

**Dermacozine: neuartige Phenazin-Derivate
von marinen *Dermacoccus*-Isolaten**

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard Karls Universität Tübingen
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von
Marcell Wagner
aus Böblingen

Tübingen
2012

Tag der mündlichen Qualifikation: 30.05.2012

Dekan: Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Hans-Peter Fiedler

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Friedrich Götz

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde zwischen April 2009 und April 2012 unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Hans-Peter Fiedler am Lehrstuhl für Mikrobiologie/Biotechnologie des Interfakultären Instituts für Mikrobiologie und Infektionsmedizin der Eberhardt-Karls-Universität Tübingen angefertigt.

Ein herzliches Dankeschön gilt allen, die mich bei der Anfertigung dieser Dissertation unterstützt und mir mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben.

Dank sagen möchte ich ganz besonders meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Hans-Peter Fiedler für die Möglichkeit, das in meiner Diplomarbeit begonnene Thema weiter fortführen zu dürfen. Bedanken möchte ich mich vor allem für die vielen anregenden Diskussionen und die stetige und engagierte Unterstützung und Betreuung. Das freundliche und familiäre Arbeitsklima wird mir in guter Erinnerung bleiben.

Herrn Prof. Dr. Friedrich Götz danke ich für seine Tätigkeit als Zweitgutachter dieser Arbeit.

Darüber hinaus möchte ich Herrn Prof. Dr. Lutz Heide, Dr. Bertholt Gust und Dr. Orwah Saleh Danke sagen für die stetige Diskussionsbereitschaft und jegliche Hilfe bei der Identifizierung des Dermacozin-Genclusters.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Marcel Jaspars, Dr. Rainer Ebel und Wael Abdel-Mageed für die Strukturaufklärung der isolierten Substanzen.

Des Weiteren möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Julie Frearson, Herrn Prof. Dr. Johannes F. Imhoff und Frau Dr. Heidi Zinecker für die Bestimmung der biologischen Aktivität der Sekundärmetabolite bedanken.

Ein herzliches Dankeschön geht an alle Kollegen der Arbeitsgruppe Fiedler, vor allem an Nadine Horlacher und Andreas Kulik für die freundliche Arbeitsatmosphäre und die gute Zusammenarbeit.

Ebenso danke ich der gesamten Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Wolfgang Wohlleben für jeden fachlichen Rat, insbesondere Regina Ort-Winkelbauer und Hans-Jörg Frasch für ihre Hilfsbereitschaft in wissenschaftlichen und technischen Fragen.

Des Weiteren möchte ich mich ganz herzlich bei der Jürgen Manchot-Stiftung für die finanzielle Unterstützung meiner Arbeit in Form eines Promotionsstipendiums sowie bei der Max-Buchner-Forschungsstiftung für die zur Verfügung gestellten Sachmittelbeiträge bedanken.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie, die mich immer unterstützt und mir in allen Lebenslagen zur Seite gestanden hat, sowie meiner lieben Freundin Steffi, die mir während der ganzen Zeit ein sehr großer Rückhalt war.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	VII
1 Einleitung.....	1
1.1 Bedeutung von Actinomyceten bei der Wirkstoffsuche.....	1
1.2 Möglichkeiten mariner Biotechnologie in der Erforschung neuartiger Sekundärmetabolite.....	2
1.3 Isolierung von Actinomyceten aus dem Marianengraben.....	3
1.4 Die Gattung <i>Dermaococcus</i>	4
1.5 Bedeutung und Biosynthese von Phenazinen.....	5
1.5.1 Phenazine: Struktur und Funktion.....	5
1.5.2 Genetische und biochemische Aspekte der Phenazin-Biosynthese.....	8
1.6 Sekundärstoffproduktion in <i>Dermaococcus</i> sp.	13
1.7 Zielsetzung.....	14
2 Material und Methoden.....	16
2.1 Material.....	16
2.1.1 Geräte und Hilfsmittel.....	16
2.1.2 Verbrauchsmaterialien.....	17
2.1.3 Verwendete Kits.....	17
2.1.4 Enzyme.....	18
2.1.5 Vektoren und Cosmide.....	18
2.1.6 Synthetische Oligonukleotide.....	19
2.1.7 Bakterienstämme	20
2.1.8 Materialien für die Chromatographie.....	20
2.1.9 Chemikalien und Reagenzien.....	20
2.1.10 Medien und Medienzusätze.....	22
2.1.11 Lösungen und Puffer.....	24
2.2 Methoden.....	26
2.2.1 Stammhaltung.....	26
2.2.2 Kultivierungsbedingungen der Produktionsstämme.....	26
2.2.3 Probenentnahme und -aufarbeitung zur Sekundärstoffanalyse.....	27
2.2.4 Wachstumsanalytik in verschiedenen Nährlösungen.....	28

2.2.5 Optimierung der Produktion durch Variation verschiedener Kultivierungsbedingungen im Schüttelkolben.....	28
2.2.6 Untersuchungen zum Schaumverhalten von <i>Dermaococcus</i> sp. MT 1.2 in Schüttelkulturen.....	30
2.2.7 Untersuchungen zum Schaumverhalten von <i>Dermaococcus</i> sp. MT 1.2 während der Fermentation.....	30
2.2.8 Fermentation und begleitende Analytik.....	30
2.2.9 HPLC-DAD-Analytik.....	31
2.2.10 Isolierung der Dermacozone.....	31
2.2.11 Chemisch-physikalische Charakterisierung der Dermacozone.....	33
2.2.12 Biologische Testierung der Dermacozone.....	34
2.2.13 Molekulargenetische Methoden.....	36
2.2.14 Herstellung und Screening einer Genbibliothek	41
2.2.15 Auswahl eines Cosmids zur vollständigen Sequenzierung.....	44
2.2.16 Sequenzierung des ausgewählten Cosmids.....	45
2.2.17 Heterologe Expression des Genclusters in <i>Streptomyces</i> sp.	45
3 Ergebnisse.....	49
3.1 Optimierung der Sekundärstoffproduktion durch Variation verschiedener Kultivierungsbedingungen	49
3.1.1 Wachstumsanalytik in verschiedenen Nährlösungen.....	49
3.1.2 Einfluss von Medienbestandteilen in NL 410.....	51
3.1.3 Einfluss der Wasserqualität.....	52
3.1.4 Einfluss von Good'schen Puffern.....	53
3.1.5 Einfluss von CaCO ₃	54
3.1.6 Einfluss verschiedener Kohlenstoffquellen.....	55
3.1.7 Einfluss verschiedener Stickstoffquellen.....	56
3.1.8 Einfluss komplexer Nährstoffquellen.....	59
3.1.9 Einfluss mehrerer Nährstoffquellen.....	60
3.2 Untersuchungen zum Schaumverhalten von <i>Dermaococcus</i> sp. MT 1.2 in Schüttelkulturen.....	60
3.3 Untersuchungen zum Schaumverhalten von <i>Dermaococcus</i> sp. MT 1.2 im 10 Liter-Fermenter.....	63
3.3.1 Sekundärstoff- und fermentationsbegleitende Analytik bei Kultivierung unter Zusatz von Agrimulester Derivat 1.....	63
3.3.2 Sekundärstoff- und fermentationsbegleitende Analytik bei Kultivierung im 10 Liter-Bioreaktor mit Propellerrad.....	66

3.3.3	Sekundärstoff- und fermentationsbegleitende Analytik bei Verwendung unterschiedlich behandelter Vorkulturen.....	68
3.4	Produktionsfermentation im 10 Liter-Bioreaktor.....	72
3.5	Isolierung und Charakterisierung der Dermacozone.....	74
3.5.1	Isolierung und Charakterisierung von Dermacozin K.....	76
3.5.2	Isolierung und Charakterisierung von Dermacozin L.....	77
3.5.3	Isolierung und Charakterisierung von Dermacozin P.....	77
3.5.4	Isolierung und Charakterisierung von Dermacozin W.....	78
3.5.5	Isolierung und Charakterisierung von Dermacozin Z.....	79
3.5.6	Isolierung und Charakterisierung von Dermacozin RT 2.3.....	80
3.5.7	Isolierung und Charakterisierung von Dermacozin RT 3.37.....	81
3.5.8	Isolierung und Charakterisierung von Dermacozin RT 4.6.....	82
3.5.9	Isolierung und Charakterisierung von Dermacozin RT 6.8.....	83
3.5.10	Zusammenfassung und Charakterisierung der isolierten Dermacozone.....	84
3.6	Biologische Aktivität der isolierten Dermacozone.....	87
3.6.1	Antibakterielle und antifungische Wirkung.....	87
3.6.2	Antitumor-Wirkung.....	88
3.6.3	Enzymhemmende Wirkung.....	88
3.6.4	Antioxidative Wirkung.....	89
3.7	Identifizierung des Dermacozin-Genclusters.....	89
3.7.1	Erstellung und Screening einer Genbibliothek.....	89
3.7.2	Auswahl eines Cosmids zur vollständigen Sequenzierung.....	92
3.7.3	Vollständige Cosmid-Sequenzierung.....	96
3.8	Heterologe Expression des Phenazin-Genclusters in <i>Streptomyces</i> sp.	101
4	Diskussion.....	104
4.1	Optimierung der Sekundärstoffproduktion von <i>Dermacoccus</i> sp. MT 1.2.....	104
4.2	Isolierung und Charakterisierung der Dermacozone.....	112
4.3	Biologische Wirkung der isolierten Dermacozone.....	116
4.4	Identifizierung des Dermacozin-Genclusters.....	118
5	Ausblick.....	128
6	Zusammenfassung.....	130
7	Anhang.....	131
8	Literaturverzeichnis.....	136

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
%	Prozent
ACN	Acetonitril
ad	auf
ADIC	2-Amino-2-Desoxyisochorisminsäure
bp	base pair
BLAST	<i>basic local alignment search tool</i>
BV	Bettvolumen
CIAP	<i>calf intestinal alkaline phosphatase</i>
<i>D. sp.</i>	<i>Dermacoccus</i> species
DAD	<i>diode array detector</i>
DAHP	3-Desoxy-D-Arabinoheptulosonsäure-7-Phosphat
DCM	Dichlormethan
deion.	deionisiert
DHHA	2,3-Dihydro-3-Hydroxyanthranilsäure
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>
DPPH	1,1-Diphenyl-2-Picryl-Hydrazyl
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
dNTP	2'-Desoxyribonukleosid-5'triphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EC ₅₀	mittlere effektive Konzentration
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ESI-MS	Elektrosprayionisations-Massenspektrometrie
F	Farad
FT-ICR-MS	Fouriertransformations-Ionencyclotronresonanz-Massenspektrometrie
g	Gramm
gen.	genomisch
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-Ethansulfonsäure
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
I.D.	im Durchmesser
JAMSTEC	<i>Japan Marine Science and Technology Center</i>
k-	kilo-
KiWiz	Kieler Wirkstoffzentrum
KM	Kulturmedium
l	Liter
LB	<i>lysogeny broth</i>
LC	<i>liquid chromatography</i>
M	Molar
m	Meter
m-	milli-
μ-	mikro-
mAU*s	<i>milli absorbance units</i> * Fläche

MIC	minimale inhibitorische Konzentration
min	Minute(n)
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
MM	Minimalmedium
MRSA	multiresistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
MS	Massenspektrometrie
MT	<i>mariana trench</i>
N	Normal
n-	nano-
NL	Nährlösung
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
nr	<i>non redundant</i>
OD	optische Dichte
ORF	<i>open reading frame</i>
p. A.	<i>pro analysi</i>
pAba	<i>para</i> -Aminobenzoessäure
PCA	Phenazin-1-Carbonsäure
PDB	<i>protein data bank</i>
PEG	Polyethylenglykol
pHba	<i>para</i> -Hydroxybenzoessäure
PHPLC	<i>preparative high performance liquid chromatography</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
pH	<i>pondus Hydrogenii</i>
ROV	<i>remotly operated vehicle</i>
RP	<i>reversed phase</i>
RT	<i>retention time</i>
<i>S. lividans</i>	<i>Streptomyces lividans</i>
SCOP	<i>structural classification of proteins</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
sec	Sekunde(n)
SGG	Stärke-Glucose-Glycerin
Std.	Stunde(n)
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TE	TRIS-EDTA
TES	N-Tris(hydroxymethyl)methyl-2-Amino-Ethansulfonsäure
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-Aminomethan
TSG	Trypton-Soyton-Glucose
U	<i>unit</i>
UV	ultraviolett
Upm	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
Vis	<i>visible</i>
v/v	<i>volume per volume</i>
vvm	Volumen Luft pro Volumen Fermenter pro Minute

1 Einleitung

1.1 Bedeutung von Actinomyceten bei der Wirkstoffsuche

Mit der Entdeckung des Penicillins [FLEMING, 1929] begann der Siegeszug antibakterieller Wirkstoffe in der Medizin. Während der „goldenen Ära“ der Antibiotika-Forschung zwischen 1950 und 1975 wurden nahezu alle wichtigen Klassen dieser Substanzen (Chloramphenicol, Tetracycline, β -Lactame, Aminoglycoside, Aminocumarine, Makrolide und Ansamycine) entdeckt. In dieser Zeit schien es daher möglich, die auftretenden Infektionskrankheiten erfolgreich besiegen zu können [BÉRDY, 2005]. Durch den zunehmenden Einsatz und z. T. auch Missbrauch von Antibiotika wurden jedoch resistente Keime selektioniert. Die nachlassende Weiter- bzw. Neuentwicklung derartiger Medikamente führte zu dem Ergebnis, dass 2004 bereits 70 % aller Infektionskeime in amerikanischen Krankenhäusern Resistenzen gegen mindestens ein Antibiotikum aufwiesen [LEEB, 2004]. Besonders problematisch sind dabei die Infektionen mit multiresistenten Bakterien wie beispielsweise MRSA (multiresistenter *Staphylococcus aureus*), bei denen selbst die Notfallantibiotika keine Wirksamkeit mehr zeigen [DAVIES & DAVIES, 2010]. Daher ist die Suche nach neuen, hoch wirksamen Arzneistoffen zwingend notwendig. In den letzten Jahren wurde dabei der Ansatz verfolgt, große Substanzbibliotheken mittels Hochdurchsatz-Technologie zielgerichtet zu durchsuchen. Dies stellte sich jedoch aufgrund verschiedener Faktoren als nicht sehr produktiv heraus. Zum einen sind die Zielkomponenten meist nur schwer zugänglich bzw. überhaupt nicht angreifbar oder für *in vitro*-Versuche völlig ungeeignet. Zum anderen ist die chemisch-molekulare Komplexität solcher Substanzsammlungen im Vergleich zu der von Naturstoffen sehr gering. Daher rückt die Entdeckung neuartiger Sekundärmetabolite wieder zunehmend in den Vordergrund [BALTZ, 2008].

Die bedeutendsten bakteriellen Naturstoff-Produzenten sind die *Actinomycetales*, die auch als Actinomyceten bezeichnet werden und ca. 45 % aller biologisch aktiven Substanzen herstellen. Dazu gehören unter anderem die filamentös wachsenden Streptomyceten, die schon während der erwähnten „goldenen Ära“ der Antibiotika die Hauptproduzenten dieser Sekundärmetabolite (ca. 70 % - 80 %) waren [BÉRDY, 2005]. Innerhalb der Actinomyceten stellen sie mit einem Anteil von ca. 80 % auch heute noch die wichtigste Wirkstoff-

Quelle dar. Die Annahme, dass lediglich 10 % der von dieser Gattung produzierten Naturstoffe bislang entdeckt wurden, verdeutlicht ihr Potential [GOODFELLOW & FIEDLER, 2010; WATVE *et al.*, 2001].

Neben den Streptomyceten gibt es noch ca. 100 weitere Gattungen der *Actinomycetales*, die als „seltene Actinomyceten“ zusammengefasst werden. Diese gewannen in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung, da aus den Streptomyceten immer weniger neue Substanzen isoliert wurden, aber gleichzeitig die Wiederentdeckungsrate bekannter Metabolite stark anstieg [WATVE *et al.*, 2001]. Seltene Actinomyceten werden als Quelle neuer, biologisch aktiver Wirkstoffe angesehen, da sie bereits als Produzenten vieler wichtiger Antiinfektiva wie z. B. Rifamycin von *Amiclatopsis mediterranea*, Erythromycin von *Saccharopolyspora erythraea* oder Vancomycin von *Amiclatopsis orientalis* beschrieben wurden [LAZZARINI *et al.*, 2000]. Dies wird vor allem für diejenigen Isolate angenommen, die aus bisher schlecht untersuchten bzw. extremen Habitaten stammen, da der dort herrschende Selektionsdruck einzigartige Entwicklungen hervorgerufen haben könnte [BULL *et al.*, 2000]. Durch neue selektive Isolierungsmethoden und Verbesserungen in der Kultivierung wurden solche Bakterien zugänglicher, vor allem im Hinblick auf marine Habitate [BALTZ, 2008; BULL & STACH, 2007; GOODFELLOW & FIEDLER, 2010; HAYAKAWA, 2008].

1.2 Möglichkeiten mariner Biotechnologie in der Erforschung neuartiger Sekundärmetabolite

Die marine Biotechnologie beschäftigt sich mit der Erschließung und umweltfreundlichen Nutzung der lebenden Ressourcen des Meeres. Ziel ist es dabei, Mikroorganismen, Pflanzen- oder Tierzellen sowie deren Bestandteile und Produkte bei technischen Verfahren, industriellen Produktionsprozessen und im medizinischen Bereich einzusetzen. Betrachtet man die Erde, so machen die Ozeane über 70 % der Oberfläche aus. Davon reichen etwa 60 % mindestens 2.000 Meter tief [BULL *et al.*, 2000; HAEFNER, 2003]. Tieferliegende Bereiche der Meere sind noch weitgehend unerforscht, enthalten jedoch ein enormes Potential. Daher rückte die Suche nach Naturstoffen von Mikroorganismen aus marinen Lebensräumen in den letzten Jahren mehr und mehr in den Vordergrund [PIETRA, 1997]. Insbesondere Bakterien, die unter extremen Bedingungen wie z. B. in den großen Tiefen der Meere leben, werden als mögliche Quellen für biologische Substanzen gesehen, die sich für technische oder pharmazeutische Prozesse verwenden lassen [BULL & STACH, 2007; BULL *et al.*, 2000, 2005; FENICAL & JENSEN, 2006]. In den letzten Jahren wurde aus

marinen Standorten eine Vielzahl seltener, teils bis dahin unbekannter Mikroorganismen isoliert, die sich als Produzenten neuartiger Sekundärmetabolite erwiesen [BULL & STACH, 2007; FENICAL & JENSEN, 2006; FIEDLER *et al.*, 2005; JENSEN *et al.*, 2005; KATO *et al.*, 1996, 1998; LAM, 2006; LI *et al.*, 1999; PATHOM-AREE *et al.*, 2006c].

So wurde auch Abyssomicin C entdeckt, ein Sekundärmetabolit aus dem seltenen marinen Actinomyceten *Verrucosipora maris* AB-18-032. Die Substanz wurde bei der gezielten Suche nach Hemmstoffen der *para*-Aminobenzoesäure-Biosynthese identifiziert und zeigt eine starke inhibitorische Wirkung gegenüber Gram-positiven Bakterien, wie multiresistenten Klinikisolaten von *Staphylococcus aureus*; die minimale inhibitorische Konzentration liegt hierfür bei 4 µg/ml [RIEDLINGER *et al.*, 2004]. Trotz dieser hohen antibakteriellen Aktivität und des einzigartigen Targets wurde diese Substanz von der pharmazeutischen Industrie nicht für den klinischen Einsatz weiterentwickelt.

Im Gegensatz dazu befindet sich Salinosporamid A, ein γ -Lactam- β -Lacton aus dem halophilen Bakterium *Salinispora tropica*, bereits in der klinischen Testphase, allerdings nicht als Antibiotikum, sondern als Hemmstoff des multiplen Myeloms durch Inhibition der proteolytischen Aktivität der 20S-Untereinheit des Proteasoms [FELING *et al.*, 2003; JENSEN *et al.*, 2005].

Einen bislang weitgehend unerforschten Lebensraum stellt auch der Marianengraben im Pazifischen Ozean dar, in dem die tiefsten Stellen des Weltmeeres liegen. Die Organisation JAMSTEC (*Japan Marine Science and Technology Center*) sammelte dort im Rahmen von verschiedenen Tauchgängen Sedimentproben [KYO *et al.*, 1995], die nach Sekundärstoff-produzierenden Mikroorganismen durchsucht wurden [PATHOM-AREE *et al.*, 2006c]. Darauf wird im folgenden Kapitel näher eingegangen.

1.3 Isolierung von Actinomyceten aus dem Marianengraben

Der Marianengraben erstreckt sich sichelförmig auf einer Länge von etwa 2.400 Kilometern und ist Teil des sogenannten pazifischen Feuerrings, der aus einer Kette von Tiefseegräben und Vulkanen besteht. Diese Linie reger Vulkanaktivität umspannt nahezu die gesamte Pazifische Platte, an deren umlaufendem Rand durch Plattentektonik Subduktionsvorgänge initiiert werden. Durch Subduktion der Lithosphäre der Pazifischen Platte unter die Philippinenplatte entstand der Marianengraben [FRYER *et al.*, 2003]. Dessen tiefste Stelle ist mit 10.898 Metern das Challengertief, das aufgrund der dort herrschenden ex-

tremen Bedingungen bzgl. Salzgehalt (34,7 %), Temperatur (2,6 °C) und Druck (11,13 kbar) kein geeignetes Habitat für marines Leben darstellt [AKIMOTO *et al.*, 2001]. Die Organisation JAMSTEC hat diesen Standort mit Hilfe spezieller Ausrüstung wie dem ROV (*remotly operated vehicle*) „Kaiko“ untersucht. Dieser Tauchroboter konnte während eines Tauchgangs (Nr. 74) bis auf den Grund des Challengertiefs (Koordinaten: 11°19'911" N; 142°12'372" E) vordringen und dort Sedimentproben sammeln [KYO *et al.*, 1995]. Aus diesen Proben wurden 38 verschiedene Actinomyceten isoliert und taxonomisch charakterisiert. Dabei wurden 19 Isolate der Gattung *Dermacoccus* zugeordnet [PATHOM-AREE *et al.*, 2006c], die Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist.

1.4 Die Gattung *Dermacoccus*

Die Gattung *Dermacoccus* wird zusammen mit den Gattungen *Demetria* und *Kytococcus* zur Familie der Dermacoccaceae zusammengefasst, die zur Ordnung *Actinomycetales* und somit zu den Actinobacteria gehört. Diese Einteilung wurde von STACKENBRANDT *et al.* [1995] vorgenommen, da sich innerhalb des ehemaligen Genus *Micrococcus* eine große Heterogenität bzgl. der Phylogenie und Chemotaxonomie zeigte. Die Umordnung resultierte in den fünf neuen Gattungen *Kocuria* gen. nov., *Nesternkonionia* gen. nov., *Kytococcus* gen. nov., *Dermacoccus* gen. nov. und *Micrococcus* Cohn 1872 gen. emend.

Dermacoccen sind Gram-positive Kokken mit einem GC-Gehalt von 66 bis 71 mol %, die weder Kapseln noch Endosporen bilden. Sie sind mesophil, Katalase-positiv, chemoorganotroph und nicht halophil. Die Gattung benötigt aerobe Bedingungen, ist aber zu geringem Wachstum auch unter mikroaerophilen Verhältnissen fähig.

Die Zellwände enthalten keine Mycol- und Teichonsäuren. Als Hauptbestandteil der Polysaccharide in der Zellwand ist Galactosamin zu finden, die Pentapetid-Kette tritt in der Variation A4a auf. Die Atmungskette enthält hydrogenierte Menachinone, wobei MK-8 (H₂) am häufigsten vorkommt. Die Dermacoccen besitzen die Cytochrome aa₃, c₅₄₉, c₅₅₅, b₅₅₉, b₅₆₄ und d₆₂₆. Ihre Membranen bestehen hauptsächlich aus den Phospholipiden Diphosphatidylglycerol, Phosphatidylglycerol und Phosphatidylinositol; als Hauptfettsäuren sind *iso*-C_{15:0}, *iso*-C_{17:0}, *iso*- und *anteiso*-C_{17:0} sowie *iso*-C_{17:1} zu finden [STACKENBRANDT *et al.*, 1995].

Es wurden bisher vier *Dermacoccus*-Stämme in der Literatur beschrieben, wobei *Dermacoccus nishnomiyaensis* [KOCUR *et al.*, 1975] als Modellspezies verwendet wird. *Dermacoccus abyssi* sp. nov. [PATHOM-AREE *et al.*, 2006a], *Dermacoccus barathri* sp. nov. [PATHOM-AREE *et al.*, 2006b] und *Dermacoccus profundi* sp. nov. [PATHOM-AREE *et al.*,

2006b] sind neu beschriebene Isolate aus dem Marianengraben. Zudem wurde vor kurzem im Zuge des „Human Microbiome Project“ begonnen, das Genom von *Dermaococcus* sp. Ellin185, einem Isolat der menschlichen Haut, zu sequenzieren [TURNBAUGH *et al.*, 2007]. Von den 19 *Dermaococcus*-Isolaten aus einer Sedimentprobe des Marianengrabens (vgl. 1.3) wurden acht Stämme als Produzenten neuartiger Sekundärmetabolite, den sogenannten Dermacozenen, beschrieben [WAGNER, 2009]. Dabei handelt es sich um neuartige Derivate der Substanzklasse der Phenazine, die im folgenden Kapitel behandelt wird.

1.5 Bedeutung und Biosynthese von Phenazinen

Moleküle der Phenazin-Familie gehören zu den heterozyklischen Verbindungen, wobei das Grundgerüst aus drei aromatischen Zyklen mit zwei Stickstoffatomen im mittleren Ring besteht. Das erste Phenazin, Pyocyanin, wurde 1860 von Mathurin-Joseph Fordos entdeckt und isoliert [FORDOS, 1860]. Seitdem wurden Vorkommen, Funktion und Biosynthese dieser Substanzklasse intensiv untersucht.

1.5.1 Phenazine: Struktur und Funktion

Bislang sind in der Literatur mehr als 6.000 Phenazin-Verbindungen bekannt, von denen etwa 100 natürlichen Ursprungs sind [LAURSEN & NIELSEN, 2004; MENDEL *et al.*, 2009]. Die Diversität der Organismen, die diese Substanzen produzieren, ist mit einer Ausnahme, dem Archaeon *Methanosarcina mazei* [ABKEN *et al.*, 1998], ausschließlich auf Bakterien beschränkt. Dazu gehören sowohl Gram-negative gamma-Proteobakterien wie z. B. *Pantoea agglomerans*, *Pelagibacter variabilis* oder verschiedene *Pseudomonas*-Spezies, beta-Proteobakterien wie z. B. *Burkholderia cepacia* und *Burkholderia phenazinium* als auch Gram-positive, wie *Microbiospora* (ehemals *Waksmania*) *aerata*, *Amycolata hydrocarbonoxydans*, *Brevibacterium linens*, *Brevibacterium iodinum*, *Nocardiopsis dassonville*, *Dermaococcus abyssi* sowie verschiedene *Streptomyces*-Stämme [ABDEL-MAGEED *et al.*, 2010; LAURSEN & NIELSEN, 2004; MAVRODI *et al.*, 2006, 2010].

Die am besten charakterisierten Phenazin-Produzenten sind die Pseudomonaden, darunter *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Pseudomonas chlororaphis*. In den meisten Fällen werden mehrere einfach-substituierte Derivate hergestellt. Dabei kommen vor allem amidierete, carboxylierte und hydroxylierte Modifikationen des Phenazin-Grundkörpers vor [MAVRODI *et al.*, 2006]. Einige Beispiele sind in Abbildung 1 gezeigt. Trotz dieser geringfügigen Unterschiede in der Modifikation können sich die biologischen

Aktivitäten erheblich voneinander unterscheiden. Es wurden antibiotische, antitumorale, antiparasitische sowie Antimalaria-Eigenschaften beschrieben [LAURSEN & NIELSEN, 2004]. In der Humanmedizin stellen einige Phenazine relevante Virulenzfaktoren dar. Dazu gehört auch das Pyocyanin (siehe Abbildung 1), das von dem opportunistischen Humanpathogen *Pseudomonas aeruginosa* produziert wird. Es schwächt bei Patienten mit cystischer Fibrose das Immunsystem, was das Überleben des Erregers fördert [LAU *et al.*, 2004; MURRAY *et al.*, 2007].

Antibakteriell wirkende Phenazine hemmen meist nur Gram-positive Bakterien. Dies ist z. B. für die Phenazin-1-Carbonsäure (siehe Abbildung 1) der Fall, die aufgrund ihrer Wirkung gegen *Mycobacterium tuberculosis* auch als Tubermycin B bezeichnet wird. Die Substanz weist wie viele weitere Phenazin-Derivate zudem eine antimykotische Wirkung auf und trägt im Boden zur Hemmung von pflanzenpathogenen Pilzen wie *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, *Gibberella avenacea*, *Alternaria* spp. oder *Drechslera graminea* bei [CHIN-A-WOENG *et al.*, 2001; MAVRODI *et al.*, 2006]. Einige Pseudomonaden werden deshalb auch als Biofungizide eingesetzt.

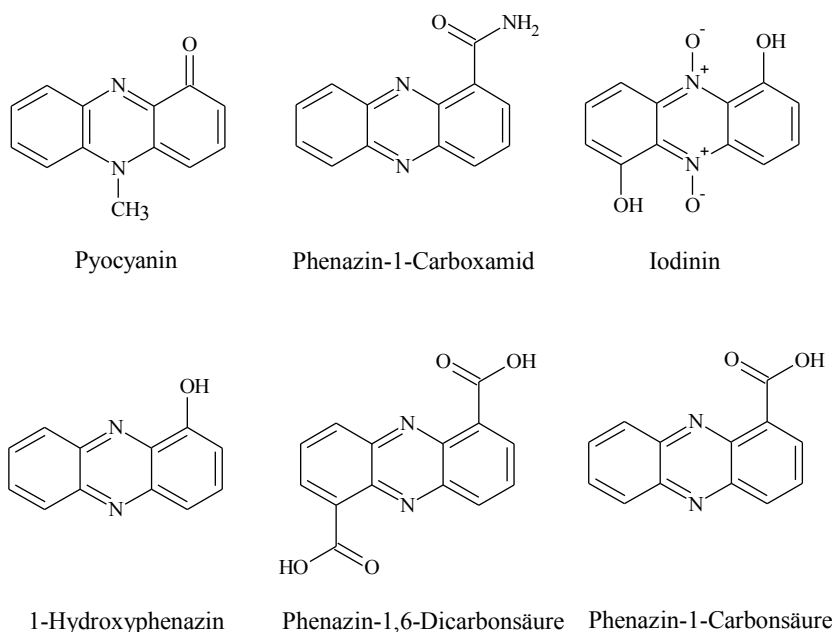


Abbildung 1: Strukturformeln einiger von *Pseudomonas* spp. produzierter Phenazine

Zusätzlich zu den einfachen Phenazin-Derivaten werden auch weit komplexere Strukturen mit einer Vielzahl von Substituenten am Grundgerüst hergestellt, z. B. bei Streptomyceten. Dazu gehören unter anderem Aminosäure-, Terpen-, Thioether-, Zucker- und Saphensäure-derivate [LAURSEN & NIELSEN, 2004]. Einige Beispiele sind in Abbildung 2 dargestellt.

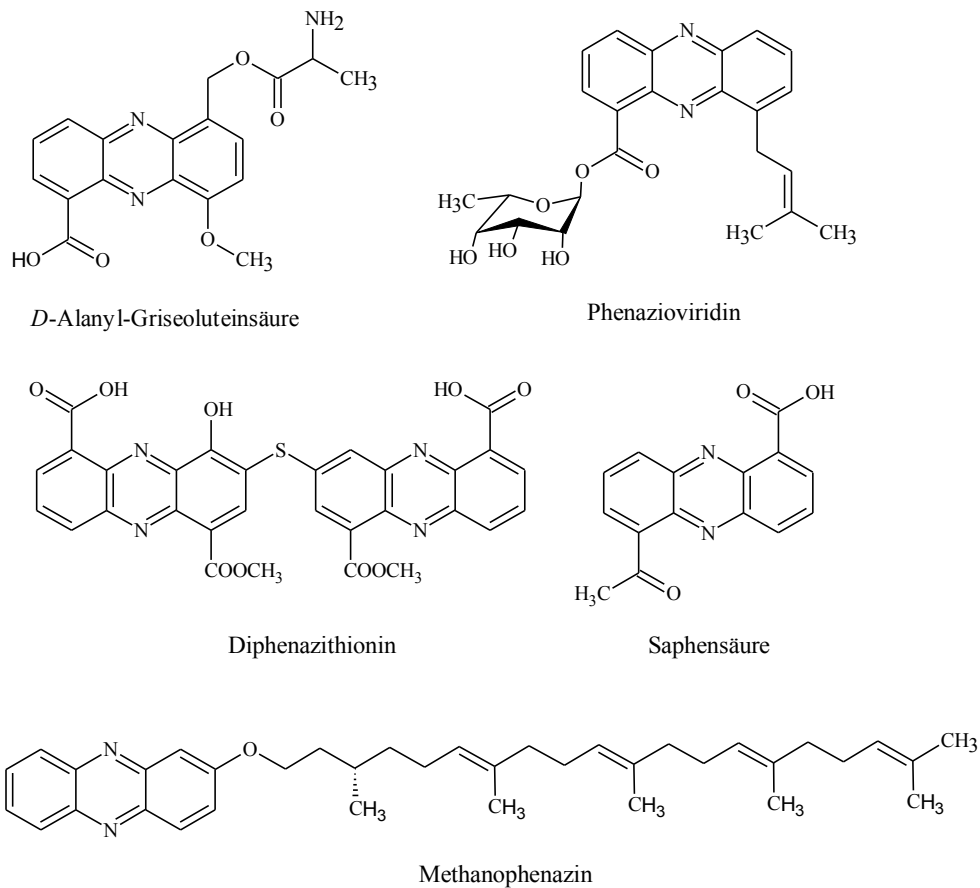


Abbildung 2: Strukturformeln weiterer Phenazin-Derivate, die nicht von *Pseudomonas* spp. stammen

Mit Methanophenazin wurde das erste Phenazin identifiziert, das nicht von einem Bakterium, sondern von einem methanogenen Archaeon, *Methanosarcina mazei* Gö1, produziert wird. Die physiologische Rolle dieses membrangebundenen Ether-Derivats ist vermutlich die Übertragung von Elektronen innerhalb der Cytoplasmamembran [ABKEN *et al.*, 1998; BEIFUSS *et al.*, 2000]. Im Allgemeinen haben viele Phenazine eine gute Redox-Aktivität, d. h. sie können Elektronen aufnehmen und an passende Akzeptoren wieder abgeben. Dies trägt wie im Fall des Pyocyanins zur Virulenz bei, indem der Vorrat an intrazellulärem cAMP und ATP sowie dem Antioxidans Glutathion reduziert bzw. die Katalase, ein Enzym zur Entgiftung von Sauerstoffradikalen, inhibiert wird. Dadurch kommt es zur Akkumulation von reaktiven Sauerstoffspezies, was die Zellen irreversibel schädigt [KANTHAKUMAR *et*

al., 1993; MULLER, 2002; O'MALLEY *et al.*, 2004]. Darüber hinaus können aufgrund dieser Redoxeigenschaften freie Radikale neutralisiert werden. Dies hat neuroprotektive Wirkungen zur Folge, da freie Radikale bei Erkrankungen des zentralen Nervensystems wie Parkinson oder Demenz eine entscheidende Rolle spielen, indem sie die neuronalen Zellen irreversibel schädigen. Dieser schützende Effekt konnte auch für die Aestivophenine, Benthocyanine und Phenostatine nachgewiesen werden [KIM *et al.*, 1999; LAURSEN & NIELSEN, 2004; SHINYA *et al.*, 1993].

1.5.2 Genetische und biochemische Aspekte der Phenazin-Biosynthese

Die Phenazin-Biosynthese wird bereits seit über 50 Jahren untersucht und ist bis heute noch nicht vollständig aufgeklärt. In ersten Versuchen wurde durch Zugabe radioaktiv-markierter Vorstufen zu *Pseudomonas*-Kulturen eine Verknüpfung zwischen Phenazin-Biosynthese und Shikimisäure-Stoffwechselweg entdeckt [MILLICAN, 1962]. Enorme Fortschritte wurden jedoch erst durch die Identifizierung der Phenazin-Gencluster in *Pseudomonas chlororaphis* und *Pseudomonas fluorescens* erzielt [MAVRODI *et al.*, 2006; MENTEL *et al.*, 2009]. Dabei konnte gezeigt werden, dass ein konserviertes Operon, das sieben Gene (*phzABCDEFG*) enthält, für die Phenazin-Synthese verantwortlich ist [MAVRODI *et al.*, 1998; PIERSON & THOMASHOW, 1992; PIERSON *et al.*, 1994, 1995]. Diese Grundgene finden sich in nahezu allen Phenazin-Produzenten wieder. Es werden mindestens die fünf Gene *phzB*, *phzD*, *phzE*, *phzF* und *phzG* benötigt, um Phenazin-1-Carbonsäure bzw. Phenazin-1,6-Dicarbonsäure zu produzieren. Daneben gibt es Gene, die ausschließlich an der Modifikation dieser Substanzen beteiligt sind. Ein Vergleich der Phenazin-Biosynthese-Gencluster verschiedener Spezies ist in Abbildung 3 gezeigt.

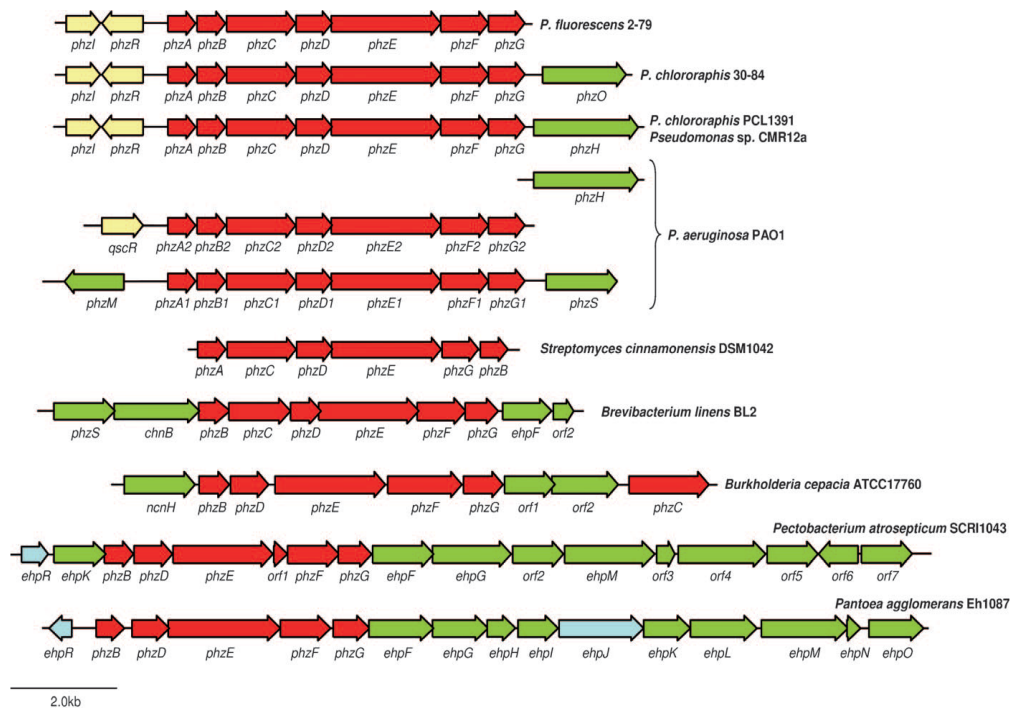


Abbildung 3: Zusammenstellung der Phenazin-Gencluster verschiedener Spezies; die Farben der Gene geben ihre Funktion an; rot: Grundgene, gelb: regulatorische Gene, grün: modifizierende Gene, hellblau: Transport- oder Resistenzgene; Abbildung entnommen aus [MENTEL *et al.*, 2009]

Die Vorstufen für die Phenazin-Biosynthese stammen aus dem Shikimisäure-Stoffwechselweg (Abbildung 4), der nur bei Pflanzen und Mikroorganismen vorkommt. Ausgehend von der Kondensation von Erythrose-4-Phosphat mit Phosphoenolpyruvat zu 3-Desoxy-*D*-Arabinoheptulosonsäure-7-Phosphat (DAHP) durch das Schlüsselenzym DAHP-Synthase wird in weiteren enzymkatalysierten Schritten Shikimisäure und anschließend Chorisminsäure gebildet. Die am besten untersuchten bakteriellen DAHP-Synthasen sind die aus *E. coli*, bei dem drei Isoenzyme vorkommen, eine Phenylalanin-sensitive, eine Tryptophan-sensitive und eine Tyrosin-sensitive DAHP-Synthase. Sie werden durch die jeweilige aromatische Aminosäure gehemmt (negative Rückkopplung). Chorisminsäure wiederum dient als Ausgangsstoff für die Synthese der aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan sowie der *para*-Aminobenzoesäure (*pAba*) bzw. der *para*-Hydroxybenzoesäure (*pHba*) [HERRMANN, 1995a, 1995b]. Die Enzyme aus dem Shikimisäure-Stoffwechselweg stammen alle aus dem Primärstoffwechsel und sind für Mikroorganismen essentiell.

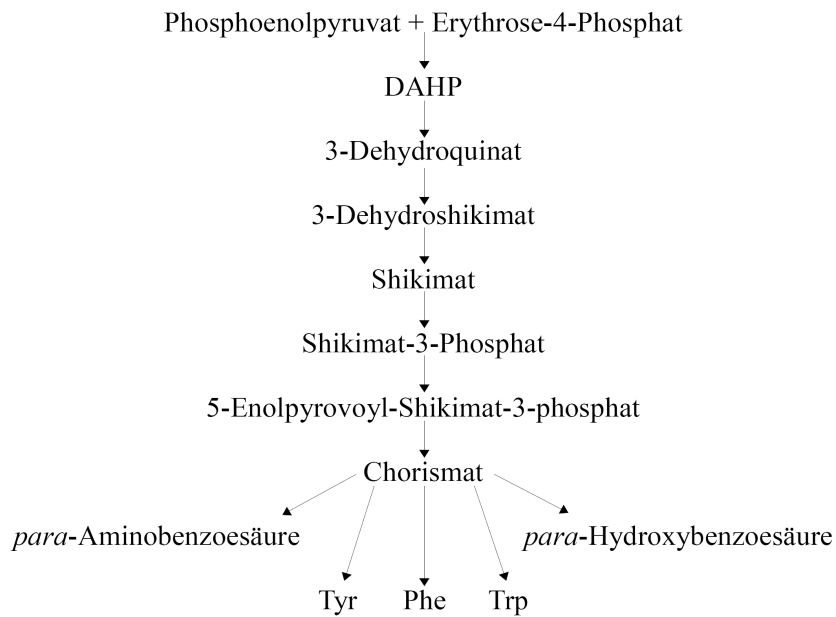


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Shikimisäure-Stoffwechselwegs. DAHP: 3-Desoxy-*D*-Arabinoseheptulosonsäure-7-Phosphat

Darüber hinaus ist die Chorisminsäure ebenfalls eine Vorstufe der Phenazine. Für weitere Syntheseschritte ausgehend von Chorisminsäure bzw. die Bildung des Phenazin-Grundgerüsts sind die Enzyme PhzE, PhzD, PhzF, PhzA/B und PhzG entscheidend. Eine Sonderstellung nimmt PhzC ein, da es eine im Sekundärstoffwechsel vorkommende DAHP-Synthase darstellt. Diese katalysiert ebenfalls die Kondensation von Erythrose-4-Phosphat mit Phosphoenolpyruvat zu DAHP, wird aber nicht durch negative Rückkopplung inhibiert [WEBBY *et al.*, 2005]. Der hypothetische Syntheseweg des Phenazingrundgerüsts ist in Abbildung 5 dargestellt und wird im Folgenden weiter erläutert.

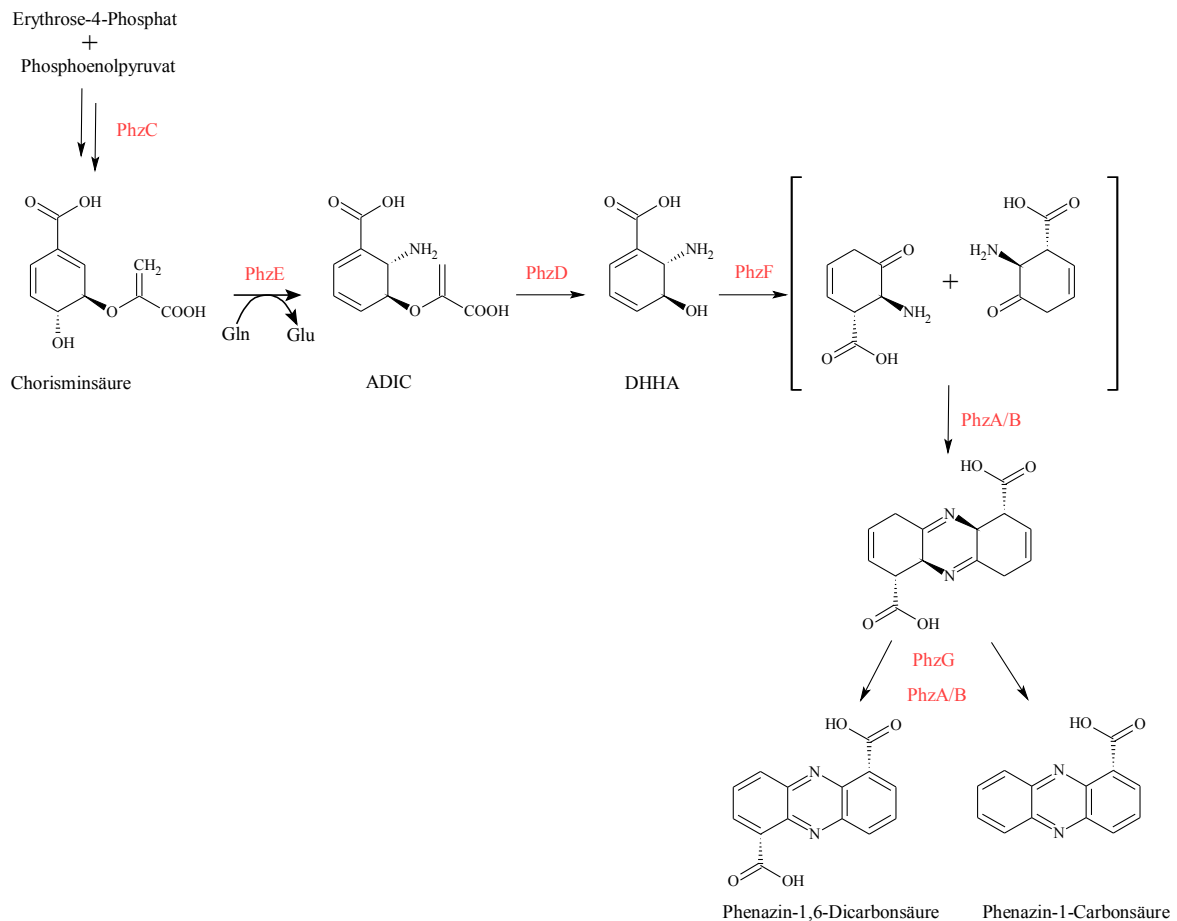


Abbildung 5: Biosyntheseweg des Phenazin-Grundgerüsts ausgehend vom Shikimisäurestoffwechselweg bis hin zur Phenazin-1-Carbonsäure bzw. Phenazin-1,6-Dicarbonsäure; ADIC, 2-Amino-2-Desoxyisochorisminsäure; DHHA, 2,3-Dihydro-3-Hydroxyanthranilsäure; Gln, Glutamin; Glu, Glutamat

PhzE ist eine Anthranilsäure-Synthase, an deren C-Terminus sich eine Amidotransferase-Domäne befindet. Diese amidiert vermutlich Chorisminsäure zu 2-Amino-2-Desoxyisochorisminsäure (ADIC) [McDONALD *et al.*, 2001]. Dabei wird Glutamin als Aminogruppendonor verwendet [GALBRAITH *et al.*, 2004]. Durch die Hydrolyse von ADIC mittels PhzD, einer Isochorismatase, entsteht 2,3-Dihydro-3-Hydroxyanthranilsäure (DHHA). Diese Reaktion wird durch Protonierung des Ethylen-Rests initiiert und führt zur Abspaltung von Pyruvat [PARSONS *et al.*, 2003]. DHHA wird anschließend durch die Isomerase PhzF umgewandelt. Bei dieser sogenannten perizyklischen Reaktion werden die Doppelbindungen des DHHA so verändert, dass 6-Amino-5-Oxocyclohex-2-en-1-Carbonsäure entsteht [BLANKENFELDT *et al.*, 2004; PARSONS *et al.*, 2004b]. Im Anschluss können zwei dieser Produkte zu einer symmetrischen Phenazin-Vorstufe kondensieren. Diese Dimerisierung kann spontan erfolgen, wird jedoch auch durch die Enzyme PhzA bzw. PhzB katalysiert [AHUJA *et al.*, 2008]. Die letzten Schritte zur Herstellung von Phenazin-1-Carbonsäure

(PCA) und Phenazin-1,6-Dicarbonsäure sind noch nicht vollständig aufgeklärt. Dies betrifft vor allem den Mechanismus der vollständigen Aromatisierung sowie die Decarboxylierung zu PCA. *In vivo* konnte gezeigt werden, dass PhzF und PhzA/B ausreichen, um DHHA hauptsächlich in PCA umzuwandeln, wobei in geringen Mengen auch Phenazin-1,6-Dicarbonsäure und der unsubstituierte Phenazin-Grundkörper entstehen [AHUJA *et al.*, 2008]. Bei Untersuchungen an PhzG wurde herausgefunden, dass es sich bei diesem Enzym um eine Flavinmononukleotid-abhängige Oxidase handelt [PARSONS *et al.*, 2004a; PIERSON *et al.*, 1995]. Aufgrund dieser Beobachtungen wird angenommen, dass es zwei Möglichkeiten der Vorstufen-Aromatisierung gibt. PCA entsteht vermutlich in einer Enzym-unabhängigen Reaktion durch oxidative Decarboxylierung der Vorstufe, während PhzG die Bildung von Phenazin-1,6-Dicarbonsäure durch eine Oxidation ohne Abspaltung der Carboxygruppe katalysiert [MENTEL *et al.*, 2009]. Diese beiden Moleküle stellen somit die Endprodukte dieses Biosynthesewegs dar, die jedoch stammspezifisch weiter modifiziert werden können.

1.6 Sekundärstoffproduktion in *Dermaococcus* sp.

Von den acht *Dermaococcus*-Stämmen, die als Dermacozin-Produzenten identifiziert worden waren (vgl. 1.4), wurden die beiden Spezies *Dermaococcus abyssi* MT 1.1 und *Dermaococcus* sp. MT 1.2 in früheren Arbeiten näher untersucht [ABDEL-MAGEED *et al.*, 2010; WAGNER, 2009]. Aus *D. abyssi* konnten dabei die Dermacozine A, B, D, E und G, aus *D. sp.* MT 1.2 die Dermacozine C und F isoliert werden. Anhand ihrer chemischen Struktur wurden die Substanzen den Phenazinen zugeordnet. Sie zeigen das charakteristische Grundgerüst aus drei aromatischen Ringen mit zwei Stickstoffatomen im mittleren Zyklus (Abbildung 6).

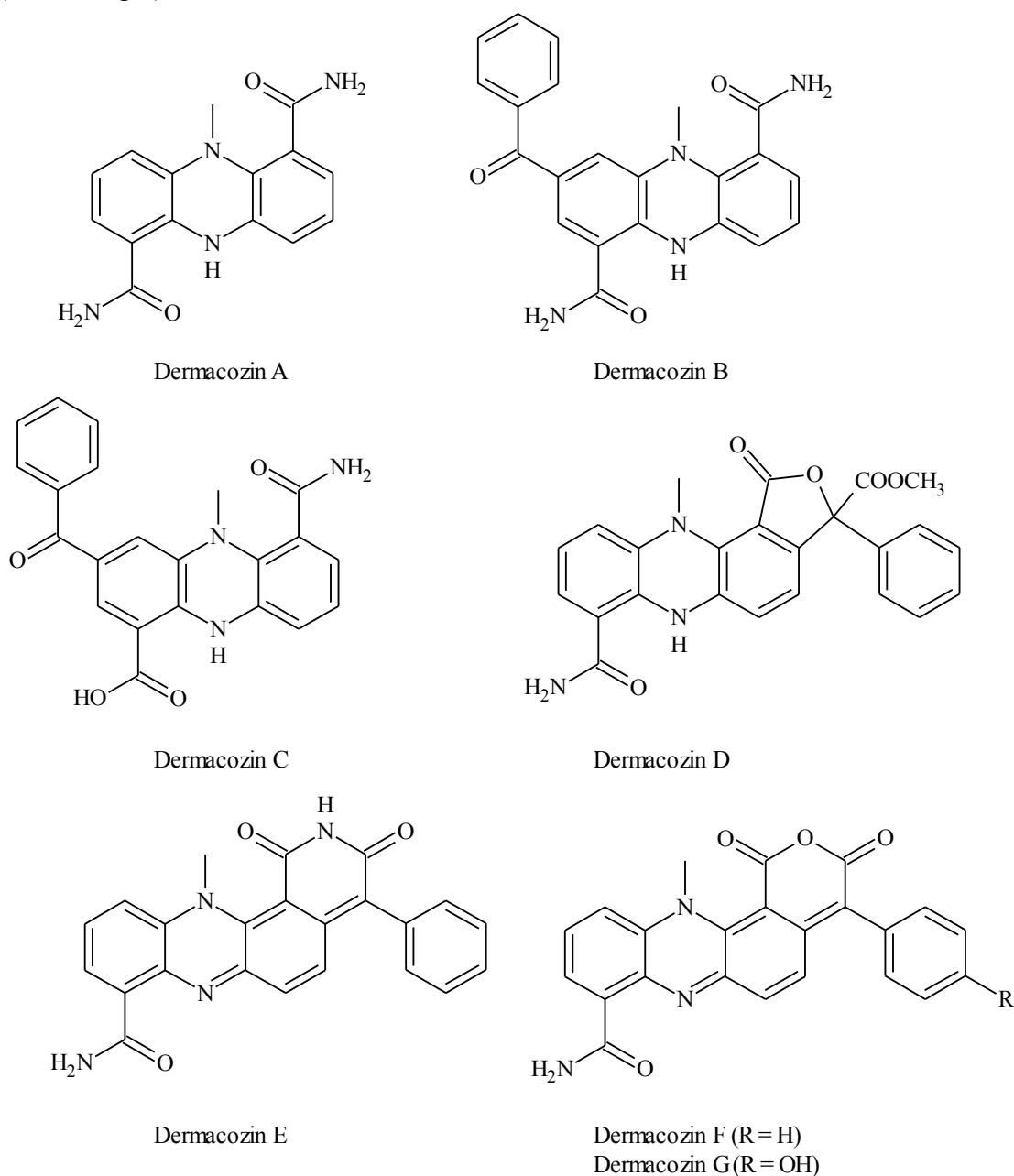


Abbildung 6: Strukturformeln der Dermacozine A - G

Weitere Charakteristika dieser Dermacozone sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1: Bezeichnung und Charakteristika aller bisher isolierten Dermacozone [Abdel-Mageed *et al.*, 2010; Wagner, 2009]

Dermacozin	Summenformel	Molekulargewicht [g/mol]	Exakte Masse [g/mol]	Farbe
A	C ₁₅ H ₁₄ N ₄ O ₂	282	282,1107	orange
B	C ₂₂ H ₁₈ N ₄ O ₃	386	386,1276	orange
C	C ₂₂ H ₁₇ N ₃ O ₄	387	387,121502	orange
D	C ₂₄ H ₁₉ N ₃ O ₅	429	429,12714	gelb
E	C ₂₃ H ₁₆ N ₄ O ₃	396	396,1217	blau
F	C ₂₃ H ₁₅ N ₃ O ₄	397	397,3971056	blau
G	C ₂₃ H ₁₆ N ₃ O ₅	413	413,101092	blau

Darüber hinaus wurden diese Substanzen auch auf ihre biologische Aktivität untersucht. Dabei zeigten die Dermacozone F und G eine mäßige zytotoxische Wirkung gegen die Leukämie-Zelllinie K562 mit einer mittleren inhibitorischen Konzentration (IC₅₀) von 9 bzw. 7 µM. Für alle Dermacozone konnten Radikalfänger-Eigenschaften nachgewiesen werden, die höchste Aktivität war dabei für Dermacozin C (IC₅₀ von 8,4 µM) zu beobachten.

1.7 Zielsetzung

Neben den Dermacozen C und F wurden mit Hilfe von HPLC-DAD-Analysen neun weitere Substanzen im Kulturfiltrat von *Dermaococcus* sp. MT 1.2 identifiziert, die anhand von UV-Vis- und HPLC-MS-Analysen ebenfalls den Phenazinen zugeordnet wurden. Aufgrund der zu geringen produzierten Menge von weniger als 1 mg/l konnten sie jedoch nicht als Reinsubstanzen gewonnen werden [WAGNER, 2009]. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, die Produktion dieser Substanzen zu verbessern, um sie in ausreichender Menge isolieren und anschließend weiter charakterisieren zu können. Dazu sollte zunächst der Einfluss einer unterschiedlichen Nährstoffzusammensetzung auf Sekundärstoffproduktion und Wachstum in Schüttelkulturen getestet werden.

Zudem hatte sich in vorausgegangenen Arbeiten eine extreme Schaumentwicklung während des Fermentationsprozesses gezeigt [WAGNER, 2009]. Diese galt es im Rahmen der vorliegenden Arbeit zu vermindern, um eine Reduktion der Substanzmenge zu umgehen. Unter diesen optimierten Bedingungen sollten Fermentationen im 10 Liter-Maßstab durchgeführt werden, um genügend Material für die Aufreinigung der Zielkomponenten zu ge-

winnen. Diese sollte mit Hilfe spezifischer Isolierungsmethoden erfolgen, um die erhaltenen Reinsubstanzen anschließend biologisch, chemisch und physikalisch charakterisieren zu können.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, den Biosyntheseweg der Dermacozine mit Hilfe einer Genbibliothek aufzuklären. Die bereits für andere Phenazine beschriebene Abfolge der einzelnen Reaktionsschritte (vgl. 1.5.2 und Abbildung 5) diene dabei als Ausgangspunkt. Anhand des identifizierten Genclusters sollte ein Schema über den hypothetischen Verlauf der Dermacozin-Synthese erstellt werden. Das Gencluster sollte anschließend mittels heterologer Genexpression in *Streptomyces* sp. verifiziert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Hilfsmittel

Tabelle 2: Verwendete Geräte

Gerät	Bezeichnung	Firma
10 Liter-Blattrührfermenter	FS-314	New Brunswick Scientific, New Jersey
Elektroporationsgerät	MicroPulser™	Bio-Rad Laboratories, München
Gefriertrockner	Lyovac GT2	Heraeus Holding, Hanau
Gelelektrophoresezubehör	Elektrophoresekammer Power Supply 1000-500	Bioplex Strehlau & Kruse, Freiburg Bio-Rad Laboratories, München
Heizblock	Digital dry block Heater	PMC Barnstead Dataplate, Leverkusen
HPLC-DAD-System	HP 1090 HP Kayak XM 600 Software Rev A.08.03	Hewlett Packard, Waldbronn
HPLC-DAD-ESI-MS-System	1200 Binäre Pumpe 1200 Autosampler, thermostatisiert 1200 Säulenthmostat 1200 DAD mit 10 mm Standard-Flusszelle LC/MSD Ultra Trap System XCT 6330	Agilent Technologies, Waldbronn
HPLC-Kohlenhydrat-Analytik	HP 1050 HPLC-Pumpe HP 1074A Refraktometer HP 3396A Integrator ISS-100 Autosampler	Hewlett Packard, Waldbronn Perkin-Elmer, Überlingen
Inkubatoren		Ehret Labor- und Pharmatechnik, Emmendingen
LC-Niederdrucksystem	2 x Pumpe E100 Software BEGRA Ultrac 7000 Fraktionssammler ISCO UA-5	Besta, Wilhelmsfeld Amersham-Pharmacia, Freiburg AS Messtechnik, Sporkhövel
Magnetrührer	IKAMAG Reo	IKA Werke, Staufen
pH-Meter	Orion 2 Star pH Benchtop	Fisher Scientific, Schwerte
Photometer	Spectralphotometer U-2000	Hitachi
PHPLC-System	LaPrep mit 2 x P110 Pumpen dynamische Mischkammer P 314 2-Kanal-UV-Vis Detektor manuelles Injektionssystem Valco C6UW mit 5 ml-Probenschlaufe 2-Kanal Flachbetschreiber	VWR, Darmstadt Knauer, Berlin VWR, Darmstadt Macherey & Nagel, Düren Abimed, Langenfeld
Pipetten	Labmate 20 µl, 200 µl, 1000 µl, 5 ml, 10 ml	Abimed, Langenfeld
Reinstwasseranlage	MilliQ Water Purification System	Millipore, Schwalbach

Gerät	Bezeichnung	Firma
Rotationsverdampfer	Rotavapor-RE Controller CVC 24 Pumpe MD 4	Büchi, Essen Vacuubrand, Wertheim Vacuubrand, Wertheim
Thermocycler	Primus 96 Plus	AVISO, Greiz-Gommla
Trockenschrank	Bio VI 2055-48	Memmert, Schwabach
Überkopfschüttler	Reax 2	Heidolph Instruments, Schwabach
UV-Transilluminator	Biochapt MV	Herolab Laborgeräte, Wiesloch
Vakuumpumpe	WOB L-PRESS/VAC DRY PUMP2	Welch, Alton, UK
Vakuumpumpe	Centrivic	Heraeus Holding, Hanau
Vortexer	Reax 1R	Heidolph Instruments, Schwabach
Waage	Sartorius Basic	Sartorius, Göttingen
Zentrifugen	Megafuge 1.0 R Biofuge 13	Heraeus Holding, Hanau Heraeus Holding, Hanau

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Firma
Antibiotika-Testblättchen	Macherey-Nagel, Düren
Einmal-Küvetten 1,5 ml	Kuhnle, Karlsruhe
Elektroporationsküvetten	Molecular BioProducts, San Diego, USA
Extraktgläschen 4 ml, 5 ml, 20 ml	International Chemie Technik, Bad Homburg
Glasfaserfilterpapier MN85Bf	Macherey-Nagel, Düren
HPLC-Probengläschen N11-1 HP	Dedeke, Königswinter
Microspin S-400 HR Columns	GE Healthcare, München
Parafilm	American National Can, Chicago, USA
Petrischalen 94/16 mm	Kuhnle, Karlsruhe
Pipettenspitzen	Greiner, Frickenhausen
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Kuhnle, Karlsruhe
Reaktionsgefäße Safe Lock 2,0 ml	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße PCR Multi Ultra-Stripes	Carl Roth, Karlsruhe
Rotiprotect-Latexhandschuhe	Carl Roth, Karlsruhe
Rotiprotect-Nitrilhandschuhe	Carl Roth, Karlsruhe
Zentrifugenröhrchen 15 ml, 50 ml	Kuhnle, Karlsruhe

2.1.3 Verwendete Kits

Tabelle 4: Verwendete Kits

Bezeichnung	Firma
CloneJET™ PCR Cloning Kit	Fermentas, St. Leon-Rot
Gigapack III XL Packaging Extract	Stratagene, Agilent Technologies, Böblingen
illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit	GE Healthcare, München
illustra™ plasmidPrep Mini Spin Kit	GE Healthcare, München
PureYield™ Plasmid Midiprep System	Promega, Mannheim

2.1.4 Enzyme

Tabelle 5: Verwendete Enzyme

Bezeichnung	Firma
<i>Bam</i> HI 10 U/μl	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Bsa</i> I 10 U/μl	Fermentas, St. Leon-Rot
CIAP 1 U/μl	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Dra</i> I 10 U/μl	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Eco</i> RI 10 U/μl	Fermentas, St. Leon-Rot
KAPAHiFi-Polymerase 1 U/μl	Peqlab, Erlangen
Lysozym 105000 U/mg	Serva Electrophoresis, Heidelberg
<i>Nco</i> I 10 U/μl	Fermentas, St. Leon-Rot
Proteinase K 51 U/mg	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
<i>Sac</i> I 10 U/μl	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Sau</i> 3AI 10 U/μl	New England Biolabs, Frankfurt am Main
T4 DNA-Ligase 1 WeissU/μl	Fermentas, St. Leon-Rot
Taq-Polymerase 5 U/μl	Qiagen, Hilden
<i>Xba</i> I 10 U/μl	Fermentas, St. Leon-Rot

2.1.5 Vektoren und Cosmide

Tabelle 6: Verwendete Vektoren und Cosmide

Vektor/Cosmid	relevanter Genotyp	Referenz
pJET1.2/blunt	<i>eco47RI</i>	Fermentas, St. Leon-Rot
pIJ787	<i>attP-int, tet</i>	[GUST <i>et al.</i> , 2004]
pIJ790	λRED (<i>gam, bet, exo</i>), <i>cat, araC, rep101^{ts}</i>	[GUST <i>et al.</i> , 2003]
pUB307	RP4-Derivat, <i>tra, tet, Δneo</i>	[BENNETT <i>et al.</i> , 1977]
pUWL201	<i>bla, tsr, ermE*</i>	[DOUMITH <i>et al.</i> , 2000] (Abbildung 60)
pUWL201_orf15	<i>bla, tsr</i> , codiert <i>orf15</i> aus MW_A9 hinter dem konstitutiven Promotor <i>ermE*</i>	diese Arbeit (vgl. Abbildung 61)
pUWL201_orf20	<i>bla, tsr</i> , codiert <i>orf20</i> aus MW_A9 hinter dem konstitutiven Promotor <i>ermE*</i>	diese Arbeit (vgl. Abbildung 62)
pUWL201_orf22	<i>bla, tsr</i> , codiert <i>orf22</i> aus MW_A9 hinter dem konstitutiven Promotor <i>ermE*</i>	diese Arbeit (vgl. Abbildung 63)
pUWL201_orf24	<i>bla, tsr</i> , codiert <i>orf24</i> aus MW_A9 hinter dem konstitutiven Promotor <i>ermE*</i>	diese Arbeit (vgl. Abbildung 64)
pUWL201_Plac/ermE	<i>bla, hph, tsr, ermE*</i>	[SALEH <i>et al.</i> , 2012]
SuperCos 1	<i>bla, cos, neo</i>	[EVANS <i>et al.</i> , 1989]; Stratgene
Cosmid MW_A9	SuperCos 1-Derivat mit <i>orf1 - orf30</i> aus <i>D. sp. MT 1.2, bla, cos, neo</i>	diese Arbeit (vgl. Abbildung 57)
Cosmid MW_A9_int	SuperCos 1-Derivat mit <i>orf1 - orf30</i> aus <i>D. sp. MT 1.2, cos, neo, tet, int</i>	diese Arbeit (vgl. Abbildung 58)
Cosmid MW_A9_int_ermE	SuperCos 1-Derivat mit <i>orf1 - orf30</i> aus <i>D. sp. MT 1.2</i> hinter dem konstitutiven Promotor <i>ermE*, cos, neo, tet, int</i>	diese Arbeit (vgl. Abbildung 59)

2.1.6 Synthetische Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Eurofins MWG, Ebersberg, bezogen.

Tabelle 7: Verwendete Primer

Bezeichnung	Sequenz	Anwendung
ermE/hygro_fw	5'-GAAATCGGGCGTGGTTCGCTACAAGC TCCGGTCAGCACGTCGATAAGCTTGATTG TAGG-3'	Amplifizierung von <i>hph</i> und <i>ermE*</i> zur homologen Rekombination
ermE/hygro_rev	5'-CGGATGCACCTGCTCCACCTGGAGCG TGTGCTTGTAAGCCTTCTAGAACTAGTGG ATC-3'	Amplifizierung von <i>hph</i> und <i>ermE*</i> zur homologen Rekombination
orf15_fw	5'-TTAGCGAATTCAATGCGAGCTGACCGA CTTG-3'	Amplifizierung von <i>orf15</i> unter Einführung einer <i>EcoRI</i> -Schnittstelle
orf15_rev	5'-GAGTCCTCTAGACTACGACAGCACGTG GTCGTGGAACGG-3'	Amplifizierung von <i>orf15</i> unter Einführung einer <i>XbaI</i> -Schnittstelle
orf20_fw	5'-CGTAGGAATTCATGGACGAGCGCGTTG CAC-3'	Amplifizierung von <i>orf20</i> unter Einführung einer <i>EcoRI</i> -Schnittstelle
orf20_rev	5'-TTATCCTCTAGACTAGCCGCGTGCGCA GTCC-3'	Amplifizierung von <i>orf20</i> unter Einführung einer <i>XbaI</i> -Schnittstelle
orf22_fw	5'-ATAGCGAATTCATGGCATTGCGGGTGG TG-3'	Amplifizierung von <i>orf2</i> unter Einführung einer <i>EcoRI</i> -Schnittstelle
orf22_rev	5'-GTAGCCTCTAGATCACCCGACCAACA GAAC-3'	Amplifizierung von <i>orf22</i> unter Einführung einer <i>XbaI</i> -Schnittstelle
orf24_fw	5'-ATGCAGAATTCATGGCCCGACCTCGT G-3'	Amplifizierung von <i>orf24</i> unter Einführung einer <i>EcoRI</i> -Schnittstelle
orf24_rev	5'-GTTAACTCTAGATCATCGGAAGGACGC GAGGAC-3'	Amplifizierung von <i>orf24</i> unter Einführung einer <i>XbaI</i> -Schnittstelle
phzB_fw	5'-TGYTCCCCGACTGGGAGTGG-3'	PCR zur Identifizierung von <i>phzB</i> im Genom von <i>Dermacoccus</i> sp. MT 1.2
phzB_rev	5'-NGGDATNCCTCNCGYTTDAT-3'	PCR zur Identifizierung von <i>phzB</i> im Genom von <i>Dermacoccus</i> sp. MT 1.2
phzF_fw	5'-CTCGGGGCGGCGATCGTGCT-3'	PCR zur Identifizierung von <i>phzF</i> im Genom von <i>Dermacoccus</i> sp. MT 1.2
phzF_rev	5'-TCCACGACGCCGTAAGCCGG-3'	PCR zur Identifizierung von <i>phzF</i> im Genom von <i>Dermacoccus</i> sp. MT 1.2
phzFdegen_fw	5'-CATCCGGATCTTGACCCCNGTNAAY GA-3'	PCR zur Identifizierung von <i>phzF</i> im Genom von <i>Dermacoccus</i> sp. MT 1.2
phzFdegen_rev	5'-GAGGGGCGCCCCATYTCNCANCC-3'	PCR zur Identifizierung von <i>phzF</i> im Genom von <i>Dermacoccus</i> sp. MT 1.2
phzF-hygro_fw	5'-ATCTCCTGTGCGATCTGCTGCATCC-3'	PCR zur Kontrolle der Integration von <i>ermE*/hph</i> in das Cosmid MW_A9_int
phzF-hygro_rev	5'-GTCTCCCGCATAGACGTCGGTGAAG-3'	PCR zur Kontrolle der Integration von <i>ermE*/hph</i> in das Cosmid MW_A9_int
T3	5'-AATTAACCCTCACTAAAGGG -3'	Sequenzierung der Cosmid-Insert-Enden
T7	5'-TAATACGACTCACTATAGGG -3'	Sequenzierung der Cosmid-Insert-Enden
tet_fw	5'-ATGTCATCAGCGGTGGAGTG-3'	PCR zum Nachweis von <i>tetR</i>
tet_rev	5'-TGACGATCAGCGGTCCAGTG-3'	PCR zum Nachweis von <i>tetR</i>

2.1.7 Bakterienstämme

Tabelle 8: Verwendete Stämme

Bezeichnung	relevanter Genotyp	Referenz
<i>Dermacoccus</i> sp. MT 1.2		[PATHOM-AREE <i>et al.</i> , 2006c]
<i>E. coli</i> SURE	<i>endA1 glnV44 thi-1 gyrA96 relA1 lac recB recJ sbcC umuC::Tn5 uvrC e14- Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)171 [F' proAB⁺ lacI^f lacZΔM15 Tn10]</i>	Stratagene, Agilent Technologies, Böblingen
<i>E. coli</i> BW25113	<i>lacI^f rrnB3 ΔlacZ4787 hsdR514 Δ(arabAD)567 Δ(rhaBAD)568 rph-1</i>	[DATSENKO & WANNER, 2000]
<i>E. coli</i> GM2163	F- <i>ara-14 leuB6 thi-1 fhuA31 lacY1 tsx-78 galK2 galT22 supE44 hisG4 rpsL136 xyl-5 mtl-1 dam13::Tn9 dcm-6 mcrB1 hsdR2</i>	New England Biolabs, [BENNETT <i>et al.</i> , 1977]
<i>E. coli</i> XL1 Blue	<i>endA1 gyrA96 thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 [F' ::Tn10 proAB⁺ lacI^f Δ(lacZ)M15] hsdR17(r_K⁻ m_K⁺)</i>	Stratagene, Agilent Technologies, Böblingen
<i>E. coli</i> S17-1	<i>recA pro hsdR RP4-2-Tc::Mu-Km::Tn7</i>	[McFARLANE <i>et al.</i> , 1987]
<i>Streptomyces lividans</i> TK 23	<i>spc-1</i> , plasmidfrei	[KIESER <i>et al.</i> , 1982]

2.1.8 Materialien für die Chromatographie

Tabelle 9: Verwendete Materialien für Dünnschicht- und Flüssigchromatographie

Bezeichnung	Firma
Amberlite XAD-16	Rohm und Haas, Frankfurt
Fractogel TSK-40 F (0,040 - 0,063 mm)	Merck, Darmstadt
LiChroprep Diol (0,040 - 0,063 mm)	Merck, Darmstadt
Nucleosil 100 C-18 (3µm)	Dr. Maisch, Ammerbuch-Entringen
Sephadex LH-20	Amersham Bioscience, Freiburg
Reprosil 100 NH ₂	Dr. Maisch, Ammerbuch-Entringen
Reprosil pur Basic C-18 (5 µm)	Dr. Maisch, Ammerbuch-Entringen
Reprosil pur Basic C-18 (10 µm)	Dr. Maisch, Ammerbuch-Entringen

2.1.9 Chemikalien und Reagenzien

Soweit nicht anders aufgeführt wurden analysereine Chemikalien der Firma Merck, Darmstadt, verwendet.

Tabelle 10: Verwendete Chemikalien und Reagenzien

Chemikalie	Firma
Aceton	Fisher Scientific, Ulm
Acetonitril HPLC Grade	J.T. Baker, Deventer, Holland
Agrimul COS2	COGNIS, Monheim am Rhein
Agrimulester Derivat 1	Sidobre Sinnova, Saint-Fargeau Ponthierry, Frankreich
Ampicillin-Natriumsalz	AppliChem, Darmstadt
<i>para</i> -Aminobenzoesäure	Carl Roth, Karlsruhe

Chemikalie	Firma
Ascorbinsäure	Carl Roth, Karlsruhe
Bacto-Agar	Becton Dickinson, Heidelberg
Bacto Casaminoacids	Difco Laboratories, Augsburg
Bacto Nutrient Broth	Difco Laboratories, Augsburg
Bacto Pepton	Difco Laboratories, Augsburg
Bacto Soyton	Difco Laboratories, Augsburg
Bacto Trypton	Difco Laboratories, Augsburg
CaCl ₂	Riedel-de Haën, Seelze
CaCO ₃	Carl Roth, Karlsruhe
Chloramphenicol	Serva Electrophoresis, Heidelberg
Dichlormethan	Fisher Scientific, Ulm
2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl	Alfa Aesar, Karlsruhe
DMSO	Carl Roth, Karlsruhe
EDTA	Riedel-de Haën, Seelze
Ethylacetat	Fisher Scientific, Ulm
Genapol 2882	Hoechst, Burgkirchen
GeneRuler 1 kb DNA-Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
Glucose	Cerestar, Krefeld
L-Glutamin	Carl Roth, Karlsruhe
Glycerin (99,5 %)	Henkel, Düsseldorf
H ₂ SO ₄	Carl Roth, Karlsruhe
Hafermehl Holo Hafergold	Neuform, Zarretin
HCl	Riedel-de Haën, Seelze
Hefeextrakt Ohly KAT	Deutsche Hefewerke, Hamburg
Hexan	Carl Roth, Karlsruhe
<i>para</i> -Hydroxybenzoesäure	Carl Roth, Karlsruhe
Hygromycin	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Isopropanol	Fisher Scientific, Ulm
Kanamycin	AppliChem, Darmstadt
Malzextrakt	Oxoid, Wesel
Meersalz	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Methanol	Fisher Scientific, Ulm
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	Carl Roth, Karlsruhe
Nalidixinsäure	Fluka Chemie, Oberhaching
NaOH	Carl Roth, Karlsruhe
NH ₄ Cl	Carl Roth, Karlsruhe
NH ₄ NO ₃	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Phenylalanin	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
PEG2000	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Q-Solution	Fermentas, St. Leon-Rot
Rotiphenol/C/I	Carl Roth, Karlsruhe
Saccharose	Carl Roth, Karlsruhe
SDS	Serva Electrophoresis, Heidelberg
Sojaöl	COGNIS, Monheim am Rhein
Sonnenblumenöl K-Classic	Kaufland Warenhandel, Neckarsulm
Spülmittel K-Classic	Kaufland Warenhandel, Neckarsulm
Stärke löslich	Carl Roth, Karlsruhe
TES	Carl Roth, Karlsruhe

Chemikalie	Firma
Tetracyclin	Serva Electrophoresis, Heidelberg
Thiostrepton	Carl Roth, Karlsruhe
Triethylamin	Fluka Chemie, Oberhaching
Tris-HCL	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Tryptophan	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Tyrosin	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Ucolub N 115	Fragol Industrieschmierstoff, Mülheim

2.1.10 Medien und Medienzusätze

Der pH-Wert wurde mit HCl bzw. NaOH entsprechend eingestellt. Alle Medien wurden autoklaviert; für Festnährmedien wurden vor dem Autoklavieren 15 g/l Bacto-Agar zugesetzt.

Tabelle 11: Verwendete Medien

Bezeichnung	Zusammensetzung	
410 (pH 7,0)	Glucose	10 g
	Glycerin	10 g
	Hafermehl	5 g
	Hefeextrakt	5 g
	Bacto Casaminoacids	5 g
	CaCO ₃	1 g
	Leitungswasser	ad 1,0 l
420 (pH 7,0)	Glucose	20 g
	Glycerin	10 g
	Hafermehl	5 g
	Hefeextrakt	5 g
	Bacto Casaminoacids	5 g
	CaCO ₃	2 g
	Leitungswasser	ad 1,0 l
Cullum	Mannit	20 g
	Sojamehl	20 g
	H ₂ O deion.	ad 1,0 l
DSMZ 1 (pH 7,0)	Bacto Pepton	5 g
	Malzextrakt	3 g
	MnSO ₄ x H ₂ O	10 mg
	H ₂ O deion.	ad 1,0 l
KM 1 (pH 7,2)	Bacto Nutrient Broth	8 g
	NaCl	5 g
	H ₂ O deion.	ad 1,0 l
KM 4 (pH 7,3)	Hefeextrakt	4 g
	Glucose	10 g
	Malzextrakt	4 g
	Leitungswasser	ad 1,0 l
KM 5 (pH 5,0)	Hefeextrakt	4 g
	Glucose	10 g
	Malzextrakt	4 g
	Leitungswasser	ad 1,0 l

Bezeichnung	Zusammensetzung	
LB (pH 7,4)	Trypton	10 g
	Hefeextrakt	5 g
	NaCl	5 g
	H ₂ O deion.	ad 1,0 l
M2 (pH 7,0)	Sojamehl	15 g
	NaCl	5 g
	CaCO ₃	3 g
	Eisen-II-Sulfat	0,3 g
	Glycerin	50 g
	Leitungswasser	ad 1,0 l
MM 1 (pH 7,0)	Glucose ¹	5 g
	Tri-Na-Citrat x H ₂ O	0,5 g
	KH ₂ PO ₄	3 g
	K ₂ HPO ₄	7 g
	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,1 g
	(NH ₄) ₂ SO ₄	1 g
	H ₂ O deion.	ad 1,0 l
MM 2	Glucose ¹	8 g
	Ammoniumtartrat	4 g
	NaCl	5 g
	K ₂ HPO ₄	2 g
	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	1 g
	CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,2 g
	MnSO ₄ x H ₂ O	0,01 g
	Ferrioxamin B	0,02 g
	H ₂ O deion.	ad 1,0 l
MS	Mannit	20 g
	Sojamehl	20 g
	MgCl ₂ x 6 H ₂ O	2 g
	H ₂ O deion.	ad 1,0 l
OM	Hafermehl	25 g
	Spurenelementlösung OM ²	5 ml
	Leitungswasser	ad 1,0 l
R2YE	Saccharose	128,75 g
	K ₂ SO ₄	0,31 g
	MgCl ₂ x 6 H ₂ O	12,65 g
	Glucose	12,5 g
	Casaminoacids	0,125 g
	H ₂ O deion.	ad 800 ml
	0,5 % KH ₂ PO ₄ ¹	12,5 ml
	5 M CaCl ₂ ¹	5 ml
	20 % L-Prolin ¹	18,75 ml
	5,73 % TES (pH7,2) ¹	125 ml
	Spurenelementlösung R2YE ²	2,5 ml
1 N NaOH ¹	6,25 ml	
10 % Hefeextrakt ¹	50 ml	
S	Pepton	4 g
	Hefeextrakt	4 g
	K ₂ HPO ₄	4 g
	KH ₂ PO ₄	2 g
	Glycin	10 g
	S-Medienzusatz ^{1,2}	200 ml
	H ₂ O deion.	ad 1,0 l

Bezeichnung	Zusammensetzung	
SGG (pH 7,3)	Stärke löslich	10 g
	Glucose	10 g
	Glycerin	10 g
	Cornsteep Powder	2,5 g
	Bacto Pepton	5 g
	Hefeextrakt	2 g
	NaCl	1 g
	CaCO ₃	3 g
	Leitungswasser	ad 1,0 l
SOB	Hefeextrakt	5 g
	Trypton	20 g
	NaCl	0,58 g
	KCl	0,19 g
	MgCl ₂ x 6 H ₂ O	2,03 g
	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	4,93 g
	H ₂ O deion.	ad 1,0 l
SOC	Hefeextrakt	5 g
	Trypton	20 g
	NaCl	0,58 g
	KCl	0,19 g
	MgCl ₂ x 6 H ₂ O	2,03 g
	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	4,93 g
	Glucose ¹	4,93 g
	H ₂ O deion.	ad 1,0 l
TSG (pH 7,3)	Bacto Trypton	17 g
	Bacto Soyton	3 g
	Glucose	2,5 g
	NaCl	5 g
	K ₂ HPO ₄	2,5 g
	Leitungswasser	ad 1,0 l
YMG (pH 7,3)	Hefeextrakt	4 g
	Glucose	4 g
	Malzextrakt	10 g
	Leitungswasser	ad 1,0 l
2 x YT (pH 7,0)	Trypton	16 g
	Hefeextrakt	10 g
	NaCl	5 g
	H ₂ O deion.	ad 1,0 l

¹ wurde separat autoklaviert und nach dem Abkühlen steril zum Medium gegeben

² Zusammensetzung siehe Tabelle 12

2.1.11 Lösungen und Puffer

Tabelle 12: Verwendete Lösungen und Puffer

Bezeichnung	Zusammensetzung	
50 x TAE-Puffer	Tris-HCl	484 g
	Na-Acetat	82 g
	EDTA	37,22 g
	Eisessig	100 ml
	H ₂ O deion.	ad 2,0 l

Bezeichnung	Zusammensetzung	
Dische-Reagenz	Diphenylamin	1,5 g
	Eisessig	100 ml
	konz. H ₂ SO ₄	1,5 ml
	1,6 % wässriges Acetaldehyd ²	0,1 ml
Kaliumacetat ¹	5 M Kaliumacetat	6 ml
	Eisessig	1,15 ml
	H ₂ O deion.	2,85 ml
Konservierungslösung ¹	Glycerin	20 g
	Saccharose	10 g
	H ₂ O deion.	70 ml
Lösung I (pH 8,0)	Tris-HCl	50 mM
	EDTA	10 mM
Lösung II	NaOH	200 mM
	SDS	1 %
Lösung III (pH 5,5)	Kaliumacetat	3 M
P-Puffer	350 mM Saccharose ¹	858 ml
	Spurenelementlösung P ^{1,2}	2 ml
	TES (250 mM; pH 7,2) ^{1,2}	10 ml
	1 M MgCl ₂ ^{1,2}	10 ml
	250 mM CaCl ₂ ^{1,2}	10 ml
	140 mM K ₂ SO ₄ ^{1,2}	10 ml
	40 mM KH ₂ PO ₄ ^{1,2}	10 ml
S-Medienzusatz ¹	Glucose	10 g
	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,5 g
	H ₂ O deion.	ad 200 ml
SM-Puffer ¹	NaCl	5,8 g
	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	2 g
	1 M Tris-HCl (pH 7,5)	50 ml
	2 % Gelatine	5 ml
	H ₂ O deion.	ad 1,0 l
Spurenelementlösung P ¹	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	200 mg
	FeSO ₄ x 7 H ₂ O	300 mg
	MnSO ₄ x H ₂ O	100 mg
	ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	300 mg
	CoCl ₂ x 6 H ₂ O	10 mg
	H ₂ O deion.	ad 100 ml
Spurenelementlösung CMMN ¹	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ x 4 H ₂ O	18 mg
	CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0,125 g
	H ₃ BO ₃	1,546 g
	KCl	3,728 g
	MnSO ₄ x H ₂ O	0,845 g
	ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	0,845 g
	H ₂ O deion.	ad 100 ml
Spurenelementlösung OM ¹	CaCl ₂ x 2 H ₂ O	3 g
	Eisen-III-Citrat	1 g
	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	200 mg
	ZnCl ₂	100 mg
	CuSO ₄ x 5 H ₂ O	25 mg
	Na ₂ B ₄ O ₇ x 10 H ₂ O	20 mg
	CoCl ₂ x 6 H ₂ O	4 mg
	Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	10 mg
	H ₂ O deion.	ad 1,0 l

Bezeichnung	Zusammensetzung	
Spurenelementlösung R2YE ¹	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ x 4 H ₂ O	10 mg
	FeCl ₃ x 6 H ₂ O	200 mg
	MgCl ₂ x 4 H ₂ O	10 mg
	ZnCl ₂	40 mg
	CuCl ₂ x 2 H ₂ O	10 mg
	Na ₂ B ₄ O ₇ x 10 H ₂ O	10 mg
	H ₂ O deion.	ad 1,0 l
TE-Puffer (pH 8) ¹	Tris-HCl	855 mg
	EDTA	146 mg
	H ₂ O deion.	ad 500 ml

¹ die Lösung wurde autoklaviert

² wurde kurz vor Gebrauch zur Lösung zugesetzt

2.2 Methoden

2.2.1 Stammhaltung

Um Bakterienstämme längerfristig aufzubewahren, wurden diese als Kryokulturen bei -80 °C eingefroren. Dazu wurden 100 ml Nährlösung in 500 ml-Erlenmeyerkolben mit einem seitlichen Einstich mit dem entsprechendem Stamm angeimpft und bis zu 72 Stunden bei 27 °C und 120 Upm inkubiert. 0,8 ml dieser Kultur wurden mit 0,8 ml steriler Konservierungslösung (Tabelle 12) gemischt und eingefroren.

2.2.2 Kultivierungsbedingungen der Produktionsstämme

2.2.2.1 Vorkulturen

500 ml-Erlenmeyerkolben mit einem seitlichem Einstich und 100 ml NL 410 bzw. NL 420 wurden mit 1,6 ml Kryokultur angeimpft und bei 27 °C und 120 Upm ca. 72 Stunden geschüttelt (Vorkultur I).

Für die Fermentation wurden je 5 ml dieser Kultur verwendet, um fünf 500 ml-Erlenmeyerkolben mit 100 ml NL 420 und einem seitlichem Einstich anzuimpfen, die weitere 72 Stunden bei 27 °C und 120 Upm inkubiert wurden (Vorkultur II).

2.2.2.2 Hauptkulturen in 500 ml-Erlenmeyerkolben

Wenn nicht anders angegeben, wurden 100 ml Nährlösung in einem 500 ml-Erlenmeyerkolben mit einem seitlichem Einstich mit 5 ml Vorkultur I angeimpft und bei 27 °C und 120 Upm 168 Stunden inkubiert. Für die Sekundärstoffanalytik wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Proben genommen (siehe 2.2.3).

2.2.2.3 Hauptkulturen im 10 Liter-Fermentationsmaßstab

Für die Fermentation im 10 Liter-Blattrührfermenter wurden 10 l Nährlösung 420 mit 500 ml Vorkultur II angeimpft und bei 250 Upm, 27 °C und einer Sauerstoffbegasung von 0,5 vvm maximal 216 Stunden inkubiert. Zur Schaumverminderung wurde vor dem Autoklavieren des Bioreaktors 1 ml Antischaummittel Ucolub N 115 zugesetzt.

2.2.3 Probenentnahme und -aufarbeitung zur Sekundärstoffanalyse

Für die Analytik der produzierten Sekundärstoffe wurden alle 24 Stunden 10 ml jeder Kultur in ein 15 ml-Falconröhrchen überführt und 10 Minuten bei 3.800 Upm zentrifugiert. Die Biomasse wurde anhand der Skala des graduierten Zentrifugenröhrchens abgelesen, in Volumenprozent angegeben und anschließend in 10 ml technischem MeOH resuspendiert (Zellextrakt).

5 ml des Überstandes aus dem Zentrifugationsschritt (Kulturfiltrat) wurden in ein neues 15 ml-Falconröhrchen überführt. Der pH-Wert wurde zur Extraktion der Sekundärstoffe mit HCl oder NaOH auf pH 4,0 eingestellt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 5 ml Ethylacetat.

Sowohl das Kulturfiltrat als auch der Zellextrakt wurden 30 Minuten am Überkopfschüttler extrahiert und anschließend bei 3.800 Upm 5 Minuten zentrifugiert. Die organische Phase des Kulturfiltratextrakts wurde in einen 10 ml-Spitzkolben überführt und am Rotationsverdampfer zur Trockene eingengt. Der Rückstand wurde in 0,5 ml MeOH p. A. resuspendiert (zehnfache Konzentrierung), im Eppendorf-Reaktionsgefäß 3 Minuten bei 13.000 Upm zentrifugiert, in ein Probengläschen überführt und mittels HPLC-DAD unter Verwendung der Methode MARCEL30 analysiert (siehe 2.2.9).

Die MeOH-Phase des Zellextrakts wurde in einen 25 ml-Spitzkolben überführt und am Rotationsverdampfer zur Trockene eingengt. Der Rückstand wurde in 1 ml MeOH p. A. resuspendiert (zehnfache Konzentrierung) und entsprechend des Kulturfiltratextrakts behandelt.

2.2.4 Wachstumsanalytik in verschiedenen Nährlösungen

Das Wachstum des *Dermaococcus*-Stammes MT 1.2 wurde in den Nährlösungen 410, KM 1, KM 4, LB und TSG mittels DNA-Bestimmung nach [HERBERT *et al.*, 1971] untersucht.

Hierzu wurde 1 ml Kulturbrühe im Eppendorf-Reaktionsgefäß 5 Minuten bei 13.000 g zentrifugiert, das Pellet in 1 ml eiskalter 0,25 N Perchlorsäure aufgenommen und durch 30-minütige Inkubation im Eisbad aufgeschlossen. Anschließend wurde die Probe 5 Minuten bei 13.000 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Sediment wurde in 1 ml 0,5 N Perchlorsäure aufgenommen und 15 Minuten bei 70 °C extrahiert. Der Extrakt wurde zentrifugiert und der Überstand gesammelt. Die Extraktion wurde zweimal wiederholt; die Überstände wurden anschließend vereinigt. 0,5 ml des vereinigten Extrakts wurden mit 0,5 ml Dische-Reagenz (vgl. Tabelle 12) gemischt und ca. 18 Stunden bei 37 °C inkubiert. Die Absorption wurde bei 628 nm gegen den Leerwert (0,5 ml Dische-Reagenz + 0,5 ml 0,5 N Perchlorsäure) gemessen und der DNA-Gehalt anhand einer Eichkurve mit Heringsperma-DNA bestimmt. Ausgehend von einer Stammlösung von 500 µg DNA in 1 ml 5 mM NaOH wurden weitere Verdünnungen (250 µg/ml, 125 µg/ml, 100 µg/ml, 50 µg/ml, 12,5 µg/ml) in 0,5 N Perchlorsäure hergestellt und 15 Minuten bei 70 °C inkubiert. Nach Zugabe von jeweils 0,5 ml Dische-Reagenz wurden die Proben 18 Stunden bei 37 °C inkubiert. Die Absorption wurde bei 628 nm gegen den Leerwert (0,5 ml Dische-Reagenz + 0,5 ml 0,5 N Perchlorsäure) gemessen.

2.2.5 Optimierung der Produktion durch Variation verschiedener Kultivierungsbedingungen im Schüttelkolben

Zur Optimierung der Sekundärstoff-Produktion des *Dermaococcus*-Stammes MT 1.2 wurden verschiedene Kultivierungsparameter (vgl. 2.2.2) variiert. Als Ausgangsmedium wurde dabei NL 410 verwendet. Die Probenentnahme und -aufarbeitung erfolgte wie unter 2.2.3 beschrieben.

2.2.5.1 Einfluss von Medienbestandteilen der NL 410

Zur Identifizierung der für die Produktion essentiellen Bestandteile von NL 410 wurde jeweils eine Komponente der Nährlösung (vgl. Tabelle 11) weggelassen. Alle 24 Stunden wurden Proben entnommen; die Entnahme und Aufarbeitung erfolgte wie unter 2.2.3 erläutert.

2.2.5.2 Einfluss der Wasserqualität und -zusammensetzung

Die Herstellung des Mediums erfolgte mit deionisiertem Wasser, Tübinger Bodensee-Eigenwasser bzw. Reutlinger Bodenseewasser. Wurde deionisiertes Wasser verwendet, wurden 0,1 % v/v der Spurenelementlösung OM bzw. CMMN (Tabelle 12) zugesetzt.

2.2.5.3 Einfluss von Good'schen Puffern

Um zu überprüfen, inwieweit sich der Einsatz verschiedener Puffer auf die Sekundärstoffproduktion auswirkt, wurden anstelle von CaCO_3 verschiedene Good'sche Substanzen, darunter HEPES, MOPS bzw. TES (je 25 mM), ins Medium zugesetzt.

2.2.5.4 Einfluss von CaCO_3

Der Einfluss von CaCO_3 auf die Produktion wurde durch die Erhöhung seiner Konzentration von 0,1 % auf 0,2 %, 0,3 % bzw. 0,5 % in NL 410 untersucht. Zudem wurde in einem Ansatz CaCO_3 weggelassen.

2.2.5.5 Einfluss verschiedener Kohlenstoffquellen

Zur Ermittlung der Produktion unter Verwendung verschiedener Kohlenstoffquellen wurden zur NL 410 entweder 1 % Maltose oder 2 bzw. 3 % Glucose oder Glycerin zugegeben.

2.2.5.6 Einfluss verschiedener Stickstoffquellen

Der Einfluss von Stickstoff auf die Produktion wurde unter Zugabe von 0,1, 0,5 bzw. 1 % Glutamin bzw. je 0,1 % Glutamat, Asparagin, Aspartat, Harnstoff oder 1 % Casaminoacids getestet. Daneben wurde untersucht, wie sich die Zugabe der anorganischen Stickstoffquellen Ammoniumchlorid, -sulfat, -nitrat und -hydrogencarbonat (je 0,1 %) auswirkt.

2.2.5.7 Einfluss komplexer Nährstoffquellen

Zur Überprüfung, welchen Einfluss komplexe Nährstoffquellen auf die Produktion der Dermacozine haben, wurden 1 bzw. 2 % Hafermehl oder Malzextrakt bzw. 1 % Hefeextrakt zur Nährlösung zugesetzt.

2.2.5.8 Einfluss mehrerer Nährstoffquellen

Um zu untersuchen, ob das Vorhandensein mehrerer Nährstoffquellen die Produktion der Sekundärmetabolite fördert, wurde die Zugabe von Glucose (2 %), Hafermehl (1 %) und Malzextrakt (1 %) miteinander kombiniert (Zweier- bzw. Dreierkombinationen).

2.2.6 Untersuchungen zum Schaumverhalten von *Dermaococcus sp.* MT 1.2 in Schüttelkulturen

Zur Schaumverminderung in Schüttelkulturen wurden die Substanzen Agrimul COS2, Agrimul Derivat 1, Genapol 2882, Sojaöl COGNIS sowie Sonnenblumenöl bzw. Spülmittel in Konzentrationen von 0,1 %, 0,5 % und 1 % zur NL 410 zugesetzt. Es wurden wie unter 2.2.3 beschriebenen Proben entnommen und aufgearbeitet.

2.2.7 Untersuchungen zum Schaumverhalten von *Dermaococcus sp.* MT 1.2 während der Fermentation

Zur Schaumverminderung während des Fermentationsprozesses wurden drei Strategien getrennt voneinander verfolgt. Zum einen wurden zum 10 Liter-Fermentationsansatz (siehe 2.2.2.3) 0,1 % bzw. 0,5 % des Antischaummittels Agrimulester Derivat 1 zugegeben. Zum anderen wurde oberhalb der Kulturbrühe ein Propellerrad an der Drehwelle angebracht, um entstehenden Schaum zu zerschlagen. Im dritten Ansatz wurden die Vorkulturen II (siehe 2.2.2.1) nur für 24 bzw. 48 Stunden geschüttelt, bevor sie bis zum Zeitpunkt 72 Stunden als Standkulturen inkubiert wurden. Die 10 Liter-Fermentationsansätze wurden mit je 500 ml dieser Kulturen angeimpft.

2.2.8 Fermentation und begleitende Analytik

Die Fermentationen erfolgten wie unter 2.2.2.3 beschrieben. Die Bestimmung von Biomasse, pH-Wert und DNA-Gehalt wurde wie unter 2.2.3 und 2.2.4 erläutert durchgeführt.

2.2.8.1 Ernte der 10 Liter-Blattrührfermenter

Zur Trennung der festen und flüssigen Bestandteile der Kulturbrühe wurde diese in 500 ml-Kunststoffbechern 10 Minuten bei 4.000 Upm zentrifugiert und das Kulturfiltrat anschließend vereinigt. Die Isolierung der Zielmetabolite erfolgte anschließend wie unter 2.2.10 beschrieben. Die Zellmasse wurde verworfen.

2.2.8.2 Bestimmung der Kohlenstoffquellen mittels HPLC

Die quantitative Bestimmung der Kohlenstoffquellen Glucose und Glycerin mittels HPLC erfolgte in modifizierter Form nach PLAGA *et al.* [1989]. Die entsprechenden Parameter sowie die Geräteausstattung sind in Tabelle 13 aufgeführt. Als Probe wurden 0,5 ml Kulturfiltrat verwendet.

Tabelle 13: Trennparameter für die Bestimmung der Kohlenstoffquellen

Gerät	Bezeichnung
Säulenmaterial	Reprosil 100 NH ₂ (3 µm)
Säulenmaße	250 x 3 mm I.D.
Flussrate	0,4 ml/min
Injektionsvolumen	5 µl
mobile Phase	isokratische Elution mit Acetonitril/Wasser (80 + 20)

Die Quantifizierung erfolgte mittels Peakflächenbestimmung nach einer Kalibrierung mit Glucose- und Glycerin-Eichstandards.

2.2.9 HPLC-DAD-Analytik

Die Analyse der Proben erfolgte mittels HP 1090 Chromatograph anhand der Methode Marcel30 (siehe Tabellen 14 und 15).

Tabelle 14: Verwendete Säule und Säulenmaße

Stationäre Phase	Hauptsäule	Vorsäule
Reprosil pur Basic C-18 (5 µm)	125 x 3,0 mm I.D.	20 x 3,0 mm I.D.

Tabelle 15: Verwendete HPLC-Methode mit Trennparametern

Methode	Detektionswellenlängen	mobile Phasen	Gradient	Fluss	Injektionsvolumen
MARCEL30	210, 230, 260, 280, 310, 360, 435, 500 nm	Eluent A: 0,1 % H ₃ PO ₄ Eluent B: Acetonitril	linearer Gradient von 25 % bis 60 % Eluent B in 12 min	0,85 ml/min	5 µl

2.2.10 Isolierung der Dermacozine

Die Isolierung der Dermacozine erfolgte aus mehreren 10 Liter-Fermentationsansätzen. Hierzu wurden verschiedene chromatographische Verfahren angewendet.

2.2.10.1 Umkehrphasenchromatographie an Amberlite XAD-16 und Ethylacetat-Extraktion

Der Kulturüberstand wurde auf eine Amberlite XAD-16-Säule mit einem Fluss von 5 l/Stunden aufgetragen, wobei das Harzvolumen 10 % des Auftragsvolumens betrug. Die Säule wurde mit je fünf Bettvolumen (BV) Wasser bzw. 30 % MeOH gewaschen. Die Zielsubstanzen wurden mit fünf BV 60 %igem MeOH eluiert, in mehreren Fraktionen aufgefangen und mittels HPLC-DAD analysiert (siehe 2.2.9). Die Säule wurde mit je fünf BV 80 %igem bzw. 100 %igem MeOH gewaschen; dabei wurden die Fraktionen gesammelt und ebenfalls analysiert.

Im Anschluss wurden die aufgefangenen Wertfraktionen am Rotationsverdampfer bis zum Wässrigen eingengt. Dieser Rückstand wurde auf einen pH-Wert von 4,0 eingestellt, mit einem Drittel des Volumens an Ethylacetat extrahiert und mittels HPLC-DAD analysiert (siehe 2.2.9). Die Ethylacetat-Extraktion wurde solange wiederholt, bis keine Zielmetabolite mehr im wässrigen Rückstand zu finden waren. Die Fraktionen wurden anschließend vereinigt, am Rotationsverdampfer zur Trockene eingengt und für weitere chromatographische Trennungen verwendet.

2.2.10.2 Adsorptionschromatographie an LiChroprep Diol

Die eingengten Fraktionen aus früheren chromatographischen Trennungen wurden in Aceton gelöst und zusammen mit dem gleichen Volumen an Säulenmaterial gemischt, gebunden und am Rotationsverdampfer zur Trockene eingengt. Das trockene Säulenmaterial mit gebundener Substanz wurde im Anschluss auf das Säulenbett aufgetragen. Die Parameter für die anschließende Adsorptionschromatographie sind in Tabelle 16, das Gradientenprofil in Tabelle 17 dargestellt.

Tabelle 16: Trennparameter für LiChroprep Diol

Gerät	Bezeichnung
Säulenmaterial	LiChroprep Diol
Säulenmaße	40 x 2,5 cm I.D.
Flussrate	5 ml/min
mobile Phase	A: Dichlormethan (DCM), B: DCM-MeOH 9 + 1
Fraktionierung	3 min

Tabelle 17: Gradientenprofil für LiChroprep Diol

Zeit [min]	Eluent A	Eluent B
0	100 %	0 %
30	100 %	0 %
270	0 %	100 %
300	0 %	100 %

2.2.10.3 Ausschlusschromatographie an Fractogel TSK HW-40 F bzw. Sephadex LH-20

Zur Trockene eingengte Fraktionen aus vorherigen chromatographischen Trennungen wurden in maximal 5 ml MeOH p. A. gelöst, auf die Säule aufgetragen und an Fractogel TSK HW-40 F bzw. Sephadex LH-20 chromatographiert. Die Trennparameter sind in Tabelle 18 aufgeführt.

Tabelle 18: Trennparameter für Fractogel TSK HW-40 F bzw. Sephadex LH-20

Gerät	Bezeichnung
Säulenmaterial	Fractogel TSK HW-40 F bzw. Sephadex LH-20
Säulenmaße	90 x 2,5 cm I.D. bzw. 90 x 1,5 cm I.D.
Flussrate	30 ml/Std. bzw. 15 ml/Std.
mobile Phase	MeOH
Fraktionierung	20 min

2.2.10.4 Präparative RP-HPLC

Zur Trockene eingeeengte Fraktionen aus vorherigen chromatographischen Trennungen wurden in maximal 2 ml MeOH p.A. und ca. 0,5 ml H₂O deion. gelöst, mit der Injektionsnadel in die Probenschleife injiziert und an der Trennsäule chromatographiert. Die Fraktionierung erfolgte manuell. Die Geräteausstattung und Trennparameter sind in Tabelle 19 aufgeführt.

Tabelle 19: Trennparameter für die präparative RP-HPLC

Gerät	Bezeichnung
Säulenmaterial	Reprosil pur Basic C-18 (10 µm)
Säulenmaße	250 x 20 mm I.D.
Schreiber	2-Kanal Flachbettschreiber, Modell N-2
Flussrate	24 ml/min
mobile Phase	A: MeOH, B: 0,1% HCOOH + 25 mM Triethylamin (pH 4,5)

2.2.11 Chemisch-physikalische Charakterisierung der Dermacozone

2.2.11.1 Massenspektrometrische Untersuchungen

Untersuchungen zur Bestimmung der Molmasse einzelner Substanzen in Extrakten bzw. isolierter Sekundärmetabolite wurden freundlicherweise von Dipl.-Ing. Andreas Kulik (Interfakultäres Institut für Mikrobiologie und Infektionsmedizin Tübingen, Universität Tübingen) mittels HPLC-Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS) durchgeführt. Die Trenn- und Detektionsparameter sind in Tabelle 20 aufgeführt.

Tabelle 20: Trenn- und Detektions-Parameter für HPLC-ESI-MS

Parameter	Bezeichnung
Säule	Nucleosil 100 C-18 (3µm), 100 mm x 2 mm I.D.
Säulentemperatur	40 °C
mobile Phase	A: 0,1 % Ameisensäure, B: 0,06 % Ameisensäure in Acetonitril
Gradient	linearer Gradient von 10 % bis 100 % Eluent B in 15 min, anschließend isokratisch 100 % Eluent B für 2 min
Flussrate	0,4 ml/min
Injektionsvolumen	2,5 µl
Ionisierung	Elektrosprayionisierung, negativ und positiv alternierend; chemische Ionisierung bei Atmosphärendruck, negativ und positiv alternierend
Modus	Ultrascan
Kapilarspannung	3.500 V
Temperatur	350 °C

Die Untersuchungen der isolierten Sekundärmetabolite mittels FT-ICR-MS (Fouriertransformations-Ionencyclotronresonanz-Massenspektrometrie) erfolgten durch Wael M. Abdel-Mageed und Dr. Rainer Ebel (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Jaspars, Department of Chemistry, University of Aberdeen).

2.2.11.2 Strukturaufklärung

Die Strukturaufklärung der isolierten Reinsubstanzen mittels ¹H- und ¹³C-NMR-Spektrometrie und zweidimensionaler NMR wurde von Wael M. Abdel-Mageed und Dr. Rainer Ebel in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Jaspars (Department of Chemistry, University of Aberdeen) durchgeführt.

2.2.12 Biologische Testierung der Dermacozine

2.2.12.1 Antibakterielle und antifungische Wirkung

Die Teststämme wurden in 500 ml-Erlenmeyerkolben mit einem seitlichen Einstich und 100 ml Nährlösung bei 27 °C und 120 Upm inkubiert (vgl. Tabelle 21). Die Kultur wurde 10 Minuten bei 4.000 Upm zentrifugiert und das Zellpellet in Saline resuspendiert. Für die Testplatten mit chemisch-definiertem Medium wurden die Zellen zwei weitere Male mit Saline gewaschen. Die resuspendierten Zellen wurden auf eine optische Dichte (OD) von 1,3 bei einer Wellenlänge von 546 nm eingestellt. Je 10 ml DSMZ-, KM- bzw. MM-Agar wurden mit 100 µl der Zellsuspension beimpft und in Petrischalen abgefüllt. Diese Testplatten wurden für einen Agardiffusionstest mit den gereinigten Substanzen eingesetzt. Dazu wurden diese in MeOH auf eine Konzentration von 1 mg/ml, 0,3 mg/ml bzw.

0,1 mg/ml verdünnt. Je 10 µl dieser Verdünnungen wurden auf Antibiotika-Testblättchen pipettiert, diese 30 Minuten getrocknet und auf die Platten aufgelegt. Die Inkubation erfolgte für 24 bzw. 48 Stunden bei entsprechender Temperatur (vgl. Tabelle 21). Zur Bestimmung der antibakteriellen bzw. antifungischen Wirkung wurden die Hemmhöfe gemessen.

Tabelle 21: Kultivierungsbedingungen der Teststämme für die biologische Testierung

Bezeichnung	Medium	Temperatur	Inkubationsdauer
<i>Bacillus subtilis</i> DSM 10	DSMZ 1, MM 1	37 °C	24 Std.
<i>Brevibacillus brevis</i> DSM 30	DSMZ 1, MM2	37 °C	24 Std.
<i>Botrytis cinerea</i> Tü 157	KM 2	24 °C	Riesenkolonie
<i>Escherichia coli</i> K12	KM 1, MM 1	37 °C	24 Std.
<i>Mycobacterium phlei</i> DSM 750	KM 1	27 °C	24 Std.
<i>Pseudomonas fluorescens</i> DSM 50090	KM 1, MM 1	27 °C	24 Std.
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 9080	KM 5	27 °C	24 Std.
<i>Staphylococcus aureus</i> DSM 20231	KM 1	37 °C	48 Std.

Die Untersuchung der gereinigten Substanzen bzgl. ihrer Hemmung von *Bacillus subtilis*, *Candida glabrata*, *Propionibacterium aeruginosa*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus lentus* bzw. *Xanthomonas campestris* wurde mit Hilfe des Mikrotiterplatten-Tests durchgeführt. Die eingesetzte Konzentration der Testsubstanzen betrug hierbei 100 µM. Dieser Wirkstofftest erfolgte durch die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Imhoff (KiWiZ, Kiel).

2.2.12.2 Antitumor-Wirkung

Die zu testenden Substanzen wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Imhoff (KiWiZ, Kiel) auf ihre cytotoxische Aktivität gegen die Tumorzelllinien Hep G2 (menschliches Leberepithelkarzinom [MOORE *et al.*, 1955]) und NIH 3T3 (embryonale Fibroblasten der Maus [TODARO & GREEN, 1963]) getestet. Es wurden Konzentrationen von 10 bzw. 50 µM eingesetzt.

2.2.12.3 Enzymhemmende Wirkung

Die Testsubstanzen (10 µM) wurden auf ihre enzymhemmende Wirkung gegen die Acetylcholinesterase, Phosphodiesterase 4 und Reverse Transkriptase untersucht (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Imhoff, KiWiZ, Kiel).

2.2.12.4 Antioxidative Wirkung

Die Bestimmung der Antioxidativen Wirkung erfolgte in modifizierter Form nach TANG & LIU [2007]. Dabei wurden die Testsubstanzen in Konzentrationen von 2, 4, 6, 8, 10, 20, 40, 70, 100 bzw. 120 μM mit je 50 μM 2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl (DPPH) für 30 Minuten bei 30 °C inkubiert. Die Absorption der Proben wurde gegen Methanol bei 517 nm im Photometer gemessen.

Das DPPH-Radikal hat eine violette Farbe; geht es eine Bindung mit einem Wasserstoffatom eines Radikalfängers ein, entsteht das reduzierte DPPH-H (2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazin) und die Farbe ändert sich von violett nach gelb. Mittels photometrischer Messung kann eine Verringerung der Absorption bei 517 nm beobachtet und somit die antioxidative Wirkung der Testsubstanz nachgewiesen werden.

Die Auswertung erfolgte durch Berechnung der prozentualen Inhibition (Q) jeder Konzentration.

$$Q (\% \text{ Inhibition}) = [(A_B - A_A)/A_B] \times 100$$

A_A = Absorption der Testsubstanzlösung, A_B = Absorption des Leerwerts

Die berechneten Werte wurden in einem Diagramm gegen die eingesetzten Konzentrationen aufgetragen. Die Bestimmung der mittleren inhibitorischen Konzentration (IC_{50}) erfolgte mit Hilfe einer Ausgleichsgeraden durch den linear verlaufenden Bereich.

2.2.13 Molekulargenetische Methoden

2.2.13.1 Herstellung elektrokompenter Zellen von *E. coli*

Für die Herstellung elektrokompenter *E. coli*-Zellen wurden 100 ml LB-Medium 1:50 mit einer Übernachtskultur angeimpft und bei 37 °C und 180 Upm inkubiert. Sobald die Kultur eine OD_{578} von 0,5 bis 0,8 erreicht hatte, wurden die Zellen 10 Minuten auf Eis gelagert und im Anschluss drei Mal mit 20 ml 10 % Glycerin gewaschen. Die Zentrifugation zwischen jedem Waschschrift erfolgte für 5 Minuten bei 4 °C und 4.000 Upm. Die Zellen wurden in 200 μl eiskaltem 10 %igem Glycerin gelöst, zu je 50 μl aliquotiert und bei -80 °C eingefroren.

2.2.13.2 Transformation von *E. coli* mittels Elektroporation

Für die Transformation wurden 50 μl elektrokompente Zellen (vgl. 2.2.13.1) auf Eis aufgetaut, mit 1 - 2 μl DNA versetzt und in eine eiskalte Elektroporationsküvette überführt. Die Elektroporation erfolgte bei einem Puls von 2,5 kV, 25 μF und 200 - 400 Ω für

4,5 - 4,9 ms. Die Zellen wurden anschließend in 500 µl S- oder SOC-Medium eine Stunde bei 37 °C und 180 Upm inkubiert. 100 µl des Ansatzes wurden auf Selektionsplatten ausplattiert. Der Rest wurde 1 Minute bei 13.000 Upm abzentrifugiert und der Überstand dekantiert. Das Zellpellet wurde im Rücklauf resuspendiert und ebenfalls ausplattiert. Die Platten wurden ca. 16 Stunden bei 37 °C inkubiert.

2.2.13.3 Herstellung chemisch kompetenter Zellen von *E. coli*

Für die Herstellung chemisch kompetenter Zellen wurden diese wie unter 2.2.13.1 beschrieben kultiviert und abzentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert, das Zellpellet in 20 ml eiskaltem 100 mM CaCl₂ aufgenommen und erneut 5 Minuten bei 4 °C und 4.000 Upm zentrifugiert. Die Zellen wurden in 2 ml eiskaltem 100 mM CaCl₂ mit 15 % Glycerin resuspendiert, zu je 200 µl aliquotiert und bei -80 °C eingefroren.

2.2.13.4 Transformation von *E. coli* nach der CaCl₂-Methode

Ein 200 µl-Aliquot chemisch kompetenter Zellen (vgl. 2.2.13.3) wurde auf Eis aufgetaut und mit 2 µl DNA versetzt. Der Ansatz wurde 30 Minuten auf Eis gelagert; anschließend erfolgte ein Hitzeschock für 90 Sekunden bei 42 °C. Die Zellen wurden in 1 ml LB-Medium für eine Stunde bei 37 °C unter Schütteln inkubiert und wie unter 2.2.13.2 erläutert auf Selektionsplatten ausplattiert.

2.2.13.5 Herstellung von *Streptomyces*-Protoplasten

Eine Schüttelkultur von *Streptomyces* sp. in S-Medium wurde nach einer Inkubation von ca. 48 Stunden bei 27 °C und 180 Upm für 10 Minuten zentrifugiert (4.000 Upm). Das Pellet wurde in 10 ml P-Puffer mit Lysozym (1 mg/ml) resuspendiert und 10 bis 20 Minuten bei 37 °C und 180 Upm inkubiert. Der Grad der Protoplastierung wurde im Mikroskop verfolgt und durch Zugabe von 20 ml eiskaltem P-Puffer (Tabelle 12) abgestoppt. Zur Abtrennung von Mycelresten wurde der Ansatz durch sterile Watte filtriert. Das Filtrat wurde bei 3.200 Upm für 5 Minuten zentrifugiert. Die pelletierten Protoplasten wurden in 1 ml P-Puffer aufgenommen, zu je 100 µl aliquotiert und bei -20 °C eingefroren.

2.2.13.6 Transformation von *Streptomyces*-Protoplasten

Ein 100 µl Aliquot von *Streptomyces*-Protoplasten (siehe 2.2.13.5) wurde mit 5 - 20 µl DNA sowie 500 µl P-Puffer mit 25 % PEG 2000 versetzt. Der Ansatz wurde gleichmäßig auf zwei R2YE-Agarplatten ausplattiert und 16 Stunden bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurden die Platten mit 3 ml Weichagar und entsprechenden Antibiotika überschichtet.

2.2.13.7 Isolierung genomischer DNA

Eine Schüttelkultur von *Streptomyces* sp. bzw. *Dermaococcus* sp. MT 1.2 in KM 4- bzw. S-Medium wurde nach einer Inkubation von ca. 72 Stunden bei 27 °C und 180 Upm zentrifugiert (4.000 Upm, 10 Minuten). Der Überstand wurde dekantiert, das Zellpellet in 0,5 ml TE-Puffer resuspendiert und mit 20 µl einer 50 mg/ml Lysozym-Lösung versetzt. Die Probe wurde unter mehrfachem Invertieren für 60 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von 60 µl 0,5 M EDTA und 10 µl Proteinase K erfolgte die weitere Inkubation für 20 Minuten bei 37 °C. Es wurden 600 µl 10 % SDS zur Probe hinzugefügt, diese für 60 Minuten auf 50 °C erhitzt und anschließend mit 350 µl 0 °C kaltem Kaliumacetat versetzt. Die Lösung wurde 10 Minuten bei 12.000 Upm zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die DNA wurde durch Zugabe von 1 ml Isopropanol gefällt, bei 12.000 Upm 15 Minuten zentrifugiert und mit 70 %igem Ethanol gewaschen. Nach erneutem Zentrifugieren (3 Minuten, 12.000 Upm) wurde das Ethanol abpipettiert, die DNA bei 27 °C 20 Minuten getrocknet und in 50 µl H₂O deion. resuspendiert.

2.2.13.8 Isolierung von Cosmiden und Plasmiden

Die Isolierung von Cosmiden erfolgte mit Hilfe des „PureYield™ Plasmid Midiprep“ Systems mit Vakuumpumpe (GE Healthcare) entsprechend den Angaben des Herstellers bzw. mittels Phenol-Chloroform-Fällung. Dabei wurden 1,5 ml einer Übernachtskultur 1 Minute bei 13.000 Upm zentrifugiert und in Lösung I resuspendiert. Nach Zugabe von 200 µl Lösung II wurde mehrfach invertiert und 150 µl eiskalte Lösung III hinzugefügt. Der Ansatz wurde mehrmals invertiert und 5 Minuten bei 13.000 Upm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 400 µl Rotiphenol/C/I extrahiert und nochmals 5 Minuten bei 13.000 Upm zentrifugiert. Die DNA wurde anschließend mit 600 µl Isopropanol gefällt und 10 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt (13.000 Upm; 5 Minuten) wurde das Pellet mit 200 µl 70 % Ethanol gewaschen, bei 60 °C getrocknet und in 50 µl H₂O deion. resuspendiert.

Für die Isolierung von Plasmiden wurde das „illustra™ Plasmid Prep Mini Spin Kit“ (GE Healthcare, München) verwendet; dabei wurde entsprechend den Angaben des Herstellers verfahren.

2.2.13.9 Agarosegelelektrophorese

Für die gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren wurde 1 % Agarose in 1 x TAE-Puffer bis zum vollständigen Lösen aufgeköcht. Die Agarose wurde in die Laufkammer mit eingesetztem Kamm eingegossen und nach dem Polymerisieren mit 1 x TAE-Puffer überschichtet. Die Proben wurden vor dem Auftragen mit 1 - 5 µl Bromphenolblau versetzt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 100 V. Zur Färbung der DNA wurde das Agarosegel 5 Minuten in ein Ethidiumbromid-Bad (5 µl/ml) gelegt und anschließend mit Hilfe einer Geldokumentationsanlage fotografiert. Zur Größenbestimmung wurden Größenstandards (GeneRuler 1 kb DNA-Ladder von Fermentas bzw. wt λDNA aus dem „Gigapack III XL Packaging Extract Kit“, Stratagene) aufgetragen.

2.2.13.10 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Standard-Bedingungen zur Amplifizierung von DNA-Fragmenten mittels PCR sind den Tabellen 22 bis 24 zu entnehmen.

Tabelle 22: Standard-PCR-Ansatz unter Verwendung der Taq-Polymerase

Lösung	Endkonzentration/Volumen
DNA-Templat	1 µl
dNTPs (10 mM)	0,2 mM
10 x PCR-Puffer	1 x
Q-Solution	10 µl
Primer vorwärts (100 µM)	2 µM
Primer rückwärts (100 µM)	2 µM
Taq-DNA-Polymerase	1 µl
H ₂ O deion.	ad 50 µl

Tabelle 23: Standard-PCR-Ansatz unter Verwendung der KAPAHifi-Polymerase

Lösung	Endkonzentration/Volumen
DNA-Templat	1 µl
dNTPs (10 mM)	0,2 mM
5 x PCR-Puffer	1 x
100 µM Primer vorwärts	2 µM
100 µM Primer rückwärts	2 µM
KAPAHifi-DNA-Polymerase	1 µl
H ₂ O deion.	ad 50 µl

Tabelle 24: Standard-PCR-Programm

Schritt	Temperatur	Zeit	
Denaturierung	94 °C	5 min	
Denaturierung	94 °C	30 sec	
Annealing*	52 - 68 °C	30 sec	30 Zyklen
Elongation	72 °C	30 sec	
Elongation	72 °C	10 min	
Lagerung	4 °C	halten	

* die Annealing-Temperatur variierte je nach verwendetem Primerpaar

Das Ergebnis der PCR wurde mittels Agarosegelelektrophorese (vgl. 2.2.13.9) überprüft.

2.2.13.11 Aufreinigung von DNA-Fragmenten

Zur Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus einer PCR (siehe 2.2.13.10) oder einem Restriktionsverdau (siehe 2.2.13.12) wurden diese gelelektrophoretisch aufgetrennt (vgl. 2.2.13.9) und unter UV-Licht analysiert. Die gewünschte Bande wurde mit einem Skalpell ausgeschnitten und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Die Isolierung aus dem Gel erfolgte mit dem „illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit“ (GE Healthcare) entsprechend Herstellerprotokoll.

2.2.13.12 Restriktionsspaltung von DNA

Zur Herstellung definierter DNA-Fragmente sowie zur Überprüfung klonierter Konstrukte wurden Restriktionsenzyme verwendet. Der Verdau wurde entsprechend den Angaben des Enzym-Herstellers (siehe Tabelle 5) durchgeführt.

2.2.13.13 Ligation von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente mit kompatiblen Enden können unter Verwendung der DNA-Ligase miteinander verknüpft werden. PCR-Produkte wurden in den Vektor pJET1.2/blunt kloniert. Dazu wurden diese zunächst mit dem „DNA blunting enzyme“ (CloneJET™ PCR Cloning Kit, Fermentas) nach Herstellerprotokoll behandelt, um glatte Enden zu erzeugen. Alle Ligationen erfolgten mit Hilfe der T4 DNA-Ligase entsprechend den Angaben des Enzym-Herstellers (siehe Tabelle 5).

2.2.13.14 Sequenzierungen von DNA

Wenn nicht anders angegeben, wurden die Sequenzierungen von der Firma Eurofins MWG GmbH, Ebersberg, durchgeführt.

2.2.14 Herstellung und Screening einer Genbibliothek

Zur Identifizierung und Charakterisierung des Phenazin-Genclusters aus *Dermaococcus* sp. MT 1.2 wurde eine Genbibliothek der gesamten genomischen DNA hergestellt und diese mittels Kolonie-PCR nach spezifischen Genen durchsucht.

Dazu wurde die genomische DNA von *Dermaococcus* sp. MT 1.2 wie unten beschrieben partiell verdaut und mit dem Vektor SuperCos 1 (Stratagene) ligiert. Die Produkte wurden in λ -Phagen verpackt und mittels Transduktion in *E.coli*-Zellen eingebracht (vgl. 2.2.14.2). Die Durchführung erfolgte anhand des Protokolls des „Gigapack III XL Packaging Extract“-Kits (Stratagene).

2.2.14.1 Präparation der genomischen DNA

Die isolierte genomische DNA von *Dermaococcus* sp. MT 1.2 (vgl. 2.2.13.7) wurde mit dem Restriktionsenzym *Sau3AI* partiell verdaut. Für die Reaktion wurden 100 μ g genomische DNA und 0,1 U Enzym eingesetzt. Nach 2,5, 5, 10 bzw. 15 Minuten wurde die Reaktion durch Zugabe von je 100 μ l 0,5 M EDTA-Lösung gestoppt und gelelektrophoretisch überprüft. Anschließend wurde die DNA mit Rotiphenol/C/I extrahiert und bei 13.000 Upm 5 Minuten zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde abgenommen und auf 0,3 M Kaliumacetat (pH 5,5) eingestellt. Der DNA-Präzipitation mit 500 μ l Ethanol p.A. folgte eine fünfminütige Zentrifugation, woraufhin das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen, anschließend getrocknet und in 30 μ l H₂O deion. resuspendiert wurde.

Um eine Religation zu verhindern, wurde die DNA mit 5 U CIAP laut Herstellerangaben in einem Gesamtvolumen von 100 μ l dephosphoryliert. Anschließend wurde das Enzym nach Zugabe von 6,5 μ l einer 250 mM EDTA-Lösung durch zehnteinminütiges Inkubieren bei 68 °C inaktiviert. Die DNA wurde wie oben beschrieben mit Rotiphenol/C/I gefällt.

2.2.14.2 Präparation des Cosmids SuperCos 1

Zur Gewinnung des Cosmids SuperCos 1 wurde *E. coli* XL1 Blue mittels Elektroporation transformiert (vgl. 2.2.13.2) und das Cosmid wie unter 2.2.13.8 beschrieben isoliert. Anschließend wurde die DNA extrahiert und dephosphoryliert (vgl. 2.2.14.1).

Zur Vorbereitung der Ligation genomischer DNA-Fragmente in das Cosmid wurde dieses zunächst mit *XbaI* gespalten; dazu wurden 45 μ g Cosmid-DNA mit 9 U Enzym pro 1 μ g DNA laut Herstellerangaben verdaut. Das Cosmid wurde im Folgenden mit *BamHI* ge-

schnitten, um eine der beiden *cos*-Stellen im Cosmid auszuschneiden und die spätere Verpackung in λ -Phagen zu ermöglichen. Nach der Restriktion mit 5 U Enzym pro 1 μ g DNA laut Herstellerprotokoll wurde die DNA erneut extrahiert.

Jeder Restriktionsverdau wurde mittels Agarosegelelektrophorese überprüft (vgl. 2.2.13.9).

2.2.14.3 Ligation und Verpackung der DNA

Die Ligation von 5 μ g der partiell verdauten genomischen DNA (vgl. 2.2.14.1) mit 1 μ g des geschnittenen Cosmids (vgl. 2.2.14.2) erfolgte unter Verwendung der T4 Ligase (Fermentas) nach Herstellerprotokoll.

Die Verpackung der ligierten DNA in λ -Phagen erfolgte wie im Protokoll des „Gigapack III XL Gold Packaging Extract“-Kits (Stratagene) beschrieben. Hierbei wurde 1 μ l des Ligationansatzes mit 25 μ l λ -Phagensuspension zwei Stunden bei 22 °C inkubiert. Im Anschluss wurden 500 μ l SM-Puffer dazugegeben und auftretende Proteine mit Chloroform sedimentiert. Die wässrige Phase wurde bei 4 °C gelagert.

2.2.14.4 Transduktion von *E. coli* mit λ -Phagen und Amplifizierung der Cosmid-Bibliothek

E. coli SURE-Zellen wurden in LB-Medium mit 10 mM MgSO₄ und 0,2 % Maltose für 16 Stunden bei 37 °C und 180 Upm inkubiert. Die Kultur wurde abzentrifugiert, das Pellet in 10 mM MgSO₄ resuspendiert und auf eine OD₆₀₀ von 0,5 eingestellt. Diese Bakterien-suspension wurde 1:50 verdünnt und zu je 250 μ l aliquotiert. Zu jedem der daraus resultierenden acht Aliquots wurden 250 μ l Verpackungsansatz (d. h. in λ -Phagen verpackte DNA, vgl. 2.2.14.3) gegeben und 30 Minuten bei 22 °C inkubiert. Zu allen Ansätzen wurden 4 ml LB-Medium hinzugefügt, diese vorsichtig invertiert und eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Nach zehnmütigem Zentrifugieren bei 4.000 Upm wurde jedes Zellpellet in 500 μ l LB-Medium aufgenommen und in 50 μ l-Aliquots auf LB-Agarplatten mit 50 μ g/ml Kanamycin und 150 μ g/ml Ampicillin ausplattiert (insgesamt 80 Platten). Die Platten wurden ca. 16 Stunden bei 37 °C inkubiert. Die erhaltenen Klone bilden eine Genbibliothek von *Dermacoccus* sp. MT 1.2

2.2.14.5 Screening der Genbibliothek mittels Kolonie-PCR

Die hergestellte Genbibliothek (vgl. 2.2.14.4) wurde mittels Kolonie-PCR auf das Vorhandensein des Phenazin-Genclusters untersucht. Die Klone wurden dabei zunächst mit Primern für *phzF*, ein für die Phenazin-Synthese essentielles Gen, gescreent.

Da die Sequenz von *phzF* aus *Dermaococcus* sp. MT 1.2 nicht bekannt war, wurden anhand bekannter Sequenzen anderer Phenazin-Produzenten mit Hilfe des Programms Codehop (<http://bioinformatics.weizmann.ac.il/blocks/codehop.html>) [ROSE *et al.*, 1998] degenerierte Primer für *phzF* erstellt. Mit diesen Primern wurde eine PCR mit genomischer DNA bei einer Annealing-Temperatur von 60 °C durchgeführt (vgl. 2.2.13.10), das PCR-Produkt aus dem Gel ausgeschnitten (vgl. 2.2.13.11) und für die Sequenzierung in den Vektor pJET1.2/blunt kloniert (vgl. 2.2.13.13). Aus den erhaltenen Sequenzen wurden spezifische Primer für *phzF* hergestellt (*phzF_fw* und *phzF_rev*; vgl. Tabelle 7), welche für das weitere Screening verwendet wurden (vgl. 2.2.14.5).

Hierfür wurden die Klone aus 2.2.14.4 zunächst mit Hilfe von Stempel und Samttüchern auf neue LB-Platten kopiert; diese wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert und für ein späteres Screening verwendet. Das erste Screening erfolgte mit den Kolonien der Originalplatten. Dabei wurden alle Klone einer Platte mit 2 ml LB-Medium abgelöst, in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und zwei Stunden bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden 3 Minuten bei 13.000 Upm zentrifugiert und jeweils in 50 µl sterilem H₂O deion. resuspendiert. Diese 80 verschiedenen Bakteriensuspensionen (aus dem Pool der Kolonien von jeweils einer Platte) wurden anschließend für eine Kolonie-PCR verwendet.

Der PCR-Ansatz und das PCR-Programm sind in den Tabellen 25 bzw. 26 dargestellt. Als Positivkontrolle für die PCR wurde 1 µl genomische DNA verwendet.

Tabelle 25: PCR-Ansatz für die Kolonie-PCR mit *E. coli*

Lösung	Endkonzentration/Volumen
10 x PCR-Puffer	1 x
dNTPs (10 mM)	0,2 mM
Primer vorwärts (100 µM)	2 µM
Primer rückwärts (100 µM)	2 µM
Taq-DNA-Polymerase (5 U/µl)	0,1 U
Zellsuspension (Templat)	ad 50 µl

Tabelle 26: PCR-Programm für die Kolonie-PCR mit *E. coli*

Schritt	Temperatur	Zeit
Denaturierung	94 °C	5 min
Denaturierung	94 °C	30 sec
Annealing	60 °C	30 sec
Elongation	72 °C	30 sec
Elongation	72 °C	10 min
Lagerung	4 °C	halten

30 Zyklen

Die PCR-Produkte wurden auf einem Agarosegel analysiert. Zeigte ein Pool die gewünschte Bande für *phzF*, wurden die Klone der entsprechenden Platte einem weiteren Screening unterzogen. Dazu wurden die Kopien der Originalplatten verwendet.

Um aus einem Zellpool auf einzelne positive Klone schließen zu können, die das *phzF*-Gen auf dem Cosmid enthalten, wurden die Kolonien weiter vereinzelt. Dazu wurden je 20 - 40 Klone einer Agarplatte auf neue Selektionsplatten überführt. Diese wurden ebenfalls kopiert und wie oben beschrieben für eine Kolonie-PCR verwendet. Zellpools, die hierbei die gewünschte PCR-Bande zeigten, wurden für ein drittes Screening einzeln ausgestrichen und nochmals einer Kolonie-PCR unterzogen.

Die Cosmide aus den daraus resultierenden positiv getesteten Klonen wurden mit dem „PureYield™ Plasmid Midiprep Kit“ (Promega) isoliert und mittels PCR (vgl. 2.2.13.10) unter Verwendung der Primer *phzF_fw* und *phzF_rev* nochmals überprüft.

2.2.15 Auswahl eines Cosmids zur vollständigen Sequenzierung

Um die Nukleotidsequenz des Dermacozin-Genclusters zu erhalten, sollte eines der isolierten Cosmide (siehe 2.2.14.5) vollständig sequenziert werden. Zur Auswahl des Cosmids wurden verschiedene Methoden angewendet.

2.2.15.1 Nachweis des *phzB*-Gens in *phzF*-positiven Cosmide

Durch eine PCR mit degenerierten Primern für *phzB* (*phzB_fw* und *phzB_rev*, vgl. Tabelle 7) sollte neben *phzF* ein weiteres essentielles Phenazin-Gen auf dem Cosmid identifiziert werden. Dazu wurde eine PCR mit den *phzF*-positiven Cosmiden wie unter 2.2.13.10 beschrieben durchgeführt.

2.2.15.2 Restriktionsanalysen der *phzF*-positiven Cosmide

Des Weiteren wurde jedes Cosmid mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI, *Nco*I bzw. *Sac*I verdaut (vgl. 2.2.13.12), um Cosmide, die das *phzF*-Gen tragen, zu identifizieren. Die Restriktionsprodukte wurden anhand des Bandenmusters auf einem Agarosegel (vgl. 2.2.13.9) analysiert.

2.2.15.3 Sequenzierung der Insert-Enden

Als drittes Auswahlkriterium wurden die Enden des DNA-Inserts mit den Primern T3 bzw. T7 (vgl. Tabelle 7) sequenziert. Die Sequenzen wurden mit Hilfe von BLASTx (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) [ALTSCHUL *et al.*, 1997] mit den Sequenzen der nr- (*non-redundant*) Datenbank verglichen.

2.2.16 Sequenzierung des ausgewählten Cosmids

Das Cosmid, das anhand der unter 2.2.15 beschriebenen Kriterien ausgewählt worden war, wurde mit Hilfe der sogenannten „Shotgun-Methode“ von der Firma GenoTech (Seoul, Südkorea) vollständig sequenziert. Dabei wurde die DNA zufällig in 300 bis 1.000 bp große Stücke fragmentiert, die sequenziert und anschließend aufgrund von Überlappungen zu einer Konsensussequenz zusammengefügt wurden.

Die erhaltene Sequenz wurde anschließend mit Hilfe des Programms Artemis: Genome Browser and Annotation Tool (<http://www.sanger.ac.uk/resources/software/artemis>) [RUTHERFORD *et al.*, 2000] nach offenen Leserahmen (ORF) mit 300 oder mehr Nukleotiden durchsucht. Die Proteinsequenz jedes ORFs wurde mit Hilfe von BLASTx mit den Sequenzen der nr-Datenbank verglichen.

2.2.17 Heterologe Expression des Genclusters in *Streptomyces* sp.

Die heterologe Expression in *Streptomyces* sp. sollte als Nachweis dienen, dass das ausgewählte Cosmid (vgl. 2.2.15) das für die Dermacozin-Biosynthese verantwortliche Gencluster enthält.

2.2.17.1 Integration der Φ C31-Integrase mittels „Rekombineering“ in ein Cosmid

Zur Integration von DNA-Fragmenten in ein Cosmid mittels homologer Rekombination („Recombineering“) wurde die Methode nach GUST *et al.* [2006] angewendet. Dazu wurde zunächst die Φ C31-Integrase, die die spätere Integration der Cosmid-DNA in das Genom von *Streptomyces* sp. vermittelt, in das entsprechende Cosmid eingebracht. Dieses wurde hierfür mittels Elektroporation in *E. coli* BW25113/pIJ790 λ RED transferiert (siehe 2.2.13.2). Ein aus dieser Transformation resultierender Klon wurde in 5 ml LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika angeimpft und über Nacht bei 30 °C und 180 Upm inkubiert. Mit 5 % dieser Kultur wurden 10 ml SOB unter Zugabe entsprechender Antibiotika und 100 μ l einer 1 M Arabinoselösung angeimpft. Arabinose induziert die Expression der

λ RED-Gene, die für die homologe Rekombination verantwortlich sind. Die Kultur wurde bei 30 °C und 180 Upm bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,4 inkubiert und anschließend 5 Minuten bei 4 °C und 4.000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet dreimal in 10 ml eiskaltem 10 %igem Glycerin gewaschen. Nach dem letzten Schritt wurde das Zellpellet in 100 μ l 10 % Glycerin resuspendiert. Im Anschluss wurde in diese Zellen (*E. coli* BW25113/pIJ790 λ RED mit dem Cosmid) das entsprechende DNA-Fragment mittels Elektroporation (siehe 2.2.13.2) eingebracht. Dazu wurde das codierende Gen der Φ C31-Integrase zusammen mit der Tetracyclin-Resistenzkassette mit den Restriktionsenzymen *Dra*I und *Bsa*I aus dem Plasmid pIJ787 (vgl. Tabelle 6) ausgeschnitten (siehe 2.2.13.12) und aufgereinigt (siehe 2.2.13.11). An den Enden dieses DNA-Fragments befinden sich zur Ampicillin-Resistenzkassette kompatible Bereiche, über die es mit dem Ampicillin-Gen auf dem entsprechenden Cosmid (MW_A9) rekombinieren kann. Die anschließende Inkubation der Selektionsplatten für 20 Stunden bei 37 °C führte zum Verlust des temperatursensitiven Plasmids pIJ790. Aufgrund der Zugabe entsprechender Antibiotika konnten zudem nur die Klone wachsen, bei denen das DNA-Fragment mit der Tetracyclin-Resistenzkassette durch homologe Rekombination in das Cosmid integriert worden war. Aus einem Klon wurde das rekombinante Cosmid mittels Phenol/Chloroform-Fällung wie unter 2.2.13.8 beschrieben isoliert und die Integration des gewünschten DNA-Fragments durch Restriktionspaltungen (siehe 2.2.13.12) bzw. PCR (siehe 2.2.13.10) überprüft.

2.2.17.2 Biparentale Konjugation zwischen *E. coli* und *Streptomyces* sp. zur Übertragung eines rekombinanten Cosmids

Für die biparenterale Konjugation zwischen *E. coli* und *Streptomyces* sp. wurde die entsprechende Cosmid-DNA zunächst durch Elektroporation in *E. coli* GM2063 pUB307 bzw. *E. coli* S17-1 eingebracht (vgl. 2.2.13.2). Mit 1 ml einer Übernachtskultur eines daraus resultierenden Transformanten wurden 50 ml LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika angeimpft und bei 37 °C und 180 Upm bis zu einer OD₅₇₈ von 0,5 bis 0,6 inkubiert. Nach dem Abzentrifugieren der Zellen für 10 Minuten bei 5.000 Upm wurden diese zweimal mit 20 ml LB-Medium gewaschen. Das Zellpellet wurde in 5 ml LB-Medium resuspendiert. Parallel dazu wurden ca. 10⁸ Sporen von *Streptomyces lividans* TK 23 in 500 μ l 2 x YT-Medium für 10 Minuten bei 60 °C erhitzt. Zu den Sporen wurden 500 μ l der transformierten *E. coli*-Zellen gegeben und 30 Sekunden bei 7.000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet im Rücklauf resuspendiert. Der Konjugations-

ansatz wurde auf MS-Agar ausplattiert und über Nacht bei 30 °C inkubiert. Im Folgenden wurden die Platten mit 20 µg/ml Nalidixinsäure und 50 µg/ml Kanamycin überschichtet und für 3 - 5 Tage bei 30 °C inkubiert.

Die Integration des Cosmids in das *Streptomyces*-Genom wurde anhand einer PCR mit den Primern tet_fw und tet_rev entsprechend 2.2.13.10 mittels Taq-Polymerase überprüft. Die PCR-Produkte wurden auf einem 1 %igen Agarosegel analysiert (vgl. 2.2.13.9). Die Exokonjuganten wurden in verschiedenen Nährlösungen kultiviert; dabei wurde die Sekundärstoffproduktion bis zu vier Wochen lang verfolgt und analysiert (siehe 2.2.17.3).

2.2.17.3 Kultivierung der Exokonjuganten und Produktion in verschiedenen Nährlösungen

Mehrere Exokonjuganten von *Streptomyces lividans* TK23 wurden durch Verdünnungsaustrieche auf Cullum-Agarplatten mit Nalidixinsäure (20 µg/ml) und Kanamycin (50 µg/ml) von *E. coli*-Zellen befreit. Mit den Reinkulturen wurden Vorkulturen I in 500 ml-Erlenmeyerkolben mit 100 ml NL 410 angeimpft und drei Tage bei 27 °C und 120 Upm inkubiert. Die Hauptkulturen in 500 ml-Erlenmeyerkolben wurden mit 5 % dieser Vorkulturen angeimpft und vier Wochen bei 27 °C und 120 Upm inkubiert. Zur Überprüfung der Produktivität wurden wie unter 2.2.3 beschrieben Proben entnommen (die erste Woche alle 24 Stunden, danach nur noch alle 7 Tage) und analysiert. Als Produktionsmedien wurden Cullum, KM 4, M2, NL 410, NL 420, NL SGG, R2YE, TSG und YMG verwendet.

2.2.17.4 Aktivierung der Expression des Phenazin-Genclusters durch zusätzliche konstitutive Expression einzelner Regulatoren

Verschiedene Gene des identifizierten Phenazin-Genclusters, die als Regulatoren identifiziert worden waren (vgl. 3.7.3), wurden einzeln unter Kontrolle des konstitutiven Promotors *ermE** auf dem Plasmid pUWL201 exprimiert. Somit sollte untersucht werden, ob diese erhöhte Transkription die Dermacozin-Synthese in *Streptomyces lividans* TK23 aktiviert. Dazu wurde jedes Gen (vgl. Tabelle 43) mittels PCR unter Verwendung der KAPA-HiFi-Polymerase amplifiziert (siehe 2.2.13.10). Es wurden Primer verwendet, die am jeweiligen Startcodon des jeweiligen Gens begannen bzw. an dessen Stoppcodon endeten und 10 - 15 bp lange 5'-Überhänge aufwiesen. In diese wurden die Restriktionsschnittstellen für *EcoRI* (vor dem Startcodon) bzw. *XbaI* (hinter dem Stoppcodon) eingebaut (vgl. Tabelle 7). Das PCR-Produkt wurde zunächst in den Vektor pJet1.2 blunt kloniert (siehe 2.2.13.13) und zur Kontrolle sequenziert (siehe 2.2.13.14). Mit den Restriktionsenzymen

EcoRI und *XbaI* wurde das Fragment wieder ausgeschnitten und mit dem Vektor pUWL201 ligiert (siehe 2.2.13.13), der mit den gleichen Restriktionsenzymen verdaut worden war. Die daraus resultierenden rekombinanten Plasmide pUWL201_orf15, pUWL201_orf20, pUWL201_orf22 bzw. pUWL201_orf24 (vgl. Tabelle 6) wurden wie unter 2.2.13.8 beschrieben isoliert und mittels Protoplasten-Transformation in *Streptomyces lividans* TK23, der das Cosmid MW_A9_int im Genom integriert hat, eingebracht (siehe 2.2.13.6). Die Transformanten wurden auf Cullum-Agarplatten mit Kanamycin (50 µg/ml) und Thiostrepton (25 µg/ml) überführt. Die Transformanten wurden in den Nährlösungen NL 410, KM 1, KM 4, M2 bzw. SGG kultiviert und die Sekundärstoffproduktion verfolgt (siehe 2.2.3).

2.2.17.5 Aktivierung der Expression des Phenazin-Genclusters durch Einführung eines konstitutiven Promotors

Zur Expression des Phenazin-Genclusters wurde außerdem vor dessen erstem Gen (*phzF*) der konstitutive Promotor *ermE** eingefügt. Dies erfolgte entsprechend der unter 2.2.17.1 aufgeführten Vorgehensweise, allerdings wurde dabei ein Cosmid verwendet, auf dem sich bereits die Integrase Φ C31 und die Tetracyclin-Resistenzkassette befanden (Cosmid MW_A9_int) (vgl. 2.2.17). Unter Verwendung der KAPAHiFi-Polymerase und der Primer *ermE/hygro_fw* und *ermE/hygro_rev* wurden mittels PCR der Promotor *ermE** und die Hygromycin-Resistenzkassette amplifiziert. Die verwendeten Primer wiesen 39 bp lange 5'-Überhänge auf, die kompatibel zur Region strangaufwärts von *phzF* waren.

Die korrekte Integration des Fragments wurde mit Hilfe einer PCR unter Verwendung der Primer *phzF-hygro_fw* und *phzF-hygro_rev*, die im *phzF*-Gen bzw. der Hygromycin-Resistenzkassette binden, überprüft (siehe 2.2.13.10).

Das resultierende rekombinante Cosmid (MW_A9_int_ermE) wurde isoliert, (siehe 2.2.13.8) mittels Elektroporation in den Stamm *E. coli* S17-1 eingebracht (siehe 2.2.13.2) und durch biparentale Konjugation in *Streptomyces lividans* TK23 übertragen (siehe 2.2.17.2). Die Exokonjuganten wurden anschließend wie unter 2.2.17.3 behandelt, zusätzlich wurde jedoch auf Hygromycin (50 µg/ml) selektioniert; als Produktionsmedien wurden NL 410, KM 1, KM 4, M2, OM bzw. SGG verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 Optimierung der Sekundärstoffproduktion durch Variation verschiedener Kultivierungsbedingungen

Da die von *Dermacoccus* sp. MT 1.2 produzierten Dermacozin-Nebenkomponenten K, L, P, W, Z, RT 2.3, RT 3.37, RT 4.6 und RT 6.8 bislang für ihre Isolierung als Reinsubstanzen in zu geringen Mengen produziert worden waren, wurde versucht deren Produktion durch Variationen verschiedener Kultivierungsbedingungen zu steigern.

3.1.1 Wachstumsanalytik in verschiedenen Nährlösungen

In einer früheren Studie wurde eine Dermacozin-Produktion ausschließlich in sehr nährstoffreichen Medien wie 333, 410 oder SGG beobachtet [WAGNER, 2009]. Diese Nährlösungen sind für die Wachstumsanalytik ungeeignet, da sie viele unlösliche Bestandteile enthalten, die eine photometrische Bestimmung der Zelldichte unmöglich machen. Daher sollten in der vorliegenden Arbeit andere Medien getestet werden, um dieses Problem zu umgehen.

Zunächst wurden Untersuchungen bzgl. des Wachstums- und Produktionsverhaltens in den voll-löslichen Komplexmedien TSG, LB, KM 1 und KM 4 durchgeführt. Dazu wurde der Wachstumsverlauf anhand des DNA-Gehalts verfolgt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 7 dargestellt.

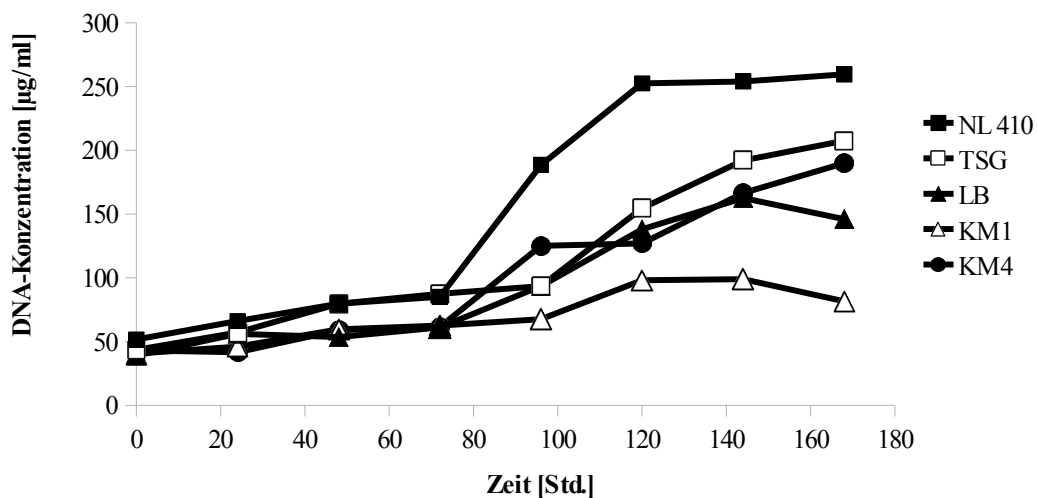


Abbildung 7: DNA-Konzentration bei Kultivierung von *Dermacoccus* sp. MT 1.2 in verschiedenen Nährlösungen zu unterschiedlichen Zeitpunkten

Die DNA-Konzentration lag zum Zeitpunkt Null, d. h. nach dem Animpfen der Kulturen, in allen Nährlösungen bei ca. 50 µg/ml. Innerhalb der ersten 72 Stunden stiegen die Werte in NL 410 und TSG um ca. 20 µg/ml und in KM 1, KM 4 bzw. LB um ca. 10 µg/ml an. Im weiteren Verlauf nahmen die Werte in allen Medien zu, insbesondere in NL 410, in der nach einer Inkubationszeit von 168 Stunden ein DNA-Gehalt von ca. 260 µg/ml erreicht wurde. Der maximale DNA-Wert lag in TSG bei 207 µg/ml, in KM 4 bei 190 µg/ml, in LB bei 160 µg/ml und in KM 1 bei 100 µg/ml.

Des Weiteren wurde die Sekundärstoffproduktion in den verschiedenen Medien untersucht. Dabei wurde stets die Menge von Dermacozin C, das sich als das Hauptprodukt herausgestellt hatte (Abbildung 8), bestimmt. Es hatte sich gezeigt, dass Änderungen in der Kulturführung oder Medienzusammensetzung mit der Syntheserate aller Dermacozine in gleichem Maße korrelieren, sodass die produzierte Menge von Dermacozin C als Maßstab für die Produktivität verwendet wurde.

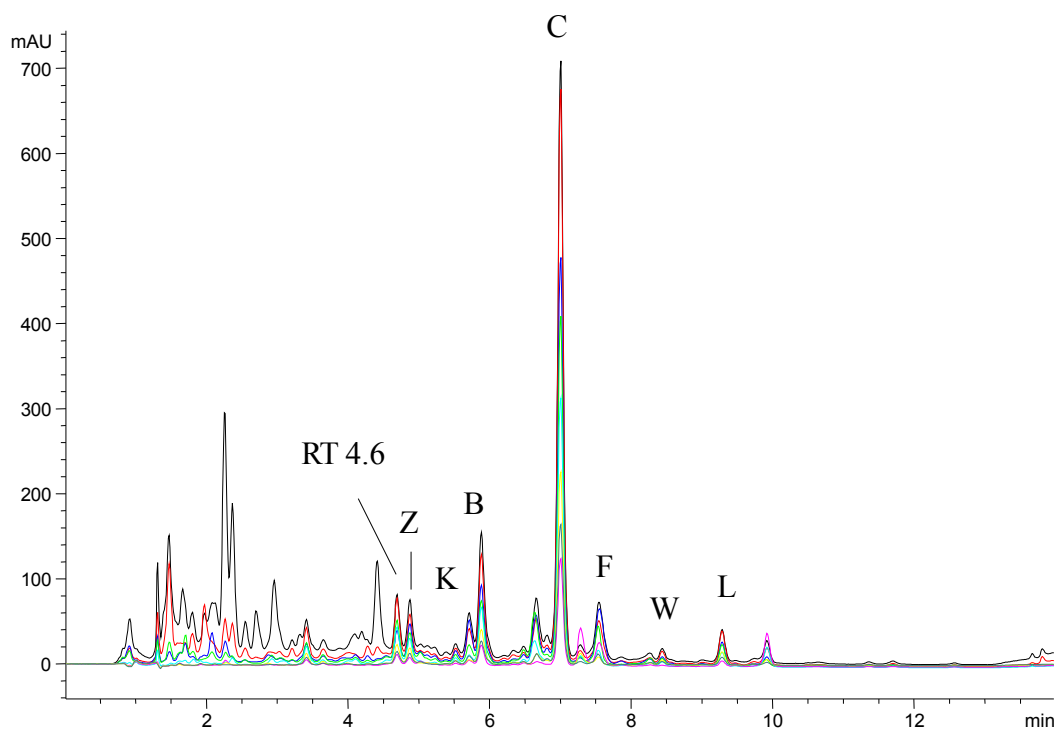


Abbildung 8: HPLC-Analyse des Kulturfiltratextrakts aus der Kultivierung von *Dermacoccus* sp. MT 1.2 in NL 410 bei einer Inkubationszeit von 168 Stunden

Zur Berechnung der Dermacozin C-Konzentration wurde die Fläche des entsprechenden Peaks im HPLC-Chromatogramm bei 280 nm bestimmt. Anschließend wurde über Rückrechnung der Peakfläche eines Dermacozin C-Standards die produzierte Menge berechnet und in Balkendiagrammen dargestellt (siehe unten).

Die Konzentration des Hauptprodukts Dermacozin C lag nach einer Kultivierung von 144 Stunden in NL 410 bei 56 mg/l; in diesem Medium war der DNA-Gehalt i. Vgl. zu LB, KM 1, KM 4 und TSG am höchsten. In diesen Medien war keine (LB, KM 1 und TSG) bzw. nur eine minimale Sekundärstoffproduktion (4,5 mg/l in KM 4) zu verzeichnen, obwohl das Wachstum nur minimal geringer war als in NL 410 (vgl. Abbildung 7). Es konnte somit nur für NL 410 eine eindeutige Korrelation zwischen Wachstum bzw. Zellzahl und Produktion festgestellt werden.

3.1.2 Einfluss von Medienbestandteilen in NL 410

Da die Produktion in allen getesteten Nährlösungen deutlich geringer war als in NL 410 (vgl. 3.1.1), wurde dieses Medium für weitere Optimierungsversuche beibehalten. Um dessen essentielle Bestandteile zu identifizieren wurde beim Ansetzen des Mediums jeweils eine Komponente weggelassen. Abbildung 9 zeigt die daraus resultierenden Ergebnisse.

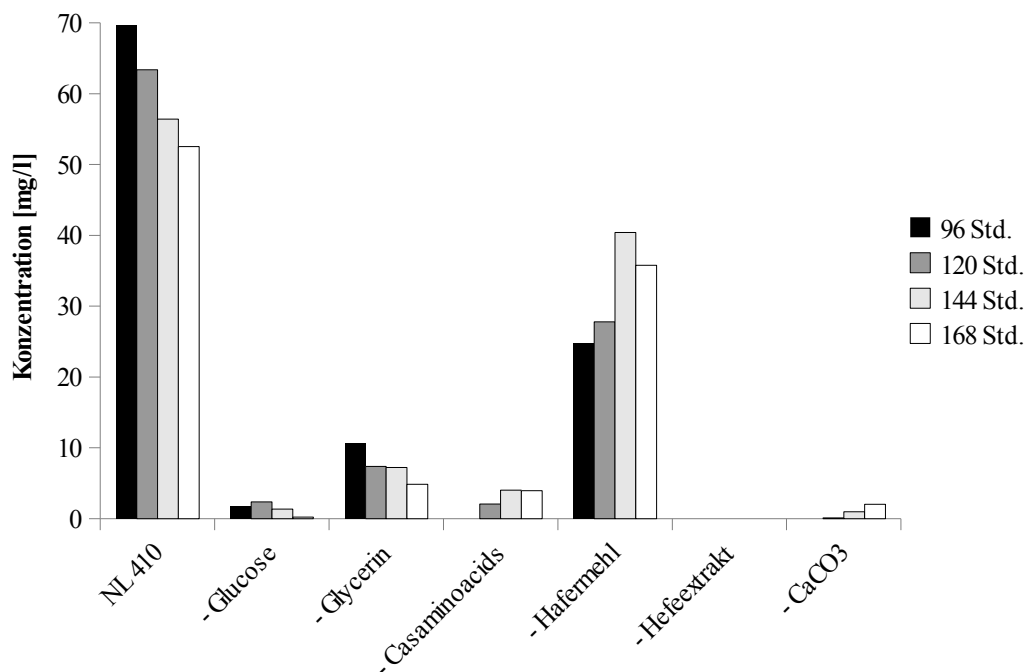


Abbildung 9: Produktion von Dermacozin C in NL 410 unter Entfernung verschiedener Medienbestandteile

In den Ansätzen ohne Glucose, Glycerin, Casaminoacids, Hefeextrakt bzw. CaCO₃ nahm die Dermacozin C-Produktion im Vergleich zu NL 410 um ca. 80 % bis 90 % ab oder war gar nicht mehr zu verzeichnen. Ohne Hafermehl sanken die Werte um ca. 30 %.

In weiteren Experimenten wurde versucht, das Hafermehl durch voll-lösliche Kohlenstoffquellen wie Maltose, Malzextrakt oder Stärke zu ersetzen. Dies war jedoch nicht erfolgreich, die Produktion war in allen Fällen ca. 20 bis 30 % geringer als in der Kontrolle (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass alle Komponenten von NL 410 für die Produktion der Dermacozine essentiell sind.

3.1.3 Einfluss der Wasserqualität

Die Wasserqualität kann je nach Bezugsort stark variieren. In einer früheren Arbeit wurde gezeigt, dass Medien, die mit deionisiertem Wasser hergestellt worden waren, sehr schlecht für die Kultivierung der Dermacoccen und für die Produktion der Dermacozine sind [WAGNER, 2009]. Die Synthese der Sekundärstoffe war ausschließlich in Nährlösungen zu beobachten, die mit Tübinger Leitungswasser hergestellt worden waren. Dabei handelt es sich um eine Mischung aus Bodensee- und Eigenwasser, das sehr kalk- und spurenelementhaltig ist. Um festzustellen, ob diese komplexe Zusammensetzung des Wassers für die Produktion essentiell ist, wurde zum Vergleich reines Bodenseewasser bzw. deionisiertes Wasser, das mit der Spurenelementlösung OM bzw. CMMN (vgl. Tabelle 7) ergänzt wurde, zur Herstellung von NL 410 verwendet. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Abbildung 10 dargestellt.

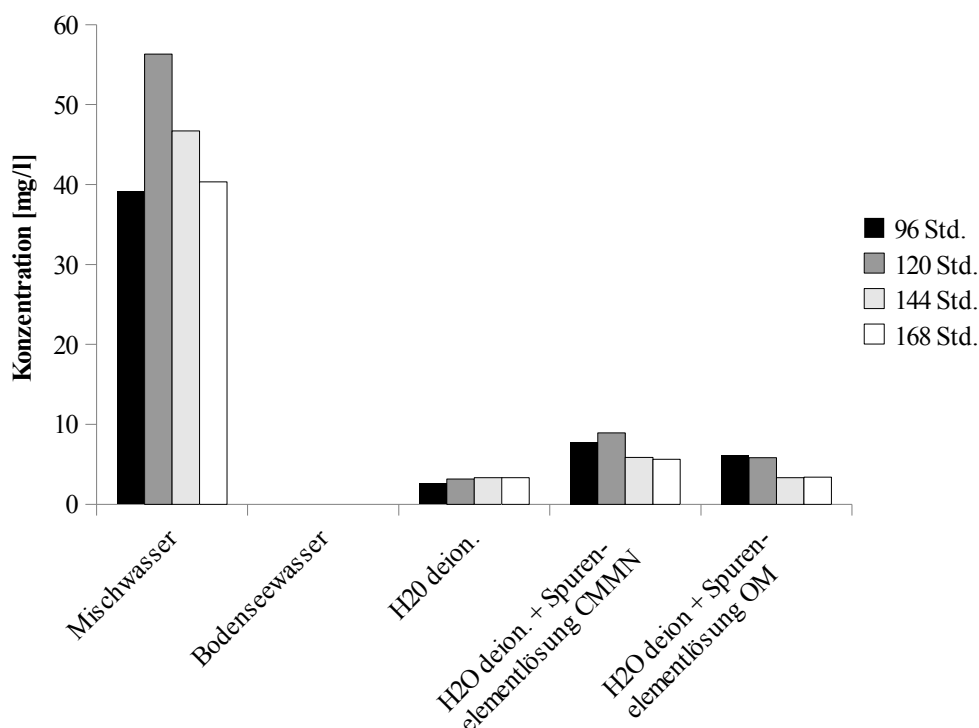


Abbildung 10: Produktion von Dermacozin C in NL 410 unter Verwendung von Mischwasser, Bodenseewasser bzw. deionisiertem Wasser, das mit einer Spurenelementlösung ergänzt worden war

Bei Verwendung von Mischwasser wurden maximal 56 mg/l Dermacozin C im Kulturfiltrat nachgewiesen (Zeitpunkt 120 Stunden). Wurde die Nährlösung mit Bodenseewasser hergestellt, zeigte sich keine Synthese von Dermacozin C. Im Ansatz mit deionisiertem Wasser wurden ca. 3 mg/l Dermacozin C produziert, was durch den Zusatz verschiedener Spurenelementlösungen bis auf 9 mg/l gesteigert werden konnte. Dermacozin C war in allen Ansätzen, die mit deionisiertem H₂O hergestellt worden waren, das einzige Produkt (Daten nicht gezeigt).

3.1.4 Einfluss von Good'schen Puffern

Der Einsatz der nicht metabolisierbaren Substanzen HEPES, MOPS und TES sollte Aufschluss darüber geben, ob anstelle von CaCO₃ auch andere Puffer zur Kultivierung des *Dermaococcus*-Stammes MT 1.2 verwendet werden können bzw. inwieweit sich dies auf die Sekundärstoff-Produktion auswirkt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 11 dargestellt. Im Kontrollansatz wurde CaCO₃ weggelassen.

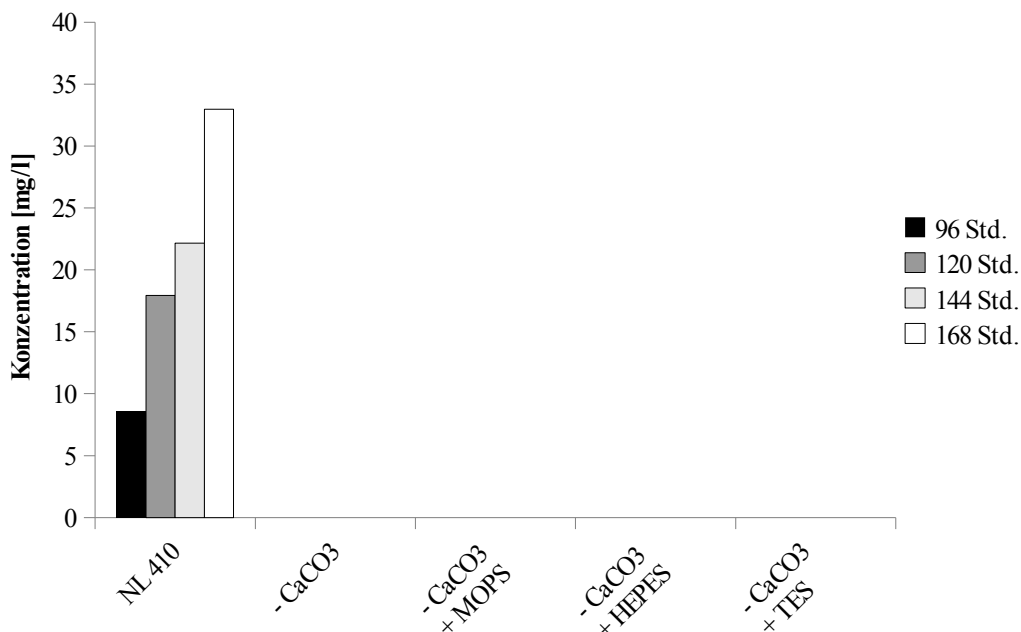


Abbildung 11: Produktion von Dermacozin C in NL 410, unter Zugabe verschiedener Puffersubstanzen

In allen Medien ohne CaCO₃ wurden keine Dermacozine produziert; HEPES, MOPS bzw. TES konnten dieses Carbonat nicht ersetzen. Da diese Substanzen nur bestimmte pH-Pufferbereiche besitzen, wurde der pH-Wert während der Kultivierung alle 24 Stunden gemessen. Der Verlauf ist in Abbildung 12 dargestellt.

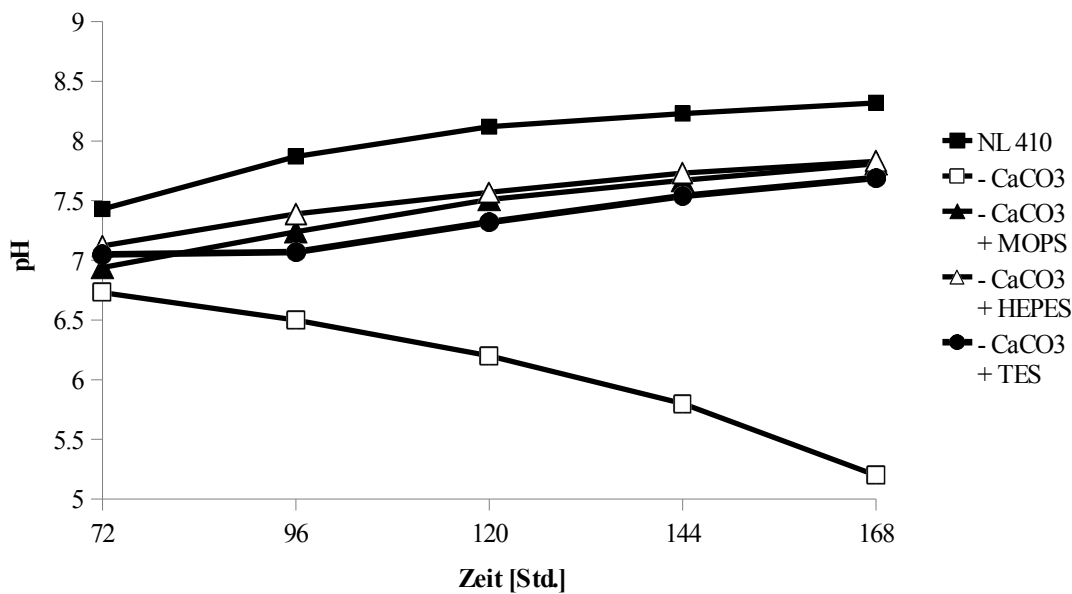


Abbildung 12: pH-Wert bei Kultivierung von *Dermacoccus* sp. MT 1.2 unter Zugabe verschiedener Puffersubstanzen

Unter Zusatz von MOPS, HEPES bzw. TES zu NL 410 stieg der pH-Wert von ca. 7,0 zu Beginn der Messung (nach einer Kultivierungsdauer von 72 Stunden) auf 7,8 (nach 168 Stunden); die Kurven verliefen dabei ähnlich (vgl. Abbildung 12). In der Kontrolle (NL 410 mit 0,1 % CaCO₃) war eine Zunahme des pH-Werts von 7,5 auf 8,3 zu beobachten. Im Ansatz ohne CaCO₃ fiel der pH-Wert von anfänglich pH 6,7 auf pH 5,2.

3.1.5 Einfluss von CaCO₃

Wie im vorherigen Kapitel beschrieben, hat der Zusatz von CaCO₃ eine enorme Auswirkung auf die Sekundärstoff-Produktion von *Dermacoccus* sp. MT 1.2 in NL 410. In weiteren Untersuchungen sollte dessen Einfluss durch Zugabe der doppelten, dreifachen bzw. fünffachen Menge überprüft werden (Abbildung 14).

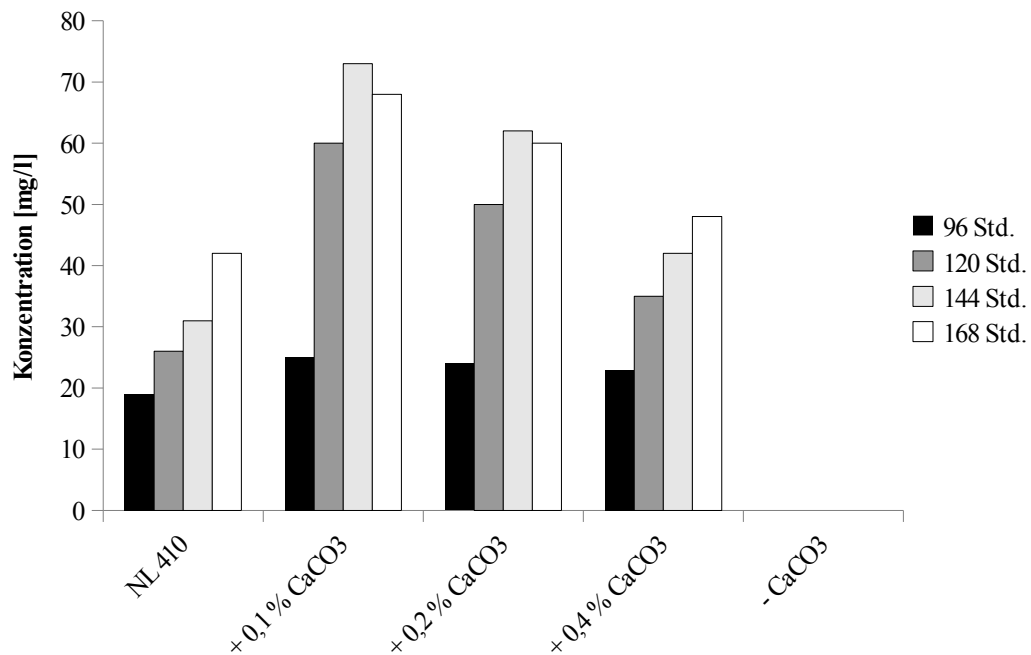


Abbildung 13: Produktion von Dermacozin C in NL 410 unter Verwendung verschiedener CaCO₃-Konzentrationen

Im Kontrollansatz mit NL 410 (enthält bereits 0,1 % CaCO₃) wurden maximal 42 mg/l Dermacozin C produziert. Die Verdopplung der CaCO₃-Menge auf insgesamt 0,2 % führte zu einem Anstieg der maximalen Produktion auf 73 mg/l. Im Vergleich dazu erhöhte die Zugabe von 0,2 % bzw. 0,4 % CaCO₃ die Dermacozin C-Synthese nicht weiter, die Werte lagen bei maximal 62 bzw. 48 mg/l. Der Verlauf der pH-Kurven aller Ansätze mit CaCO₃ waren jedoch nahezu identisch (Daten nicht gezeigt).

3.1.6 Einfluss verschiedener Kohlenstoffquellen

Durch Zugabe von verschiedenen Kohlenstoffquellen zu NL 410 und der damit verbundenen Erhöhung des Nährstoffangebots sollte die Ausbeute der Dermacozine gesteigert werden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 13 veranschaulicht.

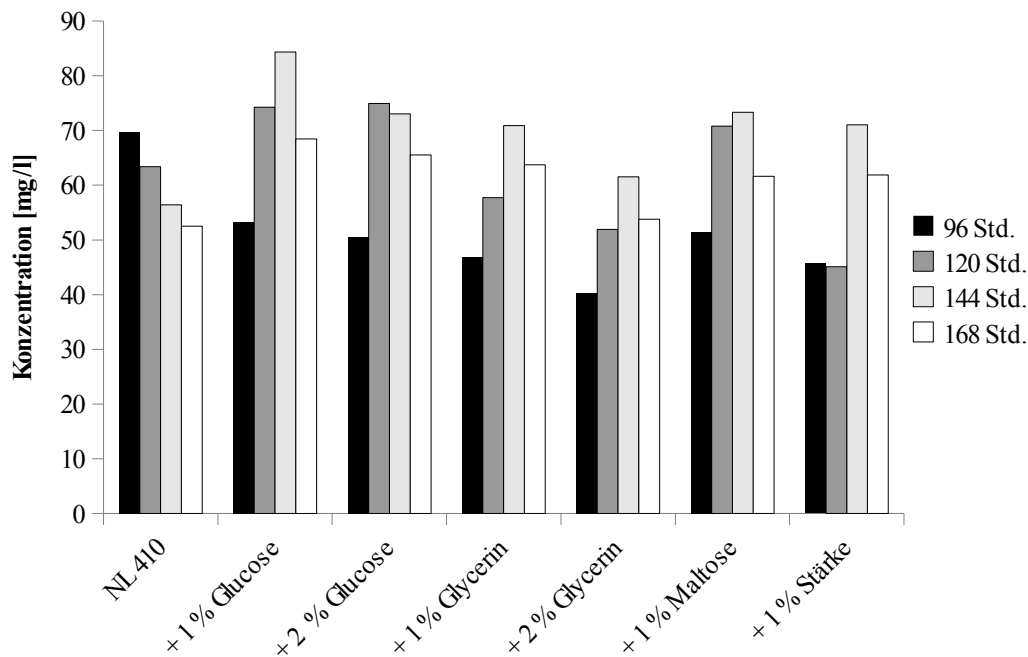


Abbildung 14: Produktion von Dermacozin C in NL 410 bei Erhöhung der Glucose- bzw. Glycerin-Konzentration sowie bei Zusatz von Maltose bzw. Stärke

Durch den Einsatz zusätzlicher Kohlenstoffquellen verschob sich das Produktionsmaximum von Dermacozin C von 96 auf 120 bzw. 144 Stunden. Die Verwendung von insgesamt 2 % Glucose führte zu einer entscheidenden Steigerung der Produktion von Dermacozin C auf 85 mg/l (Maximalwert) i. Vgl. zu einer Konzentration von 70 mg/l in der Kontrolle (NL 410, enthält bereits 1 % Glucose und 1 % Glycerin). Mit insgesamt 3 % Glucose bzw. mit 1 % Maltose wurde eine Ausbeute von 73 mg/l erzielt, während der Zusatz von insgesamt 2 % bzw. 3 % Glycerin bzw. 1 % Stärke nichts an der Produktivität änderte.

3.1.7 Einfluss verschiedener Stickstoffquellen

Bei den Dermacozinen handelt es sich um stickstoffhaltige Verbindungen, die vermutlich während ihrer Biosynthese an den Carboxylgruppen transamidiert werden. Daher wurden verschiedene anorganische bzw. organische Stickstoffquellen zum Medium zugesetzt, um deren Einfluss auf die Synthese des Hauptproduktes Dermacozin C zu untersuchen. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 15 und 16 dargestellt.

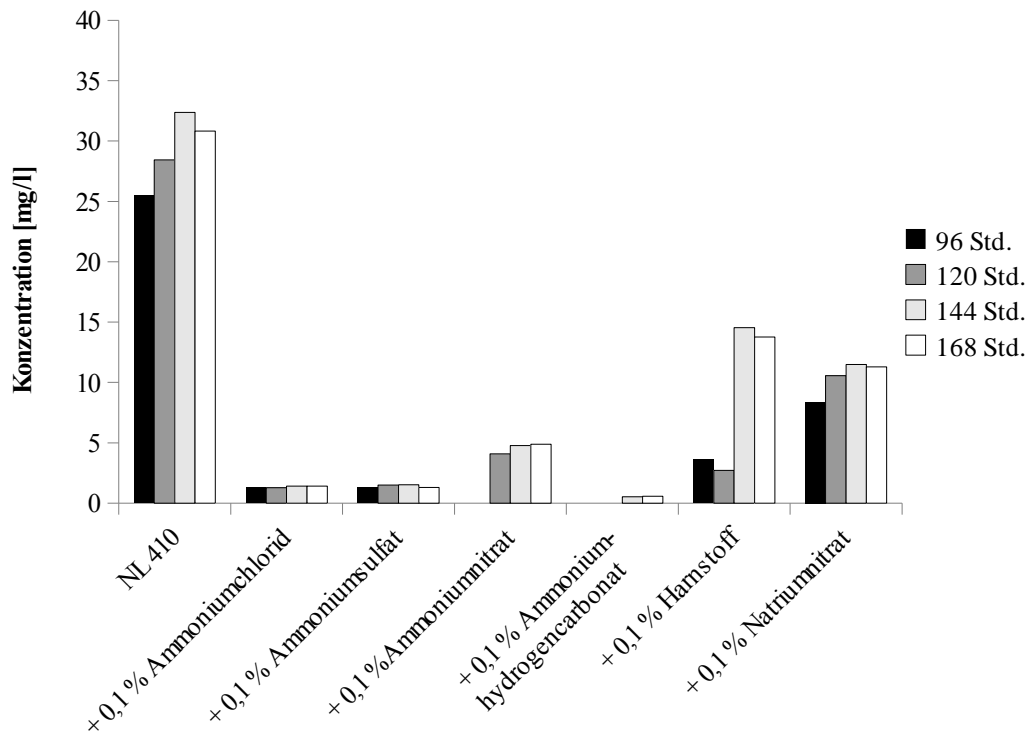


Abbildung 15: Produktion von Dermacoizin C in NL 410 unter Zusatz verschiedener anorganischer Stickstoffquellen

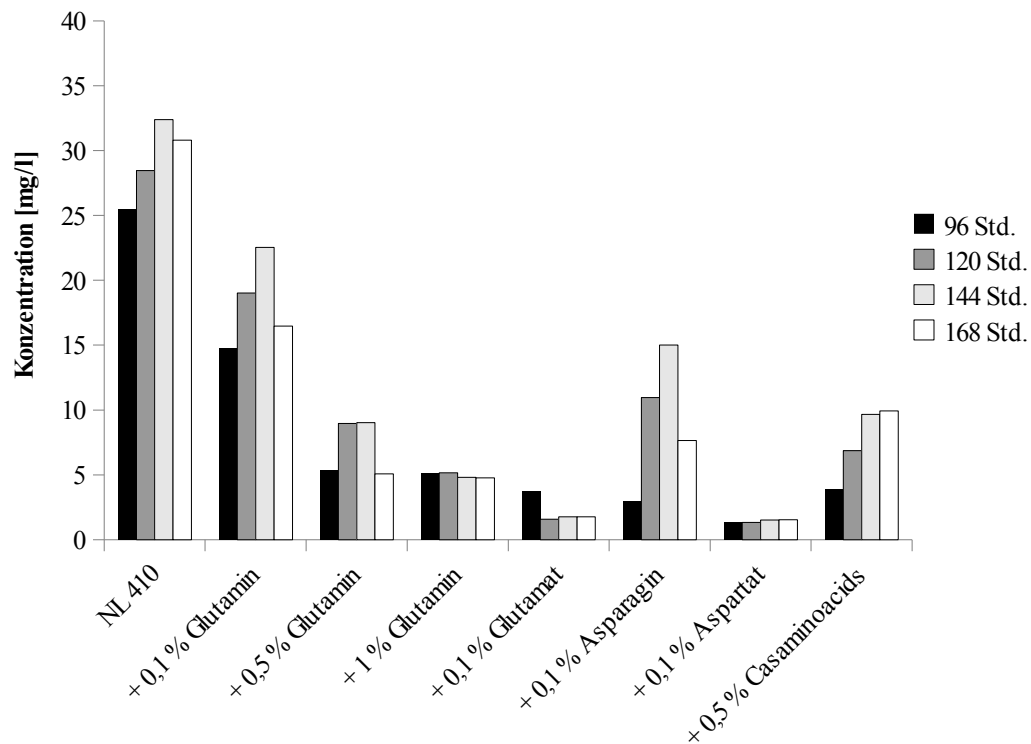


Abbildung 16: Produktion von Dermacoizin C in NL 410 unter Zusatz verschiedener organischer Stickstoffquellen

Unter Zugabe von 0,1 % Ammoniumchlorid, -sulfat bzw. -hydrogencarbonat sowie Glutamat bzw. Aspartat zeigte sich so gut wie keine Synthese von Dermacozin C. Der Einsatz aller anderen getesteten Stickstoffquellen führte zu einer deutlichen Verminderung der Produktion.

Mit zunehmender Menge Glutamin, einem universellen Aminogruppendonor, sank die Konzentration von Dermacozin C immer weiter. Da diese Beobachtung für eine zunehmende Umsetzung von Dermacozin C zu Dermacozin B sprechen könnte, wurde die synthetisierte Menge dieser beiden Substanzen miteinander verglichen (Abbildung 17).

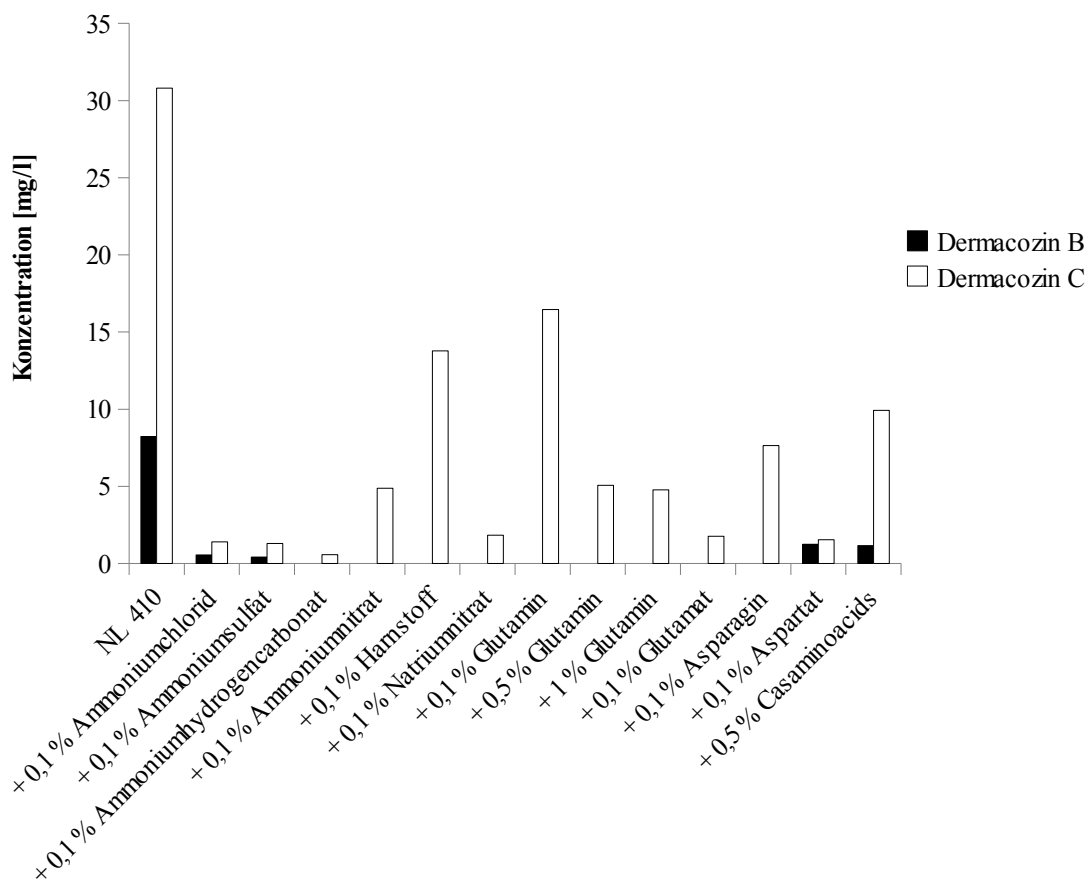


Abbildung 17: Produktion von Dermacozin B und C in NL 410 unter Zugabe verschiedener Stickstoffquellen

In keinem Ansatz wurde mehr Dermacozin B als C produziert, in den meisten Fällen wurde überhaupt kein Dermacozin B gefunden. Grundsätzlich resultierte der Zusatz verschiedener Stickstoffquellen in einer Abnahme der Produktion aller Dermacozine (Daten nicht gezeigt).

Aus den beiden Versuchsreihen lässt sich ableiten, dass sich das Metabolitenspektrum durch Verwendung verschiedener Stickstoffquellen nicht verändert hat und Dermacozin C stets das Hauptprodukt darstellt.

3.1.8 Einfluss komplexer Nährstoffquellen

Komplexe Nährstoffquellen können von Bakterien oft noch als Nahrungsgrundlage dienen, wenn leicht metabolisierbare Kohlen- und Stickstoffquellen im Medium verbraucht sind. In einer früheren Studie hatte sich gezeigt, dass die Sekundärstoffproduktion der Dermacocccen erst nach dem Verbrauch von Glucose und Glycerin eintritt [WAGNER, 2009]. Daher wurde durch den Einsatz von Hafermehl, Hefeextrakt bzw. Malzextrakt versucht, einem Mangel an Nährstoffen entgegenzuwirken, um so die Produktion der Dermacozone zu steigern (Abbildung 18).

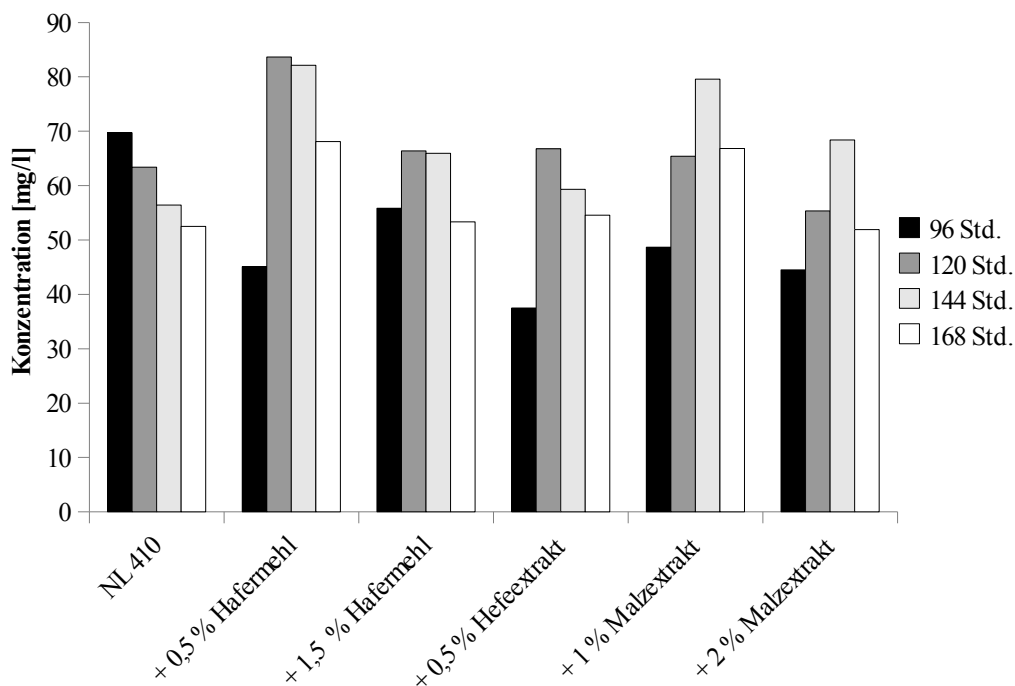


Abbildung 18: Produktion von Dermacozone C in NL 410 unter Zusatz von Malz- bzw. Hefeextrakt oder Hafermehl

Bei Verwendung von 1 % Hafermehl bzw. Malzextrakt wurde eine Erhöhung der Produktion von ca. 20 % gegenüber der Kontrolle (NL 410, enthält bereits 0,5 % Hafermehl) beobachtet. Unter Zugabe von Hefeextrakt konnte keine Steigerung erzielt werden, genauso wie unter Zusatz von 2 % Hafermehl bzw. Malzextrakt.

3.1.9 Einfluss mehrerer Nährstoffquellen

Durch Verwendung von 2 % Glucose, 1 % Hafermehl oder 1 % Malzextrakt in NL 410 konnte die Produktion der Dermacozone deutlich gesteigert werden (vgl. 3.1.6 und 3.1.8). Daher wurde versucht, durch Kombination dieser Nährstoffquellen eine weitere Erhöhung der Produktivität zu erzielen. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Abbildung 19 dargestellt.

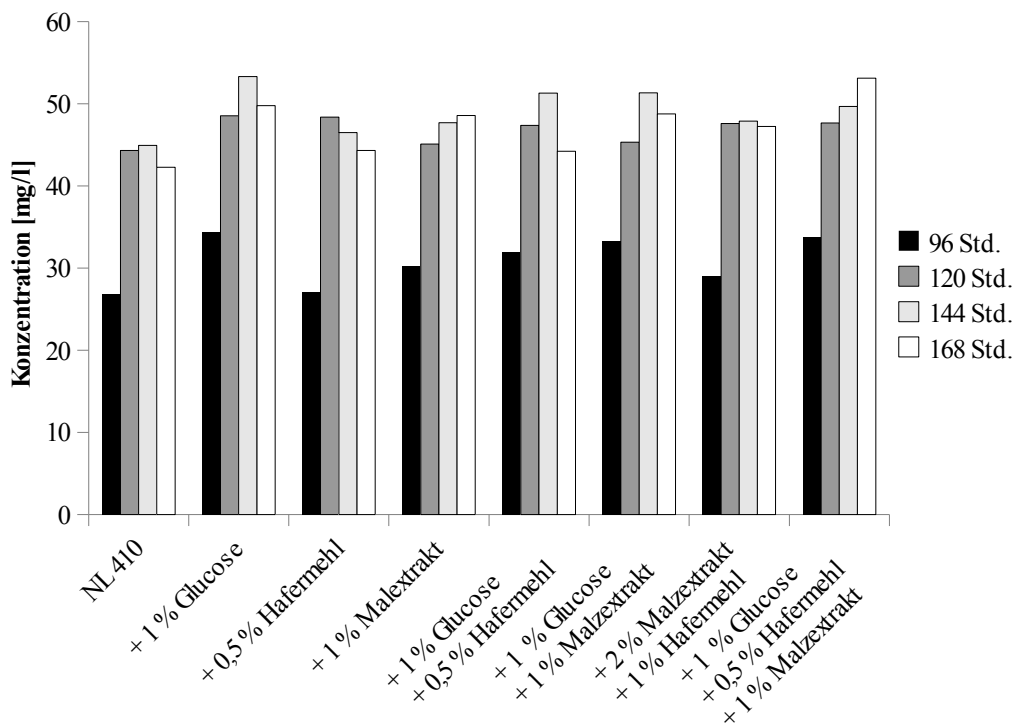


Abbildung 19: Produktion von Dermacozone C in NL 410 unter gleichzeitiger Zugabe mehrerer Nährstoffquellen

Durch Zusatz mehrerer Nährstoffquellen konnte die Produktion von Dermacozone C gesteigert werden. Die höchsten Ausbeuten konnte mit einer Gesamtglucose-Konzentration von 2 % bzw. deren Kombination mit 1 % Hafermehl und 1 % Malzextrakt erzielt werden. In beiden Ansätzen war die maximale Synthesemenge ca. 20 % höher als in der Kontrolle (NL 410).

3.2 Untersuchungen zum Schaumverhalten von *Dermacoccus* sp. MT 1.2 in Schüttelkulturen

In vorangegangenen Fermentationen hatte sich gezeigt, dass es bei der Kultivierung von *Dermacoccus* sp. MT 1.2 im 10 Liter-Bioreaktor zu einer extremen Schaumentwicklung kommt [WAGNER, 2009]. Dies sollte durch Zugabe verschiedener Antischaummittel redu-

ziert werden, um einen Substanzverlust durch Ausschäumen des Fermenters zu verhindern. In Vorversuchen wurden Agrimul COS2, Agrimul Derivat 1, Genapol 2882, Sojaöl, Sonnenblumenöl oder Spülmittel in Konzentrationen von 0,1 %, 0,5 % und 1 % in 100 ml-Schüttelkulturen getestet. Die Bewertung der Schaumentwicklung erfolgte anhand der Schaumhöhe im Schüttelkolben. Die Ergebnisse sind in Tabelle 27 dargestellt.

Tabelle 27: Schaumentwicklung in Schüttelkulturen mit NL 410 unter Zusatz von 0,1, 0,5 bzw. 1 % Agrimul COS2, Agrimulester Derivat 1, Genapol 2882, Sojaöl, Sonnenblumenöl oder Spülmittel

Zusatz	Schaumentwicklung nach			
	96 Std.	120 Std.	144 Std.	168 Std.
NL 410 (Kontrolle)	++	+++	+++	+++
0,1 % Agrimul COS 2	++	++	++	++
0,5 % Agrimul COS 2	+	+	+	++
1 % Agrimul COS 2	-	-	-	-
0,1 % Agrimulester Derivat1	+	+	+	+
0,5 % Agrimulester Derivat1	-	-	-	-
1 % Agrimulester Derivat1	-	-	-	-
0,1 % Genapol 2882	-	-	-	+
0,5 % Genapol 2882	-	-	-	-
1 % Genapol 2882	-	-	-	-
0,1 % Sojaöl	++	++	++	+++
0,5 % Sojaöl	+	+	++	++
1 % Sojaöl	+	+	+	++
0,1 % Sonnenblumenöl	+	+	++	++
0,5 % Sonnenblumenöl	+	+	+	+
1 % Sonnenblumenöl	-	-	-	-
0,1 % Spülmittel	++	+++	+++	+++
0,5 % Spülmittel	++	++	+++	+++
1 % Spülmittel	+++	+++	+++	+++

+++ hohe Schaumentwicklung; ++ mittlere Schaumentwicklung; + geringe Schaumentwicklung; - keine Schaumentwicklung

Alle Substanzen setzten die Schaumbildung in höherem oder niedrigerem Maße herab, mit Ausnahme von Spülmittel, das eine gegenteilige Wirkung zeigte. Allerdings führte jedes der eingesetzten Mittel zu einer Verringerung der Produktion. Die Auswirkung der verschiedenen Zusätze auf die Produktion ist in den Abbildungen 20 und 21 veranschaulicht.

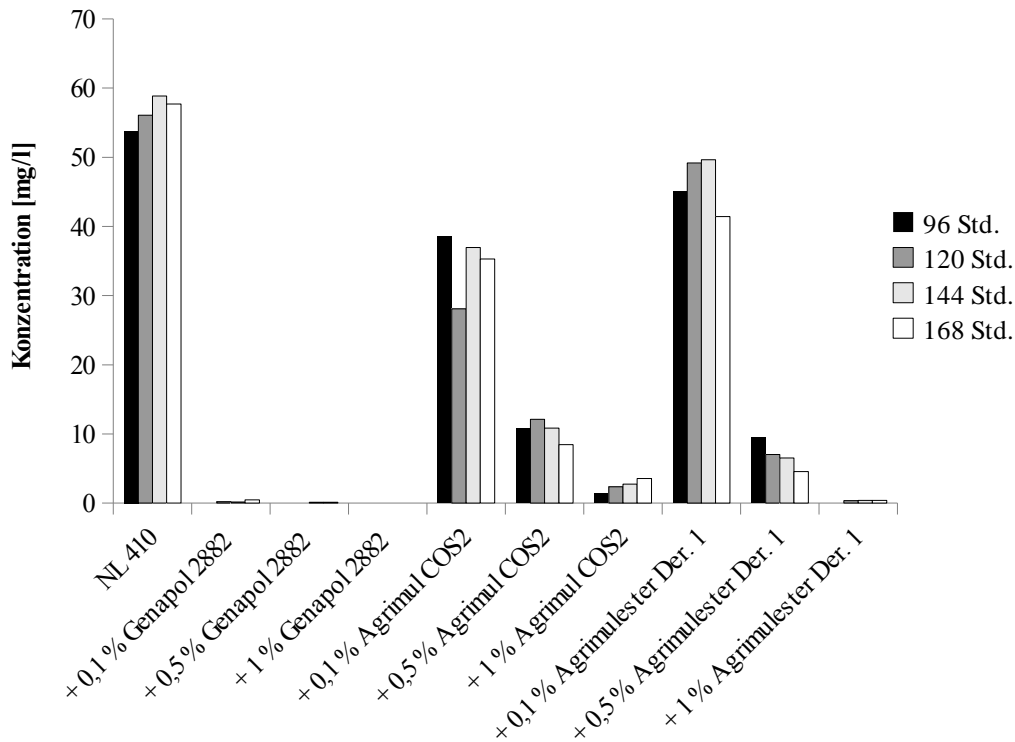


Abbildung 20: Produktion von Dermacozin C in NL 410 unter Zusatz von 0,1, 0,5 bzw. 1 % Agrimul COS2, Agrimulester Derivat 1 oder Genapol 2882

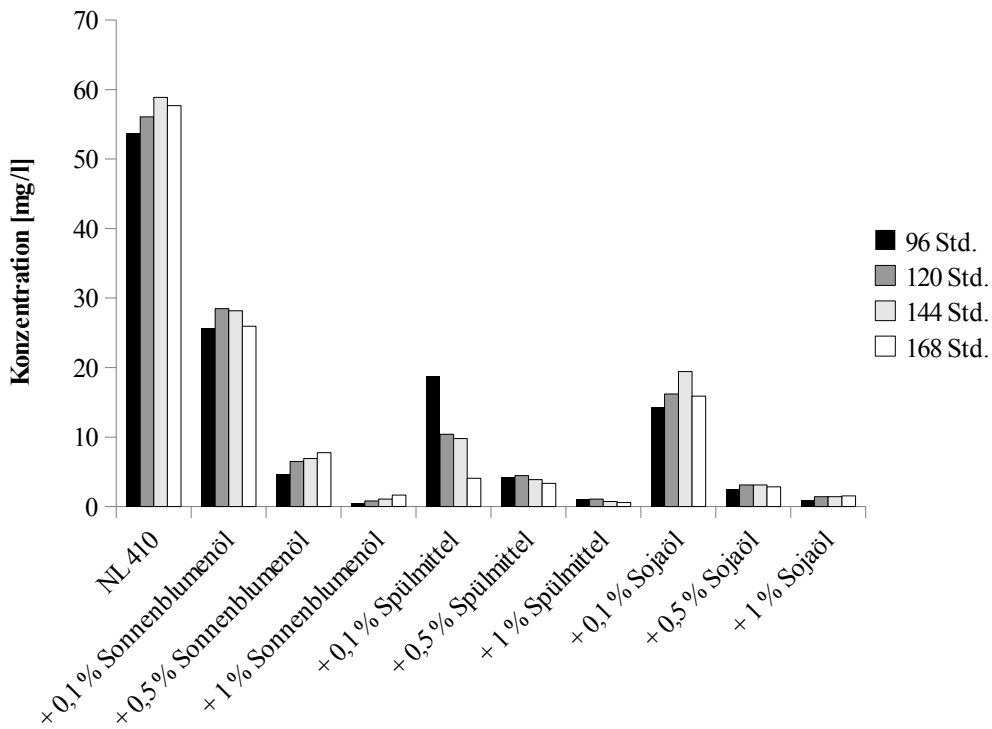


Abbildung 21: Produktion von Dermacozin C in NL 410 unter Zusatz von 0,1, 0,5 bzw. 1 % Sojaöl, Sonnenblumenöl oder Spülmittel

Genapol 2882 stellte das beste Antischaummittel dar, es verhinderte schon in einer Konzentration von 0,1 % die Schaumentwicklung. Allerdings hemmte die Zugabe dieser Substanz die Dermacozin C-Produktion vollständig. Die Verwendung von 0,1 % Agrimulester Derivat 1 reduzierte die Schaumbildung deutlich, wohingegen die Dermacozin-Ausbeute nur um ca. 17 % abnahm. In höheren Konzentrationen von 0,5 % bzw. 1 % fiel die Produktion auf unter 25 % i. Vgl. zur Kontrolle (NL 410). Unter Zugabe von 0,1 % Agrimul COS 2 wurde der Schaum kaum reduziert. In höheren Konzentrationen verringerte sich zwar die Schaumentwicklung, jedoch auch die Produktivität. Das Gleiche traf für Sonnenblumen- und Sojaöl zu. Spülmittel förderte die Schaumentwicklung und setzte die Produktion der Dermacozine ebenfalls herab.

3.3 Untersuchungen zum Schaumverhalten von *Dermacoccus* sp. MT 1.2 im 10 Liter-Fermenter

In Vorversuchen im Schüttelkolbenmaßstab hatte sich herausgestellt, dass die Zugabe von 2 % Glucose bzw. 0,2 % CaCO₃ die Produktion fördert (vgl. 3.1.5 und 3.1.6). Daher wurde für die Fermentationsansätze ein optimiertes Medium mit diesen Zusätzen verwendet (NL 420, vgl. Tabelle 11). Des Weiteren hatte sich Agrimulester Derivat 1 als die beste Substanz erwiesen, um die Schaumbildung zu reduzieren und gleichzeitig die Produktion nicht allzu sehr zu reduzieren. Daher wurde dieses Antischaummittel für die Kultivierung im Fermenter eingesetzt.

3.3.1 Sekundärstoff- und fermentationsbegleitende Analytik bei Kultivierung unter Zusatz von Agrimulester Derivat 1

Die Fermentation erfolgte wie unter 2.2.7 beschrieben unter Zusatz von 0,1 bzw. 0,5 % Agrimulester Derivat 1. Das in den Schüttelkolben beobachtete reduzierte Schaumverhalten bestätigte sich in den Fermentern nicht. Der Ansatz mit 0,5 % Agrimulester Derivat 1 begann direkt nach dem Animpfen zu schäumen. Nach ca. 48 Stunden war dieser komplett ausgeschäumt. Der Fermenter mit 0,1 % Agrimulester Derivat 1 verhielt sich ähnlich und enthielt nach 72 Stunden kaum noch Kultur. In der Kontrolle (zunächst ohne Antischaummittel) zeigte sich ebenfalls eine extreme Schaumentwicklung, daher wurde Ucolub N 115 (insgesamt drei Milliliter während der gesamten Fermentationsdauer) zugesetzt. In einer früheren Studie hatte sich herausgestellt, dass diese Substanz die Produktivität um ca. 80 - 90 % herabsetzt, jedoch auch die Schaumbildung deutlich reduziert [WAGNER, 2009]. Die

Zugabe dieser Chemikalie sollte einen Vergleich bzgl. der Schaumentwicklung mit den anderen beiden Ansätzen ermöglichen. Unter Zugabe von Ucolub N 115 gingen insgesamt ca. drei Liter Kultur verloren, während die anderen beiden Fermenter mit Agrimulester Derivat 1 komplett ausschäumten. In diesen Ansätzen war bis zum Zeitpunkt des vollständigen Ausschäumens keine Sekundärstoff-Produktion zu beobachten.

Im Kulturfiltrat des Fermenters mit Ucolub N 115 konnten die Dermacozine B, C, F, K, L und W mittels HPLC-DAD nachgewiesen werden. Nach ca. 96 Stunden setzte die Produktion ein, das Maximum wurde nach 168 Stunden erreicht. Die Konzentrationen der Dermacozine C, K, L und W wurden mittels Peakflächenrückrechnung bestimmt und in Tabelle 28 dargestellt; die Substanzen B und F wurden nicht weiter behandelt.

Tabelle 28: Konzentrationen der Dermacozine im Kulturfiltratextrakt des Fermenters unter Zugabe von Ucolub N 115 nach 168 Stunden

Substanz	Konzentration [mg/l]
Dermacozin C	23,5
Dermacozin K	7,8
Dermacozin L	2,4
Dermacozin W	5,0

Im Zellextrakt konnten die Dermacozine B, C, K und W nur in sehr geringen Mengen nachgewiesen werden, daher wurden diese Proben nicht weiter bearbeitet.

Die fermentationsbegleitende Analytik beinhaltete die Bestimmung des Wachstums, des pH-Werts und des Nährstoffverbrauchs. Für die Bestimmung des Wachstums wurde die Biomasse volumetrisch in Prozent gemessen (vgl. 2.2.3) und der DNA-Gehalt ermittelt (vgl. 2.2.4, Abbildung 22). Die Messung des Kohlenstoffverbrauchs erfolgte wie unter 2.2.8.2 beschrieben; die Ergebnisse sind in Abbildung 23 dargestellt.

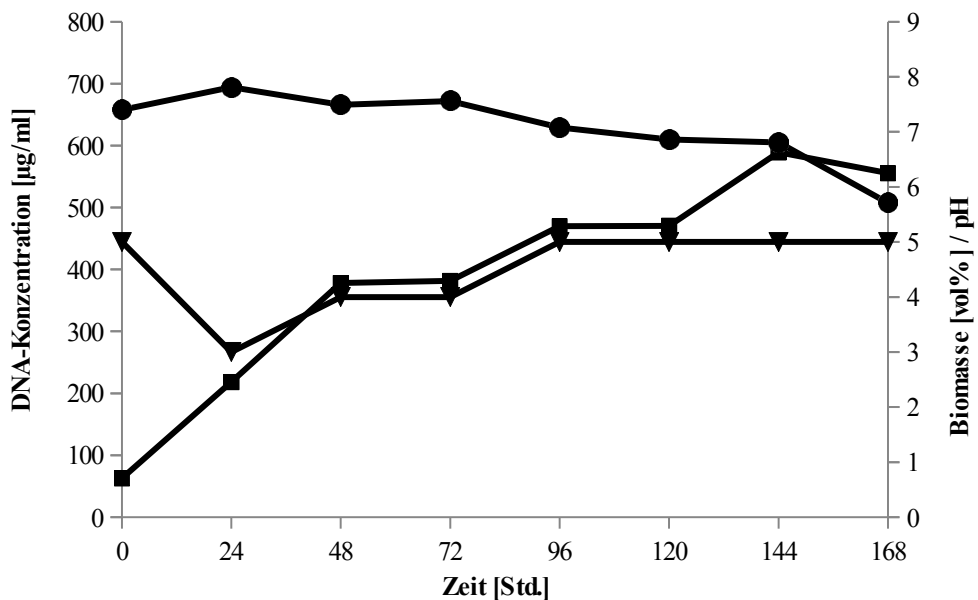


Abbildung 22: Verlauf von Biomasse (▲), DNA-Konzentration (■) und pH-Wert (●) im Fermenter mit NL 420

Der pH-Wert im Fermenter stieg in den ersten 24 Stunden leicht an, bevor er im weiteren Verlauf von ca. 7,8 auf einen Wert von 5,7 abfiel. Die Biomasse sank in den ersten 24 Stunden von 5 auf 3 % und stieg in den folgenden 72 Stunden wieder auf den Ausgangswert an, wo sie bis zur Messung nach 168 Stunden verblieb. Für den DNA-Gehalt zeigte sich in den ersten 144 Stunden eine starke Zunahme bis zu einer maximalen DNA-Konzentration von 590 µg/ml. Anschließend sank der Wert wieder leicht auf ca. 500 µg/ml.

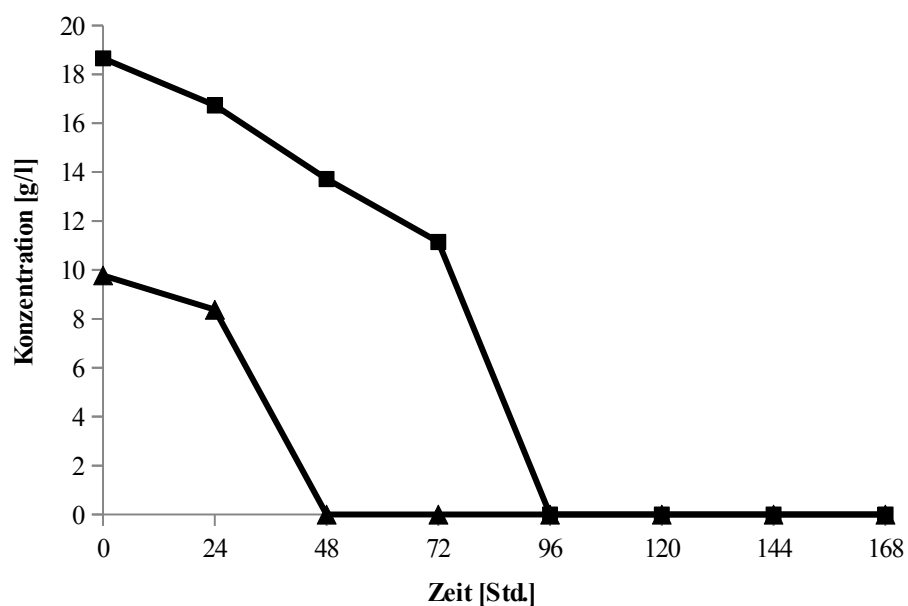


Abbildung 23: Glucose- (■) und Glycerinverbrauch (▲) im Fermenter mit NL 420

Was den Nährstoffverbrauch anbelangt wurden Glycerin und Glucose von Beginn der Fermentation an abgebaut. Glucose war nach 96, Glycerin schon nach 48 Stunden verstoffwechselt.

3.3.2 Sekundärstoff- und fermentationsbegleitende Analytik bei Kultivierung im 10 Liter-Bioreaktor mit Propellerrad

Da die Zugabe von Agrimulester Derivat 1 zum Fermentationsansatz die Schaumbildung nicht verhindern konnte, wurde versucht, das Problem mechanisch durch den Einbau einer Propellerschraube an der Drehwelle zu beheben. Dadurch wurde der aufsteigende Schaum seitlich nach unten gedrückt und konnte somit nicht mehr die Abluft des Fermenters erreichen.

Das Ausschäumen des Fermenters konnte durch das Propellerrad weitgehendst verhindert werden, es gingen während der gesamten Fermentationsdauer nur zwei Liter Kultur verloren, was aufgrund des Belüftungssystems ca. dem normalen Verlust einer 10 Liter-Fermentation entspricht. Die Synthese der Dermacozine setzte dabei nach 72 Stunden ein. Die maximale Produktion der Dermacozine C, B, F, L, W und Z war nach 168 Stunden zu verzeichnen. In Tabelle 29 sind die Konzentrationen dieser Sekundärmetabolite aufgeführt; die Substanzen B und F wurden nicht weiter behandelt.

Tabelle 29: Konzentrationen der Dermacozine im Kulturfiltratextrakt bei Kultivierung von *Dermacoccus* sp. MT 1.2 im Fermenter mit Propellerrad nach 168 Stunden

Substanz	Konzentration [mg/l]
Dermacozin C	24,5
Dermacozin L	1,9
Dermacozin W	4,1
Dermacozin Z	3

Im Zellextrakt konnte neben den Dermacozinen B, C, F und K auch Dermacozin P nachgewiesen werden. Allerdings lagen die Substanzen in Konzentrationen von weniger als 1 mg/l vor, so dass diese Proben nicht weiter bearbeitet wurden.

Zur Wachstumsbestimmung wurden sowohl Biomasse als auch DNA-Gehalt ermittelt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 24 veranschaulicht.

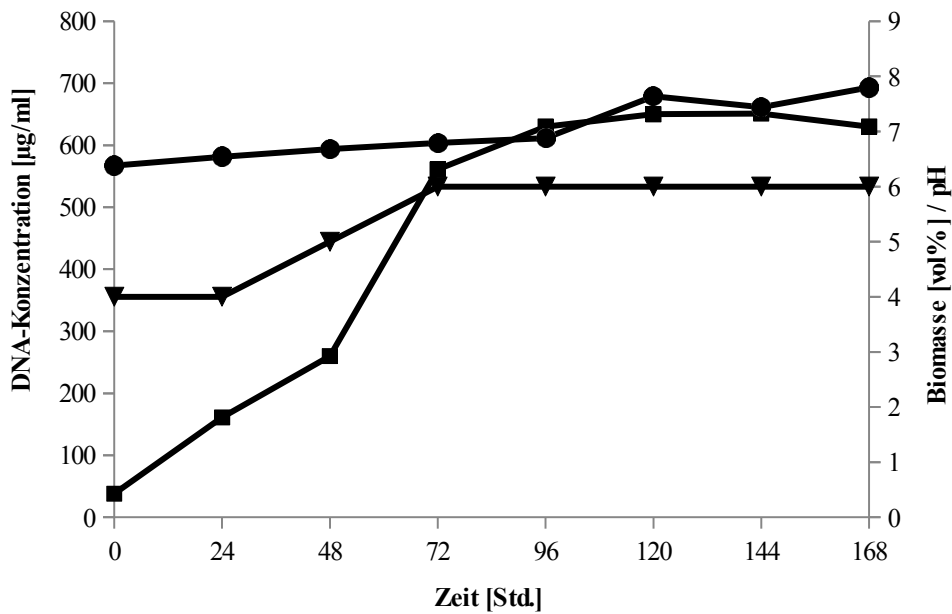


Abbildung 24: Verlauf von Biomasse (▲), DNA-Konzentration (■) und pH-Wert (●) im Fermenter mit Propellerrad

Der pH-Wert stieg im Verlauf der Kultivierung kontinuierlich von pH 6,3 auf pH 7,8 an. Die Biomasse und der DNA-Gehalt nahmen innerhalb der ersten 72 Stunden sehr stark zu, die DNA von ca. 40 auf 560 µg/ml und die Biomasse von 4 auf 6 vol%. Anschließend stagnierte die Biomasse bei 6 %, während der DNA-Gehalt auf einen Maximalwert von 650 µg/ml nach einer Kultivierungsdauer von 144 Stunden anstieg.

Durch die Bestimmung der Konzentration von Glucose und Glycerin im Kultivierungsverlauf wurde der Nährstoffverbrauch analysiert (Abbildung 25).

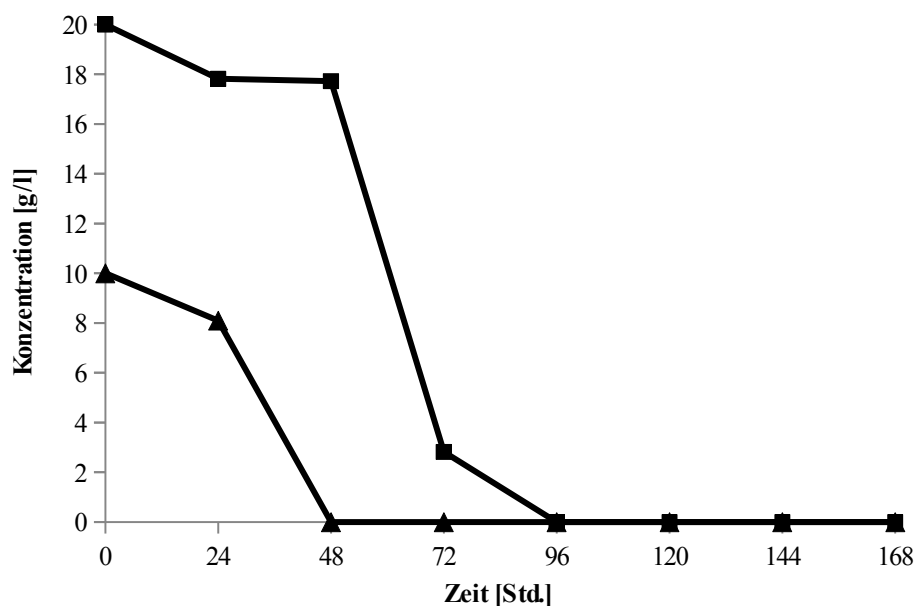


Abbildung 25: Glucose- (■) und Glycerinverbrauch (▲) im Fermenter mit Propellerrad an der Drehwelle

Glycerin wurde wie auch Glucose direkt nach Beginn der Fermentation abgebaut. Nach 48 Stunden war kein Glycerin mehr im Medium nachweisbar, nach 96 Stunden war die Glucose komplett verbraucht.

3.3.3 Sekundärstoff- und fermentationsbegleitende Analytik bei Verwendung unterschiedlich behandelter Vorkulturen

In früheren Arbeiten wurde festgestellt, dass die Inkubationszeit der Vorkultur einen Einfluss auf die Produktivität haben kann [DIETER, 2002; NEVES *et al.*, 2001]. Für die Dermacozin-Synthese hatte sich eine Verkürzung der Kultivierungsdauer von 72 auf 48 Stunden nicht als produktionssteigernd erwiesen [WAGNER, 2009].

In einem weiteren Experiment wurde untersucht, wie sich die Verwendung einer nicht geschüttelten Vorkultur (Standkultur) von *Dermaococcus* sp. MT 1.2 auswirkt. Dazu wurden die Fermentationsansätze mit Vorkulturen angeimpft, die zunächst 24 bzw. 48 Stunden bei 180 Upm geschüttelt und anschließend für weitere 48 bzw. 24 Stunden ohne Schütteln inkubiert worden waren (24/48 Stunden-Vorkultur bzw. 48/24 Stunden-Vorkultur). Zur Kontrolle wurde ein Fermenter mit einer Vorkultur angeimpft, die 72 Stunden unter Schütteln inkubiert worden war (72 Stunden-Vorkultur). Die weiteren Fermentationsbedingungen sind unter 2.2.2.3 beschrieben.

Unabhängig von der Vorkultur setzte die Produktion der Dermacozine zwischen 48 und 72 Stunden nach Kultivierungsbeginn ein und erreichte ihren Höhepunkt nach einer Inkubationsdauer von 168 Stunden. Mittels HPLC-DAD konnten die Dermacozine C, K, L, W und Z nachgewiesen werden. Die ermittelten maximalen Konzentrationen sind in Tabelle 30 angegeben.

Tabelle 30: Konzentration der Dermacozine im Fermentationsansatz mit unterschiedlich behandelten Vorkulturen nach 168 Stunden

Substanz	Dermacozin-Konzentration [mg/l]		
	24/48 Std.-Vorkultur ¹	48/24 Std.-Vorkultur ²	72 Std.-Vorkultur ³
Dermacozin C	43,8	40,4	19,6
Dermacozin K	6,3	7,6	5,7
Dermacozin L	5,1	5,3	2,1
Dermacozin W	3,7	3,2	1,7
Dermacozin Z	5,8	2,7	0

¹ Vorkulturen wurden 24 Std. schüttelnd und die folgenden 48 Std. stehend inkubiert

² Vorkulturen wurden 48 Std. schüttelnd und die folgenden 24 Std. stehend inkubiert

³ Vorkulturen wurden 72 Std. schüttelnd inkubiert

In den Fermentationsansätzen, die mit der 24/48 Stunden- bzw. 48/24 Stunden-Vorkultur angeimpft worden waren, wurde keine Schaumbildung beobachtet. Im Gegensatz dazu schäumte der Fermenter, der mit einer stets geschüttelten Vorkultur angeimpft worden war, sehr stark und verlor dabei ca. vier Liter Kultur. Unter Verwendung von Standvorkulturen war die Produktion i. Vgl. zu den Schüttelvorkulturen der Dermacozine um ca. das Doppelte erhöht. Eine Ausnahme stellte Dermacozin K dar, dessen Konzentration nur ca. 15 - 25 % erhöht war.

Die fermentationsbegleitende Analytik umfasste zunächst die Bestimmung des pH-Verlaufs (Abbildung 26).

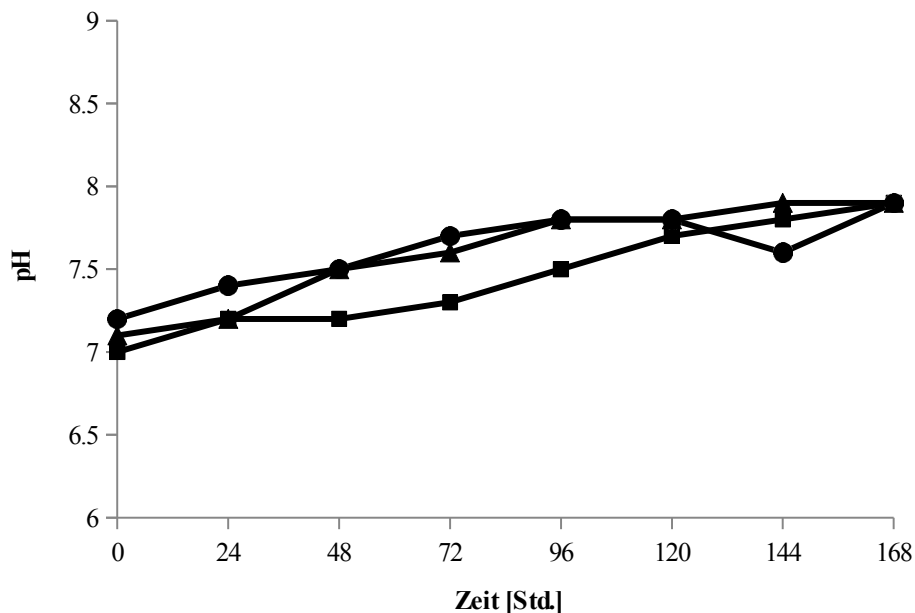


Abbildung 26: pH-Werte in den Fermentationsansätzen mit unterschiedlich behandelten Vorkulturen zu verschiedenen Kultivierungszeitpunkten; ●, 24/48 Std.-Schüttel-/Stand-Vorkultur; ▲, 48/24 Std.-Schüttel-/Stand-Vorkultur; ■, 72-Std. Schüttel-Vorkultur

In allen Ansätzen zeigte sich für die pH-Werte eine zunehmende Tendenz, dabei lagen die Werte zu Beginn der Fermentation zwischen 7,0 und 7,2 und stiegen im weiteren Verlauf in allen drei Fermentern auf pH 7,9 an.

Des Weiteren wurde das Wachstum von *Dermacoccus* sp. MT 1.2 anhand von Biomasse und DNA-Gehalt verfolgt (Abbildungen 27 und 28).

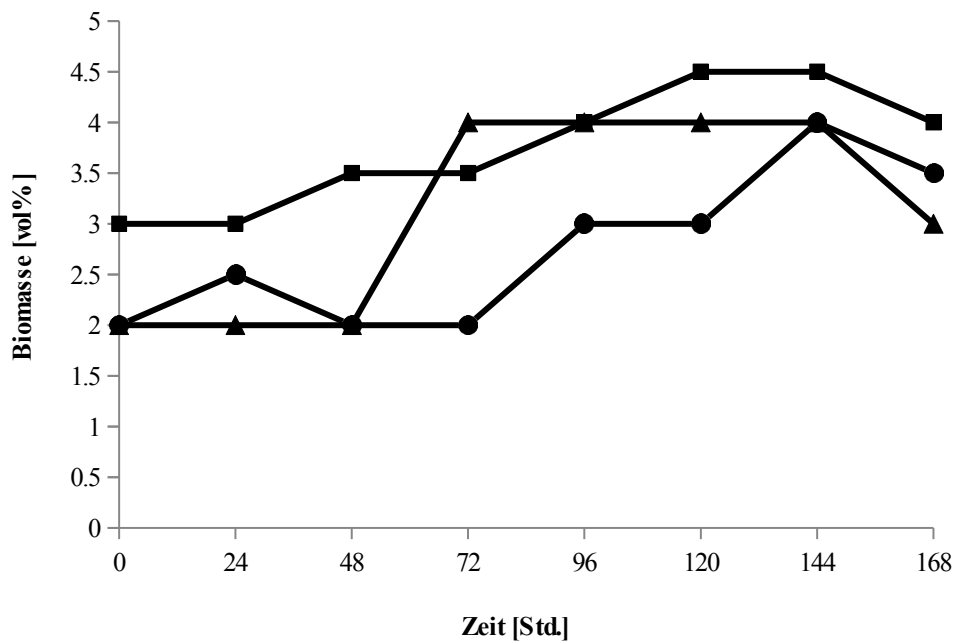


Abbildung 27: Biomasse in den Fermentationsansätzen mit unterschiedlich behandelten Vorkulturen zu verschiedenen Kultivierungszeitpunkten; ●, 24/48 Std.-Schüttel-/Stand-Vorkultur; ▲, 48/24 Std.-Schüttel-/Stand-Vorkultur; ■, 72-Std. Schüttel-Vorkultur

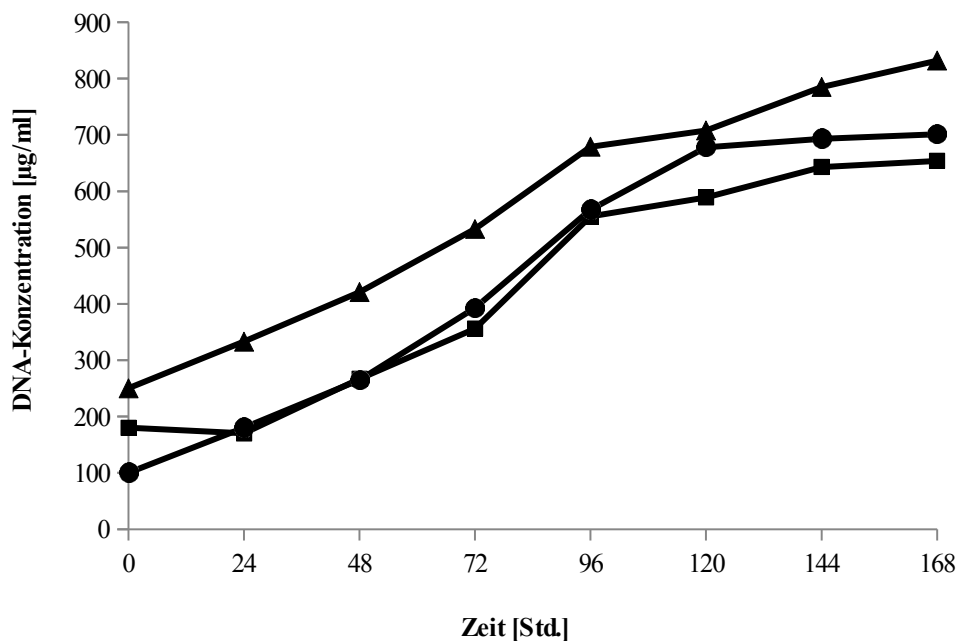


Abbildung 28: DNA-Konzentration in den Fermentationsansätzen mit unterschiedlich behandelten Vorkulturen zu verschiedenen Kultivierungszeitpunkten; ●, 24/48 Std.-Schüttel-/Stand-Vorkultur; ▲, 48/24 Std.-Schüttel-/Stand-Vorkultur; ■, 72-Std. Schüttel-Vorkultur

Die Biomasse im Fermenter, der mit der 72 Stunden-Vorkultur angeimpft worden war, stieg innerhalb der ersten 120 Stunden kontinuierlich von 3 vol% bis auf 4,5 vol% an. Dort stagnierte der Wert für weitere 24 Stunden, bevor er nach 168 Stunden auf 4 vol%

abfiel. Im Fermenter mit der 48/24 Stunden-Vorkultur verblieb die Biomasse in den ersten 48 Stunden bei 2 vol% und stieg 24 Stunden später auf 4,5 vol%. Nach weiteren 72 Stunden nahm diese um ca. ein Drittel ab. Im Ansatz, der mit der 24/48 Stunden-Vorkultur beimpft worden war, stieg die Biomasse innerhalb der ersten 120 Stunden kontinuierlich von 3,0 auf 4,5 vol% an. Nach weiteren 24 Stunden auf diesem Niveau fiel der Wert auf 3,5 vol%.

Der Verlauf der DNA-Konzentration nahm während der gesamten Fermentationsdauer in allen drei Ansätzen stetig zu. Im Fermenter mit der 24/48 Stunden-Vorkultur zeigte sich dabei ein Anstieg von 100 µg/ml auf 700 µg/ml, im Ansatz mit der 48/24 Stunden-Vorkultur von 250 µg/ml auf 832 µg/ml und im Fermenter mit der 72 Stunden-Vorkultur von 181 µg/ml auf 654 µg/ml.

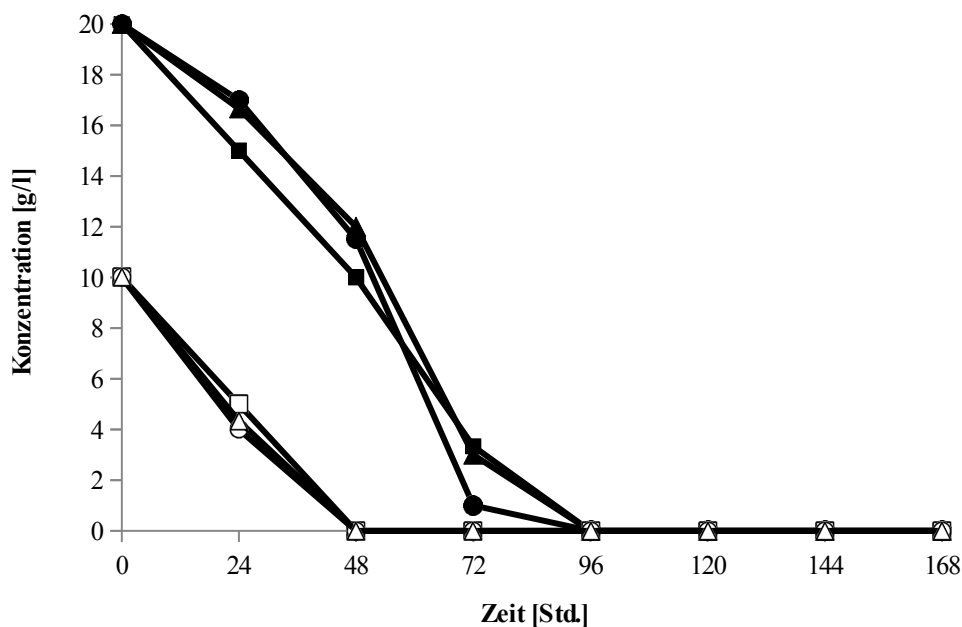


Abbildung 29: Glucose- (ausgefüllte Symbole) bzw. Glycerinverbrauch (Symbole ohne Füllung) in den Fermentationsansätzen mit unterschiedlich behandelten Vorkulturen; ● bzw. ○, 24/48 Std.-Schüttel-/Stand-Vorkultur; ▲ bzw. △, 48/24 Std.-Schüttel-/Stand-Vorkultur; ■ bzw. □, 72-Std. Schüttel-Vorkultur

Unabhängig von der Behandlung der Vorkultur wurde Glucose innerhalb von 96 Stunden verbraucht, während Glycerin bereits nach 48 Stunden nicht mehr nachweisbar war.

In den eben beschrieben Experimenten hatte sich die Verwendung von Standvorkulturen als die optimale Methode zur Schaumreduktion im Fermenter herausgestellt. Als positiver Nebeneffekt war dabei eine Verdopplung der Produktivität zu beobachten. Ruhend inku-

bierte Vorkulturen sollten daher in einem erneuten Fermentationsansatz (vgl. 3.4) verwendet werden, um ausreichende Substanzmengen für die weitere Charakterisierung zu erhalten.

3.4 Produktionsfermentation im 10 Liter-Bioreaktor

In Vorversuchen zur Optimierung der Dermacozin-Synthese hatte sich die Verwendung von Standvorkulturen als produktionsfördernd herausgestellt (vgl. 3.3.3). Daher wurden zum Animpfen der 10 Liter-Bioreaktoren für die Produktion im Großmaßstab ebenfalls Vorkulturen verwendet, die teilweise ruhend inkubiert worden waren (24/48 Stunden- bzw. 48/24 Stunden-Schüttel-/Stand-Vorkultur). Zum Vergleich wurde ein Ansatz mit 72 Stunden geschüttelten Vorkulturen angeimpft.

Eine Schaumentwicklung wurde, wie auch schon in einem früheren Experiment gezeigt (vgl. 3.3.3), nur in dem Ansatz beobachtet, der mit den 72 Stunden-Vorkulturen angeimpft worden war. Dabei bestätigte sich auch der Beginn der Dermacozin-Synthese nach 48 bis 72 Stunden. Das Produktionsmaximum wurde nach einer Kultivierungsdauer von 192 Stunden erreicht (vgl. Abbildung 30). Die Konzentrationen der Dermacozine C, F, K, L, W und Z wurden berechnet und in Tabelle 31 angegeben.

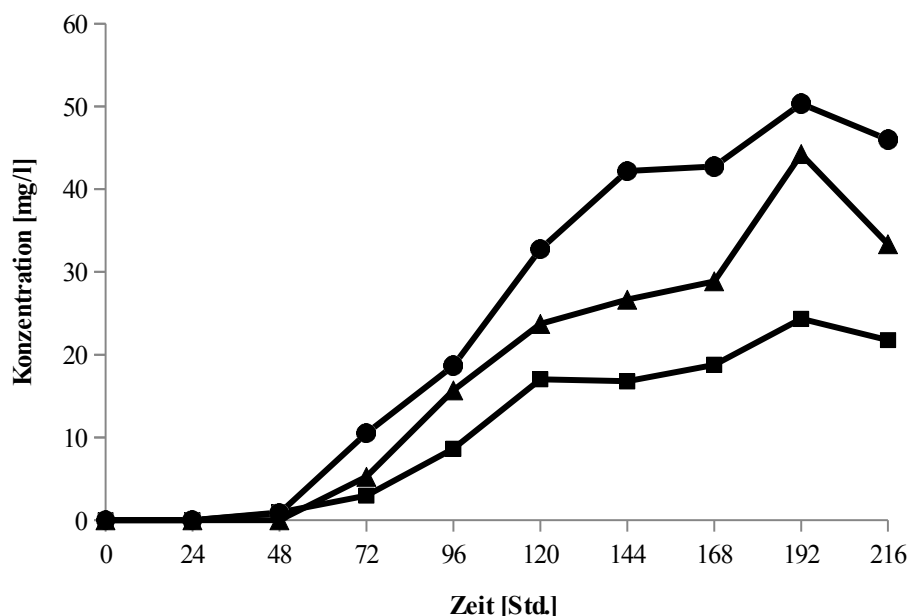


Abbildung 30: Dermacozin C-Konzentration in den Fermentationsansätzen mit unterschiedlich behandelten Vorkulturen zu verschiedenen Kultivierungszeitpunkten; ●, 24/48 Std.-Schüttel-/Stand-Vorkultur; ▲, 48/24 Std.-Schüttel-/Stand-Vorkultur; ■, 72-Std. Schüttel-Vorkultur

Tabelle 31: Konzentration der Dermacozine im Fermentationsansatz mit unterschiedlich behandelten Vorkulturen nach einer Kultivierungsdauer von 192 Stunden

Substanz	Dermacozin-Konzentration [mg/l] im Produktionsfermenter		
	24/48 Std.-Vorkultur ¹	48/24 Std.-Vorkultur ²	72 Std.-Vorkultur ³
Dermacozin C	50,0	44,2	24,3
Dermacozin K	17,3	16,5	7,5
Dermacozin L	6,7	5,4	2,6
Dermacozin W	6,7	6,1	2,7
Dermacozin Z	3,1	2,8	0

¹ Vorkulturen wurden 24 Std. schüttelnd und die folgenden 48 Std. stehend inkubiert

² Vorkulturen wurden 48 Std. schüttelnd und die folgenden 24 Std. stehend inkubiert

³ Vorkulturen wurden 72 Std. schüttelnd inkubiert

Die Produktion aller Substanzen war in den beiden Fermentern, die mit den 24/48 Stunden- bzw. 48/24 Stunden-Standvorkulturen angeimpft worden waren, wie schon unter 3.3.3 beobachtet doppelt so hoch wie im Kontrollfermenter (72 Stunden-Vorkultur).

Die fermentationsbegleitende Analytik für diese Fermentationen umfasste die Bestimmung des DNA-Gehalts, des pH-Werts, der Biomasse sowie des Glucose- bzw. Glycerin-Verbrauchs. Dabei waren keine nennenswerten Unterschiede i. Vgl. zur vorhergehenden Fermentation (vgl. 3.3.3) zu beobachten (Daten nicht gezeigt). An dieser Stelle wird der Verlauf des DNA-Gehalts dargestellt (Abbildung 31), um Wachstum und Produktion miteinander vergleichen zu können.

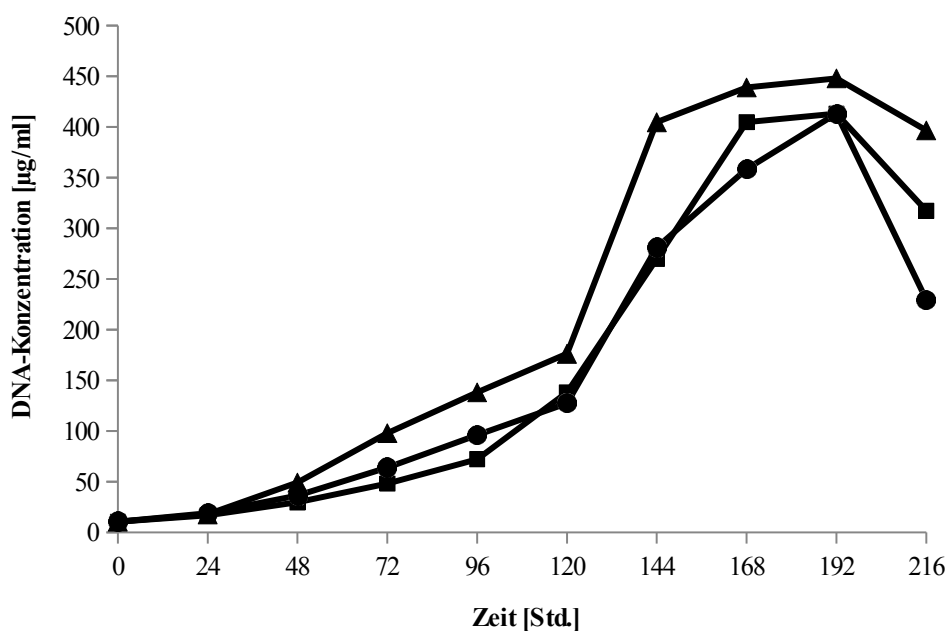


Abbildung 31: DNA-Konzentration in den Fermentationsansätzen mit unterschiedlich behandelten Vorkulturen zu verschiedenen Kultivierungszeitpunkten; ●, 24/48 Std.-Schüttel-/Stand-Vorkultur; ▲, 48/24 Std.-Schüttel-/Stand-Vorkultur; ■, 72-Std. Schüttel-Vorkultur

Der Verlauf des DNA-Gehalts in den drei Fermentern war nahezu identisch. Innerhalb der ersten 120 Stunden gab es einen flachen Anstieg von ca. 10 µg/ml auf 130 bis 170 µg/ml, welcher anschließend deutlich steiler verlief. Dabei erhöhten sich die Werte unter Verwendung der 24/48 Stunden- bzw. 72 Stunden-Vorkulturen bis auf ca. 410 µg/ml, im Ansatz mit der 48/24 Stunden-Vorkultur bis auf ca. 450 µg/ml.

3.5 Isolierung und Charakterisierung der Dermacozine

Die Isolierung der Zielsubstanzen erfolgte stets nach derselben Strategie. Im Folgenden wird das allgemeine Schema beschrieben, das für die Isolierung der Dermacozine K, L, P, W, Z, RT 2.3, RT 3.37, RT 4.6 bzw. RT 6.8 angewendet wurde. Abweichungen sind im Einzelfall näher erläutert.

Alle Produktionsfermentationen wurden in 10 Liter-Blattrührfermentern entsprechend der unter 2.2.2.3 angegebenen Bedingungen durchgeführt. Zum Zeitpunkt der höchsten Produktion wurden die Kulturen geerntet. Die Zellmasse wurde verworfen, da sich gezeigt hatte, dass die Zielsubstanzen fast ausschließlich im Kulturfiltrat vorlagen (vgl. 3.1).

Der Kulturüberstand wurde an einer Amberlite XAD-16-Säule chromatographiert, die Elution der Dermacozine erfolgte dabei mit 60 % MeOH in 10 bis 15 Fraktionen zu je 500 ml. Die Fraktionen mit den Zielsubstanzen wurden vereinigt und am Rotationsverdampfer zum Wässrigen eingengt. Der Rückstand wurde mit HCl bzw. NaOH auf pH 4 eingestellt und mehrfach mit Ethylacetat extrahiert. Die Extrakte wurden vereinigt und am Rotationsverdampfer zur Trockene konzentriert. Anschließend erfolgte die Trennung an einer LiChroprep Diol-Säule. Hierzu wurden die in apolaren Lösungsmitteln schlecht löslichen Extrakte in 50 ml Aceton gelöst, mit dem gleichen Volumen des Säulenmaterials versetzt, am Rotationsverdampfer zur Trockene eingengt und auf eine in DCM aufgeschlämmte LiChroprep Diol-Säule aufgetragen. Die Chromatographie erfolgte in einem vierstündigen Gradienten von DCM zu DCM-MeOH (9 + 1). Die Fraktionen wurden mittels HPLC-DAD analysiert (siehe 2.2.9), die Wertfraktionen vereinigt und am Rotationsverdampfer zur Trockene eingengt. Weitere Isolierungen der Dermacozine erfolgten an Sephadex LH-20-Säulen (siehe 2.2.10.3) gefolgt von einer Ausschlusschromatographie an Fractogel TSK HW-40 F (siehe 2.2.10.3). Die Dermacozine, die bis zu diesem Isolierungs-

schritt nicht als Reinsubstanzen vorlagen, wurden mittels präparativer RP-HPLC gereinigt (siehe 2.2.10.4). Die einzelnen Isolierungsschritte sind in Abbildung 32 veranschaulicht.

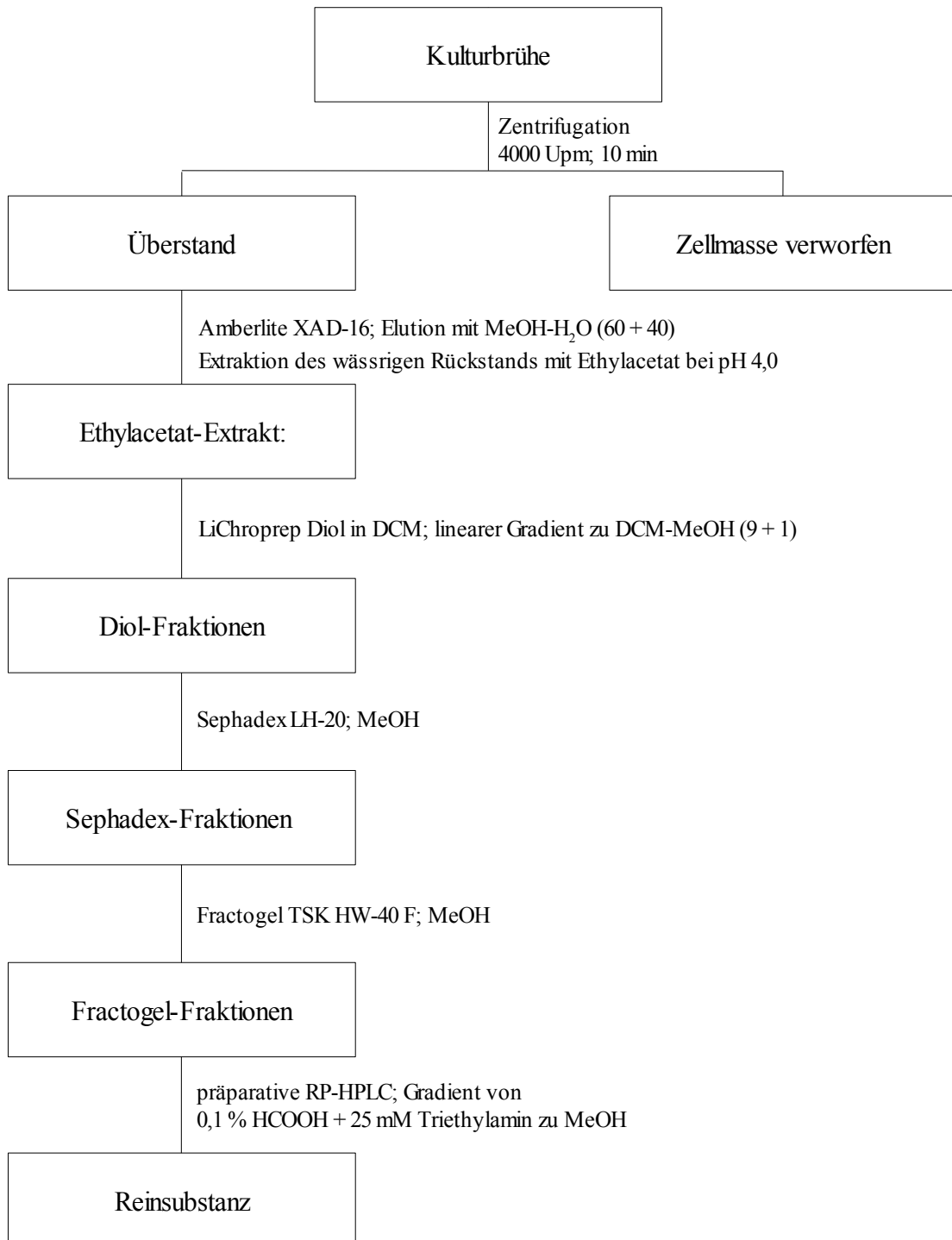


Abbildung 32: Isolierung und Reinigung der Dermacozine

Die Bilanzierung der einzelnen Isolierungsschritte aller Zielsubstanzen erfolgte mittels Peakflächenrückrechnung. Hierzu wurde jede Reinsubstanz in einer definierten Konzentration mittels HPLC-DAD analysiert und die Peakfläche bei einer bestimmten Wellenlänge bestimmt. Anhand dieser Werte konnte die Konzentration im Kulturfiltrat bzw. in den einzelnen Eluaten berechnet werden. Mittels ESI-MS wurden die molaren Massen der Dermacozone ermittelt; die Bestimmung der exakten Massen erfolgte mittels FT-ICR-MS. Die Strukturen wurden mittels ^1H - und ^{13}C -NMR- sowie zweidimensionaler NMR-Spektrometrie in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Jaspars, Department of Chemistry, University of Aberdeen, aufgeklärt. Im Folgenden wird die Isolierung und Charakterisierung der Dermacozone K, L, P, W, Z, RT 2.3, RT 3.37, RT 4.6 sowie RT 6.8 beschrieben.

3.5.1 Isolierung und Charakterisierung von Dermacozin K

Dermacozin K wurde bereits nach der Chromatographie an Sephadex LH-20 als Reinsubstanz gewonnen. Die Berechnung der Substanzmenge nach jedem Isolierungsschritt erfolgte bei 260 nm. Die Ergebnisse sind in Tabelle 32 dargestellt. Im Kulturfiltrat lag Dermacozin K in einer Konzentration von 7,6 mg/l vor.

Tabelle 32: Bilanzierung der Isolierung von Dermacozin K

Zustand	Substanzmenge [mg]	Ausbeute [%]
Kulturüberstand (7 Liter)	54,6	100
XAD-16-Eluat und Ethylacetat-Extrakt	17,2	31,5
LiChroprep Diol-Eluat	8,6	15,8
Sephadex LH-20-Eluat	8,0	14,5

Dermacozin K besitzt eine Masse von 386 g/mol, die Summenformel lautet $\text{C}_{22}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_3$. Die UV-Vis-Maxima liegen bei 257, 515, 307 und 373 nm mit einer Schulter bei 237 nm (Abbildung 33). Die Struktur von Dermacozin K ist in Abbildung 42 dargestellt.

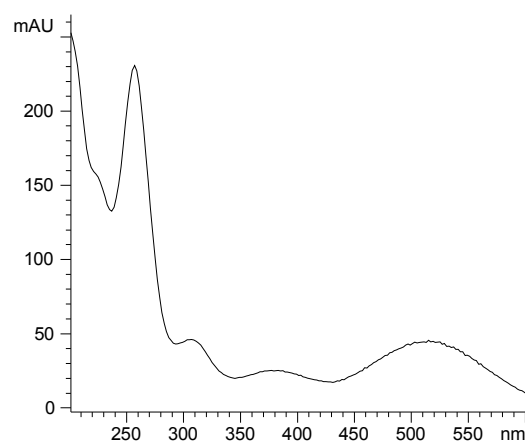


Abbildung 33: UV-Vis-Spektrum von Dermacozin K

3.5.2 Isolierung und Charakterisierung von Dermacozin L

Für die Isolierung von Dermacozin L als Reinsubstanz waren alle in Abbildung 32 aufgeführten Reinigungsschritte notwendig. Die Bilanzierung der Reinigung erfolgte bei 280 nm und ist in Tabelle 33 aufgeführt. Dermacozin L lag nach Rückrechnung über die Bestimmung der Peakfläche in einer Konzentration von 6,7 mg/l vor.

Tabelle 33: Bilanzierung der Isolierung von Dermacozin L

Zustand	Substanzmenge [mg]	Ausbeute [%]
Kulturüberstand (8 Liter)	53,6	100
XAD-16-Eluat und Ethylacetat-Extrakt	40,0	74,4
LiChrorep Diol-Eluat	12,6	23,5
Sephadex LH-20-Eluat	6,7	12,5
Fractogel TSK HW-40 F-Eluat	4,1	7,6
Eluat aus der präparativen RP-HPLC	3,7	7,0

Die Summenformel von Dermacozin L lautet $C_{22}H_{16}N_2O_5$, die Masse beträgt 388 g/mol. Maxima im UV-Vis-Spektrum sind bei 219, 239, 295 und 437 nm zu verzeichnen (vgl. Abbildung 34). Die Strukturformel von Dermacozin L ist in Abbildung 42 dargestellt.

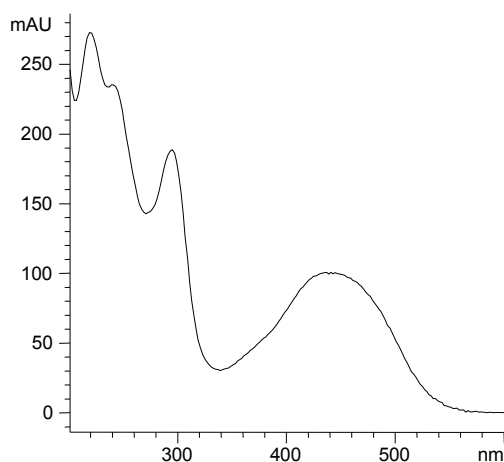


Abbildung 34: UV-Vis-Spektrum von Dermacozin L

3.5.3 Isolierung und Charakterisierung von Dermacozin P

Dermacozin P wurde von der Amberlite XAD-16-Säule mit 80 % MeOH in zehn Fraktionen zu je 500 ml sowie mit 100 % MeOH in fünf Fraktionen zu je 1 l eluiert. Die 15 Fraktionen wurden vereinigt und am Rotationsverdampfer zum Wässrigen eingengt. Nach fünffacher Extraktion mit Ethylacetat wurden die Extrakte vereinigt und am Rotationsver-

dampfer zur Trockene konzentriert. Anschließende Reinigungsschritte mittels Sephadex LH-20, Fractogel TSK HW-40 F (siehe 2.2.10.3) und präparativer RP-HPLC (siehe 2.2.10.4) ergaben 0,9 mg Reinsubstanz. Eine Bilanzierung der Reinigung konnte aufgrund der schlechten Löslichkeit und der minimalen isolierten Menge nicht vorgenommen werden.

Die Masse von Dermacozin P wurde auf 490 g/mol, die Summenformel auf $C_{29}H_{22}N_4O_4$ festgelegt. Die UV-Vis-Maxima lagen bei 257, 283, 308, 523 und 374 nm mit einer Schulter bei 227 nm (vgl. Abbildung 35).

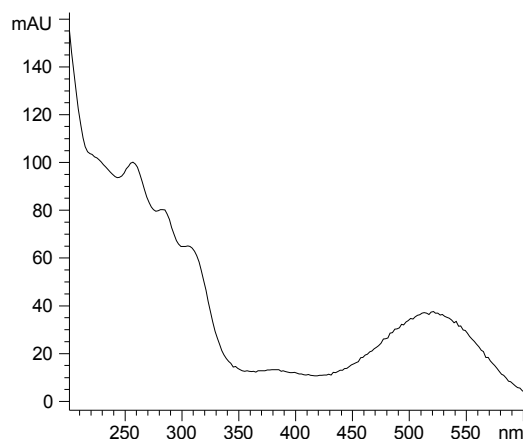


Abbildung 35: UV-Vis-Spektrum von Dermacozin P

Für Dermacozin P konnte aufgrund der zu geringen Menge und der Instabilität der Substanz noch keine Struktur ermittelt werden.

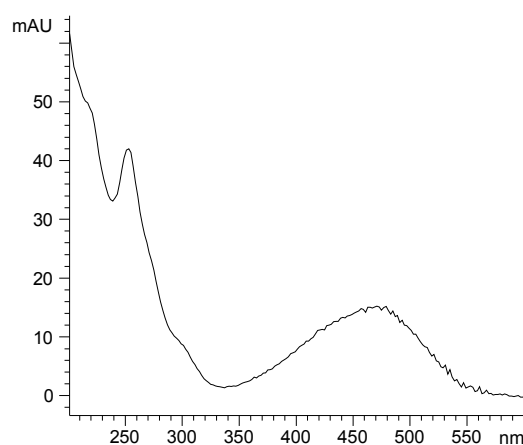
3.5.4 Isolierung und Charakterisierung von Dermacozin W

Dermacozin W wurde nach der präparativen RP-HPLC als Reinsubstanz gewonnen. Die Berechnung der in den Extrakten bzw. Wertfraktionen enthaltenen Substanzmengen erfolgte bei 260 nm. Die Bilanzierung ist in Tabelle 34 aufgeführt. Im Kulturfiltrat lag Dermacozin W in einer Konzentration von 5,4 mg/l vor.

Tabelle 34: Bilanzierung der Isolierung von Dermacozin W

Zustand	Substanzmenge [mg]	Ausbeute [%]
Kulturüberstand (30 Liter)	160,5	100
XAD-16-Eluat und Ethylacetat-Extrakt	88,3	55,0
LiChroprep Diol-Eluat	45,7	28,5
Sephadex LH-20-Eluat	13,3	8,3
Fractogel TSK HW-40 F-Eluat	8,8	5,5
Eluat aus der präparativen RP-HPLC	8,0	5,0

Für Dermacozin W wurde eine Masse von 415 g/mol ermittelt. Die Summenformel lautet $C_{23}H_{17}N_3O_5$. Das UV-Vis-Spektrum (Abbildung 36) lässt Maxima bei 251 und 471 nm mit zwei Schultern bei 216 und 307 nm erkennen. Die Aufklärung der Struktur von Dermacozin W ist zur Zeit in Bearbeitung.

**Abbildung 36: UV-Vis-Spektrum von Dermacozin W**

3.5.5 Isolierung und Charakterisierung von Dermacozin Z

Dermacozin Z wurde durch Chromatographie mittels präparativer RP-HPLC als Reinsubstanz gewonnen. Die Berechnung der Dermacozin Z-Konzentration erfolgte mittels Peakflächenrückrechnung bei 260 nm (Tabelle 35). Die Substanz war im Kulturfiltrat in einer Konzentration von 4,3 mg/l zu finden.

Tabelle 35: Bilanzierung der Isolierung von Dermacozin Z

Zustand	Substanzmenge [mg]	Ausbeute [%]
Kulturüberstand (15 Liter)	64,0	100
XAD-16-Eluat und Ethylacetat-Extrakt	51,7	80,8
LiChroprep Diol-Eluat	19,3	30,2
Sephadex LH-20-Eluat	19,2	30,0
Fractogel TSK HW-40 F-Eluat	12,8	20,0
Eluat aus der präparativen RP-HPLC	12,0	18,8

Für Dermacozin Z wurde eine Masse von 547 g/mol und eine Summenformel von $C_{27}H_{24}N_5O_6S$ bestimmt. UV-Vis-Maxima wurden bei 249, 297 und 435 nm mit einer Schulter bei 215 nm identifiziert (vgl. Abbildung 37). Die Struktur von Dermacozin Z wurde bereits aufgeklärt und ist in Abbildung 42 gezeigt.

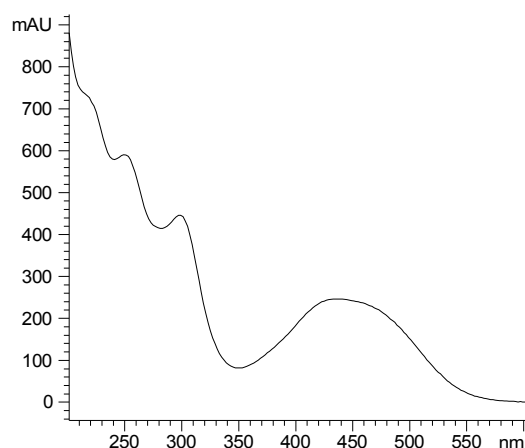


Abbildung 37: UV-Vis-Spektrum von Dermacozin Z

3.5.6 Isolierung und Charakterisierung von Dermacozin RT 2.3

Die Reinigung von Dermacozin RT 2.3 folgte dem in Abbildung 32 gezeigten Schema bis zur Chromatographie an Fractogel TSK-HW 40 F, woraufhin nochmals an Sephadex LH-20 getrennt wurde. Nach dieser Trennung lag Dermacozin RT 2.3 als Reinsubstanz vor. Die Bilanzierung der Reinigung mittels Peakflächenrückrechnung erfolgte bei 260 nm und konnte aufgrund von Peak-Überlagerungen im HPLC-Chromatogramm erst ab der ersten Sephadex LH-20-Säule durchgeführt werden.

Tabelle 36: Bilanzierung der Isolierung von Dermacozin RT 2.3

Zustand	Substanzmenge [mg]	Ausbeute [%]
1. Sephadex LH-20-Eluat	6,2	(100)
Fractogel TSK HW-40 F-Eluat	5,1	(82,3)
2. Sephadex LH-20-Eluat	4,5	(72,6)

Dermacozin RT 2.3 hat eine Masse von 414 g/mol. Die Bestimmung der exakten Masse und Summenformel sowie die Aufklärung der Struktur ist zur Zeit noch in Bearbeitung. UV-Vis-Maxima sind bei 219, 261, 350 und 427 nm zu finden (Abbildung 38).

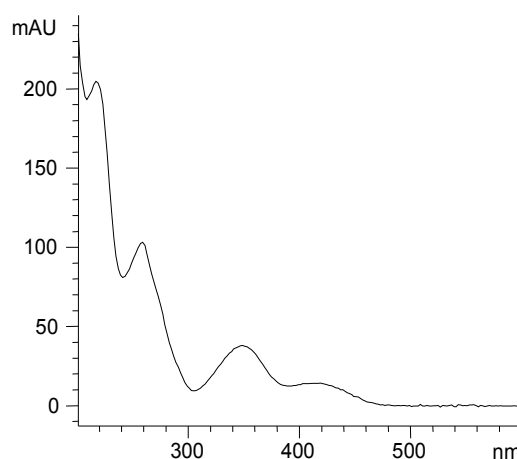


Abbildung 38: UV-Vis-Spektrum von Dermacozin RT 2.3

3.5.7 Isolierung und Charakterisierung von Dermacozin RT 3.37

Dermacozin RT 3.37 lag nach der Chromatographie an Fractogel TSK-HW 40 F in reiner Form vor. Nach Rückrechnung über die Bestimmung der Peakfläche im HPLC-Chromatogramm bei 280 nm betrug die Konzentration im Fermentationsansatz 6,4 mg/l. Tabelle 37 zeigt die in den einzelnen Reinigungsschritten isolierten Substanzmengen.

Tabelle 37: Bilanzierung der Isolierung von Dermacozin RT 3.37

Zustand	Substanzmenge [mg]	Ausbeute [%]
Kulturüberstand (19 liter)	121,5	100
XAD-16-Eluat und Ethylacetat-Extrakt	70,5	57,6
LiChroprep Diol-Eluat	14,0	11,5
Sephadex LH-20-Eluat	6,7	5,5
Fractogel TSK HW-40 F-Eluat	5,6	5,3

Die Masse von Dermacozin RT 3.37 beträgt 311 g/mol, die Summenformel lautet $C_{16}H_{13}N_3O_4$. UV-Vis-Maxima liegen bei 215, 295 und 450 nm mit drei Schultern bei 247, 421 und 359 nm (vgl. Abbildung 39). Abbildung 42 zeigt die Strukturformel der Substanz.

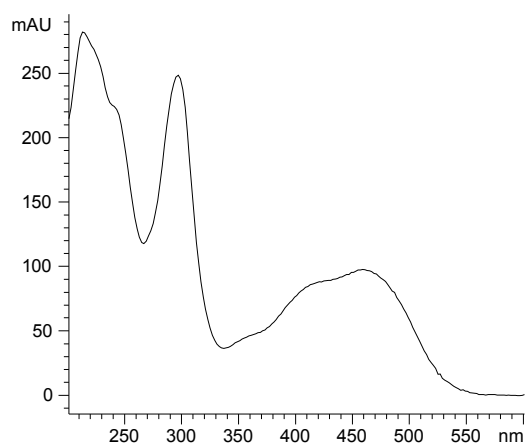


Abbildung 39: UV-Vis-Spektrum von Dermacozin RT 3.37

3.5.8 Isolierung und Charakterisierung von Dermacozin RT 4.6

Die Isolierung von Dermacozin RT 4.6 erfolgte entsprechend dem in Abbildung 32 gezeigten Schema. Es wurden 12,8 mg Reinsubstanz isoliert. Eine Bilanz über die isolierten Substanzmengen der einzelnen Reinigungsschritte konnte jedoch nicht erstellt werden, da Dermacozin RT 4.6 sehr instabil war. Die Substanz wurde direkt nach dem Trocknen am Rotationsverdampfer mit Stickstoff begast und bei -20 °C gelagert. Für die Substanz wurde eine Masse von 408 g/mol bestimmt. Bisher liegen noch keine Daten über die Summen- bzw. Strukturformel vor. Was das UV-Vis-Spektrum anbelangt, sind Maxima bei 219, 297 und 455 nm sowie zwei Schultern bei 235 und 423 nm zu verzeichnen (vgl. Abbildung 40).

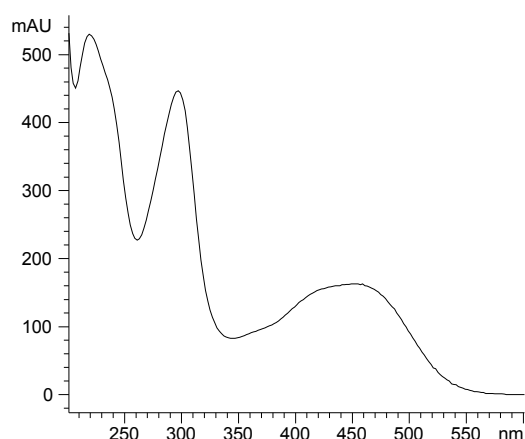


Abbildung 40: UV-Vis-Spektrum von Dermacozin RT 4.6

3.5.9 Isolierung und Charakterisierung von Dermacozin RT 6.8

Die Isolierung von Dermacozin RT 6.8 folgte dem in Abbildung 32 gezeigten Schema. Nach der präparativen RP-HPLC wurden 1,2 mg Reinsubstanz erhalten. Aufgrund der Instabilität der Substanz konnten die Bilanzierung und FT-ICR- sowie NMR-Analysen nicht durchgeführt werden.

Die Masse von Dermacozin RT 6.8 beträgt 409 g/mol. Die UV-Vis-Maxima liegen bei 225, 295 und 437 nm mit einer Schulter bei 231 nm (vgl. Abbildung 41).

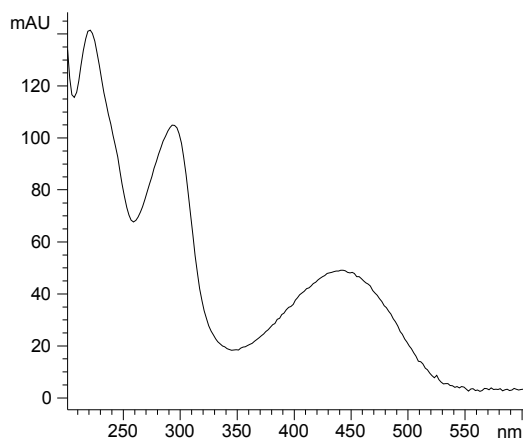


Abbildung 41: UV-Vis-Spektrum von Dermacozin RT 6.8

3.5.10 Zusammenfassung und Charakterisierung der isolierten Dermacozone

In dieser Arbeit wurden insgesamt neun Substanzen isoliert, die aufgrund der HPLC-ESI-MS- und UV-Vis-Daten als Phenazin-Derivate identifiziert wurden (siehe unten). Davon sind die Dermacozone K, L und Z sowie RT 3.37 vollständig chemisch charakterisiert. Die Strukturformeln sind in Abbildung 42 gezeigt.

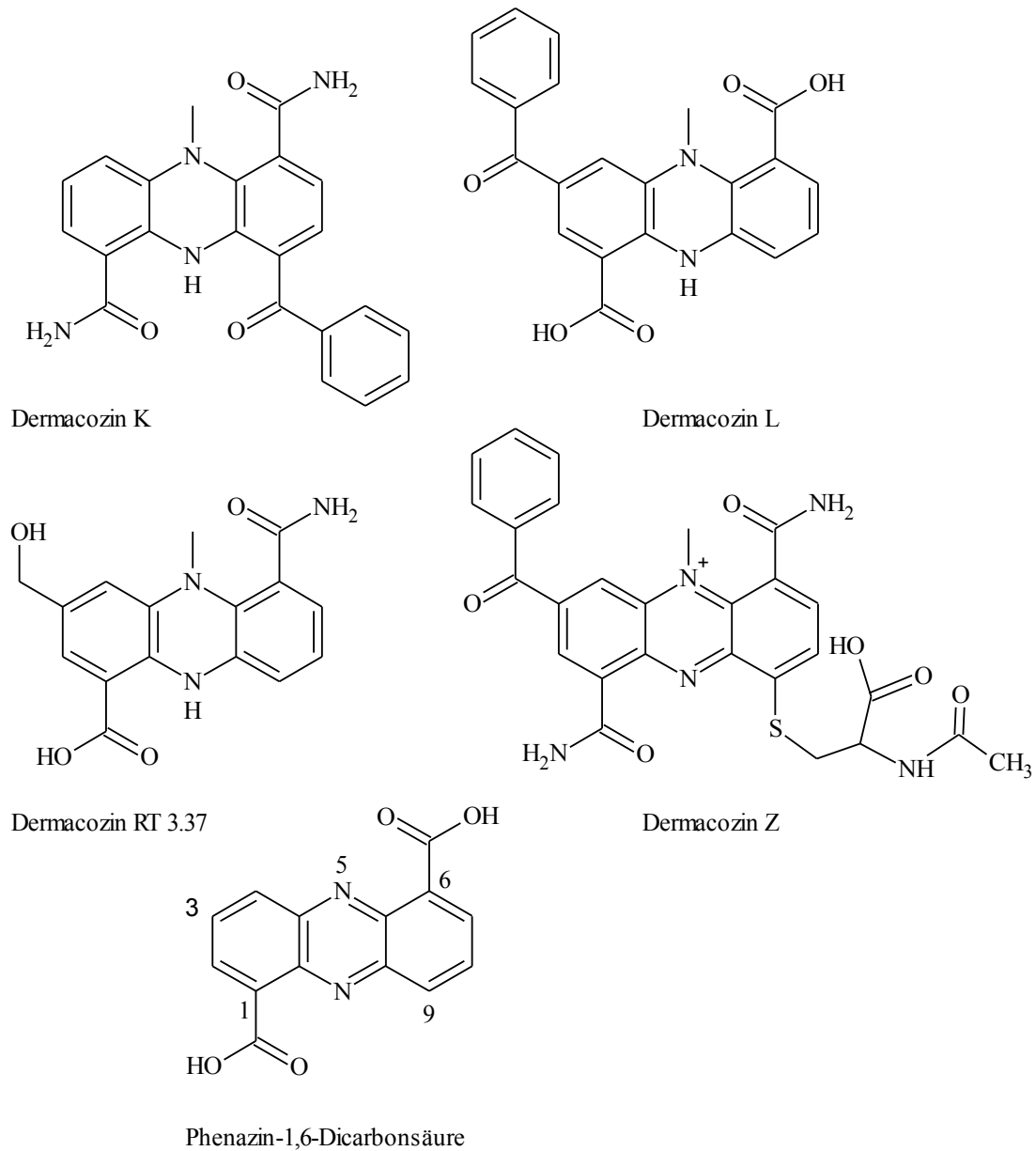


Abbildung 42: Strukturformeln der in dieser Arbeit isolierten Dermacozone im Vergleich zur Phenazin-1,6-Dicarbonsäure

Bei allen Substanzen handelt es sich um Phenazin-1,6-Dicarbonsäure-Derivate (vgl. 1.5.1), wobei das Stickstoffatom an Position 5 des Heterozyklus methyliert ist und die Carboxyl-Gruppen z. T. amidiert vorliegen. Des Weiteren wurden für die Dermacozine K, L und Z die typischen aromatischen Additionen am Phenazin-Grundkörper gefunden (C₃ bzw. C₉, vgl. Abbildung 42). Dermacozin RT 3.37 stellt hierbei eine Ausnahme dar, da sich anstelle des aromatischen Restes an C₃ eine Ethyl-Gruppe befindet.

Dermacozin L weist zwei Carboxyl-Gruppen (C₁ und C₆) auf, wohingegen diese bei Dermacozin K und Z in amidierter Form vorliegen. Dermacozin RT 3.37 enthält sowohl eine Carboxyl- (C₁) als auch eine Carboxamid-Gruppe (C₆). Dermacozin Z stellt die erste Komponente dieser Phenazin-Familie dar, die einen schwefelhaltigen Seitenrest enthält. Es handelt sich dabei um N-Acetyl-Cystein, das über eine Thioetherbindung an den Grundkörper (C₉) gebunden ist.

Die Arbeiten an Dermacozin P und RT 6.8 wurden aufgrund der geringen Verfügbarkeit, unzureichenden Löslichkeit und der hohen Instabilität der Substanz eingestellt. Die Strukturaufklärung der Dermacozine W, RT 2.3 und RT 4.6 ist momentan noch in Bearbeitung. Eine Zusammenstellung aller bislang charakterisierten Dermacozine ist in Tabelle 38 gezeigt. Die Dermacozine A - G wurden bereits in einer früheren Arbeit beschrieben [ABDELMAGEED *et al.*, 2010]. Dermacozin I wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Jaspars isoliert (unveröffentlichte Daten), wobei noch keine Struktur vorliegt.

Tabelle 38: Bezeichnung und Charakteristika aller bislang isolierten Dermacozine

Dermacozin	Formel	Molekulargewicht [g/mol]	Exakte Masse [g/mol]	Farbe
A	C ₁₅ H ₁₄ N ₄ O ₂	282	282,1107	orange
B	C ₂₂ H ₁₈ N ₄ O ₃	386	386,1276	orange
C	C ₂₂ H ₁₇ N ₃ O ₄	387	387,121502	orange
D	C ₂₄ H ₁₉ N ₃ O ₅	429	429,12714	gelb
E	C ₂₃ H ₁₆ N ₄ O ₃	396	396,1217	blau
F	C ₂₃ H ₁₅ N ₃ O ₄	397	397,3971056	blau
G	C ₂₃ H ₁₆ N ₃ O ₅	413	413,101092	blau
I	C ₁₈ H ₁₃ N ₃ O ₃	319	319,1334	rot
K	C ₂₂ H ₁₈ N ₄ O ₃	386	-	pink
L	C ₂₂ H ₁₆ N ₂ O ₅	388	388,097548	orange
P	C ₂₉ H ₂₂ N ₄ O ₄	490	490,16339	pink
W	C ₂₃ H ₁₇ N ₃ O ₅	415	415,108447	orange
Z	C ₂₇ H ₂₄ N ₅ O ₆ S	547	547,144832	gelb-orange
RT 2.3	-	414	-	orange
RT 3.37	C ₁₆ H ₁₃ N ₃ O ₄	311	-	orange
RT 4.6	-	408	-	orange
RT 6.8	-	409	-	orange

Bei der Isolierung der neun Dermacozine aus *Dermacoccus* sp. MT 1.2 wurden mittels HPLC-DAD 26 weitere Sekundärmetabolite entdeckt, für die keine Übereinstimmung in der UV-Vis-Bibliothek der Arbeitsgruppe Fiedler (933 Einträge) [FIEDLER, 1993] gefunden wurde. Anhand der UV-Vis-Spektren (Abbildung 43) wurden diese Substanzen ebenfalls als Phenazinderivate eingeordnet. Von 15 dieser Substanzen konnte die Masse mittels HPLC-ESI-MS ermittelt werden (Tabelle 39).

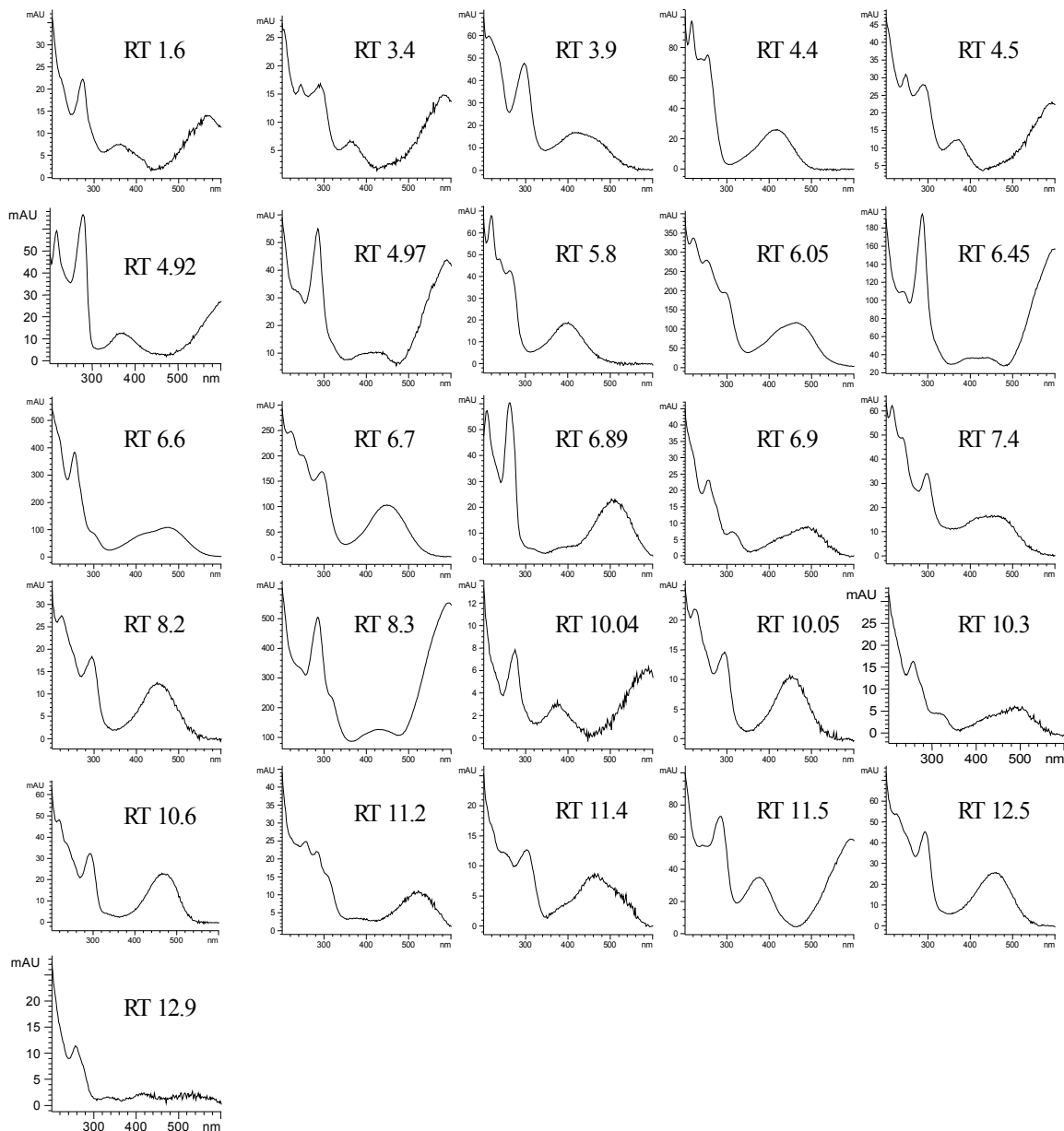


Abbildung 43: UV-Vis-Spektren von 26 unbekanntem Dermacozin-Derivaten aus *Dermacoccus* sp. MT 12.

Tabelle 39: Molekulargewichte von 15 unbekanntem Dermacozin-Derivaten aus *Dermacoccus* sp. MT 1.2

Dermacozin	Molekulargewicht [g/mol]
RT 10.04	503
RT 10.6	519
RT 11.4	504
RT 12.5	492
RT 3.4	557
RT 4.97	557
RT 6.05	548
RT 6.45	558
RT 6.6	414
RT 6.7	548
RT 6.89	309
RT 6.9	576
RT 7.4	403
RT 8.2	549
RT 8.3	559

3.6 Biologische Aktivität der isolierten Dermacozine

Die in dieser Arbeit als Reinsubstanzen isolierten Dermacozine wurden auf ihre biologische Aktivität überprüft. Dabei wurde ihre antibiotische, antitumorale, enzyminhibierende und antioxidative Wirkung getestet.

3.6.1 Antibakterielle und antifungische Wirkung

Die Dermacozine K, L, W und Z wurden im Agardiffusionstest auf ihre antibakterielle und antifungische Wirkung hin untersucht; die anderen Dermacozine konnten aufgrund der zu geringen isolierten Substanzmengen nicht getestet werden. In Konzentrationen von 0,1, 0,3 bzw. 1 mg/ml zeigte keines der untersuchten Dermacozine eine Aktivität gegenüber den bakteriellen Testorganismen *Bacillus subtilis*, *Brevibacillus brevis*, *Escherichia coli*, *Mycobacterium phlei*, *Pseudomonas fluorescens* bzw. *Staphylococcus aureus* sowie gegen die Pilze *Botrytis cinerea* bzw. *Saccharomyces cerevisiae*. Im Mikrotiterplattentest war bei einer Dermacozin-Konzentration von 100 µM zudem keine antibakterielle Wirkung gegenüber *Bacillus subtilis*, *Propionibacterium aeruginosa*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus lentus* oder *Xanthomonas campestris* bzw. keine antifungische Aktivität gegen *Candida glabrata* zu beobachten (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Imhoff, KiWiZ, Kiel).

3.6.2 Antitumor-Wirkung

Die Dermacozone C, L, W und Z, die in ausreichender Menge isoliert worden waren, wurden in Konzentrationen von 10 bzw. 50 μM auf ihre cytotoxische Aktivität gegen die Tumorzelllinien Hep G2 (menschliches Leberepithelkarzinom [MOORE *et al.*, 1955]) und NIH 3T3 (embryonale Fibroblasten der Maus [TODARO & GREEN, 1963]) getestet (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Imhoff, KiWiZ, Kiel). Dabei zeigten die Dermacozone C, L und Z keinerlei Wirkung. Dermacozone W inhibierte in einer Konzentration von 50 μM das Zellwachstum der NIH 3T3-Zellen um 22 %.

3.6.3 Enzymhemmende Wirkung

Des Weiteren wurde überprüft, ob die Dermacozone C, L, W und Z eine inhibitorische Aktivität gegenüber bestimmten Enzymen aufweisen (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Imhoff); die anderen Dermacozone wurden aufgrund der zu geringen isolierten Substanzmengen nicht getestet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 40 aufgeführt.

Tabelle 40: Enzymaktivität nach Zugabe von Dermacozone C, L, W bzw. Z

Enzym	Enzymaktivität [%] nach Zugabe von			
	Dermacozone C	Dermacozone L	Dermacozone W	Dermacozone Z
Acetylcholinesterase	64 %	79 %	100 %	100 %
Phosphodiesterase 4	69 %	78 %	77 %	68 %
Reverse Transkriptase	100 %	100 %	100 %	100 %

In einer früheren Studie war für Dermacozone C eine enzymhemmende Wirkung nachgewiesen worden [WAGNER, 2009], daher wurde diese Substanz hier als Kontrolle eingesetzt. Die Hemmung der Acetylcholinesterase und der Phosphodiesterase 4 konnte dabei bestätigt werden (Inhibition der Enzymaktivität um 36 bzw. 31 %, vgl. Tabelle 40). Dermacozone L hemmte in einer Konzentration von 10 μM ebenfalls beide Enzyme, allerdings lag die Wirkung mit 21 bzw. 22 % Inhibition etwas niedriger. Die Dermacozone W und Z hemmten ausschließlich die Phosphodiesterase 4 um 23 % bzw. 32 %.

3.6.4 Antioxidative Wirkung

Da Phenazine gute Radikalfänger sind [LAURSEN & NIELSEN, 2004], wurden die Dermacozine K, L, W, Z, RT 3.37 und RT 4.6 mittels DPPH-Assay (vgl. 2.2.12.4) auf ihre antioxidative Aktivität hin untersucht; die anderen Substanzen wurden aufgrund zu geringer isolierter Mengen nicht getestet. Als Kontrolle wurde das natürliche Antioxidans Ascorbinsäure verwendet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 41 aufgeführt.

Tabelle 41: Antioxidative Wirkung der Dermacozine K, L, W, Z, RT 3.37 und RT 4.6

Substanz	IC ₅₀ [µM]
Dermacozin K	34,6
Dermacozin L	14,0
Dermacozin W	36,6
Dermacozin Z	19,6
Dermacozin RT 3.37	18,8
Dermacozin RT 4.6	10,7
Ascorbinsäure	12,5

Dermacozin RT 4.6 wies mit einem IC₅₀-Wert von 10,7 µM die beste antioxidative Aktivität auf, gefolgt von Dermacozin L (14 µM), Dermacozin RT 3.37 (18,8 µM) und Dermacozin Z (19,6 µM). Die Dermacozine K und W zeigten nur eine geringe Radikalfänger-Eigenschaft (IC₅₀ von 34,6 bzw. 36,6 µM).

3.7 Identifizierung des Dermacozin-Genclusters

3.7.1 Erstellung und Screening einer Genbibliothek

Mit Hilfe einer Genbibliothek sollte das Dermacozin-Gencluster identifiziert werden. Dazu wurde die genomische DNA von *Dermacoccus* MT 1.2 zunächst mit dem Restriktionsenzym *Sau3AI* in Teilstücke gespalten. Das Enzym erkennt die Sequenz „GATC“ und spaltet vor dem „G“. Statistisch kommt diese Konsensussequenz alle 256 bp vor [HÉNAUT *et al.*, 1996]. Bislang identifizierte Phenazin-Gencluster umfassen ca. 15 - 20 kb [MENTEL *et al.*, 2009]. Um sicherzugehen, dass das zu klonierende Dermacozin-Gencluster alle Gene enthält, sollten in Vorversuchen Reaktionsbedingungen ermittelt werden, die in ca. doppelt so großen DNA-Fragmenten resultieren. Dabei wurden verschiedene Konzentrationen von *Sau3AI* getestet, die Enzymreaktion nach unterschiedlichen Reaktionszeiten

gestoppt (vgl. 2.2.14.1) und die Produkte mittels Gelelektrophorese analysiert (Daten nicht gezeigt). Als optimale Bedingung erwies sich der Verdau von 100 µg genomischer DNA mit 0,1 Units Enzym bei einer Inkubationszeit von 5 - 10 Minuten.

Für die Ligation der verdauten genomischen DNA mit dem Cosmid SuperCos 1 (Vektor-karte siehe Abbildung 55) wurde dieses in zwei Einzelrestriktionen zuerst mit *Xba*I, anschließend mit *Bam*HI verdaut. Das Cosmid wurde dephosphoryliert, um ein Religieren zu verhindern. Der Restriktionsverdau des 7,9 kb großen Cosmids resultierte in zwei Fragmenten von 6,8 kb und 1,1 kb, was den Erwartungen entsprach (Daten nicht gezeigt). Anschließend wurden 5 µg verdaute genomische DNA mit 1 µg geschnittenem Cosmid ligiert und in λ-Phagen verpackt (vgl. 2.2.14.3). Die Verpackung der ligierten Cosmide in Bakteriophagen stellt sicher, dass ausschließlich Cosmide, die größer als 30 kb sind, in *E. coli* übertragen werden, da die Phagen aufgrund ihre natürlichen Beschaffenheit keine kleineren DNA-Moleküle aufnehmen können. Um die Cosmide zu amplifizieren wurden im Anschluss *E. coli* SURE-Zellen mit den λ-Phagen infiziert (vgl. 2.2.14.4), was zur Übertragung der Cosmide in die Zellen führte. Der Transduktionsansatz wurde 1:50 verdünnt und auf insgesamt 80 Agarplatten mit entsprechenden Antibiotika ausplattiert. Somit konnten nur die Zellen wachsen, die ein Cosmid aufgenommen hatten. Durchschnittlich erhielt man 375 Kolonien pro Platte. Da der Ansatz vor dem Ausplattieren 50-fach verdünnt wurde, konnte somit die theoretische Größe der Genbibliothek errechnet werden; diese lag demnach bei ca. 20.000 Klonen.

Die fertiggestellte Genbibliothek wurde anschließend nach Klonen durchsucht, deren aufgenommenes Cosmid das gesamte Dermacozin-Gencluster trägt. Dazu wurden die Kolonien der 80 Agarplatten (s. o.) zunächst mit Hilfe von Samttüchern und Stempel auf neue Agarplatten übertragen. Anschließend wurden die Ursprungskolonien mit je 1 ml LB-Medium abgeschwemmt und in 80 Pools zusammengefasst. Das Screening dieser Pools nach *phzF* erfolgte mittels Kolonie-PCR unter Verwendung spezifischer Primer (siehe 2.2.14.5). Dieses Gen ist essentiell für die Synthese des Phenazin-Grundkörpers, aus dem die Dermacozine bestehen (vgl. 1.5.2). Dabei konnte in 22 der 80 Ansätze ein PCR-Produkt für *phzF* identifiziert werden.

Die Klone von sechs der 22 Agarplatten wurden mit Hilfe steriler Zahnstocher zu je 20 - 40 Kolonien pro Platte auf neue Nährböden überführt. Diese wurden wie oben beschrieben behandelt; die daraus resultierenden 70 Pools wurden erneut mittels Kolonie-PCR analysiert. Hierbei zeigten 20 Pools in einer gelelektrophoretischen Analyse das gewünschte PCR-Produkt. Jede Kolonie dieser ca. 500 Klone wurde einzeln als Templat für

eine weitere Kolonie-PCR verwendet. Dadurch wurden zwölf Klone identifiziert, die auf einem analytischen Agarosegel eine eindeutige Bande für *phzF* zeigten (Daten nicht gezeigt). Aus diesen Klonen wurden die Cosmide (MW_A8, MW_G7, MW_D3, MW_T143, MW_T141, MW_A6, MW_A5, MW_F7, MW_E2, MW_F10, MW_A9 und MW_A5) mittels Phenol-Chloroform-Fällung isoliert und in einer erneuten PCR mit *phzF*-spezifischen Primern überprüft. Die Ergebnisse sind in Abbildung 44 veranschaulicht.

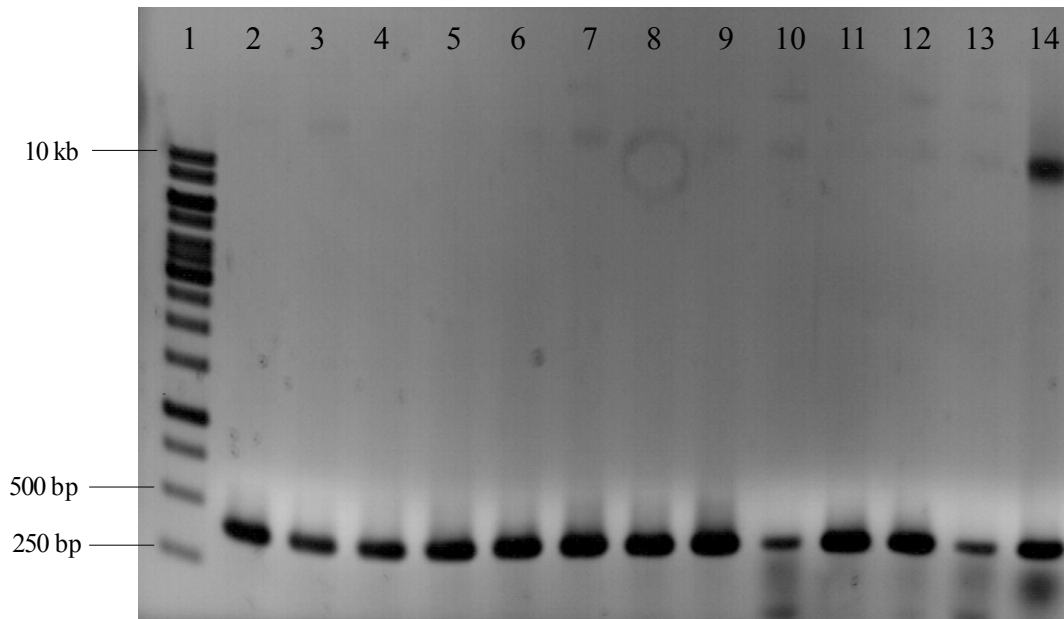


Abbildung 44: Gelelektrophoretische Analyse der Produkte einer PCR zur Amplifizierung von *phzF*
 Spur 1: GeneRuler 1 kb DNA Ladder; Spur 2: Cosmid MW_A8; Spur 3: Cosmid MW_G7; Spur 4: Cosmid MW_D3; Spur 5: Cosmid MW_T143; Spur 6: Cosmid MW_T141; Spur 7: Cosmid MW_A6; Spur 8: Cosmid MW_A5; Spur 9: Cosmid MW_F7; Spur 10: Cosmid MW_E2; Spur 11: Cosmid MW_F10; Spur MW_12: Cosmid MW_A9; Spur 13: Cosmid MW_E5; Spur 14: genomische (gen.) DNA von *D. sp.* MT 1.2

Die erwartete Größe des Produkts aus der Amplifikation eines Teils des *phzF*-Gens mit spezifischen Primern liegt bei ca. 300 bp. Eine ebensolche Bande zeigte sich bei allen zwölf getesteten Klonen (Abbildung 44), d. h. alle tragen das Zielgen.

Zur weiteren Kontrolle wurden die PCR-Produkte der beliebig ausgewählten Cosmide MW_A5 und MW_A8 aus einem Gel aufgereinigt und unter Verwendung *phzF*-spezifischer Primer sequenziert. Die daraus resultierenden Sequenzen wurden mittels BLASTx (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) [ALTSCHUL *et al.*, 1997] mit denen der nr-Datenbank verglichen. Die Sequenzen beider Cosmide waren identisch und bestätigten, dass es sich bei dem PCR-Produkt um das gewünschte Fragment von *phzF* handelt. Da alle anderen PCR-Produkte die gleiche Größe aufwiesen, wurde davon ausgegangen, dass alle zwölf Cosmide *phzF* enthielten.

3.7.2 Auswahl eines Cosmids zur vollständigen Sequenzierung

Eines der zwölf identifizierten Cosmide sollte anschließend komplett sequenziert werden, um die Sequenz des Dermacozin-Genclusters zu erhalten. Die Auswahl dieses Cosmids erfolgte unter verschiedenen Aspekten.

Zum einen wurde untersucht, welche Cosmide neben *phzF* auch das *phzB*-Gen tragen, das ebenfalls eine essentielle Rolle in der Phenazin-Synthese spielt (vgl. 1.5.2). Der Nachweis erfolgte mittels PCR unter Verwendung degenerierter Primer für *phzB*. Für die Positivkontrolle wurde genomische DNA als Templat eingesetzt. Das Ergebnis der PCR ist in Abbildung 45 gezeigt.

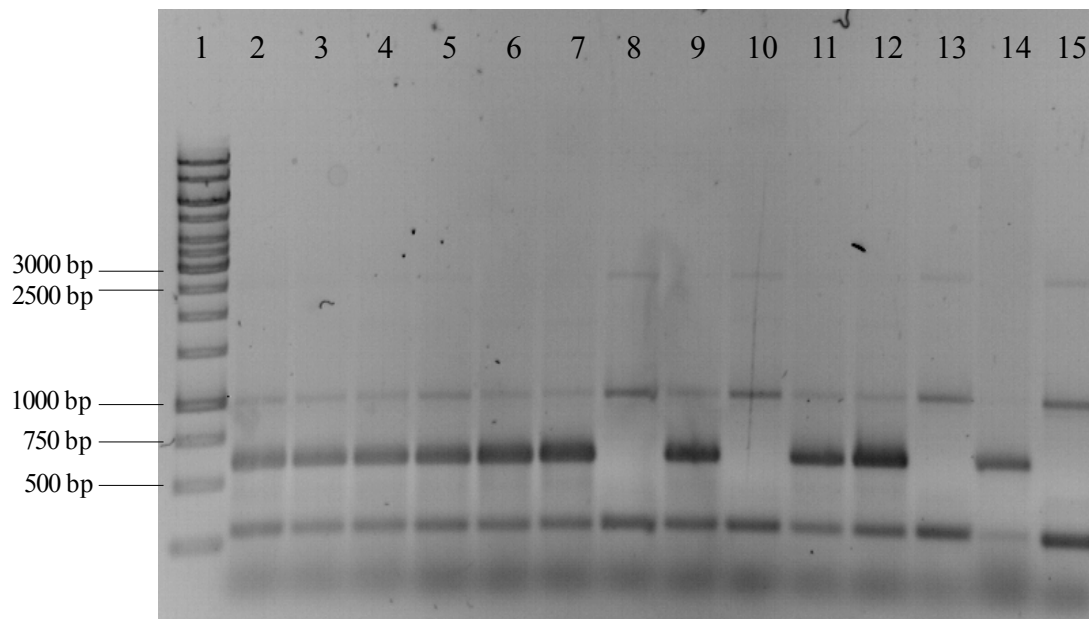


Abbildung 45: Gelelektrophoretische Analyse der Produkte einer PCR zur Amplifizierung von *phzB*

Spur 1: Marker 1 kb DNA-Leiter; Spur 2: Cosmid MW_A8; Spur 3: Cosmid MW_G7; Spur 4: Cosmid MW_D3; Spur 5: Cosmid MW_T143; Spur 6: Cosmid MW_T141; Spur 7: Cosmid MW_A6; Spur 8: Cosmid MW_A5; Spur 9: Cosmid MW_F7; Spur 10: Cosmid MW_E2; Spur 11: Cosmid MW_F10; Spur 12: Cosmid MW_A9; Spur 13: Cosmid MW_E5; Spur 14: gen. DNA von *D. sp. MT 1.2*; Spur 15: SuperCos 1

Für die Amplifizierung von *phzB* unter Verwendung degenerierter Primer (*phzB_fw* und *phzB_rev*) wurde ein PCR-Produkt mit einer Größe von ca. 600 bp erwartet. Dies war mit genomischer DNA von *Dermacoccus sp. MT 1.2* als Templat (Spur 14) sowie bei den Cosmiden MW_A8, MW_G7, MW_D3, MW_T143, MW_T141, MW_F7, MW_A6, MW_F10 und MW_A9 (Spur 2 - 7; 9; 11 - 12) der Fall. Bei den Cosmiden MW_A5, MW_E2 bzw. MW_E5 (Spur 8; 10; 13) konnte kein PCR-Produkt der gewünschten Größe nachgewiesen werden, was darauf hindeutet, dass diese Cosmide nicht das gesamte Gencluster beinhalten. Es sind weitere Banden auf dem Gelbild zu erkennen, die auf unspezifi-

sche Bindung der Primer in der Cosmid-DNA (außerhalb des Inserts) zurückzuführen sind, da sie auch im Kontrollansatz mit leerem SuperCos 1 (Spur 15) zu beobachten sind. Dies ist auf die geringe Annealing-Temperatur von 52 °C und die Verwendung degenerierter Primer zurückzuführen. Zur Überprüfung der Amplifikation von *phzB* wurde das 600 bp-PCR-Produkt aus Spur 14 (genomische DNA als Templat) sowie das eines beliebigen Cosmids (MW_A9, Spur 12) aufgereinigt und mit den Primern *phzB_fw* und *phzB_rev* sequenziert. Eine Analyse der erhaltenen Sequenzen mittels BLASTx bestätigte, dass es sich bei dem Amplifikat um das gewünschte *phzB*-Fragment handelt.

Im nächsten Schritt wurden die zwölf Cosmide mittels Restriktionsanalysen weiter untersucht. Dies diente der Abschätzung der Größe des jeweiligen Inserts, die einen Hinweis über die Vollständigkeit des Genclusters in den Vektoren geben sollte.

Die Cosmide wurden zunächst mit *Bam*HI verdaut (Abbildung 46).

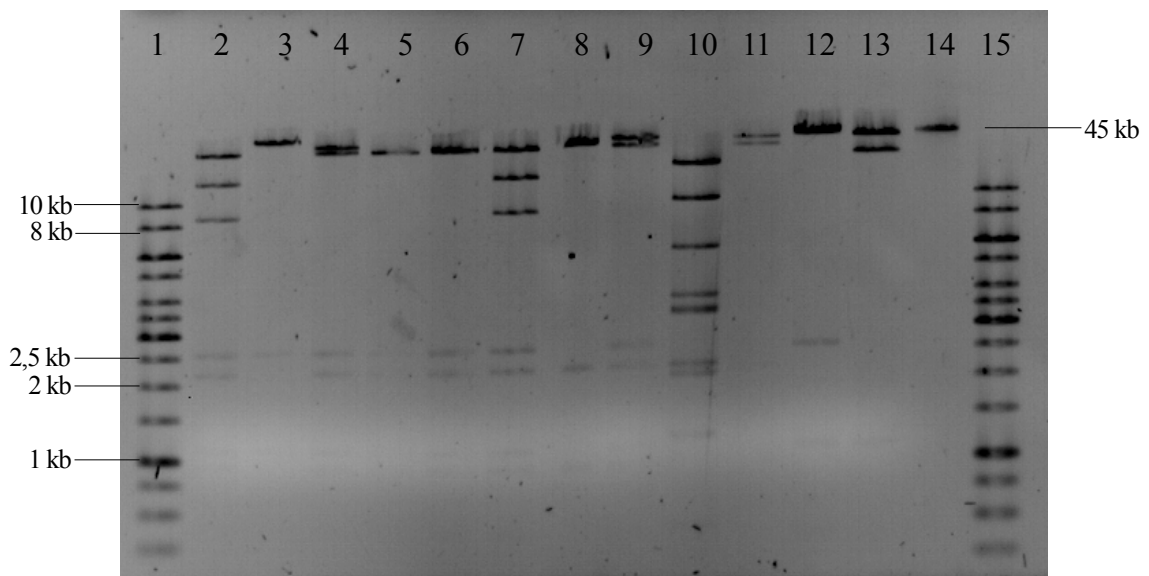


Abbildung 46: Gelelektrophoretische Analyse der Produkte eines Restriktionsverdaus der zwölf Cosmide mit *Bam*HI

Spur 1: GeneRuler 1 kb DNA Ladder; Spur 2: Cosmid MW_A8; Spur 3: Cosmid MW_G7; Spur 4: Cosmid MW_D3; Spur 5: Cosmid MW_T143; Spur 6: Cosmid MW_T141; Spur 7: Cosmid MW_A6; Spur 8: Cosmid MW_A5; Spur 9: Cosmid MW_F7; Spur 10: Cosmid MW_E2; Spur 11: Cosmid MW_F10; Spur 12: Cosmid MW_A9; Spur 13: Cosmid MW_E5; Spur 14: wt λ DNA; Spur 15: GeneRuler 1 kb DNA Ladder

Im Verdau mit *Bam*HI zeigten die Cosmide MW_A8, MW_A6, MW_E2, MW_F10 und MW_E5 (Spur 2; 7; 10; 11; 13) andere Fragmentmuster als die restlichen Cosmide, dabei war das der Cosmide MW_A8 (Spur 2) und MW_A6 (Spur 7) identisch. Die Fragmentgrößen der Cosmide MW_G7, MW_D3, MW_T143, MW_T141, MW_A5, MW_F7 und MW_A9 (Spur 3 - 6; 8 - 9; 12) waren ebenfalls untereinander sehr ähnlich. Eine Bande war etwa auf Höhe des λ DNA-Markers (45 kb), zwei weitere Banden bei etwa 2,2 kb und

2,5 kb zu beobachten, die auch bei den Cosmiden A8 und E5 zu erkennen waren. Weitere schwache Banden zeigten sich bei ca. 1 kb. Die Größen der Cosmide konnten mit diesem Verdau nicht abgeschätzt werden, da sich die Hauptbanden außerhalb des 1 kb Markers befanden.

Zur weiteren Größenbestimmung erfolgte eine Restriktion der Cosmide mit *NcoI* (Abbildung 47).

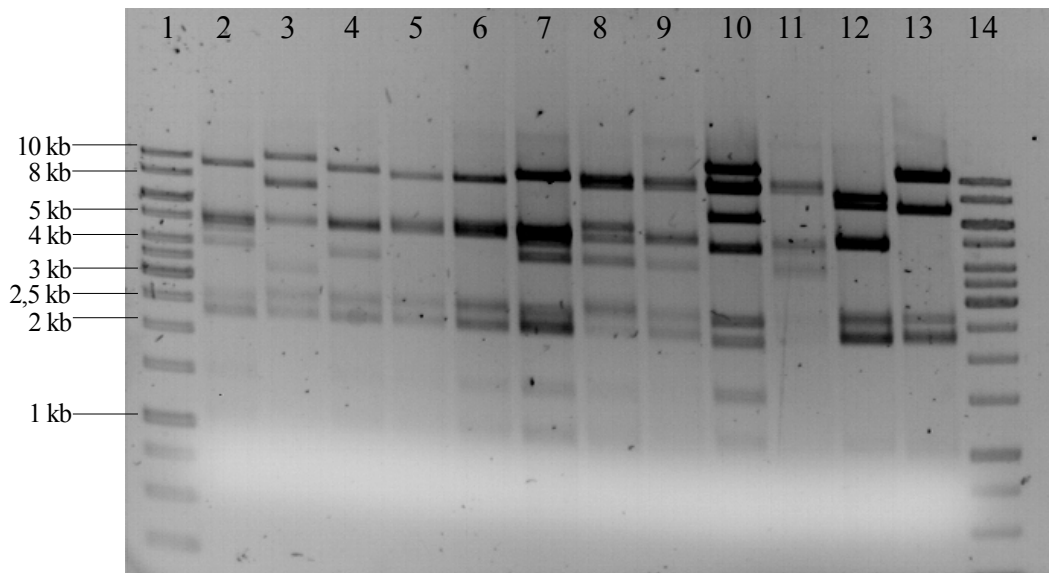


Abbildung 47: Gelelektrophoretische Analyse der Produkte eines Restriktionsverdau der zwölf Cosmide mit *NcoI*

Spur 1: GeneRuler 1 kb DNA Ladder; Spur 2: Cosmid MW_A8; Spur 3: Cosmid MW_G7; Spur 4: Cosmid MW_D3; Spur 5: Cosmid MW_T143; Spur 6: Cosmid MW_T141; Spur 7: Cosmid MW_A6; Spur 8: Cosmid MW_A5; Spur 9: Cosmid MW_F7; Spur 10: Cosmid MW_E2; Spur 11: Cosmid MW_F10; Spur 12: Cosmid MW_A9; Spur 13: Cosmid MW_E5; Spur 14: GeneRuler 1 kb DNA Ladder

Im *NcoI*-Verdau konnten für die Cosmide MW_A8, MW_D3, MW_A6, MW_F7 und MW_F10 (Spur 2; 4; 7; 9; 11) große Ähnlichkeiten bzgl. ihrer Fragmentgrößen und -muster festgestellt werden; die Fragmente der Cosmide T143 (Spur 5) und MW_T141 (Spur 6) waren identisch. Alle Cosmide zeigten zwei identische Banden bei 2 bzw. 3 kb, die vermutlich auf eine Spaltung des Vektors SuperCos 1 außerhalb des Inserts zurückzuführen sind. Die Größen der Cosmide konnten anhand der DNA-Banden auf dem Agarosegel auf ca. 25 - 40 kb festgelegt werden.

Eine weitere Restriktionskartierung der Cosmide wurde mit *SacI* durchgeführt (vgl. Abbildung 48).

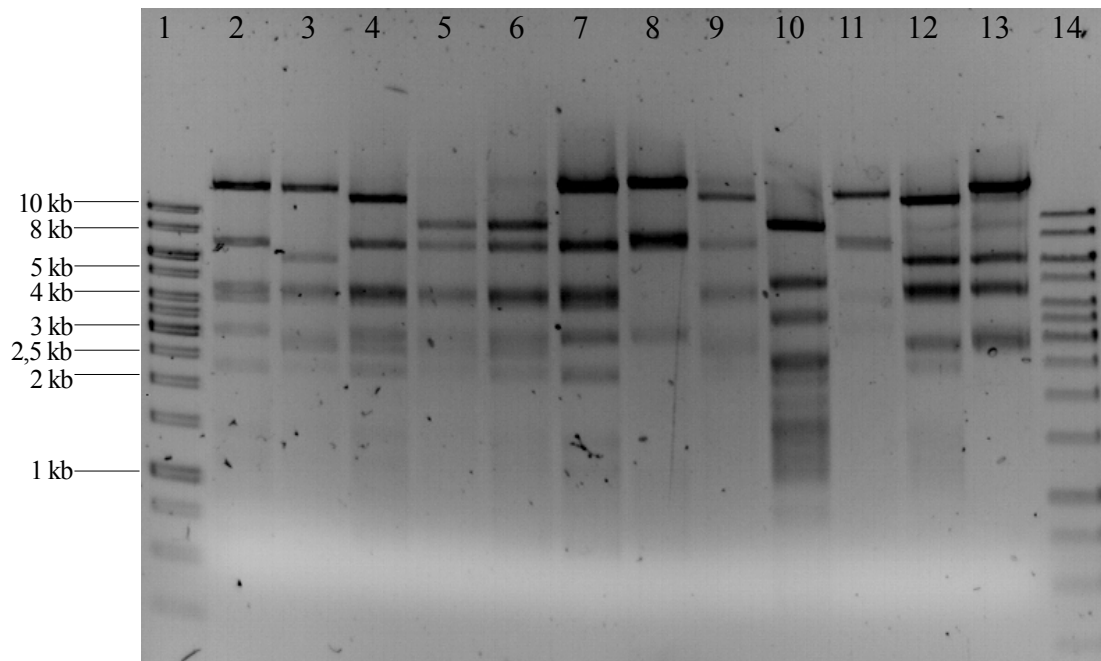


Abbildung 48: Gelelektrophoretische Analyse der Produkte eines Restriktionsverdau der zwölf Cosmide mit *SacI*

Spur 1: GeneRuler 1 kb DNA Ladder; Spur 2: Cosmid MW_A8; Spur 3: Cosmid MW_G7; Spur 4: Cosmid MW_D3; Spur 5: Cosmid MW_T143; Spur 6: Cosmid MW_T141; Spur 7: Cosmid MW_A6; Spur 8: Cosmid MW_A5; Spur 9: Cosmid MW_F7; Spur 10: Cosmid MW_E2; Spur 11: Cosmid MW_F10; Spur 12: Cosmid MW_A9; Spur 13: Cosmid MW_E5; Spur 14: GeneRuler 1 kb DNA Ladder

Beim Verdau der Cosmide mit *SacI* konnten wie schon mit den anderen Enzymen keine eindeutigen Übereinstimmungen im Bandenmuster festgestellt werden, nur MW_T141 und MW_T143 (Spur 5 und 6) verhielten sich identisch. Die Fragmentgrößen konnten ebenfalls nicht genau bestimmt werden, da die Banden außerhalb des Markers lagen.

Zusammengefasst ist festzuhalten, dass anhand der erhaltenen Restriktionskarten keine exakten Aussagen über die Ähnlichkeiten der Cosmide bzgl. der Größe ihres Inserts getroffen werden konnten. Lediglich die Cosmide MW_T143 und MW_T141 zeigten gleiche Fragmentmuster. Anhand der Ergebnisse der *NcoI*-Spaltung konnte abgeschätzt werden, dass alle Cosmide theoretisch groß genug sind, um das gesamte Gencluster zu enthalten.

Im nächsten Schritt wurden die Enden der Inserts ansequenziert, um Cosmide auszusortieren, bei denen ein Teil des Phenazin-Genclusters im Restriktionsverdau abgeschnitten worden war. Da vor der multiplen Klonierungsstelle im Vektor SuperCos 1 der T3- und dahinter der T7-Promotor liegen, konnten entsprechende Primer für die Sequenzierung der Insert-Enden verwendet werden. Die daraus resultierenden Sequenzen wurden mittels BLASTx mit denen der nr-Datenbank verglichen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 42 dargestellt.

Tabelle 42: Ergebnisse des BLASTx-Sequenzvergleichs der mittels T3- bzw. T7- Promotor-Primer sequenzierten Insert-Enden mit den Sequenzen der nr-Datenbank

Cosmid	Codierung der Insert-Enden	
	5'-Ende	3'-Ende
MW_A8	Histidin-Kinase	DNA-Primase
MW_G7	hypothetisches Protein	Sequenzierung fehlgeschlagen
MW_D3	Glycosyl-Transferase	hypothetisches Protein
MW_T143	Acetyl-Transferase	hypothetisches Protein
MW_T141	Acetyl-Transferase	hypothetisches Protein
MW_A6	Methylase	DNA-Primase
MW_A5	ATP-Bindeprotein	PhzD
MW_F7	Sequenzierung fehlgeschlagen	DNA-Primase
MW_E2	Ribosylglycohydrolase	Transposase
MW_F10	ATP-Bindeprotein	Transkriptionsregulator
MW_A9	Helikase	hypothetisches Protein
MW_E5	Transkriptionsregulator	sekretorisches Protein

Am 3'-Ende des Inserts im Cosmid MW_A5 wurde ein Phenazin-Gen (*phzD*) identifiziert. Die Sequenz codiert jedoch nicht das gesamte PhzD-Protein, sondern nur dessen N-terminalen Bereich, was auf eine Restriktionsschnittstelle für *Sau3AI* im Insert zurückzuführen ist. Dieses Cosmid enthält somit nicht das komplette Phenazin-Gencluster.

Alle anderen Inserts haben an ihren Enden keine Phenazin-Gene, sondern solche, die für Proteine aus dem Primärstoffwechsel codieren oder deren Funktion nicht bekannt ist. Dies spricht dafür, dass diese das gesamte Cluster enthalten.

Ein Sequenzvergleich der Inserts der Cosmide MW_T141 und MW_T143 führte zu dem Ergebnis, dass diese identisch sind.

3.7.3 Vollständige Cosmid-Sequenzierung

Für die vollständige Sequenzierung eines Cosmids zur Bestimmung der DNA-Sequenz des Dermacozin-Genclusters wurde das Cosmid MW_A9 ausgewählt. Dieses trägt wie oben beschrieben auf jeden Fall die Gene für PhzB und PhzF und weist mit ca. 35 kb eine Größe auf, die für die Insertion des gesamten Genclusters spricht. Die Sequenzierung erfolgte mit Hilfe der sogenannten „Shotgun-Methode“ (GenoTech, Seoul, Südkorea). Das Cosmid wurde dabei zufällig in 300 bis 1.000 bp große Stücke fragmentiert, die sequenziert und aufgrund von Überlappungen zu einer Konsensussequenz zusammengefügt wurden. Dies lieferte für das Insert eine Größe von knapp 40 kb und einen GC-Gehalt von 65,1 %. Mit Hilfe des Programms Artemis wurden darin 30 mögliche ORFs identifiziert.

Die Zuordnung der Genfunktionen erfolgte durch Sequenzanalysen mittels BLASTx (nr-Datenbank). Die Ergebnisse für die postulierte Funktion des jeweiligen codierten Proteins sind in Tabelle 43 dargestellt.

Tabelle 43: Zuordnung der annotierten ORFs zu ihrer Funktion mittels BLASTx

ORF	Aminosäuren	nächstes Homolog	aus dem Organismus ¹	Übereinstimmung/Ähnlichkeit der Proteinsequenz [%] ²	Zugangsnummer NCBI-Datenbank
<i>orf1</i>	537	hypothetisches Protein	<i>Corynebacterium diphtheriae</i> CDCE 8392	40/60	YP_005134734
<i>orf2</i>	551	hypothetisches Protein	<i>Aeromicrobium marinum</i> DSM 15272	54/69	ZP_07715755
<i>orf3</i>	345	hypothetisches Protein	<i>Mycobacterium smegmatis</i> MC2 155	54/66	YP_887528
<i>orf4</i>	233	hypothetisches Protein	<i>Kocuria rhizophila</i> DC2201	96/98	YP_001854119
<i>orf5</i>	171	vermutliche Transposase	<i>Kocuria rhizophila</i> DC2201	96/96	YP_001854118
<i>orf6</i> (<i>phzM</i>)	334	PhzM, Phenazin-spezifische Methyltransferase	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	45/63	NP_252898
<i>orf7</i>	448	Rekombinationsfaktor RarA	<i>Saccharomonospora viridis</i> DSM43017	69/80	YP_003133386
<i>orf8</i> (<i>phzF</i>)	281	Protein der Phenazin-Biosynthese, PhzF	<i>Nocardiopsis dassonvillei</i> DSM43111	63/73	YP_003682919
<i>orf9</i>	138	hypothetisches Protein	<i>Solibacter usitatus</i> Ellin6076	30/45	YP_827192
<i>orf10</i> (<i>phzD</i>)	207	PhzD, Isochorismatase	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA7	68/80	YP_001348742
<i>orf11</i> (<i>phzE</i>)	631	Protein der Phenazin-Biosynthese, PhzE	<i>Streptomyces</i> sp. AA4	50/65	ZP_07283194
<i>orf12</i> (<i>phzG</i>)	206	PhzG, FMN-abhängige Oxidase	<i>Streptomyces anulatus</i>	54/69	CAX48667
<i>orf13</i> (<i>phzH</i>)	613	PhzH, Klasse-II Glutamin-Amidotransferase	<i>Leifsonia xyli</i> CTCB07	74/85	YP_062965
<i>orf14</i> (<i>phzB</i>)	159	Protein der Phenazin-Biosynthese, EphzB (PhzB)	<i>Streptomyces griseoluteus</i>	65/81	AEG23588
<i>orf15</i>	324	vermutlicher Transkriptionsregulator	<i>Nocardiopsis dassonvillei</i> DSM43111	68/82	YP_003680083
<i>orf16</i>	133	vermutliche Endoribonuklease	<i>Streptomyces hygrosopicus</i> ATCC 53653	80/89	ZP_07293001
<i>orf17</i>	163	hypothetisches Protein	<i>Microtholunatus phosphovorius</i> NM-1	64/78	YP_004574200
<i>orf18</i>	126	hypothetisches Protein	<i>Nocardia brasiliensis</i> ATCC 700358	80/86	EHY25667
<i>orf19</i>	493	L-Asparaginase II	<i>Ketogulonigenium vulgare</i> WSH-001	46/60	AEM41135

ORF	Aminosäuren	nächstes Homolog	aus dem Organismus ¹	Übereinstimmung/Ähnlichkeit der Proteinsequenz [%] ²	Zugangsnummer NCBI-Datenbank
<i>orf20</i>	114	Transkriptionregulator, DksA-/TraR-Familie	<i>Dermacoccus</i> sp. Ellin185	49/62	ZP_07704952
<i>orf21</i>	207	Glyoxalase/Bleomycin-Resistenz-Protein/Dioxygenase	<i>Propionibacterium freudenreichii</i> CIRM-BIA1	93/98	YP_003689025
<i>orf22</i>	177	Transkriptionsregulator TetR-Familie	<i>Kineococcus radiotolerans</i> SRS30216	60/75	YP_001361936
<i>orf23</i>	233	vermutliche Alpha-/Beta-Hydrolase	<i>Mycobacterium intracellulare</i> ATCC13950	40/56	ZP_05227287
<i>orf24</i>	192	Transkriptionsregulator, TetR-Familie	<i>Kineococcus radiotolerans</i> SRS30216	52/64	YP_001360246
<i>orf25</i>	934	Typ II Restriktionsenzym	<i>Corynebacterium pseudogenitalium</i> ATCC33035	52/66	ZP_07714866
<i>orf26</i>	210	hypothetisches Protein	<i>Frankia</i> sp. CN3	50/57	ZP_09168924
<i>orf27</i>	132	hypothetisches Protein	<i>Streptomyces</i> sp. AA4	33/53	ZP_07284360
<i>orf28</i>	499	ParB-ähnliches Partitions-Protein	<i>Pseudonocardia dioxanivorans</i> CB1190	34/51	AEA29050
<i>orf29</i>	256	Corbyrinsäure a,c-Diamid-Synthase	<i>Nakamurella multipartita</i> DSM44233	39/56	YP_003202880
<i>orf30</i>	1194	vermutliche Helikase	<i>Arthrobacter aurescens</i> TC1	51/67	YP_950168

¹ angegeben ist der Organismus, dessen entsprechendes homologes Protein die höchste Sequenzidentität zum untersuchten ORF zeigte

² Übereinstimmung: die selbe Aminosäure; Ähnlichkeit: bzgl. ihrer Eigenschaften ähnliche Aminosäure

Auf dem Cosmid MW_A9 konnten die Phenazin-Grundgene *phzB*, *phzD*, *phzE*, *phzF* und *phzG* identifiziert werden, die für die Bildung der Phenazin-1,6-Dicarbonsäure verantwortlich sind (vgl. 1.5.2). Daneben wurden die Gene *phzH* und *phzM* gefunden, die in anderen Phenazin-Produzenten an der Modifikation des Phenazin-Grundkörpers beteiligt sind [CHIN-A-WOENG *et al.*, 2001; PARSONS *et al.*, 2007]. Mit Hilfe des Programms Artemis wurde zwischen *orf9* und *orf10* ein weiteres Gen annotiert, dessen Stoppcodon mit dem von *orf10* identisch war. Ein weiteres Stoppcodon für dieses Gen konnte nicht identifiziert werden. Anhand eines Vergleichs der DNA-Sequenz mittels BLASTx konnte die Region zwischen *orf9* und dem Beginn von *orf10* als die vollständige Sequenz einer 3-Desoxy-D-Arabino-Heptulosonsäure-7-Phosphat-Synthase (DAHP-Synthase) aus *Streptomyces cinnamonensis* identifiziert werden. In anderen Phenazin-Genclustern wird diese Funktion von PhzC übernommen (vgl. 1.5.2).

Zudem wurden alle ORFs mit dem Programm Phyre: protein homology/analogy recognition engine (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre/>) [BENNETT-LOVSEY *et al.*, 2008] untersucht. Dabei wurde für die zu untersuchende Aminosäure-Sequenz ein Modell zur räumlichen Struktur erstellt und in den Datenbanken PDB (*protein data bank*) [BERNSTEIN *et al.*, 1977] und SCOP (*structural classification of proteins*) [MURZIN *et al.*, 1995] nach homologen Proteinen mit bekannter Struktur gesucht, um evtl. weitere Hinweise über die Funktion der Proteine zu erhalten, die mittels BLASTx (nr-Datenbank) nicht zugeordnet werden konnten. Die Ergebnisse sind in Tabelle 44 aufgelistet.

Tabelle 44: Zuordnung der annotierten ORFs mittels Phyre

ORF	nächstes Homolog mit bekannter Struktur	aus dem Organismus	Übereinstimmung der Proteinsequenz/ Konfidenz ¹ [%]	PDB- Zugangsnummer ²
<i>orf1</i>	hypothetisches Protein		10/0	
<i>orf2</i>	Adenin-N6-DNA-Methyltransferase	<i>Thermus aquaticus</i> YT-1	17/100	1AQJ
<i>orf3</i>	hypothetisches Protein		19/35	
<i>orf4</i>	Topoisomerase V		16/45	
<i>orf5</i>	Katalytisches Zentrum der HIV-Integrase	<i>Human immunodeficiency virus 1</i>	15/100	1EXQ
<i>orf6</i> (<i>phzM</i>)	Protein der Pyocyanin-Biosynthese, PhzM	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	44/100	2IP2
<i>orf7</i>	C-Terminales Fragment der AAA+ATPase	<i>Haemophilus influenza</i> 86-028NP	41/100	3BGE
<i>orf8</i> (<i>phzF</i>)	Protein der Phenazin-Biosynthese, PhzF	<i>Pseudomonas fluorescens</i> 2-79	61/100	1UIV
<i>orf9</i>	hypothetisches Protein	<i>Bacillus subtilis</i>	13/100	2GXF
<i>orf10</i> (<i>phzD</i>)	Isochorismatase, PhzD	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	67/100	1NF9
<i>orf11</i> (<i>phzE</i>)	Anthranilat-Synthase	<i>Sulfolobus solfataricus</i>	13/100	1QDL
<i>orf12</i> (<i>phzG</i>)	Protein der Phenazin-Biosynthese, PhzD	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	42/100	1TY9
<i>orf13</i> (<i>phzH</i>)	Asparagin-Synthetase	<i>E. coli</i>	25/100	1CT9
<i>orf14</i> (<i>phzB</i>)	vermutliche Isomerase	<i>Bacillus subtilis</i>	12/100	1S5A
<i>orf15</i>	vermutlicher Transkriptionsregulator	<i>Thermotoga maritima</i>	20/95	1J5Y
<i>orf16</i>	Chorismat-Mutase-ähnliches Protein	<i>Sulfolobus tokodaii</i>	25/100	1X25
<i>orf17</i>	Thiosulfat-Sulfurtransferase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	14/90	1TQ1
<i>orf18</i>	Regulator im Zweikomponentensystem		14/10	
<i>orf19</i>	tRNA-abhängige Amidotransferase	<i>Pyrococcus abyssi</i>	13/100	1ZQ1
<i>orf20</i>	Transkriptionsfaktor DksA	<i>E. coli</i>	21/100	1TJL

ORF	nächstes Homolog mit bekannter Struktur	aus dem Organismus	Übereinstimmung der Proteinsequenz/ Konfidenz ¹ [%]	PDB-Zugangsnummer ²
orf21	Glyoxalase/Bleomycin-Resistenz-Protein/Dioxygenase	<i>Vibrio splendidus</i> 12B01	29/100	2RK9
orf22	vermutlicher Transkriptionsregulator TetR-Familie	<i>Rhodococcus jostii</i> RHA1	19/100	2I10
orf23	Arylesterase	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	18/100	1VA4
orf24	Transkriptionsregulator TetR-Familie	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> C58	21/100	2G7S
orf25	Typ I-Restriktionsenzym	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> VPI-5482	14/100	2OKC
orf26	hypothetisches Protein	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> RIMD 2210633	16/95	2QIP
orf27	Penicillin G-Acylase		10/0	
orf28	ParB-ähnliches Partitions-Protein	<i>Thermus thermophilus</i> HB27	30/100	1VZ0
orf29	Chromosom-Partitions-Protein	<i>Thermus thermophilus</i> HB27	30/100	2BEK
orf30	ATPase	<i>Sulfolobus solfataricus</i>	11/100	1Z63

¹ Übereinstimmung: dieselbe Aminosäure; Konfidenz: Wahrscheinlichkeit, dass die Faltung ähnlich ist

² PDB-Zugangsnummer nur für homologe Proteine mit hohem Konfidenzwert angegeben

Die Sequenz-Analysen mittels Phyre bestätigten die mittels BLASTx zugeordneten Funktionen und lieferten für Orf2, Orf4 und Orf16 bis Orf18 neue Hinweise über ihre mögliche Funktion. Dabei liegen die Werte bzgl. Sequenzidentität und Faltungsähnlichkeit für Orf4 und Orf18 jedoch sehr niedrig, so dass die vorgeschlagenen Funktionen nicht zwangsläufig zutreffend sind. Eine niedrige Sequenzidentität bei hohem Konfidenzwert bedeutet lediglich, dass das Protein vermutlich zur gleichen Faltungsfamilie gehört, was nicht automatisch eine Bestätigung seiner Funktion darstellt. Für Orf2, Orf16 und Orf17 liegen die Konfidenzwerte bei 90 bis 100 %, was darauf hindeutet, dass die Funktion mit der des angegebenen Proteins identisch ist.

Die Relevanz der verschiedenen Gene für die Dermacozin-Synthese wird unter 4.4 diskutiert.

3.8 Heterologe Expression des Phenazin-Genclusters in *Streptomyces* sp.

Das Gencluster auf dem Cosmid MW_A9 sollte heterolog in *Streptomyces* sp. exprimiert werden, um nachzuweisen, dass es sich hierbei um das für die Dermacozin-Biosynthese verantwortliche Gencluster handelt und dieses alle dafür nötigen Gene umfasst.

Dazu wurde zunächst die Integrase des Bakteriophagen Φ C31 zusammen mit einer Tetracyclin-Resistenzkassette in das Cosmid MW_A9 integriert (2.2.17.1). Dieser als „Recombineering“ bezeichnete Prozess basiert auf homologer Rekombination in *E. coli*, wobei das λ RED-System (*gam*, *bet* und *exo*) von λ -Phagen genutzt wird [POTTEETE, 2001]. Das rekombinante Cosmid MW_A9_int wurde anschließend mittels Konjugation in *Streptomyces lividans* TK23 eingebracht (2.2.17.2). Dabei vermittelt die Integrase die Rekombination von spezifischen Erkennungssequenzen auf dem Cosmid (*attB*) mit Erkennungssequenzen im Streptomyceten-Genom (*attP*). Die erfolgreiche Integration des Cosmids wurde durch Amplifikation der cosmidcodierten Tetracyclin-Resistenzkassette überprüft; dabei wurde die genomische DNA von vier verschiedenen Exokonjuganten als Templat verwendet.

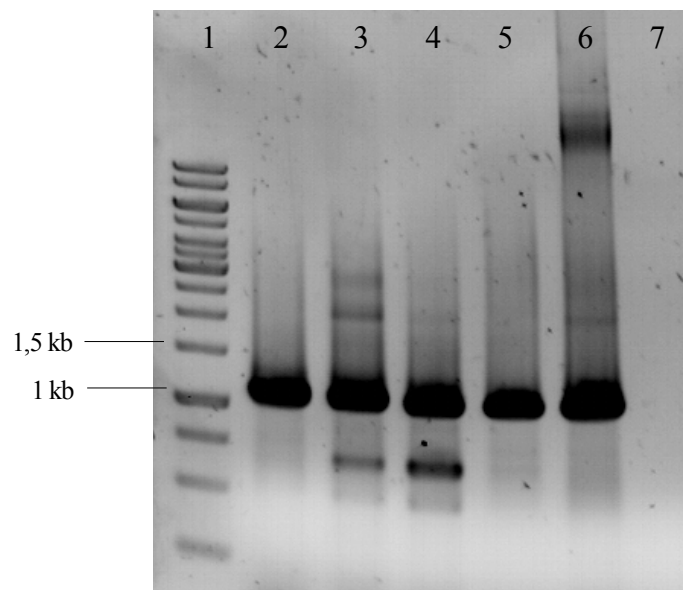


Abbildung 49: Gelelektrophoretische Analyse der Produkte einer PCR zur Amplifizierung der Tetracyclin-Resistenzkassette in vier Exokonjuganten von *Streptomyces lividans* TK23 MW_A9_int
Spur 1: GeneRuler 1 kb DNA Ladder; Spur 2: gen. DNA Exokonjugant 1; Spur 3: gen. DNA Exokonjugant 2; Spur 4: gen. DNA Exokonjugant 3; Spur 5: gen. DNA Exokonjugant 4; Spur 6: Plasmid pIJ787; Spur 7: gen. DNA *S. lividans* TK23

Mit Hilfe der Primer tet_fw und tet_rev konnte sowohl in der Positivkontrolle (Spur 6) als auch in allen vier Exokonjuganten (Spur 2 - 5) die Tetracyclin-Resistenzkassette amplifiziert werden (1,1 kb-Amplifikat). Die Negativkontrolle (genomische DNA von *S. lividans* TK23, Spur 7) zeigte diese Bande nicht. Somit konnte die erfolgreiche Integration des Cosmids in das Genom von *S. lividans* TK23 nachgewiesen werden.

Anschließend wurde die Dermacozin-Produktion der Exokonjuganten 2 und 3 (vgl. Abbildung 49) in Schüttelkulturen mit NL 410 überprüft (vgl. 2.2.17.3). Dabei konnten bei einer Kultivierungsdauer von vier Wochen zu keinem Zeitpunkt Phenazine im Kulturfiltrat bzw. Mycel mittels HPLC-DAD nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Aus diesem Grund wurde versucht, die Transkription des Phenazin-Genclusters auf eine andere Weise zu aktivieren. Für vier ORFs (Orf15, Orf20, Orf22 und Orf24) war in Sequenzanalysen eine regulatorische Funktion vorhergesagt worden (vgl. Tabelle 43), die wichtige Regulatoren im Dermacozin-Biosyntheseweg darstellen könnten. Daher wurde untersucht, ob deren konstitutive Expression die Phenazin-Produktion beeinflusst. Dazu wurde jedes der vier Gene hinter den konstitutiven Promotor *ermE** auf pUWL201 kloniert. Mit je einem der daraus resultierenden Plasmide (pUWL201_orf15, pUWL201_orf20, pUWL201_23 bzw. pUWL201_orf24) wurden Protoplasten von *Streptomyces lividans* TK23 MW_A9_int transformiert. Die Sekundärstoff-Produktion der Transformanten wurde über zwei Wochen in Schüttelkulturen mit NL 410, KM 1, KM 4, M2 bzw. SGG verfolgt. In keinem Ansatz war eine Synthese von Phenazinen zu beobachten (Daten nicht gezeigt).

Daher wurde versucht, die Expression des Genclusters durch die Einführung des konstitutiven Promotors *ermE** vor dem ersten essentiellen Phenazin-Gen (*phzF*) zu aktivieren. Dazu wurde dieser mittels PCR zusammen mit der Hygromycin-Resistenzkassette auf dem Plasmid pUWL201_Plac/ermE amplifiziert. Die verwendeten Primer wiesen 5'-Überhänge auf, die kompatibel zum Bereich strangaufwärts von *phzF* waren. Durch homologe Rekombination in *E. coli* BW25113 pIJ790 wurde das PCR-Produkt in das Cosmid MW_A9_int integriert. Das daraus resultierende rekombinante Cosmid MW_A9_int_ermE wurde mittels Sequenzierung auf die richtige Integration des Inserts überprüft und anschließend mittels biparentaler Konjugation in *S. lividans* TK23 eingebracht. Die erfolgreiche Integration des Cosmids ins Genom wurde anschließend bei vier Exokonjuganten mittels PCR geprüft. Dabei wurden die Primer so gewählt, dass einer in der Hygromycin-Resistenzkassette und der andere im *phzF*-Gen bindet. Abbildung 50 zeigt das Ergebnis dieser Amplifikation.

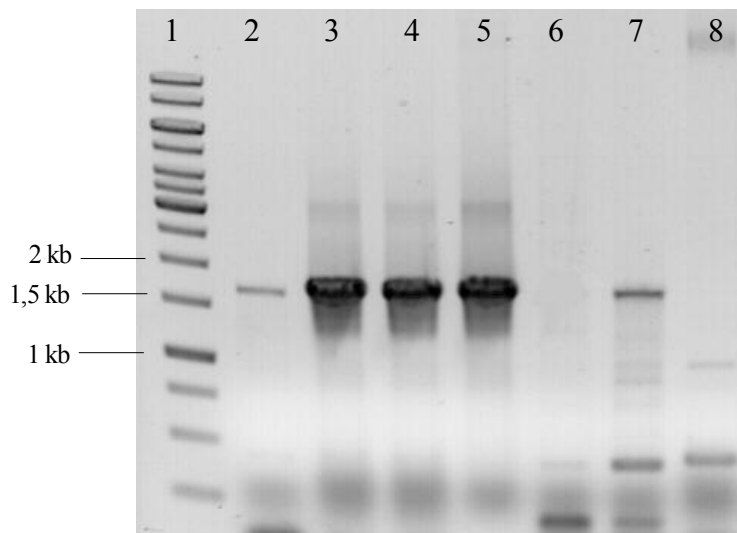


Abbildung 50: Gelelektrophoretische Analyse der Produkte einer PCR zur Amplifizierung von *phzF* und der Hygromycin-Resistenzkassette in vier Exokonjuganten von *Streptomyces lividans* TK23 MW_A9_int_ermE

Spur 1: GeneRuler 1 kb DNA Ladder; Spur 2: gen. DNA Exokonjugant 1; Spur 3: gen. DNA Exokonjugant 2; Spur 4: gen. DNA Exokonjugant 3; Spur 5: gen. DNA Exokonjugant 4; Spur 6: gen. DNA *S. lividans* TK23 wt; Spur 7: Cosmid MW_A9_int_ermE; Spur 8: gen. DNA *S. lividans* TK23 MW_A9_int

Die erwartete Bandengröße von ca. 1,7 kb war sowohl in der Positivkontrolle (Spur 7) als auch bei allen vier getesteten Exokonjuganten (Spur 2 - 5) zu erkennen. Damit war die erfolgreiche Integration des Cosmids MW_A9_int_ermE in das Genom von *S. lividans* TK23 nachgewiesen.

Für vier Klone aus der Konjugation wurde die Sekundärstoff-Produktion in Schüttelkulturen mit verschiedenen Nährlösungen (410, SGG, OM, KM 1 und KM 4) untersucht. In keinem Ansatz konnte bis zu einer Kultivierungsdauer von 168 Stunden die Synthese von Phenazinen nachgewiesen werden.

Somit konnte das identifizierte Gencluster bislang nicht erfolgreich in *Streptomyces lividans* TK23 exprimiert werden. Gründe dafür werden unter 4.4 diskutiert.

4 Diskussion

Aus einer Sedimentprobe des Challengertiefs im Marianengraben wurden 38 Actinomyce-tenstämme isoliert, darunter 19 *Dermacoccus*-, elf *Tsukamurella*- und fünf *Streptomyces*-Isolate sowie je ein *Williamsia*- *Kocuria*-, bzw. *Micromonospora*-Isolat [PATHOMAREE *et al.*, 2006c]. Von den isolierten *Dermacoccus*-Stämmen konnten acht mittels HPLC-DAD als Produzenten identischer Sekundärmetabolite charakterisiert werden [GIERTH, 2006], die später als neuartige Phenazin-Derivate, den Dermacozenen, beschrieben wurden [ABDEL-MAGEED *et al.*, 2010; WAGNER, 2009]. Aus zwei dieser Isolate, *Dermacoccus abyssi* und *Dermacoccus* sp. MT 1.2, wurden insgesamt sieben neue Substanzen, die Dermacozi-
ne A - G, isoliert und chemisch sowie z. T. biologisch charakterisiert [ABDEL-MAGEED *et al.*, 2010]. Zudem wurden während der Kultivierung von *Dermacoccus* sp. MT 1.2 neun wei-
tere Substanzen gefunden, die große Ähnlichkeiten bzgl. ihres UV-Vis-Spektrums zu den
bereits bekannten Dermacozenen aufwiesen [WAGNER, 2009]. Diese wurden in der vorlie-
genden Arbeit näher charakterisiert. Dazu wurde zunächst ihre Synthese in *Dermacoccus*
sp. MT 1.2 optimiert, um ausreichende Substanzmengen zu gewinnen.

4.1 Optimierung der Sekundärstoffproduktion von *Dermacoccus* sp. MT 1.2

In einer früheren Studie wurde die Sekundärstoffproduktion von *Dermacoccus* sp. MT 1.2
in verschiedenen Komplex- und Minimalmedien getestet. Dabei war eine Dermacozi-
Synthese nur in sehr nährstoffreichen Medien wie NL 333, 410 oder SGG zu verzeichnen
[WAGNER, 2009]. In allen anderen Nährlösungen war nur eine sehr geringe bzw. gar keine
Produktion zu beobachten. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass bestimmte Be-
standteile des Mediums die Synthese der Sekundärstoffe reprimieren oder die Medienzu-
sammensetzung das Wachstum der Bakterien negativ beeinflusst. Die Wachstumsraten in
den verschiedenen Nährlösungen konnten jedoch nicht miteinander verglichen werden, da
die unlöslichen Bestandteile der Komplexmedien die photometrische Messung der opti-
schen Dichte sowie die Ablesung der Biomasse anhand der Skala in graduierten Zentrifu-
genröhrchen i. Vgl. zu den Minimalmedien verfälschten. Daher konnte nicht geklärt
werden, ob Produktion und Wachstum miteinander korrelieren [WAGNER, 2009].

Um diese Probleme zu umgehen, wurde in vorangegangenen Arbeiten versucht, die Kultivierung in voll-löslichen Medien durchzuführen. Dabei wurde das Wachstum in KM 1, KM 4, LB bzw. TSG sowie der Nährlösung 410, die sich in früheren Experimenten als optimal für die Produktivität von *Dermacoccus* sp. MT 1.2 herausgestellt hatte [WAGNER, 2009], anhand der Bestimmung des DNA-Gehalts nach HERBERT *et al.* [1971] verfolgt. Die Produktivität wurde anhand der Synthesemenge von Dermacozin C, das sich als das Hauptprodukt erwiesen hatte [WAGNER, 2009], ermittelt. Eine Phenazin-Synthese war dabei ausschließlich in NL 410 und KM 4 zu beobachten, wobei Wachstum und Produktion in NL 410 am höchsten waren. Obwohl im Medium TSG die zweithöchste DNA-Menge nachgewiesen werden konnte, war eine Produktion nicht zu verzeichnen. Eine eindeutige Korrelation zwischen Wachstum und Produktion lies sich nicht ermitteln. Weitere Faktoren wie z. B. die einzelnen Bestandteile der Nährlösung könnten dabei eine entscheidende Rolle spielen. Für viele verschiedene Sekundärmetabolite wurde beschrieben, dass sich das Produktionsverhalten von Medium zu Medium unterscheidet [ANTAL, 2004; DIETER, 2002; JUNKER *et al.*, 2001; SCHIMANA, 2000]. Ausgehend von diesen Ergebnissen wurde versucht, die Produktivität in KM 4 zu optimieren, da sich in diesem voll-löslichen Medium immerhin eine geringe Produktion gezeigt hatte. Der Zusatz verschiedener Kohlenstoff- bzw. Stickstoffquellen resultierte jedoch in allen Fällen in Dermacozin-Konzentrationen unter 20 mg/l (Daten nicht gezeigt). Aus diesem Grund wurde die Kultivierung wieder auf das Komplexmedium 410 umgestellt und die essentiellen bzw. reprimierenden Bestandteile dieses Mediums identifiziert. Ohne Glycerin, Glucose, Hefeextrakt, Casaminoacids bzw. Calciumcarbonat war kaum noch eine Dermacozin-Synthese zu beobachten, ohne Hafermehl wurde eine Abnahme um ca. 30 % verzeichnet. Dies führte zu der Schlussfolgerung, dass alle Komponenten der Nährlösung 410 für die Produktivität von *Dermacoccus* sp. MT 1.2 essentiell sind.

Somit konnte eine Umstellung der Kultivierung auf voll-lösliche Medien nicht vorgenommen werden; auf die unlöslichen Bestandteile Hafermehl und CaCO₃ konnte dabei nicht verzichtet werden.

Ausgehend von dem Ergebnis, dass ausschließlich in NL 410 eine ausreichende Dermacozin-Ausbeute zu verzeichnen war, wurde diese Nährlösung als Ausgangsmedium für weitere Optimierungsarbeiten verwendet.

Zunächst wurde der Einfluss der Qualität des Wassers, das für die Herstellung der Nährlösungen verwendet wurde, untersucht. Die höchste Dermacozin-Synthese konnte mit Mischwasser aus Tübingen erzielt werden. Die Verwendung von Bodensee- bzw. deionisiertem Wasser führte zu einer Reduktion bzw. kompletten Hemmung der Produktion. Auch der Zusatz verschiedener Spurenelementlösungen konnte dies nicht ausgleichen. Die Zusammensetzung des Tübinger Trinkwassers scheint somit ausschlaggebend für die Dermacozin-Synthese zu sein. Mischwasser enthält von allen im Wasser vorkommenden Bestandteilen, außer Eisen, eine höhere Konzentration als das Bodenseewasser (vgl. Tabelle 45). In früheren Versuchen war gezeigt worden, dass Eisen schon in einer Konzentration von 0,56 µg/l die Dermacozin-Synthese reprimiert [WAGNER, 2009]. Daher wird die in der vorliegenden Arbeit beobachtete geringere Dermacozin-Synthese mit einer höheren Eisenkonzentration im Bodenseewasser in Verbindung gebracht.

Tabelle 45: Trinkwasserzusammensetzung in Tübingen¹

Spurenelement	Konzentration [mg/l]	
	Bodenseewasser	Mischwasser
Calcium	50	75,7
Magnesium	8	13,6
Kalium	1,3	2,14
Natrium	4,8	11,8
Mangan	<0,0005	<0,005
Eisen	0,051	<0,01
Chlorid	5,9	19,7
Sulfat	34	63,9
Fluorid	0,09	0,11
Nitrat	4,7	8,37
Nitrit	<0,005	<0,05

¹ Quelle: Stadtwerke Tübingen, <http://www.swtue.de/wasser/wasserqualitaet.html>

Es ist nicht ausgeschlossen, dass auch die anderen Spurenelemente einen Einfluss auf die Produktion haben bzw. diese fördern und *Dermacoccus* sp. MT 1.2 ein großes Angebot an Spurenelementen für die Sekundärstoff-Synthese benötigt. Um festlegen zu können, um welche Bestandteile es sich dabei handelt, müssen weitere Untersuchungen durchgeführt werden.

Calciumcarbonat kann die Produktion von Sekundärmetaboliten sowohl negativ als auch positiv beeinflussen [DIETER, 2002; GURTU & HEDING, 1978], da es als pH-Puffer fungiert. Um dies für die Dermacozin-Synthese zu überprüfen, wurde CaCO₃ durch die sogenannten Good'schen Puffer MOPS, HEPES bzw. TES ersetzt. Dabei konnte keine dieser Puf-

fersubstanzen das Fehlen von CaCO_3 ausgleichen. Dies war jedoch nicht auf eine mangelnde pH-Stabilisierung des Mediums zurückzuführen, da sich die pH-Werte stets im angegebenen Pufferbereich befanden. Dieser liegt für MOPS zwischen pH 6,6 und 7,6, für HEPES zwischen pH 7,0 und 8,0 sowie für TES zwischen pH 6,8 und 8,2 [CIBA-GEIGY, 1979]. Frühere Arbeiten hatten gezeigt, dass CaCO_3 -Konzentrationen unter 0,1 % zu einer Abnahme der Dermacozin-Synthese führen, wobei ohne CaCO_3 überhaupt keine Produktion mehr nachgewiesen werden konnte [WAGNER, 2009]. Dies konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass CaCO_3 neben der puffernden Eigenschaft eine weitere Wirkung auf das Produktionsverhalten von *Dermaococcus* sp. MT 1.2 ausübt. Womöglich dient Ca^{2+} als Cofaktor für bestimmte Biosynthese-Enzyme.

Eine Erhöhung der CaCO_3 -Menge bewirkte eine Produktionssteigerung, wobei sich eine Verdopplung der Konzentration auf 0,2 % als optimal herausstellte. Ein solcher produktionssteigernder Effekt ist auch für die Synthese von Helvolinsäure in *Cephalosporium caeruleum* beschrieben, bei der eine Steigerung der CaCO_3 -Konzentration von 0,2 auf 1 % die Ausbeute um ca. 200 $\mu\text{g/ml}$ erhöhte [IWAI *et al.*, 1973]. Höhere Mengen (bis 0,5 %) resultierten in einem Rückgang der Dermacozin-Synthese, deren Maximum jedoch immer noch über dem Wert der Kontrolle mit 0,1 % CaCO_3 lag. Eine mögliche Ursache für die Abnahme der Produktion könnte in den abrasiven Eigenschaften des Calciumcarbonats begründet sein, das zum großen Teil ungelöst im Medium vorliegt. Dies könnte im Fermenter zu Scherkräften führen, die die Bakterienzellen schädigen, sodass die Dermacozin-Ausbeute abnimmt. Aus diesem Grund wurde in weiteren Versuchen nur eine CaCO_3 -Konzentration von 0,2 % eingesetzt.

Die Erhöhung des Kohlenstoffangebots durch Verdopplung der Glucose-Menge von 1 % auf 2 % resultierte in einer Verbesserung der Produktion um 20 %. PUJARI & CHANDRA [2000] konnten durch die Variation der Glucose-Konzentration von 2 % auf 3 bis 4 % im Medium die Riboflavin-Produktion in *Eremothecium ashbyii* deutlich erhöhen. Diese nahm jedoch bei zu hohen Glucose-Mengen von 5 % wieder ab. Ein ähnlicher Effekt wurde auch für die Dermacozin-Produktion beobachtet. Eine Steigerung der Glucose-Konzentration von 1 % auf 3 % in NL 410 erhöhte dabei die Synthese nur um 8 %. Dieser Effekt könnte auf eine Hemmung wichtiger Enzyme der Sekundärstoff-Synthese zurückzuführen sein, wie dies beispielsweise bei der Cephamycin-Synthese gezeigt wurde. Dabei hemmt

Glucose in einer Konzentration von 3 % zwei Schlüsselenzyme, die für den Aufbau dieser β -Lactam-Antibiotika essentiell sind [CORTÉS *et al.*, 1986]. Ob dies auch für die Dermacozin-Synthese eine Rolle spielt, wurde nicht weiter überprüft.

Glycerin, Maltose bzw. Stärke werden oftmals als alternative Kohlenstoffquellen in Kultivierungsmedien verwendet, um einen möglichen inhibierenden Effekt von Glucose auf die Expression von Enzymen der Sekundärstoff-Biosynthese zu verhindern. Des Weiteren können diese Di- bzw. Polysaccharide als Nährstoffe dienen, wenn die schnell metabolisierbaren Kohlenstoffquellen bereits verbraucht sind [MASUREKAR, 2008]. Mit der Zugabe von Glycerin, Maltose bzw. Stärke konnte kein produktionssteigernder Effekt erzielt werden. Eine Erhöhung der Glycerinkonzentration von 10 g/l auf 30 g/l in NL 410 resultierte in einer Abnahme der Produktion unter den Wert der Kontrolle. Maltose bzw. Stärke hatten weder eine fördernde noch eine hemmende Auswirkung. Eine mögliche Erklärung hierfür liegt in der Fähigkeit, diese Substanzen metabolisieren zu können. So wurde für *Dermaococcus abyssi*, den nächsten Verwandten von *Dermaococcus* sp. MT 1.2 gezeigt, dass dieser keine Maltose abbauen kann [PATHOM-AREE *et al.*, 2006a], was somit auch für *Dermaococcus* sp. MT 1.2 zutreffen könnte. Weshalb Stärke keinen Einfluss auf die Produktion hat, ist nicht geklärt. Möglicherweise kann dieser Stamm im Gegensatz zu *Dermaococcus abyssi* diese Kohlenstoffquelle ebenfalls nicht abbauen oder die Abbaurrate ist so gering, so dass Auswirkungen erst nach dem in dieser Arbeit getesteten Zeitraum zu erkennen sind.

Ein weiterer essentieller Bestandteil jedes Kultivierungsmediums ist die Stickstoffquelle, da dieses Element für den Aufbau vieler Produkte aus dem Primär- und Sekundärstoffwechsel benötigt wird [MASUREKAR, 2008]. Da Phenazine stickstoffhaltige Sekundärmetabolite darstellen, wurde versucht, die Biosynthese durch Erhöhung des Stickstoffangebots zu verbessern. Dies wurde durch den Zusatz verschiedener organischer bzw. anorganischer Verbindungen getestet. In allen Fällen war eine Abnahme der Produktion von Dermacozin C zu verzeichnen. Dies könnte für seine zunehmende Umsetzung zu Dermacozin B sprechen, bei der ein Hydroxyl-Rest der Säuregruppe durch eine Aminogruppe ersetzt wird (vgl. Abbildung 6). Eine ähnliche Reaktion wurde bei der Synthese von Phenazin-1-Carboxamid von *Pseudomonas chlororaphis* beschrieben. Dabei katalysiert PhzH, eine Transamidase, die Umsetzung einer Säuregruppe zum Säureamid [CHIN-A-WOENG *et al.*, 2001]. Das Gen *phzH* wurde ebenfalls auf dem Cosmid MW_A9 identifiziert. Dermacozin C enthält neben einem Säureamid an C₆ eine Säuregruppe an C₁, während Dermacozin B zwei Säureamide an C₁ und C₆ besitzt, was für die Umsetzung von Dermacozin C zu

B spricht. Glutamin könnte dabei als Aminogruppendonor fungieren, wie dies bei der Phenazin-1-Carboxamid-Synthese in *Pseudomonas chlororaphis* gezeigt wurde [CHIN-A-WOENG *et al.*, 2001]. Die Zugabe von Glutamin resultierte jedoch in einer gleichmäßigen Abnahme der Konzentration beider Dermacozone, d. h. Glutamin fördert die Produktion bzw. Umsetzung in keinster Weise.

Die Zugabe von Stickstoff führte zu einer Abnahme der Synthese aller Dermacozone, was für die Vermutung von IWAI & OMURA [1982] spricht, dass die Sekundärstoffproduktion meist erst nach dem Verbrauch der Stickstoffquelle einsetzt. Die Metabolisierung von Stickstoff wurde jedoch nicht untersucht, daher kann an dieser Stelle keine Aussage über einen Zusammenhang zwischen Stickstoffverbrauch und Dermacozone-Synthese getroffen werden.

Des Weiteren wurde versucht, durch zielgerichtete Biosynthese die Ausbeute von Dermacozone Z zu steigern. Dieses Phenazinderivat hat einen N-Acetyl-Cysteinrest über eine Thioetherbindung am C₉ des Phenazin-Grundkörpers gebunden (vgl. Abbildung 42), so dass eine Erhöhung der Cystein-Konzentration die Biosynthese dieser Substanz fördern könnte. Dies bestätigte sich jedoch nicht; die Zugabe von 0,1 bis 1 % Cystein hatte keinen Einfluss auf die Produktion (Daten nicht gezeigt).

Komplexe Nährstoffquellen wie Hafermehl, Hefe- oder Malzextrakt beinhalten sowohl Kohlen- als auch Stickstoffquellen und dienen als Nahrungsgrundlage, wenn schnell metabolisierbare Nährstoffquellen im Medium bereits verbraucht sind. Durch den Zusatz dieser Komponenten sollte wie schon beim Einsatz von Stärke und Maltose einem Nährstoffmangel entgegengewirkt werden. Mit einer Verdopplung der Hafermehlmenge von 0,5 auf 1 % wurde eine Produktionssteigerung von 15 % erzielt, mit Zugabe von 1 % Malzextrakt stieg die Dermacozone-Ausbeute um 12,5 %. Alle weiteren Zusätze hatten keinen Einfluss auf die Dermacozone-Produktion. Derartige komplexe Nährstoffquellen haben den Nachteil, dass ihre Qualität stark von einzelnen Chargen der Produkte abhängig ist. Hefeextrakt soll hier als Beispiel erwähnt werden. Es wird durch thermische Lyse in Anwesenheit von Lösungsmitteln oder Salzen von Bäcker- oder Brauhefe erzeugt [KELLY, 1983]. ZHANG *et al.* [2002] zeigten, dass verschiedene Chargen von Hefeextrakt deutlich unterschiedliche Auswirkungen auf das Wachstum und die Antigen-Produktion in einem rekombinanten *Saccharomyces cerevisiae*-Stamm haben. Um dieses Problem zu umgehen, wurden in dieser Arbeit soweit möglich die gleichen Chargen dieser Komponenten verwendet.

Wie bereits beschrieben stellte sich die Verdopplung der Konzentration von Glucose bzw. Hafermehl sowie die Zugabe von Malzextrakt zu Nährlösung 410 im Einzelnen als produktionssteigernd heraus. Durch Kombination dieser Nährstoffe wurde die Produktion von Dermacozin C in allen Ansätzen nur um ca. 20 % erhöht, was jedoch auch schon durch die alleinige Zugabe der doppelten Glucose-Menge erreicht werden konnte. Malzextrakt und Hafermehl haben somit auch nach dem Verbrauch der Glucose (96 Stunden nach Kultivierungsbeginn) keinen entscheidenden Effekt mehr auf die Dermacozin-Synthese.

Anhand der Variation der Medienzusammensetzung konnte in dieser Arbeit die Sekundärstoff-Produktion in *Dermacoccus* sp. MT 1.2 verbessert werden. Eine Verdopplung der Glucose- und CaCO₃-Konzentration auf 2 % bzw. 0,2 % hatte sich dabei als optimal herausgestellt, so dass diese Bedingungen in spätere Produktionsfermentationen übertragen wurden.

In einer früheren Studie hatte sich herausgestellt, dass die Kultivierung von *Dermacoccus* sp. MT 1.2 im 10 Liter-Bioreaktor zu einer enormen Schaumentwicklung führte, die eine Dermacozin-Produktion in ausreichenden Mengen unmöglich machte. Auch durch die Zugabe des Antischaummittels Ucolub N 115 konnte die Schaumbildung nicht unter Kontrolle gebracht werden. Zudem senkte diese Substanz die Produktion von Dermacozin C um ca. 80 - 90 % [WAGNER, 2009]. Daher wurde versucht, die Schaumentstehung durch Zugabe verschiedener Reagenzien chemisch zu vermindern. Mit Ausnahme von Spülmittel zeigten alle Substanzen einen schaumreduzierenden Effekt in Schüttelkulturen. Die beste Wirkung wurde dabei mit Genapol 2882 bzw. Agrimuester Derivat 1 erreicht, die schon in geringen Mengen die Schaumbildung vollständig unterdrückten. Die beiden Substanzen gehören wie auch Agrimul COS2 zu den Polyalkoholen, die als effektive Antischaummittel bei der Fermentation beschrieben sind, indem sie die Oberflächenspannung von Flüssigkeiten herabsetzen [JUNKER, 2007]. Im Gegensatz dazu verhindern Soja- und Sonnenblumenöl nicht die Bildung des Schaums, sondern führen zu dessen Kollabieren, indem die gebildeten Blasen größer und damit instabiler werden [VARDAR-SUKAN, 1988, 1991].

Antischaumzusätze können einen erheblichen Einfluss auf Wachstum und Sekundärstoffproduktion haben [JUNKER *et al.*, 2001]. Es zeigte sich, dass die verwendeten Substanzen nicht nur den Schaum, sondern auch die Dermacozin-Produktion herabsetzen. Dies war vor allem für Genapol 2882 zu beobachten, das schon in einer Konzentration von 0,1 % die Dermacozin C-Synthese vollständig inhibierte. Agrimulester Derivat 1 hingegen senk-

te unter Verwendung der gleichen Menge die Dermacoazin C-Menge um nur 17 %, wobei es die Schaumbildung nahezu komplett unterdrückte. Aus diesem Grund wurde dieses Reagenz für die Kultivierung von *Dermacoccus* sp. MT 1.2 im 10 Liter-Bioreaktor eingesetzt. Das in den Schüttelkulturen beobachtete Verhalten konnte dabei jedoch nicht reproduziert werden, die beiden Fermenter schäumten unter Zugabe von 0,1 bzw. 0,5 % Agrimulester Derivat 1 innerhalb von 48 Stunden fast vollständig aus. Dies wird nicht auf die Zusammensetzung des Mediums zurückgeführt, da ein Ausschäumen im Kontrollfermenter zu diesem Zeitpunkt der Kultivierung noch nicht zu beobachten war. Möglicherweise war die zugesetzte Menge des Antischaummittels nicht ausreichend für die Fermentation im 10 Liter-Bioreaktor, in dem eine höhere Durchmischung der Kultur und eine gesteigerte Sauerstoffzufuhr die Schaumbildung begünstigen könnte. Im Kontrollfermenter, in dem die Schaumbildung durch Zugabe von Ucolub N 115 vermindert wurde, fiel die Produktion von Dermacoazin C mit 23,5 mg/l deutlich geringer aus als in vorherigen Versuchen in Schüttelkulturen ohne Zusatz von Antischaummitteln (ca. 85 mg/l). Dies konnte jedoch nicht auf ein reduziertes Wachstum der Bakterien zurückgeführt werden, da im Fermenter die maximal gemessene DNA-Konzentration ca. dreimal höher war als im Schüttelkolben. Des Weiteren konnte im Gegensatz zu anderen Fermentationsansätzen eine Abnahme des pH-Werts beobachtet werden. Beide Effekte sind vermutlich auf die Zugabe von Ucolub N 115 zurückzuführen.

Da die verwendeten Antischaummittel entweder die Produktivität deutlich senkten oder keine Schaumreduktion bewirkten, wurde in einem weiteren Experiment versucht, den entstehenden Schaum mechanisch durch ein Propellerrad an der Drehwelle des Fermenters zu zerschlagen. Hierdurch konnte das Ausschäumen effektiv verhindert werden. Im Vergleich zum Kontrollansatz, in dem die Schaumbildung durch Ucolub N 115 reduziert wurde, war die Dermacoazin C Ausbeute im Fermenter mit Propellerrad um ca. 30 mg höher. Der Verlust von ca. zwei Litern Kultur ist mit dem einer Fermentation ohne Propellerrad (ca. 1,5 l) zu vergleichen und auf das Belüftungssystem zurückzuführen. Somit stellte sich die mechanische Zerschlagung des Schaums als eine effektive Methode heraus, die Schaumentwicklung zu reduzieren ohne die Produktion zu inhibieren.

In einem weiteren Experiment wurde die Auswirkung der Vorkulturen auf die Schaumbildung untersucht. Es stellte sich heraus, dass Vorkulturen, die 24 bzw. 48 Stunden schüttelnd und anschließend 48 bzw. 24 Stunden stehend inkubiert worden waren, nicht nur einen positiven Einfluss auf die Schaumbildung im Fermenter, sondern auch auf die Produktivität hatten. Im Vergleich zum Kontrollfermenter, der mit 72 Stunden geschüttelten

Vorkulturen angeimpft worden war, nahm dabei die Produktion der Dermacozine C, L und W um ungefähr das Doppelte zu, während sich die Ausbeute von Dermacozin K um ca. 15 bis 25 % erhöhte. Dies wird nicht auf ein erhöhtes Wachstum der Dermacoccen zurückgeführt, da der Verlauf von Biomasse und DNA-Gehalt in allen Ansätzen vergleichbar war. Bereits in früheren Studien wurde beschrieben, dass die Vorkulturen das Wachstum und die Sekundärstoffproduktion von Mikroorganismen beeinflussen können, allerdings bezog sich dies auf deren Inkubationszeit [DIETER, 2002; HORNBAEK *et al.*, 2004; NEVES *et al.*, 2001]; über die Verwendung von kombinierten Schüttel-/Standvorkulturen liegen bislang in der Literatur keine Daten vor. Eine Möglichkeit für die erhöhte Produktion nach Standinkubation wäre eine Aktivierung der Dermacozin-Synthese aufgrund des Sauerstoffmangels. WANG *et al.* [2010] zeigten, dass die Synthese von Phenazinen das Überleben von *Pseudomonas aeruginosa* unter anaeroben Bedingungen ermöglichen kann. Dies könnte ebenfalls für die Dermacoccen zutreffen, die in ihrem natürlichen Habitat in den Tiefen des Marianengrabens vermutlich unter mikroaerophilen Bedingungen leben. Die Dermacozine könnten dabei anstelle von Sauerstoff als Elektronenakzeptoren in der Atmungskette dienen. Diese Vermutung wird durch die beschriebene antioxidative Wirkung der Dermacozine unterstützt (s. u.), was ihre Fähigkeit verdeutlicht, Elektronen abzufangen. Das Hauptprodukt Dermacozin C zeigte dabei die stärkste Radikalfänger-Eigenschaft [ABDEL-MAGEED *et al.*, 2010].

4.2 Isolierung und Charakterisierung der Dermacozine

Da durch die Verwendung von Standvorkulturen das Problem der Schaumbildung im Fermenter behoben und dabei zugleich die Produktivität gesteigert werden konnte, wurden diese Bedingungen in die Produktionsfermentation übertragen. Dabei konnten die Ergebnisse aus dem vorherigen Versuch reproduziert werden, die Verwendung von kombinierten Schüttel-/Standvorkulturen reduzierte die Schaumbildung und erhöhte gleichzeitig die Produktion.

Wie auch schon bei den vorherigen Fermentationen wurde beobachtet, dass Glycerin und Glucose gleichzeitig verstoffwechselt werden, die Produktion jedoch erst nach dem vollständigen Verbrauch von Glycerin einsetzt. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass zunächst ausreichend Zellmasse aufgebaut werden muss, bevor die Synthese der Der-

macozine einsetzt. Auch bei der Produktion anderer Sekundärmetabolite hatte sich gezeigt, dass Glycerin gleichzeitig mit Glucose abgebaut wird [MANTZOURIDOU *et al.*, 2008], d. h. eine Kohlenstoff-Katabolitrepression liegt in diesem Fall nicht vor.

Im Vergleich zu den Ansätzen in Schüttelkolben lieferten die Fermentationen im 10 Liter-Bioreaktor trotz der Optimierung der Kultivierungsbedingungen insgesamt nur geringe Dermacozin-Ausbeuten, was auf die unterschiedliche Belüftung, stärkere Durchmischung der Kultur und auftretende Scherkräfte im Fermenter zurückzuführen ist. Dennoch konnten die Dermacozine K, L, W, Z, RT 2.3, RT 3.37 und RT 4.6 in ausreichender Menge isoliert werden. Für die Dermacozine P und RT 6.8 wurden hingegen nur geringe Ausbeuten erzielt. Dies ist u. a. auf Probleme beim Isolierungsprozess zurückzuführen. Die erste Schwierigkeit stellte dabei die schlechte Löslichkeit der Dermacozine in Lösungsmitteln dar, die für chromatographische Trennungen verwendet werden. Dadurch fielen die Dermacozine häufig nach dem Auftragen auf die Säule aus und lagerten sich auf dem Säulenkopf ab. Das nachlaufende Fließmittel löste nur einen kleinen Teil des aufgetragenen Produkts, wodurch sehr breite Banden entstanden, die oftmals noch zahlreiche andere Substanzen enthielten. Ein weiteres Problem stellte die Instabilität der Dermacozine während der chromatographischen Reinigung dar. Bei der Trennung an XAD-16 mit anschließender Ethylacetat-Extraktion gingen ca. 20 bis 50 % der Zielsubstanzen verloren, was evtl. in deren Zerfall begründet ist. Der höchste Substanzverlust war bei der anschließenden Reinigung an LiChroprep Diol zu beobachten (30 - 60 %). In einer früheren Studie wurden ähnliche Verluste bei der Dermacozin-Reinigung beschrieben [WAGNER, 2009]. Allerdings konnte auf die beiden Aufreinigungsschritte nicht verzichtet werden, da sie eine effektive Abtrennung nicht erwünschter Komponenten erlaubten. Es wurden verschiedene alternative Adsorberharze getestet (XAD-1600, XAD-7 und SP-207), mit denen jedoch die gleichen Verluste zu beobachten waren (Daten nicht gezeigt). Bei anschließenden Reinigungsschritten mittels Adsorptions- und Ausschlusschromatographie an Sephadex LH-20 bzw. Fractogel TSK HW 40-F wurden Ausbeuten von 80 bis 93 % der aufgetragenen Menge erzielt

Die Gesamtausbeute lag für Dermacozin K bei 14,5 %, für Dermacozin L bei 22 %, für Dermacozin W bei 5 %, für Dermacozin Z bei 19 % und für Dermacozin RT 3.37 bei 5,3 %. Die Ausbeuten der Dermacozine P, RT 2.3, RT 4.6 und RT 6.8 konnten nicht berechnet werden, da diese Substanzen zu instabil waren und daher sofort nach dem letzten

Reinigungsschritt getrocknet, mit Stickstoff begast und eingefroren wurden. Im Fall von Dermacozin RT 2.3 konnte keine Bilanzierung vorgenommen werden, da der Substanz-Peak in HPLC-Analysen mit mehreren anderen Peaks überlagert war.

Die Charakterisierung der isolierten Dermacozine führte zu dem Ergebnis, dass sich alle Substanzen durch ein charakteristisches UV-Maximum zwischen 260 und 300 nm auszeichnen, wie dies auch für die meisten anderen Phenazine zu beobachten ist. Daneben sind im UV-Vis-Spektrum weitere Maxima zu erkennen, die sich jedoch von Substanz zu Substanz unterscheiden, was in den unterschiedlichen Seitengruppen begründet ist. Bezüglich der Strukturformeln zeigen sich ebenfalls Übereinstimmungen. Das Basismolekül stellt Phenazin-1,6-Dicarbonsäure dar, die u. a. durch aromatische Seitenreste modifiziert ist. Des Weiteren ist bei allen bislang bekannten Dermacozinen jeweils das Stickstoffatom an Position 5 des Heterozyklus methyliert. Zudem zeigte sich, dass die Carboxyl-Gruppen teilweise oder vollständig amidiert vorliegen. In *Pseudomonas chlororaphis* katalysiert PhzH die Amidierung von Phenazin-1-Carbonsäure zu Phenazin-1-Carboxamid [CHIN-A-WOENG *et al.*, 2001]. Auf dem Dermacozin-Gencluster wurde ebenfalls ein Gen identifiziert (*orf13*), das diese Transamidase codiert, was darauf hindeutet, dass eine solche Amidierung auch im Dermacozin-Biosyntheseweg vorkommt. Dies wird für die Dermacozine B, C und L vermutet, die die gleiche Grundstruktur besitzen, sich jedoch hinsichtlich ihres Amidierungsgrades unterscheiden. Dabei zeigt Dermacozin L zwei Säuregruppen, während die Dermacozine C und B stattdessen eine bzw. zwei Säureamidgruppen besitzen (vgl. Abbildung 51). Ihre Molekulargewichte unterscheiden sich nur um 1 g/mol (Dermacozin L 386 g/mol, Dermacozin C 387 g/mol, Dermacozin B 388 g/mol), ihre UV-Vis-Spektren sind dabei sehr ähnlich (vgl. Abbildung 51).

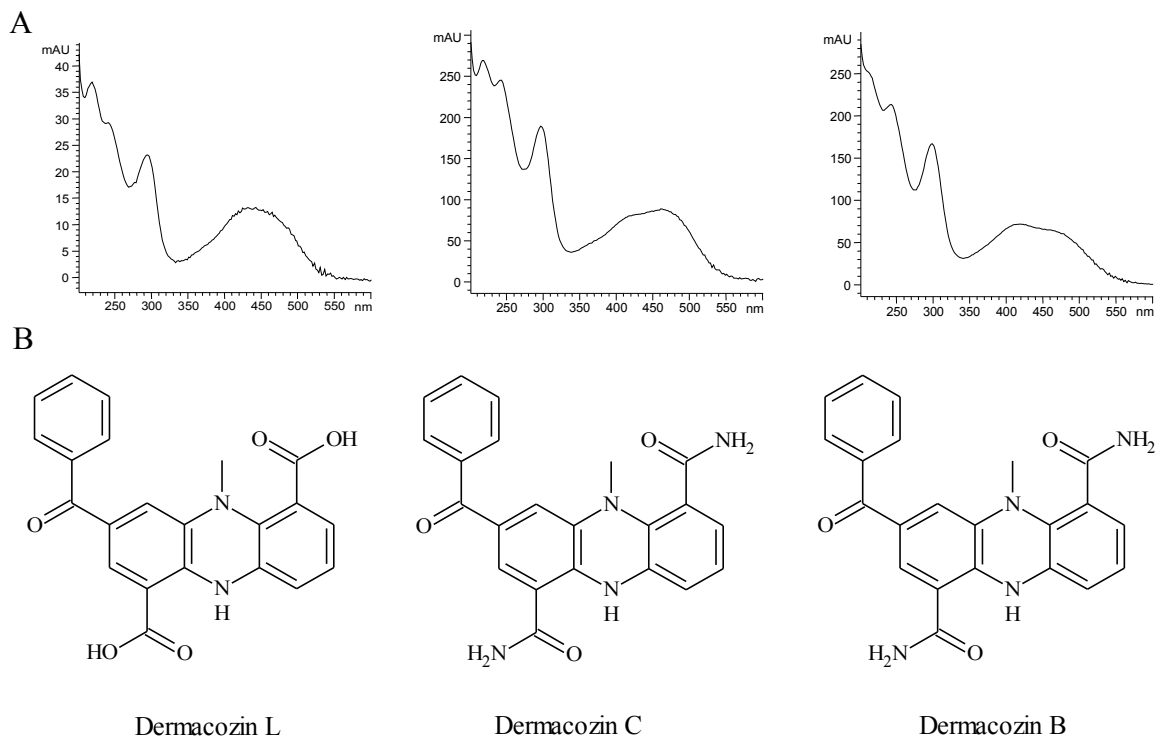


Abbildung 51: UV-Vis-Spektren (A) und Strukturen (B) der Dermacozine B, C und L

Ähnliche Amidierungsreaktionen werden auch für die Dermacozine RT 4.97, RT 6.45 und RT 8.3 vermutet. Ihre Strukturen sind zwar bislang noch nicht aufgeklärt, ihre UV-Vis-Spektren sind jedoch nahezu identisch (Abbildung 52) und ihre Molekulargewichte unterscheiden sich ebenfalls jeweils um 1 g/mol (557, 558 bzw. 559 g/mol). Daher wird vermutet, dass die Dermacozine RT 6.45 und RT 8.3 durch Amidierung einer bzw. zweier Säuregruppen von Dermacozin RT 4.97 entstanden sind.

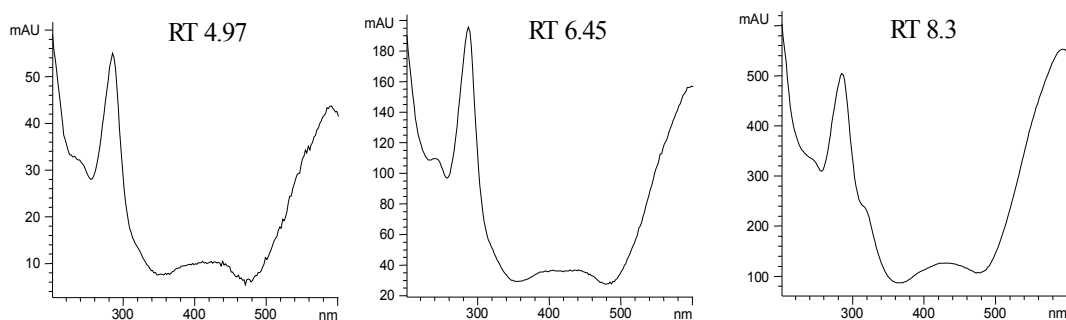


Abbildung 52: UV-Vis-Spektren der Dermacozine RT 4.67, RT 6.45 und RT 8.3

Der Stamm *Dermacoccus* sp. MT 1.2 zeigt ein enormes Biosynthese-Potential, wenn man bedenkt, dass neben den bekannten Dermacozinen A - G [ABDEL-MAGEED *et al.*, 2010] und den in dieser Arbeit isolierten Substanzen bei deren Aufreinigung noch 26 weitere Sekun-

därstoffe gefunden wurden, die aufgrund ihrer UV-Vis-Spektren vermutlich alle zur Dermacozin-Familie gehören. Allerdings sind die produzierten Mengen dieser Substanzen so gering, dass die Produktion weiter optimiert werden muss, um sie in ausreichender Konzentration zu erhalten.

4.3 Biologische Wirkung der isolierten Dermacozine

Für keines der in dieser Studie isolierten Dermacozine konnte eine antibakterielle bzw. antifungische Wirkung gegenüber Standard-Testorganismen nachgewiesen werden. Für eine Vielzahl von Phenazinen ist in der Literatur eine gute antimikrobielle Aktivität beschrieben, wobei insbesondere Gram-positive Bakterien gehemmt werden [LAURSEN & NIELSEN, 2004]. Für die Dermacozine C und F wurde in vorangegangenen Arbeiten eine geringe inhibitorische Wirkung gegenüber verschiedenen human- und pflanzenpathogenen Bakterien gezeigt [WAGNER, 2009]. Die mangelnde Aktivität der neuen Dermacozin-Derivate K, L, W und Z ist evtl. auf die Modifikationen des Phenazin-Grundkörpers zurückzuführen, wie dies bereits von LAURSEN & NIELSEN [2004] für andere Phenazine beschrieben wurde. Da sowohl verschiedene Gram-positive als auch Gram-negative Bakterien sowie unterschiedliche Pilze getestet wurden, ist es eher unwahrscheinlich, dass diese neuen Dermacozine überhaupt eine antibakterielle bzw. antifungische Wirkung haben, zumal die getesteten Konzentrationen mit 100 μM relativ hoch lagen.

Die Dermacozine C, L, W und Z wurden zusätzlich auf ihre antitumorale Wirkung untersucht. Dabei wurde lediglich für Dermacozin W eine geringe zytotoxische Aktivität festgestellt. In früheren Studien wurde auch für andere Phenazin-Derivate eine starke Zytotoxizität beschrieben [KIM *et al.*, 2007; LI *et al.*, 2007]; so inhibieren beispielsweise vier verschiedene N⁵,N¹⁰-Dioxid-Phenazin-Derivate kolorektale Karzinom-Zellen (Caco-2-Zellen) mit hoher Effektivität [PACHÓN *et al.*, 2008]. ABDEL-MAGEED *et al.* [2010] wiesen für die Dermacozine A bis G eine zytotoxische Aktivität gegenüber der Zelllinie K 562 der humanen akuten myeloischen Leukämie auf, wobei die Dermacozine F und G die stärkste Wirkung zeigten. Dies ist vermutlich ebenfalls auf die Modifikation des Phenazin-Grundkörpers zurückzuführen, da sich diese beiden Substanzen in ihrer Struktur deutlich von den anderen getesteten Dermacozinen unterscheiden (vgl. Abbildung 6 und Abbildung 42). Vermutlich ist die Position des aromatischen Seitenrestes für die antitumorale Wirkung entscheidend.

Die Testierung in Enzymassays ergab für die Dermacozine C, L, W und Z nur geringe inhibitorische Wirkungen gegenüber der Acetylcholinesterase und Phosphodiesterase 4. Für Dermacozin C wurden in einer früheren Studie bereits geringe enzymhemmende Eigenschaften beschrieben [WAGNER, 2009], die in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden konnten. Die Phosphodiesterase 4 baut cAMP und cGMP ab und tritt vornehmlich in den Lungen auf. Die Inhibition dieses Enzyms wirkt entzündungshemmend, was bei der Behandlung der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung sowie bei Asthma induziert wird [LIPWORTH, 2005]. Die Acetylcholinesterase baut Acetylcholin im synaptischen Spalt ab; eine Hemmung dieses Enzyms und die damit verbundene Anreicherung dieses exzitatorischen Neurotransmitters resultiert in einer Erhöhung des Parasympathikotonus, was zu Krämpfen u. a. des Magen-Darm-Traktes und der Atemmuskulatur führen kann [BENZI & MORETTI, 1998]. Im Enzymtest hemmte Dermacozin L ebenfalls diese beiden Enzyme, allerdings etwas schlechter als Dermacozin C. Die Dermacozine W und Z inhibierten nur die Phosphodiesterase 4. Die Aktivität der reversen Transkriptase wurde von keiner getesteten Substanzen beeinflusst. Alle bislang getesteten Dermacozine zeigten somit keine ausgeprägte enzyminhibierende Wirkung, wie dies für andere Phenazine z. B. anhand der Hemmung der Topoisomerase I [YANG *et al.*, 2005] oder der Cyclooxygenase 1 und 2 [KONDRATYUK *et al.*, 2012] beschrieben wurde.

Was die antioxidative Wirkung der Dermacozine anbelangt, zeigte Dermacozin RT 4.6 die höchste Aktivität; dabei lag der IC₅₀-Wert von 10,7 µM sogar unter der des natürlichen Antioxidans Ascorbinsäure (12,5 µM). Die anderen getesteten Dermacozine wiesen eine mäßige antioxidative Wirkung auf. Die Dermacozine A, B, C und D sind bereits als Radikalfänger bekannt [ABDEL-MAGEED *et al.*, 2010]. Innerhalb der Dermacozin-Familie zeichnete sich Dermacozin C als stärkster Radikalfänger aus, wobei der IC₅₀-Wert (8,4 µM) sogar unter dem der Ascorbinsäure lag. Betrