate

Die Inkubation der Tumorzellen (Linie A549, Bronchialkarzinom) erfolgte für 24 Stunden in einem serumfreien Medium. Das Medium wurde entfernt, die Klone getrocknet, mit Löfflers Methylenblau (*Merck*) gefärbt und gezählt, um den IC₅₀-Wert (Konzentration, bei der die Hälfte der Zellen in ihrem Wachstum inhibiert wird) zu bestimmen.

Die Untersuchungen erfolgten *in-house* in Zusammenarbeit mit der Abteilung ZELLKULTUR.

In planta* Untersuchungen zum Einfluss von Sekundärmetaboliten auf *Arabidopsis thaliana

In der Arbeitsgruppe KARLOVSKY (Universität Göttingen) wurden zunächst Verdünnungen (5 nM bis 100 µM) der Testsubstanzen in flüssigem MS-Medium (2.2 g/L Murashige & Skoogmedium, 15 g/L Sucrose) hergestellt und zum Härten für 48 Stunden bei 4 °C gelagert.

Im Anschluss erfolgte die Samensterilisation von *Arabidopsis thaliana* unter Verwendung von Natriumhypochloritlösung sowie das Auslegen der Samen in den einzelnen Vials. Zur Inkubation wurden die Samen für 14 Tage unter standardisierten Bedingungen (25 °C, 8 Stunden Dunkelheit; Beleuchtung 4x40 W, 40 cm Abstand) inkubiert. Die Auswertung des Keimungsversuches erfolgte visuell.

8 Naturstoffe aus Mikroorganismen neuer pflanzlicher Habitate

8.1 Isolierung pflanzlich assoziierter Mikroorganismen

Das hier verwendete Pflanzenmaterial stammt aus der Nähe der Stadt Harbin (VR China) und wurde seinem natürlichen Habitat steril entnommen, d.h. die Pflanzen wurden in sterile Beutel überführt. Die Auswahl erfolgte unter Berücksichtigung des Aspektes „Heilpflanze der Traditionellen Chinesischen Medizin (TCM)“. Die taxonomische Einordnung der Pflanzen wurde von M. WINK (Universität Heidelberg) vorgenommen.

Assoziierte Mikroorganismen (Actinomyceten): Die einzelnen Pflanzenteile (Wurzel, Sprossachse, Blatt) wurden mit sterilem Wasser in Falcontubes durch Schütteln mittels Vortex behandelt. Einige Tropfen der Wasserphase wurden nun auf einen Cellulose-Nitrat-Filter (Porengröße 0.2 μm , *Sartorius*) auf Stärke/Casein-Agarmedium aufgetragen und für 2-5 Tage bei 28 °C inkubiert. Zeigte sich deutliches Wachstum unterhalb des Filterpapiers wurde die dortige Mischkultur im Verdünnungsausstrich auf M2⁺-Agar überimpft und erneut bei 28 °C inkubiert. Durch wiederholtes Auswählen einzelner Kolonien und anschließenden 3-Feld-Ausstrich auf M2⁺-Agar konnten Reinkulturen gewonnen werden. Hiermit konnten 51 Actinomyceten isoliert werden. Es kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass hierunter gleiche Stämme zu finden sind. Zusätzlich wurden drei unterschiedliche Pilze isoliert, welche – vermutlich durch Wasserspritzer – neben den Cellulosefilter auf dem Casein/Stärke-Agar gewachsen sind.

Endophytische Pilze: Zur Oberflächensterilisation wurden einzelne Pflanzenteile 30 bis 60 Sekunden in 70 % (v/v) Ethanol getaucht und anschließend in sterilem Wasser gewaschen. Mit einer sterilen Rasierklinge wurden Blätter und Sprossachsen aufgeschnitten und die Schnittkanten auf NL 1158-Festmedium getupft. Die Inkubation erfolgte anfangs bei 28 °C für drei Tage. Durch mehrfaches Überimpfen (3-Feld-Ausstrich) und Inkubation bei 24 °C konnten die Kolonien vereinzelt werden. Insgesamt wurden 20 unterschiedlich erscheinende Pilze isoliert.

Als Negativkontrolle wurde zusätzlich NL 1158-Festmedium mit den sterilisierten und nicht zerschnittenen Pflanzenteilen inokuliert und bei gleichen Bedingungen inkubiert. Hier konnte kein Wachstum festgestellt werden.

8.2 Chemisches Screening von pflanzlich assoziierten Actinomyceten

Während des chemischen Screenings wurden alle Medien mit demineralisiertem Wasser angesetzt. Die Kultivierung der zu untersuchenden Stämme erfolgte in fünf verschiedenen Medien (M2, HF, SM, SGG, Spirulina) in 300 mL Erlenmeyerkolben mit Schikane und Schaumstoffkappe. Es wurden jeweils 50 mL Nährmedium mit einem ca. 1 cm² großen Stück einer gut bewachsenen Agarplatte inokuliert und bei 28 °C und 180 rpm inkubiert. Nach 72 h erfolgte eine Kontrolle des pH-Wertes. Lag dieser unter 6,0, wurde der Ansatz für weitere 24 h inkubiert und dann aufgearbeitet. Konnte ein pH-Wert über 6,0 festgestellt werden, erfolgte die Ernte dieser Kultur. Pro Medium wurden zwei Kolben angesetzt, welche bei gleichem Aussehen und End-pH zusammen aufgearbeitet wurden.

Zur Aufarbeitung wurden die vereinigten Kulturbrühen (100 mL) auf pH = 5,0 eingestellt, mit Celite versetzt und filtriert. Das Kulturfiltrat wurde drei Mal mit dem gleichen Volumen an Ethylacetat extrahiert und die organische Phase im Vakuum entfernt. Zur Extraktion des Mycels wurde dieses mit 100 mL Aceton versetzt und für 15 min im Ultraschallbad behandelt. Celite/Mycel und Flüssigphase wurden durch Filtration getrennt und das Filtrat im Vakuum eingeeengt.

Beide Extrakte (aus Kulturfiltrat und Mycel) wurden in je 5 mL Chloroform/Methanol 9:1 aufgenommen und 10 µL dieser Lösung auf HPTLC-Kieselgelplatten aufgetragen. Deren Entwicklung erfolgte mit Chloroform/Methanol 9:1 als mobile Phase. Das Metabolitenmuster wurde durch UV-Licht (254 nm, 350 nm) und mit Hilfe der Sprühreagenzien Anisaldehyd, Ehrlich und Orcin analysiert. Im Folgenden wurde eine Isolierungsstrategie verfolgt, die nicht auf das gesamte Spektrum an Metaboliten zielte, sondern sich an einzelnen, zuvor ausgewählten orientierte.

8.3 Chemisches Screening von endophytischen Pilzen

8.3.1 Kultivierung in Schüttelkulturen

Die verschiedenen Stämme wurden in vier verschiedenen Nährmedien (NL 1158, Biomalz, G20, SGG) in 1 L-Erlenmeyerkolben mit Schikane und Zellstoffstopfen kultiviert. Diese waren jeweils mit 150 mL Medium gefüllt und wurden mit ca. 1 cm² einer gut bewachsenen Agarplatte des Stammes beimpft. Es wurden jeweils zwei Kolben pro Nährmedium angesetzt, um eine Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten. Die Aufarbeitung

erfolgte analog zu den Actinomyceten-Stämmen (s. Kapitel 8.2) nach einer Fermentation von sechs Tagen bei 28 °C und 180 rpm.

8.3.2 Kultivierung in P-Kolben

Wie bei den Schüttelkulturen wurden die Nährmedien NL 1158, Biomalz, G20 und SGG verwendet. Pro Nährmedium wurden zwei P-Kolben (5 L Gefäßvolumen) mit je einem Liter Medium angesetzt und diese mit einer Schaumstoffkappe verschlossen. Nach dem Autoklavieren wurden die Kolben mit je 20 mL (2 % (v/v)) einer 72 h alten, in Schüttelkolben gewachsenen Vorkultur angeimpft und 28 Tage bei Raumtemperatur inkubiert. Die Aufarbeitung erfolgte in Analogie zum chemischen Screening von Actinomyceten (s. Kapitel 8.2), wobei hier das Rohprodukt für die Analyse mittels HPTLC in 20 mL Lösungsmittel aufgenommen wurde.

8.4 Biologisches Screening

Das biologische Screening erfolgte durch Plattendiffusionstests (vgl. Kapitel 7.3.7). Hierzu wurden die Extrakte von Kulturfiltrat und Mycel, die durch das chemische Screening gewonnen wurden, mit analysenreinem Methanol auf eine Konzentration von 5 mg/mL eingestellt. 15 µL dieser Lösung wurden je Filterpapierplättchen aufgetragen.

Ausgewählte Extrakte wurden im Rahmen einer bestehenden Kooperation bei der *BASF AG* hinsichtlich einer für den Pflanzenschutz relevanten biologischen Aktivität untersucht. Die Extrakte wurden in Mikrotestsystemen auf eine hemmende Wirkung gegen phytopathogene Pilze und schädigende Insekten geprüft. Des Weiteren wurden *in vivo* Gewächshaustests auf fungizide bzw. herbizide Wirkung durchgeführt. Zusätzlich erfolgte eine Auftrennung mittels HPLC, so dass einzelnen Fraktionen bezüglich ihrer biologischen Aktivität untersucht werden konnten.

8.5 *Streptomyces venezuelae* Wa232 (GS DV232)

Bei diesem Bakterium handelt es sich um einen assoziierten Actinomyceten, welcher vom Blatt (*Folium*) der Pflanze *Filipendula palmata* (Pall.) Maxim. („Mädesüß“, Familie der *Rosaceae*) isoliert wurde.

8.5.1 Taxonomische Charakterisierung

Die Charakterisierung erfolgte mittels 16S rDNA Analyse durch *Biotecon Diagnostics* (Potsdam) sowie über das Zuckerverwertungsspektrum durch die *DSZM* (S. VERBARG, Braunschweig).

8.5.2 Stammhaltung

Die Stammhaltung erfolgte auf M2⁺-Festmedium. Die Platten wurden nach dem Beimpfen für drei bis vier Tage bei 28 °C inkubiert, wodurch sich grau-rosa gefärbtes Luftmycel ausbildete. Der Agar färbte sich hierbei leicht dunkelbraun. Die Einlagerung erfolgte unter Standardbedingungen (in Glycerin und über Stickstoff).

8.5.3 Kultivierung in Schüttelkolben: Variation der Kultivierungsparameter

Kultivierung in HF-Medium: Zur Auswahl, welche Bedingungen einen Einfluss auf das Metabolitenspektrum besitzen, erfolgte die Kultivierung bei 28 °C für 72 h in 1 L-Erlenmeyerkolben mit Schaumstoffkappe, welche mit 250 mL Medium gefüllt waren. Die Kolben wurden mit je 1/8 einer bewachsenen Agarplatte beimpft. Es wurden folgende Variationen vorgenommen:

- HF-Medium (Leitungswasser) unter Zusatz von ‚Spur 11‘
- HF-Medium (Leitungswasser) ohne Zusatz von ‚Spur 11‘
- HF-Medium (demineralisiertes Wasser) unter Zusatz von ‚Spur 11‘
- HF-Medium (demineralisiertes Wasser) ohne Zusatz von ‚Spur 11‘

Jede Variante wurde in Erlenmeyerkolben mit Schikane und ohne Schikane angesetzt. Zusätzlich wurde jede Variante jeweils einmal unter Verwendung von Rundschüttlern (180 rpm) und einmal unter Verwendung von Längsschüttlern (120 rpm) kultiviert. Somit ergaben sich insgesamt 16 unterschiedliche Kultivierungsansätze. Zur 72. Stunde lag der pH-Wert bei allen Ansätzen bei durchschnittlich 5.5 und die Kulturen wiesen eine braune Farbe auf.

Nach Aufarbeitung (s. unten) konnten die Ansätze durch Analyse unter UV-Licht (254 nm und 350 nm) und Behandlung mit dem Sprühreagenz Anisaldehyd hinsichtlich ihrer Metabolitenspektren kategorisiert und zusammen weiter bearbeitet werden.

Kultivierung in M2-Medium: Die Kultivierung erfolgte im 5 L-Maßstab in 1 L-Erlenmeyerkolben mit Schikane und Schaumstoffkappe, welche mit jeweils 250 mL M2-Medium gefüllt waren. Nach Inokulation mit ca. 1/8 einer gut bewachsenen Agarplatte erfolgte die Kultivierung für 72 h bei 28 °C und mit 180 rpm. Zum Erntezeitpunkt war die Kultur ockerfarben und der pH-Wert lag bei 6.0.

Kultivierung in SGG-Medium: Die Kultivierung erfolgte im 6 L-Maßstab in 1 L-Erlenmeyerkolben mit Schikane und Schaumstoffkappe, welche mit jeweils 250 mL SGG-Medium (mit demineralisiertem Wasser) gefüllt waren. Nach Inokulation mit ca. 1/8 einer gut bewachsenen Agarplatte erfolgte die Kultivierung für 72 h bei 28 °C und mit 180 rpm. Die Kultur besaß eine dunkelbraune Farbe und einen pH-Wert von 7.4.

Aufarbeitung der Kultivierungsansätze: Alle Kulturen eines Ansatzes wurde bezüglich ihrer pH-Werte und Eigenschaften (Farbe, Geruch, Viskosität...) verglichen und entsprechend zusammen aufgearbeitet. Die Aufarbeitung erfolgte durch Korrektur des pH-Wertes auf 5.0 und Trennung von Kulturfiltrat und Mycel durch Filtration. Das Mycel wurde verworfen. Das Kulturfiltrat wurde drei Mal mit jeweils dem gleichen Volumen an Ethylacetat extrahiert und die organische Phase im Vakuum eingeengt.

8.5.4 Kultivierung im Fermenter (10 Liter-Ansatz)

Auswahl des Mediums: Vor der eigentlichen Kultivierung im Fermenter erfolgte eine Kultivierung in Schüttelkolben zur Auswahl eines geeigneten Fermentationsmediums. Dazu wurden pro Variante zwei 1 L-Erlenmeyerkolben mit Schikane und Schaumstoffkappe mit jeweils 250 mL Medium gefüllt. Die Varianten unterschieden sich hinsichtlich des eingesetzten Mediums:

- HF-Medium (Leitungswasser) unter Zusatz von ‚Spur 11‘
- HF-Medium (demineralisiertes Wasser) unter Zusatz von ‚Spur 11‘
- Medium S (Leitungswasser)
- Medium S (demineralisiertes Wasser)

Alle Kolben wurden mit ca. 1/8 einer gut bewachsenen Agarplatte beimpft, für vier Tage bei 28 °C und 180 rpm kultiviert und standardgemäß aufgearbeitet. Der Vergleich der

Metabolitenspektren erfolgte mittels Dünnschichtchromatographie (KG, Chloroform/Methanol 9:1 und RP-18, Methanol/Wasser 7:3).

Kultivierung im Fermenter: Die Kultivierung erfolgte als 10 L-Ansatz im Fermenter Biostat E. Dieser wurde mit neun Litern HF-Medium (mit ‚Spur 11‘ und Leitungswasser) befüllt, sterilisiert und anschließend mit einem Liter einer 48 h alten Schüttelkultur gleichen Mediums des Stammes inokuliert. Die Fermentation wurde bei 28 °C mit einer Rührgeschwindigkeit von 200 rpm und einer Belüftung von 1 vvm durchgeführt. Die pH-Sperre lag bei 6.5 ± 1.5 . Die Ernte erfolgte nach der 75. Stunde. Zu diesem Zeitpunkt zeigte die Kultur eine braune Färbung und wies einen pH-Wert von 5.9 auf.

Variation der Aufarbeitung: Kulturfiltrat und Mycel wurden durch Filtration getrennt. Um das große Volumen dieser Fermentation möglichst effizient aufzuarbeiten, wurde versucht, die Metaboliten mittels Adsorption an XAD-16 zu isolieren. Dazu wurden 100 mL des Filtrats an ca. 100 mL XAD-16 adsorbiert, dieses mit Wasser gewaschen und anschließend mit 200 mL Methanol eluiert. Als Vergleich wurden 100 mL des Kulturfiltrats zwei Mal mit jeweils dem gleichen Volumen an Ethylacetat extrahiert. Ein Teil des Mycels wurde 15 min im Ultraschallbad mit Aceton behandelt und filtriert.

In allen Fällen wurde die organische Phase im Vakuum entfernt, die Extrakte in 1 mL Chloroform/Methanol 9:1 aufgenommen und je 10 μ L durch Dünnschichtchromatographie (KG, Chloroform/Methanol 9:1) analysiert.

Die weitere Aufarbeitung erfolgte mittels Ethylacetat-Extraktion, da dieses Verfahren zu einem breiten Metabolitenspektrum führte. Im Gegensatz dazu erschien eine Extraktion des gesamten Mycels als wenig erfolgversprechend, so dass das Mycel verworfen wurde.

8.5.5 Isolierung der Metaboliten

Als Folge der variierten Kultivierungsbedingungen ergaben sich jeweils unterschiedliche Metabolitenspektren des Rohextrakts. Daher orientierte sich die weitere Aufreinigung bei jedem Medium an den zu isolierenden Metaboliten. Es wurde nur der Extrakt des Kulturfiltrats aufgearbeitet.

Isolierungsstrategie nach Kultivierung in HF-Medium: Eine erste Trennung erfolgte mittels Säulenchromatographie an Kieselgel (Schwerkraft, Chloroform/Methanol 9:1). Durch anschließende Chromatographie an Kieselgel (Schwerkraft, Cyclohexan/Ethylacetat/Methanol 5:10:2) und MPLC (RP-18, Aceton/Wasser 4:1) konnte 4-Methyl-2-chinazolinamin (**21**) in Ausbeuten von 2 mg/L gewonnen werden.

Isolierungsstrategie nach Kultivierung in M2-Medium: Der Kulturfiltratextrakt wurde an Kieselgel (Chloroform/Methanol 9:1) fraktioniert. Anschließende Aufreinigung einer Fraktion an Sephadex LH-20 (Eluent: Aceton) und HPLC (Säule 6, Programm 3) lieferten 0.5 mg/L der Substanz **22**. Eine weitere Fraktion wurde nach MPLC (RP-18, Methanol/Wasser 7:3) an Sephadex LH-20 (Eluent: Methanol) getrennt. Es wurden 1 mg/L an N-Methylantranilsäure (**23**) und 0.3 mg/L an Thioaurin (**24**) gewonnen.

Isolierungsstrategie nach Kultivierung in SGG-Medium: Das Rohextrakt wurde an Kieselgel (Schwerkraft, Chloroform/Methanol 9:1) und mittels MPLC (RP-18, Methanol/Wasser 7:3) getrennt. Man erhielt 4-Methyl-2-chinazolinamin (**21**) in Ausbeuten von 1.5 mg/L.

Isolierungsstrategie nach Kultivierung im Fermenter (HF-Medium): Durch zweifache Chromatographie an Kieselgel (Schwerkraft, 1. Chloroform/Methanol 9:1, 2. Cyclohexan/Ethylacetat/Methanol 5:10:2) und anschließende HPLC (Säule 10, Programm 4) erhielt man 4-Methyl-2-chinazolinamin (**21**) in einer Ausbeute von 0.2 mg/L.

8.5.6 Charakterisierung der Metaboliten

4-Methyl-2-chinazolinamin (**21**)

2-Amino-4-methylchinazolin, 4-Methylchinazolin-2-ylamin

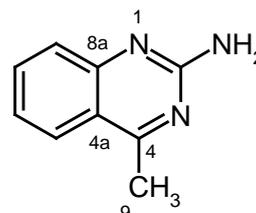
$C_9H_9N_3$ (159.19)

weißer Feststoff; minziger Geruch

UV-löschend (254 nm)

blau-weiß fluoreszierend (350 nm)

Smp.: 112 °C



$R_f = 0.44$ (KG, $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 9:1);
0.47 (RP-18, Methanol/Wasser 8:2).

$R_t = 8$ min (HPLC: Säule 2, Programm 4);
9.5 min (HPLC: Säule 3, Programm 6).

Anfärbeverhalten: intensiv rot, wird nach einiger Zeit gelb (Anisaldehyd);
violett (Ehrlich).

EI-MS: m/z (%) = 159 (100) $[\text{M}]^+$, 144 (12) $[\text{M}-\text{CH}_3]^+$, 132 (18), 119 (17).

HR-EI-MS: $m/z = 159.0797$ (gefunden wie berechnet).

ESI-MS (positive Ionen): $m/z = 160$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, 319 $[2\text{M}+\text{H}]^+$.

HR-ESI-MS: $m/z = 160.08692$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ (gefunden wie berechnet).

UV (MeOH): λ_{max} ($\lg \epsilon$) = 202 (4.04), 235 (4.28), 349 (3.31) nm;

(MeOH, HCl): λ_{max} ($\lg \epsilon$) = 201 (3.96), 230 (4.14), 246 (4.01), 275 (3.43), 342 (3.34) nm;

(MeOH, NaOH): λ_{max} ($\lg \epsilon$) = 211 (3.81), 236 (4.31), 350 (3.57) nm.

IR (KBr): $\tilde{\nu}_{\text{max}} = 3323, 3174, 2757, 1650, 1615, 1560, 1479, 1440, 1392, 1362, 1264,$
1249, 1159, 1141, 1012, 948, 868, 797, 761, 736, 555, 523 cm^{-1} .

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, Aceton- d_6): $\delta = 2.72$ (s, 3H, 9- H_3), 6.08 (bs, 2H, 2- NH_2), 7.21 (ddd, $J = 8.5, 7.0, 1.5$ Hz, 1H, 6-H), 7.44 (dd, $J = 8.5, 1.5$ Hz, 1H, 8-H), 7.63 (ddd, $J = 8.5, 7.0, 1.5$ Hz, 1H, 7-H), 7.94 (dd, $J = 8.5, 1.5$ Hz, 1H, 5-H) ppm.

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CD_2Cl_2): $\delta = 2.76$ (s, 3H, 9- H_3), 5.38 (bs, 2H, 2- NH_2), 7.25 (ddd, $J = 8.5, 7.0, 1.0$ Hz, 1H, 6-H), 7.51 (dd, $J = 8.5, 1.0$ Hz, 1H, 8-H), 7.65 (ddd, $J = 8.5, 7.0, 1.5$ Hz, 1H, 7-H), 7.89 (dd, $J = 8.5, 1.5$ Hz, 1H, 5-H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (125.7 MHz, Aceton- d_6): $\delta = 21.5$ (q, C-9), 120.3 (s, C-4a), 122.9 (d, C-6), 126.4 (d, C-5), 126.7 (d, C-8), 134.3 (d, C-7), 153.2 (s, C-8a), 161.4 (s, C-2), 170.6 (s, C-4) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (125.7 MHz, CD_2Cl_2): $\delta = 21.7$ (q, C-9), 119.9 (s, C-4a), 123.0 (d, C-6), 125.7 (d, C-5), 125.8 (d, C-8), 134.1 (d, C-7), 151.7 (s, C-8a), 159.8 (s, C-2), 170.8 (s, C-4) ppm.

$^{15}\text{N-NMR}$ (60 MHz (^{15}N), 600 MHz (^1H), Aceton- d_6): $\delta = -110.4$ (N-3), -164.2 (N-1), -303.1 (2- NH_2) ppm.

* : Chemische Verschiebungen wurden aus den Korrelationen im $^1\text{H}-^{15}\text{N}$ -HMQC bzw. $^1\text{H}-^{15}\text{N}$ -HMBC bestimmt.

Röntgenstruktur: Die Substanz wurde konzentriert in Dichlormethan gelöst (10 mg/mL) und bei 4°C zur Evaporation gelagert. **21** kristallisierte als weiß-gelbliches Nadelpolster, von dem eine einzelne Kristallnadel für die Messung abgespalten wurde. Die Röntgenstrukturdaten

und Daten der Strukturverfeinerung sind im Anhang (Kapitel 11.2) angegeben bzw. *via* CCDC^[84] zu beziehen.

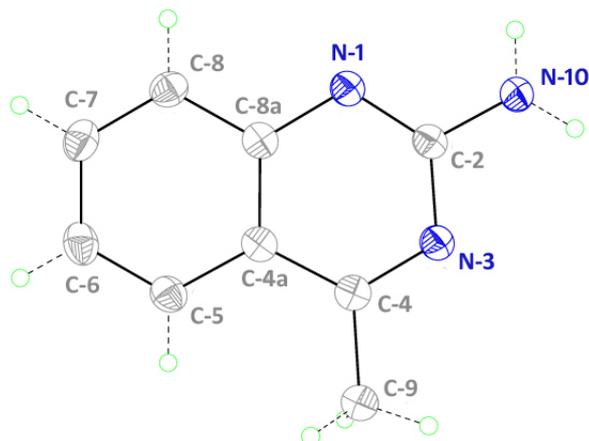


Abbildung 80: Röntgenstruktur von 4-Methyl-2-chinazolinamin (**21**). Auslenkungsellipsoide sind mit einer Aufenthaltswahrscheinlichkeit von 50 % angezeigt. Die Abbildung wurde mit dem Programm SHELXP generiert.^[86]

Analogon des 4-Methyl-2-chinazolinamins (**22**)

C₉H₉N₃ (159.19)

weißer Feststoff

UV-löschend (254 nm)

blau-weiß fluoreszierend (350 nm)

$R_f = 0.44$ (KG, CHCl₃/MeOH 9:1);

0.47 (RP-18, Methanol/Wasser 8:2).

$R_t = 6$ min (HPLC: Säule 6, Programm 3).

Anfärbeverhalten: intensiv rot, wird nach einiger Zeit gelb (Anisaldehyd);
violett (Ehrlich).

EI-MS: m/z (%) = 159 (100) [M]⁺, 144 (12) [M-CH₃]⁺, 132 (18), 119 (17).

HR-EI-MS: $m/z = 159.0797$ (gefunden wie berechnet).

UV (MeOH): λ_{max} (lg ϵ) = 202 (3.53), 236 (3.69), 271 (sh, 2.84), 348 (2.69) nm;

(MeOH, HCl): λ_{max} (lg ϵ) = 201 (3.63), 229 (3.57), 246 (3.43), 277 (2.83), 343 (2.80) nm;

(MeOH, NaOH): λ_{max} (lg ϵ) = 209 (3.76), 236 (3.77), 267 (sh, 3.18), 347 (2.99) nm.

IR (KBr): $\tilde{\nu}_{max} = 3424, 2927, 2364, 2340, 1684, 1619, 1384, 1262, 1203, 1137, 1026, 802, 760, 724$ cm⁻¹.

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CD_2Cl_2): δ^* = 2.91 (s, 3H, 9- H_3), 6.20 (bs, 1H), 7.50 (ddd, J = 8.5, 7.0, 1.0 Hz, 1H, 6-H), 7.75 (dd, J = 8.5, 1.0 Hz, 1H, 8-H), 7.88 (ddd, J = 8.5, 7.0, 1.5 Hz, 1H, 7-H), 8.01 (dd, J = 8.5, 1.5 Hz, 1H, 5-H), 10.77 (bs, 1H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (125.7 MHz, CD_2Cl_2): δ^* = 23.1 (q, C-9), 118.1 (s, C-4a), 118.5 (d, C-8), 126.0 (d, C-6), 126.9 (d, C-5), 137.5 (d, C-7), 140.0 (s, C-8a), 155.6 (s, C-2), 178.7 (s, C-4) ppm.

