

**Nachweis von Biosyntheseegenen des bakteriellen
Sekundärstoffwechsels
sowie
Isolierung und Strukturaufklärung von Naturstoffen aus
ausgewählten Actinomyceten**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität
zu Kiel

vorgelegt von
Dipl.-Biol. Imke Schneemann

Kiel 2011

Referent/in: Prof. Dr. Johannes F. Imhoff
Korreferent/in: Prof. Dr. Peter Schönheit
Tag der mündlichen Prüfung: 08. April 2011
Zum Druck genehmigt: Kiel, 08. April 2011

Der Dekan

Für Christa und Bernd

Die vorliegende Arbeit wurde am Kieler Wirkstoff-Zentrum am Leibniz-Institut für Meereswissenschaften an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel von April 2007 bis Juli 2010 unter Anleitung von Prof. Dr. Johannes F. Imhoff durchgeführt.

VERÖFFENTLICHUNGEN

Teilergebnisse dieser Arbeit wurden als Manuskripte, Patent bzw. Tagungsbeitrag vorab veröffentlicht:

Schneemann,I.; Nagel,K.; Kajahn,I.; Labes,A.; Wiese,J.; Imhoff,J.F. 2010. Comprehensive investigation of marine *Actinobacteria* associated with the sponge *Halichondria panicea*. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**, 3702–3714.

Schneemann,I.; Kajahn,I.; Ohlendorf,B.; Zinecker,H.; Erhard,A.; Nagel,K.; Wiese,J.; Imhoff,J.F. 2010. Mayamycin, a Cytotoxic Polyketide from a *Streptomyces* Strain Isolated from the Marine Sponge *Halichondria panicea*. *J. Nat. Prod.* **73**, 1309–1312.

Schneemann,I.; Ohlendorf,B; Zinecker,H.; Nagel,K.; Wiese,J.; Imhoff,J.F. 2010. Nocapyrones A - D, γ -Pyrones from a *Nocardiopsis* Strain Isolated from the Marine Sponge *Halichondria panicea*. *J. Nat. Prod.* **73**, 1444-1447.

Schneemann,I.; Wiese,J.; Kunz,A.L.; Imhoff,J.F. 2011. Genetic Approach for the Fast Discovery of Phenazine Producing Bacteria. *Mar. Drugs*. Submitted

Schneemann,I.; Kajahn,I.; Zinecker,H.; Nagel,K.; Wiese,J.; Imhoff,J.F. 2010. Herstellung und Verwendung antibakterieller, antiproliferativer und antiphytopathogener Benzanthrone. Anmeldung am 28. Januar 2010 (DE 10 2010 006 245.6). Offenlegung folgt. PVA-Nummer: pva 9077.

Schneemann,I.; Nagel,K.; Mitova,M.I.; Wiese,J.; Imhoff,J.F.; 2008. Molecular analysis and subsequent variation of culture conditions to discover new compounds from marine bacteria. Summer School "Microbial Secondary Metabolites: Genomes, Signals and Communities", Dubrovnik, Croatia, 24.08.-01.09.2008.

INHALTSVERZEICHNIS

1	Zusammenfassung	1
2	Abstract	3
3	Einleitung	4
4	Actinomyceten assoziiert mit dem Schwamm <i>Halichondria panicea</i>	9
4.1	Schwämme und ihre assoziierten Mikroorganismen – <i>Halichondria panicea</i> , ein Beispiel aus der Ostsee	9
4.2	Molekularbiologische und chemische Untersuchung der Sekundärstoffproduktion in mit dem Schwamm <i>H. panicea</i> assoziierten Actinomyceten	12
4.2.1	Einleitung	12
4.2.2	Material und Methoden	18
4.2.2.1	Schwammmaterial	18
4.2.2.2	Isolierung und Identifizierung antimikrobiell aktiver <i>Actinomycetales</i> Stämme	19
4.2.2.3	Amplifizierung von NRPS und Type II PKS Genfragmenten	20
4.2.2.4	Kultivierung der Flüssigkulturen	21
4.2.2.5	Extraktion der Flüssigkulturen und der Platten	21
4.2.2.6	Extraktion der Schwammprobe <i>H. panicea</i>	21
4.2.2.7	Chemische Analyse der bakteriellen Kulturextrakte und des Gesamtextraktes von <i>H. panicea</i> sowie Isolierung ausgewählter Reinsubstanzen	21
4.2.2.8	Antimikrobielle Aktivität der Kulturextrakte und einzelner Reinsubstanzen	23
4.2.2.9	Accession-Nummern der hinterlegten Nukleotidsequenzen	24
4.2.3	Ergebnisse	25
4.2.3.1	Isolierung und Identifizierung von <i>Actinomycetales</i> Stämmen aus <i>H. panicea</i>	25
4.2.3.2	Bestimmung der NRPS- und Typ II PKS-Genfragmente	25
4.2.3.3	Chemische Analyse der bakteriellen Kulturextrakte	30
4.2.3.4	Chemische Analyse des Schwammextraktes	39
4.2.3.5	Antimikrobielle Aktivität der Kulturextrakte und ausgewählter Reinsubstanzen	40
4.2.3.6	Suche nach biologischen Aktivitäten der identifizierten Substanzen in der Literatur	40
4.2.3.7	Vergleich der Aktivitäten der Extrakte mit den aus der Literatur bekannten Aktivitäten der identifizierten Substanzen	41
4.2.4	Diskussion	44
4.2.4.1	Wechselbeziehung zwischen dem Vorhandensein von Biosynthesegenfragmenten und dem jeweiligen Sekundärmetabolitprofil	44
4.2.4.2	Ökologische Rolle der Naturstoffe: Nützliche Effekte	45
4.2.4.3	Ökologische Rolle der Naturstoffe: Schädliche Effekte	47
4.2.4.4	Biologische Quelle der Naturstoffe	47

4.2.5	Zusammenfassung	49
4.3	Stimulationsversuche mit drei ausgewählten Actinomyceten	50
4.3.1	Einleitung	50
4.3.2	Material und Methoden	52
4.3.2.1	Stämme	52
4.3.2.2	Kultivierungs- und Stimulationsversuche	52
4.3.2.3	Extraktion der Flüssigkulturen und der Platten	53
4.3.2.4	Chemische Analyse der bakteriellen Kulturextrakte	53
4.3.3	Ergebnisse	54
4.3.3.1	<i>Streptomyces</i> sp. HB202	54
4.3.3.2	<i>Micromonospora</i> sp. HB254	56
4.3.3.3	<i>Nocardiopsis</i> sp. HB383	57
4.3.4	Diskussion	61
4.3.5	Zusammenfassung	66
4.4	Charakterisierung neuer Naturstoffe	67
4.4.1	Mayamycin (1), ein aromatisches Polyketid aus <i>Streptomyces</i> sp. HB202	67
4.4.1.1	Einleitung	67
4.4.1.2	Material und Methoden	68
4.4.1.2.1	Kultivierung und Extraktion der <i>Streptomyces</i> sp. HB202 Kultur	68
4.4.1.2.2	Aufreinigung des Mayamycins (1)	68
4.4.1.2.3	Chemische Analytik	69
4.4.1.2.4	Ermittlung der antimikrobiellen Aktivitäten des Mayamycins (1)	69
4.4.1.2.5	Ermittlung der zytotoxischen Aktivitäten des Mayamycins (1)	70
4.4.1.3	Ergebnisse	72
4.4.1.4	Diskussion	77
4.4.1.5	Zusammenfassung	80
4.4.2	<i>Micromonospora</i> sp. HB254	81
4.4.2.1	Einleitung	81
4.4.2.2	Material und Methoden	82
4.4.2.2.1	Kultivierung und Extraktion der <i>Micromonospora</i> sp. HB254 Kultur	82
4.4.2.2.2	Aufreinigung des Hauptpeaks aus der Kultur des <i>Micromonospora</i> sp. HB254	82
4.4.2.2.3	Chemische Analytik	82
4.4.2.3	Ergebnisse	83
4.4.2.4	Diskussion	84
4.4.3	Nocapyrone A - D, γ -Pyrone aus <i>Nocardiopsis</i> sp. HB383	85
4.4.3.1	Einleitung	85
4.4.3.2	Material und Methoden	86

4.4.3.2.1	Kultivierung und Extraktion der <i>Nocardioopsis</i> sp. HB383 Kultur	86
4.4.3.2.2	Aufreinigung der Nocapyrone A - D (2-5) und des (2 <i>E</i> /5 <i>Z</i>)-2-[(4-Methoxyphenyl)methylen]-5-(2-methylpropyliden)-3,6-piperazindion (6)	86
4.4.3.2.3	Chemische Analytik	87
4.4.3.2.4	Biosynthesestudien	87
4.4.3.2.5	Ermittlung der antimikrobiellen Aktivitäten der Nocapyrone A (2) und B (3) sowie von 6	87
4.4.3.2.6	Ermittlung der zytotoxischen Aktivitäten der Nocapyrone A (2) und B (3) sowie von 6	87
4.4.3.2.7	Ermittlung der enzyminhibitorischen Aktivität der Nocapyrone A (2) und B (3) sowie von 6	88
4.4.3.3	Ergebnisse	89
4.4.3.4	Diskussion	97
4.4.3.5	Zusammenfassung	99
5	Entwicklung eines Primersystems zur Identifizierung der Phenazinbiosynthese	100
5.1	Einleitung	100
5.2	Material und Methoden	104
5.2.1	Bakterielle Stämme und ihre phylogenetische Einordnung	104
5.2.2	Design der Oligonukleotide für den Nachweis von <i>phzE</i> Genfragmenten	104
5.2.3	Amplifikation und Identifikation der <i>phzE</i> Genfragmente	105
5.2.4	Kultivierung der <i>phzE</i> PCR-positiven Stämme	106
5.2.5	Extraktion der Kulturen der <i>phzE</i> PCR-positiven Stämme	106
5.2.6	Chemische Analyse	106
5.2.7	Accession Nummer der hinterlegten Nukleotidsequenzen	106
5.3	Ergebnisse	107
5.3.1	Bakterielle Stämme und ihre phylogenetische Einordnung	107
5.3.2	Design der Oligonukleotide für den Nachweis von <i>phzE</i> Genfragmenten	107
5.3.3	Suche nach <i>phzE</i> Genfragmenten in ausgewählten Bakterien der Stammsammlung des KiWiZ	107
5.3.4	Chemische Analyse der <i>phzE</i> positiven Stämme	110
5.4	Diskussion	115
5.5	Zusammenfassung	118
6	Genetische und chemische Untersuchung der Sekundärstoffproduktion in <i>Nocardia jejuensis</i> DSM 44959 ^T	119
6.1	Einleitung	119
6.2	Material und Methoden	122
6.2.1	Amplifizierung von Biosynthesegenfragmenten aus <i>Nocardia jejuensis</i> DSM 44959 ^T	122
6.2.2	Klonierungsexperiment mit den NRPS-PCR-Produkten	122

6.2.3	Kultivierung des <i>Nocardia jejuensis</i> DSM 44959 ^T	123
6.2.4	Extraktion der <i>Nocardia jejuensis</i> Kultur und Aufreinigung der Brasilibactine A - D (7-10)	123
6.2.5	Chemische Analytik	123
6.2.6	Ermittlung der antimikrobiellen Aktivität der Brasilibactine A - D (7-10)	124
6.2.7	Ermittlung der zytotoxischen Aktivität der Brasilibactine A - D (7-10)	124
6.2.8	Ermittlung der enzyminhibitorischen Aktivität der Brasilibactine A - D (7-10)	124
6.3	Ergebnisse	125
6.4	Diskussion	134
6.5	Zusammenfassung	136
7	Allgemeine Diskussion	137
8	Experimenteller Teil	142
8.1	Nährmedien und Puffer	142
8.2	Molekularbiologische Methoden	144
8.3	Chemische Methoden und instrumentelle Analytik	146
8.4	Chemikalien und Kits	148
8.5	Geräte	149
9	Literaturverzeichnis	150
10	Abkürzungsverzeichnis	173
11	Danksagung	177
12	Erklärung	178
13	Anhang	179
A	NMR-Spektren	179
B	IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) Ambiguity Code	198

1 Zusammenfassung

Bakterien und insbesondere *Actinobacteria* gehören zu den wichtigsten Produzenten von strukturell sehr unterschiedlichen und biologisch aktiven Naturstoffen, welche für die pharmazeutische Anwendung von Relevanz sind. Viele dieser Sekundärmetabolite werden von Bakterien produziert, welche in Assoziation mit einem höheren Organismus leben. Dazu zählen unter anderem manche marine Schwämme, welche häufig eine reichhaltige mikrobielle Gemeinschaft beherbergen.

Ziel dieser Arbeit war es, Actinomyceten (im Weiteren als Synonym für die Ordnung *Actinomycetales* oder die Klasse *Actinobacteria* benutzt), isoliert aus dem Schwamm *Halichondria panicea*, sowie ein paar weitere marine und terrestrische Actinomyceten bezüglich ihrer Fähigkeit zur Produktion von Sekundärmetaboliten zu untersuchen, um deren Potential für die Synthese von neuen Naturstoffen näher zu charakterisieren.

Für den ersten Teil der Arbeit wurde zunächst eine phylogenetische Einordnung der von *H. panicea* isolierten Actinomyceten vorgenommen. Die Stämme konnten den Gattungen *Actinoalloteichus*, *Micrococcus*, *Micromonospora*, *Nocardiopsis* und *Streptomyces* zugeordnet werden. Anschließend wurden das Sekundärmetabolitprofil, das Vorhandensein von NRPS- und Typ II PKS-Genfragmenten sowie die Bioaktivität der Rohextrakte aller Stämme untersucht. Es zeigte sich, dass die Schwamm-assoziierten Actinomyceten, und gerade jene mit einem NRPS- oder PKS-Genfragment, ergiebige Produzenten von biologisch aktiven Naturstoffen waren.

Im Anschluss daran wurden drei der untersuchten Stämme einer Reihe von Kultivierungs- bzw. Stimulierungsexperimenten unterzogen, um so ihr chemisches Profil noch näher zu untersuchen. Zwei dieser Actinomyceten, *Streptomyces* sp. HB202 und *Nocardiopsis* sp. HB383, waren durch Variation der Kultivierungsbedingungen besonders beeinflussbar und besaßen ein enorm großes Potential zur Synthese von Substanzen. Mittels HPLC-UV/MS und NMR-Spektroskopie wurde das aromatische Polyketid Mayamycin aus *Streptomyces* sp. HB202 sowie die γ -Pyrone Nocapyron A - D aus *Nocardiopsis* sp. HB383 isoliert und aufgeklärt. Die biologische Aktivität dieser Substanzen wurde ermittelt und die Biosynthese des Nocapyron A mithilfe von Fütterungsexperimenten untersucht.

Ferner wurden die bereits erprobten molekularbiologischen Untersuchungsmethoden auf das Vorhandensein von NRPS- und Typ II PKS-Genfragmenten durch ein zusätzliches Primersystem zur Amplifizierung von Phenazingenfragmenten erweitert werden. Die Relevanz dieser genetischen Informationen wurde durch Kultivierung und chemische Analyse von ausgewählten, phylogenetisch diversen Stämmen überprüft. Dabei stellte sich heraus, dass das etablierte molekularbiologische System besonders gut bei marinen Actinomyceten funktionierte.

Außerdem wurde das gesamte Spektrum der in dieser Arbeit erprobten Methoden bei der Untersuchung von *Nocardia jejuensis* DSM 44959^T angewendet. Durch ein zusätzliches Klonierungsexperiment konnten NRPS sowie Typ II PKS-Genfragmente identifiziert werden. In

anschließenden Kultivierungsversuchen wurden neben bekannten Substanzen zwei neue Mycobactine, Brasilibactin C und D, produziert. Die Analyse der biologischen Aktivität zeigte, dass Brasilibactin C antibakteriell sowie zytotoxisch aktiv war.

2 ABSTRACT

Bacteria, especially *Actinobacteria*, are one of the most important producers of structurally diverse and biologically active natural products, which are of great significance for pharmaceutical applications. Many secondary metabolites are synthesized by bacteria living in association with a macroorganism. Among others, marine sponges shelter a rich community of microorganisms.

Actinomycetes (in the following used as synonym for the order *Actinomycetales* or the class *Actinobacteria*) isolated from the marine sponge *Halichondria panicea* as well as other marine and terrestrial Actinomycetes were investigated according to their ability to produce well-established and unknown secondary metabolites to characterize bacterial capability of producing natural products.

A phylogenetic classification of Actinomycetes isolated from *H. panicea* was completed within the first part of this thesis. Strains were assigned to the genera *Actinoalloteichus*, *Micrococcus*, *Micromonospora*, *Nocardiopsis* and *Streptomyces*. Subsequently, the secondary metabolite pattern, the presence of NRPS and type II PKS gene fragments as well as the biological activity of raw extracts of all strains were investigated. In conclusion, sponge associated Actinomycetes and particularly those with an NRPS or PKS gene fragment, were effective producers of biologically active natural products.

Subsequently, with three of the investigated strains, cultivation and stimulation experiments were carried out to provide detailed chemical profiles. Two of these, *Streptomyces* sp. HB202 and *Nocardiopsis* sp. HB383, were notably affected by different culture conditions and showed an enormous potential to produce known as well as novel substances. Using HPLC-UV/MS and NMR-spectroscopy, mayamycin, an aromatic polyketide, of *Streptomyces* sp. HB202, and four new γ -pyrones, of *Nocardiopsis* sp. HB383, nocapyrones A-D, were isolated and structurally characterized. Their biological activity was determined and the biosynthesis of nocapyrone A was investigated by feeding experiments.

In the second part of this thesis, the genetic analysis regarding the presence of NRPS and type II PKS gene fragments was extended by an additional primer system amplifying a phenazine gene fragment. The relevance of the genetic information was validated by cultivation experiments and chemical analysis of selected, phylogenetically diverse, strains. As a result, marine Actinomycetes seem to be ideal for investigations using the designed molecular biological system

The wide range of proven methods was applied by investigating *Nocardia jejuensis* DSM 44959^T. Using further cloning experiments, NRPS and type II PKS gene fragments were identified. Subsequent cultivation approaches reveal among known metabolites two novel mycobactines, brasilibactin C and D. After the structural characterization of the investigated products, biological activities of the metabolites were tested.

3 EINLEITUNG

1942 wurde zum ersten Mal ein Mensch durch Verabreichung des Antibiotikums Penicillin von einer bakteriellen Infektion geheilt. Infektionskrankheiten galten fortan als besiegt. Leider hielt diese Siegesgewissheit nur etwas mehr als ein halbes Jahrhundert an. 66 Jahre nach dem großen Triumph verstarb der erste Mensch an einer Infektion mit Vancomycin-resistenten *Enterococce* ^[Arias & Murray 2009] und hinterließ die Mediziner erneut so hilflos wie im pre-antibiotischen Zeitalter. Schon Alexander Fleming wies bereits 1945 bei der Entgegennahme seines Nobelpreises auf dieses Problem hin: „*The time may come when antibiotics can be bought by anyone in the shops. Then there is the danger that the ignorant man may easily underdose himself, and by exposing his microbes to non-lethal quantities of the drug, make them resistant*“ ^[Fleming 2009].

Bedauerlicherweise gibt es bis heute keine Wunderwaffe gegen multiresistente Erreger, denn Bakterien sind wahre Meister der Evolution und häufiger, unsachgemäßer Gebrauch von Antibiotika verstärkt diese Entwicklung hin zur Multiresistenz zusätzlich. Einige von ihnen haben sich bereits so gut angepasst, dass sie zu einer klinischen Herausforderung geworden sind. Als große Bedrohung gelten vor allem der Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) und der Vancomycin-resistente *Enterococcus faecium* (VRE) ^[Kayser et al. 2010].

Um bei dem evolutionären Wettkampf gegen infektiöse Mikroorganismen auf Augenhöhe bleiben zu können, werden heutzutage dringend strukturell neuartige Antibiotika benötigt, welche dann wiederum auch auf neue Wirkorte abzielen können ^[Walsh 2003]. Hierbei ist es vor allem notwendig, kontinuierlich nach passenden Wirkstoffen zu suchen ^[Clardy et al. 2006]. Leider ist es nur eine Frage der Zeit bis gegen neue Antibiotika ebenfalls die ersten Resistenzen auftreten.

Speziell Naturstoffe stellen bei der Suche nach neuen Leitstrukturen eine besonders potente Substanzgruppe dar, der eine Vielzahl heute gebräuchlicher antibiotischer Wirkstoffe entspringt. 75 % aller antibakteriell wirksamen Substanzen sind Naturstoffe oder von ihnen abgeleitete Derivate ^[Newman et al. 2003]. Ähnlich hohe Anteile haben Naturstoffe auch hinsichtlich anderer Indikationen, wie zum Beispiel bei der Krebstherapie. Naturstoffe sind strukturell vielversprechender als synthetische Substanzen, da sie erfolgreich aus der Evolution hervorgegangen sind und somit anzunehmen ist, dass jeder Metabolit eine Funktion bzw. eine verwandte Zielstruktur in der Natur besitzt. Durch ihre bereits erfolgte Anpassung erreichen Naturstoffe ihren Wirkort häufig besser. Dieses führt dazu, dass Naturstoffe sich öfter durch biologische Aktivität auszeichnen als Synthetika.

Allerdings birgt die Naturstoffforschung auch einige Schwierigkeiten. Die Isolierung und Charakterisierung von Naturstoffen ist ein aufwendiger Prozess. Zusätzlich verlangt der Umgang mit der biologischen Quelle Erfahrung und eine spezielle Ausrüstung. Außerdem ist es in vielen Fällen schwierig oder sehr kostenintensiv, einen ausreichenden Nachschub an Substanzen – entweder durch Isolierung aus der natürlichen Quelle oder durch Totalsynthese – sicherzustellen.

Damit ist es ein teures und langwieriges Unterfangen, neue Naturstoffe zur pharmazeutischen Anwendung zu bringen ^[Thomson et al. 2004]. Ohne die Garantie, den Markt ausreichend beliefern zu können, gibt es für den besten Wirkstoff keine Zulassung als Medikament. Dieses alles führt dazu, dass die Pharmaindustrie bei der Wirkstoffentwicklung lange auf synthetische Substanzen aus dem Feld der kombinatorischen Chemie gesetzt hat ^[Clarke 2003].

Es gibt allerdings Naturstoffproduzenten, die einige der oben genannten Probleme nicht teilen. So lassen sich z. B. Bakterien und Pilze gut in großen Mengen und unter definierten Laborbedingungen kultivieren und eignen sich dadurch besonders für die Wirkstoffproduktion. Darüber hinaus werden häufig durch Variation der Kulturbedingungen nach dem sogenannten OSMAC- (one strain many compounds) ^[Bode et al. 2002] Prinzip weitere biologisch interessante Derivate entdeckt. Zusätzlich kann durch Anwendung molekularbiologischer Methoden und durch biologische Regulation die Substanzproduktion optimiert werden ^[Bode & Müller 2005]. Eine komplette Genomsequenzierung ist mittlerweile recht günstig und liefert weitere Informationen für die Wirkstoffsuche. Die Gene für die Sekundärmetabolit-Produktion sind überwiegend in Genclustern angeordnet oder stehen unter zentraler regulatorischer Kontrolle ^[Bode & Müller 2005]. Bakterien haben dabei den Vorteil, dass sie keine Introns besitzen, welche bei der Durchführung von Expressionsversuchen stören würden. Auch die Expression in anderen Wirten wird durch die kompakte Anordnung der Gencluster erleichtert. Aus den genannten Gründen lebt die Suche nach Wirkstoffen aus der Natur - vor allem aus Mikroorganismen - langsam wieder auf ^[Clardy et al. 2006]. Dennoch tritt immer häufiger das Problem der „Doppelisolierung“ auf, besonders bei terrestrischen mikrobiellen Naturstoffproduzenten. Trotzdem stehen mittlerweile wieder altbekannte und bewährte Quellen, wie die Actinomyceten, im Fokus, da sie immer noch genügend Potenzial für strukturelle Neuentdeckungen bieten. Häufig werden dafür allerdings Actinomyceten aus besonderen Habitaten oder Stämme besonderer phylogenetischer Herkunft untersucht ^[Clardy et al. 2006].

Von den etwa 1 Million bis heute entdeckten Sekundärmetaboliten stammt der größte Teil aus Pflanzen. Nur 5 % dieser Naturstoffe sind mikrobiellen Ursprungs. Allerdings produzieren Mikroorganismen die Hälfte, etwa 22.500, aller Naturstoffe, für die eine biologische Aktivität nachgewiesen wurde. Die Gruppe der *Actinomycetales* hat hierbei mit 45 % den größten Anteil unter den bakteriellen Vertretern ^[Bérdy 2005]. Wiederum trägt die Gattung *Streptomyces* innerhalb dieser Ordnung den größten Teil zur Naturstoffproduktion bei ^[Watve et al. 2001]. Es gibt Schätzungen, nach denen Streptomyceten das Potential haben, insgesamt bis zu 100.000 antimikrobielle Substanzen zu produzieren ^[Watve et al. 2001].

Die ersten Naturstoffe aus der Ordnung der *Actinomycetales* wurden in den 1940er Jahren in dem Labor von Selman Abraham Waksman entdeckt. 1940 entdeckte er das Actinomycin A, dessen Derivat Actinomycin D heute als Chemotherapeutikum eingesetzt wird ^[Wu & Yung 1994]. 1944 folgte das Antibiotikum Streptomycin ^[Jones et al. 1944], 1949 das Breitbandantibiotikum Neomycin ^[Waksman & Lechevalier 1949] und schließlich 1953 das antifungische Candicidin ^[Waksman et al. 1965]. Hieraus lässt sich bereits das enorme Potential dieser Gruppe erahnen.

Die Ordnung der *Actinomycetales* gehört zur Klasse der *Actinobacteria*. Ihre Vertreter sind Gram-positive, sporenbildende Bakterien mit einem hohen GC-Gehalt und bilden häufig ein Mycel aus Filamenten ^[Lechevalier & Lechevalier 1967; Goodfellow & Williams 1983]. Die *Actinomycetales* kommen beinahe überall vor. Sie wurden in den Polarregionen, in Wüsten, in Rohöl, in Schwermetallverseuchten Böden, in verschiedensten Sedimenten sowie im Süß- und im Salzwasser nachgewiesen ^[Goodfellow & Williams 1983; Jensen et al. 1991]. Sie sind normalerweise nicht extremophil, zeigen jedoch breite Toleranzen gegenüber alkalischen Bedingungen und hohen Salzgehalten. Sie sind meistens Saprophyten, können aber auch parasitär oder symbiotisch mit Tieren und Pflanzen zusammenleben.

In terrestrischen Habitaten sind sie prädominant ^[Goodfellow & Williams 1983]. Ihre Verteilung, Diversität und ihre ökologische Rolle im Ozean sind jedoch bis heute wenig erforscht. Dass Vertreter der *Actinomycetales* in marinen Habitaten vorkommen ^[Weyland 1969] ist allerdings seit Langem bekannt. Sie besiedeln dabei die gesamte Wassersäule und verschiedene Sedimente in küstennahen Gebieten sowie die Tiefen der Ozeane. Außerdem kommen diese Bakterien unter anderem in Vergesellschaftung mit unterschiedlichen marinen Makroorganismen vor ^[Fenical & Jensen 2006; Pathom-Aree et al. 2006]. Es ist bis heute nicht geklärt, inwieweit Bakterien durch Einwaschung vom Festland zu marinen Vertretern wurden oder ob terrestrische Vertreter lediglich zuerst untersucht wurden und die urtümlichsten Actinomyceten marinen Ursprungs waren, denn es werden immer wieder typische „terrestrische“ Actinomyceten aus marinen Proben isoliert ^[Fenical & Jensen 2006]. Immerhin ist heutzutage klar, dass es obligat marine Gruppen gibt ^[Helmke & Weyland 1984; Han et al. 2003; Yi et al. 2004], darunter die Gattung *Salinospora*, welche die spezielle Salzzusammensetzung des Meerwassers für ihr Wachstum benötigt ^[Maldonado et al. 2005].

Das Hauptaugenmerk bei der Erforschung mariner Actinomyceten liegt auf der Suche nach unbekanntem Naturstoffen. Da zwei Drittel der Erdoberfläche vom Meer bedeckt sind, die Ozeane die größte Biodiversität beherbergen und schätzungsweise weniger als 1 % der 20 Millionen marinen Mikroorganismen bis heute bekannt sind ^[Fenical & Jensen 2006; Qiu 2010], ist davon auszugehen, dass ein enormes pharmazeutisches Potential in den Meeren schlummert. Schon heute zeigen marine Naturstoffe aus Actinomyceten ein großes Spektrum biologischer Aktivitäten, wie antivirale, antitumorale, antiparasitische, anti-HIV, antibakterielle, antifungische und entzündungshemmende Aktivität sowie Aktivität gegen Algen und Beeinflussung der Zelldifferenzierung ^[Renner et al. 1999; Lam 2006]. Darüber hinaus sind sie auch strukturell sehr divers. Beispielsweise wurden aus marinen Actinomyceten bereits Substanzen aus der Gruppe der Polyketide, der Peptide, der Alkaloide, der Terpene sowie der Phenazine isoliert ^[Fiedler et al. 2005; Mitova et al. 2008].

Um neue, biologisch aktive Substanzen aus marinen Actinomyceten isolieren zu können, gibt es eine Reihe von verschiedenen, miteinander kombinierbaren Strategien. Dazu gehören:

- das High-Throughput-Screening von großen Stammsammlungen nach ungewöhnlichen chemischen Strukturen, welche sich stark von den gängigen Wirkstoffen unterscheiden

- die Suche nach interessanten biologischen Aktivitäten in Rohextrakten
- die Anzucht von seltenen oder sehr langsam wachsenden Stämmen
- neue Anreicherungsmethoden bei der Suche nach außergewöhnlichen Isolaten
- die kombinatorische Biosynthese
- die Genomanalyse, um sogenannte stille Gencluster zu identifizieren und anschließend heterolog zu exprimieren
- die Suche nach vielversprechenden Genclustern in Metagenomen, um diese ebenfalls in einem passenden Wirt zur Expression zu bringen
- die Variation der Kulturbedingungen bei der Anzucht der Stämme sowie Stimulation durch verschiedene Einflüsse, um dadurch das sekundärmetabolische Profil zu erweitern

Obwohl marine Actinomyceten mittlerweile ein viel untersuchtes Forschungsfeld darstellen, sind weiterhin etliche Fragen offen und ihre Rolle im ökologischen Kontext noch recht unklar. Daher sollten in der vorliegenden Arbeit vor allem Vertreter der *Actinomycetales* und im Besonderen marine Stämme auf ihr genetisches Potential zur Bildung von Sekundärmetaboliten hin untersucht sowie anschließend Kultivierungsversuche zur Analyse des chemischen Profils durchgeführt werden. In Abbildung 1 ist das immer wieder verwendete Schema zur Übersicht aufgeführt. Die allgemeine Struktur der Arbeit schlägt sich in drei großen Kapiteln nieder, welche sich jeweils nach einer Einleitung in einen Material und Methoden-, einen Ergebnis- sowie einen Diskussionsteil gliedern.

Zur Untersuchung wurden bekannte molekularbiologische Systeme verwendet sowie ein neues System zur Identifizierung des Phenazinbiosyntheseweges entwickelt. Mit dem marinen Schwamm *Halichondria panicea* assoziierte Actinomyceten wurden mit diesen genetischen Systemen untersucht und zusätzlich in Bezug auf ihr Sekundärmetabolitprofil charakterisiert, um so erste Einblicke in deren ökologische Bedeutung zu gewinnen.

Ausgewählte Stämme wurden im Weiteren auf die Variabilität ihres chemischen Profils hin untersucht, um auf diese Weise eine Idee ihrer biosynthetischen Kapazität zu erhalten. Neue Substanzen wurden mit geeigneten Methoden aufgeklärt und ihre biologische Aktivität wurde untersucht. Nach Etablierung der Genetik, der Kultivierung und der Chemie sollte zusätzlich ein weiterer Actinomycet auf das Vorkommen von neuen Substanzen hin analysiert werden.

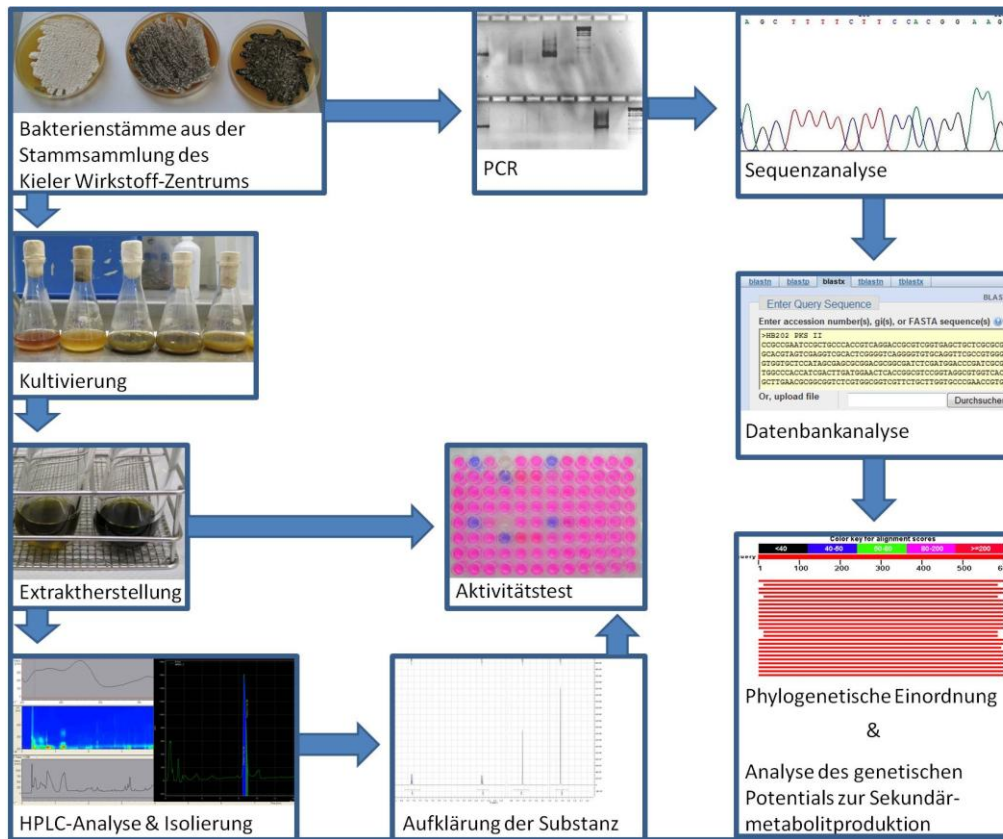


Abb. 1.: Schematische Darstellung des Arbeitsablaufes zur Untersuchung der ausgewählten Stämme.

4 ACTINOMYCETEN ASSOZIIERT MIT DEM SCHWAMM

HALICHONDRIA PANICEA

4.1 SCHWÄMME UND IHRE ASSOZIIERTEN MIKROORGANISMEN – *HALICHONDRIA PANICEA*, EIN BEISPIEL AUS DER OSTSEE

Schwämme gehören im Reich der Tiere zu den Metazoa, den vielzelligen Tieren. Sie werden zu der Gruppe der niederen Metazoa (auch als Hohltiere oder Coelenterata bezeichnet) gezählt, welche im Gegensatz zu den Bilateria nur zwei Keimblätter aufweist [Storch & Welsch 2009]. Schwämme besitzen keine echten Organe oder echtes Gewebe. Im evolutionären Sinne sind sie einer der ursprünglichsten Tierstämme. Schon vor 635 bis 750 Millionen Jahren im Precambrium lebten erste urtümliche Arten [Love et al. 2009]. Der Großteil der über 10.000 rezenten Arten kommt in marinen Lebensräumen vor [Erpenbeck & van Soest 2007]. Zu finden sind Schwämme häufig in tropischen Gebieten, aber auch in gemäßigten und polaren Regionen sowie in Seen oder Flüssen [Berquist 1978]. Sie weisen eine sessile Lebensweise auf und können jeden Tag das 20.000fache ihres eigenen Körpervolumens an Wasser filtrieren. Dazu dient das charakteristische komplexe Kanalsystem (Abb. 2), welches sich von der Außenfläche mit zahlreichen kleinen Poren (Ostien) bis in den inneren Hohlraum erstreckt. Dieser ist wiederum mit sogenannten Choanocyten (Kragengeißelzellen) ausgekleidet und führt schließlich durch das Osculum (Ausströmöffnung) nach außen. Das Kanalsystem dient der Nahrungsaufnahme in Form von Mikroorganismen und organischen Makromolekülen, der Exkretion und als Geschlechtsweg [Storch & Welsch 2009].

Schwämme weisen drei verschiedene Baupläne auf, den Ascon-, den Sycon- und den Leucon-Typ, wobei der letzte Typ (Abb. 2) der häufigste ist. Auch der Brotkrumenschwamm *Halichondria panicea* gehört mit der Klasse der Hornschwämme (Demospongiae) zur letzten Gruppe.

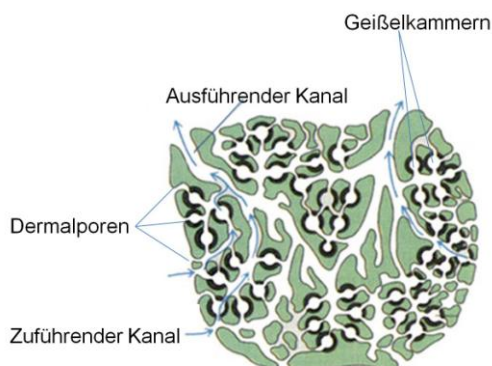


Abb. 2: Bauplan eines Schwammes des Leucon-Typs. Pinakoderm: dünne, schwarze Linien; Mesogloea: grünlich; Choanocytenverband: dicke, schwarze Linien. Die blauen Pfeile geben die Richtung des Wasserstroms an. Modifiziert nach [Storch & Welsch 2009].

Mit 95 % stellt die Klasse der Demospongiae den größten Teil aller lebenden Schwammarten dar [Hentschel & Bringmann 2010] und zeichnet sich durch kieselige, intrazellulär gebildete, tetraxone oder monaxone Megaskleren (Skelettnadeln) und eine Vielfalt verschiedener Mikroskleren (die

manchmal fehlen können) aus [Erpenbeck & van Soest 2007]. Die Klasse der Hornschwämme besteht aus 14 Subtaxa, von denen *Halichondria* eines darstellt. Vertreter dieser Gattung sind Schwämme ohne typische Mikroskleren. Ihre monaxonen Megaskleren kommen in ungeordneten Mustern vor. Die Art *Halichondria panicea* hat eine durchschnittliche Größe von etwa 15 cm, ist meistens Besiedler von Steinen, Felsen oder Molluskenschalen und kommt sowohl im Mittelmeer wie auch im Nordatlantik und in der Ostsee vor [Erpenbeck & van Soest 2007].

Dem Schutz vor Räubern dienen diesen sessilen Wirbellosen (Invertebraten) weniger die Skelettnadeln, sondern vor allem eine chemische Verteidigungsstrategie [Erpenbeck & van Soest 2007]. Schwämme sind dafür bekannt, eine große Vielfalt an biologisch aktiven Naturstoffen zu produzieren, welche speziell wegen ihrer pharmazeutischen Relevanz im Mittelpunkt des Interesses stehen.

Mit etwa 29 % haben sie den größten Anteil an der Gesamtheit der marinen Naturstoffe [Hentschel & Bringmann 2010]. Mehr als 1.000 verschiedene Metabolite wurden in den letzten Jahren aus Schwämmen identifiziert [Blunt et al. 2003; Blunt et al. 2004; Blunt et al. 2005; Faulkner 2001; Faulkner 2002]. Aus der Gattung *Halichondria* wurden bis heute einige vielversprechende Substanzen isoliert, beispielsweise die Peptide Halicylindramid A - E mit antifungischer sowie zytotoxischer Wirkung [Li et al. 1995; Li et al. 1996], ein neues Glykosphingolipid [Nagle et al. 1992] und der Polyether Halichondrin B mit starker zytotoxischer Wirkung und *in vitro* Aktivität gegen Tumore [Bai et al. 1991], welcher sich zur Zeit in der klinischen Phase III gegen Krebserkrankungen befindet.

Viele neuere Untersuchungen zeigten immer wieder Ähnlichkeiten zwischen biologisch aktiven Schwammmetaboliten und solchen, die aus Bakterien isoliert wurden. Dieses lässt vermuten, dass in vielen Fällen eher Schwamm-assoziierte Mikroorganismen als der Schwamm selbst die wahren Produzenten der Sekundärmetabolite sind [Jensen & Fenical 1994; Faulkner et al. 2000; Proksch et al. 2002; Hildebrand et al. 2004; Piel et al. 2004; Hochmuth & Piel 2009]. Beispielsweise hat sich herausgestellt, dass eine *Micromonospora* Art verantwortlich für die Produktion des zunächst als Schwammmetabolit beschriebenen Peptides Thiocoralin ist [Romero et al. 1997]. Die Biomasse vieler mariner Schwämme besteht zu 40 bis 60 % aus Mikroorganismen [Scheuermayer et al. 2006; Vogel 2008]. Dieser Anteil ist weitaus höher als der Anteil der Bakterien in der Wassersäule. Dennoch wird der Begriff der Symbiose in diesem Zusammenhang nur sehr vorsichtig verwendet, da es bis heute kaum Informationen darüber gibt, in welcher Beziehung Schwamm und Bakterien zueinander stehen. Besser eignen sich die Begriffe Assoziation oder Vergesellschaftung, um die Beziehung zwischen diesen räumlich nahen Organismen zu beschreiben.

Die mikrobielle Gemeinschaft im Schwamm ist phylogenetisch komplex, hochgradig Schwamm-spezifisch und wird vertikal über die reproduktiven Stadien (Embryos/Larven) an die nächste Schwammgeneration weitergegeben [Bayer et al. 2008]. Assoziierte Mikroben kommen sowohl auf der äußeren Schicht des Schwammes als auch im Mesohyl und intrazellulär vor. Es wird angenommen, dass im gewissen Maße eine stabile Assoziation zwischen dem Schwamm und seiner mikrobiellen Gemeinschaft besteht und diese eine ökologische Bedeutung hat [Thiel et al. 2007]. Ganz unterschiedliche Mikroorganismen können mit einem Schwamm assoziiert sein. Dazu

gehören Dinoflagellaten, selten Pilze, Cyanobakterien sowie andere Bakterien wie auch beispielsweise die Actinomyceten. Aus Schwämmen sind heute 16 verschiedene bakterielle Phyla bekannt [Fieseler et al. 2004; Siegl & Hentschel 2009]. Da Schwämme zu den ältesten Tierstämmen gehören, ist es interessant anzumerken, dass auch die Assoziation zwischen Mikroorganismen und Schwämmen extrem alt zu sein scheint [Wilkinson 1984]. Fossilien von Schwämmen, welche auf 580 Millionen Jahre datiert werden, zeigen Bakterien-ähnliche Mikrokugeln [Yin & Gao 2000]. Es wurden viele Untersuchungen zur komplexen Diversität von Schwamm-assoziierten Mikroorganismen durchgeführt, allerdings ist die metabolische Interaktion zwischen dem Schwamm und den assoziierten Mikroben bis heute nahezu unerforscht [Bayer et al. 2008]. Aufgrund der Unmengen von Wasser und den darin enthaltenen diversen Mikroorganismen, die der Schwamm täglich filtriert, muss er zwischen Nahrungspartikeln/-mikroben und vergesellschafteten Mikroorganismen unterscheiden können, da diese häufig vorteilhaft bezüglich des Nährstoffbezuges, der Stabilisation des Schwammenskelettes, der Verarbeitung von Stoffwechselendprodukten, des Schutzes vor UV-Licht und des chemischen Schutzes, des Einbaus von gelösten organischen Stoffen aus dem Umgebungswasser, des Transports von Metaboliten durch das Mesohyl, der Kohlenstofffixierung und des Schutzes vor Aufwuchs sind [Paul & Ritson-Williams 2008]. Die Beziehung zwischen Mikroorganismen und Schwamm kann durch mikrobiell produzierte biologisch aktive Substanzen, welche dem Schwamm nützen (und ihm nicht schaden), gefördert werden. Für diesen chemischen Schutz toleriert bzw. unterstützt der Schwamm wiederum jene bestimmten Mikroorganismen im/auf dem Schwammgewebe [Faulkner et al. 2000].

Es wird angenommen, dass besonders eine phylogenetische Gruppe, die *Actinobacteria*, eine große Bedeutung bei der Schwamm-Mikroorganismen-Interaktion hat. Diese Bakterien sind allgemein als vielversprechende Naturstoffproduzenten bekannt [Fiedler et al. 2005] und sind vermutlich Teil der chemische Verteidigungsstrategie des Schwammes. Mindestens sieben verschiedene Gattungen wurden bis heute in diesem Zusammenhang identifiziert: *Streptomyces* [Imamura et al. 1993], *Micromonospora*, *Saccharopolyspora* [Liu 2005], *Gordonia* [Montalvo 2005], *Micrococcus* [Montalvo 2005], *Bradybacterium* [Montalvo 2005], *Salinispora* [Kim 2005]. Mithilfe molekularbiologischer Methoden konnten in Schwämmen Actinomyceten als stetig, divers und manchmal als eine der Hauptkomponenten der bakteriellen Gemeinschaft ausgemacht werden [Hentschel et al. 2002; Hentschel et al. 2006; Wehrl et al. 2007]. Dennoch bleibt die ökologische Rolle der Actinomyceten in Schwämmen bis heute eher unklar und die durchgeführten Arbeiten eher deskriptiv.

4.2 MOLEKULARBIOLOGISCHE UND CHEMISCHE UNTERSUCHUNG DER SEKUNDÄRSTOFFPRODUKTION IN MIT DEM SCHWAMM *H. PANICEA* ASSOZIIERTEN ACTINOMYCETEN

4.2.1 EINLEITUNG

Schwämme stehen mittlerweile besonders aufgrund der diversen mit ihnen assoziierten Mikroorganismen im Fokus des Interesses. Darüber hinaus stellen sie eine Quelle unterschiedlichster Sekundärmetabolite dar [Taylor et al. 2007], welche eine enorme Bandbreite an biologischen Aktivitäten aufweisen. Inzwischen wurden viele unterschiedliche Studien zum Thema Schwamm-Bakterien-Assoziation durchgeführt, bei denen aber bisher nur einzelne Aspekte dieser Lebensgemeinschaft untersucht wurden. So gibt es Untersuchungen zur mikrobiellen Diversität (meistens molekularbiologisch), zur biologischen Aktivität (basierend auf kultivierungsabhängigen Methoden) und zur Biosynthese von Sekundärmetaboliten (chemische und molekularbiologische Analysen) der assoziierten Bakterien [Imhoff & Stöhr 2003; Wichels et al. 2006; Chelossi et al. 2007; Jiang et al. 2007; Thiel et al. 2007; Zhang et al. 2008; Kennedy et al. 2009]. Dennoch gibt es bislang keine Studien, welche versuchen, die gesammelten Informationen in einen größeren Kontext bezüglich einer Schwamm-Bakterien-Interaktion zu bringen. Aus diesem Grund sollte die vorliegende Arbeit das Auftreten von Sekundärmetaboliten in *Actinobacteria* assoziiert mit dem marinen Schwamm *Halichondria panicea* sowie die antimikrobielle Aktivität ihrer Rohextrakte und einiger Reinsubstanzen untersuchen.

Der im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Schwamm *Halichondria panicea* Pallas (Porifera, Demospongia, Halichondrida, Halichondriidae) kommt weltweit in küstennahen Bereichen vor [Barthel & Wolfrath 1989]. Vorherige Untersuchungen haben gezeigt, dass in Assoziation mit diesem Schwamm eine große phylogenetische Diversität bakterieller Vertreter vorkommt: *Alpha*-, *Beta*- und *Gammaproteobacteria*, *Cytophaga/Flavobacteria*, Vertreter der *Deinococcus*-Gruppe sowie Gram-positive Bakterien mit einem niedrigen GC-Gehalt, *Actinobacteria* und *Planctomycetales* [Imhoff & Stöhr 2003; Wichels et al. 2006].

Die *Actinobacteria* repräsentieren mit 3 bis 20 % nicht den größten Teil der bakteriellen Gemeinschaft des Schwammes, stellen aber durch ihr großes Potential zur Produktion von Sekundärmetaboliten den pharmazeutisch interessantesten dar. Unter den vielen chemisch und biologisch vielversprechenden Substanzen aus marinen *Actinobacteria* [Blunt et al. 2004; Salomon et al. 2004; Fiedler et al. 2005; Jensen et al. 2005] sind bisher nur zwei aus *H. panicea* assoziierten *Actinobacteria* bekannt [Perovic et al. 1998; Wicke et al. 2000]. Dabei handelt es sich um die antimikrobiell aktiven Metabolite 2,4,4'-Trichloro-2'-hydroxydiphenylether und Acyl-1-(acyl-6'-mannobiosyl)-3-glycerol aus *Micrococcus luteus* [Bultel-Poncé et al. 1998].

Da es bei der effektiven Wirkstoffsuche Strategien bedarf, bei denen eine große Anzahl von Mikroorganismen gezielt auf die Produktion von Sekundärmetaboliten hin geprüft werden kann, sollte in dieser Arbeit ebenfalls das Potential einer genetischen Vorauswahl untersucht werden. Die Suche nach Genfragmenten der nicht-ribosomalen Peptid-Synthetase (NRPS) und der

Polyketid-Synthase (PKS) stellt, besonders in der Gruppe der *Actinobacteria*, eine solche Möglichkeit dar.

Das Wissen über die zwei untersuchten Biosynthesesysteme NRPS und PKS ist enorm. Nicht-ribosomale Peptid-Synthetasen und Polyketid-Synthasen sind sogenannte Multienzymkomplexe und kommen teilweise als Hybride vor. Die verschiedenen Typen dieser beiden Multienzymkomplexe sind an der Herstellung einer ganzen Reihe von klinisch relevanten Naturstoffen beteiligt [Frankel & McCafferty 2004]. Beide Enzymklassen bringen eine große strukturelle Vielfalt an Produkten hervor, die wiederum eine enorme Bandbreite biologischer Aktivitäten aufweisen. Vertreter der nicht-ribosomalen Peptide und der Polyketide wirken beispielsweise gegen Bakterien, Viren, Pilze und Tumore oder unterdrücken die Immunreaktion [O'Hagan 1991; Sieber & Marahiel 2003]. Einige dieser Substanzen sind als Medikament auf dem Markt verfügbar. Hierzu zählt das actinobakterielle Vancomycin (Abb. 3), welches von *Streptomyces orientalis* (mittlerweile als *Amycolatopsis orientalis* klassifiziert) produziert wird [Mootz et al. 2002]. Vancomycin ist ein Glykopeptidantibiotikum, welches zurzeit eine wirksame Alternative gegen den Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) darstellt [von Nussbaum et al. 2006].

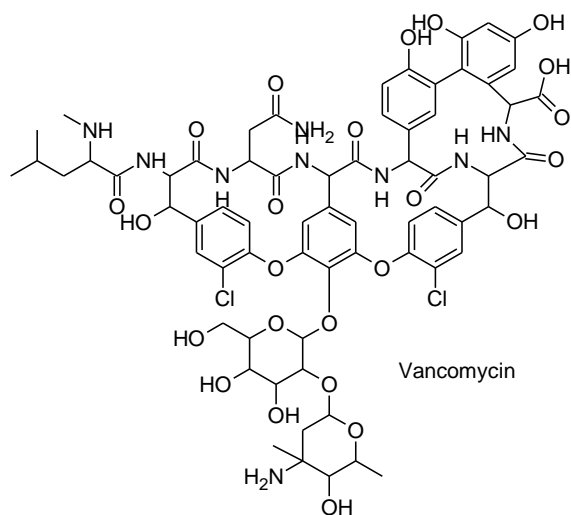


Abb.3: Das nicht-ribosomal synthetisierte Vancomycin aus *Amycolatopsis orientalis*.

Beide Systeme basieren auf einer einfachen biosynthetischen Logik: Jeder einzelne Reaktionsschritt wird von einer sogenannten Domäne des Enzymkomplexes übernommen. Diese Domänen sind wiederum in Modulen zusammengefasst, welche meistens in der vorliegenden Reihenfolge genutzt werden.

Nicht-ribosomale Peptide (NRPs) werden vor allem von filamentösen Pilzen und Bakterien gebildet [Doekel & Marahiel 2001]. Ihre Komplexität wird durch die Art der multimodularen und multifunktionalen Biosynthese besonders verständlich. Im Gegensatz zu den ribosomal synthetisierten Peptiden nutzen NRPSs neben den proteinogenen Aminosäuren auch hunderte von ungewöhnlichen Bausteinen [Grünwald & Marahiel 2006]. Dadurch weisen diese Sekundärmetabolite einzigartige Struktureigenschaften wie beispielsweise D-Aminosäuren, N-terminale angefügte Fettsäureketten, N- und C-methylierte Reste, N-formylierte Reste, heterozyklische Elemente und glycosylierte Aminosäuren sowie phosphorylierte Reste auf [Grünwald & Marahiel 2006]. Einzelne Module

und ihre Domänen sorgen bei jeder Syntheserunde für die Verlängerung des Produktes vom aminoterminalen zum carboxyterminalen Ende (Abb. 4). Die Domänen katalysieren die einzelnen Reaktionsschritte wie die Aktivierung der ausgewählten Aminosäuren, deren Bindung an das Zwischenprodukt sowie deren anschließende Modifikationen. Ein Modul ist mindestens aus einer Adenylierungsdomäne (A-Domäne), einem Peptidyl-Carrier-Protein (PCP; auch Thiolierungsdomäne genannt) und einer Kondensationsdomäne (C-Domäne) [Finking & Marahiel 2004] aufgebaut. Modifikationen können beispielsweise durch die Epimerisierungsdomäne (E-Domäne), die Zyklisierungsdomäne (Cy-Domäne), die Oxidoreduktasedomäne (Ox-Domäne), die Methyltransferasedomäne (M-Domäne) oder die Reduktasedomäne (R-Domäne) vorgenommen werden. Um die Freisetzung des Produktes von der NRPS zu gewährleisten, befindet sich am carboxyterminalen Ende des letzten Moduls eine Thioesterase-Domäne (TE-Domäne).

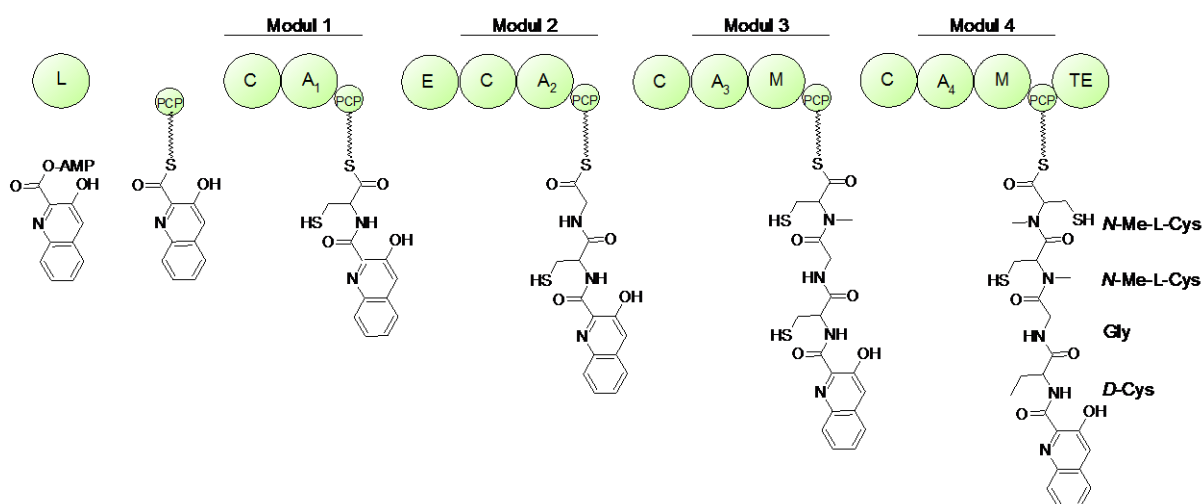


Abb.4: Organisation des NRPS-Genclusters von Thiocoralin aus einem marinen Actinomyceten modifiziert nach [Lombó et al. 2006]. L = AMP-Ligase, PCP = Peptidyl-Carrier-Protein, C = Kondensationsdomäne, A = Adenylierungsdomäne, E = Epimerisierungsdomäne, M = Methyltransferasedomäne, TE = Thioesterasedomäne.

Neben der hier ausführlicher beschriebenen linearen (Typ A) NRPS (Abb. 4), bei der die Anordnung und Anzahl der Module mit der Primärsequenz des Peptides übereinstimmt und somit die Synthese colinear vom N-terminalen zum C-terminalen Ende verläuft [Grünewald & Marahiel 2006], kommen zwei weitere Typen in der Natur vor: Die iterative (Typ B) NRPS und die nichtlineare (Typ C) NRPS.

Wie die nicht-ribosomalen Peptide gehören auch die Polyketide zu den Sekundärmetaboliten, welche eine unglaubliche strukturelle und funktionelle Diversität aufweisen. Sie sind bekannt für eine Bandbreite an pharmakologischen Aktivitäten – antibakteriell, antifungisch, antiparasitisch, antitumoral, cholesterinsenkend oder immunsuppressiv [O'Hagan 1991].

Bei der Biosynthese von Polyketiden werden grundsätzlich einfache Biosynthesebausteine wie Acetat, Propionat und Butyrat, vorliegend als Acetyl-CoA, Propionyl-CoA und Butyryl-CoA, durch die PKS miteinander verknüpft. An der Bildung sind eine β -Ketoacylsynthasedomäne (KS-Domäne), eine optionale (Malonyl-) Acyltransferasedomäne (AT-Domäne) sowie ein phosphopantetheinyliertes Acyl-Carrier-Protein (ACP) beteiligt [Hertweck 2009; Hochmuth & Piel 2009]. Nach

jedem Kettenverlängerungsschritt nehmen Ketoreduktasedomäne (KR-Domäne), Dehydratasedomäne (DH-Domäne) und Enoylreduktasedomäne (ER-Domäne) weitere Reduktionen an dem Acyl-Rückgrat vor. Die Thioesterasedomäne (TE-Domäne) ist für die Fertigstellung der Kettenverlängerung verantwortlich [Weissman & Müller 2008].

Auch bei bakteriellen Polyketid-Synthesen sind unterschiedliche Typen bekannt. Die modulare (Typ I) PKS ist aus aufeinander abgestimmten, linear angeordneten Modulen, die wiederum aus einzelnen Domänen zusammengesetzt sind, aufgebaut [Hertweck 2009]. Sie ist für die Synthese komplexer, manchmal auch aromatische Polyketide verantwortlich [Weissman & Müller 2008].

Vom Typ I gebildete Polyketide werden häufig im klinischen Alltag angewendet. Ein Beispiel ist das von *Saccharopolyspora erythraea* gebildete Erythromycin (Abb. 5), welches als Antibiotikum in Gebrauch ist [Dingermann et al. 2002].

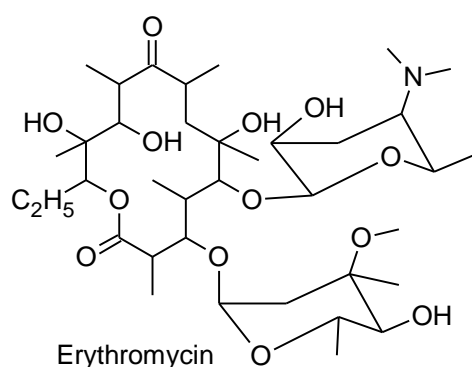


Abb.5: Ein Beispiel für ein von der Typ I PKS gebildetes Polyketid: Erythromycin.

Der zweite und in dieser Arbeit untersuchte PKS Typ ist die aromatische auch iterativ genannte Typ II PKS (Abb. 6). Dieser Typ ist für die Synthese von aromatischen und polyzyklischen Polyketiden verantwortlich [Hertweck 2009]. Die aromatische Polyketid-Synthese ist ausschließlich in Bakterien und dort hauptsächlich in der Gruppe der *Actinobacteria* anzutreffen [Hertweck 2009].

Die Typ II PKS ist aus einem dissoziierbaren Komplex aus monofunktionellen Enzymen zusammengesetzt [Hertweck 2009]. Dieser ist mindestens aus einer „minimalen PKS“ aufgebaut, die wiederum aus zwei Ketosynthasedomänen, der KS_{α} -Domäne und der KS_{β} -Domäne, auch „chain length factor“ (CLF) genannt, sowie einem ACP aufgebaut ist [Hertweck 2009]. Zusätzliche Domänen wie die KR-, die CYC- und/oder die ARO-Domäne bestimmen die Modifizierung des Produktes.

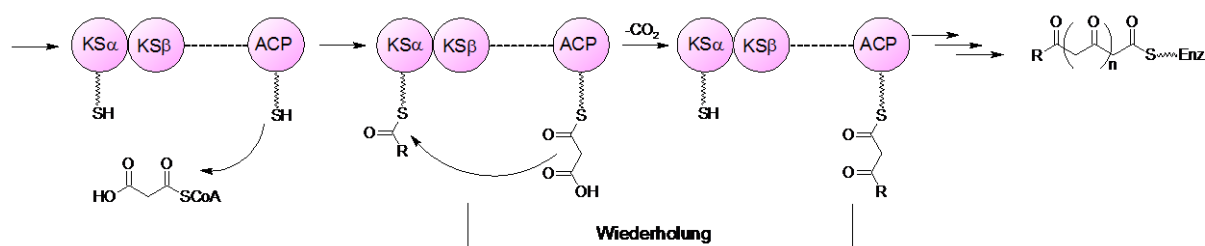


Abb.6: Mechanismus der aromatischen (Typ II) Polyketid-Biosynthese modifiziert nach [Hertweck et al. 2007] KS = Ketosynthasedomäne, ACP = Acyl-Carrier-Protein.

Auch aromatische Polyketide sind als Medikamente auf dem Markt verfügbar. Zu ihnen zählt beispielsweise das von *Streptomyces peucetius* produzierte Doxorubicin (Abb. 7), welches bei der Chemotherapie zum Einsatz kommt [Lown 1993].

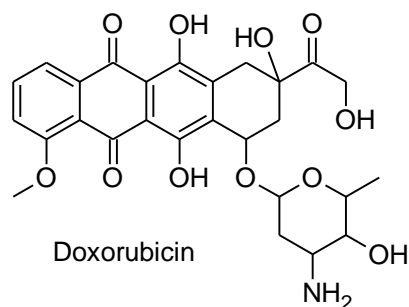


Abb.7: Ein Beispiel für ein von der Typ II PKS gebildetes aromatisches Polyketid: Doxorubicin.

Der dritte PKS Typ, die Chalcon-ähnliche PKS, war eine ganze Zeit lang nur aus Pflanzen bekannt [Moore & Hopke 2001]. Mittlerweile wurde sie auch in einigen Bakterien und Pilzen entdeckt [Austin & Noel 2003; Gross et al. 2006]. Die erste bakterielle Typ III PKS, die Tetrahydroxynaphthalin-Synthase, wurde 1995 im Labor von Horinouchi [Ueda et al. 1995] in *Streptomyces griseus* und etwas später in *Streptomyces coelicolor* beschrieben [Funa et al. 1999]. Gewöhnlich werden durch die Typ III PKS kleine Benzol- oder Naphthalinringe gebildet.

Die Gene, der in der vorliegenden Arbeit als genetische Marker dienenden zwei Biosynthesesysteme sind normalerweise im actinobakteriellen Genom gebündelt, in sogenannten Genclustern, angeordnet [Cundliffe 2006]. Diese Gencluster sind aus 10 bis 50 Genen aufgebaut. Durchschnittlich nimmt ein Biosynthesegencluster im Genom eines Actinomyceten mindestens 1 % in Anspruch [Cundliffe 2006]. Das Genom von *Streptomyces avermitilis* besteht beispielsweise aus einem 9,0 MB großen, linearen Chromosom und einem zusätzlichen kleinen Plasmid. Das Chromosom beinhaltet mindestens 30 Gencluster für die Biosynthese von verschiedenen Sekundärmetaboliten (271 Gene; 6,6 % des Genoms). Diese sind involviert in die Synthese von Melanin, Karotinoiden, Siderophoren, Polyketiden und Peptiden. Über die Hälfte dieser Cluster sind in der subtelomeren Region angesiedelt. Cluster, die in vielen Streptomyceten-Arten vorkommen, befinden sich meistens in inneren Abschnitten eines Chromosoms [Ōmura et al. 2001]. Die Analyse des Genoms bezüglich sekundärmetabolischer Gencluster kann zur Isolierung neuer Substanzen führen. So weist *Streptomyces coelicolor* A3(2) ein 8,6 MB großes, lineares Chromosom mit mehr als 20 Biosynthese-Genclustern auf [Bentley et al. 2002]. Vielen dieser Gencluster konnten bekannte Substanzen zugeordnet werden. Dennoch bleiben einige Gencluster bisher ohne zugehöriges Produkt. *In silico* war es schließlich möglich, für *S. coelicolor* den Eisenchelator Coelichelin ausgehend von den Genomdaten vorherzusagen [Challis & Ravel 2000], und drei Jahre später ebenfalls aus Kultur zu isolieren [Lautru et al. 2005].

Aufgrund der Tatsache, dass bei Genomanalysen von Bakterien mit bereits bekannten Sekundärmetaboliten und den dazugehörigen Genclustern häufig viele weitere Gencluster ohne entsprechende bekannte Substanzen gefunden werden, lässt darauf schließen, dass die

Anwesenheit von einzelnen Genclustern oder Abschnitten ein Indikator für das Vorhandensein einer ganzen Reihe weiterer Biosynthesecluster ist.

Um ein besseres Verständnis des ökologischen Zusammenhanges zwischen Actinomyceten und dem Schwamm *Halichondria panicea* zu erhalten und auf der Suche nach neuen Wirkstoffen, wurden im Rahmen dieser Arbeit die aus *H. panicea* isolierten Stämme phylogenetisch eingeordnet, ihr genetisches Potential zur Sekundärmetabolitbildung analysiert sowie die gebildeten Substanzen untersucht und versucht, ihre Rolle in der Assoziation zu definieren. Im Weiteren wurde die Stimulierbarkeit dreier unterschiedlicher *Actinomycetales* Stämme aus diesem Habitat untersucht, um eine Aussage über das veränderliche Metabolitmuster treffen zu können. So sollten Anhaltspunkte für das chemische Potential und damit für die mögliche Produktion von Sekundärstoffen *in situ* erhalten werden. Schließlich sollten bei den vorausgegangenen Versuchsteilen neu entdeckte Substanzen aufgeklärt und auf ihre biologische Aktivität hin untersucht werden.

4.2.2 MATERIAL UND METHODEN

4.2.2.1 Schwammmaterial

Das Probenmaterial des Brotkrumenschwammes *Halichondria panicea* Pallas (Porifera, Demospongiae, Halichondrida, Halichondriidae) (Abb. 8), aus dem unter anderem die actinobakteriellen Isolate stammten, wurde im Zeitraum von November 2002 bis Juni 2004 in der euphotischen Zone (etwa 6 m) der Kieler Förde Nähe Tonnenhof (54°22'N; 10°09'O) während mehrerer Tauchgänge gesammelt (Abb. 9). Im Oktober 2009 wurde für die Analyse des Gesamtschwammextraktes erneut ein Exemplar des Schwammes *H. panicea* an diesem Ort genommen.

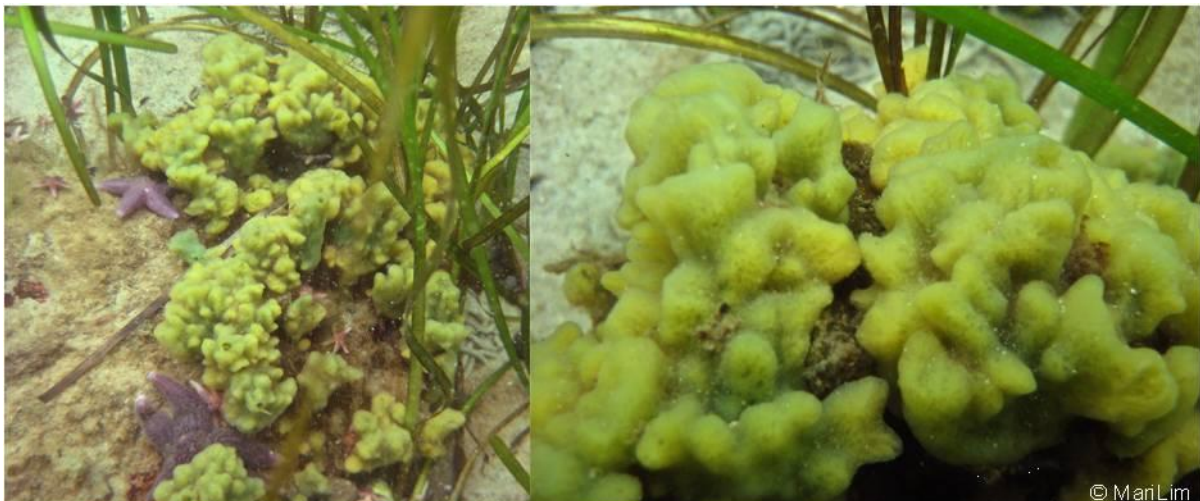


Abb. 8: Aufnahmen des Brotkrumenschwammes *Halichondria panicea* im Habitat mit anderen marinen Organismen desselben Standortes.

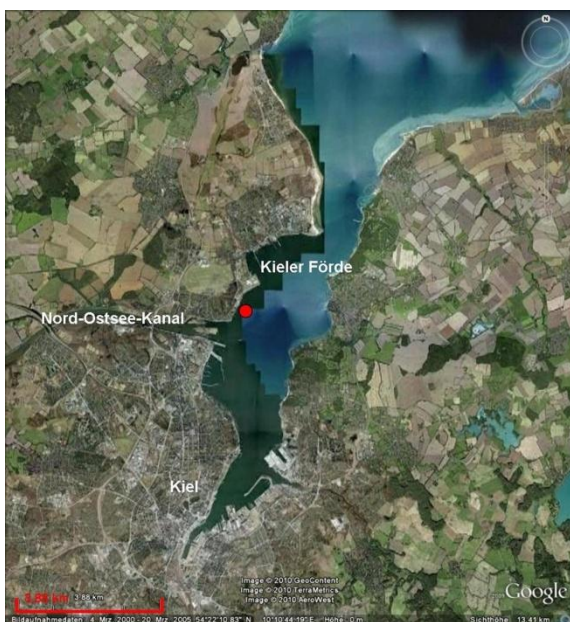


Abb.9: Karte der Kieler Förde (©Google maps Deutschland 2010). Der rote Punkt markiert die Probenahmestelle nahe Tonnenhof.

4.2.2.2 Isolierung und Identifizierung antimikrobiell aktiver *Actinomycetales* Stämme

Isolierung der Actinobakterien. Für diesen Teil der Arbeit wurde eine Auswahl an actinobakteriellen Stämmen getroffen, welche zuvor von dem marinen Schwamm *H. panicea* isoliert und als Reinkultur freundlicherweise von Frau Dr. J. Wiese zur Verfügung gestellt wurden. Für die Isolierung der Bakterien wurde etwa ein Gramm des Schwammmaterials in sterilem Umgebungswasser zerkleinert und die Suspension auf fünf unterschiedlichen Medien nach [Wiese et al. 2009] ausgestrichen. Die Reinkulturen wurden durch anschließendes Ausstreichen auf Tryptic Soy Broth- (TSB, Difco, VWR Hannover; Zusammensetzung aller Medien werden in Abschnitt 8.1 beschrieben) Medium A (mit 10 g/L NaCl) erhalten. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 22°C. Alle Reinkulturen wurden bei -80°C mithilfe des Cryobank Systems (Mast Diagnostica GmbH, Reinfeld, Deutschland) nach Anweisungen des Herstellers aufbewahrt. Eine erste Bestimmung der antibiotischen Aktivität der Isolate wurde von Frau Dr. J. Wiese mittels eines Überschichtungstests nach Standardprotokoll [Wiese et al. 2009] durchgeführt, indem die Bakterien *Bacillus subtilis* (DSM 347), *Escherichia coli* K12 (DSM 498), *Staphylococcus lentus* (DSM 6672) sowie die Hefe *Candida glabrata* (DSM 6425) verwendet wurden. Alle Isolate, welche in dieser Arbeit verwendet wurden, zeigten bei diesen Überschichtungstests eine antibiotische Aktivität. Für die weiteren Analysen wurden alle 46 Reinkulturen zunächst auf GYM4-Platten angezogen.

DNA-Extraktion. Mit einer sterilen Impföse wurde das Bakterienmaterial aufgenommen und in ein entsprechende Gefäß (Precellys 24 Kit VK05, Peqlab, Erlangen) mit 400 µl DNA-freiem Wasser (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) überführt. Im Anschluss wurden die Proben zweimal für 45 s mit einer Pause von 20 s bei 6.500 rpm mechanisch mithilfe des Precellys24 (Peqlab, Erlangen) aufgeschlossen. Die Proben wurden danach für 10 min bei 8.000 x g zentrifugiert. Der DNA-haltige Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und bis zu seiner weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Zur Konzentrationsbestimmung der DNA sowie zur Überprüfung der Reinheit wurde eine Absorptionsmessung mithilfe des Photometers GeneQuant Pro (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) durchgeführt. Die Konzentrationsbestimmung der DNA erfolgte bei einer Wellenlänge von 260 nm (Absorptionsmaximum der DNA). Dabei entspricht eine Extinktion von 1 50 µg/mL doppelsträngiger DNA. Die Proteinkonzentration wurde bei einer Wellenlänge von 280 nm (Absorptionsmaximum von Proteinen) bestimmt. Mithilfe des Quotienten Ex_{260}/Ex_{280} wurde die Reinheit des jeweiligen DNA-Extraktes überprüft. Der ermittelte Wert sollte hierbei zwischen 1,8 und 2,0 liegen [Lottspeich & Zorbas 1998]. Die eingesetzte Menge DNA sollte für eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zwischen 1 pg und 500 ng pro µL liegen [Schrimpf 2002]. Es wurde darauf geachtet, dass die DNA-Menge zwischen 10 und 20 ng pro Ansatz lag.

16S rRNA-PCR. Die 16S rRNA ist Bestandteil der 30S-Untereinheit aller prokaryotischen Ribosomen und daher ein idealer molekularer Marker für die phylogenetische Klassifizierung. Für die Einordnung der verwendeten Stämme wurde mittels PCR ein Abschnitt der 16S rDNA amplifiziert (Abschnitt 8.2, Tabellen 24, 25 und 26). Um den Erfolg der PCR zu überprüfen, wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Dazu wurde ein 1,5 %iges Gel aus Agarose und

1x TBE-Puffer hergestellt. Eine Agarose-Konzentration von 1,5 % trennt lineare DNA-Fragmente mit einer Größe von 0,2 bis 3,0 kb optimal auf. In die Taschen des Gels wurde ein Gemisch aus 3,0 µL des PCR-Produktes, 2,0 µL des Ladepuffers und 2,0 µL des TBE-Puffers aufgetragen. Zur Kontrolle und Größenbestimmung wurde der DNA Molecular Weight Marker X (Roche, Mannheim) aufgetrennt. Der Gellauf erfolgte bei 200 Volt für 20 min. Um die DNA-Banden sowie den Längenstandard im Gel sichtbar zu machen, wurde das Gel für 25 min in einer Ethidiumbromid-Lösung (1,3 µM, Fluka Biochemika, Buchs, Schweiz) angefärbt und anschließend unter der Einstrahlung von UV-Licht mithilfe der Gel-Jet-Imager Dokumentationsanlage (Intas, Göttingen) dokumentiert.

Sequenzierung. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden für die Sequenzierung mit 80 µL DNA-freiem Wasser verdünnt und jeweils 15 µL davon in eine Mikrotiterplatte pipettiert. Zusätzlich wurde pro Sequenzieransatz 1 µL des jeweiligen Primers mit einer Konzentration von 3,2 µM separat abgefüllt. Die Proben wurden zur Sequenzierung an das Institut für Klinische Molekularbiologie am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein (Kiel) gegeben. Dort wurden von allen Proben 8 µL mit 0,075 µL Exonuklease I (20 U/µL), 0,3 µL SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase) (1 U/µL) und 1,625 µL DNA-freiem Wasser für 15 min bei 37°C und anschließend 15 min bei 72°C enzymatisch aufgereinigt. Für die Sequenzierung wurde in Verbindung mit einem ABI PRISMA 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, USA) das Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Darmstadt) verwendet. Das Sequenzierverfahren beruht auf der Kettenabbruchmethode nach ^[Sanger et al. 1977]. Die erhaltenen Elektropherogramme (AB1-Datei) wurden manuell mit ChromasPro (Version 1.33c; 2005) bearbeitet und im Anschluss mithilfe der EMBL nucleotide database mittels des Basic Local Alignment Search Tool (nblast) ^[Altschul et al. 1990] und des Ribosomal Database Projects (RDP) II ^[Cole et al. 2007] auf den nächsten verwandten Typstamm hin untersucht.

4.2.2.3 Amplifizierung von NRPS und Type II PKS Genfragmenten

Alle 46 actinobakteriellen Stämme wurden auf das Vorhandensein der NRPS A-Domäne sowie der Typ II PKS KS_α-Domäne hin untersucht, indem bereits beschriebene Primersysteme verwendet wurden ^[Doekel & Marahiel 2001; Metsä-Ketelä et al. 1999]. Die erhaltenen PCR-Produkte wiesen eine Länge von 250 bis 270 bp (NRPS) sowie von 580 bis 620 bp (PKS) auf. PCR, Elektrophorese und Sequenzierung erfolgten mit den jeweiligen NRPS- bzw. PKS-Primern (Abschnitt 8.2, Tabellen 24, 25 und 26), wie im vorangegangenen Abschnitt beschrieben. Die erhaltenen und manuell bearbeiteten Sequenzen wurden mithilfe von blastx ^[Altschul et al. 1990] mit bekannten NRPS und Typ II PKS Sequenzen verglichen. Mit blastx können Nukleotidsequenzen in alle Leseraster translatiert und anschließend mit der Protein-Datenbank des EMBL verglichen werden. Eine Homologiesuche für Biosynthesegene sollte, wenn möglich, mit einer Aminosäuresequenz durchgeführt werden, da mit Proteinsequenzen Verwandtschaftsbeziehungen besser dargestellt werden können.

4.2.2.4 Kultivierung der Flüssigkulturen

Um im Anschluss an die molekularbiologischen Untersuchungen einen Überblick über das chemischen Profil der einzelnen Stämme zu erhalten, wurden die Bakterien in 100 mL GYM4-Medium in 300 mL Erlenmeyerkolben für fünf Tage bei 28°C und 120 rpm im Dunkeln angezogen. Zur Herstellung der jeweiligen Hauptkultur wurde eine 1 cm² großes Stück einer GYM4-Agarplatte, welche mit einem Kügelchen aus der Kryokonservierung angeimpft wurde, verwendet. Die Platten wurden zuvor für etwa vier Wochen bei 28°C im Dunkeln inkubiert.

4.2.2.5 Extraktion der Flüssigkulturen und der Platten

Die 100 mL Flüssigkulturen wurden mit einem Ultra Turrax-T25 basic (IKA-Werke GmbH und Co, Staufen, Deutschland) bei 13.000 rpm für 30 s homogenisiert. Anschließend wurden jeweils 50 mL Ethylacetat dem Homogenisat zugefügt, um so den Übergang der Sekundärmetabolite aus dem Medium bzw. den Zellen in die organische Phase zu gewährleisten. Der organische Überstand wurde von der wässrigen Kulturphase abgetrennt, vakuumgetrocknet und anschließend in 200 µL Methanol (Carl Roth, Karlsruhe, D in HPLC grade) aufgenommen.

Zusätzlich wurde von jedem Stamm eine der zum Animpfen der Flüssigkultur verwendeten GYM4-Agarplatten aufgearbeitet, indem diese auf die gleiche Art homogenisiert und mit 100 mL Ethylacetat extrahiert wurden. Um die organische Phase abzutrennen, wurde das Homogenisat über einen Phasentrennfilter (1 PS, 185 mm, Whatman Schleicher & Schuell, Dassel) gegeben, der Ethylacetatextrakt vakuumgetrocknet und wiederum in 200 µL Methanol aufgenommen. Die hergestellten Rohextrakte wurden für antimikrobielle Tests sowie für die chemische Analyse verwendet.

Außerdem wurde von allen verwendeten Medien, flüssig wie auch fest, ein methanolischer Extrakt auf die gleiche Weise wie oben beschrieben hergestellt und ebenfalls mittels HPLC-UV/MS analysiert, um durch die Medien verursachte Peaks von den bakteriell gebildeten Substanzen in den Chromatogrammen unterscheiden zu können.

4.2.2.6 Extraktion der Schwammprobe *H. panicea*

Zur Analyse des Gesamtschwammextraktes wurden etwa 100 g (Feuchtwicht) Schwammgewebe mit 500 mL Methanol mittels eines Ultra Turrax-T25 basic (IKA-Werke GmbH und Co., Staufen, Deutschland) bei 13.000 rpm homogenisiert. Das Homogenisat wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt, der Überstand anschließend von den Zellen getrennt, vakuumgetrocknet und in 5 mL Methanol resuspendiert. Der Rohextrakt wurde für die chemische Analyse verwendet.

4.2.2.7 Chemische Analyse der bakteriellen Kulturextrakte und des Gesamtextraktes von *H. panicea* sowie Isolierung ausgewählter Reinsubstanzen

Um das chemische Profil der verwendeten Stämme untersuchen zu können, wurden die Extrakte mithilfe eines gekoppelten Verfahrens bestehend aus Hochleistungsflüssigkeits-

chromatographie, Massenspektrometrie und einem Photodioden-Array-Detektor (DAD) zur UV/VIS-Detektion (HPLC-UV/MS) auf das Vorhandensein und die Art ihrer Naturstoffe hin untersucht. Für die Analyse wurden von allen Proben 15 µL des Rohextraktes eingespritzt. Die Auftrennung der Extrakte erfolgte per monolithischer Umkehrphase (reversed phase; RP) an einer unpolaren stationären Phase, die als lipophile Alkylreste Octadecylgruppen (C₁₈, Phenomenex Onyx Monolithic C₁₈, 100 x 3,00 mm) trug. Die HPLC-Experimente wurden mit einem Gradientensystem bestehend aus Wasser (H₂O, A) und Acetonitril (MeCN, B), jeweils versetzt mit 0,1 %iger Ameisensäure (HCOOH) (Gradient: 0 min 5 % B, 4 min 60 % B, 6 min 100 % B; Fluss 2 mL/min), auf einem VWR Hitachi Elite LaChrome System gekoppelt an einen ESI-Ionenfallen-Detektor (Esquire 4000, Bruker Daltonics, Bremen) durchgeführt (Abschnitt 8.3, Tabelle 27). Die Detektion der Substanzen fand im positiven Modus statt. Dieses führte meistens zur Bildung von Monomer-Ionen ([M+H]⁺, [M+Na]⁺), seltener zu Dimer-Ionen ([2M+H]⁺, [2M+Na]⁺). Für die Messung lag eine Spannung von 3500 V an. Als Vernebelungsgas wurde Stickstoff mit einem Druck von 2,7 bar eingespritzt. Das Trockengas hatte eine Temperatur von 350°C und wurde mit einem Fluss von 9 L/min in das System eingeleitet. Die erhaltenen UV/VIS- und Massen-Daten wurden mit dem Programm Data Analysis (Bruker Daltonics, Bremen) ausgewertet und anschließend mit zwei Datenbanken, Antibase^[Laatsch 2007] und dem Dictionary of Natural Products^[Buckingham 2009], abgeglichen, um möglichst viele Peaks bereits bekannten Substanzen zuordnen zu können und mögliche neue Substanzen für weitere Untersuchungen zu identifizieren. Ausgewählte Extrakte wurden mittels zweier verschiedener präparativer HPLCs (LaChrom Elite-System; Merck-Hitachi; Phenomenex Gemini-NX C₁₈ 5 µm 110Å, Axia packed; dimension 100 by 21.20 mm; Elutionsmittel: H₂O (A)/MeCN (B); mit variierendem Gradienten) (LaPrep-System; VWR; Phenomenex Gemini 10u C₁₈ (100 Å, Axia, 100 x 50.00 mm; Elutionsmittel: H₂O (A)/MeCN (B); mit variierendem Gradienten) weiter aufgetrennt (Abschnitt 8.3, Tabelle 27). Die Auswahl der aufgefangenen Fraktionen erfolgte über einen DAD- (mit einem Spektrum von 200 nm bis 550 nm) bzw. einen UV/VIS-Detektor (mit einer einstellbaren Wellenlänge von 200 nm bis 650 nm). Die isolierten Substanzen wurden vakuumgetrocknet und anschließend in Methanol resuspendiert. Die Überprüfung der Reinheit fand mittels HPLC-Analyse statt. Im Anschluss wurden die Reinsubstanzen durch einen Stickstoffbegaser getrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C oder -20°C gelagert.

Für die isolierten Substanzen hat zunächst eine ¹H NMR-Messung stattgefunden. Die NMR-Spektren wurden entweder mit einem Bruker DRX500 mit Probenwechsler oder einem Bruker Avance 600 mit Cryo-Probenkopf in der Spektroskopischen Abteilung des Institutes für organische Chemie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel aufgenommen. Die verbleibenden Lösungsmittelsignale wurden als Referenz verwendet (chemische Verschiebung δ_H 3,31 ppm für Protonen und δ_C 49,0 ppm für Kohlenstoffatome; NMR-Lösungsmittel: [MeOH-d₄]).

Um einen weiteren Anhaltspunkt für die Bestimmung der Substanzen zu haben, wurde mithilfe eines Benchtop Time-of-Flight Spektrometers (MicroTOF II, Bruker Daltonics, Bremen) mit positiver Elektrospray-Ionisation von einzelnen Substanzen eine exakte Masse gemessen

(Abschnitt 8.3, Tabelle 27). Dadurch war es möglich, eine Aussage über die mögliche Summenformel zu machen. Für die Analyse wurden 0,1 µg in 10 µL methanolischem Extrakt in die HPLC eingespritzt. Alle Moleküle wurden mit einer Spannung von 4000 V positiv ionisiert. Als Vernebelungsgas wurde Stickstoff mit einem Druck von 0,8 bar eingespritzt. Das Trockengas hatte eine Temperatur von 200°C und wurde mit einem Fluss von 5 L/min in das System geleitet. Die Kalibrierung des Massenspektrometers erfolgte gegen einen Natriumformiat-Puffer (5 mM NaOH, 0,2 % Formiat, 50 % Isopropanol). Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm Data Analysis (Bruker Daltonics, Bremen).

Die Lagerung der Substanzen erfolgte entweder bei 4°C oder -20°C.

4.2.2.8 Antimikrobielle Aktivität der Kulturextrakte und vereinzelter Reinsubstanzen

Alle in dieser Arbeit generierten Extrakte und Substanzen wurden freundlicherweise von Frau A. Erhard auf ihre antibakterielle Aktivität getestet.

Für die antimikrobiellen Tests wurden folgende Stämme verwendet: *Bacillus subtilis* (DSM 347; *B.s.*), *Escherichia coli* K12 (DSM 498; *E.c.*), *Staphylococcus lentus* (DSM 6672; *S.l.*), *Pseudomonas syringae* pvar. *aptata* (DSM 50252; *P.s.*), *Pseudomonas fluorescens* (NCIMB 10586; *P.fl.*), *Xanthomonas campestris* (DSM 2405; *X.c.*), *Ralstonia solanacearum* (DSM 9544; *R.s.*), *Candida glabrata* (DSM 6425; *C.g.*) und *Erwinia amylovora* (DSM 50901; *E.a.*). 10 µL der Rohextrakte bzw. der Reinsubstanzen (50 µg/mL) (Oxazolomycin aus HB100, verschiedene Antimycine aus HB157 und HB288), gelöst in Methanol, wurden in eine 96er Mikrotiterplatte überführt und vakuumgetrocknet. Übernachtskulturen (in TSB-Medium) der einzelnen Teststämme wurden auf eine OD₆₀₀ von 0,02 bis 0,05 verdünnt, um anschließend 200 µL dieser Lösung in die entsprechenden Wells zu pipettieren. Der gesamte Ansatz wurde für 15 Stunden bei 600 rpm und 28°C inkubiert, um schließlich 10 µL einer Resazurinlösung (0,2 mg/mL PBS) in jedes Well zu geben. Die Platte wurde erneut bei 28°C inkubiert, bis der Farbumschlag der Negativkontrolle von blau zu pink sichtbar wurde. Um die Zellvitalität zu überprüfen, wurde die Umwandlung von Resazurin zu Resorufin und die damit entstandene Fluoreszenz bei 560 nm und die Anregung bei 590 nm in einem Mikrotiterplattenlesegerät (Infinite M200, Tecan, Männedorf, Schweiz) gemessen. Lebende Zellen weisen eine Dehydrogenaseaktivität auf, durch welche der blaue, nicht fluoreszierende Farbstoff Resazurin zu dem rosafarbenen, fluoreszierenden Resorufin reduziert wird. Das Fluoreszenzsignal entspricht der Menge an gebildetem Resorufin und ist direkt proportional zur Anzahl der metabolisch aktiven Zellen. Extrakte, welche in diesem Testsystem zu einer blauen Färbung der Testlösung führten, sind dementsprechend biologisch aktiv gegenüber dem Testorganismus. Wohingegen Proben ohne Aktivität eine pinke Färbung im Well hervorrufen. Die erhaltenen Werte wurden mit einer Positivkontrolle (100 µg/Well Chloramphenicol für Bakterien und 200 µg/Well Cycloheximid für *Candida glabrata*) abgeglichen. Zusätzlich wurde eine Negativkontrolle (ohne jegliche Substanz) auf derselben Platte durchgeführt, welche als Vergleich zur Ermittlung der prozentualen Inhibition des Wachstums der Testorganismen diente. Alle Extrakte bzw. Substanzen wurden im Doppelansatz getestet.

4.2.2.9 Accession-Nummern der hinterlegten Nukleotidsequenzen

Für alle in dieser Arbeit verwendet 46 actinobakteriellen Stämme wurden bei GenBank Nucleotide Sequence Database die entsprechenden Sequenzinformationen hinterlegt: GQ863900-GQ863929, GQ863931-GQ863933, GU213489-GU213493 und GU213495-GU213502 (16S rRNA), GQ863946-GQ863965 (NRPS) und GQ863934-GQ863945 und GU320045 (PKS).

4.2.3 ERGEBNISSE

4.2.3.1 Isolierung und Identifizierung von *Actinomycetales* Stämmen aus *H. panicea*

Von dem marinen Schwamm *H. panicea* wurde eine große Anzahl an unterschiedlichen Bakterien isoliert, darunter 46 Stämme, welche basierend auf der Analyse der 16S rRNA den folgenden Gattungen der *Actinobacteria* zugeordnet wurden: *Actinoalloteichus*, *Micrococcus*, *Micromonospora*, *Nocardiopsis* und *Streptomyces*, wovon die letzte Gruppe mit 39 Vertretern die größte vertretene Gattung darstellte (Tabelle 1).

4.2.3.2 Bestimmung der NRPS- und Typ II PKS-Genfragmente

Alle 46 *Actinomycetales* Stämme wurden auf das Vorhandensein von NRPS- und Typ II PKS-Genfragmenten untersucht (Tabellen 1 und 2). In 16 Stämmen (35 %) konnten weder Genfragmente der NRPS noch der Typ II PKS nachgewiesen werden. Ein NRPS-PCR-Produkt in der erwarteten Größe wurde aus 24 Stämmen (52 %) amplifiziert. Bei 20 dieser 24 Stämme konnten nach der Sequenzierung Ähnlichkeiten (40-96 % Sequenzähnlichkeit) zu bekannten NRPS-Genen gezeigt werden. Bei den restlichen vier Stämmen trat mehr als ein PCR-Produkt der gleichen Länge im Elektropherogramm auf. Es kann davon ausgegangen werden, dass das Genom des jeweiligen Stammes mehr als eine A-Domäne enthielt, was mit dem modularen Aufbau der NRPS einhergeht. Für eine exakte Aussage müssten allerdings die entsprechenden NRPS-PCR-Produkte z.B. mittels einzelner Klonierungsexperimente getrennt werden.

Bei 13 (28 %) der Stämme wurde ein PCR-Produkt amplifiziert, welches Übereinstimmung zu bereits bekannten Typ II PKS-Genen aufwies (Tabelle 2). Die Ähnlichkeiten reichten von 47 % bei Stamm HB328 zu der Ketosynthase aus *Streptomyces felleus* (BAF43343) bis zu 100 % bei Stamm HB202 mit der PKS aus *Streptomyces* sp. (BAH68110).

Bei sieben Stämmen (15 %) konnte sowohl ein NRPS- als auch ein Typ II PKS-PCR-Produkt amplifiziert werden.

Durch diese Korrelation kann eine Aussage über das Vorhandensein eines NRPS- bzw. Typ II PKS-Gens getroffen werden, allerdings ist eine direkte Annotierung der Genfunktion und damit eine spezifische Aussage über mögliche nicht-ribosomale Metabolite bzw. aromatische Polyketide aufgrund der kurzen Länge der PCR-Produkte sehr schwierig. Die Fragmente sind unter 300 bp bzw. 700 bp lang und geben nur einen kleinen Abschnitt einer einzelnen A-Domäne bzw. KS_α-Domäne wieder, während ein vollständiges NRPS-bzw. PKS-Gencluster eine Länge von bis zu 70 kb erreichen kann. Hinzu kommt, dass nicht für jedes NRP bzw. aromatische Polyketid das zugehörige Gencluster bereits sequenziert wurde und umgekehrt.

Tabelle 1: *Actinomycetales* Stämme assoziiert mit *H. panicea*: Identifizierung, Nachweis von NRPS- und Typ II PKS-Genfragmenten sowie Ergebnisse der chemischen Analyse.

Stamm	Nächster verwandter Typstamm ^a	16S rRNA Gen Acc.-Nr. ^b	Identifizierte(s) Genfragment(e)	Chemisch identifizierte(s) Produkt(e) ^c	Auftreten nicht- identifizierter Substanz(en) ^d
HB062	<i>Streptomyces griseus</i> ATCC 25497 ^T	D63872	NRPS und PKS	Weitere	X
HB084	<i>Streptomyces intermedius</i> DSM 40372 ^T	Z76686	-	Weitere	
HB094	<i>Streptomyces sampsonii</i> ATCC 25495 ^T	D63871	-		
HB095	<i>Streptomyces rutgersensis</i> DSM 40077 ^T	Z76688	-	Weitere	
HB096	<i>Streptomyces rutgersensis</i> DSM 40077 ^T	Z76688	-	Weitere	
HB099	<i>Streptomyces griseus</i> ATCC 25497 ^T	D63872	-		X
HB100	<i>Streptomyces platensis</i> JCM 4662 ^T	AB045882	NRPS und PKS	Weitere	
HB101	<i>Streptomyces libani</i> subsp. <i>rufus</i> LMG 20087 ^T	AJ781351	NRPS	Pep	
HB102	<i>Streptomyces scabiei</i> ATCC 49173 ^T	D63862	NRPS	Weitere	
HB105	<i>Streptomyces sampsonii</i> ATCC 25495 ^T	D63871	-	Weitere	
HB107	<i>Streptomyces platensis</i> JCM 4662 ^T	AB045882	NRPS	Weitere, Pep	X
HB108	<i>Streptomyces fulvorobeus</i> LMG 19901 ^T	AJ781331	-		
HB110	<i>Streptomyces griseus</i> ATCC 25497 ^T	D63872	-		
HB113	<i>Streptomyces fulvorobeus</i> LMG 19901 ^T	AJ781331	NRPS ^e und PKS	Weitere, Pep	X
HB114	<i>Streptomyces griseus</i> ATCC 51928 ^T	AF112160	-		
HB115	<i>Streptomyces mediolani</i> LMG 20093 ^T	AJ781354	-		X
HB116	<i>Streptomyces sampsonii</i> ATCC 25495 ^T	D63871	-	Weitere, arom PK	
HB117	<i>Streptomyces fulvorobeus</i> LMG 19901 ^T	AJ781331	PKS	Weitere	
HB118	<i>Streptomyces sampsonii</i> ATCC 25495 ^T	D63871	-	Weitere, arom PK	
HB122	<i>Streptomyces luridiscabiei</i> S63 ^T	AF361784	-	Weitere	
HB132	<i>Streptomyces atroolivaceus</i> LMG 19306 ^T	AJ781320	NRPS ^e und PKS	Weitere	X
HB138	<i>Streptomyces fulvorobeus</i> LMG 19901 ^T	AJ781331	NRPS	Weitere, Pep	X
HB140	<i>Streptomyces griseus</i> ATCC 25497 ^T	D63872	NRPS	Weitere, Pep	
HB142	<i>Streptomyces intermedius</i> DSM 40372 ^T	Z76686	NRPS	Weitere	X
HB149	<i>Streptomyces griseus</i> JCM 4623 ^T	AB045872	NRPS		X
HB156	<i>Streptomyces koyangensis</i> VK-A60 ^T	AY079156	NRPS	Weitere	
HB157	<i>Streptomyces sampsonii</i> ATCC 25495 ^T	D63871	NRPS	Weitere, arom PK	
HB181	<i>Streptomyces fulvorobeus</i> LMG 19901 ^T	AJ781331	NRPS	Weitere, Pep	X
HB184	<i>Streptomyces mediolani</i> LMG 20093 ^T	AJ781354	-	Weitere	
HB200	<i>Streptomyces pulveraceus</i> LMG 20322 ^T	AJ781377	NRPS und PKS	Weitere	X
HB202	<i>Streptomyces mediolani</i> LMG 20093 ^T	AJ781354	NRPS und PKS	Weitere	X

Actinomyceten aus *Halichondria panicea* – Molekularbiologische und chemische Untersuchungen
Ergebnisse

Stamm	Nächster verwandter Typstamm ^a	16S rRNA Gen Acc.-Nr. ^b	Identifizierte(s) Genfragment(e)	Chemisch identifizierte(s) Produkt(e) ^c	Auftreten nicht- identifizierter Substanz(en) ^d
HB238	<i>Micromonospora matsumotoense</i> IMSNU 22003 ^{T1}	AF152109	NRPS	Pep ^f	
HB241	<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 4698 ^T	AF542073	-	Weitere	
HB243	<i>Streptomyces mediolani</i> LMG 20093 ^T	AJ781354	NRPS	Weitere, Pep	
HB253	<i>Micromonospora matsumotoense</i> IMSNU 22003 ^{T1}	AF152109	NRPS ^d		X
HB254	<i>Micromonospora matsumotoense</i> IMSNU 22003 ^{T1}	AF152109	-		X
HB272	<i>Actinoalloteichus cyanogriseus</i> C7654 ¹	AY094367	NRPS	Weitere, Pep	X
HB274	<i>Streptomyces platensis</i> JCM 4662 ^T	AB045882	NRPS		X
HB288	<i>Streptomyces odorifer</i> DSM 40347 ^T	Z76682	NRPS	Weitere, Pep	
HB291	<i>Streptomyces fulvorobeus</i> LMG 19901 ^T	AJ781331	NRPS und PKS	Weitere	X
HB298	<i>Streptomyces coelestis</i> ICSSB 1021 ^T	AF503496	PKS	Weitere	
HB320	<i>Streptomyces sanglieri</i> A5843 ¹	AY094363	PKS	Weitere, arom PK	X
HB328	<i>Streptomyces fulvorobeus</i> LMG 19901 ^T	AJ781331	PKS	Weitere	
HB375	<i>Micromonospora aurantiaca</i> DSM 43813 ^T	X92604	NRPS	Weitere	X
HB381	<i>Streptomyces griseus</i> ATCC 2549 ^T	D63872	PKS		
HB383	<i>Nocardiosis alba</i> DSM 43377 ^T	X97883	PKS		X

^a Die analysierten Sequenzen und die entsprechenden Typstämme zeigten Ähnlichkeit zueinander von 98,5 % oder mehr.

^b NCBI Accession Nummer.

^c Pep: Peptide; arom PK: aromatisches Polyketid; weitere: weitere Sekundärmetabolite neben aromatischen Polyketiden und Peptiden. Identifizierte Substanzen sind in Tabelle 3 und 4 aufgelistet.

^d Zeigt das Vorkommen von Substanzen an, welche mithilfe der verwendeten Datenbanken nicht identifiziert wurden und eventuell neue Metabolite darstellen.

^e PCR-Produkt in der entsprechenden Länge wurde amplifiziert. Die Zuordnung der erhaltenen Sequenz zu bekannten Genen war nicht möglich.

^f Nachgewiesener NRPS Biosyntheseweg für das Produkt.

Tabelle 2: Mittels blastx oder blastn Analyse^a identifizierte NRPS- und Typ II PKS-Sequenzen aus den *Actinomycetales* Stämmen assoziiert mit *H. panicea*.

Stamm	Gen-fragment	Ergebnis der blast Analyse; Enzym/Quelle	Acc.-Nr. des ähnlichsten Gens	Ähnlichkeit aa/bp ^b
HB062	NRPS	Calcium-dependent antibiotic peptide synthetase II aus <i>Streptomyces lividans</i>	ZP_05525571	24/39 (61 %)
	PKS	Ketosynthase aus <i>Streptomyces</i> sp.	AB492015	169/176 (96 %)
HB100	NRPS	Amino acid adenylation domain-containing protein aus <i>Streptomyces roseosporus</i>	ZP_04712038	35/71 (49 %)
	PKS	Ketoacyl synthase alpha subunit aus <i>Streptomyces lydicus</i>	ABM91087	192/199 (96 %)
HB101	NRPS	nblast: partial nrps gene for putative NRPS aus uncultured bacterium	AM287209	41/45 (91 %)
HB102	NRPS	Pyoverdine synthetases I aus <i>Pseudomonas fluorescens</i>	ABA73588	40/69 (57 %)
HB107	NRPS	Non-ribosomal peptide synthetase aus <i>Sorangium cellulosum</i>	CAN98427	26/48 (54 %)
HB113	PKS	Ketosynthase aus <i>Streptomyces nodosus</i> subsp. <i>asukaensis</i>	BAF43363	36/70 (51 %)
HB117	PKS	SaqA Saquayamycin aus <i>Micromonospora</i> sp.	ACP19353	86/143 (60 %)
HB132	PKS	Ketosynthase aus <i>Streptomyces nodosus</i> subsp. <i>asukaensis</i>	BAF43363	169/185 (91 %)
HB138	NRPS	Putative NRPS aus <i>Streptomyces griseus</i> subsp. <i>griseus</i>	BAG23545	56/58 (96 %)
HB140	NRPS	Amino acid adenylation domain protein aus <i>Cyanotheca</i> sp.	ACK73338	28/70 (40 %)
HB142	NRPS	Amino acid adenylation domain aus <i>Cyanotheca</i> sp.	ACK73338	49/88 (55 %)
HB149	NRPS	Amino acid adenylation domain aus <i>Cyanotheca</i> sp.	ACK73338	50/89 (56 %)
HB156	NRPS	Pyoverdine synthetases I aus <i>Pseudomonas fluorescens</i>	ABA73588	47/80 (58 %)
HB157	NRPS	Amino acid adenylation domain aus <i>Cyanotheca</i> sp.	ACK73338	51/89 (57 %)
HB181	NRPS	Pyoverdine synthetase I aus <i>Pseudomonas fluorescens</i>	ABA73588	25/29 (86 %)
HB200	PKS	Ketosynthase <i>Streptomyces nodosus</i> subsp. <i>asukaensis</i>	BAF43363	163/172 (94 %)
HB202	NRPS	Putative non-ribosomal peptide synthetase aus <i>Rhodococcus opacus</i>	BAH53136	18/29 (62 %)
	PKS	Polyketide synthase aus <i>Streptomyces</i> sp.	BAH68110	191/191 (100 %)
HB238	NRPS	blastn: Gramicidin synthetase subunit D aus <i>Mycobacterium avium</i>	CP000479	77/102 (75 %)
HB243	NRPS	blastn: Amino acid adenylation domain protein aus <i>Delftia acidovorans</i>	CP000884	49/61 (80 %)
HB272	NRPS	Amino acid adenylation domain aus <i>Cyanotheca</i> sp.	ACK73338	32/53 (60 %)
HB274	NRPS	NRPS <i>MbtE</i> (Mycobactin) aus <i>Mycobacterium marinum</i>	ACC42107	19/39 (48 %)
HB288	NRPS	NRPS <i>MtaG</i> (Myxothiazol) aus <i>Stigmatella aurantiaca</i>	AAF19815	32/46 (69 %)
HB291	NRPS	Putative NRPS aus <i>Streptomyces griseus</i> subsp. <i>griseus</i>	BAG23568	53/60 (88 %)
	PKS	Ketosynthase aus <i>Streptomyces felleus</i>	BAF43343	191/191 (100 %)
HB298	PKS	Polyketide synthase aus <i>Streptomyces</i> sp.	BAH67656	143/148 (96 %)
HB320	PKS	<i>alnL</i> Ketoacyl synthase alpha aus <i>Streptomyces</i> sp. CM020	ACI88861	119/151 (78 %)-
HB328	PKS	Ketosynthase aus <i>Streptomyces felleus</i>	BAF43343	89/187 (47 %)
HB375	NRPS	Pyoverdine sidechain peptide synthetase III aus <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i>	AAZ36245	51/89 (57 %)
HB381	PKS	Ketoacyl synthase aus <i>Streptomyces argillaceus</i>	CAA61989	94/102 (92 %)

Actinomyceten aus *Halichondria panicea* – Molekularbiologische und chemische Untersuchungen
 Ergebnisse

Stamm	Gen-fragment	Ergebnis der blast Analyse; Enzym/Quelle	Acc.-Nr. des ähnlichsten Gens	Ähnlichkeit aa/bp ^b
HB383	PKS	3-oxoacyl-(acyl-carrier-protein) synthase II aus <i>Nocardioopsis dassonvillei</i> subsp. <i>dassonvillei</i>	EEK37209	171/192 (89 %)

^a Zusätzlich zu den Ergebnissen der blast Analyse wurden die Ähnlichkeiten der erhaltenen Sequenzen zu den entsprechenden Genen ermittelt, deren Acc.-Nr. angegeben wurde.

^b aa: Anzahl der Aminosäuren; bp: Anzahl der Basenpaare.

^c PCR-Produkt in der entsprechenden Länge wurde amplifiziert. Die Zuordnung der erhaltenen Sequenz zu bekannten Genen war nicht möglich.

4.2.3.3 Chemische Analyse der bakteriellen Kulturextrakte

Die aus *H. panicea* isolierten *Actinomycetales* Stämme stellten sich als vielversprechende Naturstoffproduzenten heraus. In Extrakten von 40 der 46 Stämme wurden Substanzen nachgewiesen. Insgesamt konnten 122 unterschiedliche Sekundärmetabolite im chemischen Profil der Stämme mittels HPLC-MS-, UV- und NMR-Techniken identifiziert werden (Tabellen 3 und 4). Das chemische Profil der Stämme wurde mit dem Auftreten von Typ II PKS- und NRPS-Genfragmenten in einen Zusammenhang gebracht. Dabei stellte sich heraus, dass die Diversität der Naturstoffe (Zahl und Verschiedenheit der Substanzen) in Stämmen mit einem positiven PCR-Ergebnis viel höher war als die Diversität in Stämmen ohne Typ II PKS- oder NRPS-PCR-Produkt (23 vs. 7 unterschiedliche strukturelle Gruppen) (Abb. 10). In den 30 positiv getesteten Stämmen konnten insgesamt 108 unterschiedliche Substanzen nachgewiesen werden. Nur in einem dieser positiv getesteten Stämme (3 %) waren gar keine Metabolite zu finden, wohingegen 17 Stämme (57 %) Substanzen produzierten, welche keine Übereinstimmung mit Einträgen aus den Datenbanken zeigten (insgesamt 88 Substanzen) (Tabelle 1) und somit neue Naturstoffe sein könnten. Einige dieser Substanzen konnten im weiteren Verlauf der Arbeit als neue Metabolite identifiziert (Abschnitt 4.4), andere durch weitere Analytik bekannten Substanzen zugeordnet werden. Die Gruppe der PCR-negativen Stämme produzierte nur ein kleines Spektrum an unterschiedlichen Substanzen. Von den 16 *Actinomycetales* Stämmen, die kein PCR-Produkt aufwiesen, fand in vier Stämmen (25 %) keine Substanzproduktion statt. In den verbleibenden zwölf Stämmen wurden insgesamt 27 Substanzen identifiziert, hauptsächlich verschiedene Antimycine. Nur bei drei dieser zwölf Stämme traten Peaks auf (insgesamt 11), welche keine Übereinstimmung zu Substanzen aus den Datenbanken zeigten (Tabelle 1).

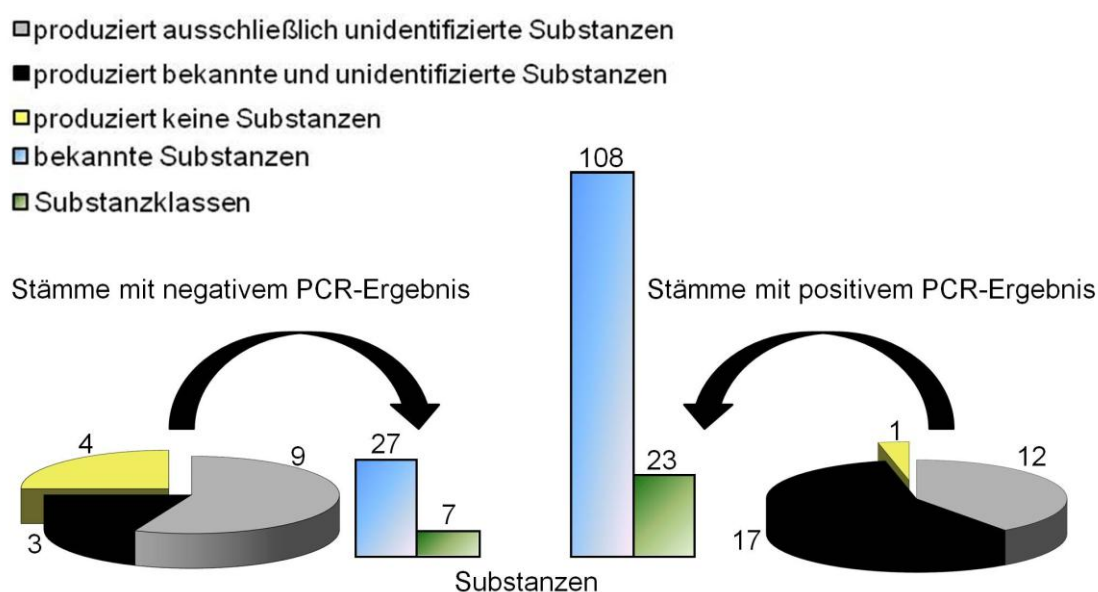


Abb. 10: Anzahl der Sekundärmetabolit-produzierenden Stämme (Tortendiagramme) und der daraus resultierenden Substanzen (Säulendiagramm) in Stämmen mit einem negativen NRPS/PKS-PCR-Ergebnis im Vergleich zu jenen mit einem positiven Ergebnis.

Insgesamt konnten die identifizierten Sekundärmetabolite 23 strukturell unterschiedlichen Gruppen zugeordnet werden (Tabellen 3 und 4 sowie Abb. 10). Zu den häufigsten Strukturen gehörten Polyketide (35 Substanzen), Peptide (16 Substanzen), Phenazine (13 Substanzen) und Aminoglykoside (13 Substanzen). Die anderen 19 Gruppen wurden nur durch einen oder wenige (bis zu 8) Vertreter repräsentiert. Beispielsweise produzierte nur Stamm HB298 ein strukturell bekanntes Pyron. Lediglich vier Glykoside konnten nachgewiesen werden, eines davon Heptakis-(6-deoxy)-cyclomaltoheptose aus Stamm HB238.

Tabelle 3: Identifizierte Substanzen aus mit dem Schwamm *H. panicea* assoziierten *Actinomycetales* Stämmen, welche ein positives NRPS- bzw. Typ II PKS-PCR-Ergebnis aufwiesen.

Nr.	Stamm	Substanzen	Strukturelle Gruppe	Aktivität lt. Lit.	Dereplikation
1.	HB062	6'''-O- α -D-Mannopyranosylmannosido-streptomycin [Ikeda et al. 1985]	Aminoglykosid	Antibakteriell	MS, UV
2.	HB100	Oxazolomycin [Kanzaki et al. 1998]	β -Lakton, Polyen	Phytotoxisch	MS, UV, NMR
3.	HB100	Coproporphyrin [Toriya et al. 1993]	Porphyrin	Zinkchelator, photosensiv	MS, UV
4.	HB101	Pepstatin AC [Aoyagi et al. 1973]	Peptid	Pepsin-Inhibitor	MS, UV, NRPS
5.	HB101	Pepstatin CU [Aoyagi et al. 1973]	Peptid	Pepsin-Inhibitor	MS, UV, NRPS
6.	HB102	Clavamycin D [King et al. 1986]	β -Laktam	Antimykotisch	MS, UV
7.	HB107	4-Thiouracil [Dolak et al. 1977]	Nucleosidanalogen	Antibakteriell, zytotoxisch	MS, UV
8.	HB107	Bovinoicidin [Anzai & Suzuki 1960]	Dipeptid	Antibakteriell	MS, UV, NRPS
9.	HB107	Trihomonactinsäure [Řezanka et al. 2004]	Lakton	Aktiv gegen Gram-positive Bakterien, aktiv gegen <i>Artemia</i>	MS, UV
10.	HB113/HB272	Antibiotic NA 22598A ₁ [Kuwahara et al. 1997]	Peptid	Zytotoxisch	MS, UV, NRPS
11.	HB113/HB140	3-O-(α -L-Mycarosyl)erythronolid B [Martin et al. 1973]	Makrolid	n.b. ^a	MS, UV
12.	HB113	Gualamycin [Tsuchiya et al. 1995]	Aminoglykosid	Milbentötend	MS, UV
13.	HB113	Antibiotic X 14931A [Westley et al. 1984]	Polyether	Aktiv gegen Gram-positive Bakterien und Protozoen, antimykotisch	MS, UV
14.	HB113	17-Methylspiramycin I [Liu et al. 1996]	Makrolid	n.b. ^a	MS, UV
15.	HB113	Streptomycin [Wallace et al. 1979]	Aminoglykosid	Antibakteriell, neuromuskulär blockierend, Phospholipase D-Inhibitor	MS, UV
16.	HB113	Antibiotic M-2846 [Suzuki et al. 1975]	Makrolid	Aktiv gegen Gram-positive Bakterien	MS, UV
17.	HB113	1-Epimanzamin D [Zhou et al. 2000]	Alkaloid	Antibakteriell, zytotoxisch	MS, UV
18.	HB113	Antibiotic A 75943 [Morishita et al. 1998]	δ -Lakton	Hemmung des Knochenabbaus	MS, UV
19.	HB113	N-Didemethylallosamidin [Nishimoto et al. 1991]	Aminoglykosid	Chitinase-Inhibitor, Insektizid, antimykotisch	MS, UV
20.	HB113	Methylallosamidin [Sakuda et al. 1987]	Aminoglykosid	Chitinase-Inhibitor (Insekten)	MS, UV

Actinomyceten aus *Halichondria panicea* – Molekularbiologische und chemische Untersuchungen
Ergebnisse

Nr.	Stamm	Substanzen	strukturelle Gruppe	Aktivität lt. Lit.	Dereplikation
21.	HB113	Allosamidin ^[Sakuda et al. 1987]	Aminoglykosid	Insektizid	MS, UV
22.	HB117/HB291	Dihydromaltophilin ^[Graupner et al. 1997]	Makrolaktam	Antimykotisch	MS, UV
23.	HB117/HB181/HB291	Senacarcin A ^[Nakano et al. 1982]	Phenazin	Antibakteriell, zytotoxisch	MS, UV,
24.	HB117/HB328	Pyrocoll ^[Dietera et al. 2003]	Alkaloid	Antibakteriell, antimykotisch, zytotoxisch, aktiv gegen Protozoen, antiparasitisch	MS, UV, NMR
25.	HB117/HB291	Streptazon B1 ^[Puder et al. 2000]	Alkaloid	Zytotoxisch	MS, UV
26.	HB132	Venturicidin A ^[Rhodes et al. 1961]	Makrolid	Antimykotisch	MS, UV
27.	HB132	Irumamycin ^[Ōmura et al. 1982]	Lakton	Antimykotisch	MS, UV
28.	HB138	Bundlin A ^[Uramoto et al. 1969]	Makrolid	Aktiv gegen Gram-positive Bakterien, antimykotisch	MS, UV
29.	HB138	Neoenactin B1 ^[Roy et al. 1987]	Hydroxamsäuren	Antimykotisch	MS, UV
30.	HB138	Ashimycin A ^[Tohma et al. 1989]	Aminoglykosid	Antibakteriell	MS, UV
31.	HB138	Validamycin D ^[Horii et al. 1972]	Aminoglykosid	Antimykotisch	MS, UV
32.	HB138	<i>N</i> -Demethylstreptomycin ^[Fredericks & Heding 1971]	Aminoglykosid	Antimikrobiell	MS, UV
33.	HB138	Detoxin E ₁ ^[Otake et al. 1973]	Depsipeptid	Zytotoxisch	MS, UV
34.	HB138	Antibiotic X 14873A ^[Liu et al. 1986]	Polyether	Aktiv gegen Gram-positive Bakterien	MS, UV
35.	HB138	Valistatin ^[Ko et al. 2010]	Tripeptid	Amino-peptidase M-Inhibitor	MS, UV, NRPS
36.	HB140	Phencomycinethylester ^[Pusecker et al. 1997]	Phenazin	Antibakteriell, zytotoxisch	MS, UV
37.	HB140	Pepstatin BU ^[Aoyagi et al. 1973]	Peptid	Pepsin-Inhibitor	MS, UV, NRPS
38.	HB140	<i>N</i> -Acetylglycylclavaminsäure ^[Arulanantham et al. 2006; Reading & Cole 1977]	β-Laktam	β-Lactamase-Inhibitor	MS, UV
39.	HB142/HB156	Isovaleryl-6-deoxy-α-L-talopyranosid ^[Bitzer & Zeeck 2006]	Glykosid	n.b. ^a	MS, UV
40.	HB156	Polyen mit etwa 8-9 Doppelbindungen	Polyen	Antimykotisch	MS, UV
41.	HB156	Galbonolid A ^[Fauth et al. 1986]	Makrolid	Antimykotisch	MS, UV
42.	HB156/HB291	5-Hydroxy-3-(1-hydroxy-2-methylpropyl)-4-methyl-2(5H)-furanon ^[Braun et al. 1995]	Lakton	Antibakteriell, Chitinase- und Phosphatase-Inhibitor	MS, UV
43.	HB156	Albaflavenon ^[Gürtler et al. 1994]	Sesquiterpenketon	Antibakteriell	MS, UV

Actinomyceten aus *Halichondria panicea* – Molekularbiologische und chemische Untersuchungen
Ergebnisse

Nr.	Stamm	Substanzen	strukturelle Gruppe	Aktivität lt. Lit.	Dereplikation
44.	HB157	3,4-Dimethyl-7-(methylamino)-5,8-isoquinolinedion ^[Mahmoud 2004]	Chinon	Aktiv gegen Gram-positive Bakterien	MS, UV
45.	HB157/HB288	5-(6'-Methyl-7'-oxo-octyl)-SH-furan-2-on ^[Mukku et al. 2000]	Lakton	Zytotoxisch	MS, UV, NMR
46.	HB157	Polyen mit etwa 7-8 Doppelbindungen	Polyen	Antimykotisch	MS, UV
47.	HB157	Fredericamycin A ^[Warnick-Pickle et al. 1981]	Aromatisches Polyketid	Zytotoxisch, Erzeuger von freien Radikalen	MS, UV
48.	HB157/HB181	Antimycin A ₄ ^[Barrow et al. 1997]	Makrolid	ATP-Citratlyase-Inhibitor	MS, UV, NMR
49.	HB157/HB181/HB288	Antimycin A ₃ ^[Barrow et al. 1997]	Makrolid	Zytotoxisch, antiviral, ATP-Citratlyase-Inhibitor	MS, UV, NMR
50.	HB157/HB181/HB288	Antimycin A ₂ ^[Barrow et al. 1997]	Makrolid	ATP-Citratlyase-Inhibitor	MS, UV, NMR
51.	HB157/HB181/HB288	Antimycin A ₁ ^[Barrow et al. 1997]	Makrolid	Antiviral, ATP-Citratlyase-Inhibitor, Ichthyotoxin, Ubiquinol-Cytochrome C Oxidoreductase-Inhibitor	MS, UV, NMR
52.	HB157	Antimycin A ₀ ^[Barrow et al. 1997]	Makrolid	Antimykotisch	MS, UV, NMR
53.	HB157	Antimycin A ₅ ^[Barrow et al. 1997]	Makrolid	n.b. ^a	MS, UV, NMR
54.	HB181	Histidinomycin ^[Ishimaru et al. 1983]	Peptid	Antimykotisch	MS, UV, NRPS
55.	HB181	Nebramycin ^[Thompson & Presti 1967]	Aminoglykosid	Antimikrobiell	MS, UV
56.	HB181/ HB243	Antibiotic X 14873G ^[Liu et al. 1986]	Polyether	Aktiv gegen Gram-positive Bakterien	MS, UV
57.	HB181	Mycosporidin ^[Nakamura et al. 1957]	Nukleosid	Aktiv gegen Gram-positive Bakterien	MS, UV
58.	HB181	5-Hydroxy-4-oxonorvalin ^[Kanazawa et al. 1960]	Aminosäure	Antimykotisch	MS, UV
59.	HB181	3-Formamido-2-hydroxy-N-[(2R,6S,7R,8R)-7-hydroxy-2,6,8-trimethyl-4,9-dioxo-1,5-dioxonan-3-yl]benzamid ^[Hara et al. 2004]	Makrolid (Antimycin)	n.b. ^a	MS, UV
60.	HB181	N-[(2R,3S,6S,7R,8R)-8-Ethyl-7-hydroxy-2,6-dimethyl-4,9-dioxo-1,5-dioxonan-3-yl]-3-formamido-2-hydroxybenzamid ^[Hara et al. 2004]	Makrolid (Antimycin)	n.b. ^a	MS, UV
61.	HB181	Blastamycin ^[Hara et al. 2004]	Makrolid (Antimycin)	Antimykotisch, ATP-Citratlyase-Inhibitor	MS, UV
62.	HB181	Kitamycin A ^[Hayashi & Nozaki 1999]	Makrolid (Antimycin)	Hemmung von Pflanzenwachstum	MS, UV

Actinomyceten aus *Halichondria panicea* – Molekularbiologische und chemische Untersuchungen
Ergebnisse

Nr.	Stamm	Substanzen	strukturelle Gruppe	Aktivität lt. Lit.	Dereplikation
63.	HB181	5-[3-[(3-Formamido-2-hydroxybenzoyl)amino]-2,6-dimethyl-8-octyl-4,9-dioxo-1,5-dioxonan-7-yl]pentansäure [Hara et al. 2004]	Makrolid (Antimycin)	n.b. ^a	MS, UV
64.	HB181	Bafilomycin D [Kretschmer et al. 1985]	Makrolid	Hemmung der membran ATPases, Insektizid	MS, UV
65.	HB200	Antibiotic BE 10988 [Oka et al. 1991]	Thiazoly lindol	Zytotoxisch, Topoisomerase II-Inhibitor	MS, UV, NRPS ^b
66.	HB200	<i>N</i> -Methyltyrosyl- <i>N</i> -methyltyrosylleucylalanin [Alvarez et al. 1994]	Peptid	n.b. ^a	MS, UV
67.	HB202	Streptopenazin A [Mitova et al. 2008]	Phenazin	Aktiv gegen Gram-positive Bakterien	MS, UV, NMR
68.	HB202	Streptopenazin B [Mitova et al. 2008]	Phenazin	Aktiv gegen Gram-positive Bakterien	MS, UV, NMR
69.	HB202	Streptopenazin C [Mitova et al. 2008]	Phenazin	Aktiv gegen Gram-positive Bakterien	MS, UV, NMR
70.	HB202	Streptopenazin D [Mitova et al. 2008]	Phenazin	Aktiv gegen Gram-positive Bakterien	MS, UV, NMR
71.	HB202	Streptopenazin E [Mitova et al. 2008]	Phenazin	Aktiv gegen Gram-positive Bakterien	MS, UV, NMR
72.	HB202	Streptopenazin F [Mitova et al. 2008]	Phenazin	Aktiv gegen Gram-positive Bakterien	MS, UV, NMR
73.	HB202	Streptopenazin G [Mitova et al. 2008]	Phenazin	Aktiv gegen Gram-positive Bakterien	MS, UV, NMR
74.	HB202	Streptopenazin H [Mitova et al. 2008]	Phenazin	Aktiv gegen Gram-positive Bakterien	MS, UV, NMR
75.	HB238	Rotihibin B [Fukuchi et al. 1995]	Peptid	Reguliert das Wachstum von Pflanzen	MS, UV, NRPS
76.	HB238	Heptakis-(6-deoxy)-cyclomaltoheptose [Buckingham 2009]	Glykosid	n.b. ^a	MS, UV
77.	HB238	Antibiotic GAI 3 [Buckingham 2009]	Glykosid	n.b. ^a	MS, UV
78.	HB238	Antibiotic GAI 2 [Buckingham 2009]	Glykosid	n.b. ^a	MS, UV
79.	HB238	Fortimicin KR ₁ [Takazawa et al. 1980]	Aminocyclitol	Antibakteriell	MS, UV
80.	HB238	Massetolid K [El Sayed et al. 2000]	Lipopeptid	Antibakteriell	MS, UV, NRPS
81.	HB243	Sulfostin [Abe et al. 2005]	Alkaloid	Dipeptidylpeptidase IV-Inhibitor	MS, UV
82.	HB243	Fosfazinomycin A [Gunji et al. 1983]	Aminophosphonsäure	Antimykotisch	MS, UV

Actinomyceten aus *Halichondria panicea* – Molekularbiologische und chemische Untersuchungen
Ergebnisse

Nr.	Stamm	Substanzen	strukturelle Gruppe	Aktivität lt. Lit.	Dereplikation
83.	HB243	Tobramycin ^[Koch et al. 1974]	Aminoglykosid	Antibakteriell	MS, UV
84.	HB243	<i>N</i> -Acetylvallylleucylargininal ^[Maeda et al. 1971]	Peptid	n.b. ^a	MS, UV, NRPS
85.	HB272	Hemipyocyanin ^[Sato et al. 1992]	Phenazin	Aktiv gegen Gram-positive Bakterien, antimykotisch, antiviral, algizid	MS, UV
86.	HB272	Daryamides C ^[Asolkar et al. 2006]	Polyketid	Zytotoxisch	MS, UV
87.	HB272	Antibiotic A 58365B ^[Nakayama et al. 1999]	Nukleosid	Zytotoxisch	MS, UV
88.	HB272	Antibiotic SW 163B ^[Takahashi et al. 2001]	Oktadepsipeptid	Antimykotisch, immunosuppressiv	MS, UV
89.	HB274	Dihydro-4-(hydroxymethyl)-3-(3-methylbutanonyl)-2(3H)-furanon ^[Buckingham 2009]	Furanon	n.b. ^a	MS, UV
90.	HB274	4-Hydroxythreonin ^[Westley et al. 1984]	Aminosäure	Antibakteriell	MS, UV
91.	HB288	Albopeptin A ^[Isono et al. 1986]	Peptid	Antimykotisch	MS, UV, NRPS
92.	HB288	PD 125375 ^[Rithner et al. 1987]	Pyroll, Amid	Zytotoxisch	MS, UV
93.	HB291	Lankamycin ^[Gäumann et al. 1960]	Makrolid	Antibakteriell	MS, UV
94.	HB298	Germicidin ^[Petersen et al. 1993]	Pyron	Keimungshemmung bei Dikotyledonen, Na ⁺ /K ⁺ -aktivierte ATPase-Inhibitor	MS, UV, NMR
95.	HB298	Inthomycin A ^[Webb et al. 2006]	Polyketid	Antimikrobiel, herbizid	MS, UV, NMR
96.	HB298	Inthomycin B oder C ^[Henkel & Zeeck 1991]	Polyketid	n.b. ^a	MS, UV, NMR
97.	HB320	Blanchaquinon ^[Clark et al. 2004]	Anthrachinon	Antibakteriell, zytotoxisch	MS, UV, PKS
98.	HB320	Antibiotic MA 1189 ^[Sato et al. 1992]	Benzendiol	5-Lipoxygenase-Inhibitor	MS, UV
99.	HB320	Antibiotic K 502A ^[Yoshimoto & Johdo 1996]	Anthracyclin	n.b. ^a	MS, UV, PKS
100.	HB320	Homononactyl-nonactoaat ^[Řezanka et al. 2004]	Dilakton	n.b. ^a	MS, UV
101.	HB328	Futalosin ^[Hosokawa et al. 1999]	Nukleosid	Zytotoxisch	MS, UV
102.	HB328	Antibiotic X 14889A ^[Liu et al. 1993]	Polyether	Aktiv gegen Gram-positive Bakterien	MS, UV
103.	HB328	Mutalomycin ^[Fehr et al. 1977]	Polyether	Ionophor	MS, UV
104.	HB375	Diazepinomicin ^[Charan et al. 2004]	Alkaloid	Antimikrobiell	MS, UV
105.	HB375	Fortimicin AH ^[Fager & Goldstein 1980]	Aminocyclitol	Antibakteriell	MS, UV

Nr.	Stamm	Substanzen	strukturelle Gruppe	Aktivität lt. Lit.	Dereplikation
106.	HB375	Rakicidin A ^[McBrien et al. 1995]	Lipopeptid	Zytotoxisch	MS, UV
107.	HB375	Rakicidin B ^[McBrien et al. 1995]	Lipopeptid	Zytotoxisch	MS, UV
108.	HB375	Polyen mit etwa 12 Doppelbindungen	Polyen	Antimykotisch	MS, UV

^a n.b.: Nicht bestimmt, d.h. es waren keine entsprechenden Literaturangaben zu finden.

^b PCR-Produkt in der entsprechenden Länge wurde amplifiziert. Die Zuordnung der erhaltenen Sequenz zu bekannten Genen war nicht möglich.

Tabelle 4: Identifizierte Substanzen aus mit dem Schwamm *H. panicea* assoziierten *Actinomycetales* Stämmen, welche ein negatives NRPS- und Typ II-PKS-PCR-Ergebnis aufwiesen.

Nr.	Stamm	Substanzen	strukturelle Gruppe	Aktivität lt. Lit.	Dereplikation
1.	HB084/HB095/HB096/ HB116/HB118	5-(6'-Methyl-7'-oxo-octyl)-SH-furan-2-on ^[Mukku et al. 2000]	Lakton	Zytotoxisch	MS, UV, NMR
2.	HB084/HB116/HB118/ HB184	3-Formamido-2-hydroxy-N-[(2R,3S,6S,7R,8R)- 7-hydroxy-2,6,8-trimethyl-4,9-dioxo-1,5- dioxoan-3yl]benzamid ^[Hara et al. 2004]	Makrolid (Antimycin)	n.b. ^a	MS, UV
3.	HB084/HB116/HB118/ HB184	[3[(3-Formamido-2-hydroxy-benzoyl)amido]- 2,6-dimethyl-4,9-dioxo-1,5-dioxoan-7-yl]fomat ^[Buckingham 2009]	Makrolid (Antimycin)	n.b. ^a	MS, UV
4.	HB084/HB116/HB118/ HB184	Blastamycin ^[Hara et al. 2004]	Makrolid (Antimycin)	Antimykotisch, ATP-Citratlyase- Inhibitor	MS, UV
5.	HB084/HB116/HB118/ HB184	Urauchimycin A or B ^[Imamura et al. 1993]	Makrolid (Antimycin)	Antimykotisch	MS, UV
6.	HB084/HB116/HB118/ HB184	Dehexylantimycin A ₁ ^[Hara et al. 2004]	Makrolid (Antimycin)	n.b. ^a	MS, UV
7.	HB084/HB095/HB096/ HB116/HB118/HB184	Antimycin A ₃ ^[Barrow et al. 1997]	Makrolid	Zytotoxisch, antiviral, ATP- Citratlyase-Inhibitor	MS, UV, NMR
8.	HB084/HB095/HB096/ HB116/HB118/HB184	Antimycin A ₂ ^[Barrow et al. 1997]	Makrolid	ATP-Citrat lyase-Inhibitor	MS, UV, NMR
9.	HB084/HB095/HB096/ HB116/HB118/HB184	Antimycin A ₁ ^[Barrow et al. 1997]	Makrolid	Antiviral, ATP-Citratlyase- Inhibitor, Ichthyotoxin, Ubiquinol-Cytochrome C Oxidoreduktase-Inhibitor	MS, UV, NMR

Actinomyceten aus *Halichondria panicea* – Molekularbiologische und chemische Untersuchungen
Ergebnisse

Nr.	Stamm	Substanzen	strukturelle Gruppe	Aktivität lt. Lit.	Dereplikation
10.	HB084/HB095/HB096/ HB116/HB118	Antimycin A ₀ [Barrow et al. 1997]	Makrolid	Antimykotisch	MS, UV, NMR
11.	HB095/HB096	Gentamycin C ₁ [Black et al. 1963]	Aminoglykosid	Antibakteriell	MS, UV
12.	HB095/HB096	Gentamycin A ₂ [Black et al. 1963]	Aminoglykosid	Antibakteriell	MS, UV
13.	HB095/HB184	Antimycin A ₄ [Barrow et al. 1997]	Makrolid	ATP-Citratlyase-Inhibitor	MS, UV, NMR
14.	HB096	Dihydromaltophilin [Graupner et al. 1997]	Makrolaktam	Antimykotisch	MS, UV
15.	HB105	Polyen mit etwa 8 Doppelbindungen	Polyketid	Antimykotisch	UV
16.	HB116/HB118	Fredericamycin A [Warnick-Pickle et al. 1981]	Aromatisches Polyketid	Zytotoxisch, Erzeuger von freien Radikalen	MS, UV
17.	HB122	Pyrocoll [Dietera et al. 2003]	Alkaloid	Antibakteriell, antimykotisch, zytotoxisch, aktiv gegen Protozoen, antiparasisch	MS, UV, NMR
18.	HB122	Streptazon B ₁ or B ₂ [Puder et al. 2000]	Alkaloid	Zytotoxisch	MS, UV
19.	HB122	Saphenylester D [Laursen et al. 2002]	Phenazin	Antibakteriell	MS, UV
20.	HB122	Xanthobaccin A [Nakayama et al. 1999]	Makrolaktam	Antimykotisch	MS, UV
21.	HB122	Aestivophoenin C [Kunigami et al. 1998]	Phenazin	Neuroprotektiv, Antioxidanz	MS, UV
22.	HB184	Enterocin [Piel et al. 2000]	Aromatisches Polyketid	n.b. ^a	MS, UV
23.	HB184	<i>trans</i> -Zimtsäure [Buckingham 2009]	Aromatische Carboxylsäure	n.b. ^a	MS, UV
24.	HB184	[8-Benzyl-3-[(3-formamido-2- hydroxybenzoyl)amino]-2,6-dimethyl-4,9-dioxo- 1,5-dioxonan-7-yl] 3-methylbutanoat [Buckingham 2009]	Makrolid (Antimycin)	n.b. ^a	MS, UV
25.	HB184	Antimycin [Barrow et al. 1997]	Makrolid (Antimycin)	n.b. ^a	MS, UV
26.	HB184	5-[3-[(3-Formamido-2-hydroxybenzoyl)amino]- 2,6-dimethyl-8-octyl-4,9-dioxo-1,5-dioxonan-7- yl]pentansäure [Buckingham 2009]	Makrolid (Antimycin)	n.b. ^a	MS, UV
27.	HB241	Indolstruktur	Alkaloid	n.b. ^a	MS, UV

^a n.b.: Nicht bestimmt, d.h. es waren keine entsprechenden Literaturangaben zu finden.

Zu jedem der Stämme konnten nun die molekularen Daten über Biosynthesegenfragmente mit den chemischen Daten verknüpft werden. Aufgrund der geringen Länge der Sequenzen war eine Aussage vom Gen ausgehend problematisch. Die zugehörigen Sekundärmetabolite konnten aus der Fragmentinformation nicht abgeleitet werden. Diese Information reichte jedoch aus, um eine Korrelation zwischen dem Vorhandensein der jeweiligen Biosynthesegenfragmente und den grundsätzlichen strukturellen Eigenschaften der identifizierten Metabolite herzustellen.

So waren aromatische Polyketide in 13 Stämmen aufgrund der Typ II PKS-Sequenz zu erwarten. Die Produktion von Polyketiden konnte in drei dieser Stämme beobachtet werden: Stamm HB320 produzierte die aromatischen Polyketide Antibiotic K 502A und Blanchaquinon. Die Stämme HB062 und HB202 wiesen Verbindungen auf, deren Massen- und UV-Daten auf ein aromatisches Polyketid schließen ließen. Für Stamm HB202 konnte im Verlauf der gesamten Arbeit diese Annahme bestätigt und ein neues aromatisches Polyketid aufgeklärt werden (Abschnitt 4.4.1). Somit zeigte dieser Ansatz aus genetischer und chemischer Untersuchung bereits erste Erfolge bei der Suche nach neuen, biologisch aktiven Sekundärmetaboliten und legte den Grundstein für weitere pharmazeutisch aber auch ökologisch interessante Fragestellungen.

In den zehn weiteren Typ II PKS-Sequenz-positiven Stämmen konnte allerdings kein aromatisches Polyketid unter den angewandten Kultivierungsbedingungen detektiert werden. Wie für das Mayamycin aus Stamm HB202 (Abschnitt 4.4.1) gezeigt, war das Auftreten des entsprechenden aromatischen Polyketides unter anderen Bedingungen aber gegeben.

Allerdings konnten aromatische Polyketide auch in Typ II PKS-Sequenz negativen Stämmen nachgewiesen werden. So trat in den Stämmen HB116, HB118 und HB157 das aromatische Polyketid Fredericamycin und in Stamm HB184 das aromatische Polyketid Enterocin auf.

Peptide konnten in elf der 20 *Actinomycetales* Stämme nachgewiesen werden, welche ein NRPS-Genfragment zeigten. So produzierte beispielsweise Stamm HB238 Massetolid K (Tabelle 3), ein bekanntes Lipopeptid, für welches die Biosynthese mittels NRPS bereits nachgewiesen wurde. Alle Stämme, die im Rohextrakt ein Peptid aufwiesen, hatten ebenfalls ein Amplifikat bei dem NRPS-PCR-Experiment. Es wurde also kein Peptid in einem NRPS-PCR-negativen Bakterium gefunden.

4.2.3.4 Chemische Analyse des Schwammextraktes

In dem methanolischen Extrakt des Schwammes *H. panicea* traten neben anderen Metaboliten, welche allerdings nicht näher charakterisiert wurden, zwei Substanzen auf, welche zuvor bereits in dem Extrakt des Stammes HB243 gefunden wurden: Fosfazinomycin und Tobramycin. Beide Sekundärmetabolite kamen nur in geringer Menge in dem Schwammextrakt vor, konnten aber mithilfe der HPLC-MS-Informationen identifiziert werden.

4.2.3.5 Antimikrobielle Aktivität der Kulturextrakte und ausgewählter Reinsubstanzen

Das erste Kriterium bei der Auswahl der 46 *Actinomycetales* Stämme war eine antimikrobielle Aktivität im Überschichtungstest während der Isolierung der Reinkulturen. Methanolische Extrakte aus den 100 mL-Kulturen dieser Reinkulturen zeigten nur noch zu 67 % eine Aktivität (d. h., Extrakte von 31 Stämmen) gegen mindestens einen der Testorganismen (Tabelle 5). Dieses kann durch die unterschiedlich ausgeführten Testansätze erklärt werden, da im Grunde unterschiedliche Phänomene beobachtet wurden und durch die Extraktion ein ganz bestimmtes (wenn auch breites) Substanzspektrum aus den Bakterien isoliert wurde. Auch die Möglichkeit einer Stimulierung der Substanzproduktion erst durch die Anwesenheit eines Antagonisten war bei dem Überschichtungsversuch gegeben. Daher wurden im Weiteren nur die Bioaktivitäten der Extrakte und ausgewählter Reinsubstanzen betrachtet.

Bei den mit den Extrakten durchgeführten Bioaktivitätstests traten häufig Aktivitäten gegen *B. subtilis* (44 %), *S. lentus* (33 %), *R. solanacearum* (24 %) und *C. glabrata* (26 %) auf. Weniger zahlreich waren Aktivitäten gegen *E. coli* (9 %), *P. fluorescens* (7 %), *P. syringae* (9 %), *X. campestris* (15 %) und *E. amylovora* (9 %). Die Extrakte zeigten insgesamt 18 unterschiedliche Aktivitätsmuster, von keiner Aktivität bis zu Aktivitäten gegen immerhin sieben von neun Teststämmen. In 15 Extrakten konnte keine antimikrobielle Aktivität nachgewiesen werden. Acht (53 %) dieser 15 Extrakte zeigten entsprechend keine Substanzen im Chromatogramm (Tabellen 1 und 5). Für elf (73 %) dieser 15 Extrakte konnte weder ein NRPS- noch ein Typ II PKS-PCR-Produkt amplifiziert werden. Sieben dieser 15 Extrakte (47 %) wiesen weder antimikrobielle Aktivität noch eine Substanz auf.

Um die Wechselbeziehung zwischen der antimikrobiellen Aktivität der Rohextrakte und den vorkommenden Sekundärmetaboliten zu überprüfen, wurden aufgrund guter Ausbeute und guter Reproduzierbarkeit die Stämme HB100, HB157 und HB288 für die Isolierung ausgesuchter Reinsubstanzen ausgewählt. Anschließend wurde deren Wirkung gegen die Teststämmen untersucht. Die antimikrobielle Aktivität der Rohextrakte deckte sich mit denen der Reinsubstanzen. Beispielsweise zeigte der Rohextrakt von Stamm HB100 Wirkung gegen *R. solanacearum*, was ebenfalls zu der Aktivität des aus HB100 isolierten Oxazolomycins passte. Zusätzlich ist dieses auch in der Literatur beschrieben ^[Kanzaki et al. 1998]. Die Rohextrakte der Stämme HB157 und HB288 hemmten das Wachstum der Hefe *C. glabrata*, was wiederum zum Auftreten der Antimycine A₀ bis A₄ passte, welche ebenfalls ein identisches Aktivitätsmusters aufwiesen.

4.2.3.6 Suche nach biologischen Aktivitäten der identifizierten Substanzen in der Literatur

Für die meisten Substanzen, die im Rahmen dieser Arbeit identifiziert wurden, konnten bei einer umfassenden Literaturrecherche bereits bekannte biologische Aktivitäten gefunden werden (Tabellen 3 und 4). Dazu gehören antibakterielle, antimykotische, zytotoxische, immunsuppressive, antivirale und algizide Eigenschaften, wobei Aktivitäten gegen Pilze und

Gram-positive Bakterien sowie zytotoxische Eigenschaften am häufigsten beschrieben wurden. Dennoch konnten für einige Metabolite auch eher ungewöhnliche Aktivitäten gezeigt werden, so kann beispielsweise Rotihibin B aus Stamm HB238 Einfluss auf das Wachstum von Pflanzen nehmen. Das vermehrte Auftreten eher üblicher biologischer Aktivitäten hat seinen Ursprung wahrscheinlich in der Benutzung eher üblicher Testsysteme und lässt daher nur eingeschränkt das Wirkspektrum erraten. Die einzelnen ungewöhnlichen Aktivitäten deuten auf ein deutlich breiteres Wirkspektrum hin.

4.2.3.7 Vergleich der Aktivitäten der Extrakte mit den aus der Literatur bekannten Aktivitäten der identifizierten Substanzen

Beim Vergleich der antimikrobiellen Aktivitäten der Kulturextrakte (Tabelle 5) mit Daten aus der Literatur (Tabellen 3 und 4) bezüglich der biologischen Aktivität der aus den Extrakten identifizierten Sekundärmetabolite war es möglich, die Aktivität von 29 (von 31) Rohextrakten mit in der Literatur beschriebenen Aktivitäten der identifizierten Substanzen in einen Zusammenhang zu bringen (Tabelle 5). Die breite antimikrobielle Aktivität mancher Extrakte gegen mehr als einen Teststamm kann durch das Vorhandensein einer Substanz mit Breitbandantibiotikumcharakter oder das Auftreten mehrerer Substanzen mit unterschiedlichen Wirkungen erklärt werden. Beispielsweise wurden in Stamm HB107 zwei als antibakteriell und als zytotoxisch beschriebene Substanzen identifiziert (Tabelle 3); der Extrakt zeigte breite Aktivität, welche durch diese Substanzen erklärt werden konnte. Hingegen wies Stamm HB132 biologische Aktivitäten gegen mehrere Testbakterien auf, es konnten jedoch lediglich zwei als antimykotisch beschriebene Metabolite – Venturicidin A und Irumamycin – im Chromatogramm identifiziert werden (Tabellen 3 und 5). Dieses könnte ein möglicher Hinweis auf eine bisher unbekannte Substanz oder aber auf unidentifizierte Bioaktivitäten sein. Diese Annahme geht einher mit dem Auftreten eines bisher nicht identifizierten Metaboliten im Extrakt des Stammes HB132.

Tabelle 5: Antimikrobielle Aktivitäten der Extrakte der *Actinomycetales* Stämme^a in Gegenüberstellung zu den in der Literatur beschriebenen biologischen Aktivitäten der in den Extrakten enthaltenen Sekundärmetabolite.

Stamm	Aktivitäten gegen									Festgestellte antimikrobielle Aktivität	
	<i>S.l.</i>	<i>B.s.</i>	<i>E.c.</i>	<i>P.fl.</i>	<i>C.g.</i>	<i>P.s.</i>	<i>X.c.</i>	<i>E.a.</i>	<i>R.s.</i>	Untersuchung der Extrakte	Angaben zu den bekannten Substanzen in der Literatur
HB062	X									X	X
HB084		X								X	X
HB094											
HB095		X								X	X
HB096		X								X	X
HB099											
HB100									X ^b	X	
HB101											
HB102											X
HB105		X								X	X
HB107		X	X	X	X	X	X		X	X	X
HB108											
HB110											
HB113											X
HB114											
HB115											
HB116		X								X	X
HB117	X	X			X				X	X	X
HB118		X								X	X
HB122	X	X								X	X
HB132	X	X	X	X	X		X	X		X	X
HB138	X	X				X	X			X	X
HB140											X
HB142					X				X	X	
HB149	X				X					X	
HB156					X				X	X	X
HB157					X ^b					X	X
HB181		X								X	X
HB184	X	X								X	X
HB200											

Actinomyceten aus *Halichondria panicea* – Molekularbiologische und chemische Untersuchungen
Ergebnisse

Stamm	Aktivitäten gegen									Festgestellte antimikrobielle Aktivität	
	<i>S.l.</i>	<i>B.s.</i>	<i>E.c.</i>	<i>P.fl.</i>	<i>C.g.</i>	<i>P.s.</i>	<i>X.c.</i>	<i>E.a.</i>	<i>R.s.</i>	Untersuchung der Extrakte	Angaben zu den bekannten Substanzen in der Literatur
HB202	X	X		X			X	X		X	X
HB238									X	X	X
HB241											
HB243											X
HB253	X	X	X		X		X		X	X	
HB254									X	X	
HB272	X	X				X			X	X	X
HB274					X				X	X	X
HB288	X ^b				X ^b					X	X
HB291							X			X	X
HB298	X	X	X		X	X	X	X		X	X
HB320											
HB328	X	X						X		X	X
HB375	X	X			X				X	X	X
HB381											
HB383	X	X								X	
Anzahl der Extrakte mit Aktivität	15	20	4	3	12	4	7	4	11	31	29
% der Extrakt mit Aktivität	33 %	44 %	9 %	7 %	26 %	9 %	15 %	9 %	24 %	67 %	63 %

^a X zeigt ein positives Ergebnis (>50 % Inhibition) bei der Untersuchung der antimikrobiellen Aktivität an.

^b Korrelation zwischen dem Ergebnis des biologischen Assays des Rohextraktes mit der Aktivität der aus diesem Extrakt isolierten Reinsubstanz.
S.l. *Staphylococcus lentus*; *B.s.* *Bacillus subtilis*; *E.c.* *Escherichia coli*; *P.fl.* *Pseudomonas fluorescens*; *C.g.* *Candida glabrata*; *P.s.* *Pseudomonas syringae*; *X.c.* *Xanthomonas campestris*; *E.a.* *Erwinia amylovora*; *R.s.* *Ralstonia solanacearum*.

4.2.4 DISKUSSION

Obwohl das Vorkommen von Mikroorganismen in marinen Schwämmen gut untersucht wurde, ist die Funktion ihrer mikrobiellen Sekundärmetabolite bis heute nur wenig verstanden. Angenommen wird, dass diese Substanzen eine entscheidende Rolle bei der biologischen Interaktion in der Lebensgemeinschaft mit dem Schwamm spielen. Um einen besseren Einblick in die Fähigkeiten zur Synthese von biologisch aktiven Metaboliten zu erhalten und um ihre ökologische Aufgabe besser verstehen zu können, wurden eine Reihe von *Actinomycetales* Stämmen aus dem marinen Schwamm *H. panicea* isoliert und hinsichtlich verschiedener Aspekte wie der phylogenetischen Herkunft, dem chemischen Profil, der biologischen Aktivität sowie dem genetischen Biosynthesepotential untersucht. Anschließend wurden diese einzelnen Gesichtspunkte im Zusammenhang betrachtet.

4.2.4.1 Wechselbeziehung zwischen dem Vorhandensein von Biosyntheseegenfragmenten und dem jeweiligen Sekundärmetabolitprofil

Die Mehrzahl der von *Actinobacteria* synthetisierten Metabolite sind komplexe Polyketide oder nicht-ribosomale Peptide. Ihre Funktion in der Natur ist bis heute noch nicht wirklich verstanden. Es wird vermutet, dass nicht-ribosomale Peptide als Verteidigung des eigenen Lebensraumes gegen konkurrierende Mikroorganismen dienen. Bekannt ist mittlerweile, dass einige NRPs wie beispielsweise die Mycobactine als sogenannte Siderophore (also eisenbindende Substanzen mit komplexbildenden Eigenschaften) fungieren, welche den Mikroorganismen ermöglichen, die sonst geringe Bioverfügbarkeit von Fe^{3+} -Ionen zu ihrem Vorteil zu erhöhen [Snow 1970]. Im Falle der Polyketide wird angenommen, dass sie als Pigmente, Virulenzfaktoren, Boten- und Abwehrstoffe fungieren [Hertweck 2009].

Die große Anzahl der NRPS- bzw. PKS-Gencluster im Vergleich zu anderen Biosyntheseegenclustern wird besonders ersichtlich bei näherer Betrachtung einiger actinobakterieller Genome [Bentley et al. 2002; Ikeda et al. 2003], wie dem von *Streptomyces coelicolor* oder *S. avermitilis*. Für beide Stämme wurden insgesamt jeweils 20 bzw. 25 verschiedene Gencluster für die Biosynthese von Sekundärmetaboliten identifiziert [Bentley et al. 2002; Ikeda et al. 2003; Bode & Müller 2005]. Von diesen Genclustern kodieren 8 bzw. 16 für die Biosynthese von NRPs oder PKs. Die anderen Gencluster sind für die Synthese von weiteren Naturstoffen, wie beispielsweise Terpenen verantwortlich. Interessanterweise sind bis heute nur wenige Sekundärmetabolite (4 bzw. 3) aus diesen beiden Streptomyceten isoliert worden. Es ist also anzunehmen, dass ein Stamm häufig mehr Substanzen hervorbringen kann, als bei ersten Untersuchungen zu erkennen ist. Außerdem kann vermutlich von dem Vorkommen eines Genclusters des Sekundärmetabolismus auf das Vorhandensein weiterer geschlossen werden. So wurde in der vorliegenden Arbeit angenommen, dass ein positives Ergebnis bei der genetischen Untersuchung bezüglich NRPS und/oder Typ II PKS einen guten Indikator für das Vorhandensein weiterer Sekundärmetabolitgencluster darstellte und somit auch den Hinweis auf die Anlage zur

Produktion weiterer Naturstoffe lieferte. Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigten diese Annahme, da in den Stämmen mit einem positiven genetischen Ergebnis mehr und strukturell diversere Naturstoffe auftraten. Zusätzlich konnten im weiteren Verlauf neue Substanzen identifiziert werden, auf deren Vorhandensein sich erst durch diese kombinierte Untersuchung schließen ließ. Ein solcher Ansatz ist also ein vielversprechendes Mittel, um pharmazeutisch und ökologisch interessante Naturstoffe und deren Produzenten zu untersuchen.

Das Fehlen eines NRPS- bzw. Typ II PKS-Genfragmentes belegt hingegen nicht sicher die Abwesenheit eines solchen Genclusters im Genom. Beispielsweise konnte für die Typ II PKS-PCR-negativen Stämmen HB116, HB118 und HB157 das aromatische Polyketid Fredericamycin A nachgewiesen werden. Allerdings beinhaltet das Gencluster von Fredericamycin A eine ungewöhnliche KS_{α} -Domäne [Wendt-Pienkowski et al. 2005], die anscheinend mit dem verwendeten Primersystem nicht amplifiziert werden konnte. Dieses ergab auch ein nachfolgender Vergleich der hier verwendeten Primersequenz mit der Sequenz des Fredericamycin A-Genclusters. Es waren keine Homologien vorhanden. Das Gleiche gilt für die Primärsequenz des Enterocins, welches im Extrakt des Stammes HB184 auftrat. Auch hierbei liegen ungewöhnliche PKS-Gene vor [Piel et al. 2000]. Insgesamt ist das verwendete Primersystem nur für die Suche nach „normalen“ aromatischen Polyketiden geeignet. Um außergewöhnliche aromatische Polyketide zu finden, ist dieses nicht die richtige Strategie. Dennoch sollte das Auffinden von ungewöhnlichen und damit eventuell neuen Sekundärmetaboliten durchaus Teil eines solchen Ansatzes sein. Allerdings konnten in dieser Arbeit mit der genetischen Vorauswahl Stämme selektiert werden, welche chemisch und antibiotisch diverser und produktiver waren als solche Stämme, die kein positives genetisches Ergebnis zeigten. Alle - bis auf einen – genetisch-positiv getesteten Stämme waren nicht nur in der Lage, Sekundärmetabolite zu produzieren, sondern taten dieses auch in einer höheren Anzahl und mit einer größeren strukturellen Diversität. Im Gegensatz dazu produzierten Stämme mit einem negativen PCR-Ergebnis weniger Naturstoffe, die darüber hinaus auch eine geringere Strukturvariabilität aufwiesen und deren Kulturextrakte weniger antimikrobielle Aktivitäten zeigten. Außerdem war die Anzahl der Stämme, welche gar keine Substanzen produzierten, viel höher und die Anzahl der eventuell neuen Metabolite viel geringer. Damit ist dieser genetische Ansatz trotz der Einschränkungen des gewählten Primersystems ein vielversprechendes Werkzeug zur Auswahl produktiver Stämme.

4.2.4.2 Ökologische Rolle der Naturstoffe: Nützliche Effekte

Ein Schwamm und seine Bakterien leben in enger Gemeinschaft [Thiel et al. 2007]. In dieser Assoziation kommen *Actinobacteria* in einer größeren Anzahl vor als in marinem Bakterioplankton [Imhoff & Stöhr 2003; Hentschel et al. 2006]. Dieses führt zu der Annahme, dass *Actinobacteria* in der Schwammgemeinschaft nicht zufällig vorkommen, sondern vom Wirt selektiert werden. *Actinobacteria* zeigen ein enormes Potential zur Produktion von Sekundärmetaboliten in einer Bakterien-Invertebraten-Gemeinschaft [Kim et al. 2005; Bull & Stach 2007; Taylor et al. 2007; Hardoim et al. 2009]. Das scheint vorteilhaft, für das Überleben der involvierten Organismen zu

sein. Damit könnte eine mögliche Funktion der Substanzen die chemische Verteidigung des Wirtsorganismus sein [Hentschel et al. 2006]. Im Hinblick auf sessile Schwämme kann die Art der Angreifer von pathogenen Bakterien über ebensolche Pilze bis hin zu Makroorganismen reichen, welche versuchen, die Oberfläche des Schwammes zu besiedeln oder sich von dem Schwamm zu ernähren. Die sessile Lebensweise von *H. panicea* und anderen Schwämmen lässt nur begrenzte Möglichkeiten der Verteidigung zu, eine davon ist die chemische. Die Bandbreite der biologischen Aktivitäten der in dieser Studie identifizierten Substanzen passt zu ebendieser ökologischen Situation.

Antibakterielle Wirkstoffe wie die Streptophenazine (Stamm HB202) und die verschiedenen Streptomycine (Stämme HB062, HB113 und HB138) schützen die *Actinomycetales* und ihren Wirt gegen andere Bakterien [Fehr et al. 1977; Wallace et al. 1979; Webb et al. 2006; Mitova et al. 2008]. Der Schutz vor Pilzen, welche möglicherweise zusätzlich als Nahrungskonkurrenten für die Bakterien auftreten, kann durch die Produktion von antimykotischen Substanzen wie Pyrocoll (Stämme HB117, HB122 und HB238) gewährleistet werden [Dietera et al. 2003]. Viele der identifizierten Metabolite zeigen zytotoxische Aktivitäten: Streptazon B₁ [Puder et al. 2000] (Stämme HB117, HB122 und HB291), Fredericamycin A [Warnick-Pickle et al. 1981] (Stämme HB116, HB118 und HB157) sowie Daryamid C [Asolkar et al. 2006] (Stamm HB272). Diese Naturstoffe könnten einen Schutz vor verschiedenen eukaryotischen Antagonisten wie Protisten oder Vertebraten bieten. Ebenso könnten diese zytotoxischen Substanzen die *Actinomycetales* vor dem Verdau durch den Schwamm schützen. Insektizide und andere Wirkstoffe gegen Vertebraten und Invertebraten, beispielsweise das Antimycin A₁ [Barrow et al. 1997] (Stämme HB157, HB181 und HB288), das Bafilomycin [Kretschmer et al. 1985] (Stamm HB181) sowie das Streptomycin [Wallace et al. 1979] (Stamm HB113), könnten den Schwamm vor Fraßfeinden schützen. Antioxidative Wirkstoffe wie das Phenazin Aestivophoenin C (Stamm HB122) verhindern die Oxidation von sensitiven Molekülen [Kunigami et al. 1998], indem sie als Radikalfänger den Zellkern bzw. die Zellmembran schützen. Außerdem ist bekannt, dass redoxaktive Sekundärmetabolite zusätzliche Eigenschaften aufweisen, zu denen z. B. die Veränderung der Koloniemorphologie bei *Pseudomonas aeruginosa* gehört [Dietrich et al. 2008]. Ebenso ist bekannt, dass Phenazine neben ihren antibiotischen Aktivitäten auch eine Funktion bei der Signalweitergabe von Zelle zu Zelle haben [Dietrich et al. 2006]. Damit könnten diese Antioxidantien durchaus eine Rolle bei der Wachstumsregulation sowie bei der Zusammensetzung eines Biofilms in *H. panicea* spielen. Phytotoxische Substanzen und Algizide wie Oxazolomycin [Kanzaki et al. 1998] (Stamm HB100) können den Schwamm vor Aufwuchs durch Mikroalgen schützen. Pyrocoll [Dietera et al. 2003] (Stämme HB117, HB122 und HB238) und weitere Wirkstoffe gegen Protozoen, wie Antibiotic X 14931 A (Stamm HB113), könnten verhindern, dass die bakterielle Flora durch Protozoen verdaut wird. Alles in allem scheinen die Naturstoffe, welche von den *Actinomycetales* in *H. panicea* produziert werden, den Schwamm und seine assoziierten Mikroorganismen vor Antagonisten zu schützen. Actinobakterielle Metabolite scheinen das Gleichgewicht des mikrobiellen Biofilms im Schwamm durch Hemmung des Wachstums von unerwünschten Mikroorganismen zu unterstützen.

4.2.4.3 Ökologische Rolle der Naturstoffe: Schädliche Effekte

Neben den nützlichen Effekten der Interaktion werden von den *Actinobacteria* aus *H. panicea* auch Substanzen gebildet, welche möglicherweise einen schädlichen Einfluss auf den Schwamm haben. Zum Beispiel produziert Stamm HB181 Bafilomycin D [Kretschmer et al. 1985], dieses ist für seine inhibierende Wirkung gegenüber der ATPase bekannt. Die Stämme HB117, HB122, HB181, HB291 und HB328 synthetisieren die zytotoxischen Substanzen Senacarcin A [Nakano et al. 1982] und Pyrocoll [Dietera et al. 2003]. Diese Naturstoffe könnten nicht nur Einfluss auf mögliche Feinde, sondern auch auf den Schwamm selbst haben. Wenigstens könnten diese zytotoxischen Substanzen die *Actinomycetales* vor dem Verdau durch den Schwamm schützen. Pilze, Viren, Alphaproteobakterien, Cyanobakterien und Bakterien der Gattungen *Bacillus* und *Pseudomonas* sind als mögliche Pathogene gegenüber Schwämmen bekannt [Webster 2007]. Bis heute wurden *Actinobacteria* nicht als Schwammpathogene identifiziert, darum ist anzunehmen, dass die von ihnen produzierten Sekundärmetabolite einen positiven Effekt auf die Gemeinschaft haben.

4.2.4.4 Biologische Quelle der Naturstoffe

In der Vergangenheit wurden viele Naturstoffe beschrieben, deren biosynthetischer Ursprung im Schwamm zu liegen schien. Von vielen ist heute bekannt, dass sie von Schwamm-assoziierten Bakterien produziert werden [Piel et al. 2004]. Beispielsweise werden Theopederin A und Onnamid A nicht wie zunächst angenommen von dem Schwamm *Theonella swinhoei*, sondern von einem bisher unkultivierbaren bakteriellen Symbionten produziert [Butzke & Piel 2006]. Das wirft zwangsläufig die Frage auf, ob Schwamm-assoziierte *Actinomycetales* eine große Anzahl der Naturstoffe produzieren, die bis jetzt als Biosyntheseprodukte des Schwammes galten. Allerdings sind als Produzenten fast aller Substanzen, die in dieser Arbeit identifiziert wurden, ebenfalls Vertreter aus der Gruppe der *Actinobacteria* beschrieben. Nur zwei der Metabolite wurden zuvor bereits aus einem Schwamm isoliert. Zum einen wurde 1-Epimanzamin D, eigentlich aus dem Schwamm *Stylorella agminata* bekannt [Kinnel et al. 1993], hier in Stamm HB113 nachgewiesen. Mittlerweile ist neben einer ganzen Anzahl von Manzaminstrukturen aus Schwämmen auch das Vorkommen eines Manzamins in einem Actinomyceten nachgewiesen worden [Hill et al. 2003]. Zum anderen konnte in der vorliegenden Arbeit die Produktion von Coproporphyrin in *Streptomyces* Stamm HB100 nachgewiesen werden. Coproporphyrine sind aus Schwämmen ebenso wie aus Bakterien bekannt [Toriya et al. 1993]. Allerdings bleibt es ungewiss, ob alle Substanzen, die unter Laborbedingungen von den *Actinomycetales* synthetisiert wurden, ebenfalls in der natürlichen Umgebung des Schwammes produziert werden. Es ist nicht bekannt, welche Faktoren diese Produktion essentiell beeinflussen und ob die Naturstoffe in den entsprechenden Konzentrationen vorliegen, um in der Umwelt als antimikrobielle Substanzen oder andere biologische Inhibitoren interagieren zu können. In diesem Zusammenhang ist es interessant zu erwähnen, dass während der letzten Jahre immer wieder angenommen wurde, dass mikrobielle Sekundärmetabolite die Transkription anderer Sekundärmetabolit-biosynthesegene beeinflussen können, so dass sie nicht oder nicht nur als Antibiotika, sondern in niedrigen Konzentrationen vor

allem als eine Art Signalmoleküle fungieren ^[Mitova et al. 2008]. Das könnte dazu führen, dass viele Naturstoffe im Schwamm in Mengen produziert werden, die unterhalb der Nachweisgrenze liegen. Außerdem muss darauf hingewiesen werden, dass *in situ* zu jedem Zeitpunkt spezifische chemische Profile ausgebildet werden, welche von denen auf den Schwamm Einfluss nehmenden Umweltfaktoren abhängig sind. D.h., Mikroorganismen produzieren nicht alle zur gleichen Zeit in vergleichbaren Mengen alle ihre Sekundärstoffe. Außerdem sind Schwämme heterogene Organismen, deren assoziierte mikrobielle Gemeinschaft manchmal durchaus variabel sein kann. Diese Faktoren beeinflussen die Gesamtanzahl und die Konzentration der zu einem bestimmten Zeitpunkt produzierten Sekundärmetabolite einer Mikroorganismen-Schwamm-Gemeinschaft.

Bis jetzt konnten in der Tat einige bakterielle Naturstoffe direkt im Schwammgewebe nachgewiesen werden ^[Piel 2004; Piel et al. 2004; Kim & Fuerst 2006]. Dieses kann als Beweis dienen, dass bakterielle Naturstoffe *in situ* auftreten, und zwar auch in solchen Konzentrationen, in denen sie eine biologische Aktivität haben.

Passend dazu zeigten erste chemische Analysen eines *H. panicea* Rohextraktes das Vorhandensein von Massen, welche im Vorfeld bereits in *Micromonospora* Stamm HB243 aufgetreten waren. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass einige der in dieser Arbeit identifizierten Substanzen durchaus in der Schwammgemeinschaft in ausreichender Menge produziert werden, um dort biologisch aktiv zu sein.

4.2.5 ZUSAMMENFASSUNG

Aus dem marinen Schwamm *H. panicea* wurden Vertreter der *Actinomycetales* isoliert. Zum ersten Mal wurde eine Studie durchgeführt, welche Daten zur Produktion von Sekundärmetaboliten, zu ihrer biologischen Aktivität, zum Vorhandensein von Genfragmenten der Typ II PKS und der NRPS sowie zur phylogenetischen Einordnung erhob und verknüpft. Zunächst wurden alle Isolate mittels 16S rRNA PCR phylogenetisch identifiziert und konnten den Gattungen der *Actinoalloteichus*, *Micrococcus*, *Micromonospora*, *Nocardiopsis* und *Streptomyces* zugeordnet werden. Das chemische Profil sowie die Bioaktivität der 46 actinobakteriellen Stämme wurden untersucht und 122 unterschiedliche Substanzen konnten identifiziert werden. Zusätzlich traten 88 bis dato unbekannte Sekundärmetabolite in den Rohextrakten auf. Die meisten der Rohextrakte waren biologisch aktiv. Um das Gesamtbild abzurunden, wurde zusätzlich das Vorhandensein der Biosynthesegene der Typ II PKS sowie der NRPS untersucht. Ein Typ II PKS- und/oder ein NRPS-Genfragment konnte in 30 Stämmen amplifiziert werden. Es wurde gezeigt, dass Stämme, bei denen ein solches Genfragment vorhanden war, eine größere Anzahl an Substanzen, auch eine größere Anzahl an unbekanntem – eventuell neuen Substanzen - produzierten. Daher scheint das Vorhandensein eines Typ II PKS- und/oder eines NRPS-Genfragmentes ein gutes Kriterium für die Vorauswahl von Sekundärmetabolit-produzierenden Stämmen zu sein.

4.3 STIMULATIONSVERSUCHE MIT DREI AUSGEWÄHLTEN ACTINOMYCETEN

4.3.1 EINLEITUNG

Im Laufe der Arbeit haben sich drei Actinomyceten Stämme von *H. panicea* als besonders interessant herausgestellt: *Streptomyces* sp. HB202, *Micromonospora* sp. HB254 und *Nocardioopsis* sp. HB383. Die Extrakte aller drei Actinomycetales Stämme zeigten biologische Aktivitäten (Tabelle 5), bei den Stämmen HB202 und HB383 konnten zusätzlich NRPS- bzw. Typ II PKS-Genfragmente amplifiziert werden (Tabelle 2). Auch hinsichtlich ihres chemischen Profils zeigten sich alle drei Stämme vielversprechend. Für Stamm HB202 wurden bereits, in verschiedenen Stimulationsversuchen von ^[Mitova et al. 2008], acht neue Phenazine und der Phenazin-1,6-dicarboxylsäure-4,9-dimethylester beschrieben (Abb. 11). Hingegen konnten bis jetzt keine Produkte der NRPS bzw. der Typ II PKS nachgewiesen werden (Tabelle 3). Allerdings gab es in der vorausgehenden Analyse (Abschnitt 4.2) bereits einen ersten Hinweis auf das Vorhandensein eines noch unidentifizierten aromatischen Polyketids in *Streptomyces* HB202. Den in den Stämmen HB254 und HB383 aufgetretenen Massen- und UV-Daten konnten keine bekannten Substanzen zugeordnet werden. Aus den genannten Gründen wurden diese drei Stämme ausgewählt, um Kultivierungs- und Stimulierungsversuche durchzuführen. Dabei sollte beobachtet werden, inwieweit sich das chemische Profil der einzelnen Stämme aus den drei unterschiedlichen Gattungen verändern und erweitern ließ. Zusätzlich sollte versucht werden, die bis jetzt noch unbekanntem Sekundärmetabolite zu isolieren und anschließend zu charakterisieren.

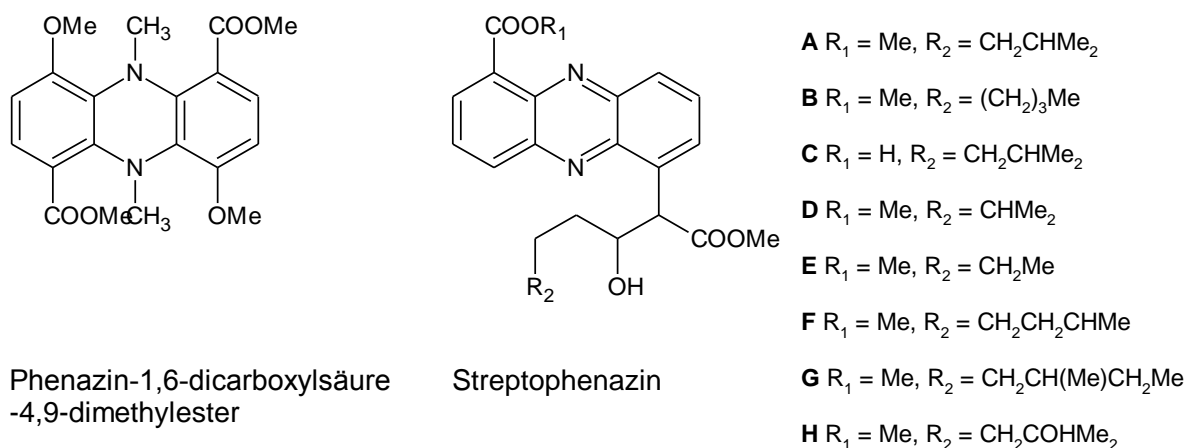


Abb. 11: Der bekannte Phenazin-1,6-dicarboxylsäure-4,9-dimethylester sowie die Streptophenazine A - H aus dem *Streptomyces* sp. HB202.

Ein Stamm hat häufig mehr Potential zur Bildung von Sekundärmetaboliten als aus einem einzigen Experiment ersichtlich wird. So wird angenommen, dass er viele Substanzen bilden kann, diese aber jeweils nur unter bestimmten Bedingungen, z.B. Stresssituationen, produziert ^[Bode et al. 2002]. Beispielsweise löste der Stress durch Zugabe von Ethanol bzw. durch Herbeiführen einer Hitzeschockreaktion die Produktion des aromatischen Polyketides Jadomycin B in *Streptomyces venezuelae* aus ^[Doull et al. 1993].

2002 beschrieben [Bode et al. 2002] das von vielen Arbeitsgruppen untersuchte und verwendete Prinzip, welches zeigt, dass ein Stamm in der Lage ist, viele Substanzen zu produzieren. Diese Substanzproduktion ist durch das Verändern der Kulturbedingungen ungezielt, aber erfolgreich und einfach stimulierbar. Mit diesem sogenannten OSMAC-Prinzip war es möglich, aus nur sechs Stämmen mehr als 100 Substanzen aus 25 strukturell unterschiedlichen Gruppen zu isolieren [Bode et al. 2002]. In der theoretischen Erweiterung des OSMAC-Ansatzes wird aufgezeigt, dass jeder einzelne Biosyntheseschritt auf Transkriptions-, Translations- sowie auf Enzymebene beeinflussbar ist. So können durch Kombination aus gezielter genetischer Informationssuche und anschließender Variation der Kultivierungsbedingungen viele neue Naturstoffe in einem Mikroorganismus gefunden werden [Bode & Müller 2005]. Medienzusammensetzung, Sauerstoffsättigung, Temperatur, Kultivierungsgefäße und pH-Wert können leicht variiert werden. Hierdurch werden sozusagen die Umweltbedingungen des Bakteriums geändert und eine Reaktion darauf (in Form von Metabolitbildung) kann erfolgen [Firm & Jones 2003]. Allerdings ist es bis jetzt noch schwierig, gezielt bestimmte Substanzen zur Produktion anzuregen, da das komplexe Netzwerk der Regulation des Sekundärmetabolismus zu wenig verstanden ist. Erste Erkenntnisse bezüglich dieser Regulation auch in *Actinobacteria* konnten allerdings über die Jahre gesammelt werden (Abb. 12).

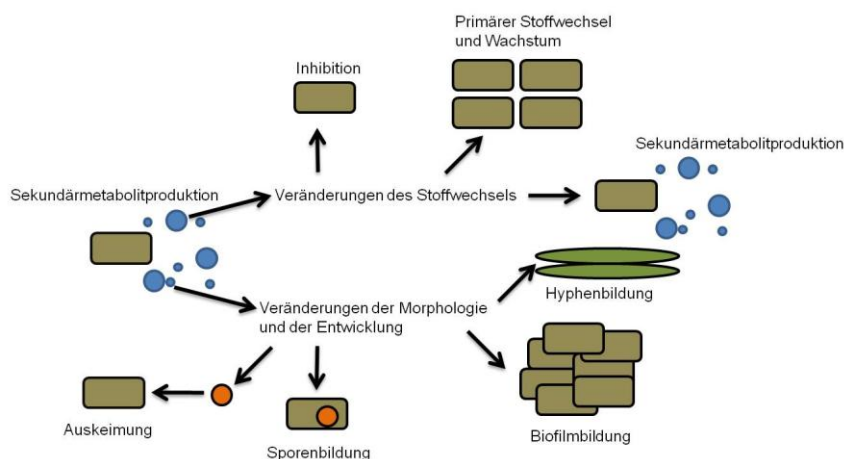


Abb. 12: Mögliche Auswirkungen von Sekundärmetaboliten auf das Verhalten anderer Zellen, modifiziert nach [Shank & Kolter 2009].

Die Möglichkeiten, welche der OSMAC-Ansatz bietet, sollten in diesem Teil der Arbeit näher untersucht werden, um so einen Eindruck des chemischen Potentials und der Stimulierbarkeit der drei ausgewählten Actinomyceten Stämme zu erhalten.

4.3.2 MATERIAL UND METHODEN

4.3.2.1 Stämme

Aufgrund der durchgeführten Vorarbeiten wurden die folgenden drei actinobakteriellen Stämme ausgewählt (Abb. 13-15).



Abb. 13: *Streptomyces* sp. HB202 auf GYM4-Medium nach 10 Tagen Wachstum bei 28°C.

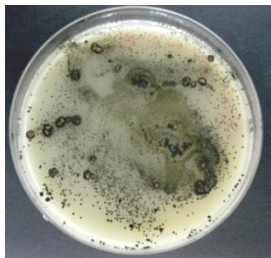


Abb. 14: *Micromonospora* sp. HB254 auf GYM4-Medium nach 14 Tagen Wachstum bei 28°C.

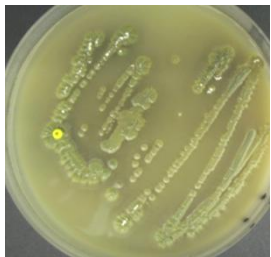


Abb. 15: *Nocardiopsis* sp. HB383 auf GYM4-Medium nach 10 Tagen Wachstum bei 28°C.

4.3.2.2 Kultivierungs- und Stimulationsversuche

Um den Einfluss unterschiedlicher Parameter wie Temperatur, Salzkonzentration und –art (Tabelle 6) sowie die Zugabe verschiedener Signalmoleküle auf die drei Stämme zu untersuchen, wurden zunächst von allen Stämmen Vorkulturen hergestellt, indem die jeweilige Kryokonservierung auf GYM4-Agarplatten ausgestrichen und für drei bis vier Wochen bei 28°C inkubiert wurde. Für die Anzucht der jeweiligen 25 mL GYM4-Flüssigkultur in einem 100 mL Erlenmeyerkolben wurde von der Agarplatte eine Impföse Bakterienmaterial verwendet. Alle Kulturen wurden im Dunkeln bei 28°C und 120 rpm geschüttelt. Die Variationen der Kultivierungsbedingungen gegenüber dem Basisversuch sind in Tabelle 6 dargestellt. Die Stämme HB202 und HB383 wurden für sieben Tage kultiviert. Aufgrund des langsameren Wachstums wurde Stamm HB254 mindestens für zehn Tage kultiviert und vor der Extraktion optisch überprüft. Zusätzlich wurden Agarplatten der drei Stämme nach 26 Tagen bei 28°C extrahiert. Alle Versuche wurden mindestens im Doppelansatz durchgeführt. Für die Zugabe der Substanzen cAMP und γ -Butyrolacton wurde zunächst mit DNA-freiem Wasser (Sigma-Aldrich,

St. Louis, USA) je eine 10 mM Stammlösung hergestellt, um anschließend die entsprechende Gebrauchslösung anzufertigen. Alle Lösungen wurden vor ihrem Gebrauch steril-filtrierte. Um eine wachstumsinhibierende Konzentration auszuschließen und um eine möglichst passende Konzentration auszuwählen, wurden beide Substanzlösungen in unterschiedlichen Konzentrationen (10 mM, 5 mM, 2 mM, 1 mM, 500 µM, 200 µM, 100 µM, 10 µM, 100 nM) getestet. Dafür wurde eine einen Tag alte Flüssigvorkultur des jeweiligen Stammes in GYM4-Medium mit 15 % Agar vermischt, um anschließend daraus Platten zu gießen. Die verschiedenen Substanzkonzentrationen wurden dann auf auf dem Agar liegende Filterplättchen aufgetropft.

Für die Salzversuche wurde zu dem Basismedium eine ansteigende Konzentration an NaCl zugefügt bzw. CaCO₃ durch CaCl₂ ersetzt (Tabelle 6). Bei den Temperaturversuchen wurde nach 72 Stunden für 17 Stunden die Temperatur von 28°C auf 15°C, 40°C bzw. 60°C geändert, um die Kulturen im Anschluss für die restliche Zeit wieder bei 28°C zu kultivieren.

4.3.2.3 Extraktion der Flüssigkulturen und der Platten

Die Extraktion der 25 mL Kulturen wurde mit 15 mL EtOAc, wie bereits in Abschnitt 4.2.2.5 beschrieben durchgeführt.

4.3.2.4 Chemische Analyse der bakteriellen Kulturextrakte

Die Analyse der methanolischen Extrakte wurde wie bereits in Abschnitt 4.2.2.7 beschrieben durchgeführt.

Tabelle 6: Kultivierungsversuche der Stämme HB202, HB254 und HB383. So nicht anders dargestellt, handelt es sich um 25 mL Kulturen in 100 mL EMK, Inkubation bei 120 rpm, 28°C.

Versuchsbezeichnung	Veränderung gegenüber des Basisversuches
Basis	keine (25 mL in 100 mL EMK, GYM4, 120 rpm, 28°C)
Temp 15	nach 72 h für 17 h bei 15°C kultiviert
Temp 40	nach 72 h für 17 h bei 40°C kultiviert
Temp 60	nach 72 h für 17 h bei 60°C kultiviert
Salz 5	zusätzlich 5 ‰ NaCl im Medium
Salz 10	zusätzlich 10 ‰ NaCl im Medium
Salz 15	zusätzlich 15 ‰ NaCl im Medium
Salz 20	zusätzlich 20 ‰ NaCl im Medium
Salz 50	zusätzlich 50 ‰ NaCl im Medium
Salz 100	zusätzlich 100 ‰ NaCl im Medium
Salz 150	zusätzlich 150 ‰ NaCl im Medium
CaCl ₂	CaCO ₃ wurde durch die gleiche Menge CaCl ₂ ersetzt
cAMP 20	Medium enthielt 20 nM cAMP
cAMP 10	Medium enthielt 10 µM cAMP
γ-Butyrol 200	Medium enthielt 200 nmol γ-Butyrolacton
γ-Butyrol 20	Medium enthielt 20 nmol γ-Butyrolacton
Platte GYM4	0 rpm; 26 Tage

4.3.3 ERGEBNISSE

4.3.3.1 *Streptomyces* sp. HB202

Streptomyces ist die bekannteste und am besten untersuchte Gattung bezüglich der bakteriellen Naturstoffproduktion [Watve et al. 2001]. Für sie konnte bereits gezeigt werden, dass die Sekundärmetabolitproduktion durch verschiedenste Stimulationsbedingungen angeregt werden kann [Doull et al. 1994; Mitova et al. 2008]. Zusätzlich zeichnet sich die Gattung *Streptomyces* durch eine vielfältige Färbung der Kolonieoberfläche sowie durch eine komplexe Matrix aus verzweigten Filamenten unbestimmter Länge aus, welche mit der Zeit Luftfäden bilden, an denen dann die Sporen entstehen [Madigan et al. 2000].

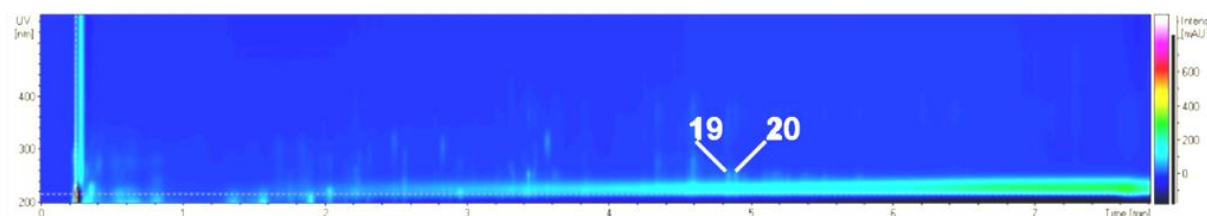


Abb. 16: 3D-UV-Chromatogramm des Extraktes von dem Basisversuch mit Stamm *Streptomyces* sp. HB202. Peak 19: Streptophenazin A, Peak 20: Streptophenazin B nach Auftrennung mittels HPLC-UV/MS.

Bei dem durchgeführten Basisversuch mit *Streptomyces* sp. HB202 wurden die Streptophenazine A und B produziert (Abb. 16). Insgesamt traten bei den 17 verschiedenen Kultivierungsbedingungen 23 unterschiedliche Peaks auf (Tabellen 7 und 10).

Tabelle 7: Aufgetretene Peaks bei den Kultivierungsversuchen mit Stamm HB202. In der rechten Spalte wurden, soweit möglich, die durch Dereplikation bestimmten Substanznamen angegeben.

Bezeichnung	Retentionszeit (min)	UV (nm)	Masse (m/z) [M] ⁺	Substanzbezeichnung
Peak 1 ^a	2,27	314, 227	165	4-Dimethylamino-benzoesäure
Peak 2 ^a	2,61	314, 227	165	4-Methylaminobenzoesäuremethylester
Peak 3 ^{a,c}	2,77	440, 330, sh301, 230	463	Mayamycin
Peak 4	3,23	368, sh363, sh352, 252, 215	440	Streptophenazin H
Peak 5 ^a	3,36	314, 227	179	Methyl 4-Dimethylaminobenzoesäure
Peak 6 ^{a,b}	3,83	368, sh363, sh352, 252, 215	400	Streptophenazin Derivat
Peak 7 ^{a,b}	3,85	322, 223	526	Unbekannt
Peak 8 ^{a,b}	3,87	368, sh363, sh352, 252, 215	420	Streptophenazin Derivat
Peak 9 ^a	3,95	324, 224	510	Xanthobaccin A
Peak 10 ^a	4,10	324, 224	512	Xanthobaccin B
Peak 11 ^a	4,20	sh395, 376, sh359, 274, 234	494	Xanthobaccin C
Peak 12 ^a	4,42	324, 224	510	Stereoisomer von Xanthobaccin A
Peak 13 ^{a,b}	4,46	322, 223	496	Xanthobaccin Derivat
Peak 14	4,54	368, sh364, sh351, 252, 218	396	Streptophenazin E
Peak 15 ^a	6,42	224	750	Eventuell ein Peptid
Peak 16	4,65	371, sh364, sh354, 252, 213	410	Streptophenazin C
Peak 17	4,72	368, sh364, sh351, 252, 218	410	Streptophenazin D

Bezeichnung	Retentionszeit (min)	UV (nm)	Masse (m/z) [M] ⁺	Substanzbezeichnung
Peak 18 ^a	4,80	322, 223	494	Stereoisomer von Xanthobaccin C
Peak 19	4,90	367, sh363, sh350, 252, 215	424	Streptophenazin A
Peak 20	4,96	368, sh364, sh351, 352, 218	424	Streptophenazin B
Peak 21	5,18	368, sh364, sh353, 252, 215	438	Streptophenazin F
Peak 22	5,22	368, sh363, sh351, 252, 214	438	Streptophenazin G
Peak 23 ^a	6,52	224	764	Eventuell ein Peptid

^a Diese Peaks traten das erste Mal im Laufe dieser Versuche auf.

^b (Vermutlich) neue Substanz.

^c Dieser Peak wurde im Laufe dieser Arbeit isoliert.

sh Bezeichnet das Auftreten einer Schulter bei angegebener Wellenlänge.

Neben den acht bereits bekannten Streptophenazinen A - H (Peak 4, 14, 16-17, 19-22) waren bei den Retentionszeiten 3,83 und 3,87 min zwei weitere Peaks (Peak 6, 8) mit vergleichbarem UV-Spektrum erkennbar, deren Massen ebenfalls auf zwei weitere Streptophenazinstrukturen hindeuteten. Einige der in den Extrakten aufgetretenen Peaks konnten bekannten Substanzen zugeordnet werden, wie die drei Benzoate (Peak 1-2, 5) und die Xanthobaccine (Peak 9-12, 18) (Abb. 17). Den Peaks 7, 15 und 23 konnten keine bekannten Sekundärmetabolite zugeordnet werden, allerdings erschweren die unspezifischen UV-Spektren der Peaks 15 und 23 die Suche nach bekannten Substanzen. Aufgrund ihrer Massen könnte es sich hier um Peptide handeln. Dieses würde ebenfalls zu dem amplifizierten NRPS-Genfragment aus *Streptomyces* sp. HB202 passen. Die zunächst als Peak 3 bezeichnete Substanz, Mayamycin (1), konnte im weiteren Verlauf der Arbeit näher charakterisiert werden (Abschnitt 4.4.1).

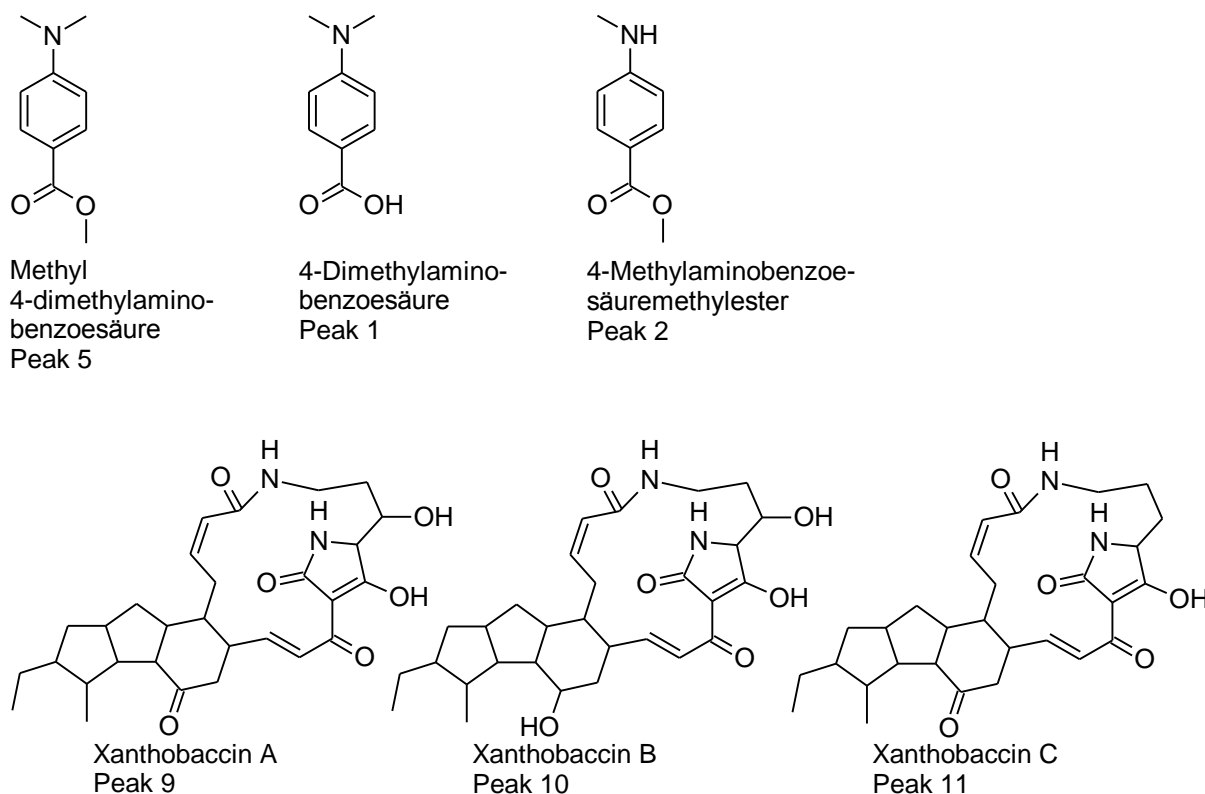


Abb. 17: Identifizierte Sekundärmetabolite aus Stamm *Streptomyces* sp. HB202.

Bei den Stimulierungsversuchen zeigte sich ein eher heterogenes Bild der auftretenden Sekundärmetabolite (Tabelle 10). So wurden im Basisversuch nur Streptophenazin A und B produziert. Bei den Temperaturversuchen hingegen traten neun unterschiedliche Peaks auf. Darunter auch die Streptophenazine C, D, F und G sowie das später beschriebene Mayamycin (1). In den Salzversuchen wurden bei 5 und 10 ‰ Salzgehalt die Methyl-4-dimethylaminobenzoesäure und bei 15 und 20 ‰ Salzgehalt Streptophenazin H produziert. Bei einem höheren Salzgehalt fand keine Sekundärmetabolitproduktion mehr statt. Ähnliche Metabolitprofile wie bei den Temperaturversuchen traten ebenfalls bei dem Austausch von CaCO_3 durch CaCl_2 sowie bei den Versuchen mit verschiedenen Stimulanzen auf. Bei der Zugabe von cAMP wurden zusätzlich die drei bekannten Xanthobaccine A - C produziert. Unter der Zugabe von γ -Butyrolacton konnten zwei neue Streptophenazin-Derivate im Rohextrakt entdeckt werden. Bei dem Plattenversuch zeigten sich ebenfalls die drei Xanthobaccine A - C sowie zwei mögliche neue Xanthobaccine (Peak 13 und 18) mit einer Masse von m/z 496 und m/z 494.

4.3.3.2 *Micromonospora* sp. HB254

Die Gattung *Micromonospora* gehört zu der Familie der *Micromonosporaceae* und zeigt sich empfindlich gegenüber pH-Werten unter 6,0. Die Vertreter dieser Gattung wachsen bei Temperaturen zwischen 20°C und 40°C und bilden ebenfalls ein Mycelium aus. Außerdem können sie unbewegliche Sporen hervorbringen. Meistens erscheinen die Kolonien zunächst hellgelb bis hellorange und werden im Laufe der Zeit rot, braun, blaugrün oder lila. Die Sporen erscheinen dann schwarzbraun, schwarzgrün oder ganz schwarz. Das erste Antibiotikum, welches aus *Micromonospora* sp. isoliert wurde, war der Aminosucker Gentamicin [Weinstein et al. 1963]. Neue Naturstoffe konnten mittlerweile auch aus marinen *Micromonospora* Arten isoliert werden. So produziert *Micromonospora* sp. L31-CLCO-002, aus einem Homogenisat des Schwammes *Clathrina coriacea* isoliert, zwei neue Indolcarbazolalkaloide, 4'-N-Methyl-5'-hydroxystaurosporin und 5'-Hydroxystaurosporin [Hernández et al. 2000]. Allerdings wurden bis jetzt nur sehr wenige Stimulationsexperimente mit Vertretern dieser Gattung durchgeführt [Gonzalez et al. 1995].

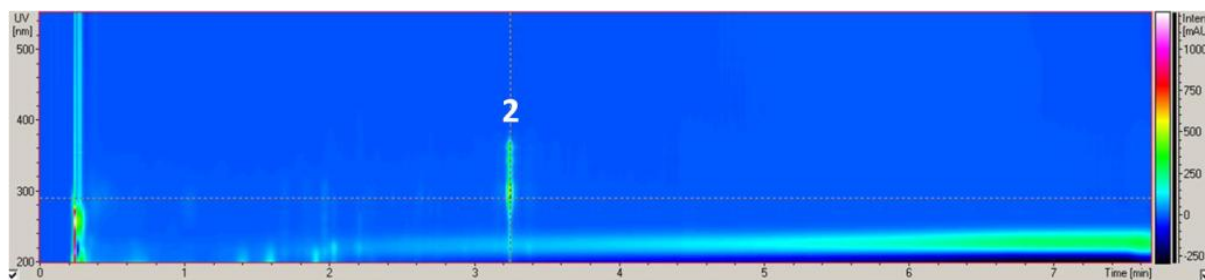


Abb. 18: 3D-UV-Chromatogramm des Extraktes von dem Basisversuch mit Stamm *Micromonospora* sp. HB254, nach Auftrennung mittels HPLC-UV/MS. Peak 2 könnte Teleocidin B sein.

Im 3D-UV-Chromatogramm der Auftrennung des Extraktes aus dem Basisversuch mit Stamm *Micromonospora* sp. HB254 trat nur die als Peak 2 bezeichnete Substanz auf (Abb. 18). Insgesamt waren vier Peaks (Tabellen 8 und 10) in den Extrakten der verschiedenen

Kultivierungsversuche zu erkennen. Keinem der Peaks konnte mit Sicherheit eine bekannte Substanz zugeordnet werden. Die Massen-Daten der aus dem *Streptomyces mediocidicus* isolierten Teleocidin A und B [Fujiki et al. 1982] stimmten mit Peak 1 und 2 überein, allerdings wichen die UV-Daten voneinander ab. Jedoch ist bekannt, dass Teleocidine photolabile Substanzen sind und ein Indolgrundgerüst aufweisen [Irie et al. 1993]. Diese Informationen decken sich mit denen im Laufe der Arbeit gewonnenen Daten bezüglich Peak 2. Leider konnten aufgrund der Instabilität der Substanzen keine genauen chemischen Analysen durchgeführt werden (Abschnitt 4.4.2).

Tabelle 8: Aufgetretene Peaks bei den Kultivierungsversuchen mit Stamm HB254. In der rechten Spalte wurden, soweit möglich, die durch Dereplikation bestimmten Substanznamen angegeben.

Bezeichnung	Retentionszeit (min)	UV (nm)	Masse (m/z) [M] ⁺	Substanzbezeichnung
Peak 1 ^{a,c}	3,05	360, 342, 326s, 303, sh293, 223s	437	Evt. Teleocidin A
Peak 2 ^{a,b,c}	3,25	360, 342, 326s, 303, sh293, 223s	451	Evt. Teleocidin B
Peak 3 ^{a,c}	6,09	283, sh225, sh207	468	Unbekannt
Peak 4 ^a	6,73	226	n.i.	Unbekannt

^a Diese Peaks traten das erste Mal im Laufe dieser Versuche auf.

^b Diese Peaks wurden im Laufe dieser Arbeit isoliert.

^c (Vermutlich) neue Substanz.

sh Bezeichnet das Auftreten einer Schulter bei angegebener Wellenlänge.

s Schwache Intensität der angegebenen Wellenlänge.

n.i. Hat nicht ionisiert.

Peak 2 trat insgesamt bei den Kultivierungsversuchen am häufigsten (Tabelle 10) und in einer viel höheren Konzentration als die anderen drei Peaks auf. Peak 3 und 4 wurden jeweils nur unter einer Bedingung produziert (Plattenversuch bzw. Temperaturversuch 15°C). In dem Extrakt des 60°C-Temperaturversuches sowie in den Extrakten der Salzversuche 10 bis 150 ‰ konnten keine Peaks detektiert werden. Bei den Kulturen der Versuche mit cAMP konnte kein Wachstum festgestellt und daher keine Analyse durchgeführt werden. Das Sekundärmetabolitmuster des Stammes HB254 ist weniger umfangreich als das der anderen beiden Stämme und es ließ sich nur bedingt durch Variation der Kulturbedingungen oder durch Zugabe von Signalsubstanzen verändern.

4.3.3.3 *Nocardiosis* sp. HB383

Für *Nocardiosis* haben im Bereich der Stimulationsexperimente noch keine Untersuchungen stattgefunden. Diese Gattung zeichnet sich durch vielfältige Koloniefarben aus und hebt sich durch den Einbau ungewöhnlicher Teichonsäuren in die Zellwand hervor [Rainey et al. 1996]. *Nocardiosis* ist für die Biosynthese einiger sehr interessanter Sekundärmetabolite wie beispielsweise dem Protein Kinase C Inhibitor K-252a verantwortlich [Kase et al. 1986].

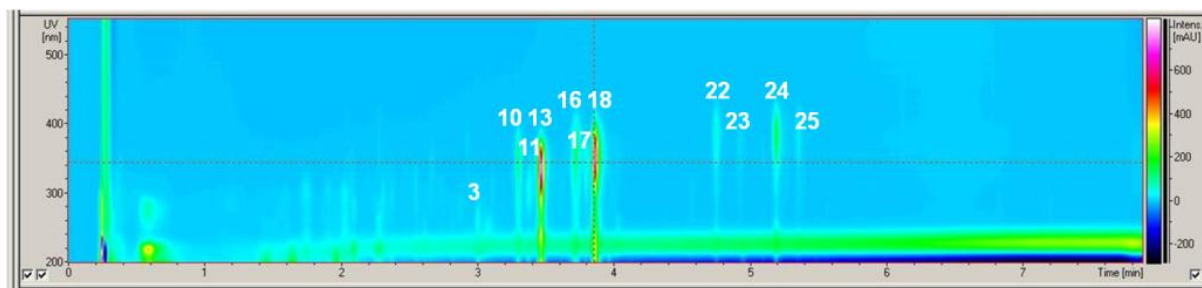


Abb. 19: 3D-UV-Chromatogramm des Extraktes von dem Basisversuch mit Stamm *Nocardioopsis* sp. HB383 nach Auftrennung mittels HPLC-UV/MS. Peak 3: Nocapyron A, Peak 10, 13, 16, 18, 22, 24-24: verschiedene Diketopiperazine, Peak 11, 17, 23: unbekannte Substanzen.

In den unterschiedlichen Stimulierungsversuchen mit Stamm *Nocardioopsis* sp. HB383 traten 33 verschiedene Peaks auf (Tabellen 9 und 10). Drei davon konnten im Laufe dieser Arbeit als neue Pyrone, Nocapyron A - C (Peak 3, 6, 21), beschrieben werden (Abschnitt 4.4.3). Zusätzlich zu den neuen Sekundärmetaboliten wurden bekannte Diketopiperazine (Peak 10, 13, 16, 18, 22, 24-25) produziert. Des Weiteren traten mehrere unterschiedliche Polyen- und Peptidstrukturen (Peak 1, 4-5, 7, 9, 26, 29-31) auf. Mehrere Peaks konnten keiner bekannten Substanz oder Substanzklasse zugeordnet werden.

Tabelle 9: Aufgetretene Peaks bei den Kultivierungsversuchen mit Stamm HB383. In der rechten Spalte wurden, soweit möglich, die durch Dereplikation bestimmten Substanznamen angegeben.

Bezeichnung	Retentionszeit (min)	UV (nm)	Masse (m/z) [M] ⁺	Substanzbezeichnung
Peak 1 ^a	2,93	380, 360, 342, 327	602	Polyen
Peak 2 ^a	2,96	sh240, 219	186	Unbekannt
Peak 3 ^{a,b}	2,99	253, 213	268	Nocapyron A
Peak 4 ^a	3,02	sh378, 358, 340	600	Polyen
Peak 5 ^a	3,10	380, 360, 342, 327	602	Polyen
Peak 6 ^{a,b,c}	3,12	253, 213	282	Nocapyron C
Peak 7 ^a	3,16	sh378, 358, 340	614	Polyen
Peak 8 ^a	3,22	360, 342, 325s, 302, sh292, 222	451	Unbekannt
Peak 9 ^a	3,25	380, 360, 342, 327	616	Polyen
Peak 10 ^{a,b}	3,30	348, 282s, 226	286	(2E/5Z)-2-[(4-Methoxyphenyl)methylen]-5-(2-methyl-propyliden)-3,6-piperazindion
Peak 11 ^a	3,38	305, 223	<u>290</u> ^d <u>250/557-8</u>	Unbekannt
Peak 12 ^a	3,40 (in der Masse)	-	238	Unbekannt
Peak 13 ^a	3,46	336, 236	<u>286/594</u>	Stereoisomer von Peak 10
Peak 14 ^a	3,58	301, sh228, 216	<u>250/290</u>	Unbekannt
Peak 15 ^a	3,63	301, 224	<u>250/268/290/558</u>	Unbekannt
Peak 16 ^a	3,73	360, 224	320	XR334
Peak 17 ^a	3,78	342, 224	288	Unbekannt
Peak 18 ^a	3,87	353, 224	320	Stereoisomer von XR334
Peak 19 ^a	3,82	227	n.i.	Unbekannt
Peak 20 ^a	4,16	294, sh230, 208	238	Unbekannt
Peak 21 ^{a,b,c}	4,54	253, 213	252	Nocapyron B

Bezeichnung	Retentionszeit (min)	UV (nm)	Masse (m/z) [M] ⁺	Substanzbezeichnung
Peak 22 ^a	4,75	381, 225	334	XR330
Peak 23 ^a	4,92	363, 226	316/632	Unbekannt
Peak 24 ^a	5,19	381, 226	334	Stereoisomer von XR330
Peak 25 ^a	5,35	378, 224	334	Stereoisomer von XR330
Peak 26 ^a	5,99	282, sh226, 210, <200	1089	Peptid
Peak 27 ^a	6,07	283s, 224	468	Unbekannt
Peak 28 ^a	6,33	464br	n.i.	Unbekannt
Peak 29 ^a	6,40	224, <200	1036	Peptid
Peak 30 ^a	6,49	224, <200	1050	Peptid
Peak 31 ^a	6,65	224, <200	1064,0	Peptid
Peak 32 ^a	6,69	227	n.i.	Unbekannt
Peak 33 ^a	6,72	478, 453, 426	n.i.	Unbekannt

^a Diese Peaks traten das erste Mal im Laufe dieser Versuche auf.

^b Diese Peaks wurden im Laufe dieser Arbeit isoliert.

^c (Vermutlich) neue Substanz.

^d Die unterstrichene(n) Masse(n) war(en) die Hauptmasse(n).

sh Bezeichnet das Auftreten einer Schulter bei angegebener Wellenlänge.

s Schwache Intensität der angegebenen Wellenlänge.

br Bereites Plateau bei der jeweiligen Wellenlänge.

n.i. Hat nicht ionisiert.

Insgesamt produzierte Stamm HB383 in allen Versuchen außer in dem Salzversuch mit 150 ‰ mehrere unterschiedliche Sekundärmetabolite (Tabelle 10). Dabei traten vor allem die Diketopiperazine 3-[(4-Methoxyphenyl)methylen]-6-(2-methylpropyliden)-2,5-piperazindion (**6**), XR334, XR330 (Abb. 20) und ihre Stereoisomere sowie das Nocapyron A immer wieder auf. Die Nocapyrone A - C (**2-4**) sowie ein weiteres Nocapyron, Nocapyron D (**5**), und **6** konnten im weiteren Verlauf isoliert und näher charakterisiert werden (Abschnitt 4.4.3).

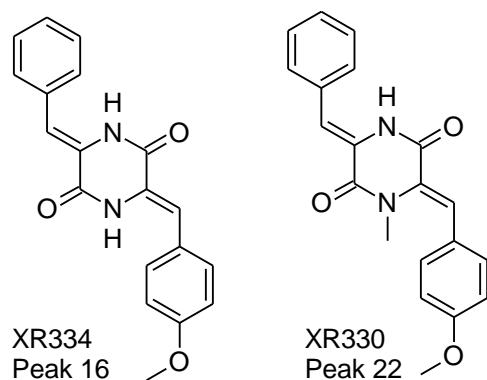


Abb. 20: Die Diketopiperazine XR334 und XR330 aus Stamm HB383.

Tabelle 10: Ergebnisse der Kultivierungsversuche der Stämme HB202, HB254 und HB383. Die Zahlen in Spalte 2-4 zeigen an, in welchen Ansätzen die Peaks aus den Tabellen 7-9 auftraten.

Versuch	HB202	HB254	HB383
Basis	19-20	2	3, 10-11, 13, 16-18, 22-25
Temp 15	5, 16-17, 19-22	2, 4	3, 6, 10-11, 13, 16-18, 21-22
Temp 40	3, 5, 15-17, 19-23	2	3, 10-11, 13, 16-18, 22
Temp 60	15-17, 19-23	-	3, 10-11, 13-14, 16-18, 21-22
Salz 5	5	2 (schwach)	1, 3, 5-6, 10-11, 13-14, 16-18, 21-22, 24

Actinomyceten aus *Halichondria panicea* – Stimulation
Ergebnisse

Versuch	HB202	HB254	HB383
Salz 10	5	-	3, 6, 10-11, 13-14, 16-18, 21-22, 24-25
Salz 15	4	-	1, 3, 6, 9-11, 13-14, 16-18, 21-22, 24-25
Salz 20	4	-	3, 10-11, 13-14, 16-18, 21-22, 24
Salz 50	-	-	1, 3, 5, 10-11, 13, 16-18, 21
Salz 100	-	-	1, 5, 9, 12, 19
Salz 150	-	-	-
CaCl ₂	1-2, 5, 15-17, 19-23	2	3, 6, 10-11, 13, 16-18, 21-22, 24-25
cAMP 20	1-2, 5, 9-12	Nicht gewachsen	1, 3-4, 7, 9-11, 13, 16-18, 21, 27-28, 32-33
cAMP 10	5, 11, 16-17, 19-22	Nicht gewachsen	4-5, 7, 9, 11, 13, 16-18, 21, 27, 32
γ-Butyrol 200	6, 8, 16-17, 19-22	2	3, 10-11, 13-14, 16-18, 21
γ-Butyrol 20	6, 8, 16-17, 19-22	1-2	3, 8, 10-11, 13-14, 16-18, 21-22
Platte GYM4	3, 5, 7, 9-11, 13, 18	1, 3	3, 10-11, 13, 16-18, 22-25, 27, 32

4.3.4 DISKUSSION

Durch die Stimulationsversuche konnte das Produktionspotential der drei Actinomyceten HB202, HB254 und HB383 aufgezeigt werden. Dabei stellte sich heraus, dass die Stämme HB202 und HB383 ein weitaus größeres Repertoire an Substanzen produzierten als *Micromonospora* sp. HB254, bei welchem insgesamt nur vier verschiedene Peaks auftraten.

Streptomyces sp. HB202 zeigte eine große Fähigkeit, angeregt durch verschiedene Kultivierungsbedingungen, neue Substanzen zu produzieren. Ausgehend vom Basisversuch konnten 21 weitere Peaks induziert werden. Dieses Potential ließ sich bereits bei der Arbeit von [Mitova et al. 2008] erkennen, bei der die Produktion der Streptophenazine A - D und H erhöht sowie die Produktion der Streptophenazine F und G durch die Zugabe von Bacitracin bzw. Tetrazyklin induziert werden konnte. Allerdings scheint, wie zunächst angenommen, die Synthese der verschiedenen Streptophenazine nicht ausschließlich durch Antibiotika wie Tetrazyklin oder Bacitracin beeinflusst zu werden, sondern im Allgemeinen durch verschiedenste Arten von Stress oder Zugabe von bestimmten Stimuli. Aus der Literatur ist bekannt, dass die Phenazinbiosynthese in diesem Fall von *Pseudomonas chlororaphis* PCL 1391 stark durch pH, den Sauerstoffgehalt, die Stickstoffquelle oder die Temperatur beeinflusst wird [van Rij et al. 2004]. Auch die Konzentration von Magnesium, osmotischer Stress und Defizite von Phosphat, Sulfat, Ammonium und Eisen haben Einfluss auf die Synthese [Mavrodi et al. 2006].

Der für Stamm HB202 von [Mitova et al. 2008] beschriebene Phenanzin-1,6-dicarbon-säuredimethylester konnte in keinem der Rohextrakte identifiziert werden. Eventuell lag das an den verwendeten Medien. In diesem Teil der Arbeit wurde GYM4 als Basismedium verwendet, wohingegen [Mitova et al. 2008] hauptsächlich TSB10-Medium nutzte. Das GYM4-Medium besteht zum größten Teil aus Glukose, Spurenelementen und Vitaminen, wohingegen das TSB10-Medium einen hohen Anteil an Aminosäuren und Peptiden wie auch Natriumionen aufweist. Außerdem trat der Phenanzin-1,6-dicarbon-säuredimethylester nur unter der Zugabe von Tetrazyklin auf. Daraus lässt sich schließen, dass das Potential zur Produktion von Sekundärmetaboliten in diesem Stamm noch nicht erschöpft ist.

Insgesamt passt das heterogene Bild dieser Stimulationsversuche gut zu den Ergebnissen aus der Diplomarbeit von [Gruchattka 2010]. Bei dieser Arbeit stellte sich heraus, dass die Experimente mit dem *Streptomyces* sp. HB202 im Grunde nicht reproduzierbar waren und dass das Metabolitspektrum stark variierte. Auch in ihren Untersuchungen zeigte sich erneut das enorme Potential der Stammes HB202. Neben einigen Substanzen, welche auch in dieser Arbeit identifiziert wurden, traten noch unbekannte Streptophenazine auf. So zeichnete sich *Streptomyces* sp. HB202 durch ein enormes Potential zur Produktion bekannter sowie neuer bioaktiver Sekundärmetabolite aus. Weitere Untersuchungen dieses Stammes sollten daher unbedingt durchgeführt werden, vor allem eine Genomsequenzierung würde gewiss viele interessante Informationen hervorbringen. Auf diese Weise könnten weitere spannende Naturstoffe identifiziert und analysiert werden. Zusätzlich könnte Stamm HB202 genutzt werden, um weitere Erkenntnisse bezüglich der Kommunikation und Regulation in Streptomyceten zu

erhalten. Es ist bekannt, dass zur Kommunikation innerhalb einer Bakterienart sowie zwischen Bakterien verschiedener Arten kleine Moleküle, sogenannte Autoinducer, produziert, abgegeben, detektiert und beantwortet werden. Auf diese Art und Weise kann die Aktivität einer großen Gruppe von Zellen koordiniert werden und die Bakterien können wie ein multizellulärer Organismus agieren. Dieser Prozess wird Quorum sensing genannt und ermöglicht den Bakterien, ihr Verhalten und ihre Anzahl in einer mikrobiellen Gemeinschaft anzupassen [Waters & Bassler 2005]. Mittlerweile ist bekannt, dass Phenazine als Signalmoleküle fungieren können [Dietrich et al. 2006]. Da Stamm HB202 eine ganze Reihe dieser Strukturen produzieren kann, wäre hier eine solche Untersuchung sicherlich interessant.

Bei den Versuchen mit cAMP als Signalsubstanz fand bei Stamm HB254 kein Wachstum statt. Eventuell waren die Konzentrationen dieser Substanzen doch so hoch, dass diese das Wachstum des Stammes HB254 hemmten. Es ist bekannt, dass die Gattung *Micromonospora* eher langsamer wächst als viele andere Actinomyceten. Und gerade Stamm HB254 zeigte auch in der Diplomarbeit von [Gruchattka 2010] ein schlechteres Wachstum als die anderen zwei Stämme. Drei der von *Micromonospora* sp. HB254 produzierten Peaks wurden erst durch variierende Bedingungen induziert. Dennoch konnte keiner der Substanzen mit Sicherheit ein Naturstoff zugeordnet werden, so dass auch Stamm HB254 ein gewisses Potential zur Produktion neuer Sekundärmetabolite aufwies. Aus der Literatur ist erst wenig über die Gattung *Micromonospora* bezüglich dieses Themas bekannt. Immerhin wurde 1995 der stimulierende Effekt von Ammonium auf die Produktion von Gentamicin in *Micromonospora purpurea* untersucht [Gonzalez et al. 1995]. Es wäre also lohnenswert, Stamm HB254 diesbezüglich näher zu untersuchen.

Das Metabolitspektrum des *Nocardiosis* sp. HB383 scheint durch variierende Kulturbedingungen erweiterbar zu sein. Gerade die Zugabe verschiedener Botenstoffe wie beispielsweise cAMP veränderte das sonst recht konforme Substanzprofil. In diesen Versuchen könnte cAMP Einfluss auf die Sekundärmetabolitproduktion gehabt und eventuell zur Bildung neuer Substanzen geführt haben. Für die Gattung *Nocardiosis* sind im Gegensatz zur Gattung *Streptomyces* bis heute keine Studien zu diesem Thema durchgeführt worden und so sind spezifische Aussagen zur Stimulationsfähigkeit dieser Gattung nur schwer möglich.

Bei allen drei Stämmen zeigten sich einige Unterschiede im Metabolitspektrum der Flüssig- im Vergleich zur Plattenkultur. Dieses ist ein bekanntes Phänomen und lässt sich durch die unterschiedlichen Kultivierungsparameter erklären. Beispielsweise können die Actinomyceten auf Agarplatte ein Luftmycel ausbilden und produzieren viele Sporen, wohingegen die Sporenbildung in Flüssigmedium deutlich geringer ausfällt. Dazu kommen noch Unterschiede in der Verteilung der Nährstoffe und unterschiedliche Sauerstoffzufuhr.

In Zusammenhang mit der Kommunikation steht die Regulation verschiedener bakterieller Prozesse wie beispielsweise die der Sekundärmetabolitproduktion. Weitestgehend wird angenommen, dass eine Verlangsamung der Wachstumsrate bzw. das komplette Einstellen des Wachstums die Produktion von Sekundärmetaboliten in Bakterien anregt. Viele unterschiedliche Umweltfaktoren haben Einfluss auf die Produktion von bakteriellen Substanzen. Es konnte

nachgewiesen werden, dass eine geringe Stickstoffkonzentration Einfluss auf die Antibiotikaproduktion in *S. coelicolor* und *S. clavuligerus* hatte [Chakraburty & Bibb 1997; Jin et al. 2004a; Jin et al. 2004]. Eine hohe Konzentration von anorganischem Phosphat im Medium hemmt hingegen häufig die Sekundärmetabolitproduktion [Martin 2004]. In der Natur sind eher nährstoffarme Bedingungen die Regel und nicht die Ausnahme; in vielen ökologischen Nischen stehen sogar zeitweise gar keine Nährstoffe zur Verfügung [Bode & Müller 2005]. Da bis heute wenig über die „natürlichen“ Bedingungen und die *in situ*-Konzentrationen in der Mikroumgebung eines Bakteriums bekannt ist, bleibt eine Vorhersage über die Synthese von Sekundärmetaboliten *in situ* nach wie vor schwierig.

Mittlerweile ist klar, dass diffusionsfähige Substanzen Teil der Stimulation bzw. Interaktion zwischen Streptomyceten (inter- und intraspecies) sind [Ueda et al. 2000]. Bei ihnen und anderen *Actinobacteria* spielen γ -Butyrolactone eine wichtige Rolle. γ -Butyrolactone stimulieren die Antibiotikaproduktion und die Zelldifferenzierung. Sie fungieren als Autoregulatoren, sogenannte Second Messenger, bakterielle Hormone oder als Signalmoleküle [Takano et al. 2001]. Ein gut untersuchtes γ -Butyrolacton aus *Streptomyces* ist das 2-Isocapryloyl-3R-hydroxymethyl- γ -butyrolacton, auch A-Faktor genannt. Schon in sehr geringen Konzentrationen schaltet es die Signalkaskade zur Biosynthese des Streptomycins in der späten exponentiellen Wachstumsphase an und fördert die Mycelbildung in *Streptomyces griseus* [Ohnishi et al. 1999; Horinouchi et al. 2001].

Die Synthese der γ -Butyrolacton könnte die Antwort auf bisher unbekannt Einflüsse aus der Umgebung, wie eine Nährstofflimitierung, sein und somit nicht nur als Indikator für die Populationsdichte dienen [Bibb 2005], sondern eine bifunktionale Rolle einnehmen und dadurch zum einen den Sekundärmetabolismus und die morphologische Differenzierung koordinieren und zum anderen als Kommunikationsmolekül dienen.

Auch unter Zugabe von γ -Butyrolacton zeigte sich eine Änderung des Metabolitprofils. Es bleibt offen, ob diese durch das allgemein sehr variable Verhalten des Stammes HB202 ausgelöst wurde oder ob das zugegebene γ -Butyrolacton Einfluss auf die Regulation des Sekundärmetabolismus hatte.

Nicht nur γ -Butyrolactone beeinflussen die Sekundärstoffbildung. Seit Längerem ist die duale Rolle verschiedener Antibiotika bekannt. Es wird angenommen, dass Antibiotika in geringen Konzentrationen als Signalsubstanzen fungieren und in hohen Konzentrationen als Waffen dienen [Fajardo & Martínez 2008]. Dieses wurde bereits von Paracelsus folgendermaßen formuliert: Dosen schädlicher oder giftiger Substanzen sollen in geringeren Konzentrationen eine positive Wirkung auf den Organismus haben. Dieses kann durch eine J- oder U-förmige Dosis-Wirkungskurve (Abb. 21) beschrieben werden. Damit erzeugen kleine biologisch aktive Moleküle eine jeweils unterschiedliche phenotypische Reaktion des Bakteriums auf die jeweilig vorhandene Konzentration. Für die konzentrationsabhängige Funktion spricht auch, dass es für die Verteidigung des mikrobiellen Organismus genügen würde, ein Breitbandantibiotikum zu produzieren. Für die Kommunikation hingegen werden viele verschiedene Signalmoleküle

benötigt. Lange wurde von der pharmazeutischen Wirkung einer Substanz auf deren ökologische und evolutionäre Funktion geschlossen. War eine Substanz antibiotisch wirksam, wurde angenommen, dass sie die Aufgabe hat, in Konkurrenz stehende Mikroorganismen zu hemmen. In der letzten Zeit konnte allerdings immer wieder gezeigt werden, dass antibiotischen Substanze in geringen Konzentrationen die Transkription von Bakterien regulieren und dass ein und dasselbe Antibiotikum bei verschiedenen Bakterien unterschiedliche Antworten hervorruft [Fajardo & Martínez 2008].

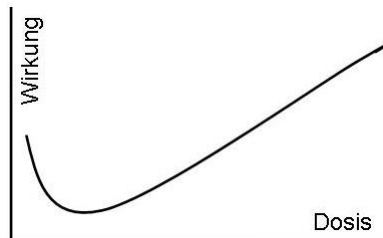


Abb. 21: Dosis-Wirkungs-Beziehung, bei der unterschiedliche Konzentrationen kleiner bioaktiver Moleküle Einfluss auf den Phenotyp eines Stammes haben. Modifiziert nach [Fajardo & Martínez 2008].

Neben den γ -Butyrolactonen und den Antibiotika fungiert das zyklische Adenosin-3',5'-monophosphat (cAMP) ebenfalls als Signalmolekül in Streptomycceten. Es hemmt beispielsweise in hohen Konzentrationen die Streptomycin-Produktion und die Mycelbildung in *Streptomyces griseus arpA* Mutanten, dagegen stimulieren bzw. verstärken geringe Konzentrationen cAMP diese beiden Prozesse [Horinouchi et al. 2001]. cAMP hat außerdem Einfluss auf die Auskeimung, die Antibiotikabiosynthese und die morphologische Differenzierung in *Streptomyces coelicolor* [Hamilton et al. 1977; Gersch 1979; Gersch et al. 1979; Tata & Menawat 1994; Süssstrunk et al. 1998]. Zusätzlich stimuliert cAMP in diesem Streptomycceten die Biosynthese des Actinorhodins [Süssstrunk et al. 1998].

Auch bei den durchgeführten Versuchen zeigte sich durch die Zugabe der Signalsubstanz cAMP eine Veränderung, besonders bei Stamm HB383. cAMP kann sowohl als intrazelluläres wie auch als interzelluläres Signal fungieren [Süssstrunk et al. 1998].

Viele Actinomyceten produzieren cAMP, dennoch konnte eine spezifische Funktion dieses Moleküls in Gram-positiven Bakterien noch nicht gezeigt werden [Botsford & Harman 1992]. Insgesamt ist aber anzunehmen, dass die Zugabe von Signalsubstanzen wie etwa γ -Butyrolacton oder cAMP ähnliche Bedingungen wie in einer Kokultivierung erzeugt.

Da es sich bei allen drei Stämmen um marine Bakterien handelte und ihre ursprüngliche Umgebung einen Salzgehalt von 12-15 PSU, was etwa 12-15 ‰ entspricht, aufwies, wurde für die Stimulationsexperimente eine Salzreihe ausgewählt. Witterungsbedingt unterscheidet sich dieser Salzgehalt von Zeit zu Zeit im Standort. Es stellt sich die Frage, ob ein veränderter Salzgehalt Einfluss auf das Sekundärmetabolitprofil hat und die Produktion von Substanzen angeregt werden kann. Im Falle des Stammes HB202, welcher Peak 4 nur unter Zugabe von Salz produziert, scheint dieses der Fall. Auch das Metabolitprofil des Stammes HB383 verändert sich unter Salzstress. Bei sehr hohen Salzkonzentrationen wachsen alle drei Stämme zwar noch, stellen aber die Metabolitproduktion ein. Aus der Literatur ist bekannt, dass Meerwasser bzw. die

Salze im Meerwasser die Antibiotikaproduktion anregen können [Okami & Okazaki 1978; Küster & Neumeier¹⁹⁸¹]. So wäre es also durchaus interessant, weitere Salz- und Meerwasserversuche mit den verwendeten Stämmen durchzuführen.

4.3.5 ZUSAMMENFASSUNG

Insgesamt zeigte sich bei den durchgeführten Stimulierungsversuchen, dass die Sekundärmetabolitspektren der drei Actinomyceten *Streptomyces* sp. HB202, *Micromonospora* sp. HB254 und *Nocardiosis* sp. HB383 durch variierende Kulturbedingungen veränderbar waren. Es traten etliche neue Peaks auf, von denen eine Reihe im weiteren Verlauf dieser Arbeit aufgeklärt werden konnten.

4.4 CHARAKTERISIERUNG NEUER NATURSTOFFE

Marine Naturstoffe stellen mittlerweile einen großen Anteil der neu isolierten Sekundärmetabolite dar. 2008 wurden 1065 neue marine Substanzen beschrieben ^[Blunt et al. 2010]. Das ist ein Zuwachs von 11 % im Vergleich zum Vorjahr. Unter den Mikroorganismen gehört die Gruppe der Actinomyceten zu den produktivsten. Die Entdeckung eines neuen Naturstoffes birgt stetig die Hoffnung auf ein wirksames Mittel gegen Infektionskrankheiten oder Krebserkrankungen. Zur näheren Charakterisierung werden Naturstoffe zunächst chemisch analysiert und ihre biologische Aktivität wird untersucht. In diesem Abschnitt sollen einige der in den mit dem Schwamm *Halichondria panicea* assoziierten Actinomyceten entdeckten, bisher unbekanntes Naturstoffe näher charakterisiert werden.

4.4.1 MAYAMYCIN (1), EIN AROMATISCHES POLYKETID AUS *STREPTOMYCES* SP. HB202

4.4.1.1 Einleitung

Innerhalb der Gruppe der Actinomyceten wurden auch in den letzten Jahren die meisten Naturstoffe aus der Gattung *Streptomyces* isoliert. Zu den marinen Beispielen zählten unter anderen die Marinopyrrole A und B ^[Hughes et al. 2008] und die Napyradiomycine ^[Soria-Mercado et al. 2005].

Auch in dieser Arbeit wurde neben einigen bekannten Substanzen ein bisher uncharakterisierter Naturstoff von dem marinen *Streptomyces* sp. HB202 produziert, allerdings in sehr geringen Mengen. Bei einer näheren molekularbiologischen und chemischen Betrachtung (Abschnitt 4.2.3.2) wurde aus HB202 ein 505 bp langes Genfragment mit Ähnlichkeiten zu Genclustern bekannter aromatischer Polyketide (Tabelle 2) amplifiziert. Kulturextrakte von HB202 wiesen verschiedene biologische Aktivitäten auf, welche sich aber nicht mit den biologischen Aktivitäten der bereits identifizierten Metabolite deckten. Um genügend Substanzmenge für die Strukturaufklärung sowie für eine Reihe biologischer Aktivitätstests zu erhalten, wurden die Kultivierungsbedingungen in Anlehnung an die Stimulationsversuche (Abschnitt 4.3) erneut variiert, so dass die neue Substanz, die später als Mayamycin (1) charakterisiert wurde, in ausreichender Menge produziert wurde.

4.4.1.2 Material und Methoden

4.4.1.2.1 Kultivierung und Extraktion der *Streptomyces* sp. HB202 Kultur

Da Stamm HB202 in den vorausgegangenen Stimulationsversuchen nur sehr geringe Mengen der bis dahin noch unbekannt Substanz produzierte, wurden weitere Kultivierungsexperimente durchgeführt. Diese Versuche wurden mit unterschiedlichen Medien (GYM4, MB, TSB10), verschiedenen Verhältnissen zwischen Kulturvolumina und Gefäßgrößen (1000 mL (1:1), 500 mL (1:8), 300 mL (~1:3), 25 mL Medium (1:4)), unterschiedlichen Gefäßformen sowie mit variierendem Sauerstoffeintrag durch Änderung der Schüttelgeschwindigkeit (Standkultur, 120 rpm) durchgeführt. Alle Versuche fanden bei 28°C im Dunkeln statt und wurden in einem 2 Tagesrhythmus für 14 Tage nach Standardbedingungen (15 mL Probe, Zugabe von 10 mL EtOAc, Abschnitt 4.2.2.5) beprobt. Die jeweilige Vorkultur wurde auf Agarplatte (GYM4) für etwa drei bis vier Wochen, bis die Kultur sichtlich gealtert war, angezogen. Anschließend wurde ein 1 cm² großes Stück zum Animpfen der Hauptkultur verwendet.

Es zeigte sich, dass bei der Anzucht im 4 L Penicillinkolben (Abb. 22) (Standkultur) mit 500 mL GYM4-Medium die bis dahin unbekannt Substanz in großen Mengen auftrat. Zur Ermittlung des optimalen Erntezeitpunkts wurde eine Zeitreihe erstellt, bei der in kurzen Abständen eine Probe nach Standardbedingungen aufgearbeitet wurde.



Abb. 22: 500 mL GYM4-Kultur des Stammes HB202 im Penicillinkolben.

Um genügend Ausgangsmaterial für alle chemischen Analysen sowie für die Bioaktivitätstests zur Verfügung zu haben, wurde Stamm HB202 schließlich in 10 x 500 mL in 4 L Penicillinkolben für 7 Tage bei 28°C (Standkultur) im Dunkeln angezogen. Zum Animpfen der Hauptkultur wurde pro Penicillinkolben $\frac{1}{4}$ einer vier Wochen alten GYM4-Agarplatte des Stammes HB202 verwendet. Hierbei war zu beachten, dass nur dann eine Substanzproduktion stattfand, wenn die Vorkulturplatte eine dunkle Färbung aufwies. Dieses war nur der Fall, wenn die Platte direkt aus der Kryokonservierung angeimpft wurde. Bei einem einmaligen Überimpfen der Platte auf eine neue Agarplatte erfolgte keine Dunkelfärbung der Kultur bzw. der Platte und in der Hauptkultur wurde anschließend kein Mayamycin (**1**) produziert.

4.4.1.2.2 Aufreinigung des Mayamycins (**1**)

Die 5 L GYM4-Kultur des Stammes HB202 wurde mithilfe des Ultra Turrax T25 basic (IKA-Werke GmbH and Co) bei 16.000 rpm für 30 Sekunden aufgeschlossen und anschließend mit 3,5 L EtOAc extrahiert. Ein Aliquot des trockenen Rohextraktes (400 mg) wurde mittels HPLC-UV/MS analysiert. Anschließend wurde der Rohextrakt mithilfe der präparativen HPLC (Phenomenex

Gemini-NX C₁₈ 110A, 100 x 50.00 mm; Elutionsmittel: H₂O (A), MeCN (B); Gradient 0 min 10 % B, 17 min 60 % B, 22 min 100 % B; Fluss 100 mL/min; UV-Detektion bei 236 nm; 8,4-9,0 min) (Abschnitt 8.3, Tabell 27) aufgetrennt und 166,5 mg Mayamycin (**1**) wurde mit einer Reinheit von über 95 % isoliert.

4.4.1.2.3 Chemische Analytik

Der Drehwert von **1** wurde mithilfe eines Perkin Elmer Model 241 bestimmt. Das UV-Spektrum von **1** wurde auf einem NanoVue (GE Healthcare) gemessen. Die NMR-Spektren wurden mit einem Bruker Avance 600 Spektrometer (600 und 150 MHz) mit Cryo-Probenkopf aufgenommen. Die verbleibenden Lösungsmittelprotonen und -kohlenstoffatome wurden als Referenz verwendet (δ_{H} 3,31 ppm und δ_{C} 49,0 ppm für CD₃OD sowie δ_{H} 5,32 ppm und δ_{C} 53,8 ppm für CDCl₂). Mithilfe eines Benchtop Time-of-Flight Spektrometers (MicrOTOF II, Bruker Daltonics) mit positiver Elektrospray-Ionisation (ESI) wurde von **1** eine exakte Masse ermittelt. Für die RP-HPLC wurde ein Gradient (Abschnitt 8.3, Tabelle 27) bestehend aus H₂O (A)/MeCN (B) (0 min 5 % B, 4 min 60 % B, 6 min 100 % B; Fluss 2 mL/min), jeweils versetzt mit 0,1 %iger Ameisensäure, über einer C₁₈ Säule (Phenomenex Onyx Monolithic C18, 100 x 3,00 mm) gegeben. Die Säule war wiederum Bestandteil eines VWR Hitachi Elite LaChrom Systems, welches an einen ESI-Ionenfallen-Detektor (Esquire 4000, Bruker Daltonics) gekoppelt war. Mayamycin (**1**) konnte hier bei 3,0 bis 3,4 min detektiert werden.

4.4.1.2.4 Ermittlung der antimikrobiellen Aktivitäten des Mayamycins (**1**)

Um die biologische Aktivität von **1** möglichst breit zu testen, wurden verschiedene Assays durchgeführt. Zur Ermittlung der antibakteriellen Aktivität im Allgemeinen wurden verschiedene Gram-negative Bakterien wie *Escherichia coli* K12 (DSM 498) und Gram-positive Bakterien wie *Bacillus subtilis* (DSM 347) und *Staphylococcus lentus* (DSM 6672) verwendet. Für speziellere Analysen wurden zwei Verursacher von Körpergeruch am Menschen, *Brevibacterium epidermidis* (DSM 20660) und *Dermabacter hominis* (DSM 7083) sowie der Erreger der gewöhnlichen Akne (*acne vulgaris*), *Propionibacterium acnes* (DSM 1897), eingesetzt. Desweiteren wurde gegen fünf sogenannte Krankenhauskeime, *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603), *Pseudomonas aeruginosa* (DSM 50071), *Staphylococcus aureus* (ATCC 12600), *Staphylococcus aureus* (ATCC 33593) und *Staphylococcus epidermidis* (DSM 20044) getestet, die zum einen gerade bei immunsupprimierten Patienten nosokomiale Infektionen auslösen und zum anderen häufig Antibiotikaresistenzen ausbilden können. Zusätzlich wurde gegen die Hefe *Candida glabrata* (DSM 6425), ein opportunistischer Pathogener, welcher ebenfalls in immungeschwächten Menschen den Urogenitaltrakt oder das Blut befallen kann, sowie gegen verschiedene Pflanzenpathogene wie den Erreger der bakteriellen Blattfleckenkrankheit der Zuckerrübe, *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* (DSM 50252), der Schleimkrankheit bei Kartoffeln und der Welke beim Tabak, *Ralstonia solanacearum* (DSM 9544), den Erreger der Adernschwärze bei Kartoffeln, *Xanthomonas campestris* (DSM 2405), gegen die phytopathogenen Pilze *Septoria*

tritici (BASF), den Erreger der Blattdürre beim Weizen, und *Phytophthora infestans* (BASF), welcher die Kraut- und Knollenfäule bei Kartoffeln und die Kraut- und Braunfäule bei Tomaten auslöst, getestet.

Für alle antibakteriellen Aktivitätstests wurden 50 µL einer 2 mM methanolischen Lösung von **1** in jeweils ein Well einer 96er-Mikrotiterplatte pipettiert und anschließend getrocknet. Übernachtskulturen der jeweiligen Teststämme, angezogen in TSB-Medium, wurden auf eine OD₆₀₀ von 0,02 bis 0,05 verdünnt, um anschließend 200 µL dieser Verdünnung in das entsprechende Well zu pipettieren. Die Mikrotiterplatte wurde für 14 bis 16 h bei 28°C, im Fall von *Dermabacter hominis* für 24 h bei 37°C, inkubiert, um dann 10 µL einer Resazurinlösung (0,2 mg/mL PBS) in jedes Well zu gegeben und die Mikrotiterplatte erneut für 1 bis 2 h bei 28°C zu inkubieren. Um die Inhibition des jeweiligen Teststammes durch das Mayamycin (**1**) festzustellen, wurde die Umwandlung von Resazurin in Resorufin gemessen, indem die Fluoreszenz bei 560_{Ex}/590_{Em} nm bestimmt wurde [Collins & Franzblau 1997] (Abschnitt 4.2.2.8). Die ermittelten Werte wurden mit einer Positivkontrolle (50 mg Chloramphenicol oder Tetrazyklin für die bakteriellen Teststämme; 50 mg Cycloheximid für die Hefe *Candida glabrata*, die Pilze *Septoria tritici* und *Phytophthora infestans*) sowie mit einer Negativkontrolle (keine Substanz) auf der gleichen Mikrotiterplatte abgeglichen.

Propionibacterium acnes wurde unter anaeroben Bedingungen (Anaerocult A mini, Merck, Darmstadt, Deutschland) in PYG-Medium bei 37°C für 48 h angezogen und auf eine OD₆₀₀ von 0,03 verdünnt. 200 µL dieser Verdünnung wurden in ein mit Mayamycin (**1**) vorbereitetes Well pipettiert und unter anaeroben Bedingungen bei 37°C für weitere 48 h inkubiert.

Für *Phytophthora infestans* wurden 190 µL einer Sporensuspension mit einer Konzentration von 1x10⁴ Sporen/mL in ein Well gegeben. Von einer 10 mM Mayamycinlösung in DMSO wurde mit PBS-Puffer eine 100 µM Verdünnung hergestellt und 10 µL davon eingesetzt. Nach der Inkubation von 48 h bei 20°C im Dunkeln wurde die Absorption bei 600 nm gemessen. Als Positivkontrolle diente Cycloheximid.

Die antibakteriellen Tests gegen die klinisch relevanten Stämme *Staphylococcus epidermidis* (DSM 20044), *Staphylococcus aureus* (ATCC 12600), *Staphylococcus aureus* (ATCC 33593), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603) und *Pseudomonas aeruginosa* (DSM 50071) wurden wie in [Sahly et al. 2003] beschrieben von Frau Dr. S. Schubert im Institut für Infektionsmedizin am UK-SH (Kiel) durchgeführt.

4.4.1.2.5 Ermittlung der zytotoxischen Aktivitäten des Mayamycins (**1**)

Alle zytotoxischen Aktivitätstests in dieser Arbeit wurden freundlicherweise von Frau Dr. H. Zinecker durchgeführt.

Für einen ersten Anhaltspunkt bezüglich der Zytotoxizität bzw. der antitumoralen Wirkung einer Substanz wurde die Sensitivität der NIH-3T3, HepG2 und HT-29 Zelllinien (DSMZ, Braunschweig) mithilfe der metabolischen Aktivität des CellTiter-Blue Cell Viability Assay (Promega, Mannheim, Deutschland) bestimmt. Die Maus-Fibroblastenzelllinie NIH-3T3 und die

humane Leberkarzinomzelllinie HepG2 wurden in RPMI 1640 Fertigmedium (Invitrogen, Carlsbad, USA), die humane Kolonkarzinomzelllinie HT 29 in Mc Coys 5A Fertigmedium inkubiert (Invitrogen, Carlsbad, USA). Den Medien wurde 10 % fötales Rinderserum (Promocell, Heidelberg), 100 U/mL Penicillin (Invitrogen, Carlsbad, USA) und 100 µg/mL Streptomycin (Invitrogen, Carlsbad, USA) zugefügt. Die Kulturen wurden feucht bei 37°C und 5 % CO₂ gehalten und zweimal pro Woche überimpft. Für die Aktivitätstests wurden die Zellen mit einer Anzahl von 7.500 Zellen (NIH-3T3) und 10.000 Zellen (HepG2 und HT-29) in Wells einer 96er Mikrotiterplatte gegeben. Nach 24 h wurde das Medium entfernt und jeweils 100 µL einer Mayamycinlösung mit Konzentrationen von 10 µM bis 40 nM (Verdünnung im Medium) zugegeben. Jede Konzentration wurde dreimal getestet. Tamoxifen (Biomol, Hamburg) wurde als Standard eingesetzt. Die Ansätze wurden für 24 h bei 37°C inkubiert, um anschließend die Fluoreszenz mithilfe des Mikrotiterplatten Readers Infinite M200 (Tecan, Männedorf, Schweiz) bei einer Extinktion von 560 nm und einer Emission von 590 nm zu bestimmen.

Die *in vitro* Zytotoxizität gegen die Magen- (GXF 251L), nicht kleinzellige Bronchial- (LXFL 529L), Haut- (MEXF 462NL), Brust- (MAXF 401NL) und Nierenkrebszellen (RXF 486L) wurde mittels eines modifizierten Propidiumiodid Monolayer Assays durch die Firma Oncotest GmbH (Freiburg, Deutschland) bestimmt ^[Dengler et al. 1995].

4.4.1.3 Ergebnisse

Um die Produktion der unbekannt Substanz aus dem marinen *Streptomyces* sp. HB202 zu steigern, wurden die Kultivierungsbedingungen variiert. Neben den in Abschnitt 4.2.2.4 und 4.3.2.2 beschriebenen Bedingungen wurde der Stamm in GYM4-, MB- und TSB10-Medium in Erlenmeyerkolben mit einem Kulturvolumen von 1000 mL, 300 mL und 25 mL bei 120 rpm und im Penicillinkolben als Standkultur (Abb. 22) kultiviert.

Entscheidend für die erfolgreiche Produktion war zunächst die Vorkultur. Es musste sich dabei um eine GYM4-Agarplatte, direkt aus der Kryokonservierung angeimpft, handeln. Diese Platte färbte sich innerhalb von drei bis vier Wochen rötlich bis braun (Abb. 23 B). Im Gegensatz dazu fand keine Mayamycinproduktion statt, wenn die Penicillinkolben von GYM4-Platte angeimpft wurden, welche selbst bereits ein- oder mehrmals überimpft wurde. Diese so überimpfte Kultur des Stammes HB202 verfärbte sich nicht (Abb. 23 A).

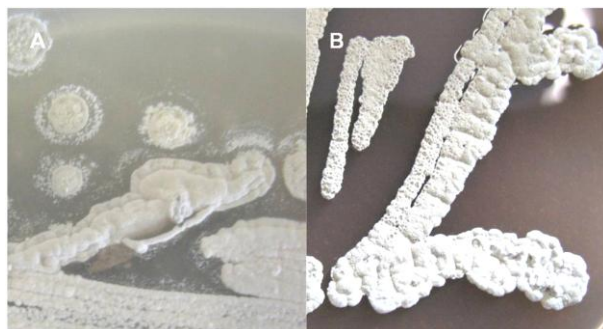


Abb. 23: GYM4-Kulturen des Stammes HB202 auf Agarplatten. A: Kultur, die aus einer Vorkultur überimpft wurde (1. Passage). Keine Verfärbung der Agarplatte. Wenn mit dieser Kultur ein Penicillinkolben inokuliert wurde, fand keine Mayamycinproduktion statt. B: Kultur, die direkt aus der Kryokonservierung angeimpft wurde. Verfärbung der Agarplatte. Bei Verwendung dieser Kultur als Inokulum für den Penicillinkolben erfolgte eine Mayamycinproduktion.

Bei der Anzucht der Hauptkultur im Penicillinkolben mit GYM4-Medium konnte in Extrakten neben den bekannten Medienpeaks nur ein Hauptpeak identifiziert werden, ein bis dahin unbekanntes Benzanthrinderivat, das Mayamycin (**1**) (Abb. 24).

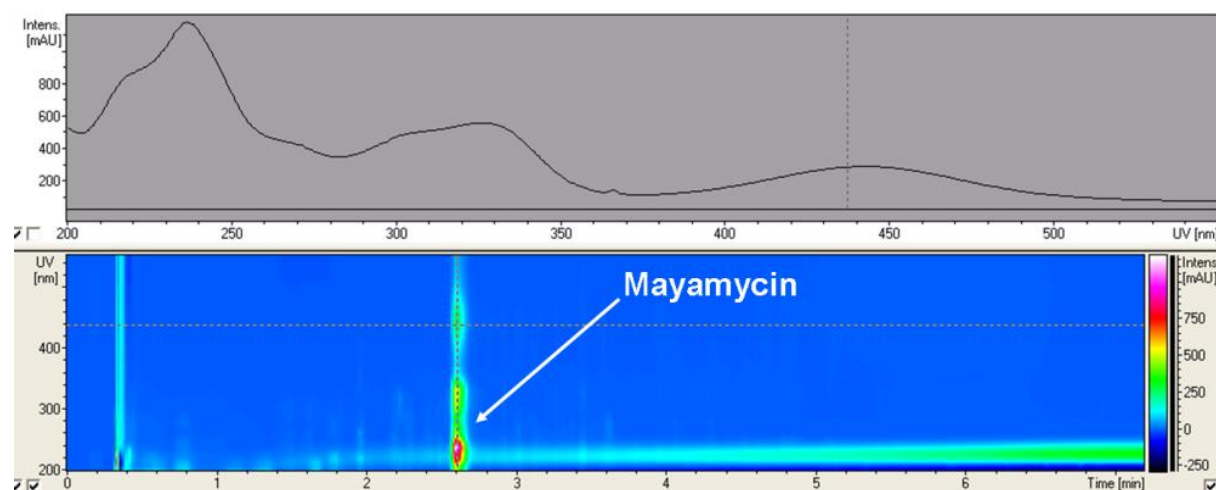


Abb. 24: MeOH-Extrakt des Stammes HB202 von einer Probe aus dem Penicillinkolben nach Auftrennung auf einer C₁₈-Phase. Im 3D-UV-Chromatogramm ist bei 2,6 min Mayamycin (**1**) deutlich als Hauptpeak neben wenigen Medienpeaks zu erkennen. Im oberen Teil der Abbildung ist das UV-Spektrum des Mayamycinpeaks angezeigt.

Das Mayamycin (**1**) wurde aus dem Rohextrakt (400 mg) der Hauptkultur mittels präparativer RP-HPLC (C₁₈) von den Medienbestandteilen getrennt. Insgesamt konnten aus 5 L Kultur 166,5 mg (33,3 mg/L) mit einer Reinheit von über 95 % gewonnen werden.

Mayamycin (**1**) ist ein amorpher, dunkelbrauner Feststoff mit einem Drehwert von $[\alpha]_D^{20}$ 0 (c 0,1, MeOH). Die durch HRESIMS bestimmte Summenformel C₂₆H₂₆NO₇ (gemessen m/z 464,1707 [M+H]⁺; berechnet für C₂₆H₂₆NO₇ m/z 464,1709) wurde durch das ¹³C NMR- sowie das ¹H-¹³C HMBC-Spektrum (Anhang A) bestätigt. In Übereinstimmung mit dem UV-Vis-Spektrum (Abb. 24) (UV (MeOH) λ_{max} (log ε) 440 (2,44), 330 (2,78), 301sh (2,68), 230 (3,07)) konnte **1** (Abb. 25) der Gruppe der Anthrachinone zugeordnet werden.

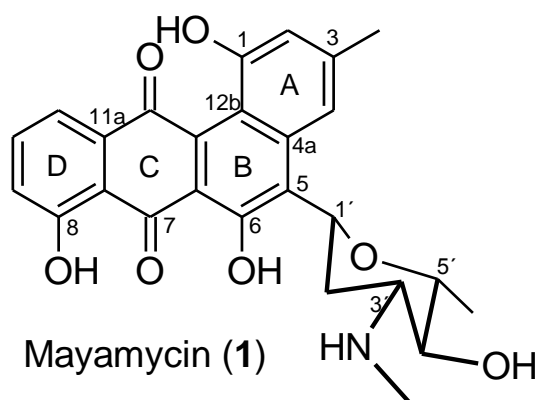


Abb. 25: (1'*R**,3'*R**,4'*S**,5'*R**)-Mayamycin (**1**).

Durch die im Tieffeld des ¹³C NMR-Spektrums auftretenden Signale zwischen δ_C 100 und δ_C 170 ppm, welche den aromatischen Kohlenstoffatomen zugeordnet wurden, und durch die beiden Carbonylgruppensignale bei δ_C 194,2 und 188,0 ppm konnte das Vorhandensein eines Chinongrundgerüsts bestätigt werden (Tabelle 11). Aufgrund der chemischen Verschiebung tragen drei der oben aufgezählten aromatischen Kohlenstoffatome (δ_C 154,4; δ_C 156,5 und δ_C 162,9 ppm) jeweils eine Hydroxygruppe. Außerdem konnte an dem C-3 des aromatischen Grundgerüsts ein Methylrest (δ_H 2,45; s) ausgemacht werden. Umfassende Analysen der 2D-NMR-Daten (¹H-¹H-COSY, HSQC, ¹H-¹³C-HMBC und NOESY; Anhang A) zeigten, dass Mayamycin (**1**) ein Polyketid vom Typ der Angucycline war und eine C-glykosidische Bindung zu einem Aminozucker aufwies (Abb. 25). Die aromatischen Protonen des Ring D des Angucyclingrundgerüsts H-9, H-10 und H-11 wiesen ¹H-¹³C-HMBC-Kopplungen zu den entsprechenden Kohlenstoffatomen C-7a, C-8 und C11a im selben Ring sowie zu dem Carbonylkohlenstoff C-12 im Ring C auf. Im Einzelnen besteht eine ¹H-¹³C-HMBC-Kopplung zwischen H-9 und C-7a sowie zwischen H-9 und C-11. H-10 koppelte mit C-8, C-11 und C-11a, während H-11 mit C-7a, C-9 und der Carbonylgruppe C-12 koppelte. Zusätzlich konnten ¹H-¹H-COSY-Korrelationen zwischen H-9 und H-10 sowie zwischen H-10 und H-11 beobachtet werden. Die verbleibenden zwei aromatischen Protonen H-2 und H-4 zusammen mit der Methylgruppe befanden sich am Ring A. Die genaue Position von Ring A konnte durch ¹H,¹³C-Kopplungen bewiesen werden. Dabei koppelte das Proton H-2 mit CH₃-3, C-4 und C-12, während H-4 mit C-2, CH₃-3, C-4a, C-5 und C-12b koppelte. Die ¹H,¹³C-Kopplung der Methylgruppe mit C-2, C-3 und

C-4 belegte ihre genaue Position an dem C-3 des Rings A. Damit ist das Angucyclinongrundgerüst von **1** dem des Dehydrorabelomycins am ähnlichsten [Gould et al. 1992]. Die ^1H , ^{13}C -Kopplungen von H-4 zu C-5 und C-12b sowie die Kopplungen von H-1' zu C-4a, C-5 und C-6 zeigten, dass der Aminozucker an C-5 gebunden war. Die NOESY-Kopplung zwischen H-4 und H-1' sowie die chemische Verschiebung von C-1' mit δ_{C} 72,8 ppm bekräftigten, dass der Aminozucker und das Benz[*a*]anthracengrundgerüst durch eine C-glykosidische Bindung miteinander verknüpft waren. Eine weiterführende Analyse der NMR-Daten zeigte, dass der Aminozucker ein 2,3,6-Trideoxy-3-methylaminopyran war. Die Position des Methylaminorestes im Zucker konnte mit ^1H , ^{13}C -Kopplungen zwischen N-CH₃ und C-3' sowie mit NOESY-Korrelationen zwischen N-CH₃ und den beiden Protonen am C-2' bewiesen werden. Der Rest der Zuckerstruktur konnte durch die ^1H - ^{13}C -HMBC-Kopplungen der beiden Protonen H-2' mit C-1', C-3' und C-4', des Protons H-4' mit C-3', C-5' und CH₃-5' sowie des Protons H-5' mit C-3', C-4' und CH₃-5' belegt werden. Die Methylgruppe an dem C-5' wies ^1H - ^{13}C -HMBC-Kopplungen mit C-4' und C-5' auf. Zusätzlich traten eine Reihe von ^1H - ^1H -COSY- sowie NOESY-Korrelationen in dem Zuckerrest von H-1' zu H-2'b und H-2'a zu H-3' zu H-4' zu H-5' auf. Die Methylgruppe am C-5' wies NOESY-Korrelationen zu H-5' sowie zu H-4' auf. All diese NOESY-Kopplungen dienten als zusätzlicher Beweis für die Struktur des Zuckers. Die chemische Verschiebung von C-4' (δ_{C} 74,5 ppm) in Kombination mit der Summenformel sprechen für eine freie Hydroxygruppe an dieser Position. Die 3J -Kopplungskonstante von 9,0 Hz für H-5'/H-4' sowie für H-4'/H-3' zeigten die axiale Ausrichtung dieser Protonen an. Die axiale Orientierung von H-1' leitete sich von der NOE-Interaktion zwischen H-3'/H-1' ab. Die Ergebnisse sprechen für einen *N*-Demethylangolosaminzucker und eine relative Konfiguration des Mayamycins (**1**) von (1'*R**,3'*R**,4'*S**,5'*R**).

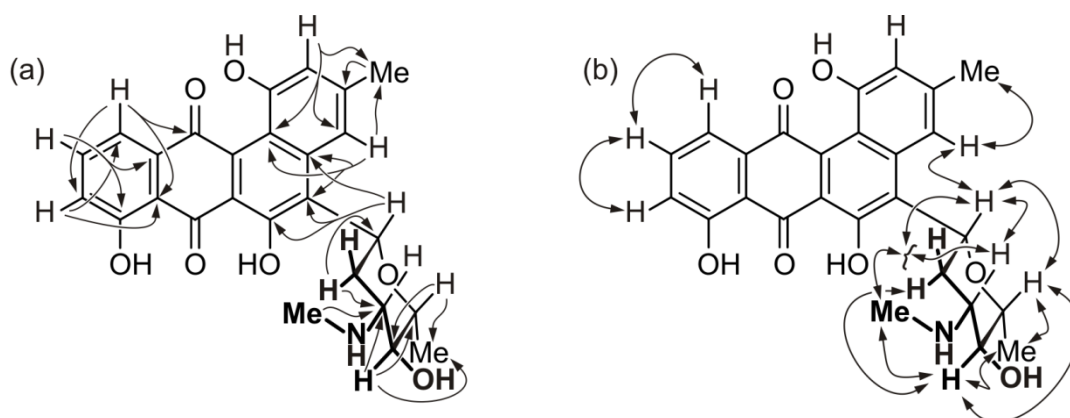


Abb. 26: 2D-NMR-Korrelationen des Mayamycins (**1**), welche relevant für die Strukturaufklärung waren (a = HMBC-Kopplungen; b = NOESY-Korrelationen).

In ersten Versuchen wurde gezeigt, dass der Rohextrakt des Stammes HB202 einige Gram-positive und Gram-negative Bakterien hemmte (Tabelle 5). Mit diesem Vorwissen und dem Wissen, dass Mitglieder der Angucyclin-Klasse ein reichhaltiges Spektrum an unterschiedlichen Bioaktivitäten, wie antibakterielle Aktivitäten, enzyminhibitorische Fähigkeiten oder zytostatische

Effekte, aufweisen, [Rohr & Thiericke 1992] wurde das Mayamycin (**1**) auf Aktivitäten gegen unterschiedliche mikrobielle Vertreter getestet (Tabelle 12).

Tabelle 11: NMR-Daten (600 MHz, CD₃OD) des Mayamycins (**1**).

Position	δ_C , mult.	δ_H (J in Hz)	COSY	HMBC	NOESY
1	156,5; C				
2	114,7; CH	6,74; s		4; 3-CH ₃ ; 12b	
3	143,4; C				
3-CH ₃	22,6; CH ₃	2,45; s		2; 3; 4	4
4	117,6; CH	8,00; s		2; 3-CH ₃ ; 4a; 5; 12b	3-CH ₃ ; 1'
4a	139,9; C				
5	126,5; C ^b				
6	154,4; C ^b				
6a	138,4/119,4; C				
7	194,2; C				
7a	116,3; C				
8	162,9; C				
9	124,9; CH	7,29; dd (1,2; 8,5) ^a	10	7a; 11	10
10	138,8; CH	7,75; dd (7,5; 8,5) ^a	9; 11	8; 11; 11a	9; 11
11	120,4; CH	7,58; dd (1,2; 7,5) ^a	10	7a; 9; 12	10
11a	137,9; C				
12	188,0; C ^b				
12a	119,4/138,4; C				
12b	117,8; C				
1'	72,8; CH	5,70; dd (11,7; 2,0)	2'a; 2'b	4a; 5; 6	4; 2'a; 2'b; 3'; 5'
2'a	32,9; CH ₂	2,35; ddd (13,0; 11,7)	1'; 3'	1'; 3'; 4'	1'; 3'; 3'-N-CH ₃
2'b	32,9; CH ₂	2,27; ddd (13,0; 2,0; 4,8)	1'; 3'	1'; 3'; 4'	1'; 3'; 3'-N-CH ₃
3'	63,0; CH	3,23; br; ddd (4,8; 11,7; 9,0)	2'; 4'		1'; 2'a; 2'b; 3'-N-CH ₃
3'-N-CH ₃	31,4; CH ₃	2,63; s		3'	2'a; 2'b; 3'; 4'
4'	74,5; CH	3,41; t (9,0)	3'; 5'	3'; 5'; 5'-CH ₃	2'a; 3'; 3'-N-CH ₃ ; 5'; 5'-CH ₃
5'	79,2; CH	3,56; dq (9,5; 6,1)	4'; 5'- CH ₃	3'; 4'; 5'-CH ₃	1'; 4'; 5'-CH ₃
5'-CH ₃	18,7; CH ₃	1,42; d (6,1)	5'	4'; 5'	4'; 5'

^a Aufgrund des breiten ¹H Signals im MeOD wurden die J Werte in CD₂Cl₂ aufgenommen.

^b Abgeleitete HMBC-Korrelationen.

Es zeigte sich, dass **1** eine gute Aktivität gegen etliche Teststämme inklusive klinisch relevanter Bakterien wie *Pseudomonas aeruginosa* oder den Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) aufwies. Ebenfalls konnten Aktivitäten gegen den Erreger der gewöhnlichen Akne *Propionibacterium acnes*, die Verursacher von Körpergeruch *Dermabacter hominis* und *Brevibacterium epidermidis* sowie den phytopathogenen *Xanthomonas campestris* aufgezeigt werden. Im Gegensatz dazu wurde keine Inhibition der Hefe *Candida glabrata*, des

Pilzes *Septoria tritici* sowie der Gram-negativen Bakterien *Escherichia coli*, *Pseudomonas syringae* und *Ralstonia solanacearum* festgestellt.

Zusätzlich konnte eine Aktivität (IC₅₀-Wert: 15,2 µM; Positivkontrolle Cycloheximid IC₅₀ 0,36 µM) gegen den phytopathogenen Oomyceten *Phytophthora infestans* nachgewiesen werden.

Tabelle 12: Antibakterielle Aktivitäten von **1** gegen verschiedene bakterielle Teststämme.

Teststamm	IC ₅₀ (µM)	IC ₅₀ (µM) der Referenzsubstanz
<i>Bacillus subtilis</i> (DSM 347) Referenzsubstanz: Chloramphenicol	8,0	9,0
<i>Brevibacterium epidermidis</i> (DSM 20660) Referenzsubstanz: Tetrazyklin	7,45	13,9
<i>Dermabacter hominis</i> (DSM 7083) Referenzsubstanz: Tetrazyklin	8,4	1,2
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC 700603; ESBL)	2,5	n.b. ^a
<i>Propionibacterium acnes</i> (DSM 1897) Referenzsubstanz: Chloramphenicol	31,2	1,0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (DSM 50071) Referenzsubstanz: Chloramphenicol	2,5	27,3
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 12600) Referenzsubstanz: Moxifloxacin	2,5	7,5
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 33593; MRSA)	1,25	n.b. ^a
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (DSM 20044)	0,31	n.b. ^a
<i>Staphylococcus lentus</i> (DSM 6672) Referenzsubstanz: Chloramphenicol	8,0	2,3
<i>Xanthomonas campestris</i> (DSM 2405) Referenzsubstanz: Chloramphenicol	30,0	3,6

^a Nicht bestimmt.

In weiteren Untersuchungen konnte eine *in vitro* Zytotoxizität gegen acht humane Krebszelllinien (Tabelle 13) gezeigt werden. Die bestimmten IC₅₀-Werte lagen in einem Konzentrationsbereich von 0,13 µM bis 0,33 µM. Allerdings war Mayamycin (**1**) mit einem IC₅₀-Wert von 0,22 µM ebenfalls zytotoxisch gegenüber der Mausfibroblastenzelllinie NIH-3T3. Hierbei zeigte die Positivkontrolle Tamoxifen einen IC₅₀-Wert von 23,7 µM.

Tabelle 13: Zytotoxische Aktivität von **1** gegen acht humane Krebszelllinien.

Krebszelllinie	IC ₅₀ (µM)	IC ₅₀ (µM) der Referenzsubstanz
HepG2 (Leberkarzinomzelllinie) Referenzsubstanz: Tamoxifen	0,2	23,4
HT-29 (Kolonkarzinomzelllinie) Referenzsubstanz: Tamoxifen	0,3	38,6
GXF251L (Magenkarzinomzelllinie) Referenzsubstanz: Adriamycin	0,2	<0,052
LXF529L (Bronchialkarzinomzelllinie) Referenzsubstanz: Adriamycin	0,16	<0,052
MAXF401NL (Brustkrebszelllinie) Referenzsubstanz: Adriamycin	0,29	<0,052
MEXF462NL (Melanomzelllinie) Referenzsubstanz: Adriamycin	0,13	<0,052
PAXF1657L (Pankreastumorzelllinie) Referenzsubstanz: Adriamycin	0,15	<0,052
RXF486L (Nierenkrebszelllinie) Referenzsubstanz: Adriamycin	0,33	<0,052

4.4.1.4 Diskussion

In dem *Streptomyces* sp. HB202 wurde neben den bereits beschriebenen Streptophenazinen A - H und einigen weiteren bekannten Substanzen (Abschnitt 4.3.2.2 und 4.3.3.1) das bis dahin unbekannte aromatische Polyketid Mayamycin (**1**) identifiziert werden. Die Angucyclingrundstruktur des Mayamycins (**1**) ist bereits seit 1986 von den Benzanthrinen A und B bekannt [Rasmussen et al. 1986; Rohr & Thiericke 1992]. Allerdings weisen die meisten bekannten Angucycline ein O-Desoxyglykosid auf und nur eine geringe Anzahl ein C-Glykosid [Martin et al. 2007] wie es bei **1** der Fall war. Zusätzlich ist der Zucker am C-5 lokalisiert und bisher sind nur Strukturen bekannt, bei denen an dieser Position ein S- oder O-glykosidisch gebundener Zucker vorkommt [Etho et al. 1987; Okabe et al. 1990]. Dennoch sind Deoxyaminozucker im Allgemeinen häufig Teil verschiedener Antibiotika, wie beispielsweise das D-Desoamin im Erythromycin [Harris et al. 1965] (Abb. 5) oder im Oleandomycin [Hochstein et al. 1960], das L-Daunosamin im Daunorubicin [Hoshino & Fujiwara 1983] sowie das D-Angolosamin im Angolamycin [Kinumaki & Suzuki 1972] oder im Medermycin [Léo et al. 2002]. Im Falle des Mayamycins (**1**) ist der Aminozucker eine mono-N-demethylierte Form des Angolosamins. Die Antibiotika P371A [Uesato et al. 2000] und Marmycin [Martin et al. 2007] sind ebenfalls Beispiele für Angucycline, welche einen Aminozucker gebunden haben. Aber im Hinblick auf die Kombination der Angucyclingrundstruktur mit ihrem speziellen Aminozucker und in Verbindung mit der Verknüpfungsstelle dieses Zuckers sowie dem Vorhandensein einer C-glykosidischen Bindung ist das Mayamycin (**1**) neu gegenüber den bisher beschriebenen Angucyclinaminozuckerstrukturen.

Es ist bekannt, dass sich manche aromatische Polyketide in Streptomyceten durch Stress induzieren lassen. So konnte bei Stamm *Streptomyces venezuelae* ISP5230 durch einen Schock mit Ethanol, Hitze oder Phagen die Produktion des Jadomycin B hervorgerufen werden [Doull et al. 1994]. Auch bei der Mayamycinproduktion könnte der Stress durch zu wenig Sauerstoffeintrag eine Rolle spielen. Mayamycin (**1**) trat in dieser Arbeit nur in der Standkultur oder im Plattenversuch auf. In allen Versuchen, welche bei einer Schüttelgeschwindigkeit von 120 rpm durchgeführt wurden, wurde **1** nicht produziert. Im Allgemeinen hat Sauerstoff einen großen Einfluss auf die Sekundärmetabolitproduktion von Streptomyceten. So kann *Streptomyces coelicolor* A3(2) mit einer größeren Verfügbarkeit von Sauerstoff die Produktion des Antibiotikums Actinorhodin steigern [Elibol & Mavituna 1999]. Im Gegensatz dazu konnte für *Streptomyces tendae* gezeigt werden, dass eine zu hohe Sauerstoffkonzentration die Produktion des Antibiotikums Nikkomycin hemmt [Trück et al. 1990].

Die zuvor durchgeführten genetischen Untersuchungen des Stammes HB202 ergaben unter anderem ein Typ II PKS PCR-Produkt mit großen Ähnlichkeiten zu bekannten aromatischen Polyketidgenclustern (Tabelle 2). Um eine exakte Aussage über den Zusammenhang dieses amplifizierten Genfragmentes und der Biosynthese des Mayamycins (**1**) zu treffen, müsste eine funktionelle Analyse, wie beispielsweise ein Knock-Out-Experiment, durchgeführt werden, bei dem das gefundene Gen vollständig abgeschaltet wird und im Anschluss keine Mayamycinproduktion mehr stattfinden dürfte. Es ist jedoch bekannt, dass Mitglieder der

Angucyclinklasse tetrazyklische Benz[a]anthrachinone sind, welche über einen Polyketidbiosyntheseweg hergestellt werden [Rohr & Thiericke 1992]. Angucycline sind typische Typ II PKS-Metabolite, deren Grundgerüste die Folge der Kondensation von 10 Acetateinheiten sind. Als Ergebnis dieses Biosyntheseweges sind die Methylgruppe am C-3 und die Hydroxygruppe am C-8 besonders typisch und beispielsweise Bestandteil des Landomycins sowie des Jadomycins [Olano et al. 2009]. Obwohl Ausnahmen von dieser Regel sehr wohl bekannt sind, bildet das Mayamycin (**1**) keine solche, sondern wird sehr wahrscheinlich durch diesen üblichen Biosyntheseweg hergestellt.

Der Vergleich bekannter Angucyclingencluster, wie das des Jadomycin B [Han et al. 1994], Landomycin E [Zhu et al. 2005], Rubromycin β [Metsä-Ketelä et al. 2004], der Angucycline Sch47554 und Sch47555 [Basnet et al. 2006] sowie des Urdamycin [Decker & Haag 1995], zeigte einen hohen Übereinstimmungsgrad bezüglich der Organisation des gesamten Genclusters sowie der entsprechenden Gene an sich [Metsä-Ketelä et al. 2004]. All diese Angucyclingencluster haben das charakteristische minimale PKS-System mit einer Ketosynthesedomäne, einem CLF und einem Acyl-Carrier-Protein. Gene für eine Zyklase sowie eine Oxygenase sind von der minimalen PKS in Richtung des 3'-Endes angeordnet, das Gen für die Reduktase in Richtung des 5'-Endes [Decker & Haag 1995; Puder 1998; Metsä-Ketelä et al. 2004; Zhu et al. 2005]. Auch das Gencluster des Mayamycins (**1**) ist mit großer Wahrscheinlichkeit so aufgebaut. Um genauere Informationen zu erhalten, müsste zumindest das Gencluster z.B. mittels einer Cosmidbank analysiert werden. Heutzutage bietet sich allerdings die komplette Genomanalyse an. So könnten außerdem zusätzliche Informationen über Stamm HB202 betreffend weiterer Sekundärmetabolitgencluster und vor allem deren Regulation gesammelt werden. Schließlich konnte neben dem PKS-Genfragment auch ein NRPS-Genfragment amplifiziert werden, welchem bis jetzt noch kein entsprechender Sekundärmetabolit zugeordnet wurde. Es ist außerdem anzunehmen, dass dieser *Streptomyces* Stamm, wie eine Vielzahl anderer Streptomyceten [Ōmura et al. 2001; Bentley et al. 2002], über eine ganze Reihe noch unidentifizierter Gencluster zur Sekundärmetabolitproduktion verfügt. Dieses wird besonders deutlich im Hinblick auf die Kultivierungs- und Stimulationsversuche in Abschnitt 4.3.3.1 sowie im Hinblick auf die Diplomarbeit von [Gruchattka 2010]. In allen Versuchen wurde deutlich, dass Stamm HB202 eine enorme Metabolitvielfalt aufweist und bis jetzt nur einige dieser Substanzen identifiziert wurde. Zusätzlich ist bekannt, dass Streptomyceten im Allgemeinen häufig mehr als 20 Gencluster zur Naturstoffproduktion in ihrem Genom tragen [Bentley et al. 2002; Ikeda et al. 2003] und meistens ihr gesamtes Sekundärmetabolitspektrum nur nach und nach erfasst werden kann.

Genau wie andere tetrazyklische Benz[a]anthrachinone, welche eine große Bandbreite an biologischen Aktivitäten aufweisen wie beispielweise antibakterielle Aktivitäten, Inhibition von Enzymen und zytostatische Effekte [Rohr & Thiericke 1992], wies auch **1** eine Reihe an unterschiedlichen biologischen Aktivitäten auf. Vermutlich beruht diese Bandbreite auf einer sehr allgemeinen Wirkung, wie der Interkalierung in die DNA. Für eine therapeutische Anwendung ist Mayamycin (**1**) zu zytotoxisch. Im Vergleich zu der als Medikament gegen Brustkrebs

eingesetzten Positivkontrolle Tamoxifen (IC_{50} -Wert von 23,7 μ M) hat **1** eine viel höhere Zytotoxizität mit einem IC_{50} -Wert von 0,22 μ M. Mayamycin (**1**) würde als Medikament also vermutlich mehr Schaden im menschlichen Körper anrichten als positiven Nutzen haben. Allerdings muss für eine genaue Aussage auch der therapeutische Index herangezogen werden. Hierbei wird das Verhältnis der therapeutischen zu der toxischen Dosis einer Substanz errechnet. Je kleiner dieser Index, desto bedenklicher der Einsatz als Arzneimittel. Alle getesteten Krebszelllinien zeigten einen ähnlichen IC_{50} -Wert wie die Maus-Fibroblastenzelllinie NIH-3T3. Um als Medikament eine Chance zu haben, müssten die IC_{50} -Werte der Krebszelllinien weit unter dem der Fibroblastenzelllinie liegen. Dennoch wäre es grundsätzlich interessant, Genaueres über die Wirkung des Mayamycins (**1**) zu erfahren. Außerdem müssten aufgrund der eingeschränkten Aussagekraft dieser *in vitro* Untersuchungen anschließende Studien am Tiermodell durchgeführt werden, um ein klareres Bild zu erhalten.

4.4.1.5 Zusammenfassung

Durch diverse Vorarbeiten mit dem aus dem marinen Schwamm *H. panicea* isolierten Stamm *Streptomyces* sp. HB202 konnten bereits antibakterielle Aktivitäten des Rohextraktes, das Vorhandensein eines Typ II PKS-Genfragmentes, die Fähigkeit zur Stimulierbarkeit und die Produktion neuer Sekundärmetabolite gezeigt werden. Durch weitere Veränderung der Kultivierungsbedingungen wurde die Produktion eines neuen Benz[*a*]anthracenderivates – Mayamycin (**1**) – angeregt. Mittels HPLC-UV/MS sowie mithilfe von 1D- und 2D-NMR-Spektroskopie wurde die Struktur des Moleküls aufgeklärt. **1** zeigte starke zytotoxische Aktivitäten gegen acht humane Krebszelllinien sowie Aktivitäten gegen mehrere Bakterien und Pilze einschließlich antibiotikaresistenter Erreger.

4.4.2 MICROMONOSPORA SP. HB254

4.4.2.1 Einleitung

Extrakte des *Micromonospora* sp. HB254 Stammes zeigten in den vorherigen Analysen (Tabelle 5, Abschnitt 4.2.3) eine Bioaktivität gegen das Gram-negative Bakterium *Ralstonia solanacearum* und einen Hauptpeak in der chemischen Analyse. Da diesem Peak zunächst keine bekannte Substanz zugeordnet werden konnte, sollte im Nachfolgenden ausreichend Biomasse für die Isolierung und nachfolgende Substanzencharakterisierung zur Verfügung gestellt werden.

Im Allgemeinen ist die Gattung *Micromonospora* dafür bekannt, interessante Naturstoffe zu produzieren. Gerade in den letzten Jahren wurden einige neue und vielversprechende Substanzen aus marinen *Micromonospora* Stämmen isoliert. Dazu gehören die zytotoxischen Alkaloide Staurosporin, 4'-N-Methyl-5'-hydroxystaurosporin und 5'-Hydroxystaurosporin [Hernández et al. 2000], das antitumorale Depsipeptid Thiocoralin [Pérez Baz et al. 1997] sowie das zytotoxische Makrolid IB-96212 [Canedo et al. 2000]. Von besonderem Interesse ist das Diazepinomicin, ein strukturell neues Dibenzodiazepinon aus einer marinen *Micromonospora* Art, welches eine breite antitumorale Aktivität gegen Krebszellen *in vitro* als auch in *in vivo* aufweist. In klinischen Studien zeigte es zunächst eine gute Verträglichkeit bei Primaten sowie anschließend auch bei Krebspatienten. Mittlerweile wird Diazepinomicin in ersten klinischen Untersuchungen zur Behandlung von Hirntumoren angewandt [Charan et al. 2004; Campas 2009]. Bis heute ist allerdings kein Sekundärmetabolit bekannt, welcher von einer mit einem Schwamm assoziierten *Micromonospora* Art produziert wird. Daher bestand durchaus die Möglichkeit, dass es sich bei der Substanz aus Stamm HB254, welcher mit dem Schwamm *H. panicea* assoziiert war, um einen neuen Naturstoff handelte.

4.4.2.2 Material und Methoden

4.4.2.2.1 Kultivierung und Extraktion der *Micromonospora* sp. HB254 Kultur

Um genügend Ausgangsmaterial für die Isolierung des Hauptpeaks aus *Micromonospora* sp. HB254 zu erhalten, wurden mithilfe von 1 cm² großen GYM4-Agarplattenstücken jeweils 12 x 1 L GYM4-Kulturen im 2 L Erlenmeyerkolben angeimpft. Die Agarplatten waren etwa drei bis vier Wochen bei 28°C im Dunkeln gewachsen. Um den idealen Erntezeitpunkt zu bestimmen, wurde alle ein bis drei Tage eine 15 mL Probe nach Standardbedingungen (Zugabe von 10 mL EtOAc, Abschnitt 4.2.2.5) aufgearbeitet und analysiert. Die Hauptkultur wurde schließlich für neun Tage bei 120 rpm und 28°C im Dunkeln kultiviert.

4.4.2.2.2 Aufreinigung des Hauptpeaks aus der Kultur des *Micromonospora* sp. HB254

Die 12 L GYM4-Kultur des Stammes HB254 wurden mithilfe des Ultra Turrax T25 basic (IKA-Werke GmbH and Co) bei 16.000 rpm für 30 Sekunden aufgeschlossen und anschließend mit 6 L EtOAc extrahiert. Ein Aliquot des trockenen Rohextraktes (152 mg) wurde mittels HPLC-UV/MS analysiert. Anschließend wurde der Rohextrakt mit der präparativen HPLC (Merck Hitachi System, Pumpe: L-7150; Autosampler: L-2450 DAD-Detektor: L-2450; Säule: Phenomenex Gemini C₁₈ 110A AXIA, 100 x 21.20 mm; Elutionsmittel: H₂O (A), MeCN (B); Gradient 0 min 35 % B, 12 min 100 % B, 14,0 min 100 % B; Fluss 15 mL/min; UV-Detektion via DAD) aufgetrennt. Peak 2 (Abb. 18 und Tabelle 8) konnte zwischen 6,6 und 6,8 min detektiert werden. Etwa 2 mg konnten mit einer Reinheit von über 80 % isoliert werden.

4.4.2.2.3 Chemische Analytik

Das ¹H NMR-Spektrum wurde mit einem Bruker AV 600 Spektrometer (600 und 150 MHz) aufgenommen. Die verbleibenden Lösungsmittelprotonen wurden als Referenz verwendet (δ_{H} 3,31 für CD₃OD). Für die RP-HPLC wurde ein Gradient (Abschnitt 8.3, Tabelle 27) bestehend aus H₂O (A)/MeCN (B) (0 min 5 % B, 4 min 60 % B, 6 min 100 % B; Fluss 2 mL/min), jeweils versetzt mit 0,1 %iger Ameisensäure, über einer C₁₈ Säule (Phenomenex Onyx Monolithic C18, 100 x 3,00 mm) gegeben, die wiederum Bestandteil eines VWR Hitachi Elite LaChrom Systems war, das an einen ESI-Ionenfallen-Detektor (Esquire 4000, Bruker Daltonics) gekoppelt war. Peak 2 konnte bei 3,3 min detektiert werden.

4.4.2.3 Ergebnisse

Bei mehreren 12 L Ansätzen des *Micromonospora* sp. HB254 trat vornehmlich ein Hauptpeak mit einem UV (MeOH) von 360, 342, 326s, 303, sh293, 223s nm und einer Masse von m/z 451 $[M]^+$ auf (Abb. 27). Diese Substanz wurde bereits zuvor (Abschnitt 4.3.3.2) als Peak 2 bezeichnet und es wurde vermutet, dass es sich um Teleocidin A oder B handeln könnte.

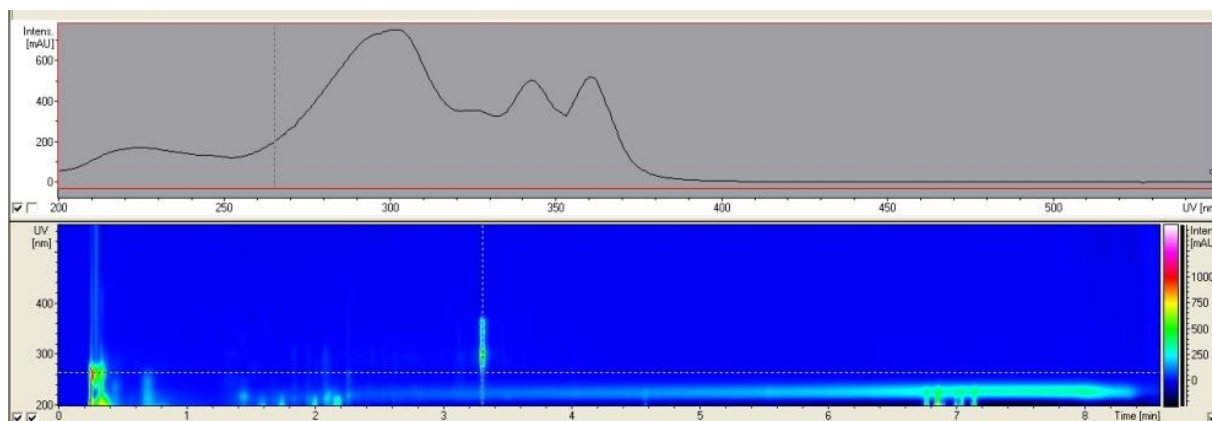
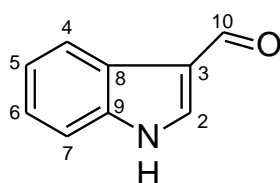


Abb. 27: 3D-UV-Chromatogramm des Extraktes eines 12 L Ansatzes von der *Micromonospora* sp. HB254 Kultur nach Auftrennung an einer C_{18} -Phase. Peak 2 war bei ca. 3,3 min zu erkennen. Der obere Teil der Abbildung zeigt das UV-Spektrum des Peaks 2.

Peak 2 ließ sich zunächst isolieren, es konnten aber anschließend keine adäquaten NMR-Spektren aufgenommen werden, da die isolierte Substanz besonders lichtempfindlich zu sein schien. Auch mit der entsprechenden Vorsicht ist es bis jetzt nicht gelungen, eine Stabilität des Peak 2 zu erhalten. Die erhaltenen 1H NMR-Daten [1H NMR (500 MHz, MeOD) δ_H 9,89 (1H, s, COH-10), 8,17 (1H, d, $J = 7,88$ Hz, CH-4), 8,09 (1H, s, CH-2), 7,48 (1H, d, $J = 7,91$ Hz, CH-7), 7,28 (1H, t, $J = 7,20$ Hz, CH-5), 7,24 (1H, t, $J = 7,20$ Hz, CH-6)] (Anhang A) konnten aber zumindest Aufschluss über das Zerfallsprodukt geben. Hierbei handelte es sich um Indol-3-carbaldehyd (Abb. 28). Aufgrund der Instabilität der Substanz aus Stamm HB254 wurden keine Bioaktivitätstests durchgeführt.



Indol-3-carbaldehyd

Abb. 28: Indol-3-carbaldehyd, das Zerfallsprodukt der Substanz aus Stamm HB254.

4.4.2.4 Diskussion

Immer wieder kommt es vor, dass Schwierigkeiten bei der Charakterisierung eines unbekanntes Naturstoffes auftreten. Sei es, dass die Kultur nicht genügend Ausgangsmaterial produziert, Derivate sich nicht sauber voneinander trennen lassen oder dass die isolierte Substanz hohe Instabilität aufweist. Auch im Falle des Stammes *Micromonospora* sp. HB254 konnte für die aussagekräftige NMR-Analyse kein geeignetes Material gewonnen werden. Allerdings passen die erhaltenen Daten der Peaks 1 und 2 (Abschnitt 4.3.3.2) sehr gut zu denen der Teleocidine A (m/z 437 $[M]^+$) und B (m/z 451 $[M]^+$), isoliert aus *Streptomyces* sp. [Takashima & Sakai 1960; Fujiki et al. 1979]. Auch in der Literatur wurde für die Derivate des Teleocidin eine Photolabilität beschrieben [Irie et al. 1993]. Es könnte sich bei den zwei Substanzen aus Stamm HB254 also um Teleocidin A und B handeln. Um diese Annahme allerdings zweifelsfrei bestätigen zu können, müsste es gelingen, die Stabilität von Peak 2 zu gewährleisten. Es würde sich mit Sicherheit lohnen, mehr Informationen zu gewinnen, da bis heute nur wenige Indolstrukturen aus der Gattung *Micromonospora* bekannt sind, wie die hochaktiven Substanzen Staurosporin, 4'-*N*-Methyl-5'-hydroxystaurosporin und 5'-Hydroxystaurosporin [Hernández et al. 2000] sowie das Diketopiperazin Sch 725418 [Yang et al. 2004]. Es wäre also besonders aufschlussreich, eine Bedingung zu finden, unter der Peak 2 und vielleicht sogar Peak 1 isoliert ihre Stabilität behalten würden, um so weitere chemische und biologische Untersuchungen durchführen zu können. Allerdings wäre eine nachfolgende biotechnologische Anwendung der unmodifizierten Substanz möglicherweise recht schwierig, obwohl es durchaus, wie im Falle des Nystatins, Substanzen gibt, die trotz ihrer Lichtempfindlichkeit mittlerweile als Medikamente eingesetzt werden.

4.4.3 NOCAPYRONE A - D, γ -PYRONE AUS *NOCARDIOPSIS* SP. HB383

4.4.3.1 Einleitung

Mittlerweile sind recht viele Sekundärmetabolite aus *Nocardioopsis* Stämmen bekannt. Aufgrund der vielversprechenden Hemmung der Protein Kinase C gehört das Staurosporin-ähnliche K-252a (Abb. 29) zu den interessantesten Strukturen dieser Gattung [Kase et al. 1986].

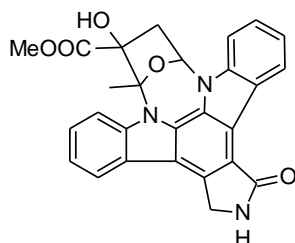


Abb. 29: Der Protein Kinase C Hemmer K-252a, isoliert aus *Nocardioopsis* sp.

Obwohl viele unterschiedliche Metabolite von der Gattung *Nocardioopsis* produziert werden, wurden bis jetzt keine γ -Pyrone beschrieben. Im Allgemeinen kommen Pyrone allerdings häufig in der Natur vor und werden von den unterschiedlichsten Organismen hergestellt [Wilk et al. 2009]. Die meisten wurden im Laufe der Zeit aus marinen Organismen isoliert [Wilk et al. 2009]. Es gibt Vermutungen, dass Pyrone als sogenannte Allomone, also Botenstoffe, dienen [Wilk et al. 2009]. Auch innerhalb der Actinomyceten und gerade bei Streptomycceten kommen γ -Pyrone häufig vor [Yano et al. 1986; Yoshida et al. 1990]. Eines der bekanntesten Beispiele aus einem Streptomycceten ist das Actinopyron A [Yano et al. 1986] (Abb. 30), für welches zunächst gefäßerweiternde und antibakterielle Eigenschaften beschrieben und diese später durch vielversprechende Aktivitäten gegen den für eine Reihe von Magenerkrankungen verantwortlichen *Helicobacter pylori* ergänzt wurden [Taniguchi et al. 2000].

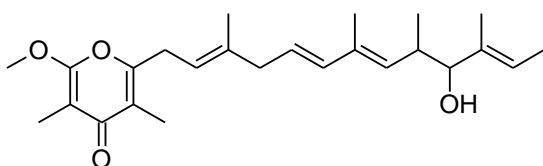


Abb. 30: Actinopyron A aus *Streptomyces pactum*.

Bei der Untersuchung von mit dem Schwamm *H. panicea* assoziierten Actinomyceten (Abschnitt 4.2.3) stellte sich heraus, dass Stamm *Nocradioopsis* sp. HB383 ein 615 bp langes Genfragment mit 89 %iger Ähnlichkeit zu der 3-Oxoacyl-(acyl-carrier-protein) Synthase II aus *Nocardioopsis dassonvillei* subsp. *dassonvillei* DSM 43111 (EEK37209) und 75 %iger Übereinstimmung mit dem Gen der Polyketid-Beta-ketoacyl-Synthase α aus *Streptomyces coelicolor* (NP_629460) [Bentley et al. 2002] zeigte (Tabelle 2). Außerdem konnten im Kulturextrakt Aktivitäten gegen Gram-positive Bakterien nachgewiesen werden (Tabelle 5). Durch die Stimulationsversuche (Abschnitt 4.3.3.3) mit diesem Stamm war es möglich, das Sekundärmetabolitprofil zu erweitern. Einige bis dahin unidentifizierte Substanzen konnten erst im Nachhinein aufgeklärt werden. Dabei handelte es sich um vier neue γ -Pyronestrukturen, die Nocapyrone A - D (2-5), sowie weitere, bereits bekannte Substanzen.

4.4.3.2 Material und Methoden

4.4.3.2.1 Kultivierung und Extraktion der *Nocardiopsis* sp. HB383 Kultur

Um einige der unidentifizierten Peaks aus den vorherigen Versuchen näher zu beschreiben, wurde Stamm *Nocardiopsis* sp. HB383 im größeren Maßstab angezogen. Dafür wurde eine 100 mL Vorkultur in GYM4-Medium in einem 300 mL Erlenmeyerkolben mit einem Kryokügelchen hergestellt und für drei Tage bei 120 rpm und 28°C im Dunkeln kultiviert. Von dieser Vorkultur wurden jeweils 10 mL in einen mit 1 L GYMCaCl₂ Medium vorbereiteten 2 L Erlenmeyerkolben überführt. Die Kultur wuchs für 17 Tage bei 120 rpm und 28°C im Dunkeln. Um den Verlauf der Metabolitproduktion zu überprüfen, wurde die Kultur in einem 2- bis 3-Tagesabstand nach Standardbedingungen (15 mL Probe, Zugabe von 10 mL EtOAc, Abschnitt 4.2.2.5) beprobt.

Die Kultur (12 L) wurde mithilfe des Ultra Turrax T25 basic (IKA-Werke GmbH and Co., Staufen) bei 16.000 rpm für 30 Sekunden homogenisiert und mit 6 L EtOAc extrahiert. Der Rohextrakt (804 mg) wurde getrocknet, in MeOH resuspendiert und mittels HPLC-UV/MS analysiert. Dafür wurde eine RP-HPLC mit einem Gradient (Abschnitt 8.3, Tabelle 27) bestehend aus H₂O (A)/MeCN (B) (0 min 5 % B, 4 min 60 % B, 6 min 100 % B; Fluss 2 mL/min), jeweils versetzt mit 0,1 %iger Ameisensäure, über einer C₁₈ Säule (Phenomenex Onyx Monolithic C18, 100 x 3,00 mm) gegeben, die wiederum Bestandteil eines VWR Hitachi Elite LaChrom Systems war, das an einen ESI-Ionenfallen-Detektor (Esquire 4000, Bruker Daltonics) gekoppelt war. Nocapyron A (**2**) und B (**3**) wurde bei 3,2 bzw. bei 4,5 min detektiert.

4.4.3.2.2 Aufreinigung der Nocapyrone A - D (**2-5**) und des (2*E*/5*Z*)-2-[(4-Methoxyphenyl)methylen]-5-(2-methylpropyliden)-3,6-piperazindion (**6**)

Der Rohextrakt wurde mittels präparativer HPLC (Merck Hitachi System, Pumpe: L-7150; Autosampler: L-2450 DAD-Detektor: L-2450; Säule: Phenomenex Gemini C₁₈ 110A AXIA, 100 x 21.20 mm; Elutionsmittel: H₂O (A), MeCN (B); Gradient 0 min 5 % B, 16 min 70 % B, 16,5 min 100 % B; Fluss 18 mL/min; UV-Detektion via DAD) aufgetrennt. Nocapyron A (**2**) (3,7 mg) eluierte bei 6,5 min, Nocapyron B (**3**) (0,3 mg) bei 9,1 min. Um Nocapyron C (**4**) (0,9 mg, eine Mischung aus zwei Stereoisomeren) und Nocapyron D (**5**) (0,2 mg) zu isolieren, wurden die vorhandenen Fraktionen mittels präparativer HPLC weiter aufgearbeitet. Es wurde eine semi-präparative Normalphasensäule (Phenomenex Luna silica 5micron 250 x 10.00 mm) und ein Gradient aus Isopropanol (C) und Hexan (D) (0 min 75 % D, 16 min 80 % D, Fluss 5 mL/min) verwendet. Nocapyron C (**4**) und Nocapyron D (**5**) eluierten bei 7,2 min bzw. bei 9,1 min. **6** (0,6 mg) fiel im methanolischen Extrakt als farbloser Feststoff aus und wurde daraufhin mehrfach mit H₂O gewaschen. Anschließend wurde viermal 1 mL MeOH dazugegeben und die methanolische Lösung dann über die präparative HPLC mit einem H₂O/ACN-Gradienten von 45 % ACN auf 90 % ACN in 13 Minuten aufgereinigt. **6** eluierte bei 5,0 min.

4.4.3.2.3 Chemische Analytik

Mithilfe eines Benchtop Time-of-Flight Spektrometers (MicroTOF II, Bruker Daltonics) mit positiver Elektrospray-Ionisation (ESI) wurden von **2-6** exakte Massen bestimmt. Die UV-Spektren wurden auf einem NanoVue (GE Healthcare) gemessen. Die NMR-Daten wurden auf einem Bruker DRX500 Spektrometer (500 und 125 MHz für ^1H bzw. ^{13}C NMR) in der Spektroskopischen Abteilung am Institut für organische Chemie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel aufgenommen. Die Restsignale der Lösungsmittelprotonen und -kohlenstoffatome dienten jeweils als Referenz (δ_{H} 3,31 und δ_{C} 49,0 ppm für CD_3OD ; δ_{H} 2,5 und δ_{C} 39,51 ppm für DMSO-d₆).

4.4.3.2.4 Biosynthesestudien

Um erste Einblicke in die Biosynthese der Nocapyrone zu erhalten, wurden einige Fütterungsexperimente mit $1\text{-}^{13}\text{C}$ -Natriumacetat, $1\text{-}^{13}\text{C}$ -Natriumpropionat und Methyl- ^{13}C -methionin mit 99 % ^{13}C (Cambridge Isotope Laboratories, Isotec and Aldrich, Land) durchgeführt. Für die Kultivierung wurden die Vorkulturen wie bereits beschrieben angezogen. Für die Hauptkultur wurde von der Vorkultur jeweils 1 mL zusammen mit den markierten Substanzen (insgesamt 500 mg $1\text{-}^{13}\text{C}$ -Natriumacetat, 500 mg $1\text{-}^{13}\text{C}$ -Natriumpropionat und 17 mg Methyl- ^{13}C -methionin; in H_2O , steril gefiltert) zu 15 x 300 mL Erlenmeyerkolben mit 100 mL GYM4CaCl₂-Medium gegeben. Die Isolierung von Nocapyron A (**2**) (~ 1 mg) erfolgte wie bereits beschrieben.

4.4.3.2.5 Ermittlung der antimikrobiellen Aktivitäten der Nocapyrone A (**2**) und B (**3**) sowie von **6**

Für die antimikrobiellen Aktivitätstests mit den Substanzen **2**, **3** und **6** wurden folgende Stämme verwendet: Die Bakterien *Bacillus subtilis* (DSM 347), *Erwinia amylovora* (DSM 50901), *Escherichia coli* K12 (DSM 498), *Pseudomonas fluorescens* (NCIMB 10586), *Propionibacterium acnes* (DSM 1897), *Pseudomonas aeruginosa* (DSM 50071), *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* (DSM 50252), *Ralstonia solanacearum* (DSM 9544), *Staphylococcus epidermidis* (DSM 20044), *Staphylococcus lentus* (DSM 6672), *Xanthomonas campestris* (DSM 2405) und die Hefe *Candida glabrata* (DSM 6425). Durchgeführt wurden diese Assays wie in Abschnitt 4.4.1.2.4 beschrieben.

Die Nocapyrone C (**4**) und D (**5**) wurden aufgrund ihrer geringen Mengen nicht getestet.

4.4.3.2.6 Ermittlung der zytotoxischen Aktivitäten der Nocapyrone A (**2**) und B (**3**) sowie von **6**

Die Ermittlung der Zytotoxizität der Substanzen **2**, **3** und **6** wurde wie in Abschnitt 4.4.1.2.5 beschrieben durchgeführt. Als Positivkontrolle diente Tamoxifen, welches IC_{50} -Werte von 23,7 μM (NIH-3T3) und 23,4 μM (HepG2) aufwies.

4.4.3.2.7 Ermittlung der enzyminhibitorischen Aktivität der Nocapyrone A (**2**) und B (**3**) sowie von **6**

Um die spezifische Hemmung bestimmter Enzyme zu untersuchen, wurden die Substanzen **2**, **3** und **6** in unterschiedlichen enzymatischen Tests eingesetzt. Hierzu gehörten bekannte Targets wie die Phosphodiesterase 4 (PDE4), ein Enzym, welches sekundäre Botenstoffe abbaut und deren Hemmung bei der Behandlung von Depressionen, Lungen- und Hauterkrankungen erprobt wird [Wachtel 1983; Griswold et al. 1993], sowie die Protein Tyrosin Phosphatase 1B (PTP1B), deren Störung im Endeffekt zu einer Tumorbildung führen kann [Eickhoff 2002]. Auch eine Wirkung auf die HIV-1 Reverse Transkriptase (HIV-1-RT) und die Acetylcholinesterase (AChE) wurde untersucht. Die Aktivität der AChE wurde nach dem kolorimetrischen Assay von [Ellman et al. 1961] im Mikrotiterplattensystem gemessen. Die eingesetzte Konzentration der jeweiligen Testsubstanz betrug 100 μM . Eine mögliche Aktivität gegen die PTP1B wurde mithilfe des Biomol Green™ PTP1B tyrosin phosphatase drug discovery Kits (Enzy Life Science GmbH, Lörrach) nach Angaben des Herstellers überprüft. In dem Testsystem wurden 5 μL (1 mg/mL) der jeweiligen Substanz eingesetzt. Die Aktivität der HIV-1-RT wurde mittels des kolorimetrischen Reverse Transkriptase ELISA Kits (Roche, Mannheim) nach Angaben des Herstellers untersucht. Für den Test wurden 6 μL einer 100 μM Lösung der jeweiligen Substanz eingesetzt. Die Aktivität der PDE4 wurde ebenfalls nach Angaben des Herstellers mithilfe des PDE Light HTS cAMP Phosphodiesterase Kits (Lonza, Rockland, USA) ermittelt. Die Substanzen wurden in einer Konzentration von 40 μM getestet. Der Enzymassay zur Bestimmung der Aktivität der Glykogen Synthase Kinase 3 β (GSK-3 β) wurde nach [Baki et al. 2007] ausgeführt. Die Substanzen wurden in einer Konzentration von 40 μM getestet.

4.4.3.3 Ergebnisse

Während der Bearbeitung der *Nocardiopsis* sp. HB383 Kultur wurden bei HPLC-UV/MS Analysen mehrere Hauptpeaks im 3D-UV-Chromatogramm (Abb. 31) mit den Massen 334, 320, 286 und 268 detektiert.

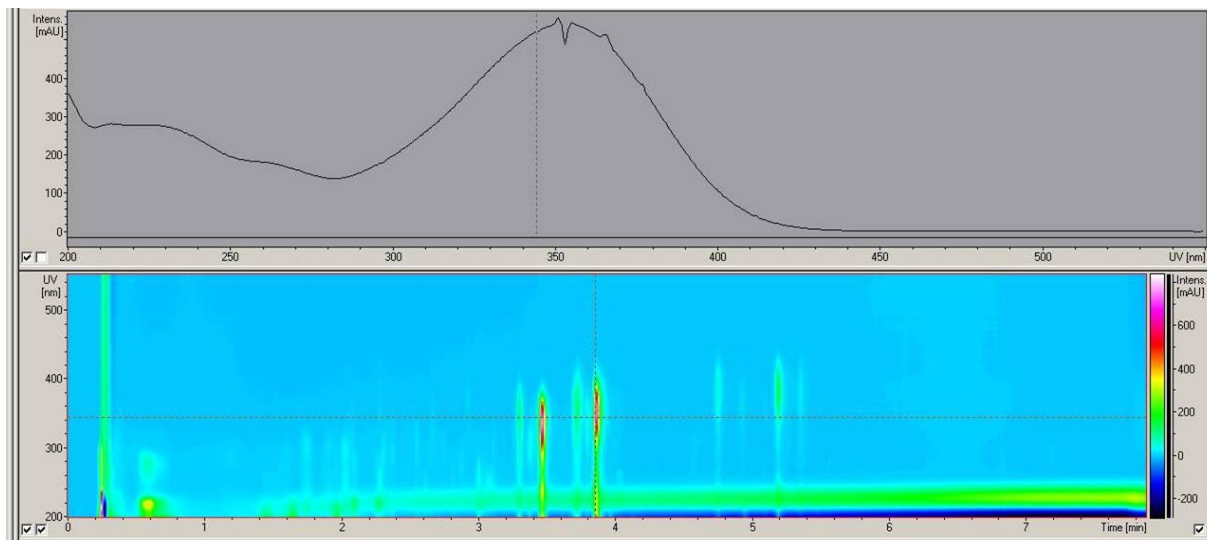


Abb. 31: 3D-UV-Chromatogramm eines Extraktes einer 12 L Kultur des Stammes HB383 nach Auftrennung an einer C₁₈-Phase. Zwischen 3 und 6 min traten die verschiedenen Diketopiperazine und ihre Stereoisomere auf. Der obere Teil der Abbildung zeigt das UV-Spektrum von XR334.

Die ersten drei Hauptpeaks stellten sich als verschiedene Diketopiperazine heraus, welche bis jetzt noch nicht aus *Nocardiopsis* Arten bekannt waren. Der vierte Hauptpeak gehörte, mit drei weiteren Derivaten, zu einer Reihe von γ -Pyronen, von denen durch präparative HPLC zunächst Nocapyron A (**2**) und B (**3**) und durch weitere Aufreinigung Nocapyron C (**4**) und D (**5**) (Abb. 32) isoliert werden konnten.

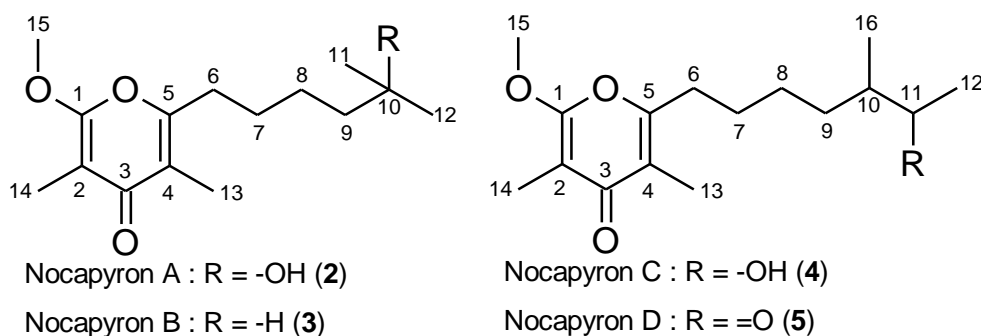


Abb. 32: Die aus *Nocardiopsis* sp. HB383 isolierten Nocapyrone A - D (**2-5**).

Die Nocapyrone A - D (**2-5**) zeigten sich als farb- und gestaltlose Feststoffe mit durch HRESIMS bestimmten Summenformeln von C₁₅H₂₄O₄ (gemessen m/z 269,1847 [M + H]⁺; berechnet m/z 269,1847) für **2**, C₁₅H₂₄O₃ (gemessen m/z 253,1805 [M + H]⁺; berechnet m/z 253,1798) für **3**, C₁₆H₂₆O₄ (gemessen m/z 283,1903 [M + H]⁺; berechnet m/z 283,1903) für **4** und C₁₆H₂₄O₄ (gemessen m/z 281,1749 [M + H]⁺; berechnet m/z 281,1747) für **5**. Diese Daten passten zu den erhobenen NMR-Daten (Anhang A sowie Tabellen 14 und 15). Die Strukturaufklärung der vier Nocapyrone beruhte hauptsächlich auf den NMR-Spektren des

Nocapyron A (**2**). Das zugehörige ^{13}C NMR-Spektrum zeigte 14 deutliche Signale. Die Signale C-11/C-12 (δ_{C} 29,4) waren nicht stärker als die anderen Kohlenstoffsignale. Aber durch die zugehörigen ^1H Signale, welche zu sechs integrierten, zeigte sich das Vorhandensein zweier magnetisch äquivalenter Methylgruppen (δ_{H} 1,17; s). Außerdem traten drei weitere Methylgruppen, C-13 (δ_{C} 10,3), C-14 (δ_{C} 7,2) und C-15 (δ_{C} 56,5), im ^{13}C Spektrum auf. C-15 konnte durch seine chemische Verschiebung als Methoxygruppe identifiziert werden. Außerdem zeigte **2** eine Kette mit vier Methylengruppen CH_2 -6 bis CH_2 -9 (δ_{C} 31,7; δ_{H} 2,72; δ_{C} 28,8; δ_{H} 1,71; δ_{C} 25,0; δ_{H} 1,46 und δ_{C} 44,5; δ_{H} 1,50) und vier olefinischen, quartären Kohlenstoffen C-1 (δ_{C} 164,8), C-2 (δ_{C} 100,2), C-4 (δ_{C} 119,3) und C-5 (δ_{C} 161,4). Durch die chemische Verschiebung konnte ebenfalls festgestellt werden, dass zwei dieser Kohlenstoffatome, C-1 und C-5, in Nachbarschaft zu einem Sauerstoffatom lagen. Schließlich konnte das Signal bei 183,4 ppm als Carbonylgruppe identifiziert werden. Mithilfe des ^1H - ^{13}C -HSQC Spektrums konnten allen Kohlenstoffatomen die entsprechenden Protonen zugeordnet werden. Das ^1H - ^1H -COSY-Spektrum zeigte, dass nur ein Spinsystem vorhanden war, welches sich aus den Methylengruppen der Seitenkette zusammensetzte. Die endgültige Struktur des Nocapyron A (**2**) (Abb. 33) konnte mithilfe des ^1H - ^{13}C -HMBC-Spektrums aufgeklärt werden.

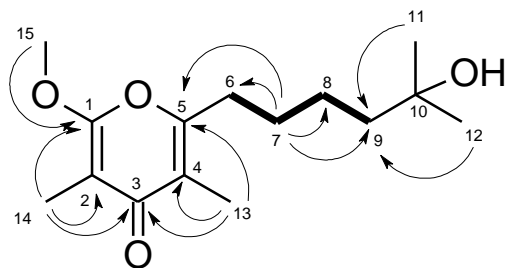


Abb. 33: Ausgewählte ^1H - ^1H -COSY- (fett) und ^1H - ^{13}C -HMBC-Korrelationen (Pfeile) von **2**.

Tabelle 14: NMR-Daten (500 MHz, MeOD) der Nocapyrone A (**2**) und B (**3**).

Position	Nocapyron A (2)				Nocapyron B (3)			
	δ_C , mult.	δ_H (J in Hz)	HMBC	COSY	δ_C , mult.	δ_H (J in Hz)	HMBC	COSY
1	164,8; C				164,9; C			
2	100,2; C				100,0; C			
3	183,4; C				183,3; C			
4	119,3; C				119,2; C			
5	161,4; C				161,8; C			
6	31,7; CH ₂	2,72; t (7,5)	4; 5; 7; 8	7	31,5; CH ₂	2,70; t (7,5)	4; 5; 7; 8	7
7	28,8; CH ₂	1,71; tt ^a (7,5)	5; 6; 8; 9	6, 8	27,9; CH ₂	1,69; quint. (7,5)	5; 6; 8; 9	6; 8
8	25,0; CH ₂	1,46; m	6; 7; 9	6, 9	30,2; CH ₂	1,42; m	6; 7; 9	6; 9
9	44,5; CH ₂	1,50; m	8; 10; 11/12	8	39,7; CH ₂	1,31; m	8; 10; 11/12	8
10	71,4; C				29,2; CH	1,55; septet (6,8)	11/12	9; 11/12
11/12	29,4; CH ₃	1,17; s	9; 10; 11/12		22,9; CH ₃	0,90; d (6,8)	9; 10; 11/12	10
13	10,3; CH ₃	1,94; s	3; 4; 5		10,2; CH ₃	1,93; s	3; 4; 5	
14	7,2; CH ₃	1,81; s	1; 2; 3		7,0; CH ₃	1,81; s	1; 2; 3	
15	56,5; CH ₃	4,03; s	1		56,3; CH ₃	4,03; s	1	

^a Das Signal trat als Quintett auf bedingt durch die Kopplungskonstante mit H₂-6 und H₂-8.

Tabelle 15: NMR-Daten (500 MHz, MeOD) der Nocapyrone C (4) und D (5).

Position	Nocapyron C (4)				Nocapyron D (5)			
	δ_C , mult.	δ_H (J in Hz)	HMBC	COSY	δ_C , mult.	δ_H (J in Hz)	HMBC	COSY
1	164,6; C				164,8 ^a ; C			
2	100,1; C				99,8 ^a ; C			
3	183,2; C				182,7 ^a ; C			
4	119,2; C				119,0 ^a ;			
5	161,3; C				161,0 ^a ; C			
6	31,5; CH ₂	2,72; t (7,5)	4; 5	7	31,4; CH ₂	2,70; t (7,5)	4; 5; 7	7
7	27,7; CH ₂	1,71; m (7,5)	6	6; 8	27,7; CH ₂	1,71; quint. (7,5)	5; 8; 9	6; 8
8	33,5; CH ₂	1,3 – 1,5; m			31,2; CH ₂	1,28 – 1,45; m		
9	33,3; CH ₂	1,3 – 1,5; m			33,4; CH ₂	1,70; 1,40; m	7	
10	40,8; CH	1,45; m		11; 16	47,4; CH	2,59; sextet (6,8)		9; 16
11	71,8; CH	3,62; dq (6,2; 4,6)		10; 11	215,3 ^a ; C			
12	20,0; CH ₃	1,11; d (6,2)	10; 11	11	28,3; CH ₃	2,14; s	10; 11	
13	10,1; CH ₃	1,93; s	3; 4; 5		10,1; CH ₃	1,93; s	3; 4; 5	
14	7,0; CH ₃	1,81; s	1; 2; 3		7,0; CH ₃	1,81; s	1; 2; 3	
15	56,4; CH ₃	4,03; s	1		56,3; CH ₃	4,03; s	1	
16	14,9; CH ₃	0,88; d (6,9)	9; 10; 11	10	16,5; CH ₃	1,08; d (7,0)	9; 10; 11	10

^a Die chemischen Verschiebungen der quaternären Kohlenstoffatome wurden vom ¹H-¹³C-HMBC-Spektrum abgeleitet.

Aus der Summenformel $C_{15}H_{24}O_4$ konnten vier ungesättigte Positionen abgeleitet werden, d.h. neben der Carbonylgruppe und den zwei Doppelbindungen musste ein Ring Teil der Struktur sein. Das wiederum passte gut zu der angedachten γ -Pyrongrundstruktur des Moleküls. Diese Annahme wurde durch die UV-Maxima aller vier Strukturen, UV (MeOH) λ_{max} ($\log \epsilon$) 253 (4,06), 204 (4,00) nm für Nocapyron A (**2**), 253 (4,02), 209 (4,07) nm für Nocapyron B (**3**), 253 (4,06), 204 (4,00) nm für Nocapyron C (**4**) und 253 (4,06), 205 (4,10) nm für Nocapyron D (**5**), bestätigt. Diese Daten passten hervorragend zu den in der Literatur beschriebenen Daten für γ -Pyrone [Yano et al. 1986; Ui et al. 2006]. Infolgedessen bestand das γ -Pyrongrundgerüst aus den olefinischen Kohlenstoffatomen und der Carbonylgruppe C-1 bis C-5. Zusätzlich waren C-1 und C-5 über ein Sauerstoffatom miteinander verbunden. Die chemische Verschiebung im 1H NMR- sowie die 1H - ^{13}C -HMBC-Korrelationen von H_3 -13 (δ_H 1,94) zu C-3, C-4 und C-5 und von H_3 -14 (δ_H 1,81) zu C-1, C-2 und C-3 zeigten, dass sich CH_3 -13 und CH_3 -14 an den Positionen 2 und 4 des γ -Pyroringes befanden. Durch die Übereinstimmung der chemischen Verschiebung von H_3 -15 (δ_H 4,03) und C-1 (δ_C 164,4) wurde deutlich, dass die Methoxygruppe OCH_3 -15 ebenfalls direkt an den Ring gebunden sein musste. C-5 blieb die einzige Position, an der die Seitenkette ansetzen konnte. Passenderweise wies H-6 nicht nur 1H - ^{13}C -HMBC-Signale zu C-7 und C-8, sondern auch zu C-4 und C-5 auf. Wie bereits erwähnt, bildeten die CH_2 -Gruppen CH_2 -6 bis CH_2 -9 ein Spinsystem aus, welches durch starke 1H - 1H -COSY-Korrelationen und die auftretende Multiplizität der Signale deutlich wurde. Die Methylenkette endete mit dem quartären C-10, an welches die äquivalenten Methylgruppen CH_3 -11 und CH_3 -12 (δ_C 29,4, δ_H 1,18) sowie eine Hydroxygruppe gebunden waren. Dieses wurde zum einen durch die chemische Verschiebung des C-10 (δ_C 71,4) bewiesen, welche auf ein Sauerstoffatom in unmittelbarer Nachbarschaft hinweist, und zum anderen durch die 1H - ^{13}C -HMBC-Korrelationen der Methylgruppen CH_3 -11 und CH_3 -12 zu C-9 und C-10 sowie untereinander. Alle spektroskopischen Daten des Nocapyron A (**2**) standen in Übereinstimmung mit der aufgezeigten Struktur (Abb. 33).

Insgesamt war die chemische Verschiebung des 1H -NMR von Nocapyron B (**3**) (Tabelle 14) nahezu identisch mit der des Nocapyron A (**2**). Der einzige Unterschied bestand in einem zusätzlichen Signal am C-10 (δ_H 1,60) und einer Hochfeldverschiebung des Signales der Methylprotonen H_3 -11 und H_3 -12 (δ_H 0,93). Diese Änderung zeigte den Verlust der Hydroxygruppe an und wurde durch die auftretende Massendifferenz von 16 unterstützt. Zusätzlich trat das Signal der Methylgruppen nun als ein Duplett auf, bedingt durch die Kopplung mit H-10. Aufgrund dieser Informationen wurde die Struktur des Nocapyron B (**3**) (Abb. 32) ermittelt.

Da die UV-Daten der Nocapyrone C (**4**) und D (**5**) nahezu identisch mit denen der anderen beiden Nocapyrone waren, wurde davon ausgegangen, dass deren Chromophore denen von **2** und **3** entsprachen. Dieses konnte anhand der ein- und zweidimensionalen NMR-Analysen (Tabelle 15) bewiesen werden. Durch die 1H -NMR- und ^{13}C -NMR-Verschiebungen der Methylgruppen CH_3 -13, CH_3 -14 und CH_3 -15 sowie durch die 1H - ^{13}C -HMBC-Korrelationen ergaben sich die Strukturen von **4** und **5**. Ähnlich wie bei den Nocapyronen A (**2**) und B (**3**)

unterschieden sich **4** und **5** nur in der Seitenkette des Moleküls. Aus den beiden Summenformeln $C_{16}H_{26}O_4$ für Nocapyron C (**4**) und $C_{16}H_{24}O_4$ für D (**5**) ergaben sich längere Seitenketten als bei **2** und **3**. Genau wie **2** besaß **4** zwei Methylgruppen, CH_3 -12 (δ_C 20,0; δ_H 1,11) und CH_3 -16 (δ_C 14,9; δ_H 0,88), in der aliphatischen Seitenkette. Jede Methylgruppe bildete ein Duplett im 1H -NMR aus. Die endständige Methylgruppe CH_3 -12 zeigte eine 1H - 1H -COSY-Korrelation zu H-11 (δ_H 3,62) und eine zusätzliche 1H - ^{13}C -HMBC-Korrelation zu C-10 (δ_C 40,8), welche für eine Aufeinanderfolge von C-12 zu C-10 sprach. Die chemische Verschiebung von CH-11 (δ_H 3,62; δ_C 71,8) wies auf eine Hydroxygruppe an dieser Methingruppe hin, wohingegen die Methingruppe CH-10 (δ_H 1,45) in Nachbarschaft zu der Methylgruppe CH_3 -16 positioniert war. Die Seitenkette wurde durch die Methylgruppen CH_2 -9 (δ_H 1,3 – 1,5; δ_C 33,3) bis CH_2 -6 (δ_H 2,72; δ_H 31,5) vervollständigt. Verglichen mit dem 1H -NMR-Spektrum des Nocapyron C (**4**) zeigte das des Nocapyron D (**5**) nur einen Unterschied. Die Methylgruppe CH_3 -16 (δ_H 1,08; δ_C 16,5) trat als Duplett auf. Die anderen Methylgruppen traten als Singuletts bei δ_H 2,14 und δ_C 28,3 ppm auf. Daraus ließ sich schließen, dass die endständige Methylgruppe CH_3 -12 in Nachbarschaft zu einer Carbonylgruppe positioniert war. Im NMR wurde deutlich, dass die Hydroxygruppe am C-11 des Nocapyron C (**4**) bei **5** nicht auftrat. Stattdessen war C-10 nun ein quartäres Kohlenstoffatom mit einer chemischen Verschiebung von δ_C 215,3 ppm. Eine solche Tieffeldverschiebung wies auf das Vorhandensein einer Ketogruppe hin. Der einzige Unterschied zwischen Nocapyron C (**4**) und D (**5**) war, dass die Hydroxygruppe durch eine Ketogruppe ersetzt wurde.

Trotz der Aktivität des Rohextraktes von *Nocardioopsis* sp. HB383 gegen die Gram-positiven Bakterien *Staphylococcus lentus* und *Bacillus subtilis* zeigten die Nocapyrone A (**2**) und B (**3**) keine Bioaktivität gegen eine ganze Anzahl von Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien ebenso wenig wie gegen die Hefe *Candida glabrata*. Auch konnte keine *in vitro* Zytotoxizität gegen die Maus-Fibroblastenzelllinie NIH-3T3 und die humanen Krebszelllinien HepG2 und HT-29 festgestellt werden. Es wurde ebenfalls keine Aktivität gegen die getesteten Enzyme gemessen.

Um ein Hinweis auf den biosynthetischen Aufbau der Nocapyrone zu erhalten, wurden verschiedene Fütterungsexperimente mit Stamm HB383 durchgeführt und das Nocapyron A (**2**) anschließend isoliert und analysiert. Alle drei Fütterungsbestandteile wurden von Stamm HB383 eingebaut und somit für die Biosynthese von **2** verwendet. Dieses wurde durch die NMR-Analyse ersichtlich, welche eine Verstärkung der Signal C-5 und C-7 ($1\text{-}^{13}C$ -Acetat), C-1 und C-3 ($1\text{-}^{13}C$ -Propionat) und C-15 (Me- ^{13}C -Methionin) (Anhang A) ergab.

Wie bereits erwähnt, produzierte Stamm HB383 nicht nur die vier Nocapyrone, sondern auch drei Diketopiperazine. Allerdings konnte nur eines dieser Moleküle, (2*E*/*5Z*)-2-[(4-Methoxyphenyl)methylen]-5-(2-methylpropyliden)-3,6-piperazindion (**6**) (Abb. 34), so aufgereinigt werden, dass sich nähere chemische und biologische Analysen durchführen ließen. **6** ist keine neue Struktur, konnte aber im Laufe dieser Arbeit zum ersten Mal als Naturstoff isoliert werden. Die Summenformel $C_{16}H_{18}N_2O_3$ wurde mittels HRESIMS (gemessen m/z 309,1219 [M+Na]⁺, berechnet 309,1210) ermittelt. Die Grundstruktur von **6** wurde durch die UV-Daten (MeOH) λ_{max}

(log ϵ) 339 (4,19), 239 (3,84) nm unterstützt. Dass **6** ein Diketopiperazin bestehend aus den Aminosäuren Dehydromethyltyrosin und Dehydroleucin war, wurde durch die NMR-Spektren bestätigt (Tabelle 16 und Anhang A).

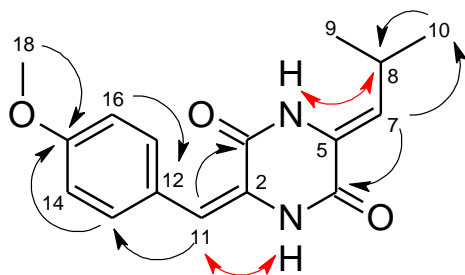


Abb. 34: Ausgewählte ^1H - ^{13}C -HMBC- (schwarze Pfeile) NOESY- (rote Pfeile) Korrelationen des (2*E*/5*Z*)-2-[(4-Methoxyphenyl)methylen]-5-(2-methylpropyliden)-3,6-piperazindion (**6**).

Die zwei Methylgruppen CH_3 -9 und CH_3 -10 (δ_{C} 22,4; δ_{H} 0,97) waren magnetisch äquivalent und traten als ein Signal auf. Dieses wurde durch die ^1H - ^1H -COSY- und ^1H - ^{13}C -HMBC-Korrelationen zu der Methingruppe CH-8 (δ_{C} 24,0; δ_{H} 2,95) sowie ^1H - ^{13}C -HMBC-Korrelationen zu dem olefinischen Kohlenstoffatom C-7 (δ_{C} 124,9) deutlich. ^1H - ^{13}C -HMBC-Korrelationen von dem Proton H-7 (δ_{H} 5,68) zu C-5 (δ_{C} 132,2) sowie zu dem Amidkohlenstoffatom C-6 (δ_{C} 157,6) vervollständigten den Dehydroleucinteil des Moleküls. Die Diketopiperazingrundstruktur war über eine olefinische Methingruppe CH-11 (δ_{C} 113,2; δ_{H} 6,70) und das quartäre Kohlenstoffatom C-12 (δ_{C} 125,4) an das aromatische Spinsystem des Dehydromethyltryosinrests gebunden. Wie das ^1H - ^1H -COSY-NMR zeigte, befanden sich die aromatischen Protonen H-13 und H-17 (δ_{H} 7,47) neben den aromatischen Protonen H-14 und H-16 (δ_{H} 6,98). C-14/16 und C-13/17 waren jeweils magnetisch äquivalent. Die zugehörigen ^1H NMR-Signale erschienen als Dupletts, bedingt durch die 3J Kopplung miteinander. Dieses gab den Hinweis auf ein 1,4-disubstituiertes, aromatisches Ringsystem. Die chemische Verschiebung des quartären Kohlenstoffatoms C-15 (δ_{C} 159,2) wies auf ein Sauerstoffatom in direkter Nachbarschaft hin. Die Methoxygruppe CH_3 -18 (δ_{C} 55,4; δ_{H} 3,79) wies ^1H - ^{13}C -HMBC-Korrelationen zu C-15 auf. Dieses zeigte endgültig, dass es sich um eine Dehydromethyltyrosinstruktur handelte. **6** wurde als ein Gemisch aus zwei Stereoisomeren isoliert. Obwohl es so schien, als ließen sich diese beiden Stereoisomere mittels präparativer HPLC voneinander trennen, entstand in kürzester Zeit erneut ein Gemisch. Infolgedessen traten in den NMR-Spektren doppelte Signale auf (Anhang A). Durch die zwei Doppelbindungen im Molekül könnten vier unterschiedliche Stereoisomere auftreten, allerdings wurden nur zwei beobachtet. Die Doppelbindungen zwischen C-5 und C-7 sowie zwischen C-2 und C-11 sind jeweils trisubstituiert. Da die absolute Konfiguration mithilfe der entsprechenden Kopplungskonstanten nicht bestimmt werden konnte, wurde ein NOESY-Spektrum gemessen. In beiden Isomeren zeigt NH-4 eine NOESY-Korrelation zu H-8, aber keine zu H-7. Daraus ergab sich, dass es sich bei dieser Doppelbindung zwischen C-5 und C-7 jeweils um eine *cis*-Isomerie handeln musste. Im Gegensatz dazu wurde eine NOESY-Korrelation zwischen NH-1 und H-11 nur in einem der beiden Isomere beobachtet. Diese Doppelbindung schien unter den gewählten Bedingungen flexibel zu sein.

Tabelle 16: NMR-Daten (500 MHz bzw. 125 MHz, DMSO-d₆) von (2*E*/5*Z*)-2-[(4-Methoxyphenyl)methylen]-5-(2-methylpropyliden)-3,6-piperazindion (**6**) und dem auftretenden Stereoisomer.

Position	(2 <i>E</i> /5 <i>Z</i>)-Isomer		(2 <i>Z</i> /5 <i>Z</i>)-Isomer	
	δ_C , mult.	δ_H (J in Hz)	δ_C , mult.	δ_H (J in Hz)
1-NH		10,27; s		10,06; s
2	125,5		125,1	
3	158,1; C		158,8	
4-NH		9,90; s		10,27; s
5	132,2; C		n.b.	
6	157,6; C		157,0	
7	124,9; CH	5,68; d (10,5)	123,8	5,60; d (11,4)
8	24,0; CH	2,95; m	24,2	2,95; m
9	22,4; CH ₃	0,97; d (6,25)	22,3	0,97; d (3,9)
10	22,4; CH ₃	0,97; d (6,25)	22,3	0,97; d (3,9)
11	113,2; CH	6,70; s	120,4	6,41; s
12	125,4; C		126,5	
13	131,0; CH	7,47; d (8,9)	132,1	7,58; d (8,6)
14	114,3; CH	6,98; d (8,9)	113,1	6,86; d (8,6)
15	159,2; C		158,9	
16	114,3; CH	6,98; d (8,9)	113,1	6,86; d (8,6)
17	131,0; CH	7,47; d (8,9)	132,1	7,58; d (8,6)
18	55,4; OCH ₃	3,79; s	55,1	3,76; s

Im Rahmen der Aktivitätstests zeigte **6** eine moderate Zytotoxizität. Eine Konzentration von 50 μ M inhibierte die metabolische Aktivität von NIH-3T3 und HepG2 um 64 % bzw. 44 %. Es wurde keine Wirkungen gegen verschiedene Pilze, Bakterien und Enzyme festgestellt.

Obwohl **6** zum ersten Mal als Naturstoff beschrieben wurde und bisher nicht bekannt war, dass die Gattung *Nocardioopsis* Diketopiperazine produziert, kommt diese Strukturklasse doch recht häufig in der Natur vor. Nah verwandte Strukturen mit Dehydroaminosäuren, wie das Albonoursin, wurden bereits aus verschiedenen Streptomyceten isoliert ^[Brown et al. 1965; Bryans et al. 1996; Kanzaki et al. 2000]. Zwei von ihnen, XR334 und XR330, bestehen aus Dehydromethyltyrosin und Dehydrophenylalanin sowie ihren *N*-methylierten Derivaten. Für XR334 und XR330 sind Molekulargewichte von 320,34 und 334,37 bekannt. Diese Angaben deckten sich hervorragend mit den Daten zweier Peaks aus dem Rohextrakt des Stammes HB383. Im Hinblick auf die bereits identifizierte Piperazindionstruktur war davon auszugehen, dass es sich bei den auftretenden Substanzen um XR334 und XR330 sowie deren Stereoisomere handelte.

4.4.3.4 Diskussion

Naturstoffe mit einer γ -Pyrongrundstruktur sind weitverbreitet und bilden eine große Gruppe biologisch aktiver Substanzen [Wilk et al. 2009]. γ -Pyrone mit zwei Methyl- und einer Methoxygruppe - wie bei den Nocapyronen - sind relativ gewöhnlich. Zu ihnen zählen auch das Verticipyron [Ui et al. 2006], das Actinopyron [Yano et al. 1986], das Kalkipyron [Graber & Gerwick 1998] und das Aureothin [Hirata et al. 1961]. Die Biosynthese von Nocapyron-verwandten Strukturen wurde bereits untersucht. Es ist bekannt, dass Moleküle, welche dieser Substanzklasse angehören, über unterschiedliche Biosynthesewege synthetisiert werden. Dazu gehören unter anderem die Biosynthesewege der Typ I, Typ II und Typ III PKS [Busch & Hertweck 2009]. Ein biosynthetisch gut untersuchtes γ -Pyrone ist das Aureothin aus einer *Streptomyces* Art [He & Hertweck 2003]. Aureothin ist ein Typ I PKS-Produkt und wird aus einer *p*-Nitrobenzol-Startereinheit, einer Acetateinheit und vier Propionateinheiten gebildet (Abb. 35). In Analogie dazu kann angenommen werden, dass Nocapyron A (**2**) aus einer Isobutyrat-Startereinheit, zwei Acetateinheiten und zwei Propionateinheiten aufgebaut war.

Diese Annahme wurde durch Fütterungsexperimente mit ^{13}C -markiertem Acetat, Propionat sowie Methionin gestützt (Abb. 35 und Anhang A), da es beispielsweise bei Zugabe von $1\text{-}^{13}\text{C}$ Propionat zu einer Verstärkung der ^{13}C NMR-Signale des C-1 und des C-3 kam. Die entsprechenden Experimente mit $1\text{-}^{13}\text{C}$ Acetat ergaben eine intensive Verstärkung der Signale C-5 und C-7. Schließlich wurde das Signal von C-15 durch die Zugabe von $[\text{Me-}^{13}\text{C}]$ Methionin erheblich verstärkt. Daher kann angenommen werden, dass diese Methylgruppe ihren Ursprung in einem *S*-Adenosylmethionin (SAM) hatte.

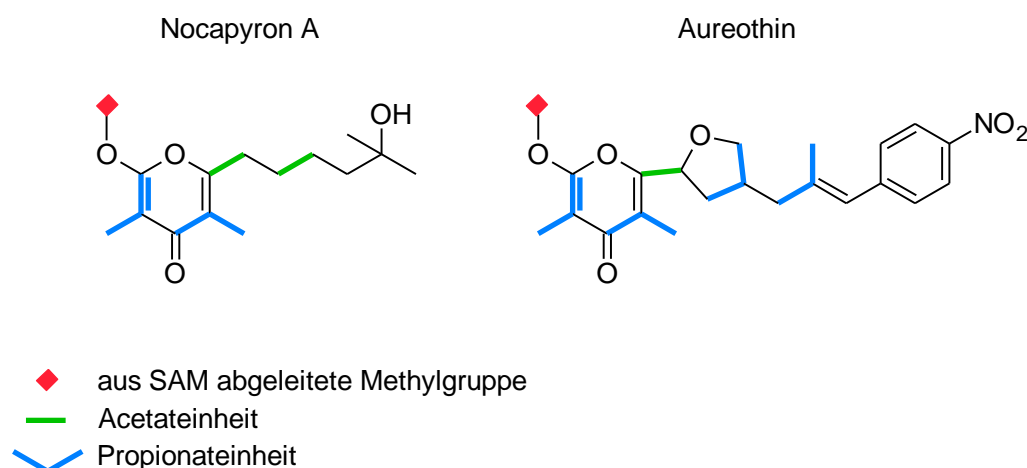


Abb. 35: Biosynthetischer Ursprung des Nocapyron A (**2**) verglichen mit dem des Aureothin [He & Hertweck 2003]; die Markierungen zeigen die durch Fütterungsexperimente mit ^{13}C -markiertem Acetat, Propionat sowie Methionin gestützte Grundstrukturannahme.

Ausgehend vom Aureothin wurde angenommen, dass Nocapyron A durch die Bildung eines α -Pyrone und die anschließende Umwandlung durch eine *O*-Methyltransferase in ein γ -Pyrone gebildet wurde (Abb. 36).

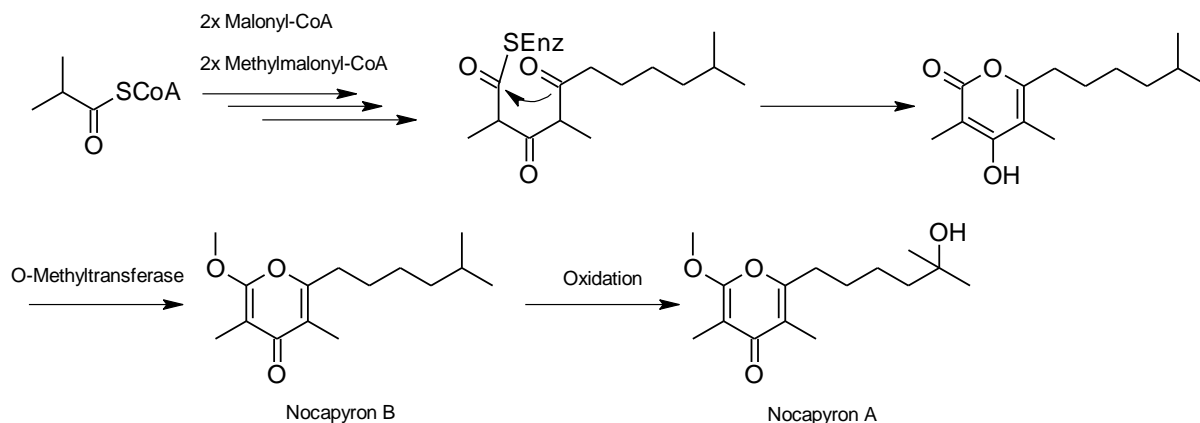


Abb. 36: Angenommene Biosynthese der Nocapyrone A (**2**) und B (**3**).

Die Bildung von Nocapyron A (**2**) und Nocapyron B (**3**) könnte durch die Oxidation von **3** zu **2** erfolgt sein oder durch die Verwendung verschiedener Startereinheiten. Manche Startermodule sind in der Lage, unterschiedliche Startermoleküle auszuwählen. Es ist bekannt, dass Startermodule die Startereinheit nicht immer strikt selektiv auswählen ^[Wiesmann et al. 1995; Weissman et al. 1998a; Weissman et al. 1998b]. Anstelle von Isobutyrat müsste in diesem Fall allerdings 2-Hydroxyisobutyrat von dem Modul akzeptiert worden sein, dieses wäre eher ungewöhnlich. Im Fall der Nocapyrone C (**4**) und D (**5**) müsste die Startereinheit Acetyl-CoA sein. Eine ähnliche Variabilität konnte bereits für das Erythromycin Startermodul der DEBS 1-TE nachgewiesen werden. Sie akzeptierte *in vitro* sowohl Acetat als auch Isobutyrat als Startereinheit ^[Wiesmann et al. 1995; Weissman et al. 1998a; Weissman et al. 1998b]. Es scheint so als folgte auf den Einbau einer Acetatstartereinheit ein zusätzlicher Verlängerungsschritt mit einer Propionateinheit. Wenn das der Fall ist, beinhaltet die Biosynthese der Nocapyrone einige interessante Aspekte. Aufgrund der geringen Ausbeute wurden nur Fütterungsexperimente bezüglich des Nocapyron A (**2**) durchgeführt.

Insgesamt stellte dieser *Nocardiosis* Stamm eine reichhaltige Quelle bekannter und neuer Naturstoffe dar. Eine biologische Aktivität dieser Naturstoffe konnte im Rahmen der durchgeführten Bioaktivitätstests bisher nicht entdeckt werden. Die Nocapyrone zeigten weder antimikrobielle noch antitumorale Wirkung und waren auch in den enzymatischen Assays nicht aktiv. Eine intensive Suche kann jedoch spezielle pharmakologische oder andere Aktivitäten aufdecken, deren Anwendung am Menschen weniger Nebenwirkungen, in Form von beispielsweise einer gewissen Zytotoxizität gegenüber normalen Zellen, im Weg stünden.

4.4.3.5 Zusammenfassung

Vier neue Sekundärmetabolite mit einer γ -Pyrongrundstruktur, die Nocapyrone A - D (**2-5**), wurden aus dem Rohextrakt des Stammes *Nocardiopsis* sp. HB383 isoliert. Bis heute sind das die ersten γ -Pyrone aus einer *Nocardiopsis* Art. Die Strukturen wurden mithilfe von ein- und zweidimensionalen NMR-Experimenten aufgeklärt, welche zusätzlich durch HPLC-UV/MS- und HRESIMS-Analysen bestätigt wurden. Im Anschluss wurden erste Untersuchungen zur Aufklärung des Biosyntheseweges der Nocapyrone durchgeführt. Zusätzlich wurden die Nocapyrone A (**2**) und B (**3**) negativ auf antibakterielle und zytotoxische Aktivität getestet. Auch in den Enzymassays wurde keine Wirkung festgestellt.

Neben den γ -Pyrone produzierte Stamm HB383 mehrere bekannte Substanzen mit einer Diketopiperazinstruktur, welche ebenfalls das erste Mal für die Gattung *Nocardiopsis* nachgewiesen wurde. Eines der Diketopiperazine, (2*E*/5*Z*)-2-[(4-Methoxyphenyl)methylen]-5-(2-methylpropyliden)-3,6-piperazindion (**6**), welches hier erstmals als Naturstoff isoliert werden konnte, wurde ebenfalls auf seine biologische Wirkung hin untersucht und zeigte eine moderate zytotoxische Aktivität gegen Fibroblasten und die humane Darmkrebszelllinie HepG2.

5 ENTWICKLUNG EINES PRIMERSYSTEMS ZUR IDENTIFIZIERUNG DER PHENAZINBIOSYNTHESE

5.1 EINLEITUNG

Eine erfolgreiche Suche nach neuen Naturstoffen, und damit der Ausgangspunkt für die Herstellung neuer Medikamente, bleibt weiterhin dringend notwendig, gerade im Hinblick auf ein großes Problem unserer Zeit: Die wachsende Rate von Infektionen mit resistenten, vor allem mit multiresistenten Mikroorganismen. Es sind bereits einige Systeme entwickelt worden, mit denen solche pharmazeutisch interessanten Substanzen ausfindig gemacht werden können, wie beispielsweise die Suche einer bestimmten biologischen Aktivität in einem Extrakt und die sich daran anschließende Isolierung des entsprechenden Metaboliten. Allerdings sind solche Ansätze häufig mühsam und die Wiederentdeckungsrate ist sehr hoch. Eine Möglichkeit neue Substanzen ausfindig zu machen, sind molekulare Screenings, bei welchen auf genetischer Grundlage nach biosynthetisch talentierten Mikroorganismen gesucht wird. Aufgrund des zahlreichen Vorkommens von Polyketiden und nicht-ribosomalen Peptiden ist der häufigste Ansatzpunkt, gerade bei Bakterien und Pilzen, die Suche nach Genen, welche für die Multienzymkomplexe PKS oder NRPS kodieren ^[Donadio et al. 2007; Willey & van der Donk 2007]. Auch im ersten Teil dieser Arbeit wurde eine vielversprechende bakterielle Vorauswahl für die Produktion von neuen Sekundärmetaboliten mithilfe eines NRPS- bzw. Typ II PKS-Primersystems getroffen (Abschnitt 4.2.3.2). Bei solchen Untersuchungen wurden weitere interessante Naturstoffklassen, wie beispielsweise Phenazine, bis jetzt nur wenig beachtet.

Es ist bereits bekannt, dass Phenazine, ob natürlich vorkommende oder synthetisch modifizierte, als Medikamente geeignet sind und aus diesem Grund gute Kandidaten für eine weitere Suche nach vielversprechenden Strukturen darstellen ^[Arbiser & Moschella 1995]. Phenazine sind heterozyklische, stickstoffhaltige Substanzen, welche an verschiedenen Seiten ihres Grundgerüsts substituiert sein können (Abb. 37) und gerade deswegen eine große Bandbreite an struktureller Diversität aufweisen. Als Sekundärmetabolite werden sie ausschließlich von Bakterien produziert, hauptsächlich von den Gattungen *Pseudomonas* und *Streptomyces* ^[Mavrodi et al. 2006].

In den letzten Jahrzehnten wurde viel unternommen, um die enzymatischen und genetischen Prozesse der Phenazinbildung zu verstehen. Dennoch ist das Wissen darüber und über die Verbreitung von bakteriellen Produzenten bis heute begrenzt.

Die ersten Untersuchungen zur Phenazinbiosynthese auf molekularer Ebene wurden mit *Pseudomonas aureofaciens* 30-84 ^[Pierson et al. 1995] und *Pseudomonas fluorescens* 2-79 ^[Mavrodi et al. 1998] durchgeführt. Es zeigte sich, dass für die Synthese der Phenazin-1-carboxylsäure (PCA) ein Gencluster mit sieben Genen verantwortlich ist. Es wird vermutet, dass Anthranilat oder ein weiteres Intermediat dieser Biosynthese wie beispielsweise die 2-Amino-2-deoxyisochorisminsäure (ADIC) die Abzweigung zur Phenazinbiosynthese ist (Abb. 37) ^{[Levitich &}

Stadtman 1964; Levitch & Rietz 1966; Podojil & Gerber 1967; Chang & Blackwood 1968]. Die komplette Phenazinbiosynthese ist bis heute nur hypothetisch [Mentel et al. 2009]. Trotzdem konnte die Funktion der Genprodukte *phzC*, *phzE* und *phzD* experimentell nachgewiesen werden. Diese Enzyme katalysieren die Umsetzung von 3-Deoxy-D-Arabinoheptulosonsäure-7-phosphat (DAHP), ADIC und *trans*-2,3-Dihydro-3-hydroxyanthranilsäure (DHHA) [Calhoun et al. 1972; McDonald et al. 2001; Mentel et al. 2009]. Die Phenazingrundstruktur wird anschließend durch die Kondensation zweier Moleküle 6-Amino-5-oxocyclohex-2-en-1-carboxylsäuren gebildet (Abb. 38) [Mentel et al. 2009]. Die Funktionen der Enzyme *PhzA*, *PhzB* und *PhzG* sind weiter unklar. *PhzF* ist wahrscheinlich für die Isomerisation von DHHA auf dem Weg zum Phenazingrundgerüst verantwortlich [McDonald et al. 2001].

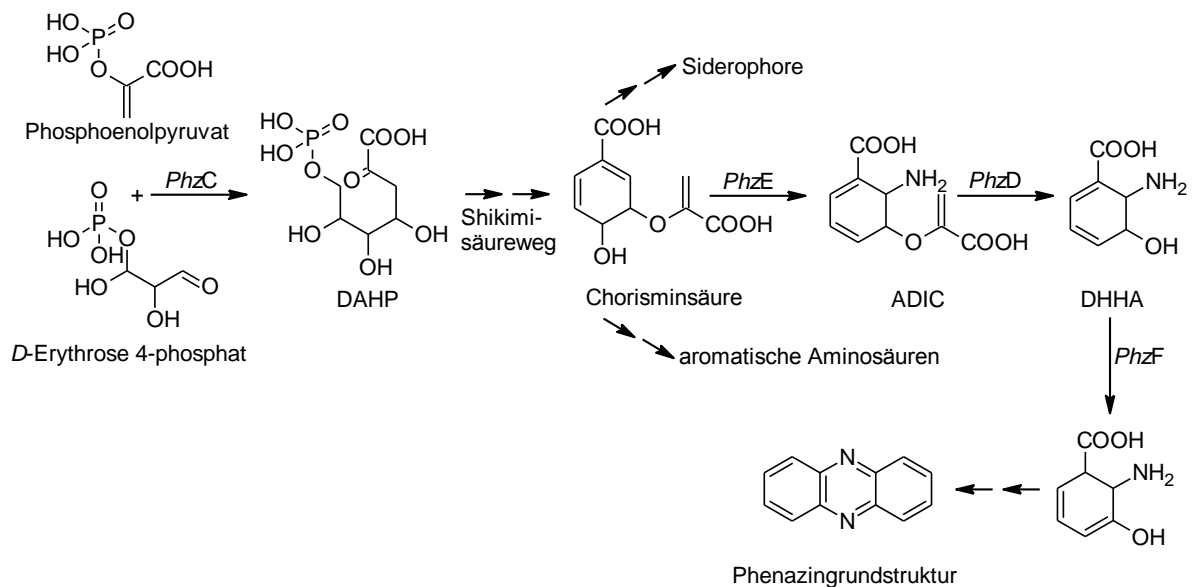


Abb. 37: Schema der Biosynthese des Phenazingrundgerüsts modifiziert nach [Price-Whelan et al. 2006].

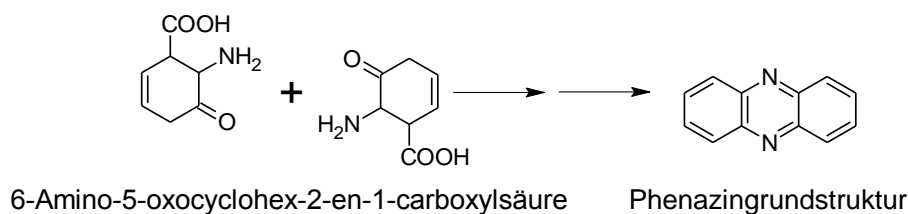


Abb. 38: Zwei Moleküle 6-Amino-5-oxocyclohex-2-en-1-carboxylsäure werden während der Phenazinbiosynthese verknüpft, so dass im Endeffekt die Phenazingrundstruktur entsteht. Modifiziert nach [Mentel et al. 2009].

Phenazine zeigen bei der chemischen Analyse ein Absorptionsspektrum, welches zwei getrennte Maxima im UV-Bereich sowie mindestens eines im sichtbaren Bereich aufweist. Dieses Spektrum variiert abhängig von der Art und Position der Substituenten am heterozyklischen Ringsystem [Anderson et al. 1999] und führt zu einem breiten Repertoire an farbigen Substanzen, wie beispielsweise zu dem dunkelroten Aeruginosin A, der zitronengelben Phenazin-1-carboxylsäure oder dem hellblauen Pyocyanin (Abb. 39) [Price-Whelan et al. 2006].

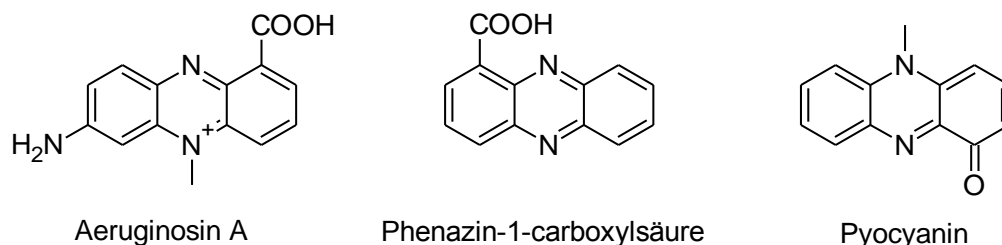


Abb. 39: Die Phenazine Aeruginosin A, Phenazin-1-carboxylsäure und Pyocyanin.

Die Variabilität und die unterschiedliche Kombination der funktionellen Gruppen, welche an die Grundstruktur binden, bestimmen außerdem das Redoxpotential und die Löslichkeit dieser Moleküle, was wiederum ihre biologische Aktivität beeinflusst [Price-Whelan et al. 2006]. Phenazine weisen eine ganze Reihe von unterschiedlichen biologischen Aktivitäten auf: Antibakterielle, antimykotische, antivirale, antiparasitäre und antitumorale [McDonald et al. 2001; de Andrade-Neto et al. 2004]. *Pseudomonas fluorescens* 2-79 und *Pseudomonas aureofaciens* 30-84 sind Beispiele für Produzenten von Phenazinen, welche wiederum pflanzenpathogene Pilze hemmen [Pierson et al. 1995]. Ein ökonomisch erfolgreiches Phenazin ist das 1957 beschriebene Clofazimin (Lamprene, Novartis) (Abb. 40).

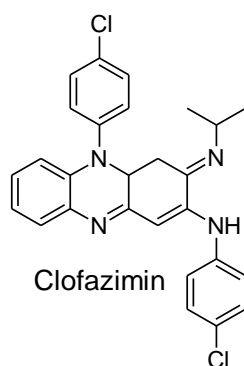


Abb. 40: Das Medikament Clofazimin.

Clofazimin hat sich als Medikament bei der Bekämpfung von Lepra bewährt und zeigt zusätzlich entzündungshemmende Eigenschaften bei der Kontrolle von *Erythema nodosum leprosum*, einer akuten Entzündung des Unterhautfettgewebes [Blunt et al. 2004], sowie weitere antimikrobielle Aktivitäten [Van Rensburg et al. 1992; Pusecker et al. 1997; van Niekerk et al. 1997]. Clofazimin ist ein synthetisches Phenazinanalogon, welches zu der Gruppe der Rimonophenazine zählt. Des Weiteren zeigten einige Phenazine, die aus verschiedenen *Streptomyces* Stämmen isoliert wurden, vielversprechende Wirkungen in der Krebstherapie und haben die Chance, als Medikament gegen Infektionskrankheiten eingesetzt zu werden, da diese Phenazine keine zytotoxischen Eigenschaften gegenüber Eukaryoten aufwiesen [Laursen & Nielsen 2004].

Bezüglich der molekularen Identifizierung von Phenazimbiosyntheseclustern gab es bei Beginn dieser Arbeit nur eine einzige Studie, die sich ausschließlich auf bereits sequenzierte Genome bezog [Fitzpatrick 2009]. Es wurde gezeigt, dass Phenazine eine komplexe evolutionäre Geschichte haben und dass horizontaler Gentransfer existiert.

Um das molekular methodische Repertoire für die Suche nach neuen Naturstoffen zu erweitern, sollte in dieser Arbeit ein System für den Nachweis von Phenazingenfragmenten entwickelt werden. 2010 veröffentlichte ^[Mavrodi et al. 2010] parallel zu den hier veröffentlichten Daten erstmals eine Methode zur Untersuchung von Phenazinen, bei welcher mithilfe von Sequenzen des Phenazinbiosyntheseogens *phzF* unter anderem die Diversität und Verbreitung von Phenazinproduzenten bei terrestrischen und Pflanzen-assoziierten Bakterien untersucht wurden. Allerdings lohnt es sich, nicht nur terrestrische Bakterien zu untersuchen, sondern gerade auch marine Vertreter, da diese viele neue und vor allem vielversprechende Naturstoffe produzieren ^[Blunt et al. 2004; Salomon et al. 2004; Fiedler et al. 2005; Jensen et al. 2005]. Das im Rahmen dieser Arbeit entwickelte System auf Grundlage des *phzE* Genes stellt eine effiziente PCR- und Sequenzierungsmethode für die Suche nach der Fähigkeit zur Phenazinbiosynthese dar. Es wurde vor allem für die Suche nach Naturstoffen aus marinen *Actinobacteria* angewandt.

Im Gegensatz zu vielen anderen Sekundärmetaboliten gibt es erste Erkenntnisse bezüglich der ökologischen Funktion von Phenazinen. Typischerweise unterliegen Ressourcen in einem Mikrohabitat großen Schwankungen und kommen häufig nur sehr begrenzt vor. Durch die redoxaktiven Phenazine erlangt ein Stamm Vorteile gegenüber seiner Konkurrenz, da konkurrierende Mikroorganismen geschädigt werden ^[Mavrodi et al. 2006]. Außerdem haben neuere Studien gezeigt, dass Phenazine die Genexpression induzieren, also als Signalmoleküle fungieren ^[Dietrich et al. 2006; Price-Whelan et al. 2006; Dietrich et al. 2008]. In fluoreszierenden *Pseudomonas* Arten startet die Phenazinbiosynthese erst in der späten Wachstumsphase und wird durch Quorum Sensing reguliert. Dieser Regulationsmechanismus, bei welchem die Synthese und Anreicherung von niedermolekularen Signalsubstanzen es den Bakterien ermöglicht, die Expression bestimmter Gene zu regeln, findet durch *N*-Acetyl-homoserinlacton als Antwort auf die Populationsdichte statt ^[Fuqua et al. 2001]. Ob Phenazine auch in *Actinobacteria* als Signalmoleküle dienen, wurde bis jetzt nicht untersucht.

5.2 MATERIAL UND METHODEN

5.2.1 BAKTERIELLE STÄMME UND IHRE PHYLOGENETISCHE EINORDNUNG

166 bakterielle Stämme unterschiedlicher phylogenetischer Herkunft (Tabelle 18) wurden für diesen Teil der Arbeit aus der Stammsammlung des Kieler Wirkstoff-Zentrums (KiWiZ) verwendet. Zusätzlich wurden zwei vorhandene Stämme der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkultur (DSMZ, Braunschweig, Deutschland), *Saccharopolyspora erythraea* DSM 40517^T und *Streptomyces cinnamonensis* DSM 1042^T, für die Untersuchungen benutzt.

Von *Saccharopolyspora erythraea* DSM 40517^T ist bereits die gesamte Genomsequenz bekannt und die offenen Leserahmen für mögliche Produkte einer Phenazinbiosynthese, *phzC* und *phzF* sowie einer Phenazin-spezifischen Methyltransferase, sind hinterlegt [Oliynyk et al. 2007]. Bis jetzt wurde die Produktion von Phenazinen in diesem Stamm jedoch nicht nachgewiesen. Für *Streptomyces cinnamonensis* DSM 1042^T sind ebenfalls Phenazinbiosynthesesequenzen hinterlegt und die Produktion von Phenazin-1-carboxylsäure und mehreren Endophenazinen wurde gezeigt [Haagen et al. 2006].

Um alle verwendeten Stämme phylogenetisch einzuordnen, wurde zunächst wie in Abschnitt 4.2.2.2 beschrieben eine DNA-Extraktion und im Anschluss eine 16S rRNA Gensequenzanalyse nach [Thiel et al. 2007] durchgeführt (Abschnitt 8.2, Tabellen 24, 25 und 26). Der Vergleich der erhaltenen mit bekannten Sequenzen wurde mittels des Basic Local Alignment Search Tool (nblast) [Altschul et al. 1990] der EMBL nucleotide Datenbank und des RDP-II Project [Cole et al. 2007] durchgeführt.

5.2.2 DESIGN DER OLIGONUKLEOTIDE FÜR DEN NACHWEIS VON *PHZE* GENFRAGMENTEN

Zum Zeitpunkt der Erstellung der Phenazinprimer waren lediglich fünf Sequenzen in der Datenbank des European Bioinformatics Institute hinterlegt, deren Zugehörigkeit zu einem *phzE* Gen bzw. Produkt bewiesen war. Diese Aminosäure- bzw. Nukleotidsequenzen wurden für das Design der Primer verwendet. Mit dem Programm CLUSTAL_X [Thompson et al. 1997] wurden die Sequenzen aligned. Die in Tabelle 17 aufgeführten *phzE* Sequenzen wurden dafür verwendet. Das Alignment wurde anschließend manuell bearbeitet. Die daraus resultierenden Primer *ephzEf* 5'-GAAGGCGCCAACTTCGTATCAA-3' und *ephzEr* 5'-GCCYTCGATGAAGTACTCGGTGTG-3' (Abschnitt 8.2, Tabelle 24) wurden von der Firma MWG (Ebersbach, Deutschland) synthetisiert.

Tabelle 17: Für die Erstellung der *phzE*-Primer verwendete Sequenzen.

Quelle	Acc.-Nr. ^a	Genabschnitt
<i>S. cinnamonensis</i>	AM384985/CAL34110	68793...70757
<i>P. chlororaphis</i>	AF195615/AAF17499	4873...6786
<i>P. aeruginosa</i>	AF005404/AAC64488	3294...5177
<i>P. aeruginosa</i>	AE004091/AAG07601	4716660...4718543
<i>P. aeruginosa</i>	AAG05292	2073555...2075438

^a NCBI Accession Nummer.

5.2.3 AMPLIFIKATION UND IDENTIFIKATION DER *PHZE* GENFRAGMENTE

Um die optimale Zusammensetzung des PCR-Ansatzes und die passende Annealingtemperatur für die synthetisierten Oligonukleotide *ephzEf* und *ephzEr* zu ermitteln, wurde zunächst mit variierenden PCR-Ansätzen (hier nicht näher beschrieben) eine Gradienten-PCR (50 bis 61°C) mit dem MJ Research PTC-200 Thermo Cycler (Biozym, Hess. Oldendorf) durchgeführt (Abb. 41).

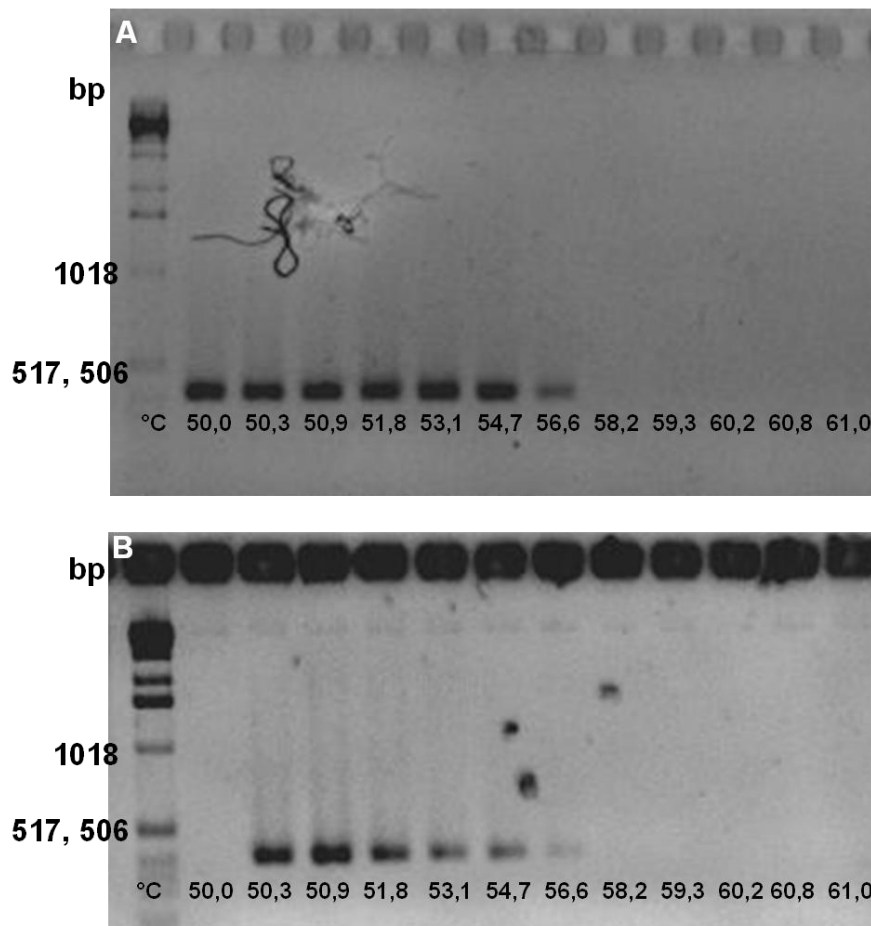


Abb. 41: Agarosegelelektrophorese der Amplifikate der Gradienten-PCR. A: Stamm *Streptomyces* sp. HB202, B: DSMZ Stamm *S. cinnamonensis* DSM 1042^T.

Die folgenden PCR-Bedingungen stellten sich für die Amplifikation der *phzE* Gene als am geeignetsten heraus: *Taq* DNA Polymerase (New England BioLabs, Ipswich; MA, Endvolumen 25 µL, 5 U Reaktion⁻¹), ThermoPol Buffer Kit (New England BioLabs, Ipswich; MA), eine Konzentration von 10 µM für die Primer *ephzEf* und *ephzEr*, 1 µl einer equimolaren Lösung aller vier dNTPs (2,5 mM) und 10 bis 50 ng DNA als Template (Abschnitt 8.2, Tabelle 25). Initiale Denaturierung: 94°C für 120 s, gefolgt von 36 Zyklen Primer-Annealing bei 54,7°C für 60 s; Primer-Extension bei 72°C für 120 s, Denaturierung bei 94°C für 60 s und eine finale Extension bei 72°C für 420 s (Abschnitt 8.2, Tabelle 26). Die PCR-Reaktionen wurden mit einem T1 Thermocycler (Whatman Biometra, Göttingen, Deutschland) ausgeführt. Der Erfolg der Amplifikation eines etwa 450 bp langen DNA-Fragmentes (Abb. 41) wurde mittels eines 1,5 %igen Agarosegels, gefärbt mit Ethidiumbromid (1,3 µM) (Fluka Biochemika, Buchs,

Schweiz), überprüft. Die Sequenzierung erfolgte mit dem *ephzE*-Primerpaar nach Standardprotokoll [Thiel et al. 2007]. Der Vergleich der erhaltenen Sequenzen wurde mit der Datenbank des European Bioinformatics Institutes mithilfe des Algorithmus blastx [Altschul et al. 1990] durchgeführt. Da Stamm *Streptomyces cinnamonensis* DSM 1042 als Grundlage für die Erstellung des Primersystems verwendet wurde, diente dessen DNA-Extrakt als Positivkontrolle.

5.2.4 KULTIVIERUNG DER *PHZE* PCR-POSITIVEN STÄMME

Alle 17 Stämme mit einem positiven PCR-Ergebnis wurden einer chemischen Analyse unterzogen, um per HPLC-UV/MS nach Phenazinen zu suchen. Alle Stämme wurden zum einen für 17 Tage bei 28°C im Dunkeln auf GYM4- und MB-Agarplatten, zum anderen in 100 mL im 300 mL Erlenmeyerkolben und 1000 mL im 2 L Erlenmeyerkolben GYM4- und MB-Flüssigmedium für 7 Tage, 120 rpm und bei 28°C ebenfalls im Dunkeln angezogen. Die Platten wurden mithilfe der Kryokonservierung des jeweiligen Stammes angeimpft. Die Flüssigkulturen wurden mit einem 1 cm² großen Stück einer zwei bis drei Wochen alten Plattenvorkultur angeimpft.

5.2.5 EXTRAKTION DER KULTUREN DER *PHZE* PCR-POSITIVEN STÄMME

Die Extraktion der Platten sowie der 100 mL Kulturen wurde mit 100 mL bzw. 50 mL EtOAc, wie bereits in Abschnitt 4.2.2.5 beschrieben, durchgeführt. Von dem 1000 mL Ansatz wurden die Zellen und der Überstand separat extrahiert. Dafür wurden die Kulturen für 20 min bei 4.700 x g zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand wie bereits beschrieben mit EtOAc weiterverarbeitet. Die Zellen wurden mit 100 mL MeOH mithilfe des Ultra Turrax-T25 basic (IKA-Werke GmbH und Co, Staufen, Deutschland) bei 13.000 rpm für 30 s homogenisiert und im Anschluss ebenfalls extrahiert. Die Extrakte wurden vakuumgetrocknet und wiederum in 200 µL MeOH resuspendiert

5.2.6 CHEMISCHE ANALYSE

Die Analyse der methanolischen Extrakte wurde wie bereits in Abschnitt 4.2.2.7 beschrieben durchgeführt. Die Suche nach Phenazinen erfolgte durch Abgleich der MS- und UV-Daten mit den Datenbanken Antibase [Laatsch 2007] und Chapman & Hall/CRC Dictionary of Natural Products [Buckingham 2009].

5.2.7 ACCESSION NUMMER DER HINTERLEGTEN NUKLEOTIDSEQUENZEN

Für alle 16 Stämme, die ein Phenazinsynthesegenfragment aufwiesen, sowie für die Stämme AB049 und AB108, für welche bis jetzt noch keine 16S rRNA Sequenzen vorhanden waren, wurden bei GenBank Nucleotide Sequence Database die entsprechenden Informationen hinterlegt: HM460700-HM460715 (*phzE*) und HM460698-HM460699 (16S rRNA).

5.3 ERGEBNISSE

5.3.1 BAKTERIELLE STÄMME UND IHRE PHYLOGENETISCHE EINORDNUNG

Für die schnelle Identifikation von bakteriellen Phenazinproduzenten sollte die Verwendbarkeit einer PCR-basierten Methode evaluiert werden. Neben den Typstämmen *Streptomyces cinnamonensis* DSM 1042^T und *Saccharopolyspora erythraea* DSM 40517^T wurden 166 vorwiegend marine Bakterienstämme aus der Stammsammlung des Kieler Wirkstoff-Zentrums mit der erstellten Methode untersucht. Neben einer großen Anzahl an *Actinobacteria* (77) befanden sich auch Vertreter der *Bacteroidetes* (2) und *Firmicutes* (28) sowie *Alpha-* (21), *Beta-* (2) und *Gammaproteobacteria* (36) unter den 166 ausgewählten Bakterienstämmen (Tabelle 18).

5.3.2 DESIGN DER OLIGONUKLEOTIDE FÜR DEN NACHWEIS VON *PHZE* GENFRAGMENTEN

Frühere Studien stellten den Zusammenhang zwischen drei enzymatischen Schritten der Phenazinbiosynthese und den entsprechenden Genen *phzC*, *phzD* und *phzE* her. Die Umwandlung von Chorismat zu ADIC ist notwendig, um die Phenazingrundstruktur zu bilden und wird von dem Enzym *PhzE* ausgeführt. *PhzE* ist ein Schlüsselenzym des Phenazinbiosyntheseweges und das zugehörige Gen durch seinen hohen Konservierungsgrad sehr geeignet für ein Primerdesign. In dem Alignment der verwendeten *phzE* Sequenzen (Abb. 42) traten zwei konservierte Bereiche auf, welche den notwendigen Abstand zueinander aufwiesen, um Genfragmente in relevanter Größe zu amplifizieren, und daher als Grundlage für die Primer *ephzE* (5'-GAA GGC GCC AAC TTC GTY ATC AA-3') und *ephzE*r (5'-GCC YTC GAT GAA GTA CTC GGT GTG-3') dienten. Bei der Amplifikation entstand ein etwa 450 bp langes Fragment des *phzE* Genes. Die Spezifität der beiden Regionen wurde durch den Vergleich der erstellten Primersequenzen mit bekannten Phenazinsequenzen sowie durch Anwendung des blast-Algorithmus überprüft. Das Ergebnis zeigte nur Übereinstimmungen der erstellten Primer mit bekannten Phenazinsequenzen.

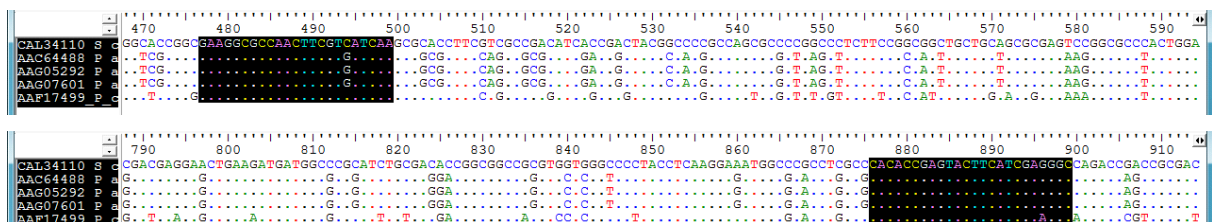


Abb. 42: Alignment der verwendeten Phenazinsequenzen (AM384985/CAL34110; AF195615/AAF17499; AF005404/AAC64488; AE004091/AAG07601; AAG05292). Die schwarz markierten Bereiche wurden für das Primerdesign herangezogen. Das Alignment wurde mit CLUSTAL_X [Thompson et al. 1997] erstellt.

5.3.3 SUCHE NACH *PHZE* GENFRAGMENTEN IN AUSGEWÄHLTEN BAKTERIEN DER STAMMSAMMLUNG DES KIWIZ

Mit dem erstellten Primersystem wurde die Existenz von *phzE* Genfragmenten in etwa 10 % der untersuchten Stämme nachgewiesen. Insgesamt zeigten damit 15 Bakterien und beide DSMZ-Stämme ein positives PCR-Ergebnis (Tabelle 19). Die Übereinstimmung mit bereits

bekannten Phenazingenen aus der Datenbank reichte dabei von 65 % im Falle des PCR-Produktes des Stammes LB151 mit dem *phzE* Gen aus *Pseudomonas chlororaphis* (AAF17499) bis hin zu 100 % bei den Stämmen CC091 und DSM 1042 mit der Sequenz der ADIC aus *Streptomyces cinnamoenis* (CAL34110). Durch die Sequenzierung des PCR-Produktes des Stammes *Streptomyces cinnamoenis* DSM 1042^T war dieser als Positivkontrolle für das entwickelte Primersystem bestätigt.

Abhängig von der taxonomischen Gruppe wurden unterschiedliche Häufigkeiten bezüglich des Vorkommens der *phzE* Genfragmente festgestellt (Tabelle 18).

Tabelle 18: Phylogenetische Zugehörigkeit der auf das Vorhandensein von Phenazin-Genfragmenten untersuchten Stämme sowie deren Anzahl, die Anzahl der positiven PCR-Ergebnisse und die Anzahl der Stämme, welche Phenazine im Extrakt aufwiesen.

Phylogenetische Gruppe	Anzahl der getesteten Stämme	Stämme mit Amplifikat	Stämme mit Phenazinen im Extrakt
<i>Actinobacteria</i>	77 ^a +2 ^b	14 (18 %)	11 (14 %)
<i>Bacteroidetes</i>	2	0	0
<i>Firmicutes</i>	28	1 (4 %)	0
<i>Alphaproteobacteria</i>	21	2 (10 %)	0
<i>Betaproteobacteria</i>	2 ^c	0	0
<i>Gammaproteobacteria</i>	36	0	0
Insgesamt	168	17 (10 %)	11 (7 %)

^a Inklusive fünf terrestrischer Stämme.

^b DSMZ-Stämme.

^c Inklusive eines terrestrischen Stammes.

Die meisten Amplifikate (14) konnten aus vier verschiedenen Gattungen der Gruppe der *Actinobacteria* erhalten werden. Damit zeigten diese Vertreter mit 18 % den größten Prozentsatz bei der PCR-Produktausbeute. Weiterhin wiesen 10 % der *Alphaproteobacteria* (2 Amplifikate) und 4 % der *Firmicutes* (1 Amplifikat) ein positives PCR-Ergebnis auf. Aus der Gruppe der *Bacteroidetes* und der *Betaproteobacteria*, welche allerdings jeweils nur mit zwei Stämmen vertreten waren, und der Gruppe der *Gammaproteobacteria* konnten keine positiven Ergebnisse erzielt werden.

Tabelle 19: Die nächsten verwandten Typstämme zu den *phzE* PCR-positiven Stämmen sowie die Sequenzähnlichkeit und -länge der *phzE* PCR-Produkte zu bekannten Phenazinsequenzen.

Stamm	Nächster verwandter Typstamm ^a	16S rRNA Gene Acc.-Nr.	Phylum	Sequenzlänge in aa	Verwandtes Phenazingen, Produzent und Acc.-Nr.	Ähnlichkeit zum Phenazingen
AB049	<i>Bacillus velezensis</i> CR-502 ¹	AY603658	F	99	ADIC; <i>S. cinnamoniensis</i> CAL34110	89 %
AB108	<i>Pseudovibrio ascidiaceicola</i> F423 ^T	AB175663	AP	144	ADIC; <i>S. cinnamoniensis</i> CAL34110	95 %
CC091 ^b	<i>Streptomyces tendae</i> ATCC19812 ^T	D63873	A	74	ADIC; <i>S. cinnamoniensis</i> CAL34110	100 %
CC183 ^b	<i>Nocardia jejuensis</i> N3-2 ^T	AY964666	A	136	ADIC; <i>S. cinnamoniensis</i> CAL34110	97 %
DSM 1042	<i>Streptomyces cinnamoniensis</i> DSM 1042 ¹	DQ462657	A	127	ADIC; <i>S. cinnamoniensis</i> CAL34110	100 %
DSM 40517	<i>Saccharopolyspora erythraea</i> DSM 40517 ¹	AM420293	A	117	ADIC; <i>S. cinnamoniensis</i> CAL34110	98 %
HB117	<i>Streptomyces fulvorobeus</i> LMG 19901 ^T	AJ781331	A	141	<i>phzE</i> ; <i>P. chlororaphis</i> AAF17499	73 %
HB122	<i>Streptomyces luridiscabiei</i> S63 ^T	AF361784	A	141	<i>phzE</i> ; <i>P. chlororaphis</i> AAF17499	74 %
HB202	<i>Streptomyces mediolani</i> LMG 20093 ^T	AJ781354	A	91	<i>phzE</i> ; <i>P. aeruginosa</i> NP_252903	84 %
HB253	<i>Micromonospora matsumotoense</i> IMSNU 22003 ^T	AF152109	A	144	<i>phzB</i> ; <i>P. chlororaphis</i> AAF17496	67 %
HB254	<i>Micromonospora matsumotoense</i> IMSNU 22003 ^T	AF152109	A	140	<i>phzE</i> ; <i>P. chlororaphis</i> AAF17499	73 %
HB291	<i>Streptomyces fulvorobeus</i> LMG 19901 ^T	AJ781331	A	140	<i>phzE</i> ; <i>P. chlororaphis</i> AAF17499	73 %
LB066 ^c	<i>Kiloniella laminariae</i> LD81 ¹	AM749667	AP	132	ADIC; <i>S. cinnamoniensis</i> CAL34110	91 %
LB114	<i>Streptomyces flavogriseus</i> DSM 40323 ^T	AJ494864	A	141	<i>phzE</i> ; <i>P. chlororaphis</i> AAF17499	79 %
LB129	<i>Streptomyces fimicarius</i> ISP 5322 ^T	AY999784	A	145	<i>phzB</i> ; <i>P. chlororaphis</i> AAF17496	75 %
LB150	<i>Streptomyces luridiscabiei</i> S63 ^T	AF361784	A	132	<i>phzB</i> ; <i>P. chlororaphis</i> AAF17496	74 %
LB151	<i>Streptomyces griseus</i> ATCC51928 ^T	AF112160	A	133	<i>phzE</i> ; <i>P. chlororaphis</i> AAF17499	65 %

^a Die analysierten Sequenzen und die entsprechenden Typstämme zeigten eine Ähnlichkeit von 98,5 % oder mehr zueinander.

^b Terrestrische Stämme.

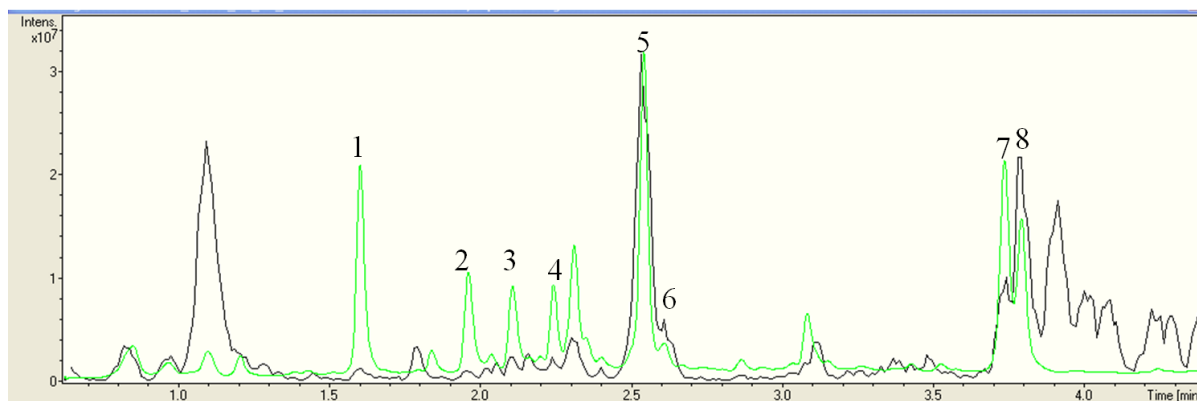
^c Hierbei handelt es sich um den Typstamm *Kiloniella laminariae* LD81^T selbst.

aa Aminosäure.

A: *Actinobacteria*; AP: *Alphaproteobacteria*; F: *Firmicutes*.

5.3.4 CHEMISCHE ANALYSE DER PHZE POSITIVEN STÄMME

Alle Stämme mit einem positiven PCR-Ergebnis sollten theoretisch die Fähigkeit besitzen, Phenazine zu produzieren. Dennoch gibt der Nachweis eines Genabschnittes nicht Gewissheit darüber, ob das gesamte Gencluster intakt ist und ob bzw. unter welchen Bedingungen die entsprechenden Produkte exprimiert werden. Um die Synthese von Phenazinen in PCR-positiven Stämmen zu untersuchen, wurden diese Bakterien kultiviert und im Anschluss chemisch analysiert. Diese Analyse ließ erkennen, dass mehr als die Hälfte (65 %, 11 Stämme) der 17 Stämme und ausschließlich Vertreter mariner *Actinobacteria* ein oder mehrere Substanzen produzierten, welche bezüglich ihrer molekularen Masse und ihrer UV-Daten eine Phenazingrundstruktur aufweisen könnten bzw. Ähnlichkeiten zu bekannten Phenazinen zeigten (Tabelle 20). Sechs der Stämme produzierten insgesamt 19 unterschiedliche bekannte Phenazine. Alle diese Stämme sind marine *Streptomyces* Arten. In der Arbeit von ^[Mitova et al. 2008] wurden für Stamm *Streptomyces* sp. HB202 verschiedene Phenazine bereits per NMR-Spektroskopie nachgewiesen. Diese Streptophenazine traten auch in den durchgeführten Versuchen auf (Abb. 43). Aus der Literatur ist ebenfalls bekannt, dass *S. cinnamomensis* DSM 1042^T die Endophenazine A - C und Phenazin-1-carboxylsäure (PCA) produzieren kann, dieses wurde ebenso in den entsprechenden Extrakten dieser Arbeit festgestellt (Abb. 43). Außerdem wurde die Produktion von Phenazin-1,6-dicarboxylsäure und einer unbekanntem Phenazin-substanz im Extrakt dieses Stammes detektiert.



- | | | | |
|---|-------------------------------------|--|--|
| 1) Unbekannte Substanz
<i>m/z</i> 206 | 3) Endophenazin B
<i>m/z</i> 322 | 5) Naphterin
<i>m/z</i> 354 | 7) Endophenazin A
<i>m/z</i> 292 |
| 2) Phenazin-1-
carboxylsäure
<i>m/z</i> 224 | 4) Endophenazin C
<i>m/z</i> 308 | 6) Phenazine-1,6-
dicarboxylsäure
<i>m/z</i> 268 | 8) Furanonaphthachinon I
<i>m/z</i> 370 |

Abb. 43: UV/MS-Chromatogramm (schwarze Spur: MS; grüne Spur: UV bei 250 nm) eines Extraktes einer 17 Tage alten GYM4-Agarplatte des Stammes DSM 1042^T nach Auftrennung an einer C₁₈-Phase. Im Extrakt wurde neben bekannten Phenazinen eine bisher unbekanntem Substanz mit typischem Phenazin-UV-Spektrum detektiert (Peak 1).

In den Extrakten der anderen neun Stämme wurden die Phenazine Senacarcin A (Stamm HB117), Saphenylester D (Stämme HB122 und HB291), Aestivophenin C und ein mögliches Derivat davon (Stämme HB122 und HB291) sowie Phencomycinmethyllester und 1-Carboxymethyl-Phenazine (Stamm LB129) nachgewiesen (Abb. 44).

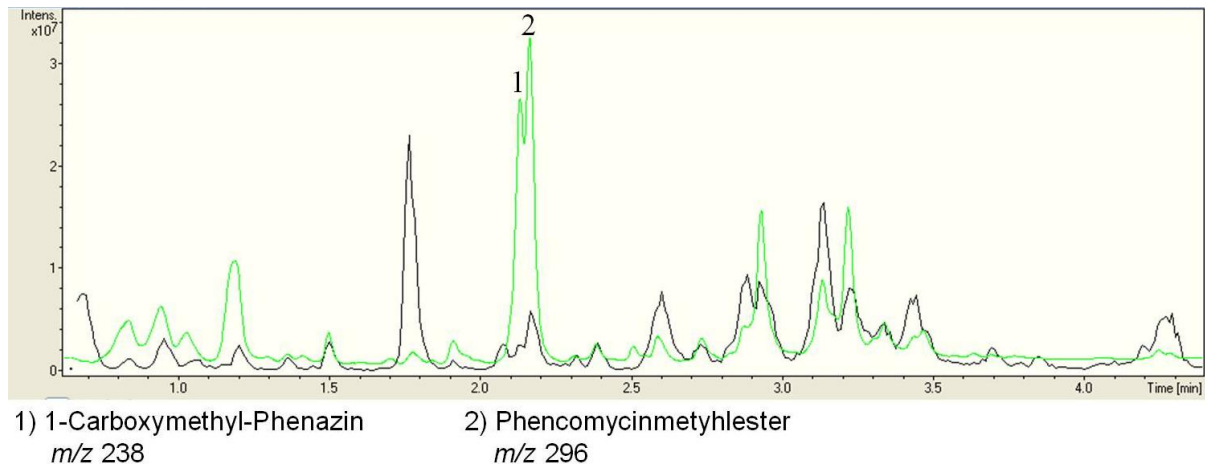


Abb. 44: UV/MS-Chromatogramm (schwarze Spur: MS; grüne Spur: UV bei 250 nm) einer 17 Tage alten GYM4-Agarplatte des Stammes LB129 nach Auftrennung an einer C_{18} -Phase. Im Extrakt wurden 1-Carboxymethyl Phenazine und Phencomycinmethylester detektiert.

Neun Stämme zeigten in ihren Chromatogrammen zusammen 13 verschiedene Substanzen, welche plausible Massendaten sowie ein passendes UV-Profil aufzeigten und damit auf das Vorhandensein weiterer, in den Datenbanken nicht vorhandener, Phenazine hindeuteten. Eine detaillierte chemische Analyse zur Aufklärung der Struktur sowie Bestimmung der biologischen Aktivität sollte in Zukunft angestrebt werden.

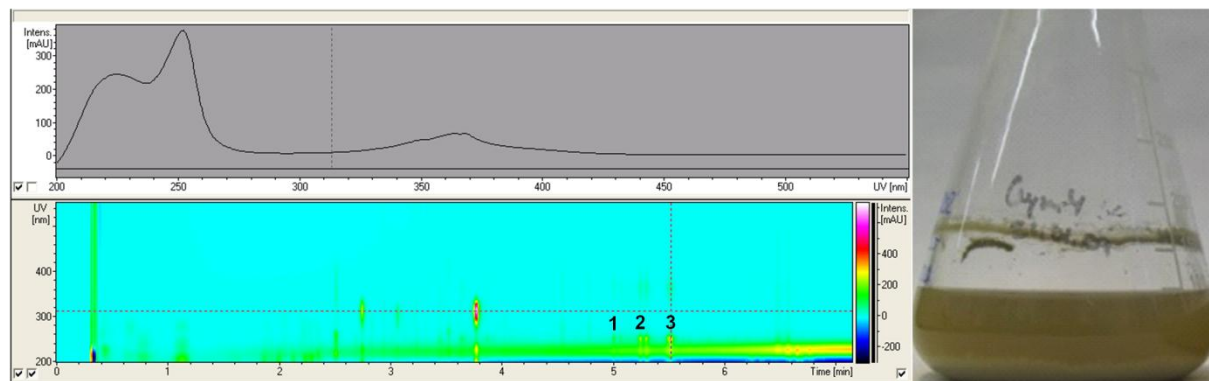
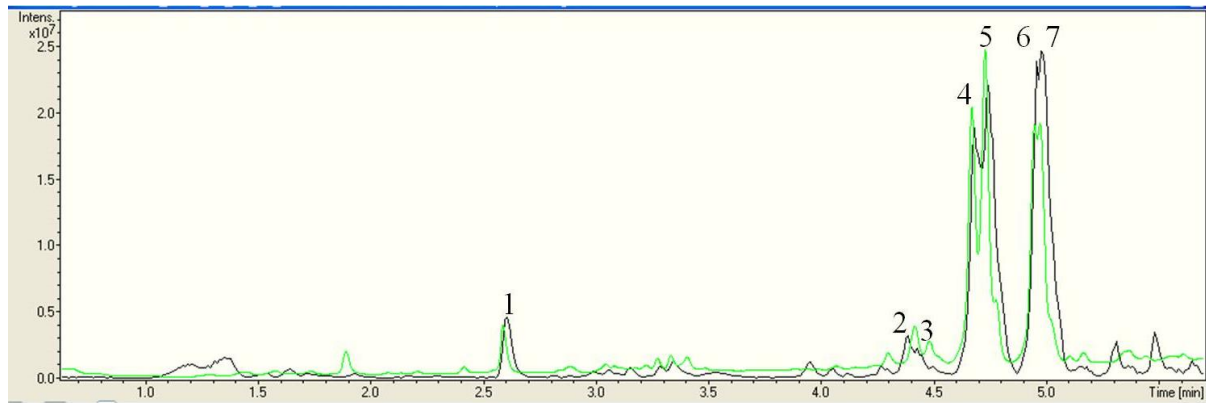


Abb. 45: 3D-UV-Chromatogramm (links) des Extraktes eines 100 mL Ansatzes von Stamm *Streptomyces* sp. HB202 nach 7 Tagen Wachstum (rechts) nach Auftrennung an einer C_{18} -Phase. Peak 1: Streptophenazin H und C; Peak 2: Streptophenazin A und B; Peak 3: Streptophenazin F und G. Die Peaks, welche nicht nummeriert wurden, hatten keine Phenazinstruktur. Der obere Teil der Abbildung zeigt ein typisches Phenazin-UV-Spektrum.



- | | | | |
|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| 1) Mayamycin
<i>m/z</i> 463 | 3) Streptopenazin C
<i>m/z</i> 410 | 5) Streptopenazin B
<i>m/z</i> 424 | 7) Streptopenazin G
<i>m/z</i> 438 |
| 2) Streptopenazin H
<i>m/z</i> 440 | 4) Streptopenazin A
<i>m/z</i> 424 | 6) Streptopenazin F
<i>m/z</i> 438 | |

Abb. 46: UV/MS-Chromatogramm (schwarze Spur: MS; grüne Spur: UV bei 250 nm) einer 17 Tage alten GYM4-Agarplatte des Stammes HB202. Im Extrakt wurden neben dem aromatischen Polyketid Mayamycin (1) verschiedene Streptopenazine detektiert nach Auftrennung an einer C₁₈-Phase.

Tabelle 20: Die nächsten verwandten Typstämme zu den *phzE* PCR-positiven Stämmen sowie Masse- und UV-Daten der Peaks, die zu bekannten bzw. möglicherweise neuen Phenazinen passen.

Stamm	Nächster verwandter Typstamm ^a	16S rRNA Gene Acc.-Nr.	Masse <i>m/z</i> [M^+]	UV-Daten (nm)	Dereplikation der Phenazine
DSM 1042	<i>Streptomyces cinnamonensis</i> DSM 1042 ¹	DQ462657	206	367, 249, 212	kein passender Eintrag
			224	372, 249, 215	Phenazin-1-carboxysäure [Haagen et al. 2006]
			268	375, 256, 223	Phenazin-1,6-dicarboxylsäure [Haagen et al. 2006]
			292	371, 254, 214	Endophenazin A [Haagen et al. 2006]
			306	387, 269, 211	kein passender Eintrag
			308	372, 249, 212	Endophenazin C [Haagen et al. 2006]
			322	375, 256, 223	Endophenazin B [Haagen et al. 2006]
HB117	<i>Streptomyces fulvorobeus</i> LMG 19901 ^T	AJ781331	336	372, 249, 212	kein passender Eintrag
			494	370br, 274, 224	Senacarcin A [Nakano et al. 1982]
HB122	<i>Streptomyces luridiscabiei</i> S63 ¹	AF361784	512	370br, 275, 230	kein passender Eintrag
			492	376, 275, sh235	Saphenylester D [Laursen et al. 2002]
			496	sh438, 383br, 276, 227	kein passender Eintrag
			498	sh419, 393-325, 289, sh253, 220	kein passender Eintrag
			508	376, 275, sh235	kein passender Eintrag
HB202	<i>Streptomyces mediolani</i> LMG 20093 ^T	AJ781354	510	430br, 325, 224	Derivat von Aestivophoenin C [Kunigami et al. 1998]
			512	432br, 327, 226	Aestivophoenin C [Kunigami et al. 1998]
			396	368, sh364, sh351, 252, 218	Streptophenazin E [Mitova et al. 2008]
			410	371, sh364, sh354, 252, 213	Streptophenazin C [Mitova et al. 2008]
			410	368, sh364, sh351, 252, 218	Streptophenazin D [Mitova et al. 2008]
			424	367, sh363, sh350, 252, 215	Streptophenazin A [Mitova et al. 2008]
			424	368, sh364, sh351, 252, 218	Streptophenazin B [Mitova et al. 2008]
			438	368, sh364, sh353, 252, 215	Streptophenazin F [Mitova et al. 2008]
			438	368, sh363, sh351, 252, 214	Streptophenazin G [Mitova et al. 2008]
			440	368, sh363, sh352, 252, 215	Streptophenazin H [Mitova et al. 2008]
HB253	<i>Micromonospora matsumotoense</i> IMSNU 22003 ^T	AF152109	260	458, sh302, 261, 232	kein passender Eintrag
			465	sh362, 345, 299, 221	kein passender Eintrag
			566	sh362, 345, 299, 221	kein passender Eintrag

Phenazine
Ergebnisse

Stamm	Nächster verwandter Typstamm ^a	16S rRNA Gene Acc.-Nr.	Masse m/z [M ⁺]	UV-Daten (nm)	Dereplikation der Phenazine
HB254	<i>Micromonospora matsumotoense</i> IMSNU 22003 ^T	AF152109	451	361, 343, 352, 301, 223	kein passender Eintrag
HB291	<i>Streptomyces fulvorobeus</i> LMG 19901 ^T	AJ781331	492	376, 275, sh235	Saphenylester D [Laursen et al. 2002]
			496	sh438, 383br, 276, 227	kein passender Eintrag
			498	sh419, 393-325, 289, sh253, 220	kein passender Eintrag
			508	376, 275, sh235	kein passender Eintrag
			510	430br, 325, 224	Derivat von Aestivophenin C [Kunigami et al. 1998]
			512	432br, 327, 226	Aestivophenin C [Kunigami et al. 1998]
LB114	<i>Streptomyces flavogriseus</i> DSM 40323 ^T	AJ494864	n.d. ^b	370, 270, 244	kein passender Eintrag
			n.d. ^b	419, 367, 305, 228	kein passender Eintrag
LB129	<i>Streptomyces fimicarius</i> ISP 5322 ^T	AY999784	296	366, 249, 214	Phencomycinmethylester [Pusecker et al. 1997]
			238	366, 249, 214	1-Carboxymethyl-Phenazin
LB150	<i>Streptomyces luridiscabiei</i> S63 ^T	AF361784	510	sh401, 378, 274, 227	kein passender Eintrag
LB151	<i>Streptomyces griseus</i> ATCC51928 ^T	AF112160	510	sh401, 378, 274, 227	kein passender Eintrag

^a Die analysierten Sequenzen und die entsprechenden Typstämme zeigten eine Ähnlichkeit von 98,5 % oder mehr zueinander.

^b n.i., Hat nicht ionisiert.

sh Bezeichnet das Auftreten einer Schulter bei angegebener Wellenlänge.

s Schwache Intensität der angegebenen Wellenlänge.

br Bereites Plateau bei der jeweiligen Wellenlänge.

5.4 DISKUSSION

Die große Diversität von Mikroorganismen und deren mannigfaltigen biosynthetischen Fähigkeiten bieten ein enormes Potential zur Produktion von neuen bioaktiven Sekundärmetaboliten. Die Suche nach solchen Substanzen in einer bakteriellen Stammsammlung ohne weitere Informationen - außer einer groben phylogenetischen Einordnung - kann eine sehr zeitraubende Angelegenheit darstellen und zu einer hohen Wiederentdeckungsrate führen. Aus diesem Grund sind effiziente Methoden nötig, welche die Suche fokussieren. Genetische Ansätze, wie beispielsweise der Einsatz von Primersystemen für NRPS, PKS oder Halogenasen, haben sich als hilfreiches Selektionskriterium herausgestellt [Metsä-Ketelä et al. 1999; Piel 2002]. Die Suche nach Phenazingenen kann diese Auswahlmethoden erfolgreich ergänzen. In dieser Arbeit wurde daher ein schnelles genetisches System zur Entdeckung von Phenazinproduzenten auf Basis des *phzE*-Gens entwickelt. Da die genetische Basis der Phenazinbiosynthese hoch konserviert ist und die Variationen der Moleküle erst nach der Synthese der Grundstruktur erfolgt, kann mit den erstellten Primern eine große Vielfalt verschiedener Phenazinstrukturen entdeckt werden.

Sequenzen der Phenazinbiosynthese von *Alpha*-, *Beta*- und *Gammaproteobacteria*, *Actinobacteria* sowie *Firmicutes* beim NCBI und in der Literatur zugänglich [Laursen et al. 2002; Price-Whelan et al. 2006]. Allerdings wurden für die Erstellung der Primer nur Sequenzen verwendet, bei denen eine Produktzugehörigkeit bereits belegt wurde. Das waren zum gegebenen Zeitpunkt lediglich fünf Sequenzen, eine davon aus der Gruppe der *Actinobacteria*. Dennoch war es möglich, degenerierte Primer für einen Teil des Biosyntheseweges (*phzE*) zu entwickeln und damit die Präsenz von Phenazingenfragmenten für etwa 10 % der untersuchten Stämme nachzuweisen. Im Anschluss konnte für 65 % dieser Bakterien eine Phenazinproduktion gezeigt werden. Allerdings wurde keine Produktion von Phenazinen in Vertretern der *Alphaproteobacteria* und der *Firmicutes* nachgewiesen, obwohl bei NCBI Nukleotidsequenzen für beide Bakteriengruppen hinterlegt sind. Eventuell war zwar das Genfragment, nach dem gesucht wurde, intakt, nicht aber das gesamte für die Produktion nötige Gencluster. Wahrscheinlicher ist es, dass keine optimalen Produktionsbedingungen hergestellt werden konnten, so dass Variationen der Kulturbedingungen vermutlich zu einer Phenazinproduktion führen würden.

Bei den *Bacteroidetes*, den *Beta*- und *Gammaproteobacteria* konnten keine Phenazingenfragmente amplifiziert werden. Zur Überprüfung wurden einige dieser Stämme angezogen und auf das Vorhandensein von Phenazinen im Rohextrakt untersucht. Übereinstimmend mit den negativen PCR-Ergebnissen konnte keine Phenazinproduktion nachgewiesen werden. Dabei ist zu beachten, dass die Anzahl der untersuchten *Betaproteobacteria* und *Bacteroidetes* zu gering war, um eine zutreffende Aussage über die Anwendbarkeit der *ephzE*-Primer machen zu können. Allerdings sind die negativen PCR-Ergebnisse bezüglich der 36 *Gammaproteobacteria* sehr unerwartet, da unter anderem einige *Pseudomonas*-Stämme getestet wurden. Pseudomonaden sind grundsätzlich als Produzenten zahlreicher Phenazine bekannt [Wilson et al. 1988; Mavrodi et al. 1998; Thomashow et al. 1990]. Und schließlich

basierten die Primer unter anderem auf Sequenzen von Pseudomonaden. Zusätzlich wurde nach der Erstellung der Primersequenzen eine Datenbanksuche mit diesen durchgeführt, welche eine perfekte Übereinstimmung mit verschiedenen Phenazingenen, wie beispielsweise jenen von *P. chlororaphis* (L48339), *Pseudomonas* sp. M18 (FJ494909) und *P. aeruginosa* (FM209186, CP000744, CP000438, AE004091, AF005404), ergab. Sollte es tatsächlich so sein, dass sich unter den 36 *Gammaproteobacteria* zufällig kein einziger Phenazinproduzent befand? Da bis heute keine genetischen Untersuchungen bezüglich der Phenazinbiosynthese bei marinen Pseudomonaden stattgefunden haben, ist es theoretisch möglich, dass sich marine Vertreter von ihren terrestrischen Verwandten genetisch viel stärker unterscheiden als bisher angenommen.

Um die Anwendbarkeit des entwickelten Systems für marine und terrestrische *Gammaproteobacteria* und andere phylogenetische Gruppen nochmals zu überprüfen, müsste in Zukunft eine größere Anzahl verschiedener Bakterien untersucht werden. Dabei sollten auch *Pseudomonas*-Stämme hinzugezogen werden, von denen bereits umfassende Informationen über die Phenazinbiosynthese vorliegen, wie beispielsweise *Pseudomonas chlororaphis*.

Im Gegensatz zu den hier erzielten Ergebnissen konnten ^[Mavrodi et al. 2010] mit einem genetischen System für *phzF* Gene eine Trefferquote von 100 % in Pseudomonaden (51 Stämme) erzielen. Allerdings wurde für jede Gattung ein eigenes, universales *phzF*-Primerset entwickelt. Die Idee der in dieser Arbeit entwickelten *ephz*-Primer war es, viele phylogenetisch unterschiedliche Stämme bzw. Isolate in einem Ansatz untersuchen zu können. In der Studie von Mavrodi *et al.* wurden insgesamt 94 terrestrische Stämme aus unterschiedlichen Habitaten und verschiedener phylogenetischer Herkunft auf das Vorkommen von Phenazingenen, genauer des *phzF* Genes, untersucht. Es zeigte sich, dass die meisten Phenazinproduzenten im Boden oder in Assoziation mit Pflanzen lebten.

Das hier entwickelte Primersystem scheint am geeignetsten für die Untersuchung von *Actinobacteria* zu sein. Die PCR-positiven Stämme sind alles marine Vertreter der Gattungen *Nocardia*, *Saccharopolyspora*, *Micromonospora* und *Streptomyces*. Für die letzten zwei Gattungen konnte ebenfalls die Produktion von bekannten und möglicherweise neuen Phenazinen gezeigt werden. Die Ergebnisse der Streptomyceten Stämme stehen im Einklang mit Daten der Literatur, die sie als reichhaltige Phenazinquelle darstellen ^[Turner & Messenger 1986; Pusecker et al. 1997; Haagen et al. 2006; Mitova et al. 2008]. Weitere detaillierte Analysen könnten Aufschluss über die möglicherweise neuen Strukturen und eventuelle interessante Bioaktivitäten geben. Besonders im Hinblick auf die beiden *Micromonospora* Stämme HB253 und HB254, welche eventuell neue Phenazine produzieren, würde sich eine eingehende Untersuchung lohnen, da bis heute keine Phenazine aus der Gattung *Micromonospora* bekannt sind.

Nicht nur aus der Literatur sind interessante Bioaktivitäten für Phenazine bekannt ^[Nakano et al. 1982; Thomashow et al. 1990; Kunigami et al. 1998; Reddy et al. 1999; de Andrade-Neto et al. 2004; Laursen & Nielsen 2004], auch die Untersuchung der Streptophenazine aus Stamm *Streptomyces* sp. HB202 zeigte vielversprechende Aktivitäten gegen unterschiedliche Gram-positive Bakterien ^[Mitova et al. 2008]. Ausgehend von den guten Bioaktivitäten der Streptophenazine kann angenommen werden, dass

auch die anderen, möglicherweise neuen Phenazine der marinen *Actinobacteria* interessante Bioaktivität aufweisen könnten.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass der genetische Ansatz zur Suche nach Phenazinen ein vielversprechendes Selektionskriterium für *Actinobacteria*, in diesem Fall mariner Vertreter, ist. Zusätzlich hat sich gezeigt, dass marine *Actinobacteria* produktive Phenazinproduzenten sind. Dieses ist besonders interessant mit dem Wissen, dass Streptomyceten Phenazine herstellen können, welche im Gegensatz zu anderen Phenazinen keine Zytotoxizität gegenüber Eukaryoten aufweisen, aber dennoch vielversprechende selektive Aktivitäten gegen Tumorzellen bzw. Infektionskrankheiten zeigen [Laursen & Nielsen 2004].

Aus ökologischer Sicht sind diese Erkenntnisse über das Vorkommen und die Diversität der aufgetretenen Phenazine ebenfalls interessant. Es ist bekannt, dass Phenazine eine Funktion bei der Kontrolle von Pflanzenpathogenen haben, dass sie zur ökologischen Fitness und zur Pathogenität des produzierenden Stammes beitragen können [Mavrodi et al. 2010]. Mehrere Studien haben gezeigt, dass Phenazine einen nützlichen Effekt auf die Konkurrenzfähigkeit und das Langzeitüberleben der Produzenten in ihrer natürlichen Umgebung haben [Mazzola et al. 1992]. Außerdem wird die Funktion als Signalmolekül immer offensichtlicher [Dietrich et al. 2006].

Die in dieser Arbeit identifizierten Phenazine wurden ausschließlich von marinen Stämmen produziert, welche entweder von dem Brotkrumenschwamm *Halichondria panicea* (HB-Stämme) oder dem Zuckertang *Saccharina latissima* (ehemals *Laminaria saccharina*; LB-Stämme) isoliert wurden. In der Literatur werden für alle identifizierten Phenazine vor allem antibakterielle und zytotoxische Eigenschaften beschrieben. So könnten die antibakteriellen Eigenschaften des Senacarcin A [Nakano et al. 1982] (Stamm HB117), des Phencomycinethylesters [Pusecker et al. 1997] (Stamm LB129), der Streptophenazine [Mitova et al. 2008] (Stamm HB202) und des Saphenylesters D [Laursen et al. 2002] (Stämme HB117 und HB298) die assoziierte mikrobielle Population des Wirtes vor unerwünschten Bakterien schützen. Die zytotoxischen Wirkungen des Senacarcin A [Nakano et al. 1982] und des Phencomycinethylesters [Pusecker et al. 1997] könnten Schutz vor beispielsweise Fraßfeinden in Form kleiner Invertebraten bzw. Vertebraten bieten oder den Aufwuchs durch Algen verhindern. Das Aestivophenin C [Kunigami et al. 1998] ist ein Antioxidans und könnte mit seiner Redoxeigenschaft den Produzenten schützen, indem es die Zerstörung empfindlicher Moleküle verhindert.

Da bekannt ist, dass Phenazine zumindest in Pseudomonaden als Signalmoleküle fungieren [Dietrich et al. 2006], könnte dieses auch bei *Actinobacteria* der Fall sein.

5.5 ZUSAMMENFASSUNG

Auf der Basis des *phzE* Gens des Phenazinbiosyntheseweges wurde ein genetisches System entwickelt, welches aufzeigt, welche Bakterien als Phenazinproduzenten in Frage kommen. Phenazine sind vielversprechende bakterielle Sekundärmetabolite mit interessanten antibiotischen Aktivitäten. Sechs unterschiedliche phylogenetische Bakteriengruppen von verschiedenen, hauptsächlich marinen Standorten, wurden diesbezüglich untersucht. Vertreter der *Firmicutes*, *Alphaproteobacteria* und *Actinobacteria* zeigten ein positives PCR-Ergebnis. Die Stämme mit einem positiven genetischen Ergebnis wurden mit Hinblick auf die Fähigkeit zur Phenazinproduktion kultiviert und das dazugehörige Metabolitprofil mittels HPLC-UV/MS analysiert. Die chemischen Untersuchungen zeigten die Bildung von Phenazinen in 11 von 17 genetisch positiv getesteten Stämmen, allesamt marine *Actinobacteria*. In sechs Bakterien konnten bekannte Phenazine identifiziert werden, in fünf Stämmen traten Phenazine auf, welche keinem bekannten Phenazin in den Datenbanken zugeordnet werden konnte. Damit stellt dieses genetische System eine schnelle und vielversprechende Methode zur Identifizierung bekannter und neuer Phenazine dar.

6 GENETISCHE UND CHEMISCHE UNTERSUCHUNG DER SEKUNDÄRSTOFFPRODUKTION IN *NOCARDIA JEJUENSIS* DSM 44959^T

6.1 EINLEITUNG

Actinomyceten sind traditionell eine reichhaltige Quelle an vielversprechenden Naturstoffen, von denen viele eine pharmazeutische Anwendung haben [Clardy et al. 2006; Gullo et al. 2006]. Streptomyceten haben mit etwa 90 % den größten Anteil daran [Clardy et al. 2006]. Auch in der Gattung *Nocardia* konnten viele strukturell unterschiedliche und pharmakologisch interessante Sekundärmetabolite entdeckt werden [Nett et al. 2009]. 1976 wurden als erste Metabolite aus dieser Organismengruppe die β -Laktamantibiotika Nocardicin A und B entdeckt, welche eine Aktivität gegen Gram-positive Bakterien und gegen Pseudomonaden zeigten [Hashimoto et al. 1976]. Besonders viele Substanzen wurden bis heute aus der Art *Nocardia brasiliensis* isoliert. Dazu gehören das fungizide Makrolid Brasilinolid A [Shigemori et al. 1996; Tanaka et al. 1997], das zytotoxische Alkaloid Brasilidin A [Kobayashi et al. 1997], die immunsuppressiven Diterpenoide Brasilicardin A - D [Komaki et al. 2000; Shigemori et al. 1998; Komatsu et al. 2004], die antibakteriellen Nocarazine A - C [Tsuda et al. 1999] und das zytotoxische Benz[*a*]anthrachinone D [Tsuda et al. 1996] sowie das zytotoxische Mycobactin Brasilibactin A [Tsuda et al. 2005]. Ein Brasilibactin A-Derivat, das antiviral wirkende Mycobactin A-77543 (im weiteren Verlauf der Arbeit aufgrund der engen strukturellen Verwandtschaft als Brasilibactin B bezeichnet), wurden ebenfalls in einem nicht näher phylogenetisch klassifizierten *Nocardia* Stamm nachgewiesen [Azuma et al. 2000].

Diese Mycobactine bestehen zum einem aus der Mycobactinsäure und zum anderen aus dem Cobactin (Abb. 47).

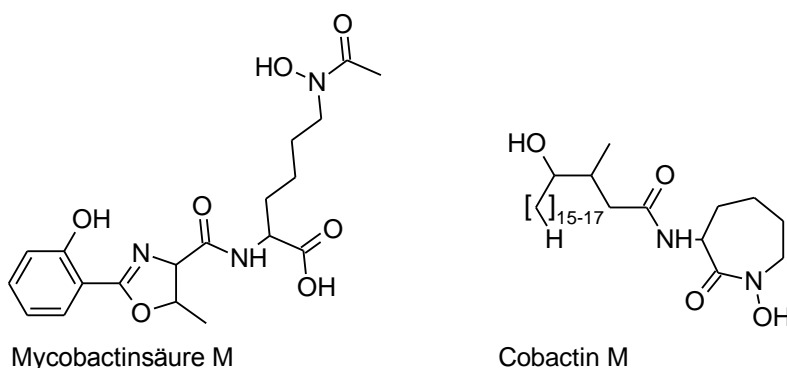


Abb. 47: Mycobactine setzen sich aus einer Mycobactinsäure und einem Cobactinteil zusammen. Hier das Beispiel des Mycobactin M, isoliert aus *Mycobacterium marinum*, modifiziert nach [Ratledge & Snow 1974].

Mycobactine sind eine Gruppe von lipidlöslichen, Eisenionen-bindenden Substanzen, welche überwiegend von der Gattung *Mycobacterium* produziert werden. Die Mycobactine fungieren als Ionophore für den Transport von Eisenionen und werden vorwiegend produziert, wenn die Umgebung ein Eisendefizit aufweist [Ratledge & Marshall 1972]. Dieses ist besonders wichtig, da die

mycobakterielle Zellwand sich durch ihre dicke, lipidhaltige Grenzschicht von anderen bakteriellen Zellwänden unterscheidet. Die Mycobactine gehören mit den Exochelinen und den Carboxymycobactinen zu der Gruppe der Siderophore [Vergne et al. 2000]. Die Gattung *Nocardia* ist mit der Gattung *Mycobacterium* nah verwandt und besitzt einen ganz ähnlichen Zellwandaufbau. Daher stellt auch hier die Eisenaufnahme ein Problem dar. 1974 wurde die erste Mycobactinstruktur, Nocobactin NA (Abb. 48), aus *Nocardia asteroides* [Ratledge & Snow 1974] beschrieben.

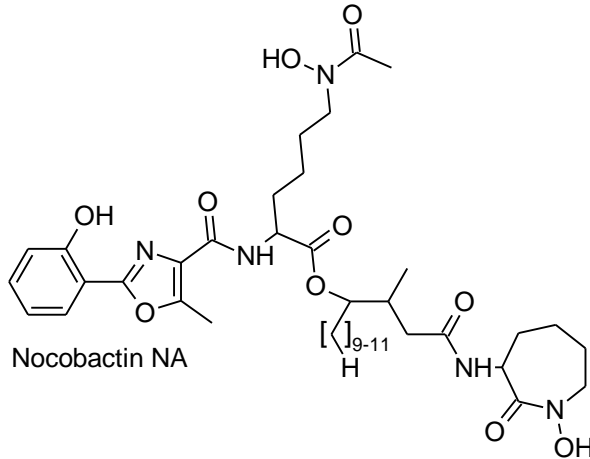


Abb. 48: Nocobactin NA aus *Nocardia asteroides*, modifiziert nach [Ratledge & Snow 1974].

Das aus nichtproteinogenen Aminosäuren aufgebaute Peptidrückgrat der Siderophore und damit auch der Mycobactine ließ schon früh eine NRPS basierte Biosynthese vermuten. Etliche Experimente bestätigten diese Annahme [Quadri et al. 1998].

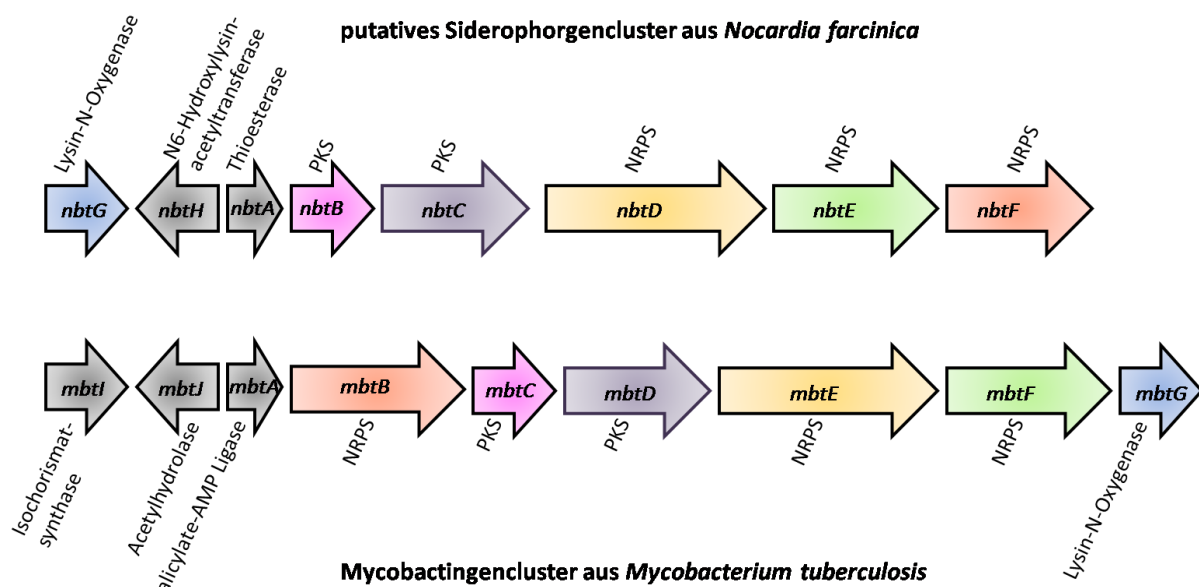


Abb. 49: Schematischer Aufbau zweier Siderophorgencluster, modifiziert nach [Ishikawa et al. 2004].

Die Analyse des Genoms von *M. tuberculosis* zeigte, dass das Gencluster *mbt* (Abb 48) für die Biosynthese des Mycobactins sowie für den anschließenden Eisentransport verantwortlich ist [DeVoss et al. 1999]. Sechs der Gene, *mbtA* bis *mbtF*, konnten als direkte Gene eines NRPS/PKS/NRPS-Hybrids identifiziert werden. Neben den zwei PKSs (*MbtC* und *MbtD*) und den drei NRPSs (*MbtB*, *MbtE*, *MbtF*) konnte eine Isochorismatsynthetase (*MbtI*), welche Salicylsäure

zur Verfügung stellt, und ein Adenylierungsenzym (MbtA), welches die Aktivierung der Salicylsäure bewirkt, um diese anschließend an das ACP-MbtB zu binden, identifiziert werden [Crosa & Walsh 2002]. Der genetische Aufbau der Siderophore innerhalb der Gattung *Nocardia* scheint sehr ähnlich zu sein [Ishikawa et al. 2004].

In diesem Teil der Arbeit sollte mit den zuvor erprobten Methoden eine *Nocardia* Art genetisch und chemisch näher charakterisiert werden, um so Einblicke in das Potential eines solchen Stammes - vor allem mit Hinblick auf die Siderophorbildung - zu gewinnen. Dafür wurde der Typstamm *Nocardia jejuensis* DSM 44959^T, der im Jahr 2006 von Lee aus einer Höhle auf Jeju Island (Südkorea) isoliert und beschrieben wurde [Lee 2006], ausgesucht. Für diese Art wurden bis jetzt keine Sekundärmetabolite nachgewiesen.

Nocardia jejuensis gehört innerhalb der *Actinobacteria* zusammen mit der Gattung *Rhodococcus* zu der Familie der *Nocardiaceae* und ist nah verwandt mit den Typstämmen *Nocardia alba* YIM 30243^T (AY222321; 97 % Übereinstimmung zu *N. jejuensis*) und *Nocardia uniformis* DSM 43136^T (AF430044; 96 % Übereinstimmung zu *N. jejuensis*). *N. jejuensis* formt ein verzweigtes Mycel, welches sich aus ungleichmäßigen Stäbchen zusammensetzt und auf der Unterseite orange und auf der Oberseite weiß bis pink gefärbt ist (Abb. 50).

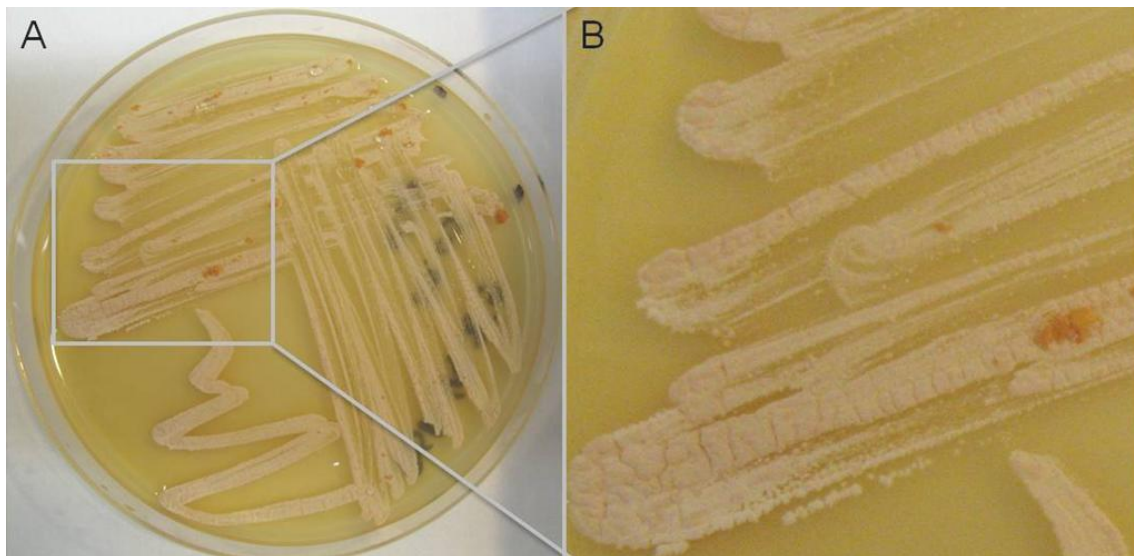


Abb. 50: A: 7 Tage alte GYM4-Agarplatte des Typstammes *N. jejuensis* nach Inkubation bei 28°C im Dunkeln. B: Vergrößerung derselben Platte.

6.2 MATERIAL UND METHODEN

6.2.1 AMPLIFIZIERUNG VON BIOSYNTHESEGENFRAGMENTEN AUS *NOCARDIA JEJUENSIS* DSM 44959^T

Der Typstamm *Nocardia jejuensis* DSM 44959^T wurde von der DSMZ in Braunschweig bezogen. Nach dem Öffnen der gelieferten Ampulle wurden 0,5 mL GYM-Medium zugegeben und die Ampulle wurde für 30 Minuten mit einem Baumwollstopfen verschlossen, so dass das Pellet aufquellen konnte. Anschließend wurde der Inhalt vorsichtig mit einer Impföse umgerührt und in ein Reagenzglas mit 5 mL GYM-Medium übertragen. 100 µL dieser Suspension wurden auf einer GYM-Agarplatte ausgestrichen, bei 28°C kultiviert und dann auf GYM4-Agarplatte überimpft. Nach 2 Wochen erfolgte die DNA-Extraktion. Eine Impföse Bakterienmaterial wurde mit 400 µL DNA-freiem Wasser (Sigma-Aldrich; St. Louis, USA) mithilfe des Precellys 24 Homogenizer (Peqlab, Erlangen) bei 2 x 6.500 rpm für 45 Sekunden aufgeschlossen. Anschließend wurde die Probe für 10 Minuten bei 8.000 x *g* zentrifugiert, um den DNA-haltigen wässrigen Überstand von dem Zellmaterial zu trennen.

Die PCR zur Amplifizierung der Typ II PKS, NRPS und *phzE* Genfragmente erfolgte wie in Abschnitt 4.2.2.3 und 5.2. beschrieben. Die erhaltenen und manuell bearbeiteten Sequenzen wurden mithilfe von blastx ^[Altschul et al. 1990] mit bekannten NRPS und Typ II PKS Gensequenzen verglichen.

6.2.2 KLONIERUNGSEXPERIMENT MIT DEN NRPS-PCR-PRODUKTEN

Da bei der NRPS-PCR mehrere PCR-Produkte mit ähnlicher Länge amplifiziert wurden, wurde im Anschluss ein Klonierungsexperiment durchgeführt, um die PCR-Produkte einzeln sequenzieren zu können. Hierfür mussten die erhaltenen PCR-Produkte von störenden PCR-Komponenten, wie beispielsweise Primerresten, befreit werden. Dieses wurde mithilfe des High Pure PCR Product Purification Kit (Roche, Mannheim) nach Angaben des Herstellers erreicht. Im Anschluss wurde die DNA-Konzentration in der Probe wie in Abschnitt 4.2.3.1 bestimmt. Für die Klonierung lag ein DNA-Gehalt von 25 ng/µL vor. Das Klonierungsexperiment an sich wurde mit dem TOPO TA Cloning Kit for Sequencing (Invitrogen, Carlsbad, USA) nach Angaben des Herstellers ausgeführt. Dabei wurde der Ansatz nach vorsichtiger Durchmischung für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Für die anschließende Transformation wurden 2 µL des Ligationsansatzes zu TOP10-kompetenten *E. coli*-Zellen gegeben. Der Ansatz wurde für weitere 30 min auf Eis inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte ein Hitzeschock, bei dem der Ansatz für 30 sec in 42°C warmes Wasser und anschließend erneut für zwei Minuten auf Eis gestellt wurde. Danach wurden 250 µL SOC-Medium zu dem Ansatz gegeben. Die Probe wurde für eine Stunde bei 37°C und 200 rpm inkubiert. Im Anschluss wurden jeweils auf vorgewärmte LB-Platten 50, 80 und 120 µL der Zellsuspension ausplattiert. Als Antibiotikum für die LB-Platten wurde Kanamycin (Calbiochem, Darmstadt) verwendet. Die LB-Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert. Am folgenden Tag wurden mittels steriler Zahnstocher Einzelkolonien gepickt und in 50 µL DNA-

freiem Wasser aufgenommen. Anschließend wurde bei 95°C (10 min) denaturiert. Nun konnte die entsprechende PCR (Abschnitt 8.2, Tabellen 25 und 26) mit den Primern M13 forward und M13 reverse (Abschnitt 8.2, Tabelle 24) durchgeführt werden. Der Erfolg der PCR wurde mittels Gel-Elektrophorese, wie in Abschnitt 4.2.2.2 beschrieben, überprüft. Die anschließende Sequenzierung erfolgte ebenfalls mithilfe des M13 Primerpaars wie bereits in Abschnitt 4.2.2.2 ausgeführt.

6.2.3 KULTIVIERUNG DES *NOCARDIA JEJUENSIS* DSM 44959^T

In einer ersten Analyse wurde Stamm *N. jejuensis* DSM 44959^T in 100 mL GYM4CaCl₂-Medium im 300 mL Erlenmeyerkolben bei 120 rpm und 28°C im Dunkeln angezogen. Die Hauptkultur wurde mit einem zwei bis drei Wochen alten, 1 cm² großen Stück einer GYM4-Agarplatte angezogen, welche wiederum aus der Kryokonservierung angeimpft wurde. Dieser Ansatz wurde nach sieben Tagen nach Standardbedingungen (Zugabe von 50 mL EtOAc, Abschnitt 4.2.2.5) aufgearbeitet. Um die in dieser Analyse auftretenden Brasilibactine in ausreichender Menge zur Verfügung zu haben, wurde ein 12 L Ansatz kultiviert. Hierfür wurde zunächst eine sechs Tage alte 100 mL GYM4CaCl₂-Vorkultur durch Animpfen aus der Kryokonservierung bei 120 rpm und 28°C im Dunkeln hergestellt. Für die Hauptkultur wurden im Anschluss 10 mL der Vorkultur in den jeweiligen 2 L Erlenmeyerkolben mit einem Liter GYM4CaCl₂ überimpft und bei 120 rpm und 28°C im Dunkeln für acht Tage kultiviert.

6.2.4 EXTRAKTION DER *NOCARDIA JEJUENSIS* KULTUR UND AUFREINIGUNG DER BRASILIBACTINE A - D (**7-10**)

Die 12 L-Kultur des Stammes *Nocardia jejuensis* DSM44959^T wurden mithilfe des Ultra Turrax T25 basic (IKA-Werke GmbH and Co) bei 16.000 rpm für 30 Sekunden homogenisiert und anschließend mit 6 L EtOAc extrahiert. Der Extrakt wurde vakuumgetrocknet und in MeOH resuspendiert. Ein Aliquot des trockenen Rohextraktes (1,565 g) wurde mittels HPLC-UV/MS analysiert. Anschließend wurde der Rohextrakt mithilfe der präparativen HPLC (Phenomenex Gemini-NX C₁₈ 110A, 100 x 50.00 mm; Elutionsmittel: H₂O (A), MeCN (B); Gradient 0 min 80 % B, 16 min 100 % B, 18 min 100 % B; Fluss 15 mL/min; UV-Detektion via DAD) aufgetrennt. Brasilibactin A (**7**) (17 mg) konnte bei 12,8-13,4 min, Brasilibactin B (**8**) (20 mg) bei 8,8-9,4 min, Brasilibactin C (**9**) (18 mg) bei 6,2-6,8 min und Brasilibactin D (**10**) (0,6 mg) bei 4,8-5,2 min detektiert werden.

6.2.5 CHEMISCHE ANALYTIK

Die NMR-Spektren wurden mit einem Bruker AV 600 Spektrometer (600 und 150 MHz) aufgenommen. Die verbleibenden Lösungsmittelprotonen wurden als Referenz verwendet (δ_{H} 3,31 und δ_{C} 49,0 ppm CD₃OD). Mithilfe eines Benchtop Time-of-Flight Spektrometers (MicroTOF II, Bruker Daltonics) mit positiver Elektrospray-Ionisation (ESI) wurde von **7-10** eine exakte Masse ermittelt. Für die RP-HPLC wurde eine C₁₈-Säule (Phenomenex Onyx Monolithic C₁₈, 100 x 3.00

mm) und ein Gradient (Abschnitt 8.3, Tabelle 27) bestehend aus H₂O (A)/MeCN (B) (0 min 5 % B, 4 min 60 % B, 6 min 100 % B; Fluss 2 mL/min), jeweils versetzt mit 0,1 %iger Ameisensäure, verwendet. Die Säule war wiederum Bestandteil eines VWR Hitachi Elite LaChrom Systems, welches an einen ESI-Ionenfallen Detektor (Esquire 4000, Bruker Daltonics) gekoppelt war.

6.2.6 ERMITTLUNG DER ANTIMIKROBIELLEN AKTIVITÄT DER BRASILIBACTINE A - D (7-10)

Zur Ermittlung der antibakteriellen Aktivität der Brasilibactine A - D (7-10) wurden folgende Stämme verwendet: Die Gram-positiven Bakterien *Bacillus subtilis* (DSM 347), *Propionibacterium acnes* (DSM 1897), *Staphylococcus epidermidis* (DSM 20044), *Staphylococcus lentus* (DSM 6672), die Gram-negativen Bakterien *Erwinia amylovora* (DSM 50901), *Escherichia coli* K12 (DSM 498), *Pseudomonas aeruginosa* (DSM 50071), *Pseudomonas fluorescens* (NCIMB 10586), *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* (DSM 50252), *Ralstonia solanacearum* (DSM 9544), *Xanthomonas campestris* (DSM 2405) und die Hefe *Candida glabrata* (DSM 6425) sowie der Pilz *Septoria tritici* (BASF). Alle Tests wurden wie in Abschnitt 4.4.1.2.4 beschrieben durchgeführt.

6.2.7 ERMITTLUNG DER ZYTOTOXISCHEN AKTIVITÄT DER BRASILIBACTINE A - D (7-10)

Die Sensitivität der NIH-3T3, HepG2 und HT-29 Zelllinien (DSMZ, Braunschweig) gegenüber den Brasilibactinen A - D (7-10) wurde wie in Abschnitt 4.4.1.2.4 beschrieben ermittelt.

6.2.8 ERMITTLUNG DER ENZYMINHIBITORISCHEN AKTIVITÄT DER BRASILIBACTINE A - D (7-10)

Die Ermittlung der enzyminhibitorischen Aktivitäten der Brasilibactine A - D (7-10) wurde wie in Abschnitt 4.4.3.2.7 beschrieben durchgeführt.

6.3 ERGEBNISSE

Aus Typstamm *Nocardia jejuensis* DSM 44959^T konnten im Laufe dieser Arbeit die bekannten Mycobactine Brasilibactin A (**7**) und B (**8**) sowie zwei neue Derivate C (**9**) und D (**10**) isoliert werden. Bei ersten Untersuchungen zur biologischen Aktivität zeigten sich antibakterielle und zytotoxische Wirkungen dieser Metabolite.

12 L Kultur wurden mit EtOAc extrahiert und der organische Überstand in MeOH gelöst, um eine HPLC-UV/MS Analyse durchzuführen. Im Anschluss konnten die farb- und gestaltlosen Feststoffe Brasilibactin A (**7**) (17 mg) bei 12,8 - 13,4 min, Brasilibactin B (**8**) (20 mg) bei 8,8-9,4 min, Brasilibactin C (**9**) (18 mg) bei 6,2 - 6,8 min und Brasilibactin D (**10**) (0,6 mg) bei 4,8-5,2 min detektiert und mit einer Reinheit von über 80 % isoliert werden. Die Summenformel C₃₈H₅₉N₅O₁₀ (gemessen m/z 746,43197 [M+H]⁺, berechnet m/z 746,4335 [M+H]⁺) für Brasilibactin C (**9**) und die Summenformel C₃₆H₅₅N₅O₁₀ (gemessen m/z 718,40564 [M+H]⁺, berechnet m/z 718,4022 [M+H]⁺) für Brasilibactin D (**10**) wurden mittels HRESIMS ermittelt. Die UV-Absorption zeigte folgende Maxima λ_{\max} (MeOH) 306, 260sh, 250sh, 244, 230sh und 215 nm für **9** und **10**. Dieses deutete auf ein substituiertes Benzolchromophor hin und stimmte mit den UV-Daten der bekannten Brasilibactine überein. Außerdem ist aus der Literatur bekannt, dass die strukturellen Komponenten der Mycobactine im Allgemeinen ein typisches UV-Spektrum aufweisen, welches durch den Hydroxyphenyloxazolinrest und die Acylhydroxamsäuregruppe hervorgerufen wird. Daraus ergibt sich ein λ_{\max} in Methanol von 243, 249 und 304 nm bei einer substituierten Benzylgruppe, bei einer nicht substituierten Benzylgruppe ein λ_{\max} von 250 und 311 nm [Vergne et al. 2000].

Da aus dem organischen Extrakt des DSM Stammes ebenfalls das Brasilibactin A (**7**) isoliert werden konnte, war es möglich, einen Abgleich des gemessenen ¹H NMR-Spektrums mit den entsprechenden Daten aus der Literatur durchzuführen. Die Spektren waren nahezu identisch. Anhand des Spektrums von Brasilibactin A (**7**) (Anhang A) und den Daten der HRESIMS konnte die Struktur des Brasilibactin C (**9**) aufgeklärt werden. Die ¹H und ¹³C NMR-Spektren des Brasilibactin C (**9**) (Anhang A) deuteten auf das Vorhandensein von neun CH-Gruppe, vier Carbonylgruppen, einer *N*-Formylgruppe, drei Methylengruppen in Nachbarschaft zu einem Heteroatom, zwei Methyl- und einigen Methylengruppen in einer Alkylkette hin. Die Struktur von **9** wies insgesamt fünf Spinsysteme auf. Einen Benzolring von H-3 bis H-6, einen Dihydrooxazolring von H₂-9 bis H-10, Alkylketten von NH-13 bis H₂-31, von NH-20 bis H₂-24 und von H-17 bis H-44.

Aus der Literatur sind bestimmte Anhaltspunkte für die NMR-Signale von Mycobactinen bekannt: Die Protonensignale teilen sich in fünf Regionen auf. Aromatische Protonen kommen in der Region um 7,7 bis 6,5 ppm vor. Die olefinischen Protonen, die Protonen in α -Stellung zu einem Sauerstoffatom und die Protonen in α -Stellung zu zwei Gruppen wie einem Stickstoffatom oder einer Carbonylgruppe geben ein Signal zwischen 6,0 und 4,0 ppm. Die Protonen in α -Stellung zu einem Stickstoffatom liegen bei 4,0 bis 3,0 ppm. Protonen einer Allylgruppe kommen bei 3,0 bis 2,0 ppm vor [Vergne et al. 2000]. Anhand dessen konnten die ¹H-¹H-COSY-Signale von H-3 (δ_{H} 6,98; d, $J = 8,3$ Hz) mit H-4 (δ_{H} 7,42; br t, $J = 7,7$ Hz), H-4 mit H-5 (δ_{H} 6,91; br t, $J = 7,5$ Hz),

H-4 mit H-6 (δ_{H} 7,69; dd, $J = 7,9; 1,7$ Hz) und H-5 mit H-6 einem orthodisubstituierten, aromatischen Ring mit einer Hydroxygruppe am C-2 (δ_{C} 161,0) zugeordnet werden. Die chemische Verschiebung der ^{13}C Signale (C-3 δ_{C} 117,7; C-4 δ_{C} 135,0; C-5 δ_{C} 120,0; C-6 δ_{C} 129,5) erhärten das Aussehen dieses Strukturelements. Die ^1H - ^{13}C -HMBC-Korrelationen von H-3/C-1 (δ_{C} 111,5), H-3/C-5, H-4/C-2 und H-5/C-1 zeigten zusätzlich, dass der Benzolring am C-2 eine phenolische Hydroxygruppe tragen musste. ^1H - ^{13}C -HMBC-Korrelationen von H-3/C-7 (δ_{C} 168,5), H-6/C-7, H₂-9 (δ_{H} 4,62 und 4,64)/C-7 und H-10 (δ_{H} 5,03)/C-7 bewiesen, dass der Benzolring (C-1 bis C-6) über C-7 mit C-9 und C-10 verbunden war. Die chemischen Verschiebungen von C-7, C-9 (δ_{C} 70,4) und C-10 (δ_{C} 69,3) deckten sich mit den Daten des Brasilibactin A (**7**) und es konnte davon ausgegangen werden, dass ein Dihydrooxazolring Teil der Struktur von **9** war. Die ^1H - ^{13}C -HMBC-Korrelationen von H₂-9, H-10 und H-14 (δ_{H} 4,48) zu C-12 (δ_{C} 173,1) zeigten, dass der Dihydrooxazolring an eine Amidcarbonylgruppe gebunden war. Die ^1H - ^1H -COSY- sowie die ^1H - ^{13}C -HMBC-Korrelationen von H-14 zu H-28 (δ_{H} 1,94 und 1,83, m) bzw. zu dem entsprechenden C-28 (δ_{C} 31,8) sowie H-28/C-15 (δ_{C} 172,9) zeigten den Übergang von der Amidcarbonylgruppe zu der Alkylkette H-28 bis H₂-31 (H-29: δ_{H} 1,47 und 1,73; m; H-30: δ_{H} 1,72; H₂-31: δ_{H} 3,55 und 3,49). Die chemische Verschiebung von C-31 (δ_{C} 50,7) und die ^1H - ^{13}C -HMBC-Korrelation von H₂-31 zu C-33 (δ_{C} 159,3) wiesen auf eine *N*-Formylgruppe an dem N-32 hin. Diese Alkylkette ist an die Carbonylgruppe C-15 (δ_{C} 172,9) gebunden. Dieses wurde durch die ^1H - ^{13}C -HMBC-Korrelation von H-14 (δ_{H} 4,48; m)/C-15 gestützt. ^1H - ^{13}C -HMBC-Signale zeigten die Bindung von H-18 (δ_{H} 2,69; dq, $J = 7,0$ Hz; 7,5 Hz) zu der Amidcarbonylgruppe C-19 (δ_{C} 175,0). Die Methylgruppe H-45 (δ_{C} 1,13; t, $J = 7,0$ Hz), C-45 (δ_{C} 14,1) lag in Nachbarschaft zu C-17, C-18 (δ_{C} 45,1) und C-19, was durch eine COSY-Korrelation zu H-18 und die HMBC-Korrelation zu den drei genannten Kohlenstoffatomen bewiesen wurde. Die Amidcarbonylgruppe C-19 war mit einem ϵ -Aminocaprolactamring verbunden. Dieses wurde durch entsprechende ^1H - ^{13}C -HMBC-Korrelationen von H-21 (δ_{H} 4,56; br d, $J = 11,4$ Hz) und H₂-24 (δ_{H} 3,92; dd, $J = 16,4; 11,5$ Hz und 3,66; dd, $J = 16,4; 5,0$ Hz) zu C-22 (δ_{C} 171,1) sowie ^1H - ^1H -COSY-Korrelationen von H-21 zu H₂-27 (δ_{H} 1,55 und 1,84), H₂-24 zu H₂-25 (δ_{H} 1,57 und 1,79) unterstützt. Die lange Alkylkette erstreckte sich von H-17 bis H₂-34 (δ_{H} 1,61; m). Diese Alkylkette endete mit der Methylgruppe CH₃-44 (δ_{H} 0,90; d, $J = 7,0$ Hz). Dieses wurde von einer COSY-Korrelation von H-44 zu H₂-43 (δ_{H} 1,20 – 1,35; m) und einer ^1H - ^{13}C -HMBC-Korrelation von H₃-44/C-42 (δ_{C} 23,7) und H₂-43/C-43 (δ_{C} 33,0) bewiesen.

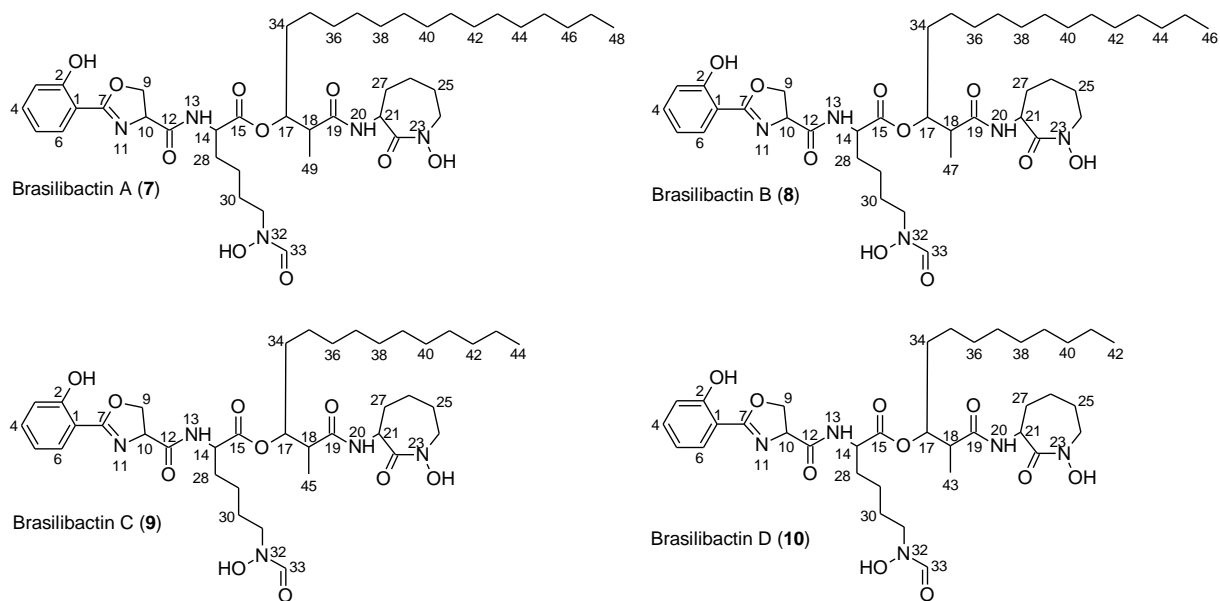


Abb. 51: Brasilibactine A - D (7-10).

Für die Strukturaufklärung von Brasilibactin D (10) mittels NMR-Experimenten konnte bedauerlicherweise nicht genügend Substanz isoliert werden. Dennoch gab die Messung der Exakten Masse und damit die Berechnung der Summenformel genügend Information, um die Struktur des Brasilibactin D (10) zu erstellen.

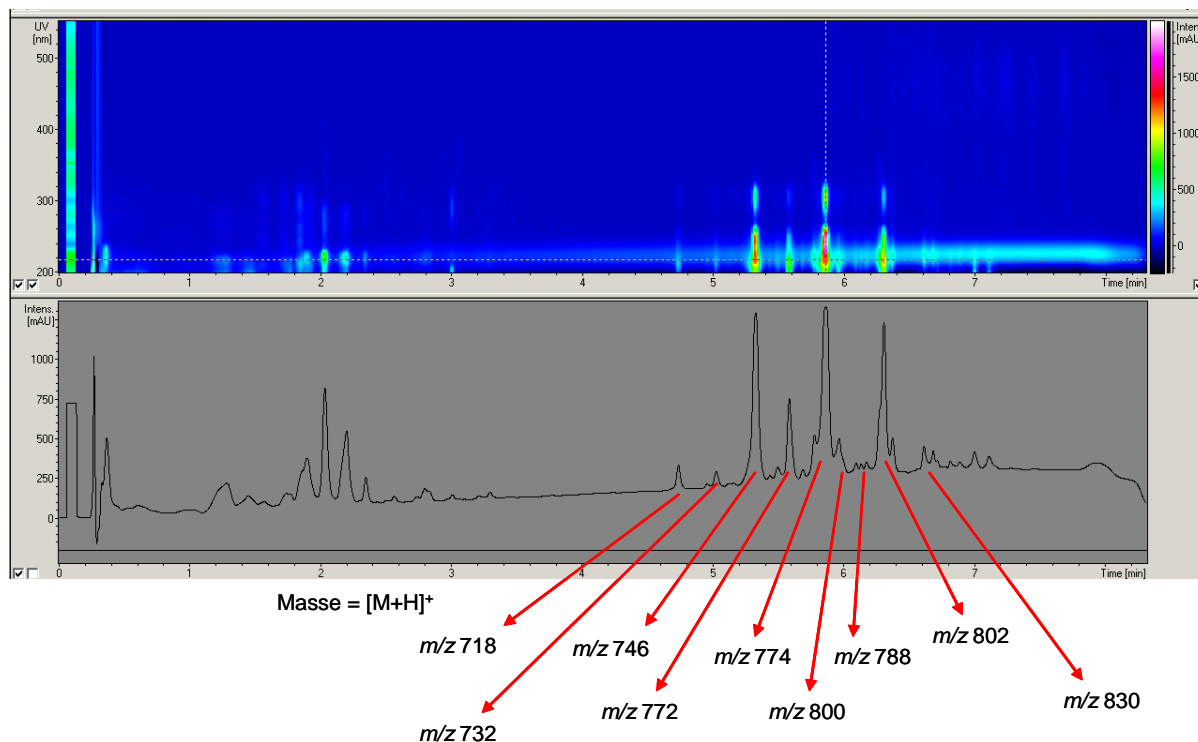


Abb. 52: 3D-UV-Chromatogramm des Rohextraktes von *N. jejuensis* nach Auftrennung an einer C₁₈-Phase. Unten sind die entsprechenden Massen von bekannten und neuen Brasilibactin Derivaten an den entsprechenden Peaks angegeben.

Neben den isolierten Brasilibactinen waren im 3D-UV/Vis-Chromatogramm des Extraktes des Stammes DSM 44959^T weitere Massen mit dem gleichen UV-Spektrum 306, 260sh, 250sh, 244, 230sh, 215 nm zu erkennen (Abb. 52). Es ist weitestgehend bekannt, dass Mycobactine häufig

als eine Mischung verschiedener Strukturderivate vorliegen, welche sich nur in der Länge der Seitenkette unterscheiden [Vergne et al. 2000]. Dieses schien hier der Fall zu sein.

Für die gefundenen Massendaten, bis auf die beiden Massen m/z 772 und 800 $[M+H]^+$, konnte davon ausgegangen werden, dass die Kettenlänge ab C-34 ausgehend von dem Brasilibactin A (7) um eine CH_2 -Gruppe verlängert (m/z 830 $[M+H]^+$) bzw. um ein bis sechs CH_2 -Gruppen (m/z 718 $[M+H]^+$) verkürzt war (Abb. 53).

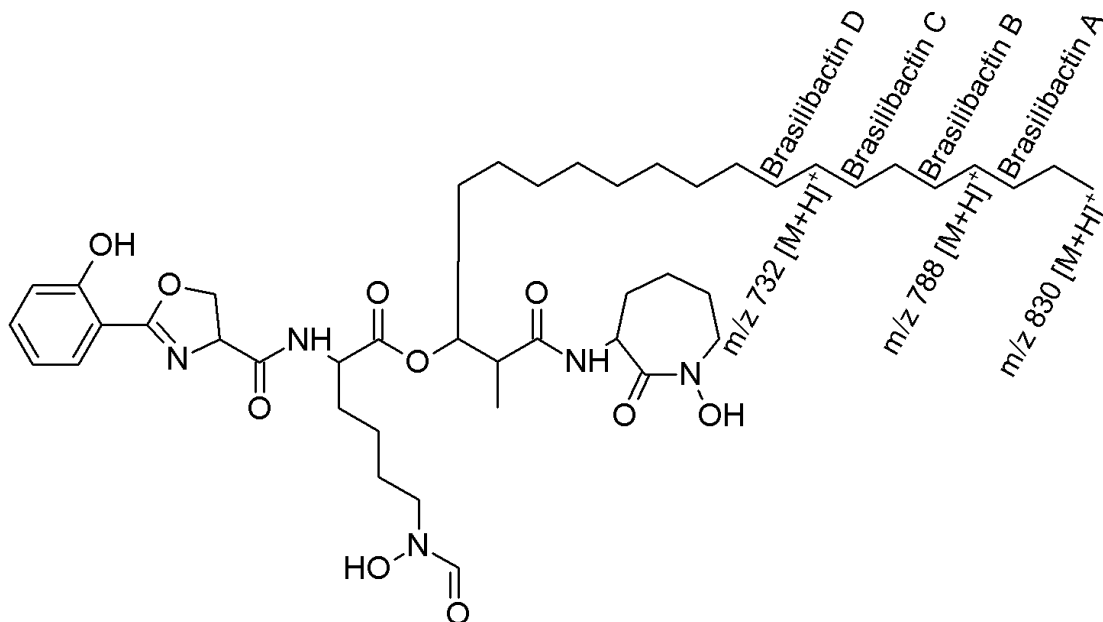


Abb. 53: Zuordnung der aufgetretenen Masse zur Länge der Seitenkette im Brasilibactin-Molekül.

Zusätzlich zu den Brasilibactinen traten im polaren Bereich des 3D-UV-Chromatogramms (Abb. 52) mehrere Substanzen auf, deren Grundgerüst vermutlich aus einem Indol bestand. Einer dieser Strukturen konnte das bekannte Indol-3-carbaldehyd (Abb. 54) zugeordnet werden, welches eine Masse von m/z 145 und ein UV von 299, 260, 244, 220sh, 211 aufwies. Eine zweite Substanz, die im Rohextrakt aufgetreten war, ist das *N*-Acetyltryptophan (Abb. 54) mit einer Masse von m/z 246 und einem UV von 291sh, 267, 233, 218sh. Die weiteren Indolstrukturen konnten bislang nicht aufgeklärt werden.

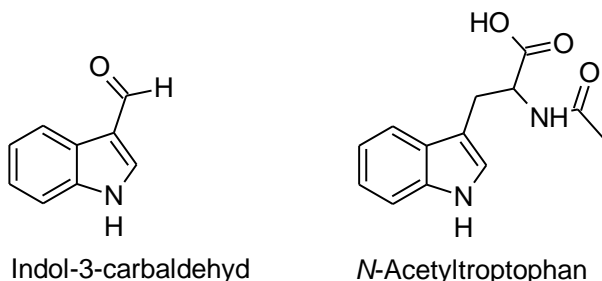


Abb. 54: Indol-3-carbaldehyd und *N*-Acetyltryptophan aus *N. jejuensis*.

Tabelle 21: NMR-Daten (600 MHz, CD₃OD) der Brasilibactine A (7) und C (9).

Position	Brasilibactin A (7) ^a				Brasilibactin C (9)			
	δ_C , mult.	δ_H (J in Hz)	COSY	HMBC	δ_C , mult.	δ_H (J in Hz)	COSY	HMBC
1	109,8				111,5; C			
2-OH	159,1; C	11,79			161,0; C			
3	116,6; CH	7,00; d (8,3)	4	1	117,7; CH	6,98; d (8,3)	4	1; 2; 5; 7
4	134,0; CH	7,46; br t (8,0)	3; 5	2	135,0; CH	7,42; br t (7,7)	3; 5	2; 6
5	119,0; CH	6,94; br t (8,0)	4; 6	1	120,0; CH	6,91; br t (7,5)	4; 6	1; 3
6	128,0; CH	7,94; d (7,7)	5	7	129,5; CH	7,69; dd (7,9; 1,7)	5	2; 4; 7
7	165,9; C				168,5; C			
8								
9	69,2; CH ₂	4,65; dd (8,8; 9,9); 4,47; dd (7,7; 8,8)	10	7	70,4; CH ₂	4,62; 4,64; br t (7,0); br t (9,0)	10	7; 12
10	67,0; CH	5,02; dd (7,7; 9,9)	9	7; 12	69,3; CH	5,03; t (8,5)	9	7; 12
11								
12	169,9; C				173,1; C			
13-NH		8,71; d (11,0)	14	12				
14	52,6; CH	4,25 m	13; 28	15	54,0; CH	4,48; m	28	12; 15; 28
15	171,5; C				172,9; C			
16								
17	75,6; CH	4,90; dt (2,0; 9,0)	18; 34	15	77,6; CH	5,07; m	18; 34	
18	43,6; CH	2,62; m	17; 49		45,1; CH	2,69; dq (7,0; 7,5)	17; 45	19
19	172,1; C			19	175,0; C			
20-NH		8,11; d (6,9)	21					
21	50,6	4,44; m	20; 27	22	52,5; CH	4,56; br d (11,4)	27	22
22	168,9; C				171,1; C			
23-NOH		9,70						
24	52,5; CH ₂	3,87; dd (11,6; 15,8); 3,48; dd (4,4; 15,8)	25	22	53,8; CH ₂	3,92; 3,66; dd (16,4; 11,5); dd (16,4; 5,0)	25	22
25	24,7; CH ₂	1,35 – 1,20; m; 1,09; m	24; 26		23,0 – 24; CH ₂	1,79; m; 1,57; m	24	
26	26,9; CH ₂	1,82; m	25; 27		23,0 – 24,0; CH ₂	1,20 – 2,00		

Position	Brasilibactin A (7) ^a				Brasilibactin C (9)			
	δ_C , mult.	δ_H (J in Hz)	COSY	HMBC	δ_C , mult.	δ_H (J in Hz)	COSY	HMBC
27	31,8; CH ₂	1,68 – 1,60; m; 1,48 – 1,40; m	21; 26		32,6; CH ₂	1,84; 1,55		
28	30,1; CH ₂	1,72; m; 1,48 – 1,40; m	14; 29		31,8; CH ₂	1,94; m; 1,83; m	14; 29	15
29	22,5; 22,3 CH ₂	1,60 - 1,52; m; 1,48 – 1,40; m	28; 30		23,0 – 34,0; CH ₂	1,73; m; 1,47; m		
30	26.,4; CH ₂	1,68 – 1,60; m; 1,60 – 1,52; m	29; 31		23,0 – 34,0; CH ₂	1,72	31	
31	45,4; 48,9; CH ₂	3,42; m; 3,35; m	30	33	50,7; CH ₂ ; 47,0; CH ₂	3,55; 3,49	30	33
32-OH		9,95						
33	161,5; C	8,22; s; 7,87; s			165,3; 159,3; C	8,16; 7,90; s		
34		1,35 – 1,20; m	17		23,0 – 34,0; CH ₂	1,61; m	17	
35	25,6; CH ₂	1,60 – 1,52; m; 1,48 – 1,40; m						
36								
37								
38					23,0 – 34,0; CH ₂	1,20 – 2,00; m	35 - 41	35 - 41
39								
40								
41	28,6 – 29,0; CH ₂							
42		1,35 – 1,20; m			23,7; CH ₂	1,45; m		
43					33,0; CH ₂	1,20 – 1,35; m	44	
44					14,5; CH ₃	0,90; d (7,0)	43	42; 43
45					14,1; CH ₃	1,13; t (7,0)	18	17; 18; 19
46	31,2; CH ₂							
47	22,0; CH ₂							
48	13,9; CH ₃	0,95; t (6,5)						
49	14,4; CH ₃	0,95; d (7,7)		19				

^a NMR-Daten aus der Literatur entnommen, DMSO-d₆ 600 MHz für ¹H NMR; 150 MHz für ¹³C NMR.

Die ersten antibakteriellen Aktivitätstests zeigten, dass die beiden neuen Brasilibactin-Derivate C (**9**) und D (**10**) im Gegensatz zu den bekannten Brasilibactinen A (**7**) und B (**8**) Aktivität gegen Gram-positive Bakterien wie auch gegen Gram-negative Bakterien aufwiesen (Tabelle 22). Zusätzlich konnten für die Brasilibactine A - C (**7-9**) zytotoxische Aktivitäten gegen die Leberkarzinomzelllinie HepG2 und die Darmkrebszelllinie HT-29 nachgewiesen werden (Tabelle 23). Allerdings zeigten alle drei Substanzen ebenfalls eine Zytotoxizität gegen die Fibroblastenzelllinie NIH-3T3. In dem sensitiveren zytotoxischen Test der Firma Oncotest zeigte Brasilibactin B (**8**) keine Aktivität mehr. Das bereits bekannte Brasilibactin A (**7**) wies, wie auch bei den HepG2 und HT-29 Zelllinien, bei allen weiteren Zelllinien einen kleineren IC₅₀-Wert als das Derivat C (**9**) auf und damit also eine bessere Wirkung. Keines der getesteten Brasilibactine zeigte eine Aktivität in den enzymatischen Tests.

Neben der strukturellen Analyse der Brasilibactine und deren biologischer Aktivität wurde *Nocardia jejuensis* zusätzlich genetische auf das Vorhandensein von NRPS- und Typ II PKS-Genfragmenten untersucht. Diese Untersuchungen ergaben, dass die etwa 20 amplifizierten NRPS-Genfragmente eine 41 %ige bis 84 %ige Ähnlichkeit zu unterschiedlichen Genabschnitten der putativen NRPS aus *Nocardia farcinica* IFM 10152, eine 54 %ige Ähnlichkeit zu der NRPS aus *Rhodococcus* sp. RHA1 und eine 44 %ige Ähnlichkeit zu der NRPS *MbtE* aus *N. farcinica* IFM 10152 (NC_006361) aufwiesen. Das PKS-Genfragment zeigte eine 35 %ige Ähnlichkeit zu der putativen PKS von *Burkholderia thailandensis* MSMB43. Es konnte kein Phenazingenfragment amplifiziert werden.

Tabelle 22: Antibakterielle Aktivitäten der Brasilibactine A - D (7-10) gegen verschiedene mikrobielle Teststämme.

Teststamm	IC ₅₀ (µM)				IC ₅₀ (µM) der Referenzsubstanz
	A (7)	B (8)	C (9)	D (10)	
<i>Bacillus subtilis</i> (DSM 347) Referenzsubstanz: Chloramphenicol	0	0	87	0	9,0
<i>Candida glabrata</i> (DSM 6425)	0	0	0	0	n.b. ^a
<i>Erwinia amylovora</i> (DSM 50901)	0	0	0	0	n.b. ^a
<i>Escherichia coli</i> (DSM 498)	0	0	0	0	n.b. ^a
<i>Propionibacterium acnes</i> (DSM 1897) Referenzsubstanz: Chloramphenicol	0	0	0	0	1,0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (DSM 50071) Referenzsubstanz: Chloramphenicol	0	0	0	0	27,3
<i>Pseudomonas fluorescens</i> (NCIMB 10586)	0	0	0	0	n.b. ^a
<i>Pseudomonas syringae</i> pvar. <i>aptata</i> (DSM 50252)	0	0	0	0	n.b. ^a
<i>Ralstonia solanacearum</i> (DSM 9544)	0	n.b. ^a	87	61	n.b. ^a
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (DSM 20044)	0	0	0	0	n.b. ^a
<i>Staphylococcus lentus</i> (DSM 6672) Referenzsubstanz: Chloramphenicol	0	0	39	0	2,3
<i>Xanthomonas campestris</i> (DSM 2405) Referenzsubstanz: Chloramphenicol	0	0	0	0	3,6

^a Nicht bestimmt.

Tabelle 23: Zytotoxische Aktivität der Brasilibactine A - D (7-10) gegen acht humane Krebszelllinien und eine Fibroblastenzelllinie.

Krebszelllinie	IC ₅₀ (µM) ^c				IC ₅₀ (µM) der Referenzsubstanz
	A (7)	B (8)	C (9)	D (10)	
HepG2 (Leberkarzinomzelllinie) Referenzsubstanz: Tamoxifen	15,9	49,6	25,4	n.b. ^a	23,4
HT-29 (Kolonkarzinomzelllinie) Referenzsubstanz: Tamoxifen	18,3	31,4	26,6	n.b. ^a	38,6
NIH-3T3 (Maus-Fibroblasten)	14,75	37,5	22,3	n.b. ^a	n.b. ^a
GXF 251L (Magenkarzinomzelllinie) Referenzsubstanz: Adriamycin	0,529 µg/mL	n.a. ^b	2,43 µg/mL	n.b. ^a	<0,052
LXF529L (Bronchialkarzinomzelllinie) Referenzsubstanz: Adriamycin	0,399 µg/mL	n.a. ^b	1,71 µg/mL	n.b. ^a	<0,052
MAXF401NL (Brustkrebszelllinie) Referenzsubstanz: Adriamycin	0,253 µg/mL	n.a. ^b	1,26 µg/mL	n.b. ^a	<0,052
MEXF462NL (Melanomzelllinie) Referenzsubstanz: Adriamycin	0,379 µg/mL	n.a. ^b	1,44 µg/mL	n.b. ^a	<0,052
PAXF1657L (Pankreastumorzelllinie) Referenzsubstanz: Adriamycin	0,224 µg/mL	n.a. ^b	1,49 µg/mL	n.b. ^a	<0,052
RXF486L (Nierenkrebszelllinie) Referenzsubstanz: Adriamycin	0,772 µg/mL	n.a. ^b	3,27 µg/mL	n.b. ^a	<0,052

^a Nicht bestimmt.

^b Nicht aktiv.

^c Wenn nicht anders angegeben.

6.4 DISKUSSION

Die Gattung *Mycobacterium* zeichnet sich durch seinen dicken, lipidhaltigen Zellwandaufbau aus. Um auch bei vorherrschenden Mangelbedingungen Eisenionen über die Zellwand aufzunehmen, produzieren diese Bakterien sogenannte Siderophore, die ihnen einen Vorteil gegenüber den konkurrierenden Mikroorganismen verschaffen [Quadri et al. 1998]. Wie später bekannt wurde, zeichnet sich auch die Gattung *Nocardia* durch diese Eigenschaften aus [Ishikawa et al. 2004]. Daher war es nicht verwunderlich, dass *N. jejuensis* mehrere Mycobactine in Form der Brasilibactine produzierte.

Bei der Gattung *Mycobacterium* sind im Allgemeinen viele Aspekte bezüglich der Mycobactine wie Biosynthese, Enzymologie, Genetik, Eisentransport und Virulenz bereits gut untersucht. Bei der Gattung *Nocardia* sollte dieses Bild trotz vieler Parallelen zu den Mycobakterien noch vollständiger werden. Grundsätzlich sind die Vertreter der Gattung *Nocardia* Umweltbakterien, können aber häufig zu opportunistischen Krankheitserregern werden [Darai et al. 2009]. Besonders betroffen sind Patienten mit einer schwerwiegenden Grunderkrankung oder einer Immunschwäche. Meistens verursachen die Zellwandbestandteile Mykolsäure und verschiedene Adhäsine das Krankheitsbild der Nocardiose, bei der es zu Entzündungen, Abszessen und Granulomen an der Lunge, am Zentralnervensystem, am Gehirn oder an der Haut kommt [Darai et al. 2009].

Eventuelle Unterschiede oder Gemeinsamkeiten mit der Gattung *Mycobacterium* könnten anhand weiterer Studien erkannt und *Nocardia* Infektionen eventuell mit den gleichen Mitteln wie *Mycobacterium* Infektionen bekämpft werden; dieses ist für das Reserveantibiotikum Amikacin bereits der Fall. Eine intensive Untersuchung von mycobakteriellen und mycobakteriell-ähnlichen Siderophoren könnte ebenfalls helfen, einen Ansatzpunkt für die therapeutische Behandlung zu finden. Mikrobielle Infektionen mit diesen Erregern werden durch das Konkurrieren des Wirtes mit den Bakterien um Eisenionen hervorgerufen [Bullen & Griffiths 1987]. So könnte die Störung der Eisenaufnahme eine lethale Wirkung für die Bakterien haben und stellt damit eine Möglichkeit zur Therapie dar [Vergne et al. 2000]. Durch die Hemmung des Eisentransportes könnte auch die Schwierigkeit umgangen werden, dass die Zellwand dieser Bakterien eine große Barriere bei der Behandlung durch Antibiotika darstellt, da diese aus einem polymerischen Komplex aus Peptidoglykan aufgebaut ist, welcher kovalent an Arabinogalactane bindet und mit einem dicht gepackten Mykolsäurebereich abschließt [Vergne et al. 2000].

Die genetischen Untersuchungen und die strukturelle Verwandtschaft der Brasilibactine zu den Mycobactinen aus *Mycobacterium tuberculosis* gaben einen ersten Hinweis auf die Biosynthese der Brasilibactine, welche aller Wahrscheinlichkeit nach wie alle anderen Mycobactine über einen NRPS/PKS-Hybrid Biosyntheseweg produziert werden. Diese These wurde zusätzlich durch das positive Ergebnis der NRPS-PCR unterstützt. Unter anderem konnte eine Ähnlichkeit zu der NRPS *mbtE* aus *N. farcinica* festgestellt werden, welche Teil des Mycobactinbiosyntheseclusters ist. Auch das Genom von *M. tuberculosis* enthält ein Gencluster

bestehend aus zehn Genen, *mbtA-J*, welche für die Grundstruktur der Mycobactinbiosynthese verantwortlich sind. 2004 konnten [Ishikawa et al. 2004] beweisen, dass die Organisation der Mycobactingene in Actinomyceten grundsätzlich konserviert ist. So zeigte auch das putative Siderophorgencluster aus *Nocardia farcinica* IFM 10152 eine große Analogie zu dem *mbt* Gencluster (Abb 48). Um eine spezifischere Aussage über das gesamte Brasilibactin-Gencluster machen zu können, müssten weitere genetische Experimente wie beispielsweise die Erstellung einer Cosmidbank mit *N. jejuensis* durchgeführt werden.

Interessanterweise konnte festgestellt werden, dass eine *Mycobacterium* Art durch die Mycobactine einer zweiten Art gehemmt wurde [Snow 1970]. Allerdings sind weitere Untersuchungen nötig, um die inhibierende Wirkung zu erklären, welche auf einer Mycobactingrundstruktur basierte, und so den Mechanismus genauer zu verstehen.

Des Weiteren gibt es erste Untersuchungen zur Eisenaufnahme und der sich daraus ergebenden Hemmung bzw. Anregung bei dem Tumorwachstum [Trowbridge & Omary 1981; Kameyama et al. 1987]. Eine zytotoxische Aktivität für verschiedene Tumorzelllinien wurde auch für die Brasilibactine nachgewiesen. Dabei fiel auf, dass Brasilibactin A (**7**) eine höhere Wirksamkeit gegenüber den HepG2-, den HAT-29- und den NIH-3T3-Zelllinien zeigte als die anderen Brasilibactine. Bei den antibakteriellen Tests hingegen zeigte vor allem Brasilibactin C (**10**) Wirkungen. Da außer der Kettenlänge kein Unterschied zwischen den einzelnen Derivaten besteht, ist anzunehmen, dass diese einen Einfluss auf die biologische Aktivität hat.

Insgesamt scheinen Siderophore und damit die Mycobactine eine Vielzahl nützlicher biologischer Aktivitäten aufzuweisen, welche entweder Prozesse, an denen Eisenionen beteiligt sind, hemmen oder fördern können [Vergne et al. 2000]. Somit stellen diese Strukturen einen vielversprechenden Ansatzpunkt für mögliche therapeutische Maßnahmen dar. Außerdem könnten nähere Untersuchungen weitere Einblicke in die biologische Rolle von Eisenionen in der Natur geben.

6.5 ZUSAMMENFASSUNG

Typstamm *Nocardia jejuensis* DSM 44959^T produzierte neben den bekannten Sekundärmetaboliten Brasilibactin A (**7**) und B (**8**) die Alkaloide Indol-3-carbaldehyd und *N*-Acetyltryptophan. Außerdem wurden zwei neue Brasilibactin Derivate, Brasilibactin C (**9**) und D (**10**), im Kulturextrakt identifiziert. Die Struktur von Brasilibactin C (**9**) wurde mithilfe von ein- und zweidimensionalen NMR-Experimenten aufgeklärt. Der Strukturvorschlag wurde durch die Analyse der HPLC-MS, HRESIMS und UV-Daten unterstützt. Für Brasilibactin C (**9**) konnten antibakterielle Aktivitäten sowohl gegen Gram-negative als auch gegen Gram-positive Bakterien nachgewiesen werden. Zusätzlich zeigte Brasilibactin C (**9**) zytotoxische Aktivitäten gegen verschiedene Zelllinien.

7 ALLGEMEINE DISKUSSION

Schon früh spielten Naturstoffe eine bedeutende Rolle in der Heilkunde. Lange Zeit standen maßgeblich die Inhaltsstoffe verschiedener Pflanzen im Zentrum des Interesses. Seit der Entdeckung des Penicillins gewannen im Laufe des letzten Jahrhunderts auch mikrobielle Sekundärmetabolite immer mehr an Bedeutung. Es stellte sich heraus, dass für eine pharmazeutische Anwendung Naturstoffe häufig viel geeigneter sind als synthetisch hergestellte Substanzen ^[Proksch 2004]. In den Jahren 1981 bis 2006 betrug der Anteil reiner Synthetika an den Neuzulassungen der US-Arzneimittelbehörde (United States Food and Drug Administration, FDA) nur etwa 30 % ^[Newman & Cragg 2007]. Der große Erfolg der Naturstoffe erklärt sich durch die Millionen Jahre der Evolution, welche diese Substanzen derart geformt hat, dass sie zu einem bestimmten Ziel in einer Zelle passen und dadurch häufiger eine Wirkung zeigen als Synthetika ^[Proksch 2004]. Die Natur bleibt also eine gute Quelle für neue Strukturen und Wirkmechanismen.

Um insbesondere neue, pharmazeutisch interessante Naturstoffe zu entdecken, müssen sinnvolle Suchstrategien angewandt werden, damit es nicht unnötig zu Mehrfachisolierungen bereits bekannter Substanzen kommt. Besonders in gut untersuchten Gruppen wie den Actinomyceten und insbesondere in der Gattung *Streptomyces* nimmt die Isolierung bereits bekannter Substanzen immer mehr zu ^[Kelecom 2002; Fenical & Jensen 2006] und es kommt zu immer weniger Neuentdeckungen ^[Busti et al. 2006]. Eine effektive Art, bereits bekannte Substanzen zu identifizieren, ist die Anwendung eines gekoppelten Verfahrens aus HPLC-UV/MS, falls möglich unter Zuhilfenahme von NMR-Experimenten. Die so gewonnenen Daten können mit bekannten Naturstoffen in Datenbanken verglichen werden, um die Isolierung bekannter Substanzen in einem gewissen Maße zu verhindern. Der Umfang und die Aktualität der Datenbanken ist dabei ein nicht zu unterschätzender Faktor. Mittlerweile umfassen solche Datenbanken, wie zum Beispiel AntiBase oder das Dictionary of Natural Products, auch spezifisch mikrobielle Naturstoffe.

In der vorliegenden Arbeit wurden zusätzlich zu der chemischen Untersuchung bestimmte biologische Aktivitäten und das Vorhandensein von Biosynthesegenfragmenten der Typ II PKS, der NRPS sowie Teile des Phenazinbiosynthesystems als Kriterium zur Bewertung mikrobieller Naturstoffproduzenten herangezogen. Bezüglich der genetischen Methode kann es bei einer solch „schnellen“ Vorauswahl mittels PCR zu Fehlinterpretationen kommen, da sich gerade die degenerierten Primer unspezifisch anlagern können. Durch die Länge der PCR-Produkte bzw. vor allem durch eine anschließende Sequenzierung können falschpositive Ergebnisse erkannt und ausgeschlossen werden. Dennoch sagt ein positives PCR-Ergebnis noch nichts Näheres über die Substanz an sich bzw. ihre Produktionsbedingungen aus. Es ist nicht bekannt, ob das entsprechende Gencluster aktiv bzw. intakt ist. Aber mithilfe dieser genetischen Methode können, wie in dieser Arbeit gezeigt, Stämme ausgewählt werden, deren biosynthetisches Potential höher ist als das solcher Stämme ohne genetisch positives Ergebnis. Gerade die Suche nach PKS-

oder NRPS-Genen ist ein erfolgversprechender Ansatzpunkt für eine genetische Vorauswahl, da sich bedingt durch deren Aufbau und die daraus resultierende biosynthetische Kapazität eine enorme strukturelle Vielfalt entdecken lässt, welche wiederum unweigerlich zu Substanzen mit besonders interessanter biologischer Aktivität führt.

Die Genetik ermöglicht außerdem im Vorfeld eine phylogenetische Zuordnung der Produzentenstämme. Ein Kriterium für die Auswahl der Stämme aus einer Sammlung war demnach die Zugehörigkeit zu einer Gattung, welche bereits für die Produktion interessanter Naturstoffe bekannt war. Um aber dennoch mit einer größeren Wahrscheinlichkeit neue Naturstoffe zu entdecken, wurden Stämme angezogen, welche größtenteils aus einem Habitat stammten, welches erst in letzter Zeit in den Mittelpunkt des Interesses gerückt ist: das Meer. Es konnte mittlerweile festgestellt werden, dass marine mikrobielle Vertreter strukturell neue Substanzen mit spannenden biologischen Aktivitäten hervorbringen ^[Fiedler et al. 2005]. Da gerade Mikroorganismen, welche in Assoziation mit einem marinen Invertebraten leben, besonders vielversprechende Produzentenstämme sind ^[Hentschel & Bringmann 2010; Pimentel-Elardo et al. 2010], wurden vor allem solche Bakterien untersucht, die aus der Assoziation mit dem marinen Schwamm *Halichondria panicea* isoliert wurden. Auf marinen Invertebraten liegt meistens eine höhere Besiedlungsdichte und eine andere mikrobielle Zusammensetzung als in der umgebenden Wassersäule vor. Kommunikation in Form kleiner Moleküle und chemische Abwehrstrategien sind hier üblich. So war anzunehmen, dass besonders hier eine reichhaltige Auswahl an Sekundärmetaboliten produziert würde.

Die in dieser Arbeit untersuchten actinobakteriellen Gattungen geben nicht das ganze in Schwämmen gefundene actinobakterielle Repertoire wieder. Außerdem ist aus Vorarbeiten bereits bekannt, dass *Actinobacteria* etwa 18 % der kultivierten Bakterien in dem Schwamm *H. panicea* ausmachen können. Hierbei konnten unter anderem die Gattungen *Micrococcus*, *Rhodococcus*, *Streptomyces* und *Micromonospora* identifiziert werden. Allerdings wurden bis jetzt nicht alle von *Halichondria panicea* isolierten Actinomyceten genauer untersucht. Somit bietet sich für die Zukunft an, zusätzlich zur näheren Untersuchung der 46 bereits analysierten Stämme, noch weitere Vertreter und deren biosynthetisches Potential zu untersuchen. Auch die Actinomyceten aus der Assoziation mit dem Zuckertang *Laminaria saccharina* (mittlerweile als *Saccharina latissima* bezeichnet) sollten in Zukunft einer genaueren biosynthetischen Betrachtung unterzogen werden, da es auch hier, im Rahmen der Phenazinbiosynthese-Experimente, erste Hinweise auf neue Naturstoffe gab. Daraus ergab sich insgesamt, dass, wie bereits angesprochen, mit marinen Makroorganismen assoziierte Bakterien eine reichhaltige Quelle für neuartige Sekundärmetabolite darstellen, wie am Beispiel des Mayamycins und der Nocapyrone gezeigt werden konnte.

Nicht nur die Untersuchung der strukturellen Diversität und eine phylogenetische Einordnung ist im Interesse der Wissenschaft, insbesondere das Auffinden einer biologischen Aktivität spielt eine zentrale Rolle, um so eine Substanz zu erhalten, die es potentiell zu einer Anwendung auf dem Markt schaffen kann. Nicht immer kann die Wirkung auch experimentell sofort gezeigt

werden, wie im Falle der Nocapyrone. Um eine interessante Wirkung zu entdecken, müsste hier eventuell ein größerer Aufwand betrieben werden, indem die untersuchten Targets noch breiter gefächert werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die isolierten Substanzen bzw. die Extrakte auf ihre antibakterielle Aktivität, ihre Wirkung gegen bestimmte Krebszelllinien und auf Hemmung von Enzymaktivitäten getestet. Es würde sich, im Besonderen bei nicht toxischen Substanzen, anbieten, Möglichkeiten der Anwendung im Bereich der Kosmetik oder der Nahrungsergänzungsmittel zu erproben.

Wie sich herausstellte, war diese Kombination mehrerer experimenteller Ansätze erfolgreich. Dadurch konnten im Rahmen dieser Arbeit einige neue Substanzen isoliert, identifiziert und analysiert werden. Zusätzlich wurde mit den über 90 bis jetzt unidentifizierten Metaboliten der Grundstein für weitere, vielversprechende Untersuchungen gelegt und eine gute Vorauswahl biologisch aktiver Stämme getroffen. Insgesamt stellte sich heraus, dass Actinomyceten aus dem marinen Schwamm *Halichondria panicea*, aber auch die während der Phenazinuntersuchung betrachteten Actinomyceten aus der marinen Alge *Saccharina latissima* äußerst vielversprechende Produzenten von pharmazeutisch und ökologisch interessanten Naturstoffen sind. Die bis jetzt als unbekannt eingestufteten Sekundärmetabolite bieten ein enormes Potential, weitere neue Substanzen zu isolieren. Dieses Potential der bisher nur recht oberflächlich untersuchten anderen 43 Actinomyceten-Stämme scheint besonders groß zu sein und auch bei den drei bereits besser charakterisierten Stämmen *Streptomyces* sp. HB202, *Micromonospora* sp. HB254 und *Nocardioopsis* sp. HB383 ist das Spektrum der Sekundärmetabolitproduktion noch nicht vollständig ausgeschöpft.

Für die Gattung *Streptomyces* wird geschätzt, dass sie in der Lage sein soll, mindestens 100.000 antimikrobiell aktive Substanzen hervorzubringen ^[Matve et al. 2001]. Es lohnt sich also immer noch, wie auch in dieser Arbeit gezeigt, gut untersuchte Gattungen wie *Streptomyces* noch näher zu untersuchen. Je mehr chemische und genetische Informationen über die untersuchte Gruppe vorliegen, desto besser können diese für die experimentelle Herangehensweise genutzt werden. Für Screeningansätze ist daher zu empfehlen, eine Kombination von gut und weniger gut untersuchten Gattungen zu verwenden. Denn es scheint nicht nur möglich, aus taxonomisch neuen Stämmen unbekannte Sekundärmetabolite zu isolieren, sondern es ist anzunehmen, dass neue Arten mit großer Wahrscheinlichkeit einzigartige Strukturen hervorbringen. Evolutionär gesehen kann die Herausbildung neuer Strukturen eine treibende Kraft bei der Spezialisierung hin zu einer Art sein ^[Bull & Stach 2007]. So kann nach einer gezielten Vorauswahl die Fokussierung auf wenige ausgewählte Stämme stattfinden, um diese anschließend beispielsweise mittels Stimulations- bzw. Kultivierungsversuchen noch näher zu charakterisieren. Dieses konnte auch in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden. So ließ sich der *Streptomyces* sp. HB202 durch erneute Variation der Kulturbedingungen zur Produktion des aromatischen Polyketides Mayamycin anregen. Alle drei näher untersuchten Actinomyceten produzierten eine ganze Reihe unterschiedlicher Sekundärmetabolite in den jeweiligen Stimulations- bzw. Kultivierungsansätzen.

So erfordert eine erfolgreiche Substanzsuche neben einer geeigneten Vorauswahl der Stämme und entsprechenden Kultivierungs- und Extraktionsmethoden vor allem die Erfahrung des Experimentators, um mit den Methoden der Naturstoffchemie möglichst die Doppelisolierung von Substanzen zu vermeiden. Allerdings kommt es immer wieder vor, dass die zunächst für neu gehaltenen Metabolite sich im Laufe der Zeit als bekannt herausstellen bzw. neue Substanzen möglicherweise übersehen werden.

Besonders schwierig wird dann der Schritt von den ersten Untersuchungen einer neuen Substanz zu Analysen, die zeigen, ob ein Naturstoff für eine Anwendung, sei es pharmazeutisch, kosmetisch oder im Lebensmittelbereich, geeignet ist. Dieser Prozess ist in der Regel langwierig und enorm kostenintensiv.

In der Naturstoffforschung spielt neben dem pharmazeutischen auch der ökologische Aspekt eine wichtige Rolle und in diesem Falle die Betrachtung des gesamten Systems Makroorganismus-Mikroorganismus. Unabhängig davon, ob Actinomyceten in Assoziation mit einem Schwamm oder einer Alge leben, kommen sie insgesamt im Meer in großer Anzahl vor [Webster & Hill 2001; Webster et al. 2001; Hentschel et al. 2002; Fiedler et al. 2005; Jensen et al. 2005]. Gerade bei einer Vergesellschaftung von Mikroorganismen mit einem in diesem Fall marinen Makroorganismus stellt sich die Frage, ob es sich dabei um eine echte Symbiose handelt. Die Symbiose wird definiert als ein regelmäßiges Zusammenleben von Organismen verschiedener Arten zu wechselseitigem Nutzen [Wehner & Gehring 2007]. Besser eignet sich hier der Begriff Mutualismus. Hierbei handelt es sich um eine Wechselbeziehung zwischen Organismen zweier Arten aus der beide einen Nutzen ziehen. Da die identifizierten Arten in dieser Arbeit bereits von Schwämmen bekannt sind, ist die Wahrscheinlichkeit groß, dass eine gewisse Art von Assoziation bestand, gleichwohl ist es möglich, dass die isolierten Actinomyceten aus dem umliegenden Meerwasser oder aus dem Sediment stammten. Dennoch scheinen gerade die Actinomyceten aufgrund der reichhaltigen Sekundärmetabolitproduktion eine Bedeutung innerhalb dieser Assoziation zu haben. Ein zusätzliches Argument für diese These lieferte die Beobachtung, dass *Actinobacteria* im Mesohyl des Schwammes *H. panicea* vermehrt zu finden waren [Grabowski 2002]. Auch dieses deutete auf eine spezifische Gemeinschaft mit dem Schwamm hin. Diese Ergebnisse passen ebenfalls zu der Arbeit von [Webster et al. 2001], welche zeigte, dass *Actinobacteria* einen hohen Anteil der Bakterienpopulation in Schwämmen darstellen. Die Frage, ob es sich um echte Symbionten handelt, bleibt aber weiter offen. Es gibt Vermutungen, dass die Mehrzahl der mit einem Schwamm assoziierten Bakterien lediglich als Nahrungsquelle dient und nur wenige Vertreter der bakteriellen Gemeinschaft eine andere Funktion im Schwamm erfüllen [Würtz 1999]. Gerade die Naturstoffproduktion scheint eine solche andere Funktion zu sein, da beide Partner einen Vorteil erlangen, indem Schwamm und Mikroorganismen-Gemeinschaft sich so gegen Feinde von außen verteidigen können. Der Schwamm bietet wiederum ein geschütztes Habitat für die Mikroorganismen. Eventuell werden auch Nährstoffe oder Vorstufen für die Biosynthese von Naturstoffen ausgetauscht. Sekundärmetabolite sind nicht essentiell für das Wachstum und der Biosyntheseweg wird nur in bestimmten Wachstumszeiträumen oder unter Stress, beispielsweise

durch Nährstoffmangel, hervorgerufen ^[Mann 1987]. Meist wird der Sekundärmetabolismus in der späten exponentiellen Phase oder zu Beginn der stationären Phase, nach der Zellteilung oder beim Anstieg der Biomasse aktiviert ^[Yarborough et al. 1993]. Insbesondere marine Naturstoffe sind pharmazeutisch interessant, da viele dieser Verbindungen sich durch eine hohe Wirksamkeit auszeichnen. Begründet wird dieses durch das Entgegenwirken gegen die Verdünnung durch das Meerwasser ^[Haefner 2003; Penesyan et al. 2010]. Bis heute ist allerdings die ökologische Rolle dieser Naturstoffe noch recht unklar und viel ist über ihre biologische Funktion nicht bekannt, aber im Grunde ist es unvorstellbar, dass sie keine ökologische Rolle haben ^[Bibb 2005]. Naturstoffe können als Signal zur Kommunikation dienen und bringen somit dem Produzenten einen Überlebensvorteil, indem diese als Antibiotika bekannten Sekundärmetabolite in subinhibitorischen Konzentrationen Einfluss auf die Biofilmbildung, den Gentransfer, die Zellmorphologie, die Mutationsfrequenz, das Quorum Sensing oder die Sekretion von Exoproteinen, Virulenzfaktoren und Toxinen haben ^[Yim et al. 2007]. Marine Naturstoffe können aber auch in entsprechender Konzentration als Antibiotika dienen, also traditionsgemäß als Substanzen, welche von Mikroorganismen produziert werden und andere Mikroorganismen im Wachstum hemmen oder töten ^[Madigan et al. 2000]. Somit kann die eigentliche mikrobielle Lebensgemeinschaft in einem Makroorganismus sich und den Wirt gegen Konkurrenz aus der Umgebung verteidigen. Die im Labor detektierte biologische Aktivität reflektiert mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht die primäre bzw. einzige Funktion einer Substanz in der natürlichen Umgebung des Actinomyceten. Sie kann aber eine spezielle pharmazeutische Wirkung zeigen, welche wiederum ein erster Ansatzpunkt zur Entwicklung eines neuen Wirkstoffes sein kann, um so beispielsweise bei der Bekämpfung multiresistenter Erreger zur Verfügung zu stehen.

1973 stellt Leigh Van Valen die sogenannte Red-Queen-Hypothese auf ^[Van Valen 1974]. Dieses Prinzip beschreibt das Wettrüsten konkurrierender Organismen und bezieht sich auf eine Erklärung, welche die Rote Königin der neugierigen Alice gibt: „Hierzulande musst du so schnell rennen wie du kannst, wenn du am gleichen Fleck bleiben willst“. Dieses muss auch für die Naturstoffforschung gelten, um bei der Bekämpfung der vorherrschenden und neu auftretenden Infektionskrankheiten unserer Zeit eine Chance zu haben.

8 EXPERIMENTELLER TEIL

8.1 NÄHRMEDIEN UND PUFFER

Für alle Nährmedien wurde demineralisiertes Wasser verwendet und der pH-Wert wurde vor dem Autoklaviervorgang (feuchte Hitze, 121°C, 1 bar Überdruck, 30 min) mit 0,5 N NaOH bzw. 0,5 N HCL eingestellt. Für Agarplatten wurden 15 g/L Agar hinzugegeben.

GYM (1 L)

4 g	Hefeextrakt
10 g	Malzextrakt
4 g	Glucose
2 g	CaCO ₃ (nur zum Flüssigmedium hinzufügen)
pH	7,2

GYM4 (1 L)

4 g	Hefeextrakt
4 g	Malzextrakt
4 g	Glucose
2 g	CaCO ₃
pH	7,2

GYM4CaCl₂ (1 L)

4 g	Hefeextrakt
4 g	Malzextrakt
4 g	Glucose
2 g	CaCl ₂
pH	7,2

LB Medium (1 L)

10 g	Trypton
5 g	Hefeextrakt
10 g	NaCl
50 mg	Kanamycin
pH	7,0

Marine Broth (MB) (1 L) Fertigmedium

1 g	Hefeextrakt
5 g	Bacto Pepton
19,45 g	NaCl
0,16g	NaHCO ₃
4 mg	Natriumsilikat
2,4 mg	Natriumfluorid
1,8 g	CaCl ₂
0,55 g	KCl
0,08 g	KBr
3,24 g	MgSO ₄
5,9 g	MgCl ₂
0,1 g	FeCitrat
1,6 mg	NH ₄ NO ₃
8,0 mg	Na ₂ HPO ₄
34,0 mg	SrCl ₂
22,0 mg	HBO ₃
pH	7,0 – 7,2

Natriumformiat-Puffer

5 mM	NaOH
0,2 %	Formiat
50 %	Isopropanol

PBS-Puffer (1 L)

8 g	NaCl
0,2 g	KCl
1,44g	Na ₂ HPO ₄
0,24 g	KH ₂ PO ₄
pH	7,4

PYG-Medium (1 L)

2,0 g	K ₂ HPO ₄
20,0 g	Glucose
5,0 g	Hefeextrakt
5,0 g	Pepton
pH	7,4

TBE (Tris Borat EDTA) Puffer

100 mM	Tris
80 mM	Borsäure (pH 8,0)
1 mM	EDTA

Tryptone Soya Broth (TSB) (1 L)

0,3 g	Sojamehl
1,7 g	Caseinpepton
0,25 g	Glucose
10 g	NaCl
0,25 g	K ₂ HPO ₄
pH	7,1

Auftragspuffer für die Gelelektrophorese

50 %	Saccharose
20 %	Glycerin
50 mM	EDTA
0,1 %	Bromphenolblau

In TBE-Puffer lösen.

8.2 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN

Tabelle 24: Verwendete Primer.

Primer	Sequenz	Funktion	Referenz
27f	5'-GAG TTT GAT CCT GGC TCA G-3'	16s rRNA PCR	[Weisburg et al. 1991]
1492r	5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3'	16s rRNA PCR	[Weisburg et al. 1991]
534r	5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG-3'	Sequenzierung	[Muyzer et al. 1993]
342f	5'-TAC GGG AGG CAG CAG-3'	Sequenzierung	[Muyzer et al. 1993]
790f	5'-GAT ACC CTG GTA GTC C-3'	Sequenzierung	[Thiel et al. 2007]
A2f	5'-AAG GCN GGC GSB GCS TAY STG CC-3'	NRPS PCR/Sequenzierung	[Doekel & Marahiel 2001]
A3r	5'-TTG GGB IKB CCG GTS GIN CCS GAG GTG-3'	NRPS PCR/Sequenzierung	[Doekel & Marahiel 2001]
KSaf	5'-TSG CST GCT TCG AYG CSA TC-3'	PKS II PCR/Sequenzierung	[Metsä-Ketelä et al. 1999]
KSar	5'-TGG AAN CCG CCG AAB CCG CT-3'	PKS II PCR/Sequenzierung	[Metsä-Ketelä et al. 1999]
<i>ephzEf</i>	5'-GAA GGC GCC AAC TTC GTY ATC AA-3'	PCR/Sequenzierung	
<i>ephzEr</i>	5'-GCC YTC GAT GAA GTA CTC GGT GTG-3'	PCR/Sequenzierung	
M13 forward	5'-GGT GAC GCC YTC GAT GAA GTA CTC GGT GTG-3'	Klonierung/Sequenzierung	[Yanisch-Perron et al. 1985]
M13 reverse	5'-GGT GAC GCC YTC GAT GAA GTA CTC GGT GTG-3'	Klonierung/Sequenzierung	[Yanisch-Perron et al. 1985]

Tabelle 25: Verwendete PCR-Reaktionsansätze zur Amplifikation.

	H ₂ O	Puffer	dNTPs	Primer 1	Primer 2	Template	Bead/ <i>Taq</i>	Funktion
Konzentration Einzelprobe μ L	22,0			27f 10 pmol/ μ L 1,0	1492r 10 pmol/ μ L 1,0	1,0	1 (B)	16S rRNA
Konzentration Einzelprobe μ L	15,5	2,5	10 pmol/ μ L 1,0	A2f 10 pmol/ μ L 1,0	A3r 10 pmol/ μ L 1,0	3,0	5 U 1,0 (T)	NRPS
Konzentration Einzelprobe μ L	13,5	2,5	10 pmol/ μ L 1,0	KSaf 10 pmol/ μ L 1,0	KSar 10 pmol/ μ L 1,0	5,0	5 U 1,0 (T)	PKS II
Konzentration Einzelprobe μ L	12,5	2,5	10 pmol/ μ L 1,0	<i>ephzEf</i> 10 pmol/ μ L 2,0	<i>ephzEr</i> 10 pmol/ μ L 2,0	4,0	0,5 U 1,0 (T)	Phenazine
Konzentration Einzelprobe μ L	17,5	2,5	10 pmol/ μ L 1,0	M13 forward 10 pmol/ μ L 1,0	M13 reverse 10 pmol/ μ L 1,0	1,0	0,5 U 1,0 (T)	Klonierung

Tabelle 26: Verwendete PCR-Protokolle zur Amplifikation.

PCR-Schritt	Initiale Denaturierung	Denaturierung	Annealing	Elongation	Terminale Elongation	Endtemp.	Funktion
Zeit [min]	2,0	0,5	0,5	0,5	1,0/5,0	∞	16S rRNA
Temp. [°C]	92,0	92,0	55,0	72,0	42,0/72,0	10,0	
Anzahl der Zyklen			30				
Zeit [min]	2,0	1,0	1,0	2,0	7,0	∞	NRPS
Temp. [°C]	95,0	95,0	68,0	70,0	70,0	10,0	
Anzahl der Zyklen			40				
Zeit [min]	2,0	1,0	1,0	1,5	8,5	∞	PKS II
Temp. [°C]	96,0	96,0	62,2	73,0	73,0	10,0	
Anzahl der Zyklen			30				
Zeit [min]	2,0	1,0	1,0	2,0	7,0	∞	Phenazine
Temp. [°C]	94,0	94,0	54,7	72,0	72,0	10,0	
Anzahl der Zyklen			35				
Zeit [min]	2,0	1,0	1,0	1,0	7,0	∞	Klonierung
Temp. [°C]	94,0	94,0	55,0	72,0	72,0	10,0	
Anzahl der Zyklen			35				

8.3 CHEMISCHE METHODEN UND INSTRUMENTELLE ANALYTIK

Für die HPLC wurden ausschließlich analysenreines Acetonitril und bidestilliertes Wasser verwendet.

Tabelle 27: Verwendete HPLC-Bedingungen.

Versuch	Gerät ^a	Säule	Lösungsmittel	Gradient	Fluss
Actino Kulturen	analytisch	Phenomenex Onyx Monolithic C ₁₈ , 100 x 3,00 mm	H ₂ O (A)/MeCN (B) (0,1 % HCOOH)	0 min 5 % B, 4 min 60 % B, 6 min 100 % B, 6,8 min 100 % B	2 mL/min
DSM 44959	analytisch	Phenomenex Onyx Monolithic C ₁₈ , 100 x 3,00 mm	H ₂ O (A)/MeCN (B) (0,1 % HCOOH)	0 min 5 % B, 4 min 60 % B, 6 min 100 % B, 6,8 min 100 % B	2 mL/min
7-10	Prep 1	Phenomenex Gemini-NX C ₁₈ 5 µm 110A, Axia packed; dimension 100 by 21.20 mm	H ₂ O (A)/MeCN (B) (0,1 % HCOOH)	0 min 80 % B, 16 min 100 % B, 18 min 100 % B	15 mL/min
HB100	Prep1	Phenomenex Gemini-NX C ₁₈ 5 µm 110A, Axia packed; dimension 100 by 21.20 mm	H ₂ O (A)/MeCN (B) (0,1 % HCOOH)	0 min 40 % B, 10 min 40 % B, 10,5 min 100 % B, 12 min 100 % B	15 mL/min
HB117	Prep2	Phenomenex Gemini 10u C ₁₈ , 100A, Axia, 100 x 50.00 mm	H ₂ O (A)/MeCN (B) (0,1 % HCOOH)	0 min 10 % B, 17 min 60 % B, 22 min 100 % B, 25 min 100 % B	100 mL/min
HB157	Prep2	Phenomenex Gemini 10u C ₁₈ , 100A, Axia, 100 x 50.00 mm	H ₂ O (A)/MeCN (B) (0,1 % HCOOH)	0 min 10 % B, 17 min 60 % B, 22 min 100 % B, 25 min 100 % B	100 mL/min
1	Prep 2	Phenomenex Gemini 10u C ₁₈ , 100A, Axia, 100 x 50.00 mm	H ₂ O (A)/MeCN (B) (0,1 % HCOOH)	0 min 10 % B, 17 min 60 % B, 22 min 100 % B	100 mL/min
HB254	Prep 1	Phenomenex Gemini-NX C ₁₈ 5 µm 110A, Axia packed; dimension 100 by 21.20 mm	H ₂ O (A)/MeCN (B) (0,1 % HCOOH)	0 min 35 % B, 12 min 100 % B, 14 min 100 % B	15 mL/min
HB298	Prep2	Phenomenex Gemini 10u C ₁₈ , 100A, Axia, 100 x 50.00 mm	H ₂ O (A)/MeCN (B) (0,1 % HCOOH)	0 min 10 % B, 17 min 60 % B, 22 min 100 % B, 25 min 100 % B	100 mL/min
2 & 3	Prep 1	Phenomenex Gemini-NX C ₁₈ 5 µm 110A, Axia packed; dimension 100 by 21.20 mm	H ₂ O (A)/MeCN (B) (0,1 % HCOOH)	0 min 5 % B, 16 min 70 % B, 16,5 min 100 % B	18 mL/min
4 & 5	Prep1	Phenomenex Luna silica, 5micron, 250 x 10.00 mm	Isopropanol (C)/Hexan (D)	0 min 75 % D, 16 min 80 % D	5 mL/min
6	Prep1	Phenomenex Gemini-NX C ₁₈ 5 µm 110A, Axia packed; dimension 100 by 21.20 mm	H ₂ O (A)/MeCN (B) (0,1 % HCOOH)	0 min 45 % B, 13 min 90 % B	15 mL/min
Phenazine Kulturen	analytisch	Phenomenex Onyx Monolithic C ₁₈ , 100 x 3,00 mm	H ₂ O (A)/MeCN (B) (0,1 % HCOOH)	0 min 5 % B, 4 min 60 % B, 6 min 100 % B, 6,8 min 100 % B	2 mL/min

^a Gerätedefinition auf der folgenden Seite.

HPLC-Anlage (analytisch):

LaChrom Elite VWR-Hitachi
Organizer
Diode Array Detector L-2450
Column Oven L-2300
Autosampler L-2200
Pump L-2130
Fraktionssammler Foxy Jr. ISCO
Säule (Standard):
Onyx monolithic C₁₈, 100 x 3.0 mm Phenomenex
Säule (Fraktionierung): Luna C₁₈(2), 4.6 x 250 mm, 5 µm Phenomenex
Software: Hystar Bruker

Massenspektrometer (analytisch)

esquire4000 Bruker
NITROX UHPLCMS 18 Dornick Hunter
Software: esquireControl Bruker

HPLC-Anlage (exakte Masse)

LaChrom Elite VWR-Hitachi
Organizer
Diode Array Detector L-2455
Column Oven L-2300
Autosampler L-2200
Pump L-2130
Säule: Gemini-NX 5u C₁₈ 110A, 250 x 4.60 mm Phenomenex
Software: Hystar Bruker

Massenspektrometer (exakte Masse)

MicrOTOF II Bruker
NITROX UHPLCMS 18 Dornick Hunter
Software: microOTOFcontrol Bruker

HPLC-Anlage (präparativ 1)

LaChrom Elite Merck-Hitachi
Organizer
Diode Array Detector L-2450
Autosampler L-2200
externe Pumpe L-7150 VWR-Hitachi
Säule: Gemini 5u C₁₈, 110A, Axia, 100 x 21.20 mm, 5 micron Phenomenex
Software: EZChrom Elite VWR

HPLC-Anlage (präparativ 2)

LaPrep VWR International
Pumpe P311
Detektor P110
Autosampler 3900
Säule: Gemini 10u C₁₈, 100A, Axia, 100 x 50.00 mm Phenomenex
Software: EZChrom Elite VWR

NMR-Spektrometer

DRX500 Bruker
Avance 600 mit Cryoprobekopf Bruker

8.4 CHEMIKALIEN UND KITS

1- ¹³ C-Natriumacetat	Cambridge Isotope Laboratories, Isotec and Aldrich, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
1- ¹³ C-Natriumpropionat	Cambridge Isotope Laboratories, Isotec and Aldrich, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Aetonitril, HPLC Gradient Grade	LGC Promochem, Wesel
Agar	Bacto™, VWR, Hannover
Ameisensäure, p.a.	Fluka, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, Darmstadt
Biomol Green™ PTP1B tyrosin phosphatase drug discovery Kit	Enzy Life Science GmbH, Lörrach
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
CaCl ₂	Carl Roth, Karlsruhe
CaCO ₃	Carl Roth, Karlsruhe
Caseinpepton	Difco, VWR, Hannover
CellTiter-Blue® Cell Viability Assay	Promega, Mannheim
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich, München
Chloroform- <i>d</i> , 99.8 Atom % D	Sigma-Aldrich, München
D(+)-Glucose-Monohydrat	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid- <i>d</i> ₆ , 99.8 Atom % D	Sigma-Aldrich, München
DNA-freies Wasser	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
DNA Molecular Weight Marker X	Roche, Mannheim
EDTA	Merck, Darmstadt
ELISA Kit	Roche, Mannheim
Ethanol 99 %, vergällt	Walter-CMP, Hamburg
Ethidiumbromid	Fluka Biochemika, Buchs, Schweiz
Ethylacetat, rein	Walter-CMP, Hamburg
Fleischextrakt trocken	Merck, Darmstadt
Fötales Rinderserum	Promocell, Heidelberg
Glucose	Merck, Darmstadt
HCl	Carl Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	Bacto™, VWR, Hannover
Hexan	Carl Roth, Karlsruhe
High Pure PCR Product Purification Kit	Roche, Mannheim
Isopropanol	Baker, Griesheim
Kanamycin	Calbiochem, Darmstadt
Malzextrakt	Bacto™, VWR, Hannover
Marine Broth	Difco™, VWR, Hannover
Mc Coys 5A Fertigmedium inkubiert	Invitrogen, Carlsbad, USA
Methanol- <i>d</i> ₄ , 99.8 Atom % D	Carl Roth, Karlsruhe
Methanol, HPLC Gradient Grade	Carl Roth, Karlsruhe
Methyl- ¹³ C-methionin	Cambridge Isotope Laboratories, Isotec and Aldrich, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
NaOH	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid, p.a.	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid, p.a.	Carl Roth, Karlsruhe
PDE Light HTS cAMP phosphodiesterase Kit	Rockland, USA
Penicillin	Invitrogen, Carlsbad, USA
Pepton	Bacto™, VWR, Hannover
Pepton aus Sojabohnenmehl	Merck, Darmstadt
Resazurin Redoxindikator	Riedel-de Häen, Sigma-Aldrich
RPMI 1640 Fertigmedium	Invitrogen, Carlsbad, USA
Saccharose	Merck, Darmstadt
Salzsäure, 32 %, reinst	Carl Roth, Karlsruhe
Sojamehl	Difco, VWR, Hannover
Streptomycin	Invitrogen, Carlsbad, USA
SYBR® Safe DNA gel stain	Invitrogen, Carlsbad, USA

Tamoxifen
Taq DNA Polymerase
Tetrazyklin
TOPO TA Cloning® Kit for Sequencing
Trypticase Soy Broth
Trypton

Biomol, Hamburg
New England Biolabs, Country Road, USA
Invitrogen, Carlsbad, USA
Invitrogen, Carlsbad, USA
Difco, VWR, Hannover
Difco, VWR, Hannover

8.5 GERÄTE

ABI PRISMA 3730 DNA Analyzer
Analysenwaage CPA
Gel-Jet-Imager Dokumentationsanlage
GeneQuant Pro
Precellys @24
Precellys @24 Kit VK05
Mikrotiterplatten Readers Infinite® M200
MJ Research PTC-200 Thermo Cycler
Multifuge 1_{L-R}, Heraeus
NanoVue Spectrophotometer
Schüttler Multitron
Ultra Turrax T25 basic

Applied Biosystems, Foster City, USA
Sartorius, Göttingen
Intas, Göttingen
Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Peqlab, Erlangen
Peqlab, Erlangen
Tecan, Männedorf, Schweiz
Biozym, Hess. Oldendorf
Thermo Scientific, Langenselbold
GE Healthcare, Little Chalfont, UK
Inforce, Einsbach
IKA-Werke GmbH and Co, Staufen,
Deutschland

9 LITERATURVERZEICHNIS

- Abe, M.; Abe, F.; Nishimura, C.; Ichimura, E.; Ogasawara, A.; Ichinei, M.; Muraoka, Y.; Saino, T. 2005. Sulphostin, a Novel Inhibitor of Dipeptidyl Peptidases IV (DPPIV) That Stimulates Hematopoiesis in Mice. *J. Antibiot.* **58**, 111-117.
- Altschul, S.F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E.W.; Lipman, D.J. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**, 403-410.
- Alvarez, M.E.; Houck, D.R.; White, C.B.; Brownell, J.E.; Bobko, M.A.; Rodger, C.A.; Stawicki, M.B.; Sun, H.H.; Gillum, A.M.; Cooper, R. 1994. Isolation and structure elucidation of two new calpain inhibitors from *Streptomyces griseus*. *J. Antibiot.* **47**, 1195-1201.
- Anderson, R.M.; Zimprich, C.A.; Rust, L. 1999. A Second Operator is Involved in *Pseudomonas aeruginosa* Elastase (*lasB*) Activation. *J. Bacteriol.* **181**, 6264-6270.
- Anzai, K.; Suzuki, S. 1960. A new antibiotic bovinocidin, identified as beta-nitropropionic acid. *J. Antibiot.* **13**, 133-136.
- Aoyagi, T.; Yagisawa, M.; Kumagai, M.; Hamada, M.; Morishima, H.; Takeuchi, T.; Umezawa, H. 1973. New pepstatins, pepstatins Bu, Pr and Ac produced by *Streptomyces*. *J. Antibiot.* **26**, 539-541.
- Arbiser, J.L.; Moschella, S.L. 1995. Clofazimine: a review of its medical uses and mechanisms of action. *J. Am. Acad. Dermatol.* **32**, 241-247.
- Arias, C.A.; Murray, B.E. 2009. Antibiotic-Resistant Bugs in the 21st Century - A Clinical Super-Challenge. *N. Engl. J. Med.* **360**, 439-443.
- Arulanantham, H.; Kershaw, N.J.; Hewitson, K.S.; Hughes, C.E.; Thirkettle, J.E.; Schofield, C.J. 2006. ORF17 from the Clavulanic Acid Biosynthesis Gene Cluster Catalyzes the ATP-dependent Formation of N-Glycyl-clavaminic Acid. *J. Biol. Chem.* **281**, 279-287.
- Asolkar, R.N.; Jensen, P.R.; Kauffman, C.A.; Fenical, W. 2006. Daryamides A-C, Weakly Cytotoxic Polyketides from a Marine-Derived Actinomycete of the Genus *Streptomyces* Strain CNQ-085. *J. Nat. Prod.* **69**, 1756-1759.
- Austin, M.B.; Noel, J.P. 2003. The chalcone synthase superfamily of type III polyketide synthases. *Nat. Prod. Rep.* **20**, 79-110.
- Azuma, T.; Kitzuka, M.; Kurakata, S.; Shiozawa, H.; Nakajima, A.; Furukawa, H. 2000. Antitumor antiviral compound A-77543 manufacture with *Nocardia*. [JP 2000344768].
- Bai, R.L.; Paull, K.D.; Herald, C.L.; Malspeis, L.; Pettit, G.R.; Hamel, E. 1991. Halichondrin B and homohalichondrin B, marine natural products binding in the vinca domain of tubulin. Discovery of tubulin-based mechanism of action by analysis of differential cytotoxicity data. *J. Biol. Chem.* **266**, 15882-15889.
- Baki, A.; Bielik, A.; Molnár, L.; Szendrei, G.; Keserü, G.M. 2007. A high throughput luminescent assay for glycogen synthase kinase-3beta inhibitors. *Assay. Drug Dev. Technol.* **5**, 75-83.
- Barrow, C.J.; Oleynek, J.J.; Marinelli, V.; Sun, H.H.; Kaplita, P.; Sedlock, D.M.; Gillum, A.M.; Chadwick, C.C.; Cooper, R. 1997. Antimycins, inhibitors of ATP-citrate lyase, from a *Streptomyces* sp. *J. Antibiot.* **50**, 729-733.
- Barthel, D.; Wolfrath, B. 1989. Tissue sloughing in the sponge *Halichondria panicea*: a fouling organism prevents being fouled. *Oecologia.* **78**, 357-360.

- Basnet,D.B.; Oh,T.J.; Vu,T.T.; Sthapit,B.; Liou,K.; Lee,H.C.; Yoo,J.C.; Sohng,J.K. 2006. Angucyclines Sch 47554 and Sch 47555 from *Streptomyces* sp. SCC-2136: cloning, sequencing, and characterization. *Mol. Cells.* **22**, 154-162.
- Bayer,K.; Siegl,A.; Schmitt,S.; Hoffmann,F.; Hentschel,U. 2008. Life Strategies of Microorganisms in the Environment and in Host Organisms: Leopoldina Symposium. Unravelling microbial diversity and metabolism in marine sponges. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft. 1. Auflage. 112 Seiten.
- Bentley,S.D.; Chater,K.F.; Cerdeño-Tárraga,A.M.; Challis,G.L.; Thomson,N.R.; James,K.D.; Harris,D.E.; Quail,M.A.; Kieser,H.; Harper,D.; Bateman,A.; Brown,S.; Chandra,G.; Chen,C.W.; Collins,M.; Cronin,A.; Fraser,A.; Goble,A.; Hidalgo,J.; Hornsby,T.; Howarth,S.; Huang,C.-H.; Kieser,T.; Larke,L.; Murphy,L.; Oliver,K.; O'Neil,S.; Rabbinowitsch,E.; Rajandream,M.-A.; Rutherford,K.; Rutter,S.; Seeger,K.; Saunders,D.; Sharp,S.; Squares,R.; Squares,S.; Taylor,K.; Warren,T.; Wietzorrek,A.; Woodward,J.; Barrell,B.G.; Parkhill,J.; Hopwood,D.A. 2002. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature.* **417**, 141-147.
- Bérdy,J. 2005. Bioactive Microbial Metabolites. *J. Antibiot.* **58**, 1-26.
- Berquist,P.R. 1978. Sponges. Hutchinson: London. 1. Auflage. 268 Seiten.
- Bibb,M.J. 2005. Regulation of secondary metabolism in streptomycetes. *Curr. Opin. Microbiol.* **8**, 208-215.
- Bitzer,J.; Zeeck,A. 2006. 6-Deoxy- α -L-talopyranosides from *Streptomyces* sp. *European. J. Org. Chem.* **16**, 3661-3666.
- Black,J.; Calesnick,B.; Williams,D.; Weinstein,M.J. 1963. Pharmacology of gentamicin, a new broad-spectrum antibiotic. *Antimicrob. Agents Chemother.* **161**, 138-147.
- Blunt,J.W.; Copp,B.R.; Munro,M.H.; Northcote,P.T.; Prinsep,M.R. 2003. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* **20**, 1-48.
- Blunt,J.W.; Copp,B.R.; Munro,M.H.; Northcote,P.T.; Prinsep,M.R. 2004. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* **21**, 1-49.
- Blunt,J.W.; Copp,B.R.; Munro,M.H.; Northcote,P.T.; Prinsep,M.R. 2005. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* **22**, 15-61.
- Blunt,J.W.; Copp,B.R.; Munro,M.H.; Northcote,P.T.; Prinsep,M.R. 2010. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* **27**, 165-237.
- Bode,H.B.; Bethe,B.; Höfs,R.; Zeeck,A. (2002) Big Effects from Small Changes: Possible Ways to Explore Nature's Chemical Diversity. *Chembiochem.* **3**, 619-627.
- Bode,H.B.; Müller,R. 2005. The Impact of Bacterial Genomics on Natural Product Research. *Angew. Chem. Int. Ed.* **44**, 6828-6846.
- Botsford,J.L.; Harman,J.G. 1992. Cyclic AMP in prokaryotes. *Microbiol. Rev.* **56**, 100-122.
- Braun,D.; Pauli,N.; Sequin,U.; Zähler,H. 1995. New butenolides from the photoconductivity screening of *Streptomyces antibioticus* (Waksman and Woodruff) Waksman and Henrici 1948. *FEMS Microbiol. Lett.* **126**, 37-42.
- Brown, R.; Kelley, C.; and Wiberley, S. E.; 1965. The Production of 3-Benzylidene-6-isobutylidene-2,5-dioxopiperazine, 3,6-Dibenzylidene-2,5-dioxopiperazine, 3-Benzyl-6-

benzylidene-2,5-dioxopiperazine, and 3,6-Dibenzyl-2,5-dioxopiperazine by a Variant of *Streptomyces noursei*. *J. Org. Chem.* **30**, 277-280.

Bryans,J.; Charlton,P.; Chicarelli-Robinson,I.; Collins,M.; Faint,R.; Latham,C.; Shaw,I.; Trew,S. 1996. Inhibition of plasminogen activator inhibitor-1 activity by two diketopiperazines, XR330 and XR334 produced by *Streptomyces* sp. *J. Antibiot.* **49**, 1014-1021.

Buckingham,J. 2009. Dictionary of natural products on CD-ROM. Chapman& Hall, London.

Bull,A.T.; Stach,J.E. 2007. Marine actinobacteria: new opportunities for natural product search and discovery. *Trends Microbiol.* **15**, 491-499.

Bullen,J.J.; Griffiths,E. 1987. Iron and Infection – Molecular, Physiological and Clinical Aspects. Chichester-New York-Brisbane-Toronto-Singapore. John Wiley and Sons. 1. Auflage. 325 Seiten.

Bultel-Poncé,V.; Debitus,C.; Berge,J.P.; Cerceau,C.; Guyot,M. 1998. Metabolites from the sponge-associated bacterium *Micrococcus luteus*. *J. Mar. Biotechnol.* **6**, 233-236.

Busch,B.; Hertweck,C. 2009. Evolution of metabolic diversity in polyketide-derived pyrones: using the non-colinear aureothin assembly line as a model system. *Phytochemistry.* **70**, 1833-1840.

Busti,E.; Monciardini,P.; Cavaletti,L.; Bamonte,R.; Lazzarini,A.; Sosio,M.; Donadio,S. 2006. Antibiotic-producing ability by representatives of a newly discovered lineage of actinomycetes. *Microbiology.* **152**, 675-683.

Butzke,D.; Piel,J. 2006. Genomic and metagenomic strategies to identify biosynthetic gene clusters in uncultivated symbionts of marine invertebrates. In: *Frontiers in Marine Biotechnology*. Horizonpress, Norfolk. 1. Auflage. Seite 327-356.

Calhoun,D.H.; Carson,M.; Jensen,R.A. 1972. The Branch Point Metabolite for Pyocyanine Biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Gen. Microbiol.* **72**, 581-583.

Campàs, C. 2009. Diazepinomicin. *Drugs of the future.* **34**, 349.

Canedo,L.M.; Puentes,J.L.F.; Baz,J.P. .2000. IB-96212, a Novel Cytotoxic Macrolide Produced by a Marine *Micromonospora*. II. Physico-chemical Properties and Structure Determination. *J. Antibiot.* **53**, 479-483.

Chakraborty,R.; Bibb,M. 1997. The ppGpp synthetase gene (*relA*) of *Streptomyces coelicolor* A3(2) plays a conditional role in antibiotic production and morphological differentiation. *J. Bacteriol.* **179**, 5854-5861.

Challis,G.L.; Hopwood,D.A. 2003. Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 14555-14561.

Challis,G.L.; Ravel,J. 2000. Coelichelin, a new peptide siderophore encoded by the *Streptomyces coelicolor* genome: structure prediction from the sequence of its non-ribosomal peptide synthetase. *FEMS Microbiol. Lett.* **187**, 111-114.

Chang,P.C.; Blackwood,A.C. 1968. Simultaneous biosynthesis of pyocyanine, phenazine-1-carboxylic acid, and oxychloroaphine from labelled substrates by *Pseudomonas aeruginosa* Mac 436. *Can. J. Biochem.* **46**, 925-929.

Charan,R.D.; Schlingmann,G.; Janso,J.; Bernan,V.; Feng,X.; Carter,G.T. 2004. Diazepinomicin, a New Antimicrobial Alkaloid from a Marine *Micromonospora* sp. *J. Nat. Prod.* **67**, 1431-1433.

Chelossi,E.; Pantile,R.; Pronzato,R.; Milanese,M.; Hentschel,U. 2007. Bacteria with antimicrobial properties isolated from the Mediterranean sponge *Chondrilla nucula* and *Petrosia ficiformis*. *Aquat. Microb. Ecol.* **49**, 157-163.

Clardy,J.; Fischbach,M.A.; Walsh,C.T. 2006. New antibiotics from bacterial natural products. *Nat. Biotechnol.* **24**, 1541-1550.

Clark,B.; Capon,R.J.; Stewart,M.; Lacey,E.; Tennant,S.; Gill,J.H. 2004. Blancaquinone: a New Anthraquinone from an Australian *Streptomyces* sp. *J. Nat. Prod.* **67**, 1729-1731.

Clarke,T. 2003. Drug companies snub antibiotics as pipeline threatens to run dry. *Nature.* **425**, 225.

Cole,J.R.; Chai,B.; Farris,R.J.; Wang,Q.; Kulam-Syed-Mohideen,A.S.; McGarrell,D.M.; Bandela,A.M.; Cardenas,E.; Garrity,G.M.; Tiedje,J.M. 2007. The ribosomal database project (RDP-II): introducing *myRDP* space and quality controlled public data. *Nucleic Acids Res.* **35**, 169-172.

Collins,L.; Franzblau,S.G. 1997. Microplate alamar blue assay versus BACTEC 460 system for high-throughput screening of compounds against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**, 1004-1009.

Crosa,J.H.; Walsh,C.T. 2002. Genetics and Assembly Line Enzymology of Siderophore Biosynthesis in Bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **66**, 223-249.

Cundliffe,E. 2006. Antibiotic production by actinomycetes: the Janus faces of regulation. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **33**, 500-506.

Darai,G.; Handermann,M.; Sonntag,H.-G.; Tidona,C.; Zöller,L. 2009. Lexikon der Infektionskrankheiten des Menschen. Springer, Berlin. 3. Auflage. 921 Seiten.

de Andrade-Neto,V.F.; Goulart,M.O.; da Silva Filho,J.F.; da Silva,M.J.; Pinto,M.C.F.R.; Pinto,A.V.; Zalis,M.G.; Carvalho,L.H.; Krettli,A.U. 2004. Antimalarial activity of phenazines from lapachol, β -lapachone and its derivatives against *Plasmodium falciparum* in vitro and *Plasmodium berghei* in vivo. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **14**, 1145-1149.

Decker,H.; Haag,S. 1995. Cloning and characterization of a polyketide synthase gene from *Streptomyces fradiae* Tü2717, which carries the genes for biosynthesis of the angucycline antibiotic urdamycin A and a gene probably involved in its oxygenation. *J. Bacteriol.* **177**, 6126-6136.

Demain,A.L. 1998. Induction of microbial secondary metabolism. *Int. Microbiol.* **1**, 259-264.

Dengler,W.A.; Schulte,J.; Berger,D.P.; Mertelsmann,R.; Fiebig,H.H. 1995. Development of a propidium iodide fluorescence assay for proliferation and cytotoxicity assays. *Anticancer Drugs.* **6**, 522-532.

De Voss,J.J.; Rutter,K.; Schroeder,B.G.; Barry,C.E. 1999. Iron Acquisition and Metabolism by Mycobacteria. *J. Bacteriol.* **181**, 4443-4451.

Dietera,A.; Hamm,A.; Fiedler,H.-P.; Goodfellow,M.; Müller,W.E.G.; Brun,R.; Beil,W.; Bringmann,G. 2003. Pyrocoll, an Antibiotic, Antiparasitic and Antitumor Compound Produced by a Novel Alkaliphilic *Streptomyces* Strain. *J. Antibiot.* **56**, 639-646.

Dietrich,L.E.; Price-Whelan,A.; Petersen,A.; Whiteley,M.; Newman,D.K. 2006. The phenazine pyocyanin is a terminal signalling factor in the quorum sensing network of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* **61**, 1308-1321.

- Dietrich,L.E.; Teal,T.K.; Price-Whelan,A.; Newman,D.K. 2008. Redox-Active Antibiotics Control Gene Expression and Community Behavior in Divergent Bacteria. *Science*. **321**, 1203-1206.
- Dingermann,T.; Hänsel,R.; Zündorf,I. 2002. Pharmazeutische Biologie: Molekulare Grundlagen und klinische Anwendungen. Springer, Berlin. 1. Auflage. 498 Seiten.
- Doekel,S.; Marahiel,M.A. 2001. Biosynthesis of Natural Products on Modular Peptide Synthetases. *Metab. Eng.* **3**, 64-77.
- Dolak,L.; Sokolski,W.T.; Mizesak,S.; Stroman,D.W.; Sebek,O.K. 1977. Microbial Formation of 4-Thiouracil. *Antimicrob. Agents Chemother.* **11**, 569-570.
- Donadio,S.; Monciardini,P.; Sosio,M. 2007. Polyketide synthases and nonribosomal peptide synthetases: the emerging view from bacterial genomics. *Nat. Prod. Rep.* **24**, 1073-1109.
- Doull,J.L.; Ayer,S.W.; Singh,A.K.; Thibault,P. 1993. Production of a novel polyketide antibiotic, jadomycin B, by *Streptomyces venezuelae* following heat shock. *J. Antibiot.* **46**, 869-871.
- Doull,J.L.; Singh,A.K.; Hoare,M.; Ayer,S.W. 1994. Conditions for the production of jadomycin B by *Streptomyces venezuelae* ISP5230: Effects of heat shock, ethanol treatment and phage infection. *J. Ind. Microbiol.* **13**, 120-125.
- Eickhoff,J. 2002. Untersuchung zur Funktion der Protein-Tyrosin-Phosphatase PTPRR. Dissertation. Biologie, Chemie und Geowissenschaften der Universität Bayreuth.
- El Sayed,K.A.; Bartyzel,P.; Shen,X.; Perry,T.L.; Zjawiony,J.K.; Hamann,M.T. 2000. Marine Natural Products as Antituberculosis Agents. *Tetrahedron*. **56**, 949-953.
- Elibol,M.; Mavituna,F. 1999. A remedy to oxygen limitation problem in antibiotic production: addition of perfluorocarbon. *Biochem. Eng. J.* **3**, 1-7.
- Ellman,G.L.; Courtney,K.D.; Andres,V.; Featherstone,R.M. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* **7**, 88-95.
- Erpenbeck,D.; van Soest,R. 2007. Parazoa, Porifera. In: Spezielle Zoologie. Teil 1: Einzeller und Wirbellose Tiere. Elsevier, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg. 2. Auflage. Seite 94-116.
- Etho,H.; Iguchi,M.; Nagasawa,T.; Tani,Y.; Yamada,H.; Fukami,H. 1987. Structures of rhodonocardins produced by a *Nocardia* sp. *Agric. Biol. Chem.* **51**, 1819-1824.
- Fager,E.E.C.; Goldstein, A.W. 1980. Fortimicins AH and AI. [U.S. 4,219,644].
- Fajardo,A.; Martínez,J.L. 2008. Antibiotics as signals that trigger specific bacterial responses. *Curr. Opin. Microbiol.* **11**, 161-167.
- Faulkner,D.J. 2001. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* **18**, 1-49.
- Faulkner,D.J. 2002. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* **19**, 1-48.
- Faulkner,D.J.; Harper,M.K.; Haygood,M.G.; Salomon,C.E.; Schmidt,E.W. 2000. Symbiotic Bacteria in Sponges: Sources of Bioactive Substances. In: Drugs from the Sea. Karger, Tokyo. 1. Auflage. Seite 1-158.
- Fauth,U.; Zähler,H.; Mühlenfeld,A.; Achenbach,H. 1986. Galbonolides A and B - two non-glycosidic antifungal macrolides. *J. Antibiot.* **39**, 1760-1764.
- Fehr,T.; King,H.D.; Kuhn,M. 1977. Mutalomycin, a new polyether antibiotic taxonomy, fermentation, isolation and characterization. *J. Antibiot.* **30**, 903-907.

- Fenical,W.; Jensen,P.R. 2006. Developing a new resource for drug discovery: marine actinomycete bacteria. *Nat. Chem. Biol.* **2**, 666-673.
- Fiedler,H.-P.; Bruntner,C.; Bull,A.T.; Ward,A.C.; Goodfellow,M.; Poterat,O.; Puder,C.; Mihm,G. 2005. Marine actinomycetes as a source of novel secondary metabolites. *Antonie Van Leeuwenhoek.* **87**, 37-42.
- Fieseler,L.; Horn,M.; Wagner,M.; Hentschel,U. 2004. Discovery of the Novel Candidate Phylum "Poribacteria" in Marine Sponges. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 3724-3732.
- Finking,R.; Marahiel,M.A. 2004. Biosynthesis of nonribosomal peptides. *Annu. Rev. Microbiol.* **58**, 453-488.
- Firn,R.D.; Jones,C.G. 2003. Natural products--a simple model to explain chemical diversity. *Nat. Prod. Rep.* **20**, 382-391.
- Fitzpatrick,D.A. 2009. Lines of Evidence for Horizontal Gene Transfer of a Phenazine Producing Operon into Multiple Bacterial Species. *J. Mol. Evol.* **68**, 171-185.
- Fleming,A. 2009. Penicillin. Nobel Lecture, December 11, 1945. http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1945/fleming-lecture.pdf.
- Frankel,B.A.; McCafferty,D.G. 2004. Profiling Natural Product Biosynthesis. *Chem. Biol.* **11**, 290-291.
- Fredericks,G.J.; Heding,H. 1971. N-demethylstreptomycin. 3. Antibacterial activity. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. B Microbiol. Immunol.* **79**, 343-344.
- Fujiki,H.; Mori,M.; Nakayasu,M.; Terada,M.; Sugimura,T. 1979. A possible naturally occurring tumor promoter, teleocidin B from *Streptomyces*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **90**, 976-983.
- Fujiki,H.; Suganuma,M.; Matsukura,N.; Sugimura,T.; Takayama,S. 1982. Teleocidin from *Streptomyces* is a potent promoter of mouse skin carcinogenesis. *Carcinogenesis.* **3**, 895-898.
- Fukuchi,N.; Furihata,K.; Nakayama,J.; Goudo,T.; Takayama,S.; Isogai,A.; Suzuki,A. 1995. Rotihibins, novel plant growth regulators from *Streptomyces graminofaciens*. *J. Antibiot.* **48**, 1004-1010.
- Funa,N.; Ohnishi,Y.; Fujii,I.; Shibuya,M.; Ebizuka,Y.; Horinouchi,S. 1999. A new pathway for polyketide synthesis in microorganisms. *Nature.* **400**, 897-899.
- Fuqua,C.; Parsek,M.R.; Greenberg,E.P. 2001. Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: acyl-homoserine lactone quorum sensing. *Annu. Rev. Genet.* **35**, 439-468.
- Gäumann,E.; Hütter,R.; Keller-Schierlein,W.; Neipp,L.; Prelog,V.; Zähler,H. 1960. Stoffwechselprodukte von Actinomyceten. 21. Mitteilung. Lankamycin und Lankacidin. *Helv. Chim. Acta.* **43**, 601-606.
- Gersch, D.; 1979. Dependence of macromolecule synthesis on cyclic AMP in antibiotic producing strains of *Streptomyces hygroscopicus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **6**, 343-347.
- Gersch,D.; Römer,W.; Krügel,H. 1979. Inverse regulation of spore germination and growth by cyclic AMP in *Streptomyces hygroscopicus*. *Cell Mol. Life Sci.* **35**, 749.
- Gonzalez,R.; Islas,L.; Obregon,A.-M.; Escalante,L.; Sanchez,S. 1995. Gentamicin formation in *Micromonospora purpurea*: Stimulatory effect of ammonium. *J. Antibiot.* **48**, 479-483.

Goodfellow,M.; Williams,S.T. 1983. Ecology of Actinomycetes. *Annu. Rev. Microbiol.* **37**, 189-216.

Gould,S.J.; Cheng,X.C.; Halley,K. 1992. Biosynthesis of dehydrorabelomycin and PD 116740: prearomatic deoxygenation as evidence for different polyketide synthases in the formation of benz[a]anthraquinones. *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 10066-10068.

Graber,M.A.; Gerwick,W.H. 1998. Kalkipyron, a Toxic γ -pyrone from an Assemblage of the Marine Cyanobacteria *Lyngbya majuscula* and *Tolypothrix* sp. *J. Nat. Prod.* **61**, 677-680.

Grabowski,V. 2002. Nachweis und Charakterisierung von Actinobakterien und einigen *Planctomycetales* aus marinen Schwämmen. Dissertation. Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.

Graupner,P.R.; Thornburgh,S.; Mathieson,J.T.; Chapin,E.L.; Kemmitt,G.M.; Brown,J.M.; Snipes,C.E. 1997. Dihydromaltophilin; a novel fungicidal tetramic acid containing metabolite from *Streptomyces* sp. *J. Antibiot.* **50**, 1014-1019.

Griswold,D.E.; Webb,E.F.; Breton,J.; White,J.R.; Marshall,P.J.; Torphy,T.J. 1993. Effect of selective phosphodiesterase type IV inhibitor, rolipram, on fluid and cellular phases of inflammatory response. *Inflammation.* **17**, 333-344.

Gross,F.; Luniak,N.; Perlova,O.; Gaitatzis,N.; Jenke-Kodama,H.; Gerth,K.; Gottschalk,D.; Dittmann,E.; Müller,R. 2006. Bacterial type III polyketide synthases: phylogenetic analysis and potential for the production of novel secondary metabolites by heterologous expression in pseudomonads. *Arch. Microbiol.* **185**, 28-38.

Gruchattka,E. 2010. Verfahren zur Stimulation der Sekundärmetabolitproduktion mariner Actinomyceten. Diplomarbeit. Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.

Grünewald,J.; Marahiel,M.A. 2006. Chemoenzymatic and Template-Directed Synthesis of Bioactive Macrocyclic Peptides. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **70**, 121-146.

Gullo,V.P.; McAlpine,J.; Lam,K.S.; Baker,D.; Petersen,F. 2006. Drug discovery from natural products. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **33**, 523-531.

Gunji,S.; Arima,K.; Beppu,T. 1983. Screening of antifungal antibiotics according to activities inducing morphological abnormalities. *Agricult. Biol. Chem.* **47**, 2061-2069.

Gürtler,H.; Pedersen,R.; Anthoni,U.; Christophersen,C.; Nielsen,P.H.; Wellington,E.M.; Pedersen,C.; Bock,K. 1994. Albaflavenone, a sesquiterpene ketone with a zizaene skeleton produced by a streptomycete with a new rope morphology. *J. Antibiot.* **47**, 434-439.

Haagen,Y.; Glück,K.; Fay,K.; Kammerer,B.; Gust,B.; Heide,L. 2006. A Gene Cluster for Prenylated Naphthoquinone and Prenylated Phenazine Biosynthesis in *Streptomyces cinnamomensis* DSM 1042. *Chembiochem.* **7**, 2016-2027.

Haefner,B. 2003. Drugs from the deep: marine natural products as drug candidates. *Drug Discov. Today.* **8**, 536-544.

Hamilton,R.W.; Achberger,E.C.; Kolenbrander,P.E. 1977. Control of morphogenesis in *Arthrobacter crystallopoietis*: effect of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate. *J. Bacteriol.* **129**, 874-879.

Han,L.; Yang,K.; Ramalingam,E.; Mosher,R.H.; Vining,L.C. 1994. Cloning and characterization of polyketide synthase genes for jadomycin B biosynthesis in *Streptomyces venezuelae* ISP5230. *Microbiology.* **140**, 3379-3389.

- Han,S.K.; Nedashkovskaya,O.I.; Mikhailov,V.V.; Kim,S.B.; Bae,K.S. 2003. *Salinibacterium amurskyense* gen. nov., sp. nov., a novel genus of the family *Microbacteriaceae* from the marine environment. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**, 2061-2066.
- Hara,Y.; Kishimoto,T.; Sano,H.; Haramoto,M. 2004. 3-(Acylamino)salicylamide derivatives and agricultural fungicides containing them. [JP 2,004,323,516].
- Hardoim,C.C.; Costa,R.; Araújo,F.V.; Hajdu,E.; Peixoto,R.; Lins,U.; Rosado,A.S.; van Elsas,J.D. 2009. Diversity of Bacteria in the Marine Sponge *Aplysina fulva* in Brazilian Coastal Waters. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**, 3331-3343.
- Harris,D.R.; McGeachin,S.G.; Mills,H.H. 1965. The structure and stereochemistry of erythromycin A. *Tetrahedron Lett.* **11**, 679-685.
- Hashimoto,M.; Komori,T.A.; Kamiya,T. 1976. Nocardicin A and B, novel monocyclic β -lactam antibiotics from a *Nocardia* species. *J. Am. Chem. Soc.* **98**, 3023-3025.
- Hayashi,K.; Nozaki,H. 1999. Kitamycins, new antimycin antibiotics produced by *Streptomyces* sp. *J. Antibiot.* **52**, 325-328.
- He,J.; Hertweck,C. 2003. Iteration as Programmed Event during Polyketide Assembly; Molecular Analysis of the Aureothin Biosynthesis Gene Cluster. *Chem. Biol.* **10**, 1225-1232.
- Helmke,E.; Weyland,H. 1984. *Rhodococcus marinonascens* sp. nov., an Actinomycete from the Sea. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **34**, 127.
- Henkel,T.; Zeeck,A. 1991. Secondary substances from chemical screening. 16. Inthomycins, new oxazole trienes from *Streptomyces* sp. *Liebigs Ann. Chem.* **4**, 367-373.
- Hentschel,U.; Bringmann,G. 2010. Marine Schwämme: Füllhorne der Meere. Suche nach neuen Wirkstoffen aus der Natur. *Pharm. Unserer Zeit.* **39**, 62-66.
- Hentschel,U.; Hopke,J.; Horn,M.; Friedrich,A.B.; Wagner,M.; Hacker,J.; Moore,B.S. 2002. Molecular Evidence for a Uniform Microbial Community in Sponges from Different Oceans. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 4431-4440.
- Hentschel,U.; Usher,K.M.; Taylor,M.W. 2006. Marine sponges as microbial fermenters. *FEMS Microbiol. Ecol.* **55**, 167-177.
- Hernández,L.M.; Blanco,J.A.; Baz,J.P.; Puentes,J.L.; Millán,F.R.; Vázquez,F.E.; Fernández-Chimeno,R.I.; Gravalos,D.G. 2000. 4'-N-methyl-5'-hydroxystaurosporine and 5'-hydroxystaurosporine, new indolocarbazole alkaloids from a marine *Micromonospora* sp. strain. *J. Antibiot.* **53**, 895-902.
- Hertweck,C. 2009. Die biosynthetische Grundlage der Polyketid-Vielfalt. *Angew. Chem.* **121**, 4782-4811.
- Hertweck,C.; Luzhetskyy,A.; Rebets,Y.; Bechthold,A. 2007. Type II polyketide synthases: gaining a deeper insight into enzymatic teamwork. *Nat. Prod. Rep.* **24**, 162-190.
- Hildebrand,M.; Waggoner,L.E.; Lim,G.E.; Sharp,K.H.; Ridley,C.P.; Haygood,M.G. 2004. Approaches to identify, clone, and express symbiont bioactive metabolite genes. *Nat. Prod. Rep.* **21**, 122-142.
- Hill,R.T.; Hamann,M.T.; Peraud,O.; Kasanah,N. 2003. Manzamine-producing actinomycetes. [WO 2003-US24238].

- Hirata, Y.; Nakata, H.; Yamada, K.; Okuhara, K.; Naito, T. 1961. The structure of aureothin, a nitro compound obtained from *Streptomyces thioluteus*. *Tetrahedron*. **14**, 252-274.
- Hochmuth, T.; Piel, J. 2009. Polyketide synthases of bacterial symbionts in sponges - Evolution-based applications in natural products research. *Phytochemistry*. **70**, 1841-1849.
- Hochstein, F.A.; Els, H.; Celmer, W.D.; Shapiro, B.L.; Woodward, R.B. 1960. The structure of oleandomycin. *J. Am. Chem. Soc.* **82**, 3225-3227.
- Horii, S.; Kameda, Y.; Kawahara, K. 1972. Studies on validamycins, new antibiotics. 8. Isolation and characterization of validamycins C, D, E and F. *J. Antibiot.* **25**, 48-53.
- Horinouchi, S.; Ohnishi, Y.; Kang, D.K. 2001. The A-factor regulatory cascade and cAMP in the regulation of physiological and morphological development in *Streptomyces griseus*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **27**, 177-182.
- Hoshino, T.; Fujiwara, A. 1983. Microbial conversion of anthracycline antibiotics. II. Characterization of the microbial conversion products of auramycinone by *Streptomyces coeruleorubidus* ATCC 31276. *J. Antibiot.* **36**, 1463-1467.
- Hosokawa, N.; Naganawa, H.; Kasahara, T.; Hattori, S.; Hamada, M.; Takeuchi, T.; Yamamoto, S.; Tsuchiya, K.S.; Hori, M. 1999. Futasosine and Its Derivatives, New Nucleoside Analogs. *Chem. Pharm. Bull.* **47**, 1032-1034.
- Hughes, C.C.; Prieto-Davo, A.; Jensen, P.R.; Fenical, W. 2008. The Marinopyrroles, Antibiotics of an Unprecedented Structure Class from a Marine *Streptomyces* sp. *Org. Lett.* **10**, 629-631.
- Ikeda, H.; Ishikawa, J.; Hanamoto, A.; Shinose, M.; Kikuchi, H.; Shiba, T.; Sakaki, Y.; Hattori, M.; Ōmura, S. 2003. Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*. *Nat. Biotechnol.* **21**, 526-531.
- Ikeda, Y.; Gomi, S.; Yokose, K.; Naganawa, H.; Ikeda, T.; Manabe, M.; Hamada, M.; Kondo, S.; Umezawa, H. 1985. A new streptomycin group antibiotic produced by *Streptomyces sioyaensis*. *J. Antibiot.* **38**, 1803-1805.
- Imamura, N.; Nishijima, M.; Adachi, K.; Sano, H. 1993. Novel antimycin antibiotics, urauchimycins A and B, produced by marine actinomycete. *J. Antibiot.* **46**, 241-246.
- Imhoff, J.F.; Stöhr, R. 2003. Sponge-associated bacteria: general overview and special aspects of bacteria associated with *Halichondria panicea*. In: Sponges (Porifera). Progress in Molecular and Subcellular Biology. Marine Molecular Biotechnology, 1. Auflage. Seiten. 35-57.
- Irie, K.; Okuno, S.; Koizumi, F.; Koshimizu, K. 1993. Photolabile derivatives of indol alkaloid tumor promoter teleocidins: synthesis, biological activities and photoaffinity labeling studies. *Tetrahedron*. **49**, 10817-10830.
- Ishikawa, J.; Yamashita, A.; Mikami, Y.; Hoshino, Y.; Kurita, H.; Hotta, K.; Shiba, T.; Hattori, M. 2004. The complete genomic sequence of *Nocardia farcinica* IFM 10152. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**, 14925-14930.
- Ishimaru, K.; Ishida, J.; Noborio, N.; Nakamura, S. 1983. Histidinomycin, a new antifungal antibiotic. *J. Antibiot.* **36**, 1644-1650.
- Isono, K.; Kobinata, K.; Okawa, H.; Kusakabe, H.; Uramoto, M.; Ko, K.; Misato, T.; Tai, S.W.; Ni, C.T.; Shen, Y.C. 1986. New antibiotics, albopeptins A and B. *Agr. Biol. Chem.* **50**, 2163-2165.
- Jensen, P.R.; Dwight, R.; Fenical, W. 1991. Distribution of actinomycetes in near-shore tropical marine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 1102-1108.

- Jensen, P.R.; Fenical, W. 1994. Strategies for the Discovery of Secondary Metabolites from Marine Bacteria: Ecological Perspectives. *Annu. Rev. Microbiol.* **48**, 559-584.
- Jensen, P.R.; Gontang, E.; Mafnas, C.; Mincer, T.J.; Fenical, W. 2005. Culturable marine actinomycete diversity from tropical Pacific Ocean sediments. *Environ. Microbiol.* **7**, 1039-1048.
- Jensen, P.R.; Mincer, T.J.; Williams, P.G.; Fenical, W. 2005. Marine actinomycete diversity and natural product discovery. *Antonie Van Leeuwenhoek.* **87**, 43-48.
- Jiang, S.; Sun, W.; Chen, M.; Dai, S.; Zhang, L.; Liu, Y.; Lee, K.J.; Li, X. 2007. Diversity of culturable actinobacteria isolated from marine sponge *Haliclona* sp. *Antonie Van Leeuwenhoek.* **92**, 405-416.
- Jin, W.; Kim, H.K.; Kim, J.Y.; Kang, S.G.; Lee, S.H.; Lee, K.J. 2004. Cephamycin C production is regulated by *relA* and *rsh* genes in *Streptomyces clavuligerus* ATCC27064. *J. Biotechnol.* **114**, 81-87.
- Jin, W.; Ryu, Y.G.; Kang, S.G.; Kim, S.K.; Saito, N.; Ochi, K.; Lee, S.H.; Lee, K.J. 2004. Two *relA/spoT* homologous genes are involved in the morphological and physiological differentiation of *Streptomyces clavuligerus*. *Microbiology.* **150**, 1485-1493.
- Jones, D.; Metzger, H.J.; Schatz, A.; Waksman, S.A. 1944. Control of Gram-Negative Bacteria in Experimental Animals by Streptomycin. *Science.* **100**, 103-105.
- Kameyama, T.; Takahashi, A.; Kurasawa, S.; Ishizuka, M.; Okami, Y.; Takeuchi, T.; Umezawa, H. 1987. Bisucaberin, a new siderophore, sensitizing tumor cells to macrophage-mediated cytolysis. I. Taxonomy of the producing organism, isolation and biological properties. *J. Antibiot.* **40**, 1664-1670.
- Kanazawa, K.I.; Tsuchiya, K.; Raki, T. 1960. A new antituberculous amino (α -hydroxy- γ -oxo-l-norvaline). *Am. Rev. Respir. Dis.* **81**, 924.
- Kanzaki, H.; Wada, K.; Nitoda, T.; Kawazu, K. (1998) Novel Bioactive Oxazolomycin Isomers Produced by *Streptomyces albus* JA3453. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **62**, 438-442.
- Kanzaki, H.; Yanagisawa, S.; Nitoda, T. 2000. Biosynthetic intermediates of the tetrahydro cyclic dipeptide albonoursin produced by *Streptomyces albulus* KO-23. *J. Antibiot.* **53**, 1257-1264.
- Kase, H.; Iwahashi, K.; Matsuda, Y. 1986. K-252a, a potent inhibitor of protein kinase C from microbial origin. *J. Antibiot.* **39**, 1059-1065.
- Kayser, F.H.; Böttger, E.C.; Zinkernagel, R.M.; Haller, O.H.; Eckert, J.; Deplazes, P. 2010. Medizinische Mikrobiologie. Thieme, Stuttgart. 12. Auflage. 774 Seiten.
- Kelecom, A. 2002. Secondary metabolites from marine microorganisms. *An. Acad. Bras. Ciênc.* **74**, 151-170.
- Kennedy, J.; Baker, P.; Piper, C.; Cotter, P.D.; Walsh, M.; Mooij, M.J.; Bourke, M.B.; Rea, M.C.; O'Connor, P.M.; Ross, R.P.; Hill, C.; O'Gara, F.; Marchesi, J.R.; Dobson, A.D. 2009. Isolation and Analysis of Bacteria with Antimicrobial Activities from the Marine Sponge *Haliclona simulans* Collected from Irish Waters. *Mar. Biotechnol.* **11**, 384-396.
- Kim, T.K.; Fuerst, J.A. 2006. Diversity of polyketide synthase genes from bacteria associated with the marine sponge *Pseudoceratina clavata*: culture-dependent and culture-independent approaches. *Environ. Microbiol.* **8**, 1460-1470.

- Kim, T.K.; Garson, M.J.; Fuerst, J.A. 2005. Marine actinomycetes related to the "*Salinospora*" group from the Great Barrier Reef sponge *Pseudoceratina clavata*. *Environ. Microbiol.* **7**, 509-518.
- King, H.D.; Langharig, J.; Sanglier, J.J. 1986. Clavamycins, new clavam antibiotics from two variants of *Streptomyces hygroscopicus*. I. Taxonomy of the producing organisms, fermentation, and biological activities. *J. Antibiot.* **39**, 510-515.
- Kinnel, R.B.; Gehrken, H.-P.; Scheuer, P.J. Palau'amine : a cytotoxic and immunosuppressive hexacyclic bisguanidine antibiotic from the sponge *Stylotella agminata*. *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 3376-3377.
- Kinumaki, A.; Suzuki, M. 1972. Proposed structure of angolamycin (shincomycin A) by mass spectrometry. *J. Antibiot.* **25**, 480-482.
- Ko, H.R.; Chun, H.K.; Jung, M.C.; Kho, Y.H. 2010. Valistatin (3-amino-2-hydroxy-4-phenylbutanoyl-valyl-valine), a new aminopeptidase M inhibitor, produced by *Streptomyces* sp. SL20209. *J. Microbiol. Biotechnol.* **5**, 36-40.
- Kobayashi, J.; Tsuda, M.; Nemoto, A.; Tanaka, Y.; Yazawa, K.; Mikami, Y. 1997. Brasilidine A, a New Cytotoxic Isonitrile-Containing Indole Alkaloid from the Actinomycete *Nocardia brasiliensis*. *J. Nat. Prod.* **60**, 719-720.
- Koch, K.F.; Rhoades, J.A.; Hagaman, E.W.; Wenkert, E. 1974. Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectral analysis of tobramycin and related antibiotics. *J. Am. Chem. Soc.* **96**, 3300-3305.
- Komaki, H.; Tanaka, Y.; Yazawa, K.; Takagi, H.; Ando, A.; Nagata, Y.; Mikami, Y. 2000. Antitumor activity of brasilicardin A, a novel terpenoid antibiotic from *Nocardia brasiliensis*. *J. Antibiot.* **53**, 75-77.
- Komatsu, K.; Tsuda, M.; Shiro, M.; Tanaka, Y.; Mikami, Y.; Kobayashi, J. 2004. Brasilicardins B-D, new tricyclic terpenoids [correction of terpernoids] from actinomycete *Nocardia brasiliensis*. *Bioorg. Med. Chem.* **12**, 5545-5551.
- Kretschmer, A.; Dorgerloh, M.; Deeg, M.; Hagenmaier, H. 1985. The structures of novel insecticidal macrolides: bafilomycins D and E, and oxohygroolidin. *Agricult. Biol. Chem.* **49**, 2509-2511.
- Kunigami, T.; Shin-Ya, K.; Furihata, K.; Furihata, K.; Hayakawa, Y.; Seto, H. 1998. A novel neuronal cell protecting substance, aestivophoenin C, produced by *Streptomyces purpeofuscus*. *J. Antibiot.* **51**, 880-882.
- Küster, E.; Neumeier, W. 1981. Halotolerance in some Streptomycetes producing tetracyclines. *Actinomycetes*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart. 1. Auflage. Seite 315-319.
- Kuwahara, A.; Nishikiori, T.; Shimada, N.; Nakagawa, T.; Fukazawa, H.; Mizuno, S.; Uehara, Y. 1997. NA22598A1, a novel antitumor substance produced by *Streptomyces* sp. NA22598. *J. Antibiot.* **50**, 712-713.
- Laatsch, H. 2007. Antibase 2007 SciDex – The Natural Products identifier. Wiley-VCH, Weinheim. CD-Rom.
- Lam, K.S. 2006. Discovery of novel metabolites from marine actinomycetes. *Curr Opin. Microbiol.* **9**, 245-251.
- Laursen, J.B.; de Visser, P.C.; Nielsen, H.K.; Jensen, K.J.; Nielsen, J. 2002. Solid-phase synthesis of new saphenamycin analogues with antimicrobial activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **12**, 171-175.

- Laursen, J.B.; Nielsen, J. 2004. Phenazine Natural Products: Biosynthesis, Synthetic Analogues, and Biological Activity. *Chem. Rev.* **104**, 1663-1686.
- Lautru, S.; Deeth, R.J.; Bailey, L.M.; Challis, G.L. 2005. Discovery of a new peptide natural product by *Streptomyces coelicolor* genome mining. *Nat. Chem. Biol.* **1**, 265-269.
- Lechevalier, H.A.; Lechevalier, M.P. 1967. Biology of actinomycetes. *Annu. Rev. Microbiol.* **21**, 71-100.
- Lee, S.D. 2006. *Nocardia jejuensis* sp. nov., a novel actinomycete isolated from a natural cave on Jeju Island, Republic of Korea. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **56**, 559-562.
- Léo, P.M.; Morin, C.; Philouze, C. 2002. Structure Revision of Medermycin/Lactoquinomycin A and of Related C-8 Glycosylated Naphthoquinones. *Org. Lett.* **4**, 2711-2714.
- Levitch, M.E.; Rietz, P. 1966. The Isolation and Characterization of 2-Hydroxyphenazine from *Pseudomonas aureofaciens*. *Biochemistry.* **5**, 689-692.
- Levitch, M.E.; Stadtman, E.R. Study of the Biosynthesis of Phenazine-1-carboxylic acid. *Arch. Biochem. Biophys.* **106**, 194-199.
- Li, H.; Matsunaga, S.; Fusetani, N. 1996. Halicyclindramides D and E, Antifungal Peptides from the Marine Sponge *Halichondria cylindrata*. *J. Nat. Prod.* **59**, 163-166.
- Li, H.Y.; Matsunaga, S.; Fusetani, N. 1995. Halicyclindramides A-C, antifungal and cytotoxic depsipeptides from the marine sponge *Halichondria cylindrata*. *J. Med. Chem.* **38**, 338-343.
- Liu, C.M.; Westley, J.W.; Chu, J.; Hermann, T.E.; Liu, M.; Palleroni, N. 1993. Three novel polyether antibiotics X-14889A, C, and D from a streptomycete. Taxonomy of the producing organism, fermentation production and biological properties of the antibiotics. *J. Antibiot.* **46**, 275-279.
- Liu, C.M.; Westley, J.W.; Hermann, T.E.; Prosser, B.L.; Palleroni, N.; Evans, R.H.; Miller, P.A. 1986. Novel polyether antibiotics X-14873A, G and H produced by a *Streptomyces*: taxonomy of the producing culture, fermentation, biological and ionophorous properties of the antibiotics. *J. Antibiot.* **39**, 1712-1718.
- Liu, L.; Roets, E.; Busson, R.; Vankeerberghen, A.; Janssen, G.; Hoogmartens, J. 1996. Two novel spiramycins obtained from commercial samples: isolation and elucidation of structure. *J. Antibiot.* **49**, 398-401.
- Lombó, F.; Velasco, A.; Castro, A.; de la Calle F.; Braña, A.F.; Sánchez-Puelles, J.M.; Méndez, C.; Salas, J.A. 2006. Deciphering the Biosynthesis Pathway of the Antitumor Thiocoraline from a Marine Actinomycete and Its Expression in two *Streptomyces* species. *Chembiochem.* **7**, 366-376.
- Lottspeich, F.; Zorbas, H. 1998. Bioanalytik. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin. 1. Auflage. 1035 Seiten.
- Love, G.D.; Grosjean, E.; Stalvies, C.; Fike, D.A.; Grotzinger, J.P.; Bradley, A.S.; Kelly, A.E.; Bhatia, M.; Meredith, W.; Snape, C.E.; Bowring, S.A.; Condon, D.J.; Summons, R.E. 2009. Fossil steroids record the appearance of Demospongiae during the *Cryogenian period*. *Nature.* **457**, 718-721.
- Lown, J.W.; 1993. Anthracycline and anthraquinone anticancer agents: Current status and recent developments. *Pharmacol. Ther.* **60**, 185-214.
- Madigan, M.T.; Martinko, J.M.; Parker, J. 2000. Brock Mikrobiologie. Spektrum Akademischer Verlag, Berlin. 9. Auflage. 1175 Seiten.

- Maeda,K.; Kawamura,K.; Kondo,S.; Aoyagi,T.; Takeuchi,T. 1971. The structure and activity of leupeptins and related analogs. *J. Antibiot.* **24**, 402-404.
- Mahmoud,M.A.S. 2004. Bioactive secondary metabolites from marine and terrestrial bacteria: Isoquinolinequinones, bacterial compounds with a novel pharmacophore. Dissertation. Georg-August-Universität Göttingen.
- Maldonado,L.A.; Fenical,W.; Jensen,P.R.; Kauffman,C.A.; Mincer,T.J.; Ward,A.C.; Bull,A.T.; Goodfellow,M. 2005. *Salinispora arenicola* gen. nov., sp. nov. and *Salinispora tropica* sp. nov., obligate marine actinomycetes belonging to the family *Micromonosporaceae*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55**, 1759-1766.
- Mann,J. 1987. Secondary metabolism. Oxford University Press, Oxford, USA. 2. Auflage. 374 Seiten.
- Martin,G.D.; Tan,L.T.; Jensen,P.R.; Dimayuga,R.E.; Fairchild,C.R.; Raventos-Suarez,C.; Fenical,W. 2007. Marmycins A and B, Cytotoxic Pentacyclic C-Glycosides from a Marine Sediment-Derived Actinomycete Related to the Genus *Streptomyces*. *J. Nat. Prod.* **70**, 1406-1409.
- Martín,J.F. 2004. Phosphate Control of the Biosynthesis of Antibiotics and Other Secondary Metabolites Is Mediated by the PhoR-PhoP System: an Unfinished Story. *J. Bacteriol.* **186**, 5197-5201.
- Martin,J.R.; Egan,R.S.; Perun,T.J.; Goldstein,A.W. 1973. 8-epi-erythronolide B and its metabolic fate in fermentations of *Streptomyces erythreus*. *Tetrahedron.* **29**, 935-940.
- Mavrodi,D.V.; Blankenfeldt,W.; Thomashow,L.S. 2006. Phenazine Compounds in Fluorescent *Pseudomonas* Spp. Biosynthesis and Regulation. *Annu. Rev. Phytopathol.* **44**, 417-445.
- Mavrodi,D.V.; Ksenzenko,V.N.; Bonsall,R.F.; Cook,R.J.; Boronin,A.M.; Thomashow,L.S. 1998. A Seven-Gene Locus for Synthesis of Phenazine-1-Carboxylic Acid by *Pseudomonas fluorescens* 2-79. *J. Bacteriol.* **180**, 2541-2548.
- Mavrodi,D.V.; Peever,T.L.; Mavrodi,O.V.; Parejko,J.A.; Raaijmakers,J.M.; Lemanceau,P.; Mazurier,S.; Heide,L.; Blankenfeldt,W.; Weller,D.M.; Thomashow,L.S. 2010. Diversity and Evolution of the Phenazine Biosynthesis Pathway. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**, 866-879.
- Mazzola,M.; Cook,R.J.; Thomashow,L.S.; Weller,D.M.; Pierson,L.S. 1992. Contribution of phenazine antibiotic biosynthesis to the ecological competence of fluorescent pseudomonads in soil habitats. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 2616-2624.
- McBrien,K.D.; Berry,R.L.; Lowe,S.E.; Neddermann,K.M.; Bursuker,I.; Huang,S.; Klohr,S.E.; Leet,J.E. 1995. Rakicidins, new cytotoxic lipopeptides from *Micromonospora* sp. fermentation, isolation and characterization. *J. Antibiot.* **48**, 1446-1452.
- McDonald,M.; Mavrodi,D.V.; Thomashow,L.S.; Floss,H.G. 2001. Phenazine Biosynthesis in *Pseudomonas fluorescens*: Branchpoint from the Primary Shikimate Biosynthetic Pathway and Role of Phenazine-1,6-dicarboxylic Acid. *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 9459-9460.
- Mentel,M.; Ahuja,E.G.; Mavrodi,D.V.; Breinbauer,R.; Thomashow,L.S.; Blankenfeldt,W. 2009. Of Two Make One: The Biosynthesis of Phenazines. *ChemBiochem.* **10**, 2295-2304.
- Metsä-Ketelä,M.; Salo,V.; Halo,L.; Hautala,A.; Hakala,J.; Mäntsälä,P.; Ylihonko,K. 1999. An efficient approach for screening minimal PKS genes from *Streptomyces*. *FEMS Microbiol. Lett.* **180**, 1-6.

- Metsä-Ketelä, M.; Ylihönko, K.; Mäntsälä, P. 2004. Partial activation of a silent angucycline-type gene cluster from a rubromycin β producing *Streptomyces* sp. PGA64. *J. Antibiot.* **57**, 502-510.
- Mitova, M.I.; Lang, G.; Wiese, J.; Imhoff, J.F. 2008. Subinhibitory Concentrations of Antibiotics Induce Phenazine Production in a Marine *Streptomyces* sp. *J. Nat. Prod.* **71**, 824-827.
- Moore, B.S.; Hopke, J.N. 2001. Discovery of a New Bacterial Polyketide Biosynthetic Pathway. *Chembiochem.* **2**, 35-38.
- Mootz, H.D.; Schwarzer, D.; Marahiel, M.A. 2002. Ways of Assembling Complex Natural Products on Modular Nonribosomal Peptide Synthetases. *Chembiochem.* **3**, 490-504.
- Morishita, T.; Sato, A.; Ando, T.; Oizumi, K.; Miyamoto, M.; Enokita, R.; Okazaki, T. 1998. A novel bone resorption inhibitor, A-75943 isolated from *Streptomyces* sp. SANK 61296. *J. Antibiot.* **51**, 531-538.
- Mukku, V.J.; Speitling, M.; Laatsch, H.; Helmke, E. 2000. New Butenolides from Two Marine Streptomycetes. *J. Nat. Prod.* **63**, 1570-1572.
- Muyzer, G.; de Waal, E.C.; Uitterlinden, A.G. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 695-700.
- Nagle, D.G.; McClatchey, W.C.; Gerwick, W.H. 1992. New Glycosphingolipids from the Marine Sponge *Halichondria panicea*. *J. Nat. Prod.* **55**, 1013-1017.
- Nakamura, S.; Rai, M.; Karasawa, K.; Yonehara, H. 1957. On an antibiotic, mycospocidin. *J. Antibiot.* **10**, 248-253.
- Nakano, H.; Yoshida, M.; Shirahata, K.; Ishii, S.; Arai, Y.; Morimoto, M.; Tomita, F. 1982. Senacarcin A, a new antitumor antibiotic produced by *Streptomyces endus* subsp. *aureus*. *J. Antibiot.* **35**, 760-762.
- Nakayama, T.; Homma, Y.; Hashidoko, Y.; Mizutani, J.; Tahara, S. 1999. Possible Role of xanthobaccins Produced by *Stenotrophomonas* sp. Strain SB-K88 in Suppression of Sugar Beet Damping-Off Disease. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 4334-4339.
- Nett, M.; Ikeda, H.; Moore, B.S. 2009. Genomic basis for natural product biosynthetic diversity in the actinomycetes. *Nat. Prod. Rep.* **26**, 1362-1384.
- Newman, D.J.; Cragg, G.M. 2007. Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 years. *J. Nat. Prod.* **70**, 461-477.
- Newman, D.J.; Cragg, G.M.; Snader, K.M. 2003. Natural Products as Sources of New Drugs over the Period 1981-2002. *J. Nat. Prod.* **66**, 1022-1037.
- Nishimoto, Y.; Sakuda, S.; Takayama, S.; Yamada, Y. 1991. Isolation and characterization of new allosamidins. *J. Antibiot.* **44**, 716-722.
- O'Hagan, D. 1991. The polyketide metabolites. (Ellis Horwood Series in Organic Chemistry). Ellis Horwood Ltd. Chichester. New York. 1. Auflage. 250 Seiten.
- Ohnishi, Y.; Kameyama, S.; Onaka, H.; Horinouchi, S. 1999. The A-factor regulatory cascade leading to streptomycin biosynthesis in *Streptomyces griseus*: identification of a target gene of the A-factor receptor. *Mol. Microbiol.* **34**, 102-111.

- Oka,H.; Yoshinari,T.; Murai,T.; Kawamura,K.; Satoh,F.; Funaishi,K.; Okura,A.; Suda,H.; Okanishi,M.; Shizuri,Y. 1991. A new topoisomerase-II inhibitor, BE-10988, produced by a streptomycete. I. Taxonomy, fermentation, isolation and characterization. *J. Antibiot.* **44**, 486-491.
- Okabe,T; Suda,H.; Sato,F.; Okanishi,M. 1990. Isolation of antitumor agent BE-7585A from *Amycolatopsis orientalis* subsp. *vinearia*. [JP 02164894].
- Okami,Y.; Okazaki,T. 1978. Actinomycetes in marine environments. *Nocardia* and *Streptomyces*. Proceedings from the International Symposium on *Nocardia* and *Streptomyces*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart. Seite 145-151.
- Olano,C.; Méndez,C.; Salas,J.A. 2009. Antitumor Compounds from Marine Actinomycetes. *Mar. Drugs.* **7**, 210-248.
- Oliynyk,M.; Samborsky,M.; Lester,J.B.; Mironenko,T.; Scott,N.; Dickens,S.; Haydock,S.F.; Leadlay,P.F. 2007. Complete genome sequence of the erythromycin-producing bacterium *Saccharopolyspora erythraea* NRRL23338. *Nat. Biotechnol.* **25**, 447-453.
- Ōmura,S.; Ikeda,H.; Ishikawa,J.; Hanamoto,A.; Takahashi,C.; Shinose,M.; Takahashi,Y.; Horikawa,H.; Nakazawa,H.; Osonoe,T.; Kikuchi,H.; Shiba,T.; Sakaki,Y.; Hattori,M. 2001. Genome sequence of an industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*: Deducing the ability of producing secondary metabolites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 12215-12220.
- Ōmura,S.; Tanaka,Y.; Nakagawa,A.; Iwai,Y.; Inoue,M.; Tanaka,H. 1982. Irumamycin, a new antibiotic active against phytopathogenic fungi. *J. Antibiot.* **35**, 256-257.
- Otake,N.; Kakinuma,K.; Yonehara,H. 1973. Studies on detoxin complex, the selective antagonists of blasticidin S. II. Separation of detoxin complex and characterization of two active principles, detoxin C 1 and D 1. *Agr. Biol. Chem.* **37**, 2777-2780.
- Pathom-aree,W.; Stach,J.E.; Ward,A.C.; Horikoshi,K.; Bull,A.T.; Goodfellow,M. 2006. Diversity of actinomycetes isolated from Challenger Deep sediment (10,898 m) from the Mariana Trench. *Extremophiles.* **10**, 181-189.
- Paul,V.J.; Ritson-Williams,R. 2008. Marine chemical ecology. *Nat. Prod. Rep.* **25**, 662-695.
- Penesyan,A.; Kjelleberg,S.; Egan,S. 2010. Development of Novel Drugs from Marine Surface Associated Microorganisms. *Mar. Drugs.* **8**, 438-459.
- Pérez Baz,J., Cañedo,L.M. & Fernández Puentes,J.L.; Silva Elipe,M.V. 1997. Thiocoraline, a Novel Depsipeptide with Antitumor Activity Produced by a Marine *Micromonospora*. II. Physico-chemical Properties and Structure Determination. *J. Antibiot.* **50**, 738-741.
- Perovic,S.; Wichels,A.; Schütt,C.; Gerds,G.; Pahler,S.; Steffen,R.; Müller,W.E.G. 1998. Neuroactive compounds produced by bacteria from the marine sponge *Halichondria panicea*: activation of the neuronal NMDA receptor. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **6**, 125-133.
- Petersen,F.; Zähler,H.; Metzger,J.W.; Freund,S.; Hummel,R.P. 1993. Germicidin, an autoregulative germination inhibitor of *Streptomyces viridochromogenes* NRRL B-1551. *J. Antibiot.* **46**, 1126-1138.
- Piel,J. 2002. A polyketide synthase-peptide synthetase gene cluster from an uncultured bacterial symbiont of *Paederus* beetles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 14002-14007.
- Piel,J. 2004. Metabolites from symbiotic bacteria. *Nat. Prod. Rep.* **21**, 519-538.
- Piel,J.; Hertweck,C.; Shipley,P.R.; Hunt,D.M.; Newman,M.S.; Moore,B.S. 2000. Cloning, sequencing and analysis of the enterocin biosynthesis gene cluster from the marine isolate

'*Streptomyces maritimus*': evidence for the derailment of an aromatic polyketide synthase. *Chem. Biol.* **7**, 943-955.

Piel,J.; Hui,D.; Wen,G.; Butzke,D.; Platzer,M.; Fusetani,N.; Matsunaga,S. 2004. Antitumor polyketide biosynthesis by an uncultivated bacterial symbiont of the marine sponge *Theonella swinhoei*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**, 16222-16227.

Pierson,L.S.; Gaffney,T.; Lam,S.; Gong,F. 1995. Molecular analysis of genes encoding phenazine biosynthesis in the biological control bacterium. *Pseudomonas aureofaciens* 30-84. *FEMS Microbiol. Lett.* **134**, 299-307.

Pimentel-Elardo,S.M.; Kozytska,S.; Bugni,T.S.; Ireland,C.M.; Moll,H.; Hentschel,U. 2010. Anti-Parasitic Compounds from *Streptomyces* sp. Strains Isolated from Mediterranean Sponges. *Mar. Drugs.* **8**, 373-380.

Podojil,M.; Gerber,N.N. 1967. The Biosynthesis of 1,6-Phenazinediol 5,10-Dioxide (Iodinin) by *Brevibacterium iodinum*. *Biochemistry.* **6**, 2701-2705.

Price-Whelan,A.; Dietrich,L.E.; Newman,D.K. 2006. Rethinking 'secondary' metabolism: physiological roles for phenazine antibiotics. *Nat. Chem. Biol.* **2**, 71-78.

Proksch,P. 2004. Bedeutung von Naturstoffen für die Pharmazie. Seite. 4-13. Wissenschaftlicher Beirat der Bundesregierung Globale Umweltveränderung (WBGU).

Proksch,P.; Edrada,R.A.; Ebel,R. 2002. Drugs from the seas - current status and microbiological implications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **59**, 125-134.

Puder,C. 1998. Neue Streptazoline und Rubiginone aus Streptomyceten durch Variation der Kultivierungsbedingungen sowie Untersuchungen zur Struktur und Biosynthese der Rubromycine. Dissertation. Georg-August-Universität Göttingen.

Puder,C.; Krastel,P.; Zeeck,A. 2000. Streptazones A, B1, B2, C, and D: New Piperidine Alkaloids from Streptomycetes. *J. Nat. Prod.* **63**, 1258-1260.

Pusecker,K.; Laatsch,H.; Helmke,E.; Weyland,H. 1997. Dihydrophencomycin methyl ester, a new phenazine derivative from a marine Streptomycete. *J. Antibiot.* **50**, 479-483.

Qiu,J. 2010. It's a microbial world. *Nature News*. doi:10.1038/news.2010.190

Quadri,L.E.N.; Sello,J.; Keating,T.A.; Weinreb,P.H.; Walsh,C.T. 1998. Identification of a *Mycobacterium tuberculosis* gene cluster encoding the biosynthetic enzymes for assembly of the virulence-conferring siderophore mycobactin. *Chem. Biol.* **5**, 631-645.

Rainey,F.A.; Ward-Rainey,N.; Kroppenstedt,R.M.; Stackebrandt,E. 1996. The Genus *Nocardiopsis* Represents a Phylogenetically Coherent taxon and a Distinct Actinomycete Lineage: Proposal of *Nocardiopsaceae* fam. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **46**, 1088-1092.

Rasmussen,R.R.; Nuss,M.E.; Scherr,M.H.; Mueller,S.L.; McAlpine,J.B.; Mitscher,L.A. 1986. Benzanthrins A and B, a new class of quinone antibiotics. II. Isolation, elucidation of structure and potential antitumor activity. *J. Antibiot.* **39**, 1515-1526.

Ratledge,C.; Marshall,B.J. 1972. Iron transport in *Mycobacterium smegmatis*: The role of mycobactin. *Biochim. Biophys. Acta.* **279**, 58-74.

Ratledge,C.; Snow,G.A. 1974. Isolation and structure of nocobactin NA, a lipid-soluble iron-binding compound from *Nocardia asteroides*. *Biochem. J.* **139**, 407-413.

- Reading,C.; Cole,M. 1977. Clavulanic Acid: a Beta-Lactamase-Inhiting Beta-Lactam from *Streptomyces clavuligerus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **11**, 852-857.
- Reddy,V.M.; O'Sullivan,J.F.; Gangadharam,P.R. 1999. Antimycobacterial activities of riminophenazines. *J. Antimicrob. Chemother.* **43**, 615-623.
- Renner,M.K.; Shen,Y.-C.; Cheng,X.-C.; Jensen,P.R.; Frankmoelle,W.; Kauffman,C.A.; Fenical,W.; Lobkovsky,E.; Clardy,J. 1999. Cyclomarins A-C, New Antiinflammatory Cyclic Peptides Produced by a Marine Bacterium (*Streptomyces* sp.). *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 11273-11276.
- Řezanka,T.; Spížek,J.; Přikrylová,V.; Dembitsky,V.M. 2004 Four New Derivatives of Trihomononactin Acid from *Streptomyces globisporus*. *European. J. Org. Chem.* **2004**, 4239-4244.
- Řezanka,T.; Spížek,J.; Přikrylová,V.; Prell,A.; Dembitsky,V.M. 2004. Five new derivatives of nonactin and homo-nonactin acids from *Streptomyces globisporus*. *Tetrahedron.* **60**, 4781-4787.
- Rhodes,A.; Fantes,K.H.; Boothroyd,B., McGonagle,M.P.; Crosse,R. 1961. Venturicidin: a new antifungal antibiotic of potential use in agriculture. *Nature.* **192**, 952-954.
- Rithner,C.D.; Bunge,R.H.; Bloem,R.J.; French,J.C.; Xu,C.; Clardy,J. 1987. PD 125375, a novel metabolite coproduced with tomaymycin. *J. Org. Chem.* **52**, 298-300.
- Rohr,J.; Thiericke,R. 1992. Angucycline group antibiotics. *Nat. Prod. Rep.* **9**, 103-137.
- Romero,F.; Espliego,F.; Pérez,B.J.; García de Quesada,T.; Grávalos,D.; de la Calla,F.; Fernández-Puentes,J.L. 1997. Thiocoraline, a new depsipeptide with antitumor activity produced by a marine *Micromonospora*. I. Taxonomy, fermentation, isolation, and biological activities. *J. Antibiot.* **50**, 734-737.
- Roy,S.K.; Inouye,Y.; Nakamura,S.; Furukawa,J.; Okuda,S. 1987. Isolation, structural elucidation and biological properties of neoenactins B₁, B₂, M₁ and M₂, neoenactin congeners. *J. Antibiot.* **40**, 266-274.
- Sahly,H.; Schubert,S.; Harder,J.; Rautenberg,P.; Ullmann,U.; Schröder,J.; Podschun,R. 2003. *Burkholderia* is Highly Resistant to Human Beta-Defensin 3. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**, 1739-1741.
- Sakuda,S.; Isogai,A.; Matsumoto,S.; Suzuki,A. 1987. Search for microbial insect growth regulators. II. Allosamidin, a novel insect chitinase inhibitor. *J. Antibiot.* **40**, 296-300.
- Salomon,C.E.; Magarvey,N.A.; Sherman,D.H. 2004. Merging the potential of microbial genetics with biological and chemical diversity: an even brighter future for marine natural product drug discovery. *Nat. Prod. Rep.* **21**, 105-121.
- Sanger,F.; Nicklen,S.; Coulson,A.R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **74**, 5463-5467.
- Sato,Y.; Taketomo,T.; Yoshiyama,Y.; Yokota,I. 1992. Catechol derivative, its manufacture with *Streptomyces*, and its uses as anti-inflammatory and anti-allergy agent. [JP patent 04,360,855].
- Scheuermayer,M.; Pimentel-Elardo,S.; Fieseler,L.; Grozdanov,L.; Hentschel,U. 2006. Microorganisms of Sponges: Phylogenetic Diversity and Biotechnological Potential. In: *Frontiers in marine biotechnology*. Horizon Scientific Press, London, United Kingdom. 1. Auflage. Seite 289-312.

Schrimpf, G. 2002. Gentechnische Methoden. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin. 3. Auflage. 512 Seiten.

Shank, E.A.; Kolter, R. 2009. New developments in microbial interspecies signaling. *Curr. Opin. Microbiol.* **12**, 205-214.

Shigemori, H.; Komaki, H.; Yazawa, K.; Mikami, Y.; Nemoto, A.; Tanaka, Y.; Sasaki, T.; In, Y.; Ishida, T.; Kobayashi, J. 1998. Brasilicardin A. A Novel Tricyclic Metabolite with Potent Immunosuppressive Activity from Actinomycete *Nocardia brasiliensis*. *J. Org. Chem.* **63**, 6900-6904.

Shigemori, H.; Tanaka, Y.; Yazawa, K.; Mikami, Y.; Kobayashi, J. 1996. Brasilinolide A, New Immunosuppressive Macrolide from Actinomycete *Nocardia brasiliensis*. *Tetrahedron.* **52**, 9031-9034.

Sieber, S.A.; Marahiel, M.A. 2003. Learning from Nature's Drug Factories: Nonribosomal Synthesis of Macrocytic Peptides. *J. Bacteriol.* **185**, 7036-7043.

Siegl, A.; Hentschel, U. 2009. PKS and NRPS gene clusters from microbial symbiont cells of marine sponges by whole genome amplification. *Environ. Microbiol. Rep.* **2**, 507-513.

Snow, G.A. 1970. Mycobactins: Iron-Chelating Growth Factors from Mycobacteria. *Bacteriol. Rev.* **34**, 99-125.

Soria-Mercado, I.E.; Prieto-Davo, A.; Jensen, P.R.; Fenical, W. 2005. Antibiotic Terpenoid Chloro-Dihydroquinones from a New Marine Actinomycete. *J. Nat. Prod.* **68**, 904-910.

Storch, V.; Welsch, U. 2009. Porifera, Schwämme. In: Kükenthal Zoologisches Praktikum. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg. 26. Auflage. 532 Seiten.

Süsstrunk, U.; Pidoux, J.; Taubert, S.; Ullmann, A.; Thompson, C.J. 1998. Pleiotropic effects of cAMP on germination, antibiotic biosynthesis and morphological development in *Streptomyces coelicolor*. *Mol. Microbiol.* **30**, 33-46.

Suzuki, M.; Nagahama, N.; Seki, Y.; Yamaguchi, T. 1975. Antibiotic production by *Streptomyces*. [JP patent 50,126,880].

Takahashi, K.; Tsuda, E.; Kurosawa, K. 2001. SW-163A and B, Novel Immunosuppressants Produced by *Streptomyces* sp. *J. Antibiot.* **54**, 867-873.

Takano, E.; Chakraborty, R.; Nihira, T.; Yamada, Y.; Bibb, M.J. 2001. A complex role for the γ -butyrolactone SCB1 in regulating antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol. Microbiol.* **41**, 1015-1028.

Takashima, M.; Sakai, H. 1960. A new toxic substance, teleocidin, produced by *Streptomyces*. *Bull. Arg. Chem. Soc. Japan* **24**, 647-651.

Takazawa, S.; Shirohata, K.; Sato, S.; Takahashi, K. 1980. 3-O-Demethylfortimicins. [JP patent 55,045,631].

Tanaka, Y.; Komaki, H.; Yazawa, K.; Mikami, Y.; Nemoto, A.; Tojyo, T.; Kadowaki, K.; Shigemori, H.; Kobayashi, J. 1997. Brasilinolide A, a new macrolide antibiotic produced by *Nocardia brasiliensis*: Producing strain, isolation and biological activity. *J. Antibiot.* **50**, 1036-1041.

Taniguchi, M.; Watanabe, M.; Nagai, K.; Suzumura, K.; Suzuki, K.; Tanaka, A. 2000. γ -Pyrone compounds with selective and potent anti-*Helicobacter pylori* activity. *J. Antibiot.* **53**, 844-847.

- Tata,M.; Menawat,A.S. 1994. Cyclic AMP regulation of tylosin biosynthesis and secondary metabolism in *Streptomyces fradiae*. *Biotechnol. Bioeng.* **44**, 283-290.
- Taylor,M.W.; Radax,R.; Steger,D.; Wagner,M. 2007. Sponge-Associated Microorganisms: Evolution, Ecology, and Biotechnological Potential. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **71**, 295-347.
- Thiel,V.; Leininger,S.; Schmaljohann,R.; Brümmer,F.; Imhoff,J.F. 2007. Sponge-specific Bacterial Associations of the Mediterranean Sponge *Chondrilla nucula* (Demospongiae, Tetractinomorpha). *Microb. Ecol.* **54**, 101-111.
- Thiel,V.; Neulinger,S.C.; Staufenberger,T.; Schmaljohann,R.; Imhoff,J.F. 2007. Spatial distribution of sponge-associated bacteria in the Mediterranean sponge *Tethya aurantium*. *FEMS Microbiol. Ecol.* **59**, 47-63.
- Thomashow,L.S.; Weller,D.M.; Bonsall,R.F.; Pierson,L.S. 1990. Production of the Antibiotic Phenazine-1-Carboxylic Acid by Fluorescent *Pseudomonas* Species in the Rhizosphere of Wheat. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 908-912.
- Thompson,J.D.; Gibson,T.J.; Plewniak,F.; Jeanmougin,F.; Higgins,D.G. 1997. The CLUSTAL_X Windows Interface: Flexible Strategies for Multiple Sequence Alignment Aided by Quality Analysis Tools. *Nucleic Acids Res.* **25**, 4876-4882.
- Thompson,R.Q.; Presti,E.A. 1967. Nebramycin, a new broad-spectrum antibiotic complex. 3. Isolation and chemical-physical properties. *Antimicrob. Agents Chemother.* **7**, 332-340.
- Thomson,C.J.; Power,E.; Ruebsamen-Waigmann,H.; Labischinski,H. 2004. Antibacterial research and development in the 21st Century - an industry perspective of the challenges. *Curr. Opin. Microbiol.* **7**, 445-450.
- Tohma,S.; Kondo,H.; Yokotsuka,J.; Iwamoto,J.; Matsushashi,G.; Ito,T.; Seto,H. 1989. Ashimycins A and B, new streptomycin analogues. *J. Antibiot.* **42**, 1205-1212.
- Toriya,M.; Yaginuma,S.; Murofushi,S.; Ogawa,K.; Muto,N.; Hayashi,M.; Matsumoto,K. 1993. Zincphyrin, a novel coproporphyrin III with zinc from *Streptomyces* sp. *J. Antibiot.* **46**, 196-200.
- Trowbridge,I.S.; Omary,M.B. 1981. Human cell surface glycoprotein related to cell proliferation is the receptor for transferrin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **78**, 3039-3043.
- Trück,H.U.; Chmiel,H.; Hammes,W.P.; Trösch,W. 1990. Effects of oxygen supply on the production of nikkomycin with immobilized cells of *Streptomyces tendae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **34**, 1-4.
- Tsuchiya,K.; Kobayashi,S.; Harada,T.; Kurokawa,T.; Nakagawa,T.; Shimada,N.; Kobayashi,K. 1995. Gualamycin, a novel acaricide produced by *Streptomyces* sp. NK11687. I: Taxonomy, production, isolation, and preliminary characterization. *J. Antibiot.* **48**, 626-629.
- Tsuda,M.; Nemoto,A.; Komaki,H.; Tanaka,Y.; Yazawa,K.; Mikami,Y.; Kobayashi,J. 1999. Nocarasin A-C and Brasiliquinone D, New Metabolites from the Actinomycete *Nocardia brasiliensis*. *J. Nat. Prod.* **62**, 1640-1642.
- Tsuda,M.; Sato,H.; Tanaka,Y.; Yazawa,K.; Mikami,Y.; Sasaki,T.; Kobayashi,J. 1996. Brasiliquinones A-C, new cytotoxic benz[a]anthraquinones with an ethyl group at C-3 from actinomycete *Nocardia brasiliensis*. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **1**, 1773-1175.
- Tsuda,M.; Yamakawa,M.; Oka,S.; Tanaka,Y.; Hoshino,Y.; Mikami,Y.; Sato,A.; Fujiwara,H.; Ohizumi,Y.; Kobayashi,J. 2005. Brasilibactin A, a Cytotoxic Compound from Actinomycete *Nocardia brasiliensis*. *J. Nat. Prod.* **68**, 462-464.

- Turner,J.M.; Messenger,A.J. 1986. Occurrence, Biochemistry and Physiology of Phenazine Pigment Production. In: *Advances in Microbial Physiology*. 27. Auflage. Seite 211-275.
- Ueda,K.; Kawai,S.; Ogawa,H.; Kiyama,A.; Kubota,T.; Kawanobe,H.; Beppu,T. 2000. Wide distribution of interspecific stimulatory events on antibiotic production and sporulation among *Streptomyces* species. *J. Antibiot.* **53**, 979-982.
- Ueda,K.; Kim,K.M.; Beppu,T.; Horinouchi,S. 1995. Overexpression of a Gene Cluster Encoding a Chalcone Synthase-like Protein Confers Redbrown Pigment Production in *Streptomyces griseus*. *J. Antibiot.* **48**, 638-646.
- Uesato,S.; Tokunaga,T.; Mizuno,Y.; Fujioka,H.; Kada,S.; Kuwajima,H. 2000. Absolute Stereochemistry of Gastric Antisecretory Compound P371A1 and Its Congener P371A2 from *Streptomyces* Species P371. *J. Nat. Prod.* **63**, 787-792.
- Ui,H.; Shiomi,K.; Suzuki,H.; Hatano,H.; Morimoto,H.; Yamaguchi,Y.; Masuma,R.; Sunazuka,T.; Shimamura,H.; Sakamoto,K.; Kita,K.; Miyoshi,H.; Tomoda,H.; Ômura,S. 2006. Verticipyronone, a New NADH-fumarate Reductase Inhibitor, Produced by *Verticillium* sp. FKI-1083. *J. Antibiot.* **59**, 785-790.
- Uramoto,M.; Otake,N.; Ogawa,Y.; Yonehara,H. 1969. The structures of Bundlin A (lankacidin) and Bundlin B. *Tetrahedron Lett.* **27**, 2249-2254.
- van Niekerk,S.; Huygens,F.; Van Rensburg,C.E. 1997. A time-kill study to evaluate the in-vitro activity of clofazimine in combination with cefotaxime against a penicillin - and cefotaxime-resistant strain of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Antimicrob. Chemother.* **40**, 602-604.
- Van Rensburg,C.E.; Jooné,G.K.; O'Sullivan,J.F.; Anderson,R. 1992. Antimicrobial activities of clofazimine and B669 are mediated by lysophospholipids. *Antimicrob. Agents Chemother.* **36**, 2729-2735.
- van Rij,E.T.; Wesselink,M.; Chin-A-Woeng,T.F.C., Bloemberg,G.V.; Lugtenberg,B.J. 2004. Influence of Environmental Conditions on the Production of Phenazine-1-Carboxamide by *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391. *Mol. Plant Microbe Interact.* **17**, 557-566.
- Van Valen,L. 1974. Molecular evolution as predicted by natural selection. *J. Mol. Evol.* **3**, 89-101.
- Vergne,A.F.; Walz,A.J.; Miller,M.J. 2000. Iron chelators from mycobacteria (1954-1999) and potential therapeutic applications. *Nat. Prod. Rep.* **17**, 99-116.
- Vogel,G. 2008. The Inner Lives of Sponges. *Science.* **320**, 1028-1030.
- von Nussbaum,F.; Brands,M.; Hinzen,B.; Weigand,S.; Habich,D. 2006. Antibacterial Natural Products in Medicinal Chemistry - Exodus or Revival? *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **45**, 5072-5129.
- Wachtel,H. 1983 Potential antidepressant activity of rolipram and other selective cyclic adenosine 3',5'-monophosphate phosphodiesterase inhibitors. *Neuropharmacology.* **22**, 267-272.
- Waksman,S.A.; Lechevalier,H.A. 1949. Neomycin, a New Antibiotic Active against Streptomycin-Resistant Bacteria, including Tuberculosis Organisms. *Science.* **109**, 305-307.
- Waksman,S.A.; Lechevalier,H.A.; Schaffner,C.P. 1965. Candicidin and Other Polyenic Antifungal Antibiotics. *Bull. World Health Organ.* **33**, 219-226.
- Wallace,B.J.; Tai,P.C.; Davis,B.D. 1979. Mechanism of action of antibacterial agents. Streptomycin and related antibiotics. *Antibiotics.* **5**, 272-303.

- Walsh, C. 2003. Where will new antibiotics come from? *Nat. Rev. Microbiol.* **1**, 65-70.
- Warnick-Pickle, D.J.; Byrne, K.M.; Pandey, R.C.; White, R.J. 1981. Fredericamycin A, a new antitumor antibiotic. II. Biological properties. *J. Antibiot.* **34**, 1402-1407.
- Waters, C.M.; Bassler, B.L. 2005. Quorum Sensing: Cell-to-Cell Communication in Bacteria. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **21**, 319-346.
- Watve, M.G.; Tickoo, R.; Jog, M.M.; Bhole, B.D. 2001. How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*? *Arch. Microbiol.* **176**, 386-390.
- Webb, M.R.; Donald, C.; Taylor, R.J.K. 2006. A general route to the *Streptomyces* derived inthomycin family: the first synthesis of (+)-inthomycin B. *Tet. Lett.* **47**, 549-552.
- Webster, N.S. 2007. Sponge disease: a global threat? *Environ. Microbiol.* **9**, 1363-1375.
- Webster, N.S.; Hill, R.T. 2001. The culturable microbial community of the Great Barrier Reef sponge *Rhopaloeides odorabile*. *Appl. Environ. Microbiol.* **138**, 843-851.
- Webster, N.S.; Wilson, K.J.; Blackall, L.L.; Hill, R.T. 2001. Phylogenetic Diversity of Bacteria Associated with the Marine Sponge *Rhopaloeides odorabile*. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 434-444.
- Wehner, R.; Gehring, W. 2007. Zoologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York. 24. Auflage. 954 Seiten.
- Wehrl, M.; Steinert, M.; Hentschel, U. 2007. Bacterial Optake by the Marine Sponge *Aplysina aerophoba*. *Microb. Ecol.* **53**, 355-365.
- Weinstein, J.M.; Luedemann, G.M.; Oden, E.M.; Wagman, G.H.; Rosselet, J.P.; Marquez, J.A.; Coniglio, C.T.; Charney, W.; Herzog, H.L.; Black, J. 1963. Gentamicin, a New Antibiotic Complex from *Micromonospora*. *J. Med. Chem.* **6**, 463-464.
- Weisburg, W.G.; Barns, S.M.; Pelletier, D.A.; Lane, D.J. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* **173**, 697-703.
- Weissman, K.J.; Bycroft, M.; Cutter, A.L.; Hanefeld, U.; Frost, E.J.; Timoney, M.C.; Harris, R.; Handa, S.; Roddis, M.; Staunton, J.; Leadlay, P.F. 1998. Evaluating precursor-directed biosynthesis towards novel erythromycins through *in vitro* studies on a bimodular polyketide synthase. *Chem. Biol.* **5**, 743-754.
- Weissman, K.J.; Bycroft, M.; Staunton, J.; Leadlay, P.F. 1998. Origin of Starter Units for Erythromycin Biosynthesis. *Biochemistry.* **37**, 11012-11017.
- Weissman, K.J.; Müller, R. 2008. Protein-Protein Interactions in Multienzyme Megasyntetases. *ChemBiochem.* **9**, 826-848.
- Wendt-Pienkowski, E.; Huang, Y.; Zhang, J.; Li, B.; Jiang, H.; Kwon, H.; Hutchinson, C.R.; Shen, B. 2005. Cloning, Sequencing, Analysis, and Heterologous Expression of the Fredericamycin Biosynthetic Gene Cluster from *Streptomyces griseus*. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 16442-16452.
- Westley, J.W.; Liu, C.M.; Sello, L.H.; Troupe, N.; Blount, J.F.; Chiu, A.M.; Todaro, L.J.; Miller, P.A.; Liu, M. 1984. Isolation and characterization of antibiotic X-14931A, the naturally occurring 19-deoxyglycone of dianemycin. *J. Antibiot.* **37**, 813-815.
- Weyland, H. 1969. Actinomycetes in North Sea and Atlantic Ocean sediments. *Nature.* **223**, 858.

- Wichels,A.; Würtz,S.; Döpke,H.; Schütt,C.; Gerdt,G. 2006. Bacterial diversity in the breadcrumb sponge *Halichondria panicea* (Pallas). *FEMS Microbiol. Ecol.* **56**, 102-118.
- Wicke,C.; Hüners,M.; Wray,V.; Nimtz,M.; Bilitewski,U.; Lang,S. 2000. Production and Structure Elucidation of Glycoglycerolipids from a Marine Sponge-Associated *Microbacterium* Species. *J. Nat. Prod.* **63**, 621-626.
- Wiese,J.; Thiel,V.; Nagel,K.; Staufenberg,T.; Imhoff,J.F. 2009. Diversity of Antibiotic-Active Bacteria Associated with the Brown Alga *Laminaria saccharina* from the Baltic Sea. *Mar. Biotechnol.* **11**, 287-300.
- Wiesmann,K.E.; Cortés,J.; Brown,M.J.; Cutter,A.L.; Staunton,J.; Leadlay,P.F. 1995. Polyketide synthesis *in vitro* on a modular polyketide synthase. *Chem. Biol.* **2**, 583-589.
- Wilk,W.; Waldmann,H.; Kaiser,M. 2009. γ -pyrone natural products-A privileged compound class provided by nature. *Bioorg. Med. Chem.* **17**, 2304-2309.
- Wilkinson,C.R. 1984. Immunological Evidence for the Precambrian Origin of Bacterial Symbioses in Marine Sponges. *Proc. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* **220**, 509-517.
- Willey,J.M.; van der Donk,W.A. 2007. Lantibiotics: Peptides of Diverse Structure and Function. *Annu. Rev. Microbiol.* **61**, 477-501.
- Wilson,R.; Sykes,D.A.; Watson,D.; Rutman,A.; Taylor,G.W.; Cole,P.J. 1988. Measurement of *Pseudomonas aeruginosa* phenazine pigments in sputum and assessment of their contribution to sputum sol toxicity for respiratory epithelium. *Infect. Immun.* **56**, 2515-2517.
- Wu,M.H.; Yung,B.Y. 1994. Cell cycle phase-dependent cytotoxicity of actinomycin D in HeLa cells. *Eur. J. Pharmacol.* **270**, 203-212.
- Würtz,S. 1999. Dynamik und Diversität assoziierter Bakterienpopulationen beim Brotkrumenschwamm *Halichondria panicea* (Pallas, 1766). Diplomarbeit. Freie Universität Berlin.
- Yang,S.-W.; Chian,T.-M.; Terracciano,J.; Loebenberg,D.; Chen,G.; Patel,M.; Gullo,V.; Pramanik,B.; Chu,M. 2004. Structure elucidation of a new diketopiperazine Sch 725418 from *Micromonospora* sp. *J. Antibiot.* **57**, 345-347.
- Yanisch-Perron,C.; Vieira,J.; Messing,J. 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene.* **33**, 103-119.
- Yano,K.; Yokoi,K.; Sato,J.; Oono,J.; Kouda,T.; Ogawa,Y.; Nakashima,T. 1986. Actinopyrones A, B and C, new physiologically active substances. II. Physico-chemical properties and chemical structures. *J. Antibiot.* **39**, 38-43.
- Yarbrough,G.G.; Taylor,D.P.; Rowlands,R.T.; Crawford,M.S.; Lasure,L.L. 1993. Screening microbial metabolites for new drugs-theoretical and practical issues. *J. Antibiot.* **46**, 535-544.
- Yi,H.; Schumann,P.; Sohn,K.; Chun,J. 2004. *Serinicoccus marinus* gen. nov., sp. nov., a novel actinomycete with L-ornithine and L-serine in the peptidoglycan. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**, 1585-1589.
- Yim,G.; Wang,H.H.; Davies,J. 2007. Antibiotics as signalling molecules. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **362**, 1195-1200.
- Yin,C.; Gao,L. 2000. The microfossils in phosphate deposit in Doushantuo stage, Sinian System, Weng'an, Guizhou Province. *Chin. Sci. Bull.* **45**, 279-284.

Yoshida,M.; Hara,M.; Saitoh,Y.; Sano,H. 1990. The kapurimycins, new antitumor antibiotics produced by *Streptomyces*. Physico-chemical properties and structure determination. *J. Antibiot.* **43**, 1519-1523.

Yoshimoto,A.; Johdo,O. 1996. Anthracycline antibiotics manufacture with *Streptomyces*. [JP patent 08,113,587].

Zhang,H.; Zhang,W.; Jin,Y.; Jin,M.; Yu,X. 2008. A comparative study on the phylogenetic diversity of culturable actinobacteria isolated from five marine sponge species. *Antonie Van Leeuwenhoek.* **93**, 241-248.

Zhou,B.-N.; Sleboznick,C.; Johnson,R.K.; Mattern,M.R.; Kingston,D.G.I 2000. New Cytotoxic Manzamine Alkaloids from a Palaun Sponge. *Tetrahedron.* **56**, 5781-5784.

Zhu,L.; Ostash,B.; Rix,U.; Nur-e-Alam,M.; Mayers,A.; Luzhetskyy,A.; Mendez,C.; Salas,J.A.; Bechthold,A.; Fedorenko,V.; Rohr,J. 2005. Identification of the Function of Gene *IndM2* Encoding a Bifunctional Oxygenase-Reductase Involved in the Biosynthesis of the Antitumor Antibiotic Landomycin E by *Streptomyces globisporus* 1912 Supports the Originally Assigned Structure for Landomycinone. *J. Org. Chem.* **70**, 631-638.

10 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

∞	unendlich
1D	eindimensionale
2D	zweidimensionale
Abb.	Abbildung
Acc.-Nr.	Accession-Nummer
AchE	Acetylcholinesterase
ACP	Acyl-Carrier-Protein
ADIC	2-Amino-2-deoxyisochorsäure
AMP	Adenosinmonophosphat
AT-Domäne	Acyltransferasedomäne
ATP	Adenosintriphosphat
blast	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaare
br	bereiteres Plateau bei der jeweiligen Wellenlänge
<i>B.s.</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
bzw.	beziehungsweise
C	Kohlenstoff
ca.	circa
CaCl ₂	Calciumchlorid
CaCO ₃	Calciumcarbonat
cAMP	zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat
CD ₂ Cl ₂	deutertes Dichlormethan
C-Domäne	Kondensationsdomäne
<i>C.g.</i>	<i>Candida glabrata</i>
CLF	chain length factor
cm ²	Quadratcentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COSY	correlated spectroscopy
Cy-Domäne	Zyklisierungsdomäne
d	Dublett
DAD	Photodioden-Array-Detektor
DAHP	3-Deoxy-D-Arabinose-7-phosphat
δ_c	Chemische Verschiebung des Kohlenstoffatomsignals
dd	Dublett vom Dublett
ddd	Dublett vom Dublett vom Dublett
ddt	Dublett vom Dublett vom Triplet
DEBS	6-Deoxyerythronolide B Synthase
δ_H	Chemische Verschiebung des Wasserstoffatomsignals
d.h.	das heißt
DH-Domäne	Dehydratasedomäne
DHHA	<i>trans</i> -2,3-Dihydro-3-hydroxyanthranilsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMSO-d6	deutertes Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid = Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
dt	Dublett vom Triplet
<i>E.a.</i>	<i>Erwinia amylovora</i>
<i>E.c.</i>	<i>Escherichia coli</i>
E-Domäne	Epimerisierungs-Domäne
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzym-linked immunosorbent assay
Em	Emission
EMBL	European Molecular Biology Laboratory

EMK	Erlenmeyerkolben
ER-Domäne	Enoylreduktasedomäne
ESI	Elektrospray-Ionisation
et al.	et alteri
EtOAc	Ethylacetat
Evt	Eventuell
Ex	Extinktion
FeCitrat	Eisencitrat
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
°C	Grad Celsius
GC-Gehalt	Guanin-Cytosin-Gehalt
GSK-3 β	Glykogen Synthase Kinase 3 beta
GYM	Glucose Yeast Malt
h	hour = Stunde
H ₂ O	Wasser
HBO ₃	Perborsäure
HCL	Salzsäure
HCOOH	Ameisensäure
HIV-1-RT	Humane Immundefizienz-Virus-1 Reverse Transkriptase
HMBC	heteronuclear multiple bond coherence
<i>H. panicea</i>	<i>Halichondria panicea</i>
HPLC	high performance liquid chromatography = Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HRESIMS	high resolution electron spray ionization mass spectra
HSQC	heteronuclear single quantum coherence
Hz	Hertz
kb	Kilobasen
KBr	Kaliumbromid
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
KiWiZ	Kieler Wirkstoff-Zentrum
km	Kilometer
KR-Domäne	Ketoreduktasedomäne
KS-Domäne	β -Ketoacylsynthasedomäne
LD ₅₀	mittlere letale Dosis
LB	Lysogeny Broth
Lit	Literatur
lt	laut
m	Multipllett
mA	Milliampere
MB	Marine Broth
MB	Megabasen
M-Domäne	Methylierungsdomäne
MeCN	Acetonitril
MeOD	deuteriertes Methanol
MeOH	Methanol
MeOH- <i>d</i> 4	deuteriertes Methanol
mg	Milligramm
μ g	Mikrogramm
Mg ²⁺	Magnesium
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
MHz	Megahertz
min	Minute(n)
mL	Milliliter
μ L	Mikroliter
mm	Millimeter

mM	millimolar
μM	Mikromolar
MRSA	Methicillin resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
MS	Masse
m/z	Masse-zu-Ladung-Verhältnis
N	Stickstoff
N	Normal
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxyd
nblast	nucleotide Basic Local Alignment Search Tool
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ng	Nanogramm
NH ₄ NO ₃	Ammonium nitrate
n.i.	hat nicht ionisiert
nm	Nanometer
NMR	nuclear magnetic resonance = Kernspinresonanzspektroskopie
NOESY	nuclear overhauser enhancement spectroscopy
NRPS	nicht-ribosomale Peptid-Synthetase
O	Sauerstoff
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
Ox-Domäne	Oxidationsdomäne
PBS	Phosphate buffered saline = Phosphategepufferte Salzlösung
PCA	Phenazin-1-carboxylsäure
PCP	Peptidyl-Carrier-Protein
PCR	Polymerase chain reaction = Polymerasekettenreaktion
PDE4	Phosphodiesterase 4
<i>P.fl.</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
pg	Pikogramm
pH	potentia hydrogenii
PKS	Polyketid-Synthase
PP _i	Pyrophosphat
ppan	Phosphopantethein
<i>P.s.</i>	<i>Pseudomonas syringae</i> pvar. <i>aptata</i>
PSU	Practical Salinity Units
PTP1B	Protein Tyrosin Phosphatase 1B
PYG	Peptone Yeast Extract Glucose = Pepton Hefeextrakt Glukose
q	Quartett
qd	Quartett vom Dublett
quint	Quintett
R-Domäne	Reduktasedomäne
RP-18	Octadecylgruppen
RP-HPLC	reverse phase high performance liquid chromatography
rpm	rounds per minute = Umdrehung pro Minute
rDNA	ribosomal desoxyribonucleic acid = ribosomale Desoxyribonukleinsäure
rRNA	ribosomal ribonucleic acid = ribosomale Ribonukleinsäure
<i>R.s.</i>	<i>Ralstonia solanacearum</i>
s	schwache Intensität der angegebenen Wellenlänge
s	Sekunde
s	Singulett
<i>S.</i>	<i>Streptomyces</i>
SAM	S-Adenosylmethionin
SAP	Shrimp Alkaline Phosphatase
sh	bezeichnet das Auftreten einer Schulter bei angegebener Wellenlänge
<i>S.l.</i>	<i>Staphylococcus lentus</i>
<i>sp.</i>	species
SrCl ₂	Strontiumchlorid

<i>sub</i>	sponge symbiont ubiquitous PKS
t	Triplet
td	Triplet vom Dublett
TBE	Tris-Borat-EDTA
T-Domäne	Thiolierungs-Domäne
TE-Domäne	Thioesterase-Domäne
Temp.	Temperatur
tRNA	transfer Ribonukleinsäure
TSB	tryptic soy broth
U	Units
UV	Ultraviolett
V	Volt
VIS	visible = sichtbar
X.c.	<i>Xanthomonas campestris</i>
z.B.	zum Beispiel

11 DANKSAGUNG

Bedanken möchte ich mich bei...

Herrn Prof. Dr. Johannes F. Imhoff für die Betreuung dieser Doktorarbeit im Allgemeinen und im Besonderen für die Freiheit meinen eigenen Ideen im Rahmen dieser Arbeit nachgehen zu können und an einem solch interessanten Thema forschen zu können.

Dr. Inga Kajahn und Dr. Antje Labes nicht nur für die gute Betreuung gerade am Ende dieser Arbeit und die Hilfe bei der Strukturaufklärung des Mayamycins sondern vor allem für das tolle Mädelsbüroklima und die neueingeführten MuttiTreffen.

Dr. Birgit Ohlendorf für die gute und fröhliche Zusammenarbeit beim Bearbeiten der Nocapyrone.

Kerstin Nagel für die nette Zusammenarbeit gerade am Anfang unserer Arbeiten.

Arlette Erhard und Dr. Heidi Zinecker für die Durchführung der Aktivitätstests.

Dr. Jutta Wiese für die Betreuung und die Bereitstellung der HB und LB Stämme.

Den netten Kollegen der Marinen Mikrobiologie für das angenehme und fröhliche Arbeitsklima und für alle Ideen und Tipps.

Lieblingsfreundin/-tante Natäsch für ihre wundervolle Freundschaft, die vielen wunderbaren Mittagspausen, Spaziergänge, Donnerstagabende, ...

Uli dafür, dass er der beste Uli der Welt ist ☺

Christa und Bernd für ihre wunderbare Unterstützung in einfach Allem.

12 ERKLÄRUNG

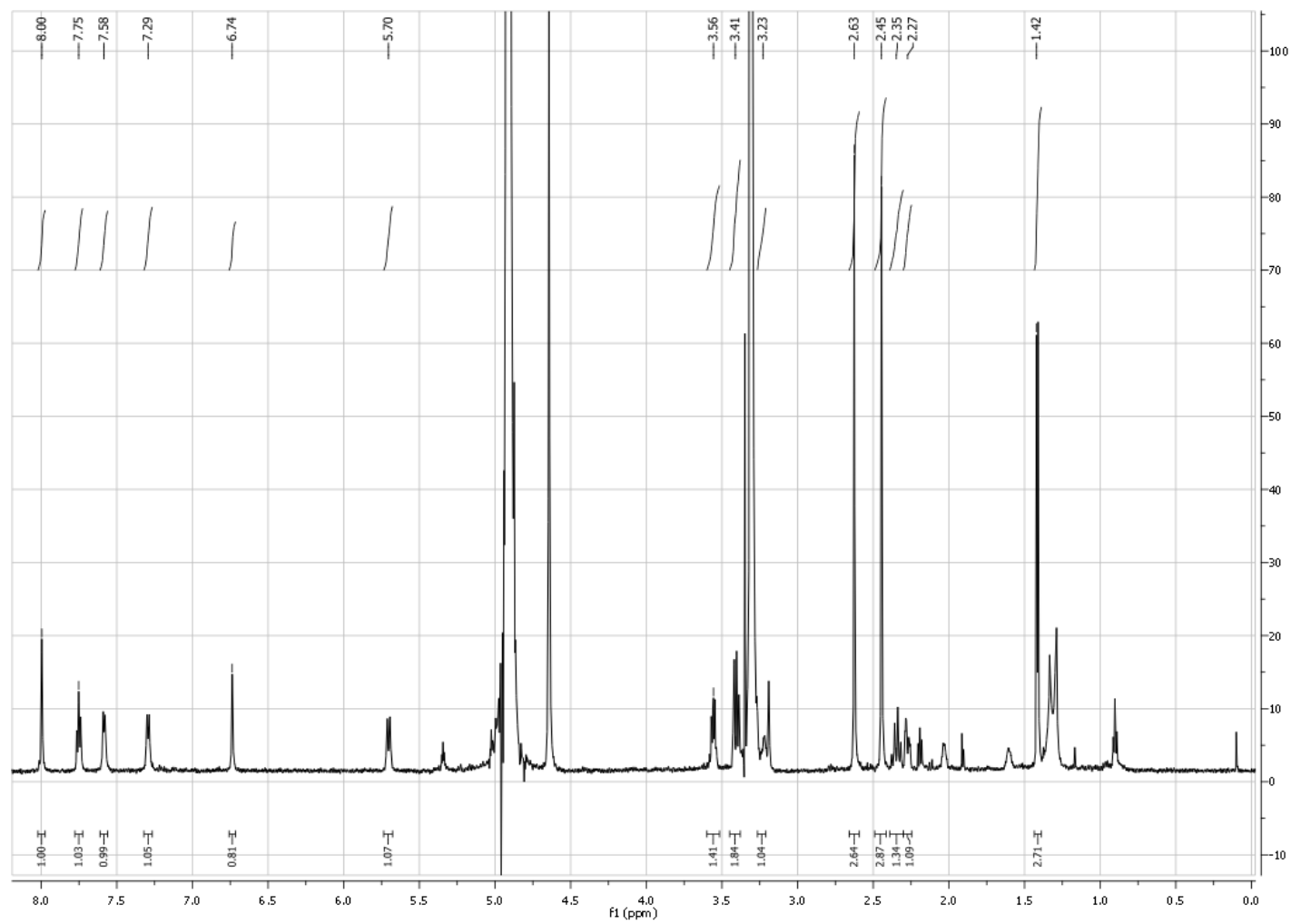
Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt habe und dass sie nach Form und Inhalt meine eigene Arbeit ist. Sie wurde keiner anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegt und entstand unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft. Dies ist mein einziges und bisher erstes Promotionsverfahren. Die Promotion soll im Fach Mikrobiologie erfolgen. Des Weiteren erkläre ich, dass ich Zuhörer bei der Disputation zulasse.

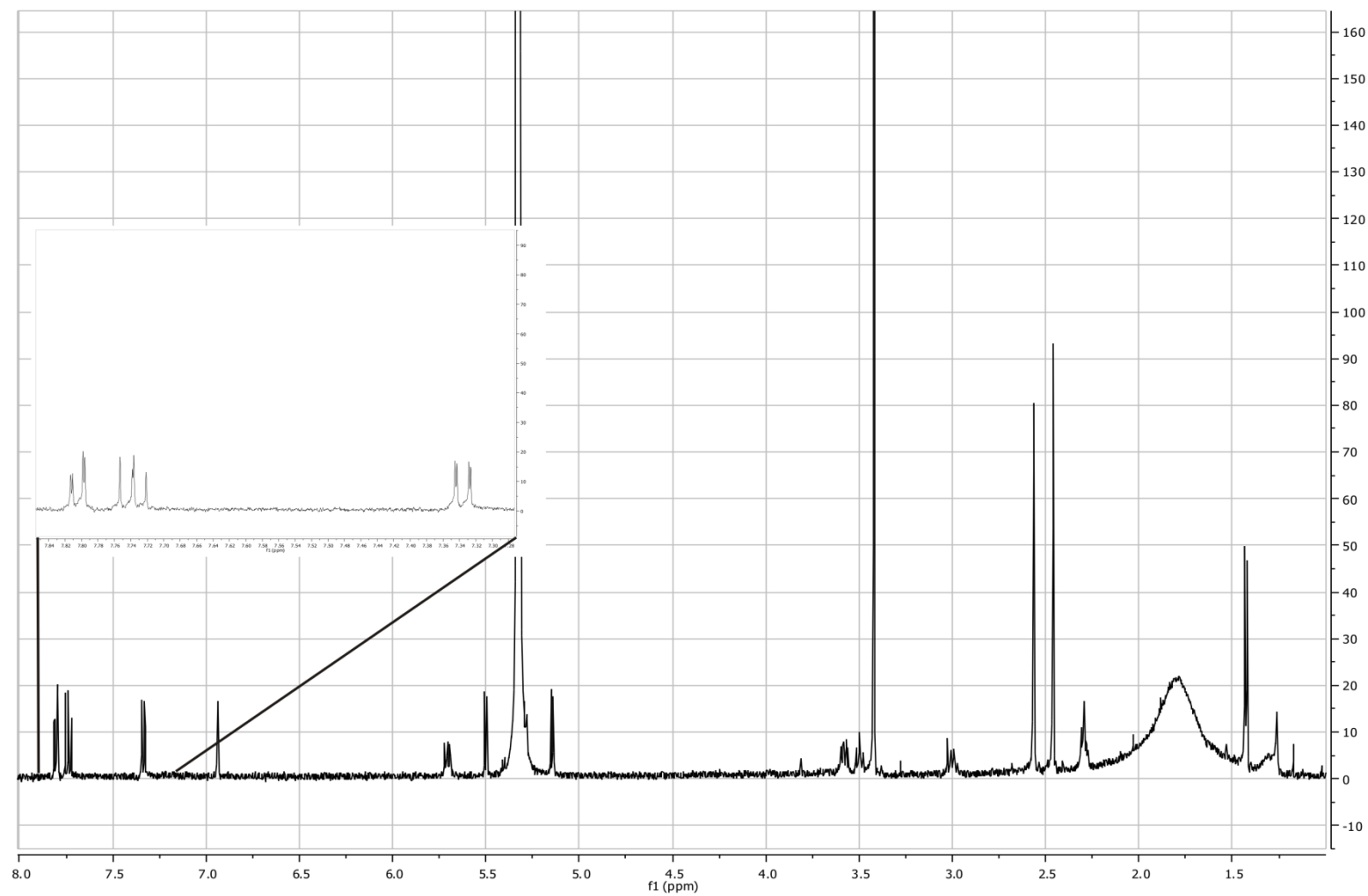
(Imke Schneemann)

13 ANHANG

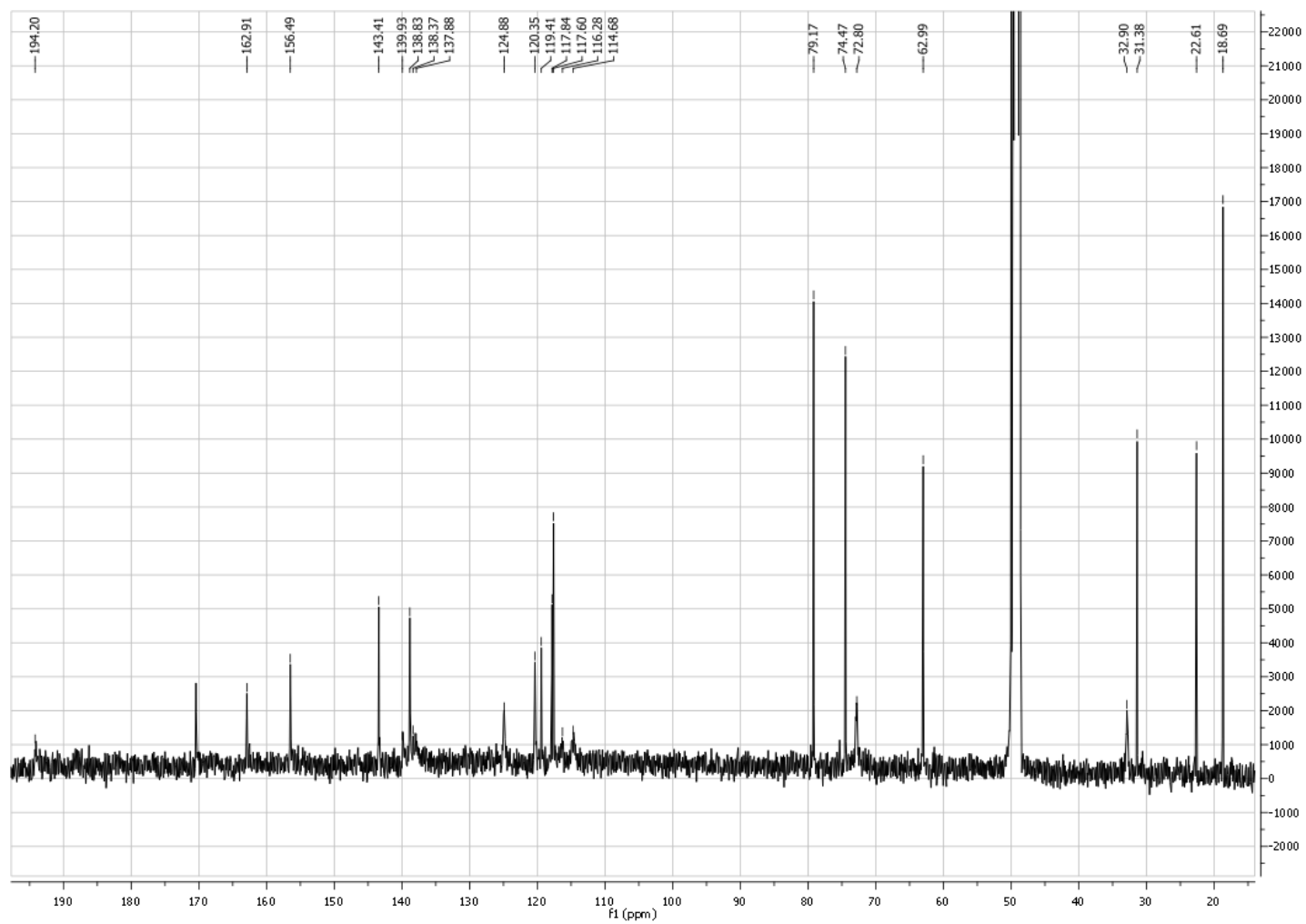
A NMR-SPEKTREN

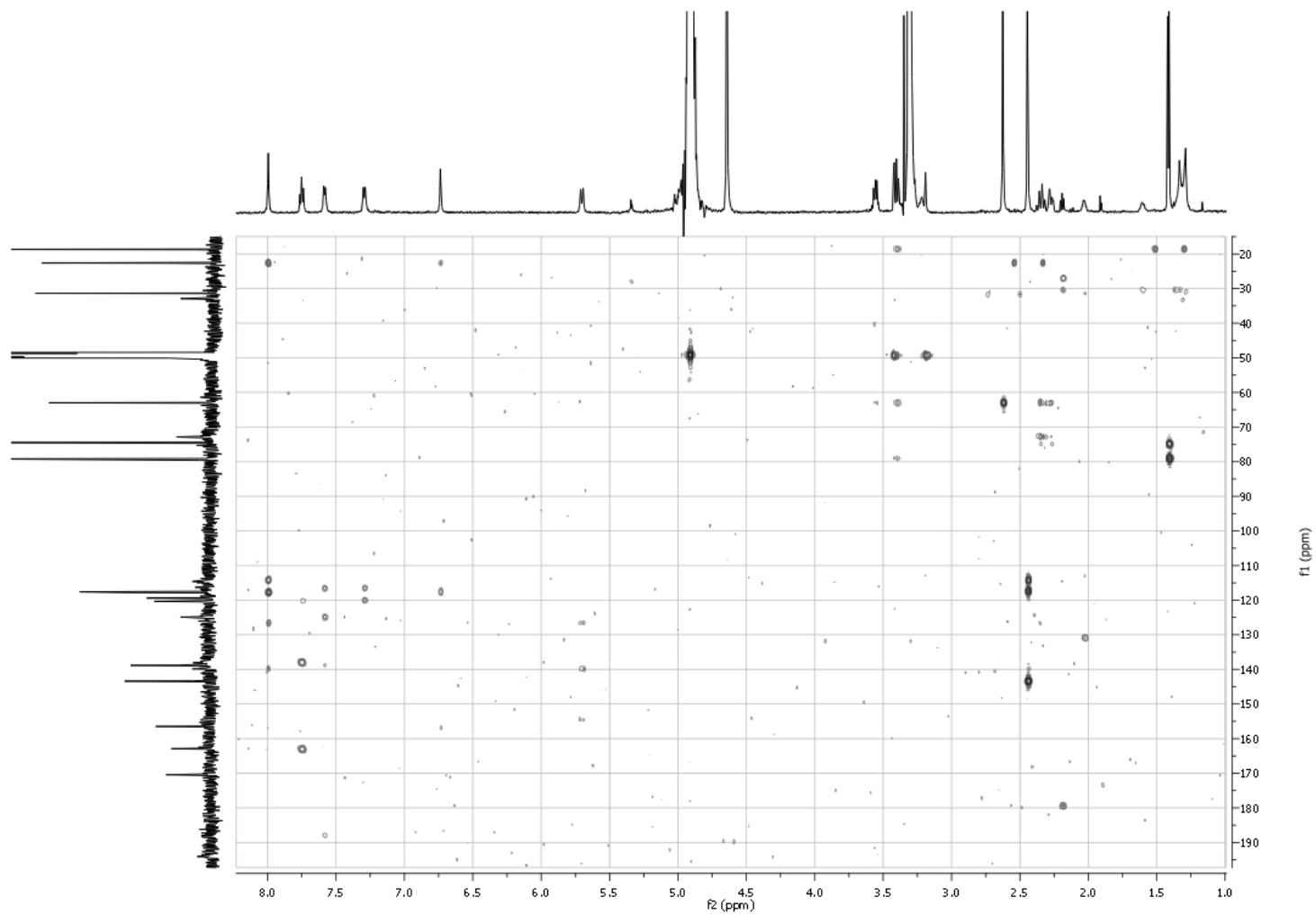
A 1. ^1H NMR (600 MHz, CD_3OD) Spektrum von Mayamycin (1)



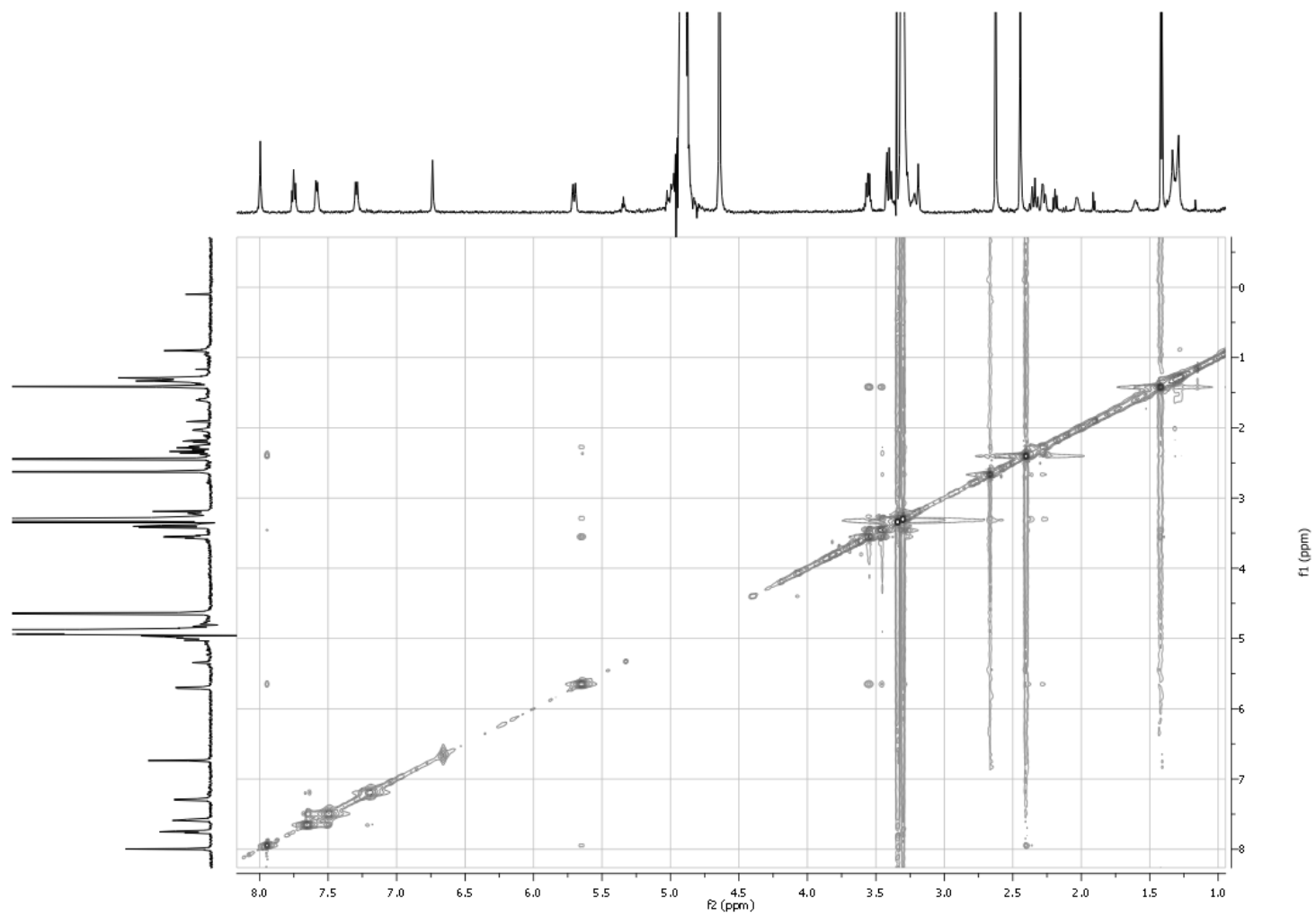
A 2. ^1H NMR (600 MHz, CD_2Cl_2) Spektrum von Mayamycin (1)

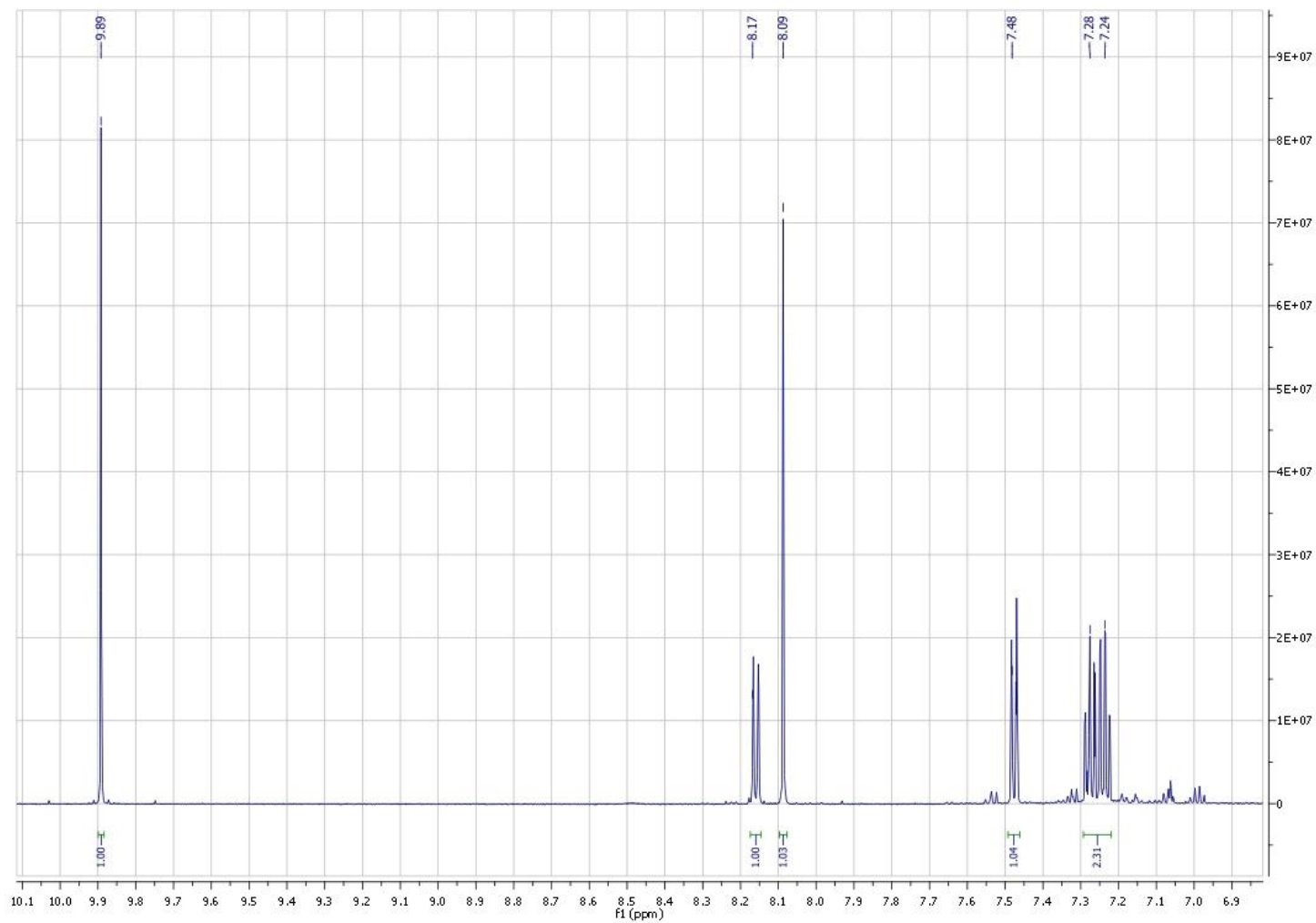
A 3. ^{13}C NMR (150 MHz, CD_3OD) Spektrum von Mayamycin (**1**)

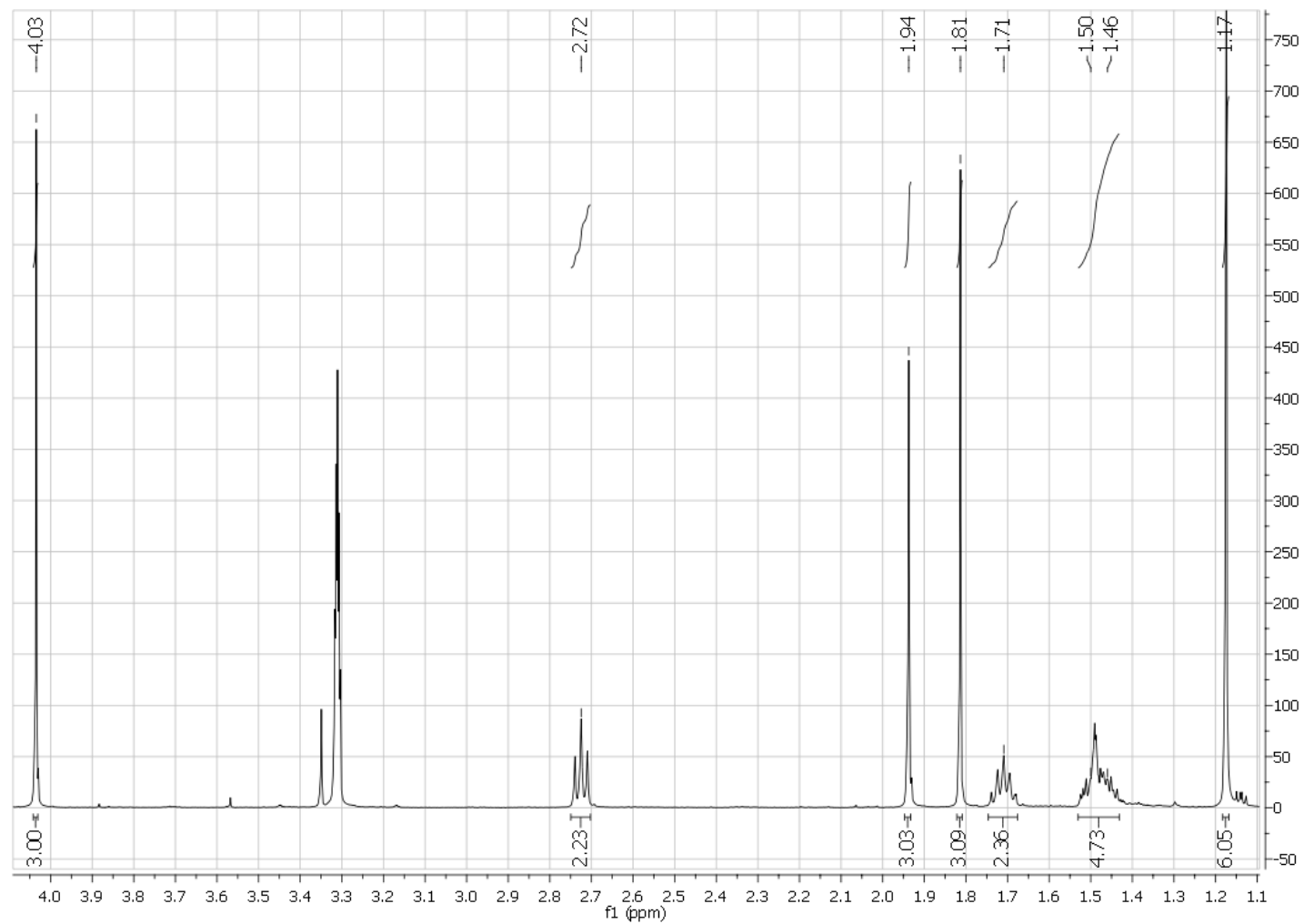


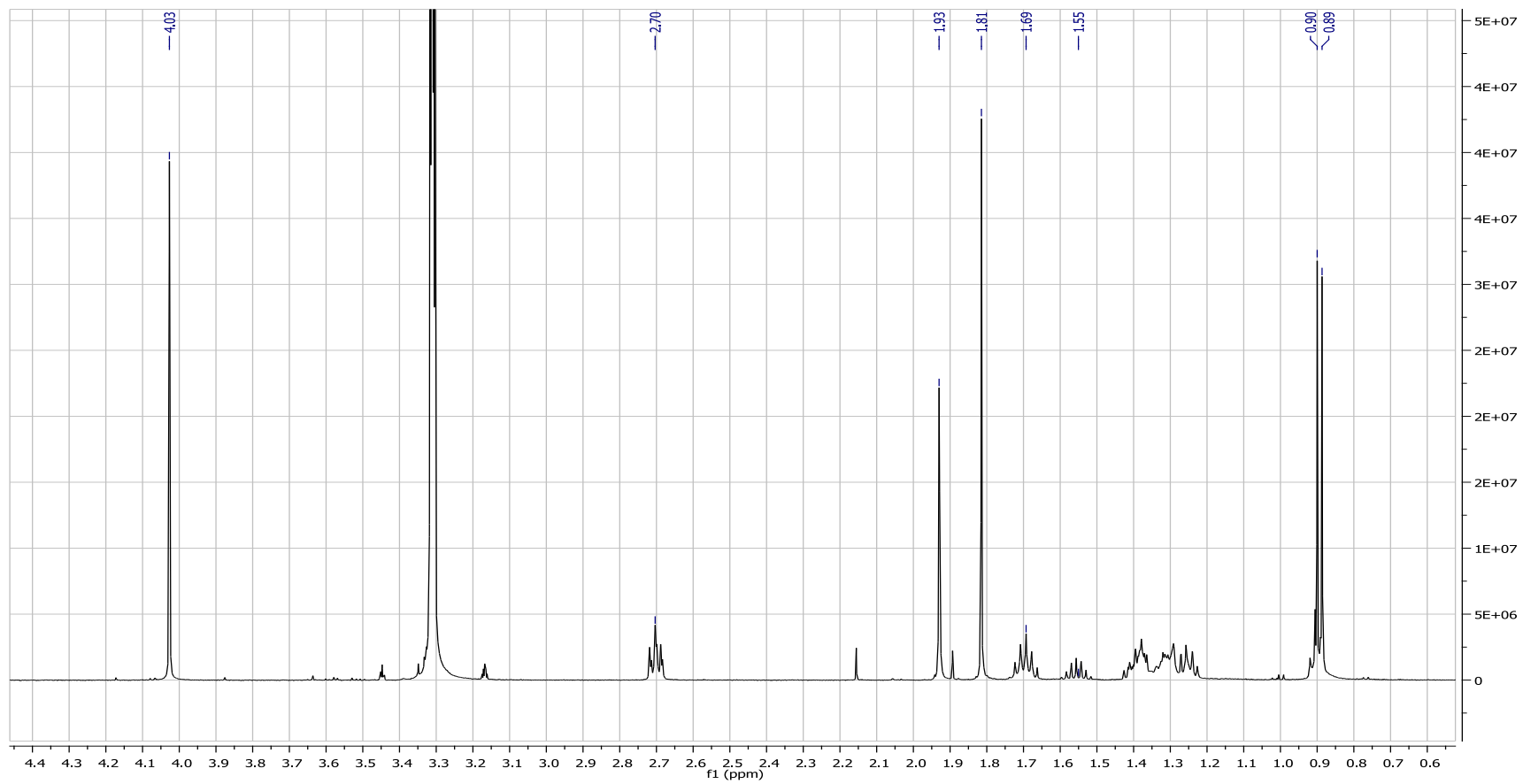
A 4. ^1H - ^{13}C HMBC-NMR (600 MHz, 150 MHz, CD_3OD) Spektrum von Mayamycin (1)

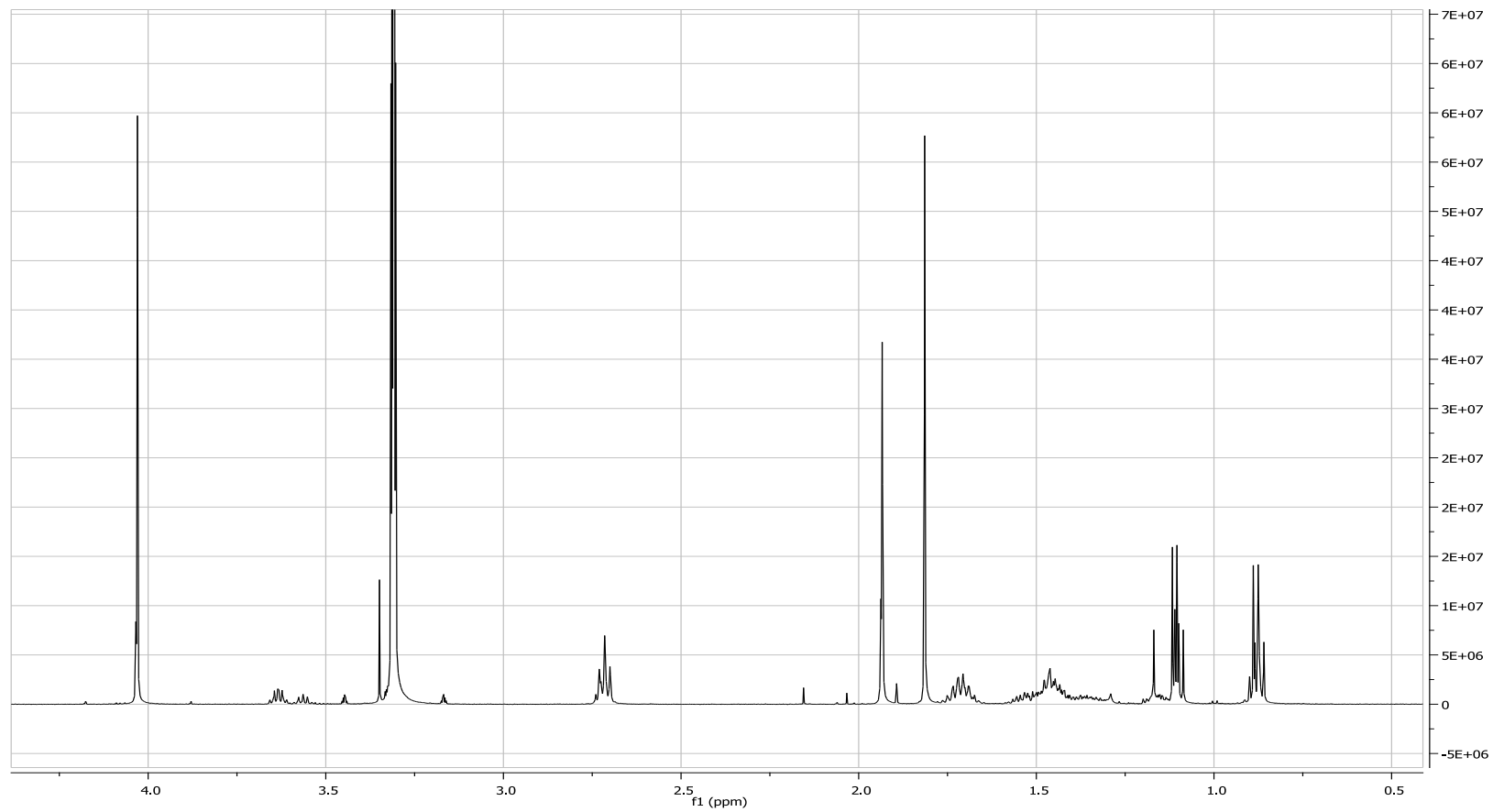
A 5. NOESY-NMR (600 MHz, CD₃OD) Spektrum von Mayamycin (1)

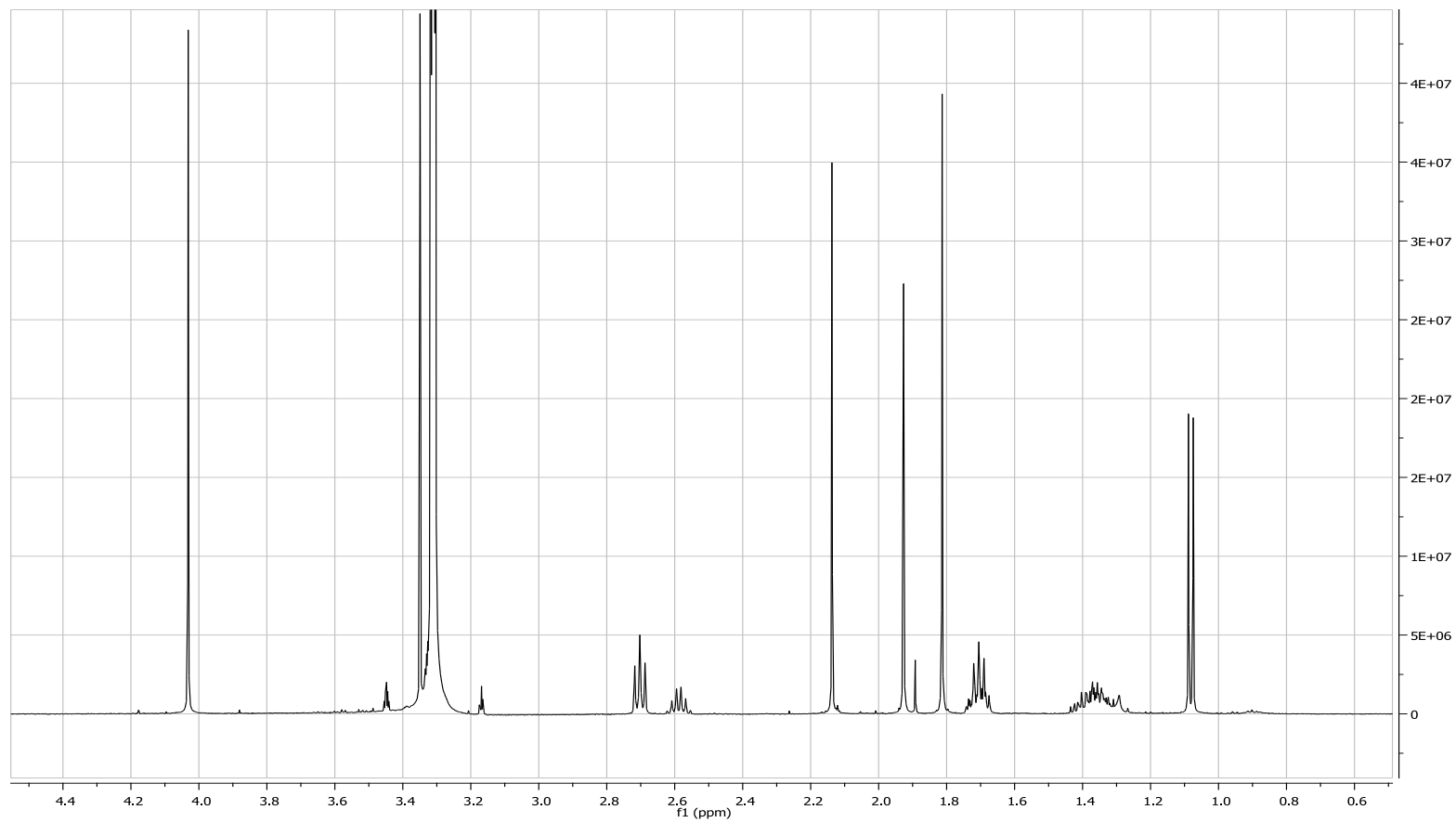


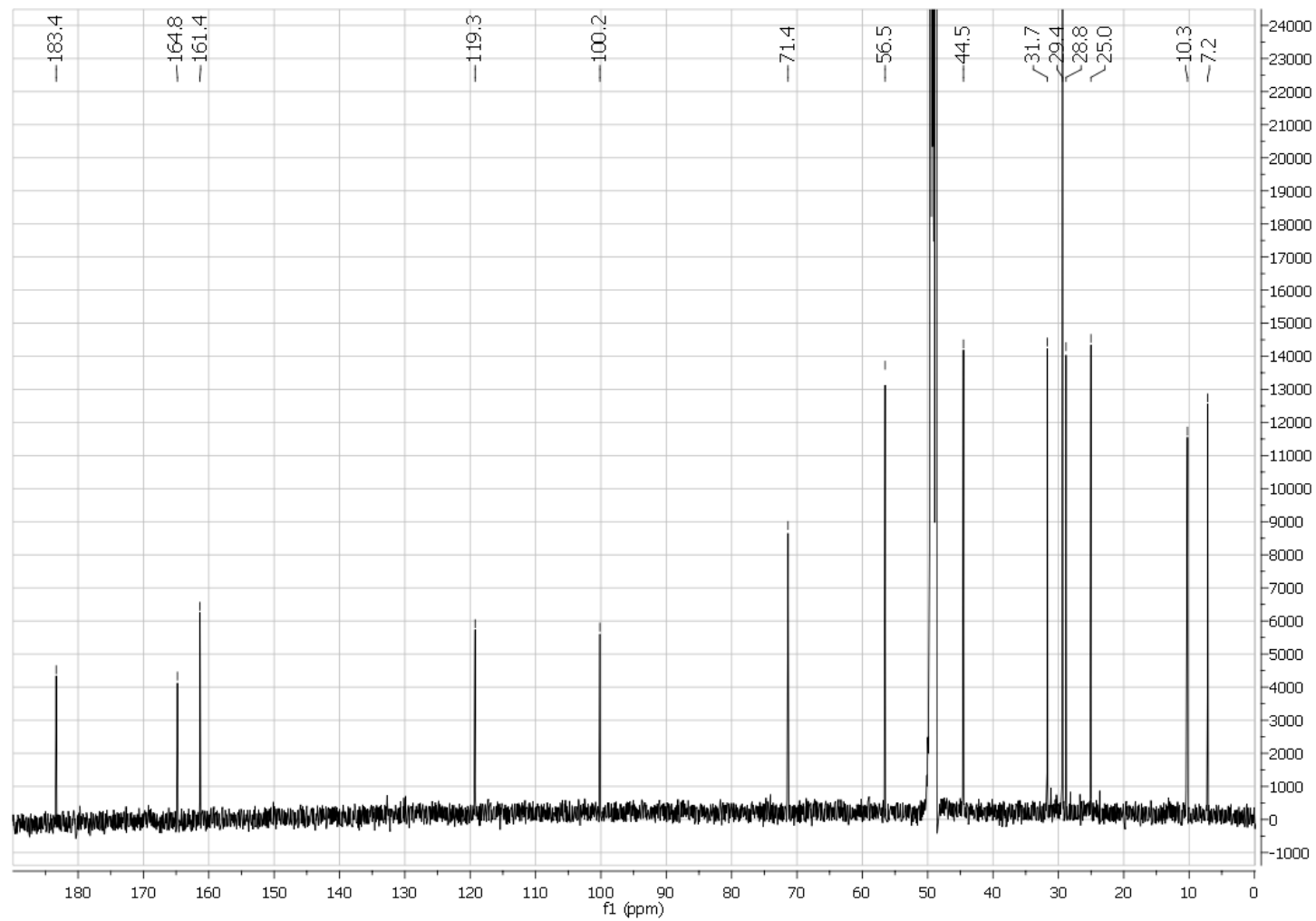
A 6. ^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) Spektrum von Indol-3-carbaldehyd aus Stamm HB254

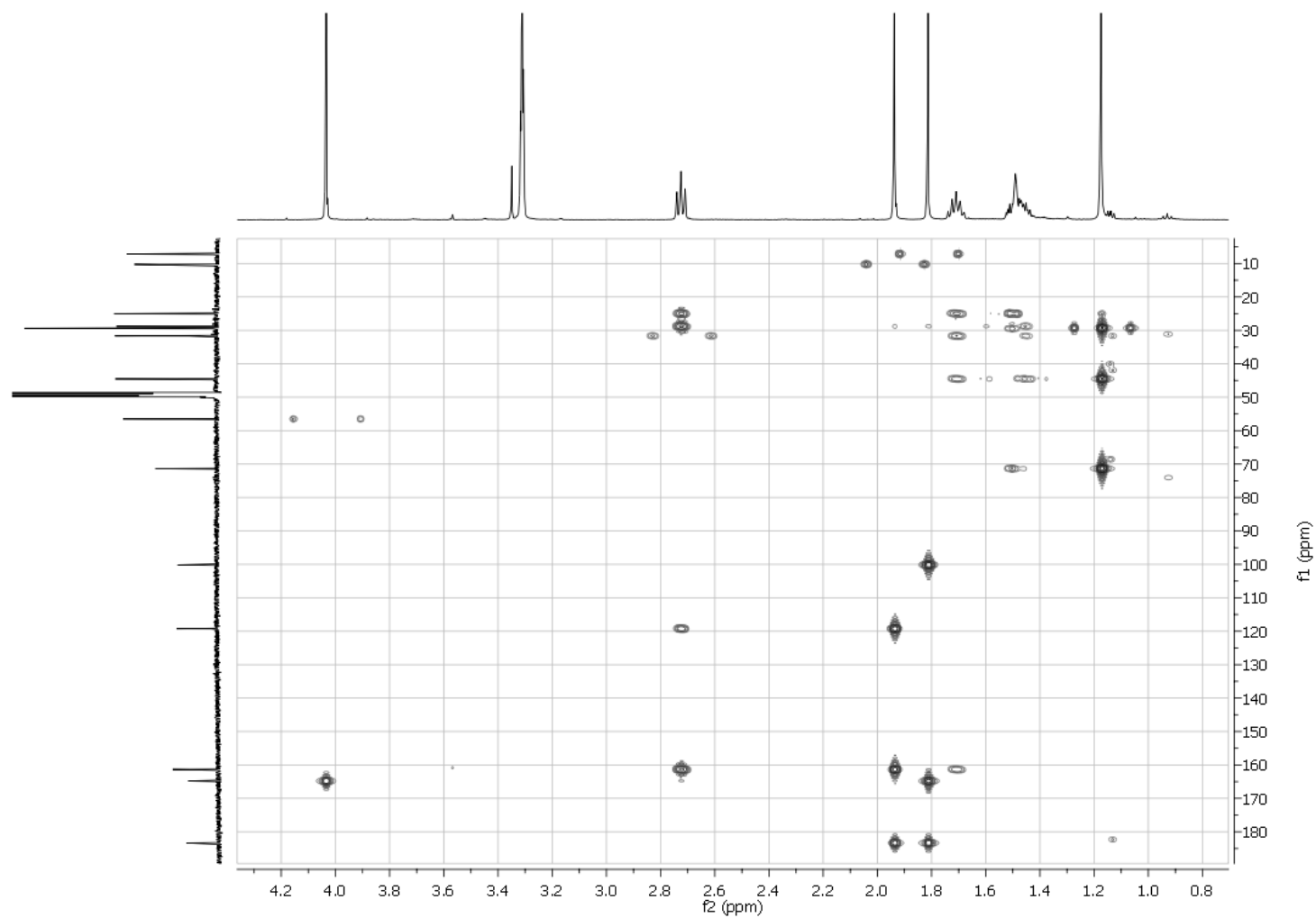
A 7. ^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) Spektrum von Nocapyron A (2)

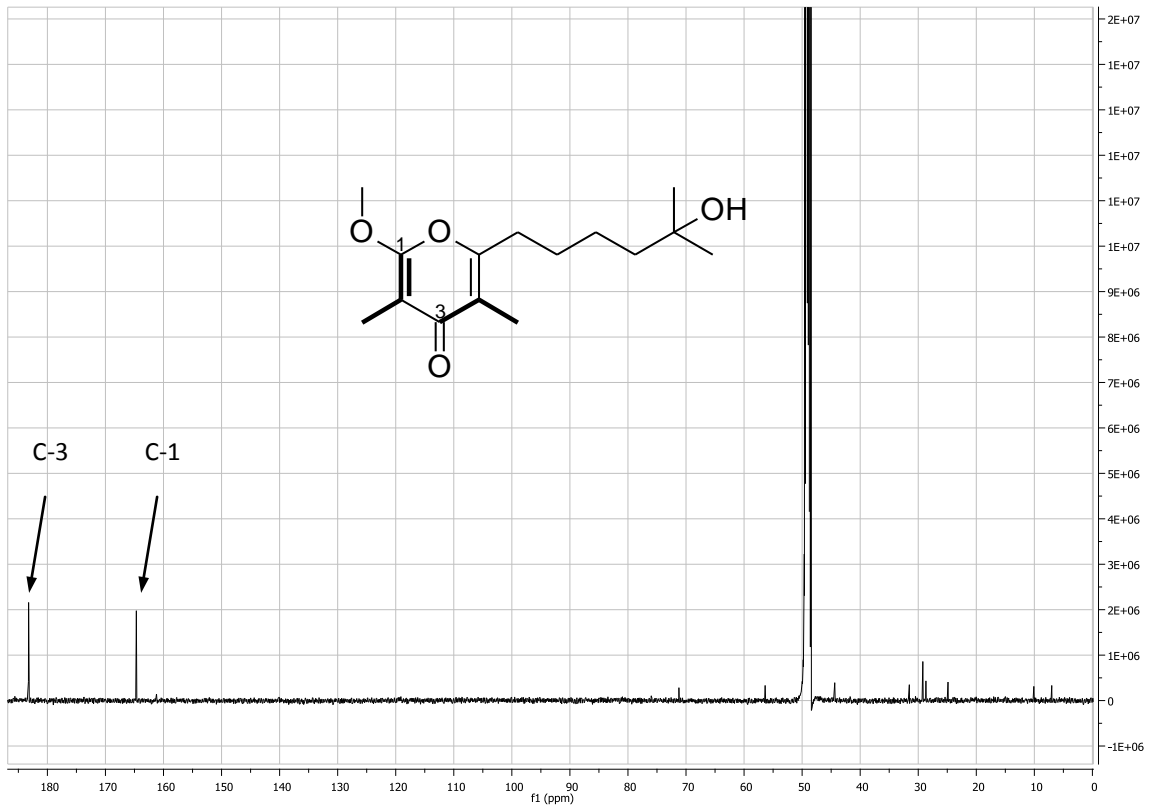
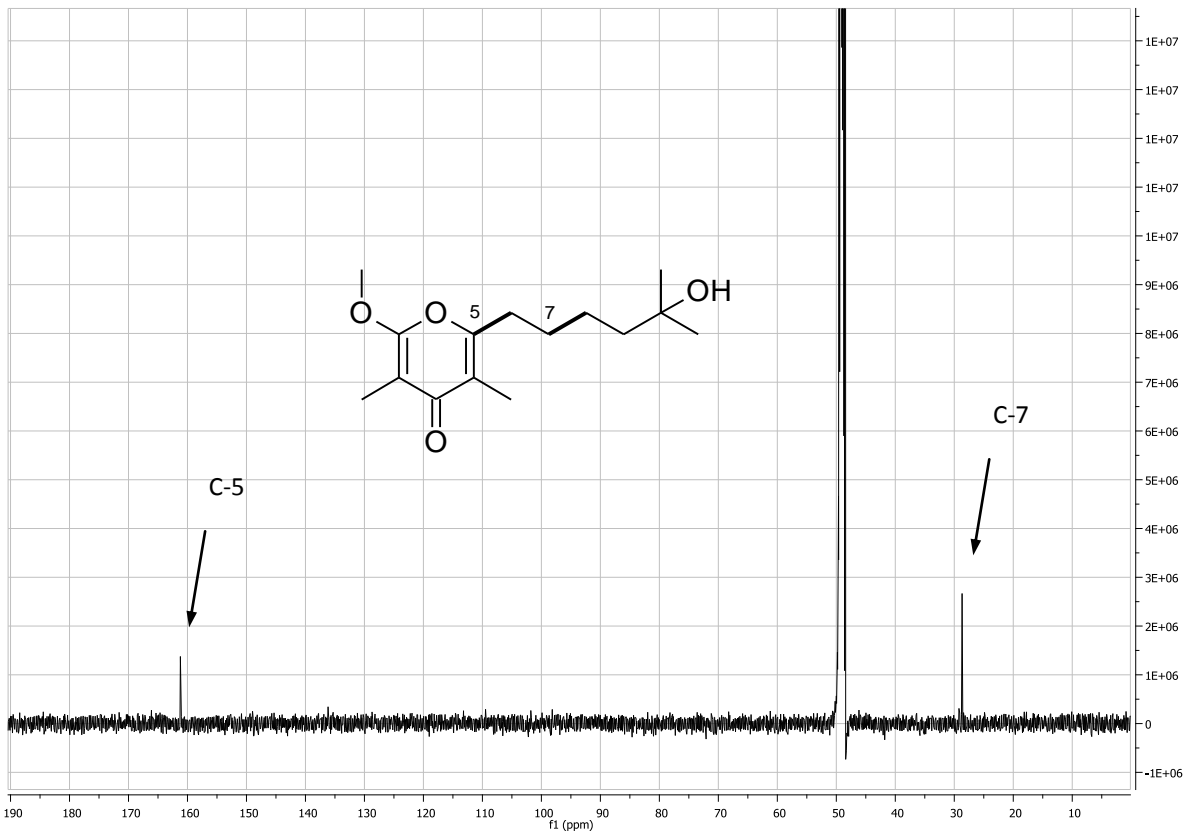
A 8. ^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) Spektrum von Nocapyron B (**3**)

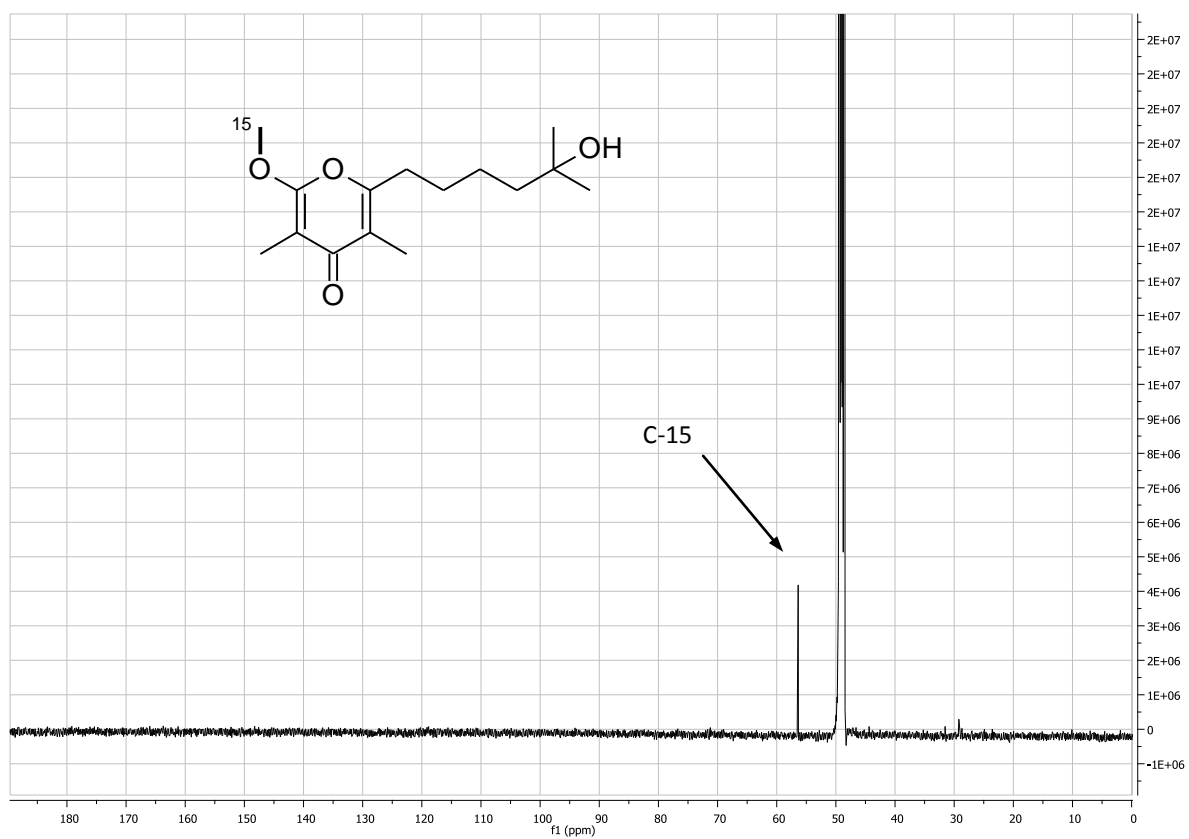
A 9. ^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) Spektrum von Nocapyron C (4)

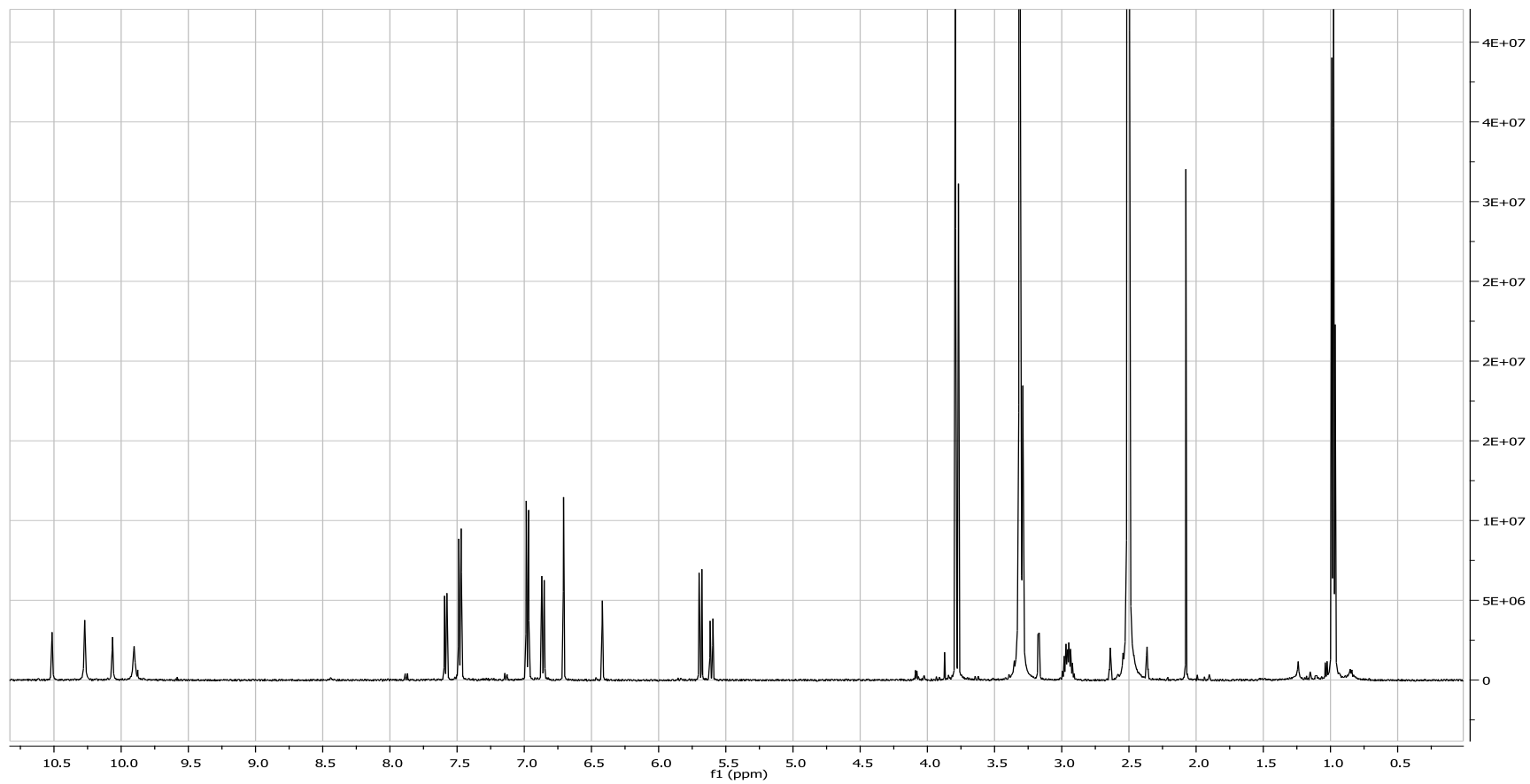
A 10. ^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) Spektrum von Nocapyron D (5)

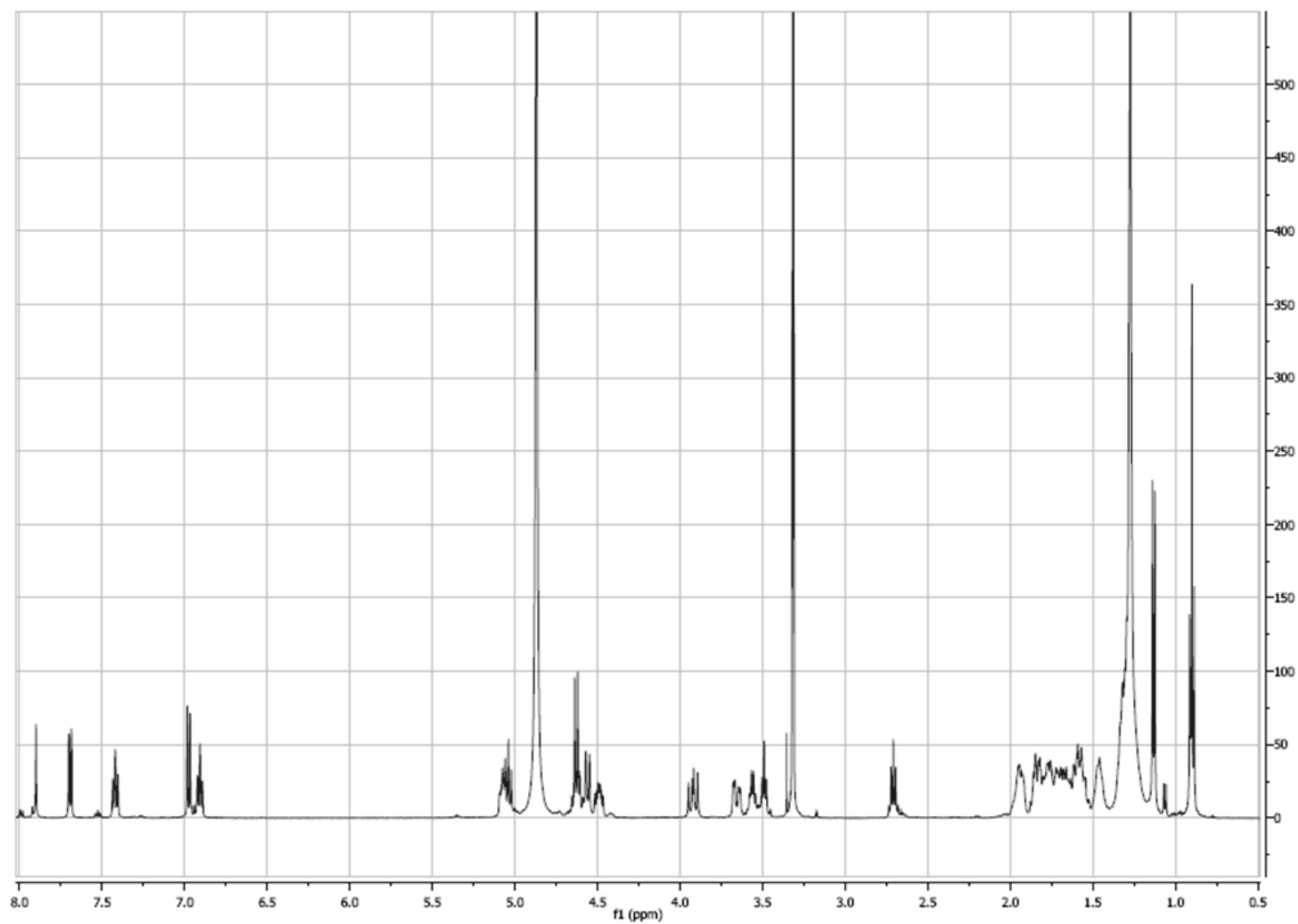
A 11. ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD) Spektrum von Nocapyron A (2)

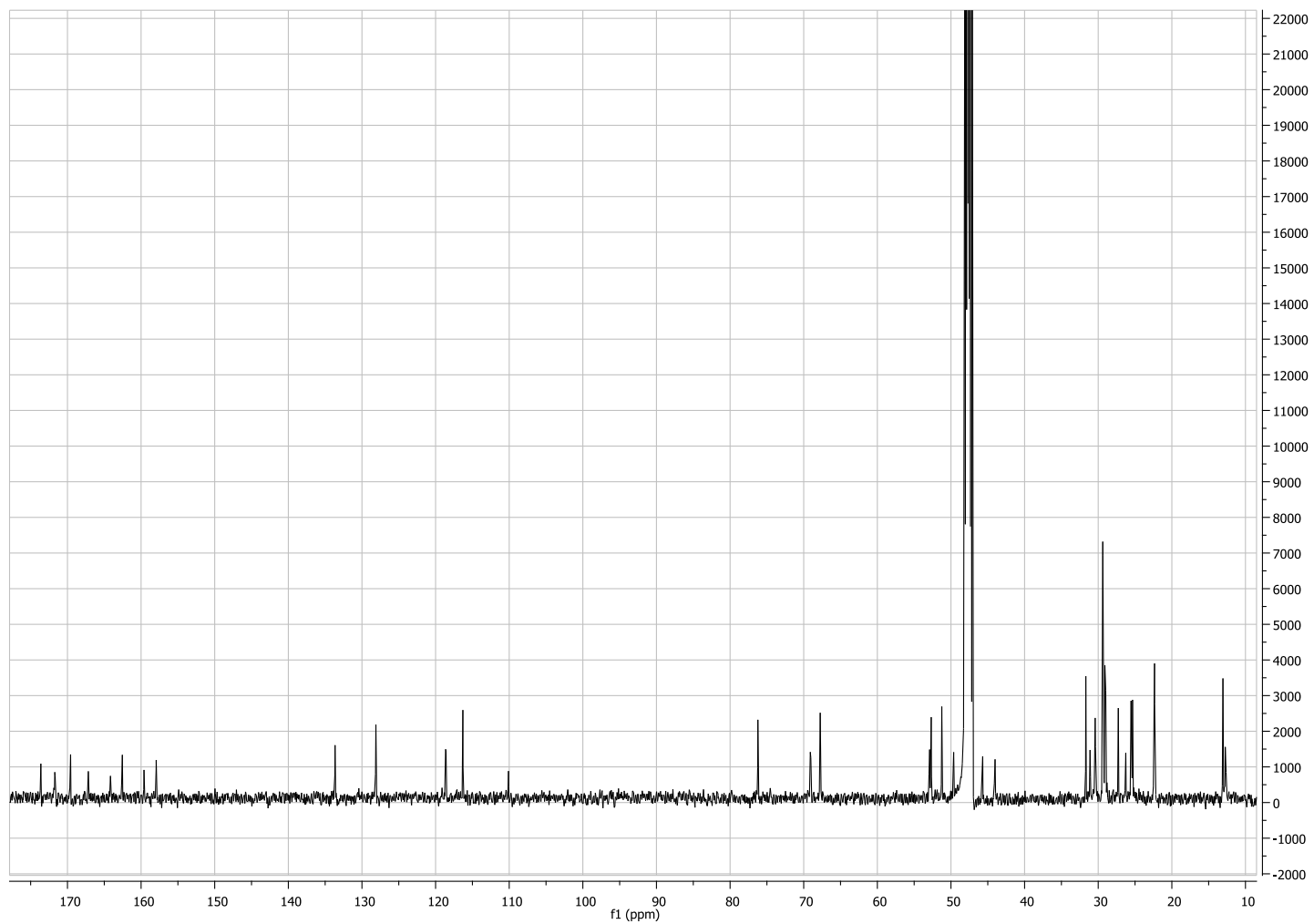
A 12. ^1H - ^{13}C HMBC-NMR (500 MHz, 125 MHz, CD_3OD) Spektrum von Nocapyron A (2)

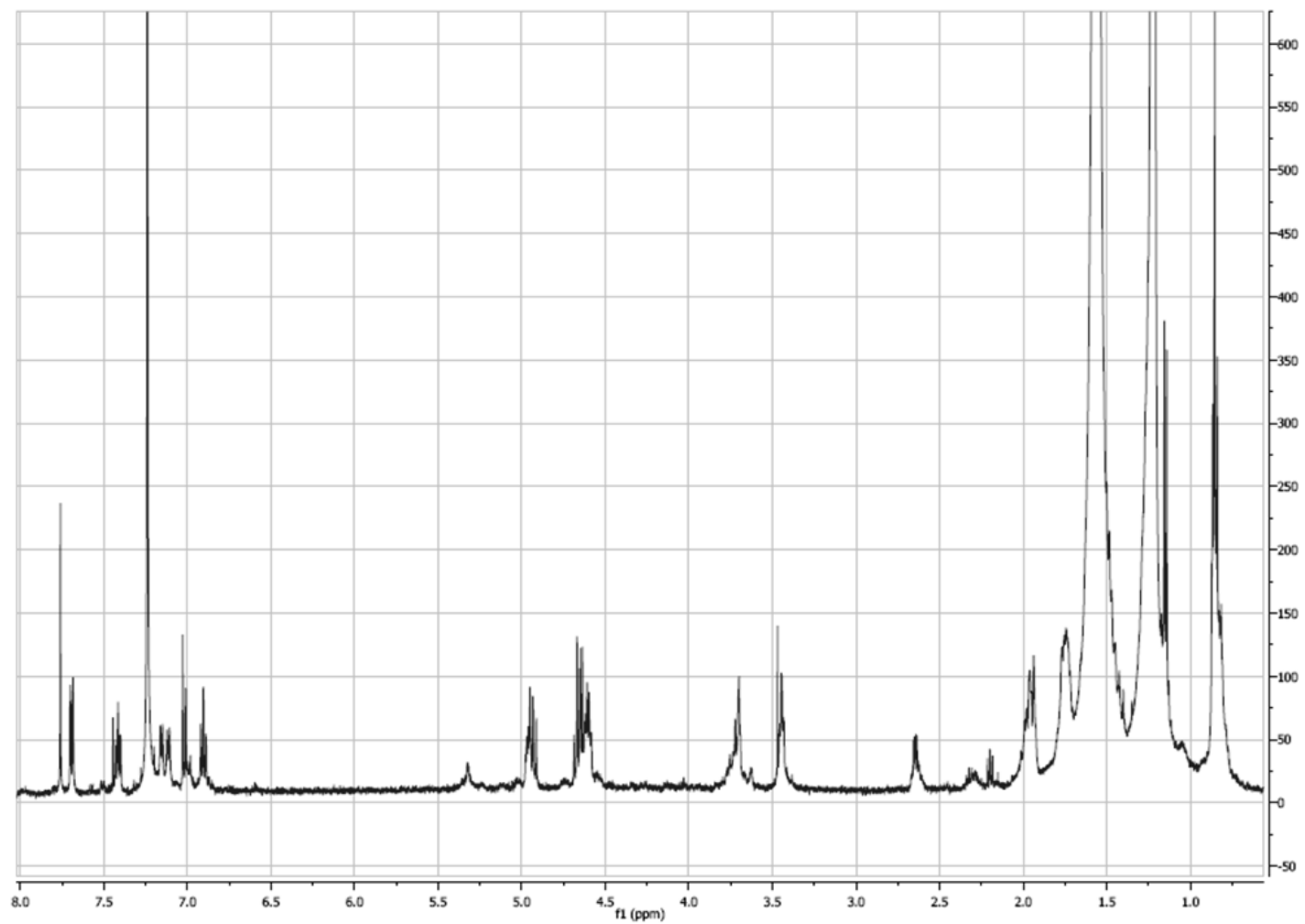
A 13. ^{13}C NMR-Spektrum von **2** nach dem Fütterungsexperiment mit $1\text{-}^{13}\text{C}$ -Natriumpropionat**A 14.** ^{13}C NMR-Spektrum von **2** nach dem Fütterungsexperiment mit $1\text{-}^{13}\text{C}$ -Natriumacetat

A 15. ^{13}C NMR-Spektrum von **2** nach dem Fütterungsexperiment mit Methyl- ^{13}C -methionin

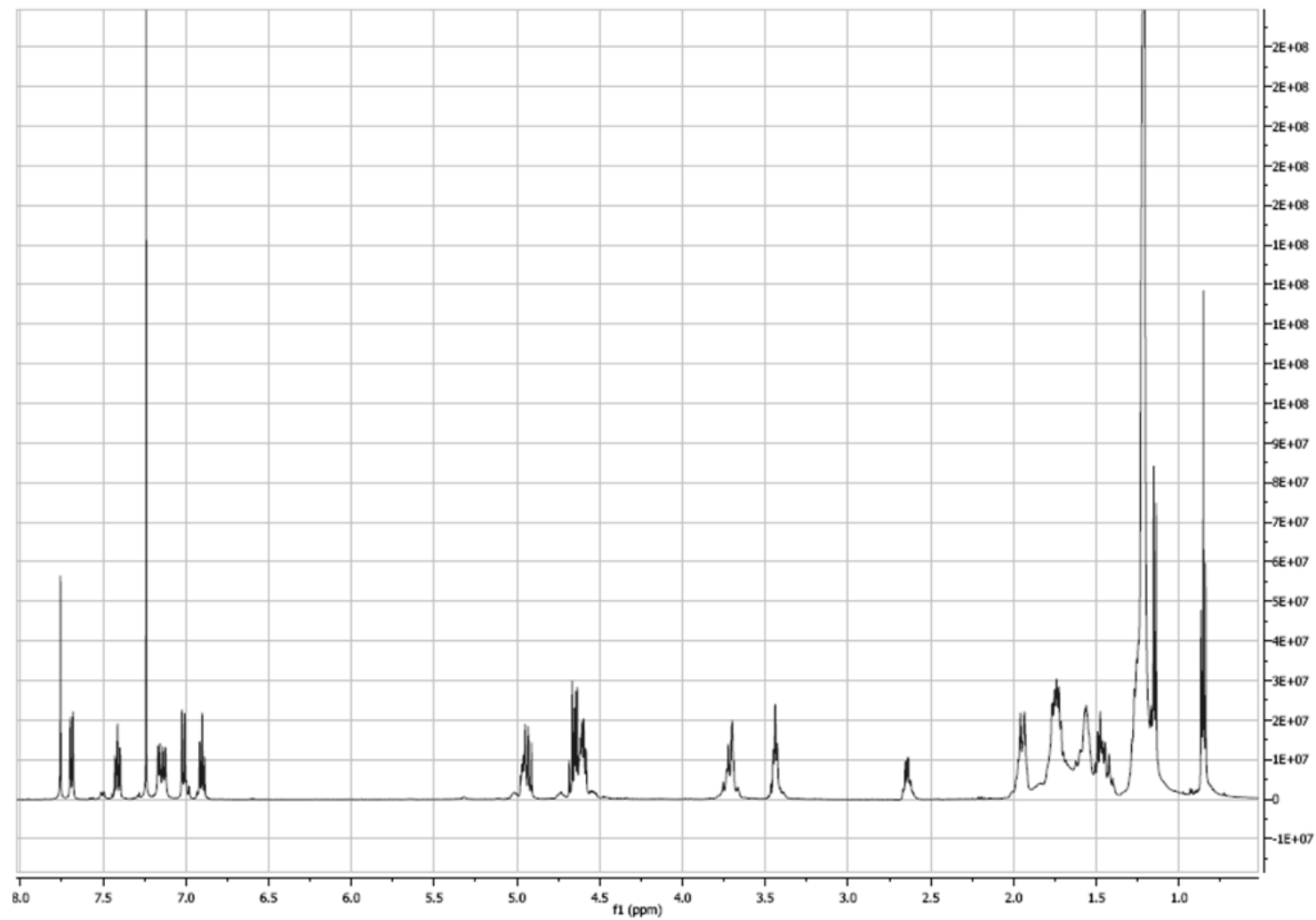
A 16. ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) von (2*E*/*Z*)- und (2*Z*/*Z*)-2-[(4-Methoxyphenyl)methylen]-5-(2-methylpropyliden)-3,6-piperazinedion (**6**)

A 17. ^1H NMR (600 MHz, CD_3OD) Brasilibactin C (**9**)

A 18. ^{13}C NMR (600 MHz, CD_3OD) Brasilibactin C (**9**)

A 19. ^1H NMR (600 MHz, CD_3OD) Brasilibactin B (**8**)

A 20. ^1H NMR (600 MHz, CD_3OD) Brasilibactin A (7)



B IUPAC (INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY) AMBIGUITY CODE

IUPAC Code	Nukleotid	Komplimentäres Nukleotid
A	A	T
C	C	G
G	G	C
T/U	T	A
M	A oder C	K
R	A oder G	Y
W	A oder T	W
S	C oder G	S
Y	C oder T	R
K	G oder T	M
V	A oder C oder G	B
H	A oder C oder T	D
D	A oder G oder T	H
B	C oder G oder T	V
N	A oder C oder G oder T	N