* : Nummerierung des Grundgerüsts in Analogie zu **21**,
jedoch kann kein endgültiger Strukturvorschlag gegeben werden (s. Kapitel 3.3.3).

***N*-Methylantranilsäure (23)**

2-(Methylamino)benzoesäure, *o*-(Methylamino)benzoesäure

$\text{C}_8\text{H}_9\text{NO}_2$ (151.16)

blass gelber Feststoff

UV-löschend (254 nm)

R_f = 0.36 (KG, $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 9:1).

R_t = 9.5 min (HPLC: Säule 1, Programm 1).

Anfärbeverhalten: rosa (Ehrlich).

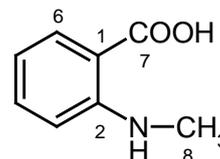
EI-MS m/z (%) = 151 (100) $[\text{M}]^+$, 132 (25), 105 (78), 77 (33), 51 (13).

HR-EI-MS: m/z = 151.0633 (gefunden wie berechnet).

UV (MeOH): λ_{max} ($\lg \epsilon$) = 215 (3.16), 253 (2.65), 332 (2.26) nm;

(MeOH, HCl): λ_{max} ($\lg \epsilon$) = 203 (2.81), 221 (2.90), 256 (1.70), 352 (1.91) nm;

(MeOH, NaOH): λ_{max} ($\lg \epsilon$) = 217 (3.37), 254 (2.93), 332 (2.64) nm.



$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): δ = 2.94 (s, 3H, 8- H_3), 6.68 (dd, J = 8.0 Hz, 1H, 5-H), 6.76 (d, J = 8.5 Hz, 1H, 3-H), 7.44 (ddd, J = 8.5, 1.5 Hz, 1H, 4-H), 7.97 (dd, J = 8.0, 1.5 Hz, 1H, 6-H) ppm.

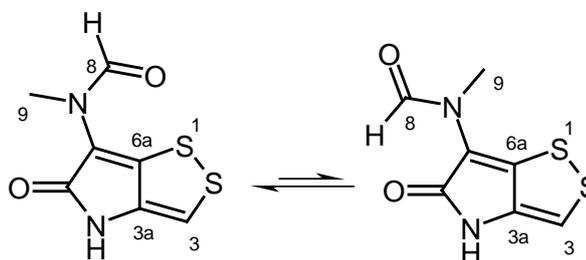
$^{13}\text{C-NMR}$ (150.8 MHz, CDCl_3): δ = 30.1 (q, C-8), 109.3 (s, C-1), 111.7 (d, C-3), 115.5 (d, C-5), 132.5 (d, C-6), 135.6 (d, C-4), 151.7 (s, C-2), 172.7 (s, C-7) ppm.

Thioaurin (24)Antibiotikum vD844, 5-Oxo-6-(*N*-methylformamid)-4,5-dihydro-1,2-dithiol[4,3-*b*]pyrrol**C₇H₆N₂O₂S₂** (214.26)

gelber Feststoff

UV-löschend (254 nm)

R_f = 0.36 (KG, CHCl₃/MeOH 9:1);
0.65 (RP-18, MeOH/H₂O 7:3).

**Anfärbeverhalten:** gelb-grün (Anisaldehyd).**EI-MS** m/z (%) = 214 (10) [M]⁺, 186 (29), 171 (12), 64(22), 59(28), 43 (100).**HR-ESI-MS** gefunden: 214.9943220 [M+H]⁺, 236.9762860 [M+Na]⁺;berechnet: 214.9943453 [M+H]⁺ (Abweichung 0.11 ppm),236.9762899 [M+Na]⁺ (Abweichung 0.02 ppm).**UV** (MeOH): λ_{\max} (lg ϵ) = 203 (4.00), 370 (3.90), 544 (3.01), 579 (3.02) nm;(MeOH, HCl): λ_{\max} (lg ϵ) = 202 (3.91), 370 (3.89), 543 (3.00), 578 (3.01) nm;(MeOH, NaOH): λ_{\max} (lg ϵ) = 221 (3.82), 359 (3.89), 544 (3.04), 578 (3.06) nm.**¹H-NMR** (300 MHz, Aceton-d₆): δ (Hauptrotamer) = 3.49 (s, 3H, 9-H₃), 7.12 (s, 1H, 3-H), 8.14 (s, 1H, 8-H), 9.74 (bs, 1H, 4-H)* ppm.**¹H-NMR** (300 MHz, Aceton-d₆): δ (Nebenrotamer) = 3.15 (s, 3H, 9-H₃), 7.21 (s, 1H, 3-H), 8.51 (s, 1H, 8-H), 9.90 (bs, 1H, 4-H)* ppm.

* : Zuordnungen sind austauschbar.

¹³C-NMR (125.7 MHz, Aceton-d₆): δ = 34.1 (q, C-9), 110.5 (d, C-3), 110.6 (s, C-6), 134.4 (s, C-3a), 142.7 (s, C-6a), 162.4 (d, C-8), 162.5 (s, C-5) ppm.**8.5.7 Biosyntheseuntersuchungen an 4-Methyl-2-chinazolinamin (21)****8.5.7.1 Erstellen der Fermentationskurve**

Kultivierung in HF-Medium: Aufgrund der höheren Ausbeute an **21** war für Untersuchungen zur Biosynthese eine Fermentation des Stammes Wa232 in HF-Medium vorgesehen. Als Inokulum diente eine Glycerin-Einlagerung des Stammes. Hiermit wurde gewährleistet, dass das Zellmaterial der ursprünglichen Kultivierung verwendet wurde. Zur Aufnahme des zeitabhängigen Produktionsverlaufs von **21** sollten alle Kultivierungsansätze die gleichen

Anfangsbedingungen besitzen. Deshalb wurde zunächst eine Vorkultur in 300 mL Erlenmeyerkolben mit Schikane und Schaumstoffkappe, die mit je 100 mL HF-Medium gefüllt waren, angesetzt. Nach dem Beimpfen mit je 1.5 mL einer Glycerin-Einlagerung des Stammes erfolgte die Kultivierung für 48 h bei 28 °C und 180 rpm. Die Hauptkultur erfolgte in 300 mL Erlenmeyerkolben mit Schikane und Schaumstoffkappe und jeweils 100 mL HF-Medium. Diese wurden mit je 5 mL (5 % (v/v)) der 48 h-Vorkultur inokuliert und bei 28 °C und 180 rpm inkubiert. Alle fünf bis sechs Stunden wurden drei Kolben entnommen und wie unten beschrieben aufgearbeitet. Die Probenentnahme erfolgte bis zur 166. Stunde, so dass insgesamt 75 Kolben aufgearbeitet wurden.

Aufarbeitungsschema:

- Der pH-Wert der Proben wurde ggf. auf pH = 5.5 korrigiert.
- 50 mL wurden in ein Falcontube überführt und für 5 min bei 10000 rpm zentrifugiert. Das Mycel wurde verworfen.
- Der Überstand wurde ein Mal für ca. 30 Sekunden mit 100 mL Ethylacetat extrahiert und die organische Phase im Vakuum eingeengt.
- Der so erhaltene Extrakt wurde in 2 mL Methanol aufgenommen und in ein 2 mL-Reaktionsgefäß überführt. Mittels Vakuumzentrifuge wurde das Volumen auf 1 mL eingeengt.
- Eine Analyse des Produktionsverlaufs an **21** erfolgte dünnschichtchromatographisch (KG, Chloroform/Methanol 9:1) und mittels HPLC (Säule 4, Programm 5). Hierbei wurden jeweils 10 µL als Injektionsvolumen gewählt.

Variation des Nährmediums: Da die unterschiedlichen Proben kein vergleichbares Metabolitenmuster und schwankende Konzentrationen an **21** aufwiesen, wurden Variationen des Mediums von Vor- und Hauptkultur vorgenommen und analysiert.

Hierzu wurde der Stamm unter den oben genannten Bedingungen für 48 h kultiviert, wobei diese jeweils in HF- und M2-Medium erfolgten. Mit 7.5 mL (7.5 % (v/v)) dieser Vorkulturen inokulierte man 100 mL Medium (HF und M2) in 300 mL Erlenmeyerkolben mit Schikane.

Dadurch ergaben sich folgende Kombinationen, welche je 2× durchgeführt wurden:

<u>Vorkultur</u>	<u>Hauptkultur</u>
HF	HF
HF	M2
M2	M2
M2	HF

Die Kultivierung erfolgte bei 28 °C und 180 rpm, wobei Proben von je 10 mL nach 48 h und 60 h entnommen wurden.

Zur Aufarbeitung wurden die Proben (10 mL) in Falcontubes überführt, das Mycel abzentrifugiert (5 min bei 13000rpm) und der Überstand ein Mal mit 20 mL Ethylacetat extrahiert. Die organische Phase wurde im Vakuum eingeengt und in 0.5 mL Methanol aufgenommen. Eine Analyse des Metabolitenmusters erfolgte mittels Dünnschichtchromatographie (KG, Chloroform/Methanol 9:1).

Kultivierung in M2-Medium: Für die Biosyntheseuntersuchungen wurde als Konsequenz der obigen Vorversuche das Medium M2 ausgewählt. Die Aufnahme der Fermentationskurve erfolgte analog zur Kultivierung in HF-Medium (s. oben). Im Unterschied dazu wurde sowohl für Vor- als auch Hauptkultur das Medium M2 eingesetzt. Die Entnahme der Proben (3× 100 mL Kultur) erfolgte bis zur 54. Stunde nach Fermentationsbeginn. Nach Aufarbeitung (s. oben) wurden die Extrakte auf ihre Konzentration an **21** mittels Dünnschichtchromatographie (KG, Chloroform/Methanol 9:1) und gekoppelter HPLC-MS (10 µL Probenvolumen, Säule 3, Programm 6) untersucht. Hierbei wurden die Flächenintegrale des Peaks von **21** im UV-Chromatogramm (über alle Wellenlängen) ermittelt.

8.5.7.2 Durchführung der Fütterungsexperimente

Fermenter: Die zu fütternden Substanzen wurden zuvor in 40 mL sterilem Reinstwasser gelöst, ggf. der pH-Wert auf ca. 6-7 eingestellt und steril filtriert. Anthranilsäure (**25**) wurde durch Zugabe von 0.5 M Salzsäure in Lösung gebracht und der pH-Wert anschließend mit 0.5 M Natronlauge korrigiert. Alle Fütterungsexperimente wurden im Fermenter Biostat B im Medium M2 durchgeführt. Der Fermentationsansatz wurde mit 10 % (v/v) einer 48 h-

Vorkultur, die in 1 L-Erlenmeyerkolben mit Schikane (150 mL M2-Medium) bei 28 °C und 180 rpm kultiviert wurde, inokuliert. Als Kultivierungsbedingungen im Fermenter wurden gewählt: 28 °C, 500 rpm, 3 vvm Luftzufuhr und pH-Sperre bei 6.5 ± 1.5 . Die zu fütternden Substanzen wurden mit Hilfe einer Schlauchpumpe kontinuierlich von der zwölften bis 23. Inkubationsstunde zugepumpt.

Erlenmeyerkolben: Für alle unmarkierten Substanzen wurde das Fütterungsexperiment parallel zum Fermenter zusätzlich in Schüttelkulturen durchgeführt, um einen Vergleich der Ausbeute an **21** zu erhalten. Diese Fütterungsexperimente (300 mL-Ansatz) wurden in 1 L-Erlenmeyerkolben mit Schikane und Schaumstoffkappe durchgeführt, welche mit je 150 mL M2-Medium gefüllt waren. Nach dem Beimpfen mit 7.5 mL der 48 h-Vorkultur (s. oben) wurde der Stamm für 54 h bei 28 °C und 180 rpm kultiviert. Auch hier wurden die Fütterungssubstanzen von der zwölften bis 23. Inkubationsstunde kontinuierlich zugeführt.

Tabelle 14: Übersicht über die in den Fütterungsexperimenten am Stamm Wa232 verwendeten Substanzen. Angegeben ist zusätzlich die Größe des Kultivierungsansatzes im Fermenter. Bei allen unmarkierten Substanzen wurden zusätzlich Fütterungsversuche in Schüttelkulturen durchgeführt (= Angabe „EMK“).

Substanz	Bezugsquelle	Anreicherung	Endkonzentration	Kultivierungsansatz
Anthranilsäure	<i>Merck</i>	-	7.3 mM	5 L + EMK
Glycerin	<i>AppliChem</i>	-	5.4 mM	1 L + EMK
[U- ¹³ C ₃]Glycerin	<i>Isotec</i>	99 % ¹³ C	5.4 mM	1 L
Harnstoff	<i>Merck</i>	-	4.0 mM	1 L + EMK
[¹³ C]Harnstoff	<i>Campro</i>	99 % ¹³ C	4.0 mM	1 L
[¹⁵ N ₂]Harnstoff	<i>Campro</i>	95 % ¹⁵ N	4.0 mM	1 L
[¹³ C, ¹⁵ N ₂]Harnstoff	<i>Cambridge Isotope Lab.</i>	99 % ¹³ C, > 98 % ¹⁵ N	4.0 mM	1.5 L
[Methyl- ¹³ C]Methionin	<i>Cambridge Isotope Lab.</i>	99 % ¹³ C	1.2 mM	1.5 L

Aufarbeitung: Um die Konzentration an Chinazolin (**21**) zu ermitteln, wurden von allen Ansätzen je 50 mL entnommen und wie in Kapitel 8.5.7.1 (Erstellung der Fermentationskurve) beschrieben aufgearbeitet. Eine Analyse erfolgte durch Dünnschichtchromatographie (KG, Chloroform/Methanol 9:1) und HPLC-MS (10 µL Probenvolumen, Säule 3, Programm 6).

Zur Aufarbeitung der Fütterungsansätze wurde der pH-Wert auf 5.5 korrigiert und das Mycel durch Filtration abgetrennt. Das Kulturfiltrat wurde drei Mal mit jeweils dem gleichen Volumen an Ethylacetat extrahiert und die organische Phase im Vakuum eingengt.

Isolierung von 4-Methyl-2-chinazolinamin (21): Mit dem Ziel, keine der produzierten Metaboliten durch Chromatographie an Kieselgel zu verlieren, wurde das Rohprodukt durch Gelchromatographie an Sephadex LH-20 (Eluent: Methanol) getrennt. Mittels MPLC (RP-18, Methanol/Wasser 8:2) konnte **21** in Ausbeuten von 2 mg/L gewonnen werden.

Aus den Extrakten aus den Fütterungsansätzen mit Glycerin und [Methyl-¹³C]Methionin konnte nach Chromatographie an Sephadex LH-20 ein roter Farbstoff (**65**) als Minderkomponente (0.5 mg/L) isoliert werden.

Zusätzlich zeigte sich im Dünnschichtchromatogramm nach Behandlung mit Anisaldehyd eine mäßig polare Zone, welche zu einer intensiv grün-braunen Farbreaktion führte. Die zugehörige Substanz stellte sich als das aus dem Medium M2 stammende Furan-2,5-dimethanol (**66**) heraus und konnte in Ausbeuten von 7 mg/L isoliert werden.

8.5.7.3 Charakterisierung der aus Fütterungsversuchen gewonnenen Metaboliten

Substanz 65

roter Feststoff

wenig UV-löschend (254 nm)

rot fluoreszierend (350nm)

$R_f =$ 0.00 (Auftragsstelle; KG, CHCl₃/MeOH 9:1);

0.44 (RP-18, MeOH/H₂O 7:3).

$R_t =$ 17.5 min (Säule 3, Programm 6).

Anfärbeverhalten: färbt nicht an (Anisaldehyd, Ehrlich).

ESI-MS (positive Ionen): m/z (%) = 717 [M+H]⁺ (100),

(negative Ionen): m/z (%) = 715 [M-H]⁻ (100), 1431 [2M-H]⁻ (54).

HR-ESI-MS gefunden: $m/z = 739.1715660$ [M+Na]⁺

berechnet: $m/z = 739.1718199$ (C₃₃H₄₈O₅S₆),

$m/z = 739.1718895$ (C₃₂H₂₈N₈O₁₂),

$m/z = 739.1723714$ (C₂₈H₂₅N₁₆O₆Cl₁).

UV (MeOH+0.05 % HCOOH)*: λ_{\max} = 236, 328, 404, 536, 572.

* : Ermittelt aus HPLC-MS-Messungen.

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CD_3OD)*: δ = 3.15-3.20 (m), 3.65 (d/dd), 4.38-4.47 (m), 10.09 (s), 10.19 (s), 10.24 (s) ppm.

* : Aus NMR-Messungen bestätigte Signale für **65** ohne Anspruch auf Vollständigkeit.

Furan-2,5-dimethanol (**66**)

2,5-Bis(hydroxymethyl)furan

$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_3$ (128.12)

weißer Feststoff

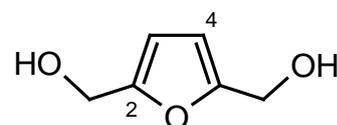
R_f = 0.34 (KG, $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 9:1);

0.75 (RP-18, $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ 7:3).

Anfärbeverhalten: intensiv grün-braun (Anisaldehyd);

violett (Ehrlich).

EI-MS m/z (%) = 128 [M]⁺ (59), 111 (16), 109 (11), 97 (100), 83 (15), 69 (22), 59 (19), 41 (26).



$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, Aceton- d_6): δ = 4.34 (bs, 1H, CH_2OH), 4.46 (s, 2H, CH_2OH), 6.18 (s, 1H, 3-H, 4-H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (125.7 MHz, Aceton- d_6): δ = 57.2 (t, CH_2OH), 108.1 (d, C-3, C-4), 155.6 (s, C-2, C-5) ppm.

8.5.8 Synthetische Arbeiten zu 4-Methyl-2-chinazolinamin (**21**)

8.5.8.1 Darstellung von **21**

Die Synthese erfolgte in Anlehnung an die Arbeiten von HYNES *et al.*, wodurch eine Ausbeute von 31 % zu erwarten war.^[80] Alle Reagenzien wurden bei *AlfaAesar* bezogen.

Guanidincarbonat (0.9 g, 5 mmol) und *ortho*-Fluoroacetophenon (0.3 g, 2.5 mmol) wurden unter Schutzgas (Argon) in 30 mL *N,N*-Dimethylacetamid gelöst. Die Lösung wurde für 9 h bei 135 °C unter Rückfluss gerührt, wobei parallel eine Reaktionskontrolle mittels Dünnschichtchromatogramm (KG, Chloroform/Methanol 9:1) erfolgte. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum eingeeengt und der Rückstand in 50 mL Eiswasser

aufgenommen. Nach Filtration und Waschen mit Eiswasser erhielt man einen gelb-weißen Feststoff. Dieser wurde aus Wasser umkristallisiert und unter Vakuum getrocknet. Aufgrund der vorgesehenen biologischen Tests erfolgte ein weiterer Reinigungsschritt durch HPLC (Säule 8, Programm 6). Man erhielt **21** als weißes kristallines Pulver in einer Ausbeute von 22 % (0.86 g, 0.54 mmol). Der Schmelzpunkt wurde auf 112 °C bestimmt (Lit.: 156-158 °C)^[80].

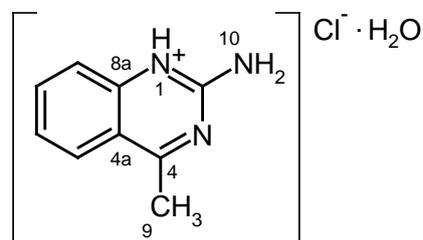
8.5.8.2 Darstellung des Chlorid-Salzes (**29**)

21 wurde in 0.5 M Salzsäure gelöst bei 40 °C im Vakuum eingengt. Der so erhaltene Feststoff wurde mit ca. 2 mL Dichlormethan gewaschen und getrocknet. Man erhielt **29** als weiße kristalline Nadeln.

C₉H₁₀N₃Cl·H₂O (213.66)

Smp.: 170 °C

HR-ESI-MS gefunden: 160.08696 [M-Cl]⁺,
berechnet: 160.08692 [M-Cl]⁺.



UV (MeOH): λ_{\max} (lg ϵ) = 202 (3.65), 236 (3.88), 263 (sh, 3.04), 351 (2.86) nm;

(MeOH, HCl): λ_{\max} (lg ϵ) = 230 (3.78), 246 (3.65), 342 (2.93) nm;

(MeOH, NaOH): λ_{\max} (lg ϵ) = 237 (3.70), 268 (sh, 3.12), 349 (2.98) nm.

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-d₆, 35 °C): δ = 2.48 (s, 3H, 9-H₃), 7.54 (ddd, J = 8.5, 7.0, 1.5 Hz, 1H, 6-H), 7.71 (dd, J = 8.5, 1.5 Hz, 1H, 8-H), 7.96 (ddd, J = 8.5, 7.0, 1.5 Hz, 1H, 7-H), 8.22 (dd, J = 8.5, 1.5 Hz, 1H, 5-H), 8.44 (bs, 1H), 9.23 (bs, 1H), 14.40 (bs, 1H) ppm.

¹⁵N-NMR (60 MHz (¹⁵N), 600 MHz (¹H), DMSO-d₆, 25 °C)*: δ = -117.5 (N-3), -246.9 (N-1), -282.8 (2-NH₂) ppm.

* : Chemische Verschiebungen wurden aus den Korrelationen im ¹H-¹⁵N-HMQC bzw. ¹H-¹⁵N-HMBC bestimmt.

8.5.8.3 Acetylierung von **21**

21 (2 mg, 12.6 mmol) wurde in Pyridin (500 μ L) gelöst, im Eisbad gekühlt und mit Essigsäureanhydrid (50 μ L) versetzt. Nach Erwärmen auf Raumtemperatur wurde der Ansatz für 20 Stunden bei dieser Temperatur gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 3 mL gesättigter NaHCO₃-Lösung und 5 mL kaltem Reinstwasser gestoppt. Nach zweimaliger Extraktion mit dem gleichen Volumen an CHCl₃ wurde die organische Phase im Vakuum

eingengt. Mittels HPLC (Säule 8, Programm 6) konnte 4-Methyl-2-chinazolinacetylamid (**60**) in Ausbeuten von 47 % (1,2 mg, 6.0 mmol) gewonnen werden.

4-Methyl-2-chinazolinacetylamid (**60**)

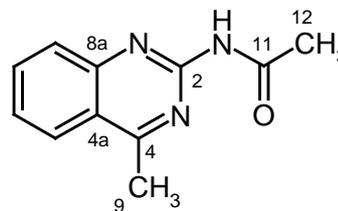
C₁₁H₁₁N₃O (201.22)

gelb-weißer Feststoff

$R_t =$ 14.5 min (Säule 3, Programm 6),

18 min (Säule 8, Programm 6).

EI-MS m/z (%) = 202 (100) $[M+H]^+$, 160 (48) $[M-COCH_3+H]^+$.



¹H-NMR (600 MHz, Aceton-d₆): $\delta =$ 2.50 (s, 3H, 12-H₃), 2.86 (s, 3H, 9-H₃), 7.53 (ddd, $J = 8.5, 7.0, 1.0$ Hz, 1H, 6-H), 7.78 (dd, $J = 8.5, 1.0$ Hz, 1H, 8-H), 7.86 (ddd, $J = 8.5, 7.0, 1.0$ Hz, 1H, 7-H), 8.15 (dd, $J = 8.5, 1.0$ Hz, 1H, 5-H), 9.18 (bs, 1H, 10-H) ppm.

¹³C-NMR (125.7 MHz, Aceton-d₆): $\delta =$ 21.7 (q, C-9), 25.4 (q, C-12), 122.2 (s, C-4a), 126.4 (d, C-6), 126.5 (d, C-5), 128.4 (d, C-8), 135.1 (d, C-7), 151.6 (s, C-8a), 171.0 (s, C-11), 171.6 (s, C-4) ppm. C-2 konnte nicht identifiziert werden.

8.6 *Actinomyces* sp. Wa283 (GS DV283)

Bei diesem Bakterium handelt es sich um einen assoziierten Actinomyceten, welcher vom Blatt (*Folium*) der Pflanze *Filipendula palmata* (Pall.) Maxim. („Mädesüß“, Familie der *Rosaceae*) isoliert wurde.

8.6.1 Stammhaltung

Die Stammhaltung erfolgte auf M2⁺-Festmedium. Die Platten wurden nach dem Beimpfen für vier bis fünf Tage bei 28 °C inkubiert, wodurch sich sandfarbenes Luftmycel ausbildete. Der Agar färbte sich leicht dunkelbraun. Die Einlagerung erfolgte unter Standardbedingungen (in Glycerin und über Stickstoff).

8.6.2 Kultivierung in Schüttelkolben und Aufarbeitung

Kultivierung: Die Kultivierung des Stamms Wa283 wurde in einem 7 L-Ansatz in 1 L-Erlenmeyerkolben mit Schikane und Schaumstoffkappe, die mit jeweils 250 mL SM-Medium gefüllt waren, durchgeführt. Die Kultivierungsbedingungen betragen 28 °C und 180 rpm. Die Inokulation erfolgte mit je 10 mL einer 48 h-Vorkultur (300 mL-Erlenmeyerkolben, Schikane, je 100 mL SM-Medium, gleiche Bedingungen). Die Fermentation wurde nach vier Tagen beendet, wobei die Kultur eine braune Farbe angenommen hatte und der pH-Wert bei 6.6 lag.

Aufarbeitung: Im chemischen Screening konnten nach Dünnschichtchromatographie des Mycel-Extrakts keine als „interessant“ eingestuft Zonen gefunden werden. Das Mycel wurde durch Filtration abgetrennt und daher verworfen. Das Kulturfiltrat wurde auf pH = 5.5 korrigiert, drei Mal mit Ethylacetat extrahiert und die organische Phase im Vakuum eingengt.

8.6.3 Isolierung und Charakterisierung der Metaboliten

Die Isolierung der Metaboliten erfolgte gemäß Abbildung 81.

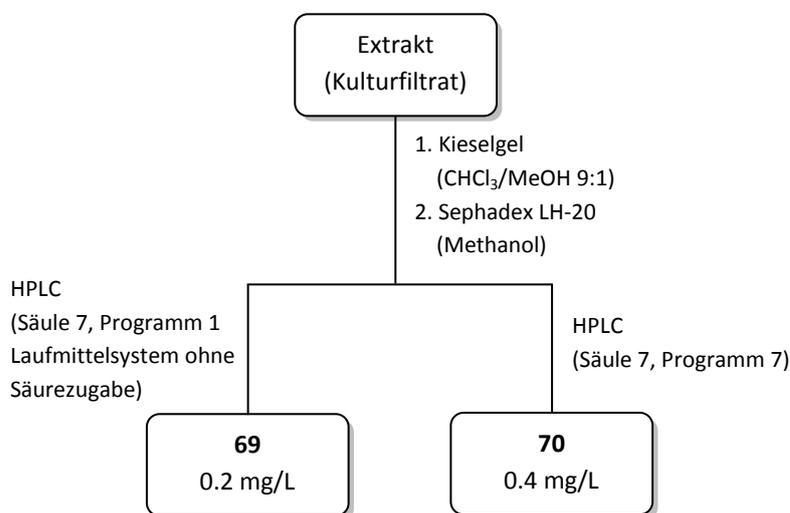


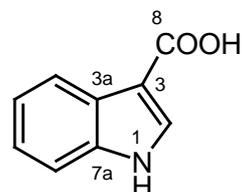
Abbildung 81: Isolierungsschema der Metaboliten aus *Actinomyces* sp. Wa283 nach Fermentation in SM-Medium.

Indol-3-carbonsäure (69)**C₉H₇NO₂** (161.16)

hellbrauner Feststoff

UV-löschend (254 nm)

rot fluoreszierend (350 nm)

Smp.: 230 °C**R_f** = 0.45 (KG, CH₂Cl₂/MeOH 9:1).**R_t** = 13.0 min (HPLC: Säule 7, Programm 1).**Anfärbeverhalten:** gelb-orange (Anisaldehyd).**EI-MS:** *m/z* (%) = 161 (100) [M]⁺, 144 (77) [M-OH]⁺.**UV** (MeOH): λ_{max} (lg ε) = 210 (3.54), 280 (3.15) nm;(MeOH, HCl): λ_{max} (lg ε) = 210 (3.38), 279 (3.03) nm;(MeOH, NaOH): λ_{max} (lg ε) = 219 (3.71), 280 (3.61), 341 (3.54) nm.[α]_D²⁰ = -7.7 ° (MeOH, *c* = 1.0 mg/mL).**¹H-NMR** (600 MHz, CD₂Cl₂): δ = 7.28 (m, 2H, 5-H, 6-H), 7.47 (m, 1H, 7-H), 7.99 (d, 1H, 2-H), 8.14 (m, 1H, 4-H), 8.79 (bs, 1H, 1-H) ppm.**¹H-NMR** (600 MHz, CD₃OD): δ = 7.12 (dt, *J* = 7.5, 1.3 Hz, 1H, 5-H)^{*}, 7.15 (dt, *J* = 7.5, 1.3 Hz, 1H, 6-H)^{*}, 7.39 (m, 1H, 7-H), 7.86 (s, 1H, 2-H), 8.11 (dd, *J* = 7.5, 1.0 Hz, 1H, 7-H) ppm.

* : Zuordnungen sind austauschbar.

¹³C-NMR (150.8 MHz, CD₃OD): δ = 110.0 (s, C-3), 112.7 (d, C-7), 122.1 (d, C-4, C-5), 123.4 (d, C-6), 127.5 (s, C-3a), 132.9 (s, C-2), 138.2 (s, C-7a), 170.3 (s, C-8) ppm.

Pyrrol-3-carbonsäure (70)1*H*-Pyrrol-3-carbonsäure, 3-Pyrrolcarbonsäure**C₅H₅NO₂** (111.10)

blass gelber Feststoff

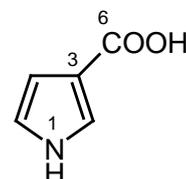
UV-löschend (254 nm)

 $R_f = 0.39$ (KG, CH₂Cl₂/MeOH 9:1). $R_t = 5$ min (HPLC: Säule 7, Programm 7).**Anfärbeverhalten:** gelb-braun (Anisaldehyd).**EI-MS:** m/z (%) = 111 [M]⁺ (6), 110 [M-H]⁺ (100), 94 [M-OH]⁺ (48), 66 [M-COOH]⁺ (27), 45 [COOH]⁺ (6).**DCI-MS:*** m/z (%) = 221 [2M+H]⁺ (8), 145 [M+NH₃+NH₄]⁺ (23), 128 [M+NH₃]⁺ (100), 111 [M+H]⁺ (14).* : [M] = vermutlich unprotonierte Spezies von **70**.¹**H-NMR** (600 MHz, Aceton-d₆): $\delta = 6.15$ (m, 1H, 4-H), 6.22 (bs, 1H, 1-H), 6.78 (m, 1H, 5-H), 6.95 (m, 1H, 2-H), 10.61 (bs, 1H, 6-OH) ppm.¹**H-NMR** (600 MHz, CDCl₃): $\delta = 5.85$ (bs, 1H, 1-H), 6.25 (m, 1H, 4-H), 6.65 (m, 1H, 5-H), 6.95 (m, 1H, 2-H), 9.58 (bs, 1H, 6-OH) ppm.**8.7 Actinomyces sp. WaS4811 (GS DV4811)**

Bei diesem Bakterium handelt es sich um einen assoziierten Actinomyceten, welcher von der Sprossachse der Pflanze *Filipendula palmata* (Pall.) Maxim. („Mädesüß“, Familie der *Rosaceae*) isoliert wurde.

8.7.1 Stammhaltung

Die Stammhaltung erfolgte auf M2⁺-Festmedium. Die Platten wurden nach dem Beimpfen für vier bis fünf Tage bei 28 °C inkubiert, wodurch sich sandfarbenes Luftmycel ausbildete. Der Agar färbte sich leicht dunkelbraun. Die Einlagerung erfolgte unter Standardbedingungen (in Glycerin und über Stickstoff).



8.7.2 Kultivierung in Schüttelkolben und Aufarbeitung

Die Kultivierung des Stamms Wa283 wurde in einem 4 L-Ansatz in 1 L-Erlenmeyerkolben mit Schikane und Schaumstoffkappe, die mit jeweils 150 mL M2-Medium gefüllt waren, durchgeführt. Die Kultivierungsbedingungen betragen 28 °C und 180 rpm. Die Inokulation erfolgte mit je 1/8 einer gut bewachsenen Agarplatte des Stammes. Die Fermentation wurde nach vier Tagen beendet, wobei die Kultur eine orange-braune Farbe angenommen hatte und der pH-Wert bei 6.9 lag.

Zur Aufarbeitung wurde das Mycel durch Filtration abgetrennt und verworfen. Im chemischen Screening konnten nach Dünnschichtchromatographie des Mycel-Extrakts keine als interessant eingestuften Zonen gefunden werden. Das Kulturfiltrat wurde auf pH = 5.0 korrigiert, drei Mal mit Ethylacetat extrahiert und die organische Phase im Vakuum eingeeengt.

8.7.3 Isolierung und Charakterisierung der Metaboliten

Der Extrakt des Kulturfiltrats wurde an Kieselgel (Schwerkraft, Chloroform/Methanol 9:1) chromatographisch getrennt. Im Dünnschichtchromatogramm (KG, Chloroform/Methanol 9:1) zeigte sich in einer Fraktion eine durch Orcin intensiv braun färbende Zone. Die zugehörige Substanz Streptazolin (**71**) konnte in einer Ausbeute von 3.5 mg/L mittels semipräparativer HPLC (Säule 9, Programm 8) isoliert werden.

Streptazolin (**71**)

1-Aza-3-oxatricyclo-dec-6-en-2-on

$C_{11}H_{13}NO_3$ (207.22)

gelbes Öl

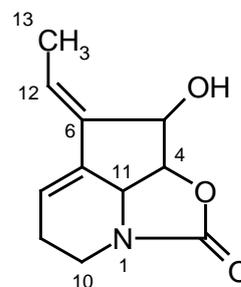
UV-löschend (254 nm)

R_f = 0.34 (KG, $CHCl_3/MeOH$ 9:1);

0.64 (RP-18, $MeOH/H_2O$ 7:3).

R_t = 6 min (HPLC: Säule 9, Programm 8);

6 min (HPLC: Säule 1, Programm 1).



Anfärbeverhalten: gelb-braun (Anisaldehyd);
orange (Ehrlich);
intensiv braun (Orcin).

EI-MS: m/z (%) = 207 (100) [M]⁺, 170 (20), 134 (29), 91 (35), 57(43).

HR-ESI-MS: gefunden: m/z = 208.0968890 [M+H]⁺;
berechnet: m/z = 208.0968197 [M+H]⁺ (Abweichung 0.33 ppm).

UV (MeOH): λ_{\max} (lg ϵ) = 203 (3.76), 268 (3.36), 547 (2.75), 578 (2.81) nm;
(MeOH, HCl): λ_{\max} (lg ϵ) = 202 (3.78), 265 (3.44), 544 (2.96), 579 (2.98) nm;
(MeOH, NaOH): λ_{\max} (lg ϵ) = 221 (3.64), 280 (3.47), 544 (2.98), 578 (3.01) nm.

$[\alpha]_D^{20}$ = 25 ° (MeOH, c = 1.0 mg/mL).

CD (MeOH, c = 0.48 mmol/L): λ_{\max} (θ) = 206 (10408), 212 (9987) nm.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 1.87 (d, J = 7.5 Hz, 3H, 13-CH₃), 2.12-2.24 und 2.41-2.54 (m, 2H, 9-H₂), 3.32-3.46 (m, 2H, 10-H₂), 4.26 (d, J = 7.0 Hz, 1H, 11-H), 4.71 (d, J = 7.0 Hz, 1H, 4-H), 4.83 (s, 1H, 5-H), 6.00 (ddd, J = 7.0, 4.0, 3.5 Hz, 1H, 8-H), 6.12 (q, J = 7.0 Hz, 1H, 12-H) ppm.

8.8 *Actinomyces* sp. WWa18 (GS DV18)

Bei diesem Bakterium handelt es sich um einen assoziierten Actinomyceten, welcher von der Wurzel der Pflanze *Filipendula palmata* (Pall.) Maxim. („Mädesüß“, Familie der *Rosaceae*) isoliert wurde.

8.8.1 Stammhaltung

Die Stammhaltung erfolgte auf M2⁺-Festmedium. Die Platten wurden nach dem Beimpfen für vier bis fünf Tage bei 28 °C inkubiert, wodurch sich sandfarbenes Luftmycel ausbildete. Der Agar färbte sich leicht dunkelbraun. Die Einlagerung erfolgte unter Standardbedingungen (in Glycerin und über Stickstoff).

8.8.2 Kultivierung in Schüttelkolben und Aufarbeitung

Die Kultivierung des Stamms Wa283 wurde in einem 3 L-Ansatz in 1 L-Erlenmeyerkolben mit Schikane und Schaumstoffkappe, die mit jeweils 250 mL SM-Medium gefüllt waren, durchgeführt. Die Kultivierungsbedingungen betragen 28 °C und 180 rpm. Die Inokulation

erfolgte mit je 1/8 Stück einer gut bewachsenen Agarplatte des Stammes. Die Fermentation wurde nach drei Tagen beendet, wobei die Kultur ockerfarben erschien und der pH-Wert bei 6.5 lag.

Zur Aufarbeitung wurde das Mycel durch Filtration abgetrennt und verworfen. Im chemischen Screening konnten nach Dünnschichtchromatographie des Mycel-Extrakts keine als interessant eingestuften Zonen gefunden werden. Das Kulturfiltrat wurde auf pH = 5.0 korrigiert, drei Mal mit Ethylacetat extrahiert und die organische Phase im Vakuum eingeengt.

8.8.3 Isolierung und Charakterisierung der Metaboliten

Nach dreifacher Chromatographie an Kieselgel (1. Schwerkraft, Chloroform/Methanol 9:1; 2. MPLC, Aceton/Wasser 3:1; 3. Schwerkraft, Cyclohexan/Ethylacetat/Methanol 5:10:0.5) erhielt man Streptazolin (**71**) in einer Ausbeute von 5.0 mg/L. Die physikochemischen Eigenschaften von **71** sind in Kapitel 8.7.3 beschrieben.

8.9 *Actinomyces* sp. WWa183 (GS DV183)

Bei diesem Bakterium handelt es sich um einen assoziierten Actinomyceten, welcher von der Wurzel der Pflanze *Filipendula palmata* (Pall.) Maxim. („Mädesüß“, Familie der *Rosaceae*) isoliert wurde.

8.9.1 Stammhaltung

Die Stammhaltung erfolgte auf M2⁺-Festmedium. Die Platten wurden nach dem Beimpfen für vier bis fünf Tage bei 28 °C inkubiert, wodurch sich sandfarbendes Luftmycel ausbildete. Der Agar färbte sich leicht dunkelbraun. Die Einlagerung erfolgte unter Standardbedingungen (in Glycerin und über Stickstoff).

8.9.2 Kultivierung in Schüttelkolben und Aufarbeitung

Die Kultivierung des Stamms Wa283 wurde in einem 6 L-Ansatz in 1 L-Erlenmeyerkolben mit Schikane und Schaumstoffkappe, die mit jeweils 250 mL M2-Medium gefüllt waren, durchgeführt. Die Kultivierungsbedingungen betragen 28 °C und 180 rpm. Die Inokulation erfolgte mit je 1/8 Stück einer gut bewachsenen Agarplatte des Stammes. Die Fermentation

wurde nach vier Tagen beendet, wobei die Kultur ockerfarben erschien und der pH-Wert bei 7.3 lag.

Zur Aufarbeitung wurde das Mycel durch Filtration abgetrennt und verworfen. Im chemischen Screening wurden nach Dünnschichtchromatographie des Mycel-Extrakts keine Zonen für eine weitere Bearbeitung ausgewählt. Das Kulturfiltrat wurde auf pH = 5.0 korrigiert, drei Mal mit Ethylacetat extrahiert und die organische Phase im Vakuum eingeengt.

8.9.3 Isolierung und Charakterisierung der Metaboliten

Der Extrakt des Kulturfiltrats wurde an Kieselgel (Schwerkraft, Chloroform/Methanol 9:1) chromatographisch getrennt. Im Dünnschichtchromatogramm (KG, Chloroform/Methanol 9:1) zeigte sich in einer Fraktion eine breite Zone, die durch Behandlung mit Ehrlich in der Wärme orange färbte. Die zugehörige Substanz Streptazolin (**71**) konnte in einer Ausbeute von 3.0 mg/L nach Chromatographie an Kieselgel (Schwerkraft, Cyclohexan/Ethylacetat/Methanol 5:10:4) gewonnen werden. Eine Charakterisierung von **71** befindet sich in Kapitel 8.7.3.

9 Biosyntheseuntersuchungen an *Streptomyces griseus* 3822-14F

9.1 Stammhaltung

Die Stammhaltung erfolgte auf SM-Agarplatten, welche nach dem Beimpfen für 3-4 Tage bei 28 °C inkubiert wurden. Der Stamm färbte den Agar dunkelbraun und bildete ein weißes Luftmycel, welches sich teilweise grau verfärbte.

9.2 Standard-Kultivierung und Aufarbeitung

Sofern keine Biosyntheseuntersuchungen durchgeführt wurden, erfolgte die Kultivierung von Stamm 3822-14F in SM-Medium oder Medium NL 1358s (mit 30 g/L Glycerin anstatt Stärke und Glucose). Dazu inokulierte man 250 mL Medium in 1 L-Erlenmeyerkolben (ohne Schikane, mit Schaumstoffkappe) mit 1/8 einer gut bewachsenen Agarplatte. Die Fermentation wurde auf einem Längsschüttler (120 spm) bei 28 °C für 70 h durchgeführt. Zum Erntezeitpunkt wies die Kultur eine braune Färbung auf und der pH-Wert lag bei 6.5.

Die Aufarbeitung erfolgte durch Korrektur des pH-Wertes auf 6.0 und Filtration über Celite. Das Kulturfiltrat wurde 2× mit dem gleichen Volumen an Ethylacetat extrahiert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

9.3 Fütterungsexperimente zur Untersuchung der Biosynthese

Alle Fütterungsexperimente wurden als 500 mL-Ansatz durchgeführt. Die zu fütternden Substanzen wurden zuvor in 80 mL sterilem Reinstwasser gelöst, ggf. der pH-Wert auf ca. 6-7 eingestellt und steril filtriert. Die Kultivierung erfolgte in 1 L-Erlenmeyerkolben (ohne Schikane, mit Schaumstoffkappe) bei 28 °C. Dazu wurden je 250 mL Medium NL 1358f mit 1/8 einer gut bewachsenen Agarplatte beimpft. Alle Fütterungssubstanzen wurden kontinuierlich mittels Schlauchdosierpumpe zugeführt (s. Tabelle 15). Die Kultivierung wurde nach der 56. Stunde (Fütterungen mit Glycerin) bzw. nach der 70. Stunde (restliche Fütterungen) beendet, wobei die anschließende Aufarbeitung analog zur Standard-Methode erfolgte.

Tabelle 15: Übersicht über die eingesetzten Substanzen bei den Fütterungsexperimenten am Produzentenstamm *S. griseus* 3822-14F. Bei der Fütterung von markiertem Glycerin wurde zusätzlich ein Teil unmarkiertes Glycerin zugegeben, um statistische Kopplungen möglichst zu unterbinden.

Substanz	Bezugsquelle	Anreicherung, % ee	End- konzentration	Fütterungs- zeitraum
[U- ¹³ C ₃]Glycerin ^(a)	<i>Chemotrade</i>	99 % ¹³ C	0.8 mM	30.-42. Std.
(2R)-[1,2- ¹³ C ₂]Glycerin ^(a)	H. G. FLOSS	> 99 % ¹³ C, > 95 % ee	0.8 mM	30.-42. Std.
(2S)-[1,2- ¹³ C ₂]Glycerin ^(a)	H. G. FLOSS	> 99 % ¹³ C, > 95 % ee	0.8 mM	30.-42. Std.
D-Glycerat ^(b)	<i>Fluka</i>	-	4.2 mM	32.-56. Std.
L-Glycerat ^(b)	<i>Fluka</i>	-	4.2 mM	32.-56. Std.
(R)-Na[1,2- ¹³ C ₂]Glycerat	H. G. FLOSS	> 99 % ¹³ C, > 75 % ee	3.9 mM	32.-56. Std.
(S)-Na[1,2- ¹³ C ₂]Glycerat	H. G. FLOSS	> 99 % ¹³ C, > 69 % ee	3.9 mM	32.-56. Std.
[Methyl- ¹³ C]L-Methionin	<i>CIL</i> ^(c)	99 % ¹³ C	1.2 mM	32.-56. Std.

^a: Zusätzlich wurden 2 mM unmarkiertes Glycerin zugegeben.

^b: Es wurde Glycerinsäure-Hemicalciumsalz (Monohydrat) verwendet.

^c: *Cambridge Isotope Laboratories*.

9.4 Kultivierung zur Produktion von 2,4-Dimethoxycarbonylfuran (19)

Die Produktion von **19** wurde durch Fütterung von Glycerin während der Fermentation von *S. griseus* 3822-14F induziert. Die Kultivierung erfolgte in 1 L-Erlenmeyerkolben (ohne Schikane, mit Schaumstoffkappe) bei 28 °C. Dazu wurden 250 mL Medium NL 1358f mit 1/8 einer gut bewachsenen Agarplatte beimpft. Eine sterile Glycerinlösung (40 mL pro Erlenmeyerkolben) wurde von der 30. bis 42. Inkubationsstunde kontinuierlich mittels Pumpe zugeführt. Die Endkonzentration von Glycerin betrug 5.4 mM (500 mg/L). Die Ernte erfolgte nach 56 Stunden, wobei die Aufarbeitung analog zur Standard-Methode erfolgte.

9.5 Isolierung der Metaboliten

Die Isolierung der Bafilomycine (**16**, **17**) und des 2,4-Dimethoxycarbonylfurans (**19**) erfolgte durch Säulenchromatographie an Kieselgel (Schwerkraft, Cyclohexan/Aceton 3:2) und anschließender Trennung an Sephadex LH-20 (Eluent: Aceton). Folgende Ausbeuten waren reproduzierbar: 3-5 mg/L an (**16**), 15-20 mg/L an (**17**) und ca. 1.5 mg/L an (**19**).

9.6 Charakterisierung der Metaboliten

Bafilomycin A₁ (16)

C₃₅H₅₈O₉ (622.83)

weißer Feststoff

UV-löschend (254 nm)

Smp.: 102 °C

R_f = 0.52 (KG, CHCl₃/MeOH 9:1);

0.46 (KG, Cyclohexan/Ethylacetat 1:2).

Anfärbeverhalten: dunkelviolett (Anisaldehyd).

HR-ESI-MS (TOF): gefunden m/z = 645.3989 [M+Na]⁺;

berechnet m/z = 645.3973 [M+Na]⁺.

IR (KBr): $\tilde{\nu}_{\max}$ = 3421, 2967, 1735, 1718, 1687, 1646, 1662, 1246, 1195, 1163, 1100, 974 cm⁻¹.

UV (MeOH): λ_{\max} (lg ϵ) = 247 (4.42), 287 (4.06) nm;

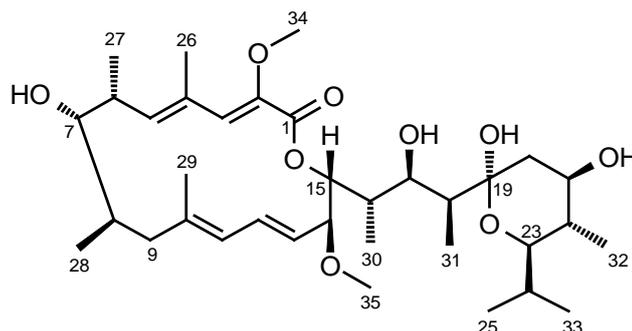
(MeOH/HCl): λ_{\max} (lg ϵ) = 247 (4.40), 285 (4.03) nm;

(MeOH/NaOH): λ_{\max} (lg ϵ) = 247 (4.42), 286 (4.07) nm.

$[\alpha]_D^{20}$ = -29 ° (MeOH, c = 0.3 mg/mL).

CD (MeOH, c = 0.19 mmol/L): λ_{\max} (θ) = 202 (-466), 246 (54786), 274 (-35519) nm.

¹H-NMR (500 MHz, CD₂Cl₂): δ = 0.76 (d, J = 7.0 Hz, 3H, 33-H₃), 0.81 (d, J = 7.0 Hz, 3H, 30-H₃), 0.89 (d, J = 7.0 Hz, 3H, 32-H₃), 0.91 (d, J = 6.5 Hz, 3H, 28-H₃), 0.92 (d, J = 7.0 Hz, 3H, 25-H₃), 1.00 (d, J = 7.0 Hz, 3H, 31-H₃), 1.04 (d, J = 7.0 Hz, 3H, 27-H₃), 1.11 (td, J = 11.5, 2.0 Hz, 1H, 20-H_a), 1.76 (dq, J = 7.0 Hz, 1.0 Hz, 1H, 18-H), 1.85-1.92 (m, 3H, H-24, H-22, H-8), 1.93 (s, 3H, 29-H₃), 1.93-1.97 (m, 1H, 9-H_a), 1.98 (d, J = 1.0 Hz, 3H, 26-H₃), 2.08 (m, 1H, 16-H), 2.12 (m, 1H, 9-H_b), 2.23 (dd, J = 12.0, 5.0 Hz, 1H, 20-H_b), 2.53 (m, 1H, 6-H), 3.23 (s, 3H, 35-H₃), 3.28 (m, 1H, 7-H), 3.46 (dd, J = 10.0, 2.1 Hz, 1H, 23-H), 3.60 (s, 3H, 34-H₃), 3.61 (m, 1H, 21-H), 3.89 (t, J = 9.0 Hz, 14-H), 4.12 (ddd, J = 19.0, 4.2, 2.0 Hz, 1H, 17-H), 4.59 (dd, J = 4.2, 1.0 Hz, 1H, 17-OH), 4.88 (dd, J = 8.5, 1.0 Hz, 1H, 15-H), 5.13 (dd, J = 15.0, 9.5 Hz, 1H, 13-H), 5.31 (d, J = 2.0 Hz, 19-OH), 5.78 (d, J = 9.0 Hz, 1H, 5-H), 5.81 (d, J = 11.0 Hz, 1H, 11-H), 6.53 (dd, J = 15.0, 11.0 Hz, 1H, 12-H), 6.68 (s, 1H, 3-H) ppm.



¹³C-NMR (125.7 MHz, CD₂Cl₂): δ = 7.1 (q, C-31), 9.8 (q, C-30), 12.1 (q, C-32), 14.0 (q, C-26), 14.3 (q, C-33), 17.3 (q, C-27), 20.1 (q, C-29), 21.3 (q, C-25), 21.7 (q, C-28), 28.2 (d, C-24), 37.0 (d, C-6), 37.5 (d, C-16), 40.4 (d, C-22), 43.8 (t, C-20), 41.4 (d, C-8), 41.5 (t, C-9), 42.3 (d, C-18), 55.7 (q, C-35), 60.1 (q, C-34), 71.0 (d, C-17), 70.9 (d, C-21), 76.1 (d, C-23), 77.0 (d, C-15), 81.1 (d, C-7), 82.6 (d, C-14), 99.3 (s, C-19), 125.3 (d, C-11), 127.1 (d, C-13), 133.1 (s, C-4), 133.5 (d, C-12), 133.9 (d, C-3), 141.4 (s, C-2), 143.5 (d, C-5), 143.6 (s, C-10), 167.6 (s, C-1) ppm.

Bafilomycin B₁ (17)

C₄₄H₆₅NO₁₃ (816.00)

gelber Feststoff

UV-löschend (254 nm)

Smp.: 129 °C

R_f = 0.39 (KG, CHCl₃/MeOH 9:1);

0.18 (KG, Cyclohexan/Ethylacetat 1:2).

Anfärbeverhalten: bräunlich-violett (Anisaldehyd).

HR-ESI-MS (TOF): gefunden *m/z* = 838.4351 [M+Na]⁺;

berechnet *m/z* = 838.4348 [M+Na]⁺.

UV (MeOH): λ_{max} (lg ε) = 215 (4.37), 252 (4.56) nm;

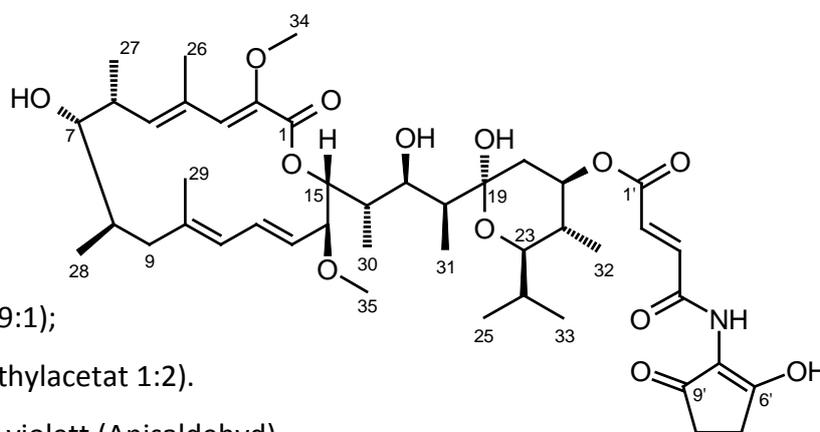
(MeOH, HCl): λ_{max} (lg ε) = 206 (4.22), 247 (4.48), 291 (4.08) nm;

(MeOH, NaOH): λ_{max} (lg ε) = 216 (4.45), 251 (4.60) nm.

IR (KBr): ν̄_{max} = 3420, 3251, 2967, 1724, 1614, 1553, 1458, 1362, 1244, 1170, 1099, 969, 943, 917, 760 cm⁻¹.

[α]_D²⁰ = -24 ° (MeOH, c = 1.0 mg/mL).

CD (MeOH, c = 0.18 mmol/L): λ_{max} (θ) = 203 (-5733), 222 (14687), 249 (23943), 276 (-24311) nm.



¹H-NMR (500 MHz, CD₂Cl₂): δ = 0.79 (d, J = 7.0 Hz, 3H, 33-H₃), 0.82 (d, J = 7.0 Hz, 3H, 30-H₃), 0.83 (d, J = 6.5 Hz, 3H, 32-H₃), 0.91 (d, J = 2.0 Hz, 3H, 28-H₃), 0.93 (s, 3H, 25-H₃), 0.99 (d, J = 7.0 Hz, 3H, 31-H₃), 1.04 (d, J = 8.0 Hz, 3H, 27-H₃), 1.22 (td, J = 11.5, 2.0 Hz, 1H, 20-H_a), 1.63 (m, 1H, H-22), 1.80 (m, 1H, H-18), 1.87 – 1.92 (m, 2H, H-24, H-8), 1.93 (s, 3H, 29-H₃), 1.94 (m, 1H, 9-H_a), 1.98 (d, J = 1.0 Hz, 3H, 26-H₃), 2.09 (m, 1H, 16-H), 2.11 (m, 1H, 9-H_b), 2.33 (dd, J = 12.0, 5.0 Hz, 1H, 20-H_b), 2.54 (m, 1H, 6-H), 2.59 (bs, 4H, 7'-H₂, 8'-H₂), 3.23 (s, 3H, 35-H₃), 3.28 (m, 1H, 7-H), 3.59 (m, 1H, 23-H), 3.61 (s, 3H, 34-H₃), 3.89 (t, J = 9.0 Hz, 1H, 14-H), 4.12 (ddd, J = 11.0, 4.0, 1.5 Hz, 1H, 17-H), 4.66 (d, J = 3.5 Hz, 1H, 17-OH), 4.88 (dd, J = 9.0, 1.0 Hz, 1H, 15-H), 5.00 (td, J = 11.0, 5.0 Hz, 1H, 21-H), 5.14 (dd, J = 15.0, 9.0 Hz, 1H, 13-H), 5.46 (d, J = 2.0 Hz, 1H, 19-OH), 5.80 (m, 2H, 5-H, 11-H), 6.54 (dd, J = 15.0, 11.0 Hz, 1H, 12-H), 6.69 (s, 1H, 3-H), 6.86 (d, J = 15.0 Hz, 1H, 3'-H), 7.29 (d, J = 15.0 Hz, 1H, 2'-H), 8.90 (bs, 1H, NH) ppm.

¹³C-NMR (125.7 MHz, CD₂Cl₂): δ = 7.2 (q, C-31), 10.0 (q, C-30), 12.4 (q, C-32), 14.1 (q, C-26), 14.4 (q, C-33), 17.4 (q, C-27), 20.3 (q, C-29), 21.3 (q, C-25), 21.8 (q, C-28), 14.4 (q, C-24), 26.2 (t, C-7'), 28.4 (d, C-24), 32.6 (t, C-8'), 37.2 (d, C-6), 37.7 (d, C-16), 38.5 (d, C-22), 40.4 (t, C-20), 40.6 (d, C-8), 41.7 (t, C-9), 42.4 (d, C-18), 55.8 (q, C-35), 60.3 (q, C-34), 71.1 (d, C-17), 75.8 (d, C-21), 76.1 (d, C-23), 77.2 (d, C-15), 81.3 (d, C-7), 82.8 (d, C-14), 99.3 (s, C-19), 115.2 (s, C-5'), 125.5 (d, C-11), 127.3 (d, C-13), 133.3 (s, C-4), 133.4 (d, C-2'), 133.6 (d, C-12), 133.8 (d, C-3'), 134.0 (d, C-3), 141.6 (s, C-2), 143.6 (d, C-5), 143.7 (s, C-10), 164.2 (s, C-4'), 164.8 (s, C-1'), 167.7 (s, C-1), 175.6 (s, C-6'), 198.1 (s, C-9') ppm.

2,4-Dimethoxycarbonylfuran (19)

Furan-2,4-dicarbonsäuredimethylester, Dimethyl-2,4-furandicarboxylat

C₈H₈O₅ (184.15)

weißer Feststoff

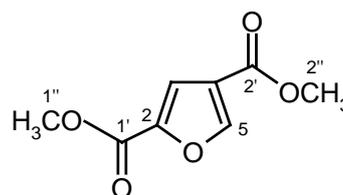
UV-löschend (254 nm)

Smp.: 77 °C

R_f = 0.71 (KG, CHCl₃/MeOH 9:1);

0.59 (KG, Cyclohexan/Ethylacetat 1:2).

R_T = 8 min (Säule 1, Programm 1 ohne Säurezusatz)



Anfärbeverhalten: blassrosa (Anisaldehyd)

EI-MS: m/z (%) = 184 (42) [M]⁺, 153 (100).

HR-EI-MS: m/z = 184.0372 (gefunden wie berechnet).

IR (KBr): $\tilde{\nu}_{\max}$ = 3138, 1729, 1437, 1395, 1272, 1083, 953, 808, 768 cm⁻¹.

UV (MeOH): λ_{\max} (lg ϵ) = 203 (4.03), 242 (4.03) nm;

(MeOH/HCl): λ_{\max} (lg ϵ) = 203 (4.06), 241 (4.03) nm;

(MeOH/NaOH): λ_{\max} (lg ϵ) = 204 (4.27), 242 (4.03), 296 (3.10) nm.

¹H-NMR (600 MHz, CD₂Cl₂): δ = 3.83 (s, 3H, 2''-H₃), 3.87 (s, 3H, 1''-H₃), 7.42 (s, 1H, 3-H), 8.11 (s, 1H, 5-H) ppm.

¹³C-NMR (150.8 MHz, CD₂Cl₂): δ = 52.1 (q, C-2''), 52.4 (q, C-1''), 117.0 (d, C-3), 121.3 (s, C-4), 145.9 (s, C-2), 150.4 (d, C-5), 158.7 (s, C-1'), 162.5 (s, C-2') ppm.

9.7 Fütterungsversuche zur Steigerung der Produktion von 2,4-Dimethoxy-carbonylfuran (19)

Die Fütterungsexperimente (500 mL-Ansatz) wurden in 1 L-Erlenmeyerkolben (ohne Schikane, mit Schaumstoffkappe) mit je 250 mL Medium NL 1358f durchgeführt. Als Kontrolle diente zusätzlich ein 1 L-Ansatz mit Glycerin-haltigem Medium NL 1358s (30 g Glycerin anstatt Stärke und Glucose). Nach dem Animpfen mit 1/8 einer bewachsenen Agarplatte wurde der Stamm bei 28 °C und 120 spm (Längsschüttler) inkubiert. Die zu fütternden Substanzen (s. Tabelle 16) wurden in 80 mL Reinstwasser gelöst, ggf. der pH-Wert auf 6-7 eingestellt und steril filtriert. Die Zufütterung erfolgte kontinuierlich von der 30. bis 42. Inkubationsstunde. Die Ernte erfolgte nach der 56. Stunde. Nach Aufarbeitung, wie in Kapitel 9.2 beschrieben, wurde das Rohprodukt in Methanol aufgenommen und eine Konzentration von 4 mg/mL eingestellt. Diese Rohprodukt-Lösungen wurden mittels HPLC-MS (Säule 1, Programm 1) auf Konzentrationen an **19** analysiert.

Tabelle 16: Zur Steigerung der Produktion von 2,4-Dimethoxycarbonylfuran (**19**) dem Stamm *S. griseus* 3822-14F zugefütterte Substanzen.

Substanz	Bezugsquelle	Finale Konzentration
DL-Alanin	Fluka	8.0 mM
Glycerin	AppliChem	4.0 mM
D-Glycerat	Fluka	4.0 mM
DL-Serin	Fluka	8.0 mM
Shikimisäure	Fluka	4.0 mM

9.8 Darstellung von 2,4-Dimethoxycarbonylfuran (**19**)

Die Synthese von **19** erfolgte durch Anknüpfung an Konzepte von FEIST^[171], v. PECHMANN^[184] und JOHNSTONE^[186].

Cumalinsäure (**97**) (3 g, 20.1 mmol; AlfaAesar, 97 %) wurde in 10 mL Methanol durch leichtes Erwärmen (ca. 40 °C) gelöst und im Eisbad mit etherischer Diazomethan-Lösung (0.4 M, ca. 3 mL) versetzt bis eine dauerhafte Gelbfärbung der Lösung eintrat. Nach Einengen im Vakuum konnte der gebildete Cumalinsäuremethylester (**112**) (0.3 g, 1.9 mmol) als weißes Pulver durch Chromatographie an Kieselgel (Schwerkraft, CHCl₃/MeOH 9:1) aus dem Reaktionsgemisch isoliert werden. **112** wurde in 2 mL Eisessig unter Zugabe katalytischer Mengen Iod gelöst, unter Rühren sukzessive mit 200 µL Brom versetzt und für 30 min auf ca. 70 °C (Wasserbad) erhitzt. Diese Lösung wurde für sieben Tage bei Raumtemperatur zum Kristallisieren ruhen gelassen. Es bildeten sich klare Kristallnadeln, welche mit etwas Eisessig gewaschen und in Diethylether aufgenommen worden. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum erhielt man Bromcumalinsäuremethylester (**113**) (81 mg, 0.35 mmol) als weißes Pulver. 0.5 g KOH wurden in 1 mL Wasser gelöst, wovon 0.5 mL zu **113** gegeben worden. Die Lösung färbte sich gelb und wurde für 35 min bei 60 °C erhitzt. Nach Verdünnen mit ca. 2 mL Wasser und Abkühlen im Eisbad, erfolgte die Neutralisierung durch Zugabe von 10 %iger H₂SO₄ (ca. 3 mL). Extraktion mit Diethylether und Einengen der organischen Phase lieferte Furan-2,4-dicarbonsäure (**96**) (45 mg, 0.29 mmol) als gelb-weißes Pulver. Die Veresterung erfolgte erneut mit Diazomethan. Dazu wurde **96** in 20 mL Methanol gelöst und (auf Eis) im Überschuss – bis zum Eintreten einer dauerhaften Gelbfärbung der Lösung – mit etherischer Diazomethan-Lösung versetzt. Die Reaktionskontrolle erfolgte mittels Dünnschichtchromatogramm. Nach Chromatographie an Kieselgel (Schwerkraft,

Cyclohexan/Aceton 3:2) erhielt man **19** (30 mg, 0.16 mmol) als weißes Pulver mit Schmelzpunkt bei 77 °C (Lit.: 109-110 °C)^[171]. Für biologische Tests wurde das Produkt zusätzlich mittels HPLC gereinigt (Säule 11, Programm 1 ohne Säurezusatz).

Darstellung einer etherischen Diazomethan-Lösung

Lösung 1: 50 g *N*-Methyl-*N*-nitroso-*p*-toluolsulfonamid (*Aldrich* ‚Diazald‘) wurden in 480 mL Diethylether gelöst und auf 0 °C gekühlt.

Lösung 2: 23 g gepulvertes KOH wurden zu 80 mL Ethylenglykolmonomethylether (*Aldrich*) gegeben und durch Erwärmen in Lösung gebracht. Anschließend wurde auf 10 °C gekühlt.

In einem schlifffreien Kolben unterschichtete man bei 0 °C Lösung 1 mit Lösung 2 und erwärmte unter langsamen Rühren auf 40 °C (Wasserbad). Das hierbei gebildete etherische Diazomethan (ca. 350 mL, 0.4 M) konnte durch Destillation in eine eisgekühlte Vorlage gewonnen werden. Es wurde eine Apparatur ohne Schliffe verwendet. Nach Ende der Reaktion wurde der Rückstand im Eisbad durch portionsweise Zugabe von 2 M HCl neutralisiert.

10 Genetische Studien zur Biosynthese des Collinolactons

10.1 Nährmedien, Puffer und Lösungen

Die verwendeten Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen:

<i>AppliChem</i> : Glycerin wasserfrei; EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure); Na ₂ EDTA×2 H ₂ O; SDS (Natriumdodecylsulfat)	<i>Fluka</i> : Pepton (Soja) <i>Oxoid</i> : Hefeextrakt <i>Roth</i> : Tris (Tris-(hydroxymethyl)-amino- methan); Tris/HCl
<i>BD Biosciences</i> : Difco Agar; Bacto Trypton	<i>Sigma-Aldrich</i> : RNase A
<i>Fermentas</i> : IPTG (Isopropyl-β-D-thio- galactosid); X-Gal	

Nährmedien

Für alle Nährmedien wurde demineralisiertes Wasser verwendet und der pH-Wert vor dem Autoklavieren mit 0.5 M Salzsäure bzw. 0.5 M Natronlauge eingestellt (sofern angegeben). Zur Herstellung von Agarplatten wurden 22 g/L Agar zugesetzt. Alle Nährmedien wurden durch Autoklavieren (feuchte Hitze, 121 °C, 1 bar Überdruck, 30 min) sterilisiert.

Die folgenden Angaben beziehen sich auf ein Endvolumen von einem Liter:

LB	Bacto Trypton	10 g
	Hefeextrakt	5 g
	NaCl	10 g
		pH = 7.0
2×YT	Bacto Trypton	16 g
	Hefeextrakt	10 g
	NaCl	5 g
		pH = 7.0
SOB	Bacto Trypton	20 g
	Hefeextrakt	5 g
	NaCl	10 g
	250 mM KCl	10 mL
		pH = 7.0

Medium S	1. Lösung	auf 800 mL
	Pepton	4 g
	Hefeextrakt	4 g
	K ₂ HPO ₄	4 g
	KH ₂ PO ₄	4 g
	2. Lösung	auf 200 mL
	Glucose	10 g
	MgSO ₄	0.5 g

nach dem Autoklavieren zusammengeben

Puffer und Lösungen

Es wurde Reinstwasser verwendet und die Lösungen nach dem Ansetzen steril filtriert (Membranfilter *Sartorius* Minisart 2 µm).

Puffer für die DNA-Präparation

TE-Puffer	Tris/HCl	10 mM
	EDTA	1 mM
		pH = 8.0-8.2
Tris-Puffer	Tris/HCl	10 mM
		pH = 8.5
AL1	Tris/HCl	50 mM
	EDTA	10 mM
	RNase A (100 mg/mL in TE-Puffer; 10 min bei 80 °C aktiviert)	100 µg/mL
		pH = 8.0
AL2	SDS	1 % (m/v)
	NaOH	0.2 M
AL3	Kaliumacetat	3 M
		pH = 5.5

Puffer für die Gelelektrophorese

TAE-Puffer (50× Stammlsg.)	Tris Na ₂ EDTA × 2 H ₂ O	2 M 50 mM pH = 8.0 (mit Eisessig)
TAE-Puffer (1× Gebrauchslsg.)	Tris Na ₂ EDTA × 2 H ₂ O	40 mM 1 mM pH = 8.0 (mit Eisessig)
Beschwerungspuffer (10×)	Bromphenolblau Xylencyranol EDTA Glycerin	0.42 % (m/v) 0.42 % (m/v) 83 mM 30 % (m/v)

Lösungen für Blau/Weiß-Screening

X-Gal	Lösungsmittel: Dimethylformamid	40 mg/mL
IPTG	Lösungsmittel: Reinstwasser	100 mM

10.2 Antibiotika**Flüssig- und Festmedien****Tabelle 17:** Übersicht über die eingesetzten Konzentrationen an Antibiotika.

Antibiotikum	Abkürzung	Endkonzentration [µg/mL]	Lösungsmittel	Hersteller
Ampicillin	amp	100	Wasser	<i>Roth</i>
Apramycin	apr	100 (<i>E. coli</i>) 50 (Streptomyceten)	Wasser	<i>Fluka</i>
Chloramphenicol	cm	25	Methanol	<i>Roth</i>
Kanamycin	kan	50 30 (<i>Qiagen pDrive</i>)	Wasser	<i>Roth</i>
Nalidixinsäure	nal	30	0.05 M NaOH	<i>AlfaAesar</i>
Thiostrepton	thio	30	DMSO	<i>Sigma-Aldrich</i>

Overlay: Es wurde 1 mL des Antibiotikums auf die Festphasenkultur aufgetragen und vorsichtig mittels Plattierungsspatel (Fa. *Sarstedt*) verteilt. Damit die Endkonzentration beim Overlay der Konzentration anfänglich zugesetzter Antibiotika entsprach, galt folgende Annahme: Je Petrischale sind 25 mL Festmedium enthalten. Dadurch wurde der Overlay mit einer um den Faktor 25 erhöhten Konzentration an Antibiotikum durchgeführt.

Beispiel Apramycin: Festmedium 100 µg/mL
 Overlay 1.25 mg/mL

10.3 Enzyme

Restriktionsenzyme

<i>Bam</i>HI	5'–G [^] GATCC–3' 3'–CCTAG [^] G–5'	<i>New England Biolabs (NEB), Fermentas</i>
<i>Bg</i>II	5'–A [^] GATCT–3' 3'–TCTAG [^] A–5'	<i>Fermentas</i>
<i>Eco</i>RI	5'–G [^] AATTC–3' 3'–CTTAA [^] G–5'	<i>Fermentas</i>
<i>Pst</i>I	5'–CTGCA [^] G–3' 3'–G [^] ACGTC–5'	<i>Fermentas</i>
<i>Sac</i>I	5'–GAGCT [^] C–3' 3'–C [^] TCGAG–5'	<i>Fermentas</i>

Für eine schnellere Restriktionsspaltung wurden die Enzyme *Bam*HI und *Bg*II alternativ als ‚FastDigest‘-Enzyme (*Fermentas*) verwendet.

Enzyme für die PCR

<i>Taq</i> DNA Polymerase	<i>Fermentas</i>
Dream <i>Taq</i> DNA Polymerase	<i>Fermentas</i>
TrueStart <i>Taq</i> DNA Polymerase	<i>Fermentas</i>
CombiZyme Polymerase	<i>Invitek</i>

Diverse Enzyme

RNase A	<i>Sigma-Aldrich</i>
Proteinase K	<i>Sigma-Aldrich</i>
Lysozym	<i>Sigma-Aldrich</i>
T4 DNA Ligase	<i>Fermentas</i>
Phosphatase (‚FastAP‘)	<i>Fermentas</i>

10.4 Weitere Reagenzien

Agarose (NEEO Ultra-Qualität)	<i>Roth</i>
dNTP (Desoxynukleotide)	<i>Sigma-Aldrich</i>
Ethidiumbromid (1 %)	<i>Roth</i>
Marker für Gelelektrophorese (GeneRuler, 1 kb und 100 bp)	<i>Fermentas</i>
Oligonukleotide	<i>Sigma-Aldrich</i>
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol- Lösung (25:24:1)	<i>Roth</i>
Sucrose (Saccharose)	<i>Roth</i>

10.5 *Escherichia coli*-Stämme und Plasmide

Tabelle 18: In dieser Arbeit verwendete *E. coli*-Stämme und Plasmide sowie deren Eigenschaften.

Bezeichnung	Genotyp/Funktion	Selektion	Bezugsquelle
<i>E. coli</i> DH5 α ^[230]	Standard zur Multiplikation von Plasmiden; <i>F'</i> / <i>endA1, hsdR17</i> ($r_k^- m_k^+$), <i>glnV44, thi-1, recA1, gyrA(Nal^R), relA1, $\Delta(lacIZYA-argF)U169, deoR$ ($\phi 80dlac \Delta(lacZa)M15$)</i>	geeignet für Blau/Weiß-Selektion	Abteilungsbestand
<i>E. coli</i> ET12567 ^[231]	Standard für Konjugationsexperimente; <i>F-</i> , <i>dam-13::Tn9, dmc-6, hsdM, hsdR, lacY1</i>	-	T. WEBER (Universität Tübingen)
pOJ436 ^[214]	Integriationssystem/ Cosmidbank	apr	Combinature (Berlin)
pDrive	Sequenzierungsvektor	amp, kan; Blau/Weiß-Selektion	Qiagen (PCR Cloning Kit)
pJET1.2/blunt	Sequenzierungsvektor	amp; „letales Gen“ für Selektion	Fermentas (CloneJET PCR Cloning Kit)
pUB307 ^[232]	Mobilisierungsplasmid für Konjugationsexperimente	cm, kan	T. WEBER (Universität Tübingen)
pA18mob ^[233]	Geninaktivierungsvektor	apr	T. WEBER (Universität Tübingen)
pSET152 ^[214]	Integriationssystem	apr	T. WEBER (Universität Tübingen)
pSET152ermE+ egfp+rrnB	Integriationssystem mit ,Green Fluorescence Protein'	apr	T. WEBER (Universität Tübingen)

Ausgewählte Plasmidkarten befinden sich im Anhang (s. Kapitel 11.1).

10.6 Kultivierung von *Streptomyces albus* und *Streptomyces lividans*

10.6.1 Stammhaltung

Die Stammhaltung erfolgte aus SM*-Agarplatten, welche nach Inokulation für vier bis fünf Tage bei 28 °C inkubiert wurden. Der Stamm *S. albus* bildete weiß-grünes Luftmycel, welches nicht vollständig mit Sporen bedeckt war und der Agar verfärbte sich grün-braun. Der Stamm *S. lividans* bildete weiß-graues Luftmycel und es kam zu einer Graufärbung des Agars.

10.6.2 Standardkultivierung für molekulargenetische Arbeiten

Die Kultivierung erfolgte in 300 mL-Erlenmeyerkolben (EMK) mit Schikane und Schaumstoffkappe bei 27 °C und 180 rpm. Die Kolben enthielten je 100 mL Medium S und wurden mit ca. 1 cm² einer gut bewachsenen Agarplatte inokuliert. Die Fermentationsdauer betrug 48 h.

10.7 Kultivierung von *Streptomyces* sp. Gö 40/10 und Tü 1892

10.7.1 Stammhaltung

Die Stammhaltung erfolgte auf SM-Agarplatten, welche nach Inokulation für drei bis vier Tage bei 28 °C inkubiert wurde. Es bildete sich weißes Luftmycel, welches sich mit der Zeit grau verfärbte. Der Agar zeigte nach Inkubation eine deutliche Verdunkelung.

10.7.2 Standardkultivierung

Vorkultur bzw. Kultur für molekulargenetische Arbeiten: Die Kultivierung erfolgte in 300 mL-Erlenmeyerkolben (EMK) mit Schikane und Schaumstoffkappe bei 28 °C und 250 rpm. Die Kolben enthielten je 100 mL SM-Medium und wurden mit ca. 1 cm² einer gut bewachsenen Agarplatte inokuliert. Die Fermentationsdauer betrug 24 h für molekulargenetische Arbeiten (Isolierung von DNA) bzw. 48 h als Standard-Vorkultur.

Hauptkultur: Zur Isolierung von Collinolacton (**20**) erfolgte eine Kultivierung in 1 L EMK mit Schikane und Schaumstoffkappe für 72 h bei 28 °C und 250 rpm. Die Kolben enthielten je 150 mL SM-Medium und wurden mit 7.5 mL (5 % (v/v)) einer 48 h alten Vorkultur angeimpft. Nach 24 h wurden jedem EMK ca. 7 g steriles, feuchtes XAD-16 zugesetzt.

10.7.3 Aufarbeitung

Diese Standard-Aufarbeitung erfolgte in Anlehnung an die Arbeiten von L. HOFFMANN^[41] und J.-N. FRICKE^[201] zur Optimierung der Collinolacton-Ausbeute.

Die Kulturbrühe wurde mit 1 M HCl auf pH = 5.0 eingestellt, mit Celite-Pulver (ca. 4 Esslöffel/L) versetzt und filtriert. Es wurde nur der feste Mycel-Rückstand durch Extraktion mit Aceton aufgearbeitet. Die organische Phase wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand ggf. durch Lyophilisierung vollständig getrocknet. Das so erhaltene grünbraune Pulver wurde mit Chloroform/Methanol 9:1 extrahiert (3× 20 mL/g), filtriert, der Rückstand verworfen und das Filtrat im Vakuum eingengt. Man erhielt ein braunes Öl, welches mit Petrolether (3× 10 mL/g) gewaschen wurde.

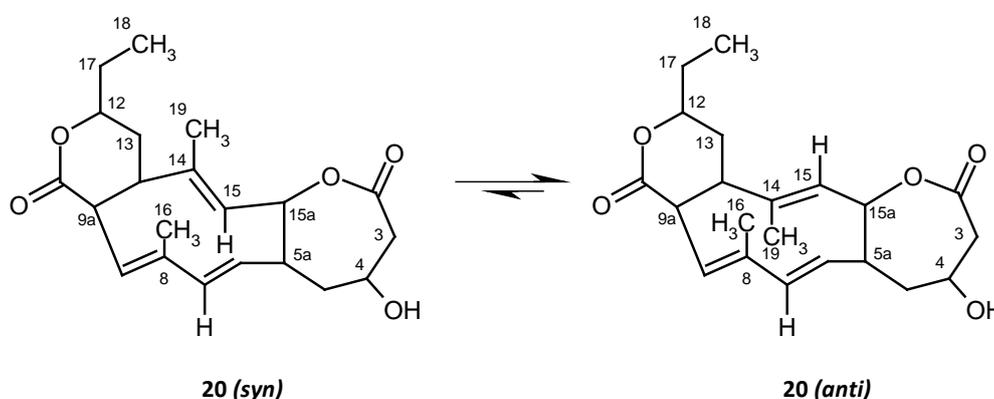
10.7.4 Chromatographische Aufreinigung

Nach dem ersten Reinigungsschritt an Kieselgel (Schwerkraft, Chloroform/Methanol 9:1) erfolgte Chromatographie an RP-18 (MPLC, Methanol/Wasser 7:3). Ggf. war eine weitere Aufreinigung mittels semipräparativer HPLC (Säule 5, Programm 2) bzw. präparativer HPLC (Säule 12, Programm 2) durchzuführen. Man erhielt Collinolacton (**20**) als weißes Pulver in wechselnden Ausbeuten von 10-30 mg/L.

10.7.5 Charakterisierung von Collinolacton (**20**)

Die Charakterisierung von **20** erfolgte gemäß den Arbeiten von L. HOFFMANN^[41].

(6E,8Z,14E)12-Ethyl-4-hydroxy-8,14-dimethyl-4,5,5a,9a,12,13,13a,15a-octahydro-2H-pyrano-[3',4':7,8]cyclodeca[1,2-b]oxepine-2,10(3H)-dione



C₂₁H₂₈O₅ (360.45)

weißer Feststoff

UV-löschend (254 nm)

R_f = 0.71 (KG, CH₂Cl₂/MeOH 9:1);

0.41 (RP-18, MeOH/H₂O 7:3).

R_t = 15 min (Säule 5, Programm 2).

Anfärbeverhalten: grün (Anisaldehyd);

gelb (Ehrlich).

ESI-MS (positive Ionen): $m/z = 743.0 [2M+Na]^+$;

(negative Ionen): $m/z = 405.1 [M+HCOO]^-$, $764.9 [2M+HCOO]^-$.

HR-ESI-MS berechnet: $m/z = 361.20095 [M+H]^+$, $383.18290 [M+Na]^+$;

gefunden: $m/z = 361.20099 [M+H]^+$, $383.18302 [M+Na]^+$.

IR (KBr): $\tilde{\nu}_{\max} = 3428, 2959, 2362, 1725, 1638, 1450, 1381, 1266, 1200, 1143$
 1019 cm^{-1} .

UV (MeOH): $\lambda_{\max} (\lg \epsilon) = 240 (3.13)$;

(MeOH/HCl): $\lambda_{\max} (\lg \epsilon) = 240 (3.13)$;

(MeOH/NaOH): $\lambda_{\max} (\lg \epsilon) = 240 (3.23) \text{ nm}$.

$[\alpha]_D^{20} = -20^\circ$ (CHCl₃, $c = 5.9 \cdot 10^{-5} \text{ mol/L}$);

-92° (MeOH, $c = 2.5 \cdot 10^{-2} \text{ mol/L}$).

CD (MeOH, $c = 0.059 \text{ mmol/L}$): $\lambda_{\max} (\theta) = 211 (-37214)$, $251 (8306) \text{ nm}$.

Anti-Rotamer

¹H-NMR (600 MHz, CD₂Cl₂): $\delta = 1.0$ (dd, $J = 7.5, 7.5 \text{ Hz}$, 3H, 18-H₃), 1.62 (m, 1H, 17-H_a), 1.68 (s, 3H, 19-H₃), 1.73 (m, 1H, 17-H_b), 1.76 (m, 1H, 5-H_a), 1.78 (m, 1H, 13-H_a), 1.89 (m, 1H, 13-H_b), 1.91 (s, 3H, 16-H₃), 2.34 (dd, $J = 15, 10 \text{ Hz}$, 1H, 5-H_b), 2.62 (ddd, $J = 8.5, 8.5, 3 \text{ Hz}$, 1H, 13a-H), 2.88 (m, 1H, 5a-H), 2.92 (dd, $J = 15, 5 \text{ Hz}$, 1H, 3-H_a), 3.14 (dd, $J = 10, 15 \text{ Hz}$, 1H, 3-H_b), 3.27 (dd, $J = 8.5, 8.5 \text{ Hz}$, 1H, 9a-H), 4.35 (m, 1H, 12-H), 4.46 (m, 1H, 4-H), 4.83 (d, $J = 7.0 \text{ Hz}$, 1H, 15-H), 5.13 (dd, $J = 16, 10 \text{ Hz}$, 1H, 6-H), 5.61 (dd, $J = 6.0, 6.0 \text{ Hz}$, 1H, 15a-H), 5.74 (dd, $J = 7.5, 2.5 \text{ Hz}$, 1H, 9-H), 5.88 (d, $J = 16.5 \text{ Hz}$, H-7) ppm.

¹³C-NMR (150.8 MHz, CD₂Cl₂): δ = 9.6 (q, C-18), 13.2 (q, C-19), 19.8 (q, C-16), 28.4 (t, C-17), 32.4 (t, C-13), 35.0 (t, C-5), 40.5 (d, C-9a), 42.7 (t, C-3), 43.0 (d, C-5a), 46.7 (d, C-13a), 62.8 (d, C-4), 78.4 (d, C-12), 82.2 (d, C-15a), 123.5 (d, C-9), 127.0 (d, C-6), 133.7 (s, C-14), 133.7 (d, C-15), 135.8 (s, C-8), 138.7 (d, C-7), 171.6 (s, C-2), 173.8 (s, C-10) ppm.

Syn-Rotamer

¹H-NMR (600 MHz, CD₂Cl₂): δ = 0.99 (dd, J = 7.5, 7.5 Hz, 3H, 18-H₃), 1.58 (s, 3H, 19-H₃), 1.62 (m, 1H, 17-H_a), 1.73 (m, 1H, 17-H_b), 1.77 (m, 1H, 5-H_a), 1.91 (s, 3H, 16-H₃), 2.04 (m, 2H, 13-H₂), 2.22 (m, 1H, 13a-H), 2.29 (dd, J = 15, 5 Hz, 1H, 3-H_a), 2.35 (dd, J = 15, 10 Hz, 1H, 5-H_b), 2.76 (m, 1H, 5a-H), 3.14 (dd, J = 15, 10 Hz, 1H, 3-H_b), 3.35 (dd, J = 12, 8.5 Hz, 1H, 9a-H), 4.35 (m, 1H, 12-H), 4.46 (m, 1H, 4-H), 5.17 (dd, J = 16, 10 Hz, 1H, 6-H), 5.26 (d, J = 6.0 Hz, 1H, 15-H), 5.46 (dd, J = 5, 5 Hz, 1H, 15a-H), 5.57 (dd, J = 8.5, 3 Hz, 1H, 9-H), 5.94 (d, J = 16.5 Hz, 1H, 7-H) ppm.

¹³C-NMR (150.8 MHz, CD₂Cl₂): δ = 9.9 (q, C-18), 20.3 (q, C-16), 23.5 (q, C-19), 28.5 (t, C-17), 35.0 (t, C-13), 35.6 (t, C-5), 42.9 (t, C-3), 44.4 (d, C-5a), 45.3 (d, C-13a), 46.6 (d, C-9a), 62.7 (d, C-4), 78.6 (d, C-12), 80.1 (d, C-15a), 120.4 (d, C-9), 121.8 (d, C-15), 124.3 (d, C-6), 138.0 (s, C-8), 138.3 (d, C-7), 148.3 (s, C-14), 171.5 (s, C-2), 173.9 (s, C-10) ppm.

10.8 Isolierung und Reinigung von DNA

10.8.1 Isolierung genomischer DNA aus Streptomyces (Mini Präparation)

Das hier angewandte Verfahren beruht im Wesentlichen auf drei Schritten: Zuerst erfolgt das Aufbrechen der Zellen durch ein Agens (Lysozym) mit anschließender Entfernung von Lipidmolekülen durch ein Detergens (SDS). Es folgt eine Abtrennung der Proteine durch Behandlung mit Phenol/Chloroform. Abschließend wird die DNA durch Präzipitation mit Isopropanol gereinigt.

- 5 mL einer 24 h-Kultur des Bakterienstammes werden bei 5000 rpm für 5 min zentrifugiert und der flüssige Überstand verworfen.
- Das Mycel-Pellet mit 10.3 % (m/v) Sucrose-Lösung waschen und erneut bei 5000 rpm für 5 min zentrifugieren; Überstand abdekantieren.
- Pellet mit 1-2 mL TE-Puffer resuspendieren und 100 μ L davon in 2 mL-Reaktionsgefäß überführen.

- Lyse: Nach Zugabe von 1 mL Lysozym-Lösung bei 37 °C für 60-90 min inkubieren. Lysozym-Lösung: 10 mg/mL in TE-Puffer.
- Es werden 10 µL Proteinase K-Lösung zugegeben und bei 50 °C für 15 min inkubiert. Proteinase K-Lösung: 20 mg/mL in Reinstwasser oder fertige Gebrauchslösung.
- Durch Zugabe von 250 µL einer 2 % (m/v) SDS-Lösung und anschließendem Mischen mittels Vortex sollte eine klare Lösung vorliegen. Ggf. den Ansatz für kurze Zeit bei 50 °C inkubieren.
- Zur Proteinfällung werden 250 µL Phenol/Chloroform-Lösung zugegeben, durch Umschwenken durchmischt und der Ansatz 5-10 min auf Eis stehen gelassen. Anschließend bei 13000 rpm für 10 min zentrifugieren.
- Es bilden sich drei Phasen, mit den Proteinen in der Interphase. Die obere, wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführen und Phenolisierungsschritt (Zugabe Phenol/Chloroform, Inkubation auf Eis, Zentrifugieren) 1-3× wiederholen, bis sich keine Protein-Interphase mehr ausbildet.
- Zur Fällung der DNA wird 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat-Lösung und 1 Volumen Isopropanol zugeben und bei Raumtemperatur für 10 min stehen gelassen. Nach anschließender Zentrifugation bei 13000 rpm für 10 min liegt die DNA als hell-weißes Pellet vor und der Überstand kann abdekantiert werden.
- Das Waschen der DNA erfolgt mit 1 mL 70 % (v/v) Ethanol, gefolgt von einer Zentrifugation bei 13000 rpm für 10 min. Überstand verwerfen.
- 10-15 min in der Vakuumzentrifuge trocknen und Pellet in 50 µL sterilem Reinstwasser (kurze Lagerung), Tris-Puffer oder TE-Puffer aufnehmen. Ggf. kurzzeitig auf 37 °C erwärmen, um Pellet zu lösen. In Lösung kann die genomische DNA einige Tage bei 4 °C aufbewahrt werden. Eine Langzeitlagerung erfolgt bei -20 °C.

Alternativ erfolgte die Isolierung genomischer DNA mittels folgender DNA-Isolierungs-Kits gemäß Anleitung:

bacDNA-OLS Kit	<i>OMNI Life Sciences</i>
DNA Isolation Kit for Cells	<i>Roche</i>
RTP Bacteria DNA Mini Kit	<i>Invitex</i>

Ausbeute/DNA-Konzentration: Auf eine Bestimmung der DNA-Konzentration wurde im Allgemeinen verzichtet. Um jedoch einen Anhaltspunkt für alle Folgeanwendungen zu bekommen, wurde die Konzentration ausgewählter Proben von C. SIMON (AK DANIEL/Universität Göttingen) mittels *Peqlab* NanoDrop 1000 bestimmt.

Die Werte der DNA-Konzentration nach Mini Präparation lagen bei ca. 0.2-0.5 µg/µL (Kit) bzw. 1.0-2.0 µg/mL (Phenol/Chloroform-Isolierung).

10.8.2 Isolierung von Plasmid-DNA (Mini Präparation)

Diese Methode beruht auf einer alkalischen Lyse, verbunden mit anschließendem Absenken des pH-Werts. Dadurch werden Bedingungen geschaffen, bei denen nur Plasmid-DNA renaturiert und so von chromosomaler DNA getrennt werden kann. Abschließend wird die Plasmid-DNA mittels Isopropanol-Fällung gereinigt und aufkonzentriert.

- *E. coli*-Zellen mit entsprechendem Plasmid über Nacht (12-15 Stunden) in LB-Medium (in Reagenzgläsern mit Alukappe) unter Selektionsdruck bei 37 °C und 220 rpm (Schrägschüttelbrett) kultivieren.
- 3 mL dieser Kultur zentrifugieren (5000 rpm, 3 min) und Überstand verwerfen.
- Pellet in 300 µL AL1-Puffer vollständig resuspendieren; es empfiehlt sich ein 2 mL-Reaktionsgefäß für die weiteren Schritte.
- 300 µL AL2-Puffer hinzufügen, mehrmals vorsichtig umschwenken und maximal fünf Minuten bei Raumtemperatur stehen lassen.
- Die Proteinfällung erfolgt durch Hinzufügen von 300 µL AL-3 Puffer, vorsichtiges Umschwenken und anschließende Inkubation für 15 min auf Eis.
- Reaktionsgefäß für 20 min bei 13000 rpm zentrifugieren.
- Den Überstand in ein neues 2 mL-Reaktionsgefäß überführen und mit dem gleichen Volumen Isopropanol vorsichtig mischen; für 30-45 min bei Raumtemperatur inkubieren.
- Zentrifugation bei 13000 rpm für 15 min. Es sollte sich ein hell-weißes Pellet am Boden des Reaktionsgefäßes befinden. Anschließend Überstand verwerfen.
- Zum Reinigen der DNA 1 mL 70% (v/v) Ethanol auf das Pellet geben und 10 min auf Eis stehen lassen. Zentrifugation bei 13000 rpm für 15 min; Überstand abdekantieren.

- 10-15 min in der Vakuumzentrifuge trocknen und Pellet in 50 μ L sterilem Reinstwasser (kurze Lagerung), Tris-Puffer oder TE-Puffer aufnehmen. Ggf. kurzzeitig auf 37 °C erwärmen, um Pellet zu lösen. Für eine anschließende Verwendung, an der Enzyme beteiligt sind, Reinstwasser oder Tris-Puffer als Lösungsmittel verwenden (kein EDTA). Die gelöste Plasmid-DNA ist einige Tage bei Raumtemperatur bzw. bei 4 °C stabil; eine längere Aufbewahrung erfolgt bei -20 °C.

Diese Methode eignet sich besonders, um Plasmid-DNA für Folgeanwendungen oder Einlagerung vieler Proben (z.B. Cosmid-Bank) zu gewinnen. Die Proben waren jedoch nie komplett frei von Proteinresten. Für eine anschließende Sequenzierung oder effiziente Transformation mit *E. coli* (Elektroporation) wurde die Mini Präparation mittels folgender DNA-Isolierungs-Kits bevorzugt:

High Pure Plasmid Isolation Kit *Roche*

NucleoSpin Plasmid Kit *Macherey-Nagel*

Ausbeute/DNA-Konzentration: Auf eine Bestimmung der DNA-Konzentration wurde im Allgemeinen verzichtet. Um jedoch einen Anhaltspunkt für alle Folgeanwendungen zu bekommen, wurde die Konzentration ausgewählter Proben von B. RUST (AK PIELER/Universität Göttingen) mittels *Amersham Biosciences* Ultraspec 1100pro bestimmt.

Die Werte der DNA-Konzentration nach der Mini Präparation lagen bei 50-200 ng/ μ L (Kit) bzw. 500-800 ng/ μ L („Hand-Präp.“).

10.8.3 Reinigung von DNA

Bei Anwendungen, bei denen sich Enzyme nicht durch Hitze inaktivieren lassen, war eine Reinigung von DNA als Zwischenschritt nötig.

Phenol/Chloroform-Fällung: Hierbei werden Proteine durch Zugabe von Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Lösung (25:24:1) denaturiert und können so von der DNA abgetrennt werden. Dazu wird der Reaktionsansatz mit dem gleichen Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Lösung gemischt und nach ca. 5 min Inkubation bei 13000 rpm für 10 min zentrifugiert. Es bilden sich drei Phasen, wobei sich die Proteine in der Interphase befinden. Die obere, wässrige Phase wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Ethanol-/Isopropanol-Fällung: Zu der DNA-Lösung wird 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat-Lösung gegeben. Anschließend versetzt man das Gemisch mit zwei Volumenteilen Ethanol bzw. einem Volumenteil Isopropanol und inkubiert auf Eis für 30 min. Durch Zentrifugation (15-30 min, 13000 rpm) erhält man die DNA als hell-weißes Pellet, welche mit 50 µL sterilem Reinstwasser (kurze Lagerung), Tris-Puffer oder TE-Puffer resuspendiert werden kann.

10.9 Charakterisierung von DNA

10.9.1 Restriktionsspaltung

Alle benötigten Reagenzien wurden kurz vor der Anwendung auf Eis aufgetaut und der Spaltungsansatz anschließend ebenfalls auf Eis angesetzt. Das Verhältnis Enzym zu DNA beruht auf der Annahme, dass 1 µg DNA von 10 u Enzym gespalten wird. Im Folgenden sind die Zusammensetzungen eines Standardansatzes von 20 µL angegeben.

<i>Bam</i> HI mit BSA (<i>NEB</i>)		Restriktionsenzyme (<i>Fermentas</i>)	
Reinstwasser	<i>ad</i> 20 µL	Reinstwasser	<i>ad</i> 20 µL
Puffer (10×)	2 µL	Puffer (10×)	2 µL
BSA	0.2 µL	Enzym (10 u/µL)	1 µL
Enzym (20 u/µL)	0.5 µL	DNA	1 µL ^a / 5 µL ^b
DNA	1 µL ^a / 5 µL ^b		

^a: genomische DNA; ^b: Plasmid-DNA

Der Ansatz wurde vorsichtig durchmischt und bei 37 °C für 10 min (FastDigest-Enzyme) bzw. 60 min (konventionelle Enzyme) inkubiert. Die Inaktivierung des Enzyms erfolgte, wenn möglich, mittels Hitze-Inaktivierung nach den Herstellerangaben.

Die Zugabe von BSA trägt zur Stabilisierung des Enzyms bei und soll eine bessere „Performance“ des Enzyms zur Folge haben. Es konnte jedoch kein Unterschied zu einem Verdau ohne Einsatz von BSA festgestellt werden.

Ein Verdau mit zwei Enzymen (doppelter Verdau) erfolgte nach Angaben des Herstellers (Online-Programm *Fermentas* DoubleDigest)^[234].

10.9.2 Agarose-Gelelektrophorese

Aufgrund ihrer negativen Ladung ist es möglich, DNA im elektrischen Feld in einer Agarose-Matrix aufzutrennen. Die Laufstrecke richtet sich nach den äußeren Bedingungen (Konzentration der Agarose, angelegte Spannung) und nach Größe und Konformation der

DNA. Für die Gelelektrophorese wurde ein Gel aus Agarose angefertigt. Dessen Konzentration richtet sich nach der zu erwartenden Größe der aufzutragenden Fragmente:

- DNA < 1 kb: 2 % (w/w) Agarose in TAE-Puffer; Marker Typ 100 bp.
- DNA > 1 kb: 0.8 % (w/w) Agarose in TAE-Puffer; Marker Typ 1 kb.

Es wurde Agarose zu TAE-Puffer gegeben und mehrmals bis zur vollständigen Lösung in der Mikrowelle erhitzt. Die heiße Agarose-TAE-Lösung wurde in eine vorbereitete Gelkammer (mit Geltisch, 10 cm Länge) bis zu einer Füllhöhe von ca. 5 mm gegossen, mit einem Kamm versehen und zum Abkühlen stehen gelassen. Das feste Gel wurde mit Geltisch in eine TAE-Puffer gefüllte Elektrophoreseapparatur überführt und der Kamm vorsichtig entfernt. Das Gel muss vollständig von TAE-Puffer überschichtet sein. Zum Beladen des Gels werden 5 µL DNA mit 2 µL Beschwerungspuffer versetzt und in die Probestaschen gegeben. Zusätzlich wurde 1 µL DNA-Marker als Größenvergleich aufgetragen. Die Elektrophorese wurde für 110 min bei 70 V durchgeführt (*Biorad PowerPac 300*).

Um die DNA sichtbar zu machen, wurde das Gel anschließend für 20-30 min im Ethidiumbromidbad (Ethidiumbromid in TAE-Puffer, 1 µg/mL) gefärbt. Hierbei interkaliert Ethidiumbromid in die DNA, weshalb diese mittels Transilluminator (*Syngene GelVue GVM20*, $\lambda = 302$ nm) sichtbar gemacht werden konnte.

10.10 Amplifikation von DNA mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

10.10.1 Oligonukleotide („Primer“) für die PCR

Die Primer wurden durch die Firma *Sigma-Aldrich* als Auftragsarbeit synthetisiert. Alle Primer wurden gelöst in TE-Puffer (100 mM) bei -20 °C gelagert. Für den häufigen PCR-Einsatz wurden die Primer als 10 mM Aliquots in Reinstwasser verwendet; hierbei war eine Lagerung bei 5 °C für einige Tage möglich.

BVO-spezifische Primer (abgeleitet aus Alignment)

BVD1a_for: 5'–GGN CTN ATG CTN GCN GGN GAR C–3' (22mer; 50 % GC; $T_M = 65$ °C)

BVD1b_for: 5'–GGS CTS ATG CTS GCS GGS G–3' (19mer; 53 % GC; $T_M = 61$ °C)

BV63_for: 5'–GGA CTN ATG CTN GCN GGS GA–3' (20mer; 50 % GC; $T_M = 63$ °C)

BVD1a_rev: 5'–TC NCC RTC RCA NCC NAC G–3' (18mer; 50 % GC; $T_M = 55$ °C)

BVD1b_rev: 5'–TC SCC GTC GCA KCC SAC G–3' (18mer; 61 % GC; $T_M = 65$ °C)

BVD2a_rev: 5'–G SGC SGC RTC NCC SGC–3' (16mer; 63 % GC; $T_M = 58$ °C)

BVO-spezifische Primer (abgeleitet mit Programm CodeHop^[219])

BVCHA1_for: 5'–CGG CCC GGT CGG NMT SWT SCT SG–3' (23mer; 57 % GC; $T_M = 76$ °C)

BVCHA2_for: 5'–ACG TCG TCG TCG TCG GNG SSG GNC C–3' (25mer; 64 % GC; $T_M = 79$ °C)

BVCHD1_rev: 5'–CGT CGC AGC CSA CSV YGY A–3' (19mer; 53 % GC; $T_M = 62$ °C)

BVCHD2_rev: 5'–AGT GCT CGC CGT CRC ANC CNA C–3' (22mer; 59 % GC; $T_M = 69$ °C)

BVCHE1_rev: 5'–TGC TGG TGG GCG GCR TCN CCN GC–3' (23mer; 70 % GC; $T_M = 80$ °C)

BVCHE2_rev: 5'–GGC GGC CAG CTT CCA NCC SAG GT–3' (23mer; 65 % GC; $T_M = 75$ °C)

Primer für Screening nach PKS I^[235]

1KS5_for: 5'–AGA ATT CGG SCC SGC SCT SAC SGT SGA CAC SGC S–3'

(34mer; 47 % GC; $T_M = 76$ °C)

1rAT3_rev: 5'–TTT CTA GAS GCG ATC TCS CCC TGS GWG TGS CC–3'

(32mer; 50 % GC; $T_M = 76$ °C)

PKSI-KS_for: 5'–CTS GGS GAC CCS ATC GAG–3'

(18mer; 56 % GC; $T_M = 54$ °C)

PKSI-AT_rev: 5'–GCS GCS GCG ATC TCS CCC TGS SWG TGS CC–3'

(29mer; 59 % GC; $T_M = 81$ °C)

10.10.2 PCR-Programme/-Reaktionsbedingungen

Zur Verbeugung vor Kontaminationen und daraus resultierender falsch positiver Amplifikate, wurde der PCR-Ansatz unter sterilen Bedingungen zusammengestellt. Für alle PCR-Versuche mit *Taq*-Polymerase (Standard) wurde folgender Ansatz gewählt:

Reinstwasser	<i>ad</i> 50 µL	
Puffer (10×)	5 µL	(1×)
MgCl ₂ (25 mM)	5 µL/7 µL	(2.5 mM/3.5 mM)
dNTPs (10 mM)	1 µL	(0.2 mM)
Primer forward (10 µM)	2.5 µL	(0.5 µM)
Primer reverse (10 µM)	2.5 µL	(0.5 µM)
<i>Taq</i> -Polymerase (5 u/µL)	0.2 µL	(1 u)
DNA-Template	1 µL	

Die Durchführung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) erfolgte mittels *Eppendorf* Thermocycler Typ ‚Gradient‘.

Temperaturgradient: Zur Ermittlung der optimalen Annealing-Temperatur erfolgten zunächst PCR-Versuche mit Temperaturgradient. Unter Berücksichtigung der Schmelztemperaturen der eingesetzten Primerpaare wurde ein Temperaturfenster von 60 ± 6 °C gewählt. Die einzelnen Abstufungen wurden durch den *Eppendorf* Thermocycler automatisch festgelegt: 55.1, 55.5, 56.4, 57.6, 59.1, 60.7, 62.4, 63.9 °C. Als Template diente genom. DNA der Stämme Tü 2717 und Gö 40/10. Alle möglichen Kombinationen der BVO-spezifischen Primer wurden getestet.

Definierte Annealing-Temperatur: Da jedoch kein eindeutiges Ergebnis erzielt wurde, erfolgte die PCR nunmehr bei einer bestimmten Annealing-Temperatur: Es wurde angenommen, dass sich diese an der Schmelztemperatur der Primer orientiert. Sie wurde 2-6 °C geringer gewählt als der Durchschnittswert der Schmelztemperaturen beider Primer. Außerdem sollte die Annealing-Temperatur möglichst unter 68 °C gehalten werden, da ab dieser Temperatur die Polymerase aktiviert ist. Für die Elongation galt die Annahme, dass durch die Polymerase ca. 1000 Basenpaare pro Minute synthetisiert werden können.

PCR-Programme

BVO-Standard:

Denaturierung	95 °C	2:30 min	
Denaturierung	95 °C	1:15 min	} 30 Zyklen
Annealing*		1:30 min	
Elongation	72 °C	1:00 min	
Finale Elongation	72 °C	10:00 min	
Endtemperatur	10 °C		

* : Die optimale Annealing-Temperatur wurde gemäß Tabelle 19 gewählt.

Tabelle 19: Annealing-Temperaturen des Programms ‚BVO-Standard‘ für die jeweiligen Primerpaare.

	BVD1a_for	BVD1b_for	BV63_for
BVD1a_rev	57 °C	56 °C	-
BVD1b_rev	63 °C	57 °C	57 °C
BVD2a_rev	57 °C	57 °C	-
BVCHD1_rev	-	57 °C	57 °C

BVO-1: Touchdown-PCR für Primer BVCHA1/2_for + BVCHD1_rev

Denaturierung	95 °C	2:00 min	
Denaturierung	95 °C	0:30 min	7 Zyklen
Annealing	63 °C	0:20 min	
Elongation	72 °C	1:00 min	
Denaturierung	95 °C	0:30 min	7 Zyklen
Annealing	61 °C	0:20 min	
Elongation	72 °C	1:00 min	
Denaturierung	95 °C	0:30 min	7 Zyklen
Annealing	59 °C	0:20 min	
Elongation	72 °C	1:00 min	
Denaturierung	95 °C	0:30 min	7 Zyklen
Annealing	57 °C	0:20 min	
Elongation	72 °C	1:00 min	
Finale Elongation	72 °C	10:00 min	
Endtemperatur	10 °C		

Bei dieser Kombination des Primerpaares läge die als optimal angenommene Annealing-Temperatur bei ca. 62 °C. Aufgrund der großen Differenz der Schmelztemperaturen beider Primer wurde versucht, einen möglichst breiten Temperaturbereich abzudecken.

BVO-2a: Touchdown-PCR für Primer BVCHA1/2_for + BVCHD2_rev

Denaturierung	95 °C	2:00 min	
Denaturierung	95 °C	0:30 min	10 Zyklen
Annealing	66 °C	0:20 min	
Elongation	72 °C	0:50 min	
Denaturierung	95 °C	0:30 min	20 Zyklen
Annealing (optimal)	64 °C	0:20 min	
Elongation	72 °C	0:50 min	
Finale Elongation	72 °C	10:00 min	
Endtemperatur	10 °C		

BVO-2b: PCR für Primer BVCHA1/2_for + BVCHD2_rev

Denaturierung	95 °C	2:00 min		
Denaturierung	95 °C	0:30 min	}	30 Zyklen
Annealing (optimal)	64 °C	0:20 min		
Elongation	72 °C	0:50 min		
Finale Elongation	72 °C	10:00 min		
Endtemperatur	10 °C			

BVO-3: 2-Step-PCR für Primer BVCHA1_for + BVCHE1/2_rev

Denaturierung	95 °C	2:00 min		
Denaturierung	95 °C	0:30 min	}	30 Zyklen
Annealing & Elongation	72 °C	1:10 min		
Finale Elongation	72 °C	10:00 min		
Endtemperatur	10 °C			

BVO-4: Kombinierte 2-Step- und Touchdown-PCR für Primer BVCHA2_for + BVCHE2_rev

Denaturierung	95 °C	2:00 min		
Denaturierung	95 °C	0:30 min	}	10 Zyklen
Annealing & Elongation	72 °C	1:00 min		
Denaturierung	95 °C	0:30 min	}	20 Zyklen
Annealing (optimal)	68 °C	0:20 min		
Elongation	72 °C	0:50 min		
Finale Elongation	72 °C	10:00 min		
Endtemperatur	10 °C			

PKS I-Screening^[235]

Denaturierung	94 °C	3:00 min	
Denaturierung	94 °C	1:15 min	} 35 Zyklen
Annealing	57 °C	1:30 min	
Elongation	72 °C	1:00 min	
Finale Elongation	72 °C	5:00 min	
Endtemperatur	10 °C		

10.11 Untersuchungen zur Primer-Spezifität mittels real-time PCR

Die Durchführung der real-time PCR erfolgte mittels *BioRad* Thermocycler Typ ‚iCycler‘ in der Arbeitsgruppe P. KARLOVSKY (Universität Göttingen).

Tabelle 20: Reaktionsgemisch und Programme zur Untersuchung von *Streptomyces* sp. Gö 40/10 und Tü 2717 mittels real-time PCR.

Bezeichnung	Konzentration	Endkonzentration
Reinstwasser		ad 25 µL
NH ₄ Reaktionspuffer (<i>Bioline</i>)	10x	1x
Magnesiumchlorid (<i>Bioline</i>)	50 mM	4 mM
dNTP (<i>Bioline</i>)	4 mM	150 µM
Primer forward	10 µM	0,5 µM
Primer reverse	10 µM	0,5 µM
Fluorescein	1 µM	10 nM
SybrGreen I, Molecular Probes (<i>Invitrogen</i>)	10x	0,1 x
BioTaq DNA Polymerase (<i>Bioline</i>)	5 U/µL	0,5 U
DNA-Template	5 ng/µL	1 µL

Programm 1

Cycle	Bezeichnung	Temperatur	Minuten
Cycle 1	initiale Denaturierung	95 °C	2:30
Cycle 2	Denaturierung	92 °C	1:00
40x	Hybridisierung	55 °C - 65 °C	1:00
	Elongation	72°C	2:00
Cycle 3	finale Elongation	72°C	5:00
Cycle 4	Denaturierung (Schmelzkurve)	95°C	1:00
Cycle 5	Abkühlung (Schmelzkurve)	55°C	1:00
Cycle 6	Schmelzkurve	65 °C → 95 °C	0:10
	60 x 0,5 °C Steps		
Cycle 7		15 °C	HOLD

Programm 2

Cycle	Bezeichnung	Temperatur	Minuten
Cycle 1	initiale Denaturierung	95 °C	0:30
Cycle 2	Denaturierung	94 °C	0:30
40x	Hybridisierung	55 °C - 61 °C	0:30
	Elongation	72°C	0:30
Cycle 3	finale Elongation	72°C	5:00
Cycle 4	Denaturierung (Schmelzkurve)	95°C	1:00
Cycle 5	Abkühlung (Schmelzkurve)	55°C	1:00
Cycle 6	Schmelzkurve 70 x 0,5 °C Steps	65 °C → 100 °C	0:20
Cycle 7		15 °C	HOLD

10.12 Klonierungsexperimente und DNA-Transfer**10.12.1 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen**

Um größendefinierte DNA-Fragmente für Klonierungsarbeiten zur Verfügung zu haben, wurde DNA aus PCR-Experimenten bzw. nach Restriktionsspaltung mittels Agarosegel getrennt (vgl. Kapitel 10.9.2). Im Unterschied zur Standard-Gelelektrophorese wurde ein Geltisch größerer Laufstrecke (20 cm) eingesetzt und das Gel nach erfolgter Gelelektrophorese in der Mitte geteilt. Die eine Hälfte des Gels wurde mit Ethidiumbromid behandelt und diente als Referenz, die zweite Hälfte wurde nicht angefärbt und diente zur Extraktion. Die Auftragsvolumina betrugen: 5 µL DNA zum Anfärben und 20-30 µL DNA zum Extrahieren. Die weiteren Bedingungen hierbei lauteten: 2 % (w/w) Agarose; 140 V; 180 min. Nach erfolgter Auftrennung konnten die gesuchten DNA-Fragmente durch Vergleich zur Laufhöhe der Referenz mit einem Skalpell ausgeschnitten werden. Die eigentliche Extraktion wurde mit Hilfe des QIAquick Gel Extraktion Kits (*Qiagen*) nach Anleitung durchgeführt.

10.12.2 Ligation von DNA in einen Vektor

Mittels T4 DNA Ligase können unter ATP-Verbrauch sowohl glatte (blunt) als auch überhängende (sticky) Restriktionseenden von doppelsträngiger DNA verknüpft werden. Dabei kommt es zur Ausbildung einer Phosphodiesterbindung.

Die Ligation in pDrive und pJET1.2/blunt erfolgte mittels der in den Vektoren-Sets enthaltenen Komponenten (gemäß Anleitung).

Da der Vektor pA18mob nicht linearisiert vorlag, musste dieser vor der Ligation noch durch Restriktionsspaltung mit *Bam*HI geöffnet werden. Um eine Rekombination des Vektors mit sich selbst bei der Ligation zu verhindern, erfolgte als zweiter Schritt eine Dephosphorylierung am 5'-Ende mittels FastAP-Phosphatase (gemäß Anleitung).

Für anschließende Ligation wurde folgender Ansatz gewählt:

Reinstwasser	ad 20 µL
Insert / Vektor	Insert 10 µL / Vektor 2 µL (Verhältnis 5:1)
Ligationspuffer	2 µL
T4 DNA Ligase	1 u (1 µL)

Die Inkubation erfolgte über Nacht (ca. 20 Stunden) bei 4 °C.

Eine Selektion auf rekombinante Plasmide erfolgte im Anschluss an die Transformation.

Dabei richtete sich die Methode nach den Eigenschaften des eingesetzten Vektors:

- pDrive: mittels Blau/Weiß-Screening (s. Kapitel 10.12.4)
- pJET1.2blunt: Der Vektor enthält ein letales Gen, dessen Expression verhindert wird, wenn DNA erfolgreich in die Klonierungsstelle ligiert wurde. Die Effizienz hierbei ist allerdings durch u.a. punktuelle Mutationen im Vektor begrenzt. Daher besitzen nur etwa 50-80 % der gewachsenen Kolonien tatsächlich das Insert.
- pA18mob: Dieser Vektor wurde für die interspezifische Konjugation mit dem *E. coli* ET12567 eingesetzt. Da dieser allerdings nicht für das Blau/Weiß-Screening geeignet ist, erfolgte die Selektion über einen Zwischenschritt. Dazu wurde der *E. coli* DH5α mit pA18mob transformiert und erfolgreich rekombinierte Plasmide mittels Blau/Weiß-Screening selektiert. Nach Isolierung der Plasmid-DNA konnte bei der anschließenden Transformation ausschließlich erfolgreich ligierte DNA eingesetzt werden (vgl. Kapitel 10.12.6).

10.12.3 DNA-Transfer mittels Elektroporation

Herstellung elektrokompetenter *E. coli*-Zellen

Grundlage bei der Herstellung kompetenter Zellen bildet eine Übernachtskultur des zu transformierenden *E. coli*-Stammes (DH5α, ET12567 (pUB307)). Dabei erfolgte die Kultivierung von DH5α ohne Selektionsdruck; die Kultivierung von ET12567 (pUB307) wurde unter Zugabe von Chloramphenicol und Kanamycin durchgeführt. Bei der weiteren

Aufarbeitung ist darauf zu achten, dass die Zellen die ganze Zeit unter Kühlung behandelt werden.

- 25 mL SOB-Medium (in 100 mL EMK ohne Schikane mit Schaumstoffkappe) mit 5 μ L einer Glycerin-Einlagerung des *E. coli*-Stammes inokulieren und bei 37 °C, 220 rpm für 12-15 Stunden inkubieren. DH5 α : ohne Selektionsdruck; ET12567 (pUB307): unter Zugabe von Chloramphenicol und Kanamycin.
- Vier 1 L EMK (ohne Schikane, mit Schaumstoffkappe) mit je 500 mL SOB-Medium ca. 30 min bei 37 °C vorwärmen. Bei *E. coli* ET12567 (pUB307) erfolgt zusätzlich die Zugabe von Chloramphenicol und Kanamycin zum SOB-Medium.
- Nach Inokulation mit je 2.5 mL (DH5 α) bzw. 5 mL (ET12567 (pUB307)) der Übernachtskultur bis zu einer optischen Dichte (OD_{600}) von 0.6-0.8 kultivieren (ca. 2-4 h) und anschließend sehr rasch auf Eis kühlen.
- Die Zellen des kompletten Ansatzes werden in 250 mL Zentrifugationsflaschen (*Nalgene*) durch Abzentrifugieren (10 min, 6000 rpm, 4 °C) gewonnen; der Überstand wird verworfen. Danach die Zellen auf Eis gekühlt halten.
- Zum Entfernen des Kultivierungsmediums werden die Zellen drei Mal mit eisgekühlter 10 % (m/v) Glycerinlösung gewaschen: Dazu werden die Zentrifugationsflaschen mit der Glycerinlösung aufgefüllt, durch Schütteln resuspendiert und gekühlt (4 °C) bei 6000 rpm für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wird nach Abdekantieren verworfen.
- Die Zellen werden nach dem Waschen mit eiskalter Glycerinlösung (10 %ig) resuspendiert und in zwei Falcontubes überführt, kurz zentrifugiert (4000 rpm, 4 °C) und der Überstand verworfen.
- Die Zellpellets werden in jeweils 3 mL eiskalter Glycerinlösung (10 %ig) aufgenommen (entsprechen 3 mL Glycerin pro Liter SOB-Medium; soll: ca. 10^{10} Zellen/mL).
- Abschließend die Zellsuspension als 50 μ L Aliquots in Reaktionsgefäße abfüllen, in flüssigem Stickstoff schockgefrieren und bei -75 °C lagern.

Elektroporation (Elektrotransformation)

- Pro Reaktion ein 50 μL Aliquot der elektrokompenten Zellen und die DNA auf Eis auftauen lassen.
- 1 μL der DNA im Reaktionsgefäß zu den *E. coli*-Zellen geben, 30 Sekunden inkubieren und in eine sterile, eisgekühlte Elektroporationsküvette (*Biorad* GenePulser Küvette, 0.2 cm Entfernung der Elektroden) überführen.
- Die Behandlung im Elektroporator (*Biorad* GenePulser) erfolgte unter folgenden Bedingungen:
Spannung: 2.5 kV
Kapazität: 25 μF
Widerstand: 200 Ω
Die Pulsdauer für eine erfolgreiche Transformation liegt bei ca. 5 ms. Es darf zu keiner Lichtbogenbildung kommen.
- Anschließend den Reaktionsansatz sofort in 1 mL warmen (28-30 °C) LB-Medium ohne Selektionsantibiotikum aufnehmen, in ein 1.5 mL Reaktionsgefäß überführen und zur Regeneration eine Stunde bei 37 °C inkubieren.
- Nach der Regeneration wird der Ansatz auf LB-Agar mit entsprechenden Selektionsantibiotika ausplattiert und über Nacht (ca. 15 Stunden) bei 37 °C inkubiert. Es empfiehlt sich, eine 1:10 Verdünnung (100 μL des Ansatzes verdünnt mit 900 μL LB-Medium) auszuplattieren sowie die restlichen 900 μL des Ansatzes auf eine weitere LB-Agarplatte zu geben. Die Selektion auf erfolgreiche Transformation erfolgt über die vermittelte Antibiotikaresistenz.

10.12.4 Blau/Weiß-Selektion von transformierten Kolonien

Bei Transformationen mit Vektoren (pDrive, pA18mob), die das *lacZ*-Gen zur Komplementation der β -Galactosidase des *E. coli* besitzen, wurde eine Blau/Weiß-Selektion zur Detektion rekombinanter Plasmide vorgenommen. Das für die Komplementation notwendige Protein wird auf dem Plasmid kodiert und enthält einen multiplen Klonierungsbereich. Durch den Einbau eines Inserts in diesen Klonierungsbereich wird die kodierende Sequenz unterbrochen und die Bildung des notwendigen Proteins unterbleibt. Als Nachweis für das Vorhandensein von aktiver β -Galactosidase diente das Substrat X-Gal, welches dem LB-Festmedium zugesetzt wurde. Zur Induktion des *lacZ*-Promotors wurde

zusätzlich IPTG zugegeben. Bei erfolgreicher Expression des *lacZ*-Gens erscheinen die Kolonien blau, was auf ein Fehlen des Inserts hindeutet.

Hierzu wurden zu einem Liter ca. 50-55 °C warmen LB-Agar 2 mL einer X-Gal-Lösung und 0.5 mL einer IPTG-Lösung zugegeben. Anschließend wurden dem Agar noch entsprechende Selektionsantibiotika zugesetzt.

10.12.5 Resistenzprofil von *Streptomyces* sp. Gö 40/10 und Tü 1892

Um nach erfolgter Konjugation garantieren zu können, dass ein Wachstum auf Antibiotika-haltigen Medium nur von den erzeugten Mutanten ausgeht, erfolgte vor der eigentlichen Konjugation die Erstellung eines Resistenzprofils der Stämme Gö 40/10 und Tü 1892. Dazu wurden zum einen Antibiotika-haltige SM-Agarplatten mit den beiden Streptomycceten beimpft und bei 28 °C inkubiert. Des Weiteren wurden SM-Agarplatten (ohne Antibiotikum) inokuliert, für 24 Stunden bei 28 °C inkubiert und anschließend das Antibiotikum *via* Overlay aufgetragen. Über mehrere Tage wurde das eventuelle Wachstum der beiden Stämme verfolgt. Getestet wurden: Apramycin (50 µg/mL), Chloramphenicol (25 µg/mL), Kanamycin (50 µg/mL), Nalidixinsäure (hier 40 µg/mL) und Thiostrepton (30 µg/mL). Die Konzentrationen wurden entsprechend Tabelle 17 gewählt.

10.12.6 Interspezifische Konjugation von *E. coli* und *Streptomyces* sp.

Bei der Konjugation können Plasmide (Fremd-DNA) in einen Streptomycceten eingebracht werden. Hierbei fungiert ein *E. coli*-Stamm mit dem Plasmid als Donor und der Streptomycceten-Stamm entsprechend als Rezipient. Hierbei wird die Transferfunktion eines RP4-Plasmid in *E. coli* ausgenutzt, um den Transfer in andere Spezies zu ermöglichen. Die Plasmide müssen hierzu einen RP4 Origin of Transfer (*oriT*) besitzen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der methylierungsdefiziente *E. coli* ET12567 mit dem Mobilisierungsplasmid pUB307 (ein RP4-Derivat) verwendet.^[232]

- Vorbereitung des Rezipienten: Der Bakterienstamm wird 48 h unter Standardbedingungen kultiviert und als Glycerin-Einlagerung eingefroren.
- Der *E. coli* ET12567 (pUB307) mit dem zu mobilisierendes Plasmid wird über Nacht (ca. 12-15 Stunden) in 5 mL LB-Medium unter Selektionsdruck (Reagenzgläser mit Alukappe) bei 37 °C und 220 rpm kultiviert.

- Davon 100 μL zu 5 mL frischem LB-Medium geben und unter Selektionsdruck bis zu einer optischen Dichte (OD_{600}) von 0.4-0.6 bei 37 °C und 220 rpm inkubieren.
- Die Zellen in 15 mL Falcontubes vier Minuten bei 7000 rpm (4 °C) abzentrifugieren und zwei Mal mit LB-Medium ohne Antibiotikazusatz waschen.
- Den Rückstand mit LB-Medium resuspendieren und mit 500 μL einer Glycerin-Einlagerung des Streptomyceten vermischen.
- Dieser Ansatz wird zwei Mal mit 2 \times YT-Medium gewaschen; das Zentrifugieren erfolgt hierbei bei 5000 rpm (4 °C) für drei Minuten.
- Überstand abdekantieren und Pellet im verbleibendem Medium resuspendieren. Diese Zellsuspension anschließend auf dem Medium SM* unter Zusatz von 10 mM MgCl_2 ausplattieren und bei 30 °C für 16-20 Stunden inkubieren.
- Overlay: Die SM*-Agarplatten mit 1 mL einer Lösung aus dem entsprechenden Selektionsantibiotikum und 0.5 mg/mL Nalidixinsäure (zum Abtöten von *E. coli*) überschichten und trocknen lassen. Es wird nur das Selektionsantibiotikum entsprechend des zu mobilisierenden Plasmids für den Overlay eingesetzt, nicht zusätzlich für das Mobilisierungsplasmid (pUB307).
- Die Platten werden nach dem Overlay bis zu einem deutlichen Wachstum der Exkonjuganten bei 30 °C inkubiert.
- Als Test auf erfolgreiche Konjugation werden die gewachsenen Kolonien auf frisches SM-Festmedium (unter Zusatz des Selektionsantibiotikums und Nalidixinsäure) überimpft und bei 28 °C für 4-6 Tage inkubiert.

Alternative Vorgehensweise für Insertionsmutanten mit Plasmid pA18mob als Donor:

Hierbei stammten die verwendeten Bakterienzellen nicht aus einer Glycerin-Einlagerung, sondern werden direkt aus einer 48 h-Kultur entnommen. Als Alternative wurde eine Sporensuspension verwendet. Zusätzlich kommt es zu einem Aktivierungsschritt durch Wärme.

- Die Gewinnung der *E. coli*-Zellen erfolgt nach oben genannter Methode.
- Variante 1: 100 μL einer 48 h-Kultur des Rezipienten-Stammes werden zu 400 μL 2 \times YT-Medium in ein Reaktionsgefäß gegeben.
- Variante 2: Eine drei Tage alte Festphasenkultur (Agarplatte) des Rezipienten-Stammes wird mit ca. 3 mL 2 \times YT-Medium überschichtet. Mit Hilfe eines Wattepad

werden die Sporen des Luftmycel vorsichtig abgelöst. Mittels Pipette werden die Sporen durch das Wattepad gefiltert und in ein Falcontube überführt. Dieser Schritt wird drei Mal wiederholt und die Sporen durch Zentrifugation (7000 rpm, 4 min) gewonnen. 5 µL der Sporen werden in 500 µL 2×YT-Medium aufgenommen.

- Zur Induktion der Konjugationseffizienz wird die Suspension (aus Variante 1 bzw. 2) bei 50 °C für 10 min inkubiert.
- Die *E. coli*-Zellen werden in etwas 2×YT-Medium resuspendiert und 500 µL davon mit dem Rezipienten (aus Variante 1 bzw. 2) vermischt.
- Alle weiteren Schritte folgen der Standard-Vorschrift.

10.12.7 Konjugationsfähigkeit von *Streptomyces* sp. Gö 40/10 und Tü 1892

Um in späteren Versuchen die Sicherheit zu besitzen, dass die eingesetzten Stämmen überhaupt eine Konjugationsfähigkeit besitzen, wurden Vorversuche mit Modellplasmiden durchgeführt. Hierzu wurden die von T. WEBER (Universität Tübingen) bereitgestellten Plasmide pSET152 und pSET152ermE+egfp+rrnB über eine intergenerische Konjugation von ET12567 (pUB307) in die Stämme Gö 40/10 und Tü 1892 vermittelt. Für Kulturen, die das gewünschte Resistenzprofil (Apramycin-Resistenz) aufwiesen, wurde eine erfolgreiche Plasmid-Aufnahme angenommen. Zusätzlich konnte durch das *via* pSET152ermE+egfp+rrnB vermittelte ‚EGFP‘ (‚Enhanced Green Fluorescence Protein‘) mittels Fluoreszenzspektroskopie auf erfolgreiche Konjugation geschlossen werden. Dazu wurde eine einzelne Kolonie aus dem Agar ausgestochen und auf einen Objektträger überführt. Die Emission des GFP liegt bei 508 nm, daher konnten erfolgreiche Exkonjuganten durch eine grüne Fluoreszenz identifiziert werden. Die Messungen am Fluoreszenzmikroskop erfolgten in Zusammenarbeit mit D. WEISKOPF (AK STEINEM/Universität Göttingen) an einem Zeiss AxioTech Vario (Bandpass-Filtersatz 44: 475 nm Absorption, 530 nm Emission).

10.12.8 Kultivierung und Analyse der Geninaktivierungsmutanten

Alle durch interspezifische Konjugation erhaltenen Exkonjuganten, die das korrekte Resistenzprofil (Apramycin-resistent) auswiesen, wurden unter Selektionsdruck kultiviert. Zusätzlich erfolgte eine parallele Fermentation des Wildtyps mit und ohne Selektionsdruck.

Streptomyces albus* / *Streptomyces lividans

Vorkultur: Die Kultivierung erfolgte in 300 mL-Erlenmeyerkolben (EMK) mit Schikane und Schaumstoffkappe bei 27 °C und 180 rpm. Die Kolben enthielten je 100 mL Medium S_{apr} und wurden mit ca. 1 cm² einer gut bewachsenen Agarplatte inokuliert. Die Fermentationsdauer betrug 48 h.

Hauptkultur: Die Kultivierung erfolgte je Mutante in vier 300 mL-Erlenmeyerkolben (EMK) mit Schikane und Schaumstoffkappe bei 27 °C und 180 rpm. Die Kolben enthielten jeweils 125 mL Medium SM*_{apr} und wurden mit 12 mL (10 % (v/v)) der Vorkultur beimpft. Die Dauer der Fermentation betrug vier Tage für *S. lividans* bzw. fünf Tage für *S. albus*.

Aufarbeitung: Der pH-Wert der vereinigten Kulturbrühe wurde auf 5.5 korrigiert. Das Mycel wurde nach Zugabe von etwas Celite durch Filtration abgetrennt und mit 100 mL Aceton im Ultraschallbad behandelt. Das Kulturfiltrat wurde zwei Mal mit der gleichen Menge an Ethylacetat extrahiert. Die organischen Phasen wurden im Vakuum eingengt.

Analyse: Die Analyse des Metabolitenmusters erfolgte mittels Dünnschichtchromatographie (KG, Chloroform/Methanol 8:2 und RP, Methanol/Wasser 7:3) und HPLC-MS (Säule 1, Programm 1). Für beide Untersuchungen wurde eine Konzentration der Rohextrakte von 5 mg/mL eingestellt.

***Streptomyces* sp. Gö 40/10**

Kultivierung: Die Kultivierung erfolgte pro Mutante in zwei 300 mL-Erlenmeyerkolben (EMK) mit Schikane und Schaumstoffkappe bei 28 °C und 250 rpm. Die Kolben enthielten jeweils 100 mL SM_{apr}-Medium und wurden mit ca. 1 cm² einer gut bewachsenen Agarplatte inokuliert. Nach 24 Stunden wurden jeder Kultur 10 mL (ca. 5 g) eines sterilen XAD-16/Wasser-Gemisches zugegeben. Die Fermentation wurde nach 70 Stunden beendet.

Aufarbeitung: Der pH-Wert der vereinigten Kulturbrühe wurde auf 5.5 korrigiert. Das Mycel/XAD wurde nach Zugabe von etwas Celite im Falcontube durch Zentrifugation (5 min bei 9000 rpm) abgetrennt. Das abdekantierte Kulturfiltrat wurde verworfen. Das Mycel/XAD wurde zwei Mal mit je 100 mL Aceton extrahiert und die organischen Phasen im Vakuum eingengt. Der Rohextrakt wurde mit 20 mL Chloroform/Methanol (9:1) aufgenommen und nur die flüssige Phase eingengt.

Analyse: Das Metabolitenspektrum der Extrakte (*c* = 5 mg/mL) wurde mittels HPLC-MS (Säule 1, Programm 1) untersucht

11 Anhang

11.1 Plasmidkarten

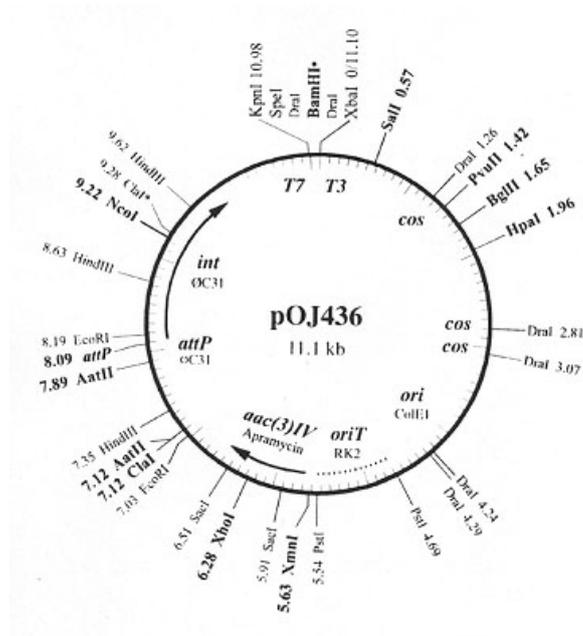


Abbildung 82: Plasmidkarte des für die Cosmidbank eingesetzten Vektors (Integrationsystem) pOJ436^[214].

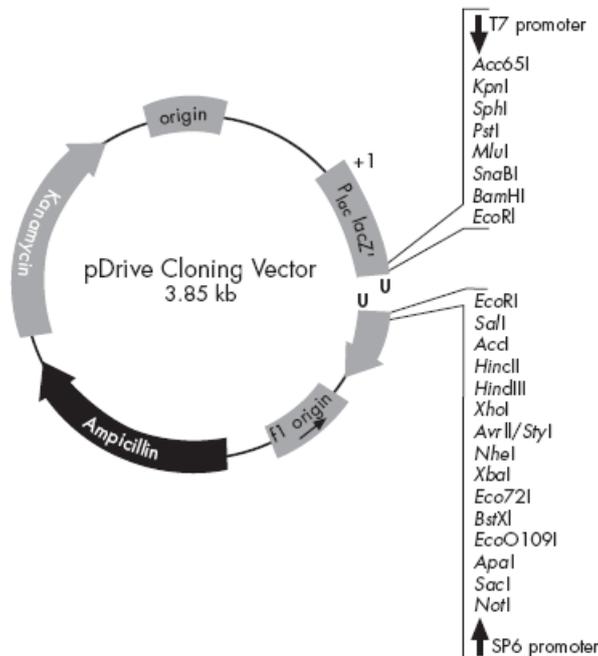


Abbildung 83: Plasmidkarte des Sequenzierungsvektors *Qiagen* pDrive aus *Qiagen* PCR Cloning Kit (Abbildung entnommen aus [236]).

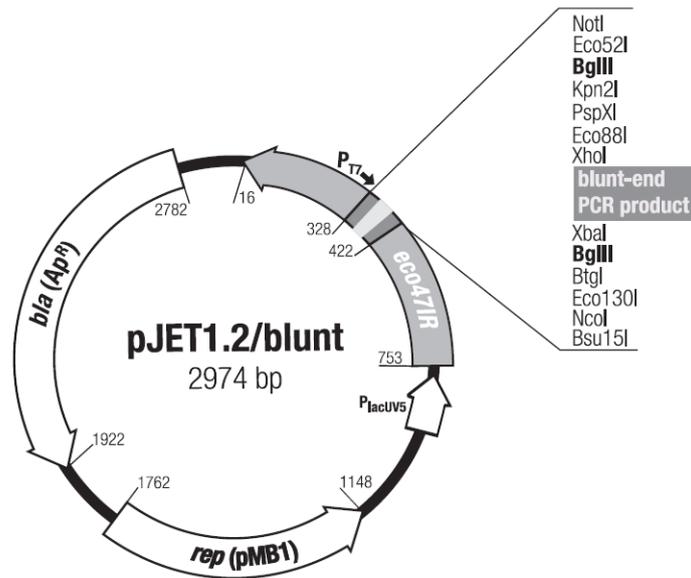


Abbildung 84: Plasmidkarte des Sequenzierungsvektors *Fermentas* pJET1.2/blunt aus *Fermentas* CloneJET PCR Cloning Kit (Abbildung entnommen aus [237]).

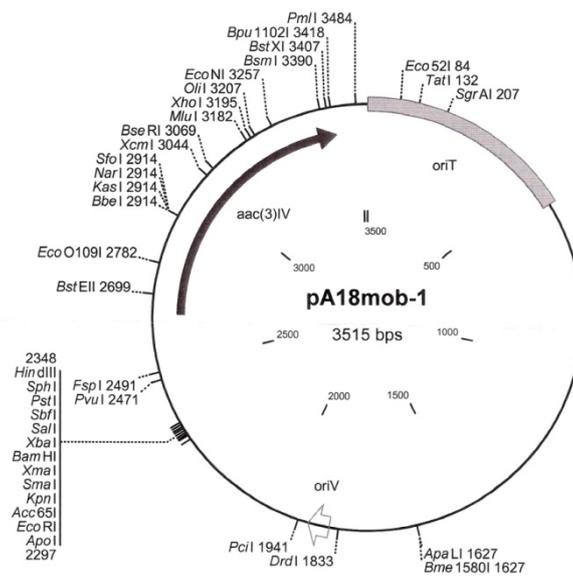


Abbildung 85: Plasmidkarte des Geninaktivierungsvektors pA18mob (pK18-Derivat).

11.2 Ergebnisse des chemischen Screenings

Tabelle 21: Ergebnisse des chemischen Screenings der von chinesischen Heilpflanzen isolierten assoziierten Actinomyceten. Der erste Buchstabe der Stamm-Bezeichnung gibt die Pflanze an, von der der Mikroorganismus stammt: *Crataegus pinnatifida* Bge. (H), *Caltha palustris sibirica* Regel. (M), *Viola alisoviana* Kiss. (V), *Filipendula palmata* (Pall.) Maxim. (W). Bewertung: interessant (+); eingeschränkt interessant (o); keine weitere Bearbeitung vorgesehen (-).

Bezeichnung	Quelle	Medium	Kulturbrühe	Dauer/pH	Bewertung
HaB3231	Blatt	M2	braun	3 d / 7.7	-
		SM	hellbraun	3 d / 7.5	-
		SGG	braun	3 d / 8.5	-
		HF	grau	3 d / 6.1	-
HaB34	Blatt	M2	hellbraun	4 d / 7.6	-
		SM	hellbraun	4 d / 5.6	o
		SGG	hellbraun	3 d / 7.0	-
		Spirulina	grün-braun	3 d / 8.6	-
HaB351	Blatt	M2	braun	3 d / 5.5	-
		SM	hellbraun	3 d / 6.3	-
		SGG	hellbraun	3 d / 6.5	o
		HF	hellbraun	4 d / 5.3	-
Wa21	Blatt	M2	grün-grau	4 d / 7.6	-
		SM	grün-grau	4 d / 8.1	-
		SGG	grün-grau	3 d / 7.0	-
		Spirulina	grün-grau	3 d / 8.8	o
Wa231	Blatt	M2	gelb-braun	4 d / 6.6	-
		SM	dunkelbraun	3 d / 8.9	-
		SGG	dunkelbraun	3 d / 7.8	-
		Spirulina	grün-braun	3 d / 8.7	-
Wa232	Blatt	M2	hellbraun	3 d / 6.0	+
		SM	dunkelbraun	3 d / 8.4	o
		SGG	dunkelbraun	3 d / 6.9	+
		HF	hellbraun	4 d / 5.0	+
Wa2621	Blatt	M2	braun	3 d / 7.4	-
		SM	grün-grau	3 d / 8.6	o
		SGG	braun	3 d / 7.8	+
		HF	hellbraun	4 d / 5.4	-
Wa281	Blatt	M2	braun	3 d / 6.3	-
		SM	hellbraun	4 d / 6.0	-
		SGG	hellbraun	4 d / 8.0	-
		HF	ockerfarben	4 d / 5.3	-

Tabelle 21 (Fortsetzung): Ergebnisse des chemischen Screenings der von chinesischen Heilpflanzen isolierten assoziierten Actinomyceten. Der erste Buchstabe der Stamm-Bezeichnung gibt die Pflanze an, von der der Mikroorganismus stammt: *Crataegus pinnatifida* Bge. (H), *Caltha palustris sibirica* Regel. (M), *Viola alisoviana* Kiss. (V), *Filipendula palmata* (Pall.) Maxim. (W). Bewertung: interessant (+); eingeschränkt interessant (o); keine weitere Bearbeitung vorgesehen (-).

Bezeichnung	Quelle	Medium	Kulturbrühe	Dauer / pH	Bewertung
Wa283	Blatt	M2	braun	4 d / 6.5	-
		SM	hellbraun	4 d / 5.6	+
		SGG	hellbraun	3 d / 7.0	-
		HF	hellbraun	4 d / 5.3	-
WaS4811	Sprossachse	M2	gelb-braun	4 d / 6.3	+
		SM	grau-braun	4 d / 7.6	-
		SGG	grau	3 d / 7.4	-
		Spirulina	grün-braun	3 d / 9.0	-
WW111	Wurzel	M2	grün-grau	4 d / 7.5	-
		SM	grün-grau	4 d / 8.2	-
		SGG	grün-grau	3 d / 7.2	o
		Spirulina	grün-grau	3 d / 8.6	-
WW121	Wurzel	M2	braun	4 d / 7.0	+
		SM	grün-grau	3 d / 7.1	-
		SGG	grün-grau	3 d / 7.1	-
		HF	hellbraun	4 d / 5.6	-
WW28	Wurzel	M2	braun	3 d / 5.5	-
		SM	hellbraun	3 d / 6.3	-
		SGG	hellbraun	3 d / 6.5	-
		HF	hellbraun	4 d / 5.3	-
WWa271	Wurzel	M2	grün-braun	4 d / 8.0	-
		SM	hellbraun	4 d / 8.1	o
		SGG	hellbraun	3 d / 7.3	-
		Spirulina	hellbraun	3 d / 8.9	-
WWa1132	Wurzel	M2	grau	4 d / 6.8	-
		SM	grau	3 d / 7.5	-
		SGG	grau	3 d / 6.6	-
		Spirulina	grün-braun	3 d / 8.9	-
WWa141	Wurzel	M2	braun	3 d / 7.5	+
		SM	hellbraun	4 d / 7.9	+
		SGG	dunkelbraun	3 d / 6.7	o
		HF	wie Medium	4 d / 5.6	-
WWa1512	Wurzel	M2	gelb-braun	4 d / 7.1	-
		SM	hellbraun	4 d / 6.5	-
		SGG	hellbraun	3 d / 7.2	-
		Spirulina	grün-braun	3 d / 9.0	-

Tabelle 21 (Fortsetzung): Ergebnisse des chemischen Screenings der von chinesischen Heilpflanzen isolierten assoziierten Actinomyceten. Der erste Buchstabe der Stamm-Bezeichnung gibt die Pflanze an, von der der Mikroorganismus stammt: *Crataegus pinnatifida* Bge. (H), *Caltha palustris sibirica* Regel. (M), *Viola alisoviana* Kiss. (V), *Filipendula palmata* (Pall.) Maxim. (W). Bewertung: interessant (+); eingeschränkt interessant (o); keine weitere Bearbeitung vorgesehen (-).

Bezeichnung	Quelle	Medium	Kulturbrühe	Dauer / pH	Bewertung
WWa18	Wurzel	M2	hellbraun	3 d / 7.1	-
		SM	hellbraun	3 d / 7.6	+
		SGG	braun	3 d / 6.7	-
		HF	ockerfarben	4 d / 5.3	+
WWa181	Wurzel	M2	braun	3 d / 7.7	-
		SM	hellbraun	4 d / 8.2	-
		SGG	hellbraun	3 d / 7.8	-
		HF	ockerfarben	4 d / 5.5	-
WWa183	Wurzel	M2	hellbraun	3 d / 5.8	+
		SM	hellbraun	3 d / 6.8	-
		SGG	hellbraun	3 d / 7.0	-
		HF	hellbraun	4 d / 5.5	-

Tabelle 22: Ergebnisse des chemischen Screenings der aus chinesischen Heilpflanzen isolierten endophytischen Pilze. Der erste Buchstabe der Stamm-Bezeichnung gibt die Pflanze an, von der der Mikroorganismus stammt: *Crataegus pinnatifida* Bge. (H), *Caltha palustris sibirica* Regel. (M), *Viola alisoviana* Kiss. (V), *Filipendula palmata* (Pall.) Maxim. (W). Bewertung: interessant (+); eingeschränkt interessant (o); keine weitere Bearbeitung vorgesehen (-). Die Kultivierungsform ist für jedes Medium mit angegeben: Schüttelkultur (SK) bzw. Ruhekultur (R).

Bezeichnung	Quelle	Medium	Kulturbrühe	Dauer / pH	Bewertung
MeB3	Blatt	NL 1158 (SK)	braun ^(a)	6 d / 3.9	-
		NL 1158 (R)	grau-braun	28 d / 3.9	-
		BM (SK)	grau-braun ^(a)	6 d / 5.2	-
		BM (R)	braun	28 d / 4.2	-
		G20 (SK)	braun ^(a)	6 d / 8.3	-
		G20 (R)	braun	28 d / 7.3	-
		SGG (SK)	grau ^(a)	6 d / 8.1	-
		SGG (R)	grau-gelb	28 d / 7.4	-
VeT11	Blatt	NL 1158 (SK)	dunkelbraun	6 d / 2.7	+
		NL 1158 (R)	dunkelbraun	28 d / 4.9	+
		BM (SK)	ockerfarben	6 d / 4.3	o
		BM (R)	braun	28 d / 4.5	o
		G20 (SK)	gelblich ^(a)	6 d / 6.4	o
		G20 (R)	braun	28 d / 4.9	-
		SGG (SK)	gelblich ^(a)	6 d / 7.8	-
		SGG (R)	braun	28 d / 7.9	-
WeB111	Blatt	NL 1158 ^(b)	braun ^(a)	6 d / 5.1	+
		BM ^(b)	grün-grau	6 d / 4.7	+
		G20 ^(b)	dunkelbraun	6 d / 6.9	-
		SGG ^(b)	braun	6 d / 8.2	-
WeS11	Sprossachse	NL 1158 (SK)	currygelb	6 d / 3.2	+
		NL 1158 (R)	gelb-braun	28 d / 6.7	-
		BM ^(b)	grün-grau	6 d / 5.8	-
		G20 (SK)	dunkelbraun	6 d / 4.7	-
		G20 (R)	braun	28 d / 7.3	-
		SGG (SK)	grün-braun	6 d / 8.2	-
		SGG (R)	braun	28 d / 7.4	-

^a : Das Mycel bildete Pellets.

^b : Die Kultivierung als Ruhekultur führte zu keinem Wachstum.

11.3 Röntgenstrukturdaten von 4-Methyl-2-chinazolinamin (21)

Tabelle 23: Daten des Kristalls und der Strukturverfeinerung von **21**.

Identification code	atx008_6	
Empirical formula	C ₉ H ₉ N ₃	
Formula weight	159.19	
Temperature	100(2) K	
Wavelength	1.54178 Å	
Crystal system	Orthorhombic	
Space group	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	
Unit cell dimensions	a = 7.4227(15) Å	α = 90°.
	b = 9.1999(18) Å	β = 90°.
	c = 11.846(2) Å	γ = 90°.
Volume	809.0(3) Å ³	
Z	4	
Density (calculated)	1.307 Mg/m ³	
Absorption coefficient	0.660 mm ⁻¹	
F(000)	336	
Crystal size	0.27 x 0.22 x 0.18 mm ³	
Theta range for data collection	6.09 to 60.23°.	
Index ranges	-8<=h<=8, -7<=k<=10, -10<=l<=13	
Reflections collected	8148	
Independent reflections	1197 [R(int) = 0.0401]	
Completeness to theta = 60.23°	99.2 %	
Absorption correction	Semi-empirical from equivalents	
Max. and min. transmission	0.8905 and 0.8420	
Refinement method	Full-matrix least-squares on F ²	
Data / restraints / parameters	1197 / 3 / 119	
Goodness-of-fit on F ²	1.054	
Final R indices [I>2sigma(I)]	R1 = 0.0225, wR2 = 0.0600	
R indices (all data)	R1 = 0.0225, wR2 = 0.0601	
Absolute structure parameter	-0.0448(856)	
Extinction coefficient	0.0090(17)	
Largest diff. peak and hole	0.122 and -0.097 e.Å ⁻³	

Tabelle 24: (a) Bindungslängen [Å] und (b) Bindungswinkel [°] in **21**.

(a)	N(10)-C(2)	1.3498(15)	(b)	C(2)-N(10)-H(1)	118.8(10)
	N(10)-H(1)	0.881(8)		C(2)-N(10)-H(2)	119.2(9)
	N(10)-H(2)	0.882(8)		H(1)-N(10)-H(2)	121.9(13)
	N(1)-C(2)	1.3253(16)		C(2)-N(1)-C(8a)	116.25(10)
	N(1)-C(8a)	1.3723(16)		C(4)-N(3)-C(2)	117.22(10)
	N(3)-C(4)	1.3197(16)		C(7)-C(8)-C(8a)	120.21(12)
	N(3)-C(2)	1.3803(16)		C(7)-C(8)-H(8a)	119.9
	C(8)-C(7)	1.3720(18)		C(8a)-C(8)-H(8a)	119.9
	C(8)-C(8a)	1.4091(17)		C(8a)-C(4a)-C(5)	119.49(11)
	C(8)-H(8a)	0.9500		C(8a)-C(4a)-C(4)	116.86(10)
	C(4a)-C(8a)	1.4119(17)		C(5)-C(4a)-C(4)	123.57(11)
	C(4a)-C(5)	1.4124(17)		N(1)-C(2)-N(10)	118.53(11)
	C(4a)-C(4)	1.4266(17)		N(1)-C(2)-N(3)	126.44(10)
	C(4)-C(9)	1.4933(18)		N(10)-C(2)-N(3)	115.02(11)
	C(7)-C(6)	1.4034(18)		N(1)-C(8a)-C(8)	119.65(11)
	C(7)-H(7a)	0.9500		N(1)-C(8a)-C(4a)	121.43(10)
	C(5)-C(6)	1.3680(19)		C(8)-C(8a)-C(4a)	118.92(11)
	C(5)-H(5a)	0.9500		N(3)-C(4)-C(4a)	121.41(11)
	C(6)-H(6a)	0.9500		N(3)-C(4)-C(9)	117.50(11)
	C(9)-H(2a)	0.9800		C(4a)-C(4)-C(9)	121.08(11)
	C(9)-H(2b)	0.9800		C(8)-C(7)-C(6)	121.03(12)
	C(9)-H(2c)	0.9800		C(8)-C(7)-H(7a)	119.5
				C(6)-C(7)-H(7a)	119.5
				C(6)-C(5)-C(4a)	120.58(12)
				C(6)-C(5)-H(5a)	119.7
				C(4a)-C(5)-H(5a)	119.7
				C(5)-C(6)-C(7)	119.73(12)
				C(5)-C(6)-H(6a)	120.1
				C(7)-C(6)-H(6a)	120.1
				C(4)-C(9)-H(2a)	109.5
				C(4)-C(9)-H(2b)	109.5
				H(2a)-C(9)-H(2b)	109.5
				C(4)-C(9)-H(2c)	109.5
				H(2a)-C(9)-H(2c)	109.5
				H(2b)-C(9)-H(2c)	109.5

Tabelle 25: Atomkoordinaten [$\cdot 10^4$] und äquivalent isotrope Auslenkungsparameter [$\text{\AA}^2 \cdot 10^3$] für **21**. $U(\text{eq})$ ist definiert als ein Drittel der Spur des orthogonalen U^{ij} Tensors.

	x	y	z	U(eq)
N(1)	4511(1)	5584(1)	279(1)	23(1)
N(3)	1543(1)	6004(1)	1049(1)	23(1)
N(10)	3042(2)	7762(1)	33(1)	28(1)
C(2)	3072(2)	6403(1)	463(1)	22(1)
C(4)	1565(2)	4730(1)	1561(1)	22(1)
C(4a)	3087(2)	3788(1)	1488(1)	22(1)
C(5)	3181(2)	2420(1)	2025(1)	26(1)
C(6)	4617(2)	1518(1)	1845(1)	29(1)
C(7)	6024(2)	1965(2)	1134(1)	29(1)
C(8)	5989(2)	3300(1)	619(1)	26(1)
C(8a)	4521(2)	4245(1)	790(1)	22(1)
C(9)	-74(2)	4302(1)	2212(1)	29(1)

C. Literaturverzeichnis

- 1 A. Gurib-Fakim, *Mol. Aspects Med.* **2006**, *27*, 1–93.
- 2 A. L. Demain, S. Sanchez, *J. Antibiot.* **2009**, *62*, 5–16.
- 3 D. J. Newman, G. M. Cragg, *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 461–516.
- 4 Y.-W. Chin, M. J. Balunas, H. B. Chai, A. D. Kinghorn, *AAPS J.* **2006**, *8*, E239–E253.
- 5 a) T. Henkel, R. M. Brunne, H. Müller, F. Reichel, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 643–647.
b) T. Henkel, R. M. Brunne, H. Müller, F. Reichel, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 688–691.
- 6 Y.-Z. Shu, *J. Nat. Prod.* **1998**, *61*, 1053–1071.
- 7 S. Omura (Ed.), *The Search for Bioactive Compounds from Microorganisms*, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, **1992**.
- 8 G. L. Challis, D. A. Hopwood, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA (PNAS)* **2003**, *100*, 14555–14561.
- 9 M. A. Fischbach, C. T. Walsh, *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 3468–3496.
- 10 D. J. Faulkner, *Nat. Prod. Rep.* **2000**, *17*, 1–55.
- 11 a) R. Höfs, M. Walker, A. Zeeck, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 3258–3261.
b) R. Höfs, M. Walker, A. Zeeck, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 3400–3403.
- 12 H. B. Bode, B. Bethe, R. Höfs, A. Zeeck, *ChemBioChem* **2002**, *3*, 619–627.
- 13 J. Fuchser, R. Thiericke, A. Zeeck, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1995**, 1663–1664.
- 14 J. Fuchser, A. Zeeck, *Liebigs Ann.* **1997**, 87–95.
- 15 M. Zerikly, G. L. Challis, *ChemBioChem* **2009**, *10*, 625–633.
- 16 K. Scherlach, C. Hertweck, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 1753–1760.
- 17 C. R. Hutchinson, *Curr. Opin. Microbiol.* **1998**, *1*, 319–329.
- 18 J. A. Kers, M. J. Wach, S. B. Krasnoff, J. Widom, K. D. Cameron, R. A. Bukhalid, D. M. Gibson, B. R. Crane, R. Loria, *Nature* **2004**, *429*, 79–82.
- 19 A. A. Izzo, E. Ernst, *Drugs* **2001**, *61*, 2163–2175.
- 20 M. Ichinoe *et al.*, *Eisei Shikenjo Hokoku (Bulletin of National Institute of Hygienic Sciences)* **1988**, *106*, 18–24.
- 21 R. R. Ruffolo, *Exp. Opin. Drug Discov.* **2006**, *1*, 99–102.
- 22 C. T. Keith, A. A. Borisy, B. R. Stockwell, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2005**, *4*, 71–78.
- 23 X.-J. Li, H.-Y. Zhang, *Trends Mol. Med.* **2008**, *14*, 1–2.
- 24 B. M. Schmidt, D. M. Ribnicky, P. E. Lipsky, I. Raskin, *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3*, 360–366.
- 25 J. Han, *J. Ethnopharmacol.* **1988**, *24*, 1–17.
- 26 X.-J. Li, H.-Y. Zhang, *EMBO Rep.* **2008**, *9*, 112–113.

- 27 P. G. Xiao, Y. Liu, W. Xiao, *China Pharm. J.* **2001**, *36*, 505–507.
- 28 D. M. Yue, B. L. Wang, *Chin. Commun. Doct.* **2004**, *6*, 8.
- 29 X.-J. Li, H.-Y. Zhang, *Trends Pharmacol. Sci.* **2008**, *29*, 331–332.
- 30 T. W. Corson, C. M. Crews, *Cell* **2007**, *130*, 769–774.
- 31 a) S. F. Brady, J. Clardy, *J. Nat. Prod.* **2000**, *63*, 1447–1448.
b) J. Y. Li, G. Strobel, J. Harper, E. Lokovsky, J. Clardy, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 767–770.
- 32 O. Expósito, M. Bonfill, E. Moyano, M. Onrubia, M. H. Mirjalili, R. M. Cusidó, J. Palazón, *Anticancer Agents Med. Chem.* **2009**, *9*, 109–21.
- 33 A. Stierle, G. Strobel, D. Stierle, *Science* **1993**, *260*, 214–216.
- 34 D. Sreekanth, A. Syed, S. Sarkar, D. Sarkar, B. Santhakumari, A. Ahmad, M. I. Khan, *J. Microbiol. Biotechnol.* **2009**, *19*, 1342–1347.
- 35 M. Heinrich, *Curr. Top. Med. Chem.* **2003**, *3*, 141–154.
- 36 S. A. Strobel, G. A. Strobel, *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3*, 356–359.
- 37 J. Y. Li, J. K. Harper, D. M. Grant, B. O. Tombe, B. Bashyal, W. M. Hess, G. A. Strobel, *Phytochemistry* **2001**, *56*, 463–468.
- 38 J. Y. Li, G. A. Strobel, *Phytochemistry* **2001**, *57*, 261–265.
- 39 G. A. Strobel, B. H. Daisy, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2003**, *67*, 491–502.
- 40 T. Schuhmann, *Dissertation*, Universität Göttingen, **2004**.
- 41 L. Hoffmann, *Dissertation*, Universität Göttingen, **2006**.
- 42 W. Wencai *et al.* in *Flora of China – Vol. 6 (Caryophyllaceae through Lardizabalaceae)* (Eds.: Flora of China Editorial Committee), Science Press, Beijing und Missouri Botanical Garden Press, St. Louis, **2001**, pp.133–438.
- 43 G. Cuizhi, S. A. Spongberg in *Flora of China - Vol. 9 (Pittosporaceae through Connaraceae)* (Eds.: Z. Y. Wu, P. H. Raven, D. Y. Hong), Science Press, Beijing und Missouri Botanical Garden Press, St. Louis, **2003**, pp. 111–117.
- 44 R. Traversier, K. Staudinger, S. Friedrich, *TCM mit westlichen Pflanzen*, Sonntag Verlag, Stuttgart, **2005**.
- 45 L. Chaoluan, H. Ikeda, H. Ohba in *Flora of China - Vol. 9 (Pittosporaceae through Connaraceae)* (Eds.: Z. Y. Wu, P. H. Raven, D. Y. Hong), Science Press, Beijing und Missouri Botanical Garden Press, St. Louis, **2003**, pp. 193–195.
- 46 H. Wang (Universität Göttingen), *persönliche Mitteilung*.
- 47 C. Yousheng, Y. Qiner, H. Ohba, V. V. Nikitin in *Flora of China – Vol. 13 (Clusiaceae through Araliaceae)* (Eds.: Flora of China Editorial Committee), Science Press, Beijing und Missouri Botanical Garden Press, St. Louis, **2007**, pp.72–111.
- 48 S. Umezawa, T. Tsuchiya, K. Tatsuta, Y. Horiuchi, T. Usui, H. Umezawa, M. Hamada, A. Yagi, *J. Antibiot.* **1970**, *23*, 20–27.
- 49 S. Breiding-Mack, A. Zeeck, *J. Antibiot.* **1987**, *40*, 953–960.
- 50 K. Burkhardt, H. P. Fiedler, S. Grabley, R. Thiericke, A. Zeeck, *J. Antibiot.* **1996**, *49*, 432–437.

- 51 W. A. König, H. Drautz, H. Zähler, *Liebigs Ann. Chem.* **1980**, 1384–1391.
- 52 S. Omura, *J. Antibiot.* **2009**, *62*, 17–26.
- 53 R. P. Hertzberg, A. J. Pope, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, *4*, 445–451.
- 54 A. Taddei, M. Valderrama, J. Giarrizzo, M. Rey, C. Castelli, *Res. Microbiol.* **2006**, *157*, 291–297.
- 55 S. A. Waksman, *Bacteriol. Rev.* **1941**, *5*, 231–291.
- 56 H. A. Lechevalier, C. T. Corke, *Appl. Microbiol.* **1953**, *1*, 110–112.
- 57 S. A. Waksman, H. A. Lechevalier, *Science* **1949**, *109*, 305–307.
- 58 S. A. Waksman, H. A. Lechevalier, *Antibiot. Chemother.* **1954**, *1*, 125.
- 59 N. C. Gassner, P. Crews, T. R. Holman, R. S. Lokey *et al.*, *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 383–390.
- 60 N. Beetz, *Arbeit zum 1. Staatsexamen*, Universität Göttingen, **2007**.
- 61 a) S. F. Altschul, W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, D. J. Lipman, *J. Mol. Biol.* **1990**, *215*, 403–410.
b) S. McGinnis, T. L. Madden, *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, W20–W25 (*Web Server issue*).
c) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> (Stand: 09/2009).
- 62 J. Ehrlich, D. Gottlieb, P.R. Burkholder, L. E. Anderson, T. G. Pridham, *J. Bacteriol.* **1948**, *56*, 467–477.
- 63 Y. Hinuma, *J. Antibiot.* **1954**, *7*, 134–136.
- 64 http://www.dsmz.de/microorganisms/main.php?content_id=68 (Stand: 09/2009).
- 65 E. B. Shirling, D. Gottlieb, *Int. J. Syst. Bacteriol.* **1969**, *19*, 391–512.
- 66 E. B. Shirling, D. Gottlieb, *Int. J. Syst. Bacteriol.* **1972**, *22*, 265–394.
- 67 Ergebnisprotokoll der DSMZ (07/2009), Frau Dr. Verbarg.
- 68 H. Laatsch, *AntiBase – A Data Base for Rapid Structural Determination of Microbial Natural Products*, Chemical Concepts, Weinheim (Version **2008**).
- 69 P. M. Dewick, *Nat. Prod. Rep.* **1998**, *15*, 17–58.
- 70 W. Balk, *Dissertation*, Universität Göttingen, **1995**.
- 71 M.-J. Cheng, C.-F. Lin, C.-J. Wang, I.-L. Tsai, I.-S. Chen, *J. Chin. Chem. Soc.* **2007**, *54*, 779–783.
- 72 *Dictionary of Natural Products on DVD*, Chapman & Hall/CRC Press, Boca Raton (USA), London (UK), (Version 18:1, **2009**).
- 73 W. L. Bolhofer, R. A. Machlowitz, J. Charney, *Antibiot. Chemother.* **1953**, *3*, 382–384.
- 74 S. B. Binkley, *Annu. Rev. Biochem.* **1955**, *24*, 597–626.
- 75 W. D. Celmer, I. A. Solomons, *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, *77*, 2861–2865.
- 76 W. v. Daehne, W. O. Godtfredsen, L. Tybring, K. Schaumburg, *J. Antibiot.* **1969**, *22*, 233–236.
- 77 K. Minamiguchi, H. Kumagai, T. Masuda, M. Kawada, M. Ishizuka, T. Takeuchi, *Int. J. Cancer* **2001**, *93*, 307–316.
- 78 B. Jensen, *Acta Cryst. B* **1971**, *27*, 392–400.
- 79 L. F. Theilling, R. L. McKee, *J. Am. Chem. Soc.* **1952**, *74*, 1834–1836.

- 80 J. B. Hynes, J. P. Campbell, J. D. Hynes, *J. Heterocyclic Chem.* **1995**, *32*, 1185–1187.
- 81 G. Gran, *Acta Chem. Scand.* **1950**, *4*, 559–577.
- 82 P. Gans, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1985**, 1195–1200.
- 83 W. L. F. Armarego, J. I. C. Smith, *J. Chem. Soc. (C)* **1966**, 234–239.
- 84 Die CCDC Referenznummer 737855 verweist auf die kristallographischen Daten der Struktur. CCDC, 12 Union Road, Cambridge CB2 1EZ (UK); Fax: +44 1223 336033; E-Mail: deposit@ccdc.cam.ac.uk; www.ccdc.cam.ac.uk/conts/retrieving.html (Stand: 09/2009).
- 85 D. L. Crabb, K. J. McCullough, P. N. Preston, G. M. Rosair, B. C. Bishop, S. H. B. Wright, W. Clegg, S. Coles, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1999**, 1517–1525.
- 86 G. M. Sheldrick, *Acta Cryst.* **2008**, *A64*, 112–122.
- 87 P. Emsley, K. Cowtan, *Acta Cryst.* **2004**, *D60*, 2126–2132.
- 88 V. Markowski, G. R. Sullivan, J. D. Roberts, *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 714–718.
- 89 N. C. Gonnella, J. D. Roberts, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 3162–3164.
- 90 N. C. Gonnella, H. Nakanishi, J. B. Holtwick, D. S. Horowitz, K. Kanamori, N. J. Leonard, J. D. Roberts, *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 2050–2055.
- 91 A. Bischler, M. Lang, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1895**, *28*, 279–293.
- 92 W. L. F. Armarego, *Adv. Heterocycl. Chem.* **1963**, *11*, 253–309.
- 93 L. D'yakonov, M. V. Telezhenetskaya, *Chem. Nat. Compd.* **1997**, *33*, 221–267.
- 94 a) D. Chakravarti, R. N. Chakravarti, S. C. Chakravarti, *J. Chem. Soc.* **1953**, 3337–3340.
b) D. Chakravarti, R. N. Chakravarti, L. A. Cohen, B. Dasgupta, S. Datta, H. K. Miller, *Tetrahedron* **1961**, *16*, 224–250.
c) S. K. Banerjee, D. Chakravarti, R. N. Chakravarti, H. M. Fales, D. L. Klayman, *Tetrahedron* **1961**, *16*, 251–254.
- 95 S. C. Pakrashi, T. B. Bhattacharyya, *Tetrahedron* **1963**, *19*, 1011–1026.
- 96 H. Schildknecht, W. F. Wenneis, K. H. Weis, U. Maschwitz, *Z. Naturforsch. B* **1966**, *21*, 121–127.
- 97 U. P. Claeson, T. Malmfors, G. Wikman, J. G. Bruhn, *J. Ethnopharmacol.* **2000**, *72*, 1–20 (und dort zitierte Literatur).
- 98 a) E. Späth, F. Kuffner, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1934**, *67*, 868–869.
b) E. Späth, F. Kuffner, N. Platzer, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1935**, *68*, 699–702.
- 99 D. Kikelj in *Science of Synthesis - Vol. 16* (Eds.: Y. Yamamoto, I. Shinkai), Thieme, Stuttgart, **2003**, pp. 573–749.
- 100 T. R. Webb, D. Lvovskiy, S.-A. Kim, X. Ji, N. Melman, J. Linden, K. A. Jacobson, *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11*, 77–85.
- 101 J. P. Michael, *Nat. Prod. Rep.* **2008**, *25*, 166–187.
- 102 R. P. Maskey, M. Shaaban, I. Grün-Wollny, H. Laatsch, *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 1131–1134.
- 103 Z. H. Xin, Y. Fang, L. Du, T. Zhu, L. Duan, J. Chen, Q.-Q. Gu, W.-M. Zhu, *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 853–855.

- 104 S. Mann, *Arch. Mikrobiol.* **1967**, *56*, 324–329.
- 105 J. Ruther, S. Steiner, L.-A. Garbe, *J. Chem. Ecol.* **2008**, *34*, 99–102.
- 106 S. Johné, K. Waiblinger, D. Gröger, *Eur. J. Biochem.* **1970**, *15*, 415–420.
- 107 D. G. O'Donovan, H. Horan, *J. Chem. Soc. (C)* **1970**, 2466–2470.
- 108 D. Gröger, S. Johné, K. Mothes, *Experientia* **1965**, *21*, 13–14.
- 109 D. R. Liljegren, *Phytochemistry* **1968**, *7*, 1299–1306.
- 110 D. R. Liljegren, *Phytochemistry* **1971**, *10*, 2661–2669.
- 111 C. D. Cox, J. Parker, *J. Clin. Microbiol.* **1979**, *9*, 479–484.
- 112 P. P. Gray, K. Vu-Trong, *Production of Secondary Metabolites from Micro Organisms*, WO 84/00777 (US & European Patent), **1984**.
- 113 S. C. Wenzel, R. M. Williamson, C. Grünanger, J. Xu, K. Gerth, R. A. Martinez, S. J. Moss, B. J. Carroll, S. Grond, C. J. Unkefer, R. Müller, H. G. Floss, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 14325–14336.
- 114 S. Berger, S. Braun, H.-O. Kalinowski, *NMR Spectroscopy of the Non-Metallic Elements*, John Wiley & Sons, Chichester, **1997**.
- 115 H. Nishihara, E. E. Dekker, *J. Biol. Chem.* **1972**, *247*, 5079–5087.
- 116 M. Speitling, *Dissertation*, Universität Göttingen, **1998**.
- 117 V. J. R. V. Mukku, R. P. Maskey, P. Monecke, I. Grün-Wollny, H. Laatsch, *Z. Naturforsch. C* **2002**, *57*, 335–337.
- 118 S. Fotso, R. P. Maskey, D. Schröder, A. S. Ferrer, I. Grün-Wollny, H. Laatsch, *J. Nat. Prod.* **2008**, *71*, 1630–1633.
- 119 P. J. Slininger, S. W. Gorsich, Z. L. Liu, *Biotechnol. Bioeng.* **2009**, *102*, 778–790.
- 120 R. Splivallo, U. Fischer, C. Göbel, I. Feussner, P. Karlovsky, *Plant Physiol.* **2009**, *150*, 2018–2029.
- 121 P. J. Davis, M. E. Gustafson, J. P. Rosazza, *J. Bacteriol.* **1976**, *126*, 544–546 (und dort zitierte Literatur).
- 122 X. Fu, F. J. Schmitz, R. S. Tanner, *J. Nat. Prod.* **1995**, *58*, 1950–1954.
- 123 M. Bernart, W. H. Gerwick, *Phytochemistry* **1990**, *29*, 3697–3698.
- 124 C. Costa, A. Bertazzo, G. Allegri, S. Catinella, P. Traldi, *Org. Mass Spectrom.* **1991**, *26*, 972–976.
- 125 H. Drautz, H. Zähler, E. Kupfer, W. Keller-Schierlein, *Helv. Chim. Acta* **1981**, *64*, 1752–1765.
- 126 I. Bahner, *Dissertation*, Universität Göttingen, **1996**.
- 127 C. Puder, *Dissertation*, Universität Göttingen, **1998**.
- 128 C. Puder, S. Loya, A. Hizi, A. Zeeck, *J. Nat. Prod.* **2001**, *64*, 42–45.
- 129 E. J. Corey, J. W. Ponder, *Tetrahedron Lett.* **1984**, *25*, 4325–4328.
- 130 K. U. Bindseil, A. Zeeck, *Liebigs Ann. Chem.* **1994**, 305–312.
- 131 a) G. Ingenhorst, K. U. Bindseil, C. Boddien, S. Dröse, M. Gaßel, K. Altendorf, A. Zeeck, *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, 4525–4532.
- b) M. Huss, H. Wieczorek, *J. Exp. Biol.* **2009**, *212*, 341–346.

- 132 E. J. Bowman, A. Siebers, K. Altendorf, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA (PNAS)* **1988**, *85*, 7972–7976.
- 133 S. Saroussi, N. Nelson, *Pflugers Arch. – Eur. J. Physiol.* **2009**, *457*, 581–587.
- 134 H. Wiczorek, D. Brown, S. Grinstein, J. Ehrenfeld, W. R. Harvey, *Bioessays* **1999**, *21*, 637–648.
- 135 J.-P. Sumner, J. A. T. Dow, F. G. P. Earley, U. Klein, D. Jäger, H. Wiczorek, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 5649–5653.
- 136 S. Dröse, K. U. Bindseil, E. J. Bowman, A. Siebers, A. Zeeck, K. Altendorf, *Biochemistry* **1993**, *32*, 3902–3906.
- 137 S. Dröse, K. Altendorf, *J. Exp. Biol.* **1997**, *200*, 1–8.
- 138 M. Huss, G. Ingenhorst, S. König, M. Gaßel, S. Dröse, A. Zeeck, K. Altendorf, H. Wiczorek, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 40544–40548.
- 139 B. J. Bowman, E. J. Bowman, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 3965–3972.
- 140 T. Murata, I. Yamato, Y. Kakinuma, A. G. Leslie, J. E. Walker, *Science* **2005**, *308*, 654–659.
- 141 M. Huss, *Dissertation*, Universität Osnabrück, **2001**.
- 142 M. Iharashi, H. Nakamura, H. Naganawa, T. Takeuchi, *J. Antibiot.* **1997**, *50*, 932–936.
- 143 S. Omura, N. Imamura, K. Hinozawa, K. Otaguro, G. Lukacs, R. Faghieh, R. Tolmann, B. H. Arison, J. L. Smith, *J. Antibiot.* **1983**, *36*, 1783–1786.
- 144 K. Neupert-Laves, M. Dobler, *Helv. Chim. Acta* **1982**, *65*, 262–267.
- 145 F. Sasse, H. Steinmetz, G. Höfle, H. Reichenbach, *J. Antibiot.* **2003**, *56*, 520–525.
- 146 M. Huss, F. Sasse, B. Kunze, R. Jansen, H. Steinmetz, G. Ingenhorst, A. Zeeck, H. Wiczorek, *BMC Biochem.* **2005**, *6*, 13.
- 147 A. Hinton, S. Bond, M. Forgac, *Pflugers Arch. – Eur. J. Physiol.* **2009**, *457*, 589–598.
- 148 S.R. Sennoune, K. Bakunts, G. M. Martinez, J. L. Chua-Tuan, Y. Kebir, M. N. Attaya, R. Martinez-Zaguilan, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **2004**, *286*, C1443–C1452.
- 149 S. Gagliardi, P. A. Gatti, P. Belfiore, A. Zocchetti, G. D. Clarke, C. Farina, *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 1883–1893.
- 150 K. U. Bindseil, A. Zeeck, *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 5487–5492.
- 151 T. Schuhmann, S. Grond, *J. Antibiot.* **2004**, *57*, 655–661.
- 152 K. Hatano, E. Mizuta, S. Akiyama, E. Higashide, Y. Nakao, *Agric. Biol. Chem.* **1985**, *49*, 327–333.
- 153 S. Ōmura, K. Tsuzuki, A. Nakagawa, G. Lukacs, *J. Antibiot.* **1983**, *36*, 611–613.
- 154 A. Haber, R. D. Johnson, K. L. Rinehart, *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 3541–3544.
- 155 A. M. Hill, J. P. Harris, A. P. Siskos, *Chem. Commun.* **1998**, 2361–2362.
- 156 K. Wu, L. Chung, W. P. Revill, L. Katz, C. D. Reeves, *Gene* **2000**, *251*, 81–90.
- 157 W. Li, J. Ju, H. Osada, B. Shen, *J. Bacteriol.* **2006**, *188*, 4148–4152.
- 158 C. Zhao, J. Ju, S. D. Christenson, W. C. Smith, D. Song, X. Zhou, B. Shen, Z. Deng, *J. Bacteriol.* **2006**, *188*, 4142–4147.

- 159 G. Werner, H. Hagenmaier, K. Albert, H. Kohlshorn, H. Drautz, *Tetrahedron Lett.* **1983**, *24*, 5193–5196.
- 160 G. H. Baker, P. J. Brown, R. J. J. Dorgan, J. R. Everett, S. V. Ley, A. M. Z. Slawin, D. J. Williams, *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 5565–5568.
- 161 O. Hano, O. Schmidt, K. Welzel, T. Weber, S. Grond, U. Wehmeier, *unveröffentlichte Ergebnisse*.
- 162 W. Li, J. Ju, S. R. Rajski, H. Osada, B. Shen, *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 28607–28617.
- 163 Y. Kato, L. Bai, Q. Xue, W. P. Revill, T.-W. Yu, H. G. Floss, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 5268–5269.
- 164 S. C. Wenzel, R. M. Williamson, C. Grünanger, J. Xu, K. Gerth, R. A. Martinez, S. J. Moss, B. J. Carroll, S. Grond, C. J. Unkefer, R. Müller, H. G. Floss, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 14325–14336.
- 165 K. Watanabe, C. Khosla, R. M. Stroud, S.-C. Tsai, *J. Mol. Biol.* **2003**, *334*, 435–444.
- 166 H. B. Bode, *Dissertation*, Universität Göttingen, **2000**.
- 167 G. Michal (Hrsg.), *Biochemical Pathways*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, **1999**.
- 168 Auf Grundlage von: T. Schumann, *Experimentelle Arbeiten*, Universität Göttingen, **2005**.
- 169 R. Kuhn, G. Krüger, *Chem. Ber.* **1957**, *90*, 264–277.
- 170 E. Wenkert, S. R. Piettre, *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 5850–5853.
- 171 F. Feist, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1901**, *34*, 1992–1996.
- 172 E. Winterfeldt, *Chem. Ber.* **1965**, *98*, 1581–1587.
- 173 a) I. H. Cho, H.-J. Namgung, H.-K. Choi, Y.-S. Kim, *Food Chem.* **2008**, *106*, 71–76.
b) I. H. Cho, H.-K. Choi, Y.-S. Kim, *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 4820–4825.
- 174 K. T. Steffen, T. Cajthaml, J. Šnajdr, P. Baldrian, *Res. Microbiol.* **2007**, *158*, 447–455.
- 175 B. Sullivan, D. J. Faulkner, L. Webb, *Science* **1983**, *221*, 1175–1176.
- 176 J. E. Hochlowski, D. J. Faulkner, *Tetrahedron Lett.* **1981**, *22*, 271–274.
- 177 H.-G. Floss, U. Mothes, *Phytochemistry* **1966**, *5*, 161–169.
- 178 C. Gardana, F. Nalin, P. Simonetti, *Molecules* **2008**, *13*, 2220–2228.
- 179 A. Nagatsu, Y. Ogihara *et al.*, *Chem. Pharm. Bull.* **2002**, *50*, 675–677.
- 180 Y.-S. Li, Z.-J. Chen, D.-Y. Zhu, *Nat. Prod. Res.* **2005**, *19*, 165–170.
- 181 M.-J. Don, C.-C. Shen, W.-J. Syu, Y.-H. Ding, C.-M. Sun, *Phytochemistry* **2006**, *67*, 497–503.
- 182 H. Quiroz-Florentino, R. Aguilar, B. M. Santoyo, F. Díaz, J. Tamariz, *Synthesis* **2008**, *7*, 1023–1028.
- 183 R. H. White, *Biochemistry* **1988**, *27*, 4415–4420.
- 184 H. v. Pechmann, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1884**, *17*, 2396–2399.
- 185 I. A. Pearl, J. S. Barton, *J. Am. Chem. Soc.* **1952**, *74*, 1375.
- 186 D. L. Dare, I. D. Entwistle, R. A. W. Johnstone, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1973**, 1130–1134.
- 187 N. Burkard, *Diplomarbeit*, Universität Göttingen, **2009**.
- 188 E. Abele, E. Lukevics, *Chem. Heterocycl. Compd.* **2001**, *37*, 141–169.
- 189 M. Quitschau, *Dissertation*, Universität Göttingen, **2009**.

- 190 B. Bethe, *Dissertation*, Universität Göttingen, **1994**.
- 191 R. Kind, *Dissertation*, Universität Göttingen, **1991**.
- 192 H.-J. Schiewe, *Dissertation*, Universität Göttingen, **1997**.
- 193 S. Harada, D. T. Purtilo, Y. Koyanagi, J. Sonnabend, N. Yamamoto, *J. Immunol. Methods* **1986**, *92*, 177–181.
- 194 W. Lindenbein, *Arch. Mikrobiol.* **1952**, *17*, 361–383.
- 195 V. Prelog, W. Oppolzer, *Helv. Chim. Acta* **1973**, *56*, 2279–2287.
- 196 R. B. Woodward, *Angew. Chem.* **1957**, *69*, 50–58.
- 197 T. Dingermann, R. Hänsel, I. Zündorf, *Pharmazeutische Biologie: molekulare Grundlagen und klinische Anwendung*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, **2002**.
- 198 a) H. M. R. Hoffmann, J. Rabe, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1985**, *24*, 94–110.
b) H. M. R. Hoffmann, J. Rabe, *Angew. Chem.* **1985**, *97*, 96–112.
- 199 a) S. Horinouchi, *Front. Biosci.* **2002**, *7*, 2045–57.
b) S. Horinouchi, T. Beppu, *Mol. Microbiol.* **1994**, *12*, 859–864.
- 200 T. U. Mayer, T. M. Kapoor, S. J. Haggarty, R. W. King, S. L. Schreiber, T. J. Mitchison, *Science* **1999**, *286*, 971–974.
- 201 J.-N. Fricke, *Diplomarbeit*, Universität Göttingen, **2008**.
- 202 M. D. Mihovilovic, B. Müller, P. Stanetty, *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, 3711–3730.
- 203 N. M. Kamerbeek, J. J. Olsthoorn, M. W. Fraaije, D. B. Janssen, *Appl. Environm. Microbiol.* **2003**, *69*, 419–426.
- 204 G. E. Turfitt, *Biochem. J.* **1948**, *42*, 376.
- 205 a) N. M. Kamerbeek, M. W. Fraaije, D. B. Janssen, *Eur. J. Biochem.* **2004**, *271*, 2107–2116.
b) N. M. Kamerbeek, D. B. Janssen, W. J. H. van Berkel, M. W. Fraaije, *Adv. Synth. Catal.* **2003**, *345*, 667–678.
- 206 K. H. Jones, R. T. Smith, P. W. Trudgill, *J. Gen. Microbiol.* **1993**, *139*, 797–805.
- 207 a) C. Walsh, Y.-C. J. Cheng, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1988**, *27*, 333–343.
b) C. Walsh, Y.-C. J. Cheng, *Angew. Chem.* **1988**, *100*, 342–352.
- 208 N. A. Donoghue, D. B. Norris, P. W. Trudgill, *Eur. J. Biochem.* **1987**, *63*, 175–192.
- 209 J. Rohr, R. Thiericke, A. Zeeck, *Nat. Prod. Rep.* **1992**, *9*, 103–137.
- 210 U. Rix, L. L. Remsing, D. Hoffmeister, A. Bechthold, J. Rohr, *ChemBioChem* **2003**, *1*, 109–111.
- 211 U. Rix, C. Wang, Y. Chen, F. M. Lipata, L. L. Remsing Rix, L. M. Greenwell, L. C. Vining, K. Yang, J. Rohr, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 838–845.
- 212 L. Zhu, V. Fedorenko, J. Rohr *et al.*, *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 631–638.
- 213 D. L. Wheeler, E. Yaschenko *et al.*, *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36*, D13–21.
- 214 M. Biermann, R. Logan, K. O'Brien, E. T. Seno, R. Nagaraja-Rao, B. E. Schoner, *Gene* **1992**, *116*, 43–49.

- 215 G. Kleiger, D. Eisenberg, *J. Mol. Biol.* **2002**, *323*, 69–76.
- 216 M. W. Fraaije, N. W. Kamerbeek, W. J. H. van Berkel, D. B. Janssen, *FEBS Lett.* **2002**, *518*, 43–47.
- 217 a) M. A. Larkin, G. Blackshields, N. P. Brown, R. Chenna, P. A. McGettigan, H. McWilliam, F. Valentin, I. M. Wallace, A. Wilm, R. Lopez, J. D. Thompson, T. J. Gibson, D. G. Higgins, *Bioinformatics* **2007**, *23*, 2947–2948.
- b) <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/> (Stand: 09/2009).
- 218 a) Y. Nakamura, T. Gojobori, T. Ikemura, *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, 292.
- b) <http://www.kazusa.or.jp/codon/> (Stand: 09/2009).
- 219 a) T. M. Rose, J. G. Henikoff, S. Henikoff, *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 3763–3766.
- b) T. M. Rose, E. R. Schultz, J. G. Henikoff, S. Pietrokovski, C. M. McCallum, S. Henikoff, *Nucleic Acids Res.* **1998**, *26*, 1628–1635.
- 220 a) <http://eu.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer/default.aspx> (Stand: 09/2009).
- b) <http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html> (Stand: 09/2009).
- 221 Version: BLASTN 2.2.21+; Z. Zhang, S. Schwartz, L. Wagner, W. Miller, *J. Comput. Biol.* **2000**, *7*, 203–14.
- 222 P. Mazodier, R. Petter, C. Thompson, *J. Bacteriol.* **1989**, *171*, 3583–3585.
- 223 J. Sun, G. H. Kelemen, J. M. Fernández-Abalos, M. J. Bibb, *Microbiology* **1999**, *145*, 2221–2227.
- 224 D. Vollmar, A. Thorn, I. Schuberth, S. Grond, *J. Antibiot.* **2009**, *62*, 439–444.
- 225 T. Schuhmann, D. Vollmar, S. Grond, *J. Antibiot.* **2007**, *60*, 52–60.
- 226 Bruker AXS Inc., Madison/Wisconsin, USA.
- 227 E. Merck, *Anfärbereagenzien für die Dünnschicht- und Papierchromatographie*, Merck, Darmstadt, **1998**.
- 228 A. Ian Scott, C. A. Townsend, K. Okada, M. Kajiwara, R. J. Cushley, P. J. Whitman, *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, *96*, 8069–8080.
- 229 M. R. Grever, S. A. Schepartz, B. A. Chabner, *Semin. Oncol.* **1992**, *19*, 622–638.
- 230 D. M. Woodcock, P. J. Crowther, J. Doherty, S. Jefferson, E. DeCruz, M. Noyer-Weidner, S. S. Smith, M. Z. Michael, M. W. Graham, *Nucleic Acid Res.* **1989**, *17*, 3469–3478.
- 231 D. J. MacNeil, K. M. Gewain, C. L. Ruby, G. Dezeny, P. H. Gibbons, T. MacNeil, *Gene* **1992**, *111*, 61–68.
- 232 F. Flett, V. Mersinias, C. P. Smith, *FEMS Microbiol. Lett.* **1997**, *155*, 223–229.
- 233 T. Weber, K. Laiple, E. Pross, A. Textor, S. Grond, K. Welzel, S. Pelzer, A. Vente, W. Wohlleben, *Chem. Biol.* **2008**, *15*, 175–188.
- 234 *Fermentas DoubleDigest*: <http://www.fermentas.com/doubledigest/index.html> (Stand: 09/2009).
- 235 T. Weber (Universität Tübingen), persönliche Mitteilung.
- 236 *Qiagen PCR Cloning Kit Handbook*, Qiagen, Hilden, **2001**.
- 237 *Fermentas CloneJET PCR Cloning Kit Protocol*, Fermentas, St. Leon-Rot, **2008**.

Registered names, trademarks, etc. used in this document, even when not specifically marked as such, are not to be considered unprotected by law.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen namentlich genannten und ungenannten helfenden Händen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Für ihre Unterstützung danke ich allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Serviceabteilungen, der Firma BioViotica, des Sekretariats und der Verwaltung.

Mein ganz besonderer Dank gilt natürlich meiner Arbeitsgruppe für die immer so gute Zusammenarbeit und die vielen Diskussion über meine Fragen und Wünsche. Danke, für die vielen gemeinsamen Kaffeepausen und Feierabendbierchen.

Besonders sei auch meiner Betreuerin Stephanie Grond gedankt, die mich aufgrund ihres Engagements und ihrer Spontanität während meiner Forschungsarbeiten stets inspirierte und mir in so mancher Nachtschicht beistand.

Möge möglichst viel vom Esprit der Göttinger „Kuschelabteilung“ den Umzug der Arbeitsgruppe nach Tübingen überstanden haben und dort für die richtige Atmosphäre sorgen.

Abschließend danke ich natürlich meiner Familie, die mir mein Studium und die Promotion ermöglichte und mich – wo immer es geht – unterstützt.



Und natürlich auch ein großes Dankeschön an meinen Kater Skittles für die Hilfe bei den NMR-Spektren.

Lebenslauf

Am 10.09.1978 wurde ich als Kind von Ilona Gerda Brigitte Vollmar, geb. Bielitz, und Karl-Heinz Vollmar in Northeim (Han.) als deutscher Staatsbürger geboren.

Von 1985 bis 1989 besuchte ich die Johann-Wolf-Grundschule in Nörten-Hardenberg und wechselte 1989 auf die Novalis Schule (Orientierungsstufe), ebenfalls in Nörten-Hardenberg. Ab dem Jahr 1991 erfolgte meine Schulausbildung am Otto-Hahn-Gymnasium in Göttingen, welches ich im Juni 1998 mit der Allgemeinen Hochschulreife verließ.

Von September 1998 bis September 1999 leistete ich meinen Zivildienst in der Apotheke des Albert-Schweizer Krankenhauses in Northeim.

Zum Wintersemester 1999/2000 begann ich mein Studium an der Georg-August-Universität zu Göttingen im Studienfach „Chemie und Physik, Lehramt an Gymnasien“ und legte im Oktober 2001 die Zwischenprüfung im Fach Physik sowie im Juli 2002 die Zwischenprüfung im Fach Chemie ab. In der Zeit von Juli 2004 bis Januar 2005 fertigte ich im Arbeitskreis von Jun. Prof. Dr. R. Signorell (Institut für Physikalische Chemie/Universität Göttingen) meine Examensarbeit zur Thematik: „Infrarotspektroskopie an Aerosolen aus organischen Säuren“ an. Das Zeugnis über die erste Staatsprüfung für das Lehramt an Gymnasien wurde mir im Juni 2005 verliehen.

Seit Januar 2006 arbeite ich unter der Anleitung von Prof. Dr. S. Grond und Prof. Dr. A. Zeeck an der vorliegenden Dissertation.

Göttingen, 16.09.2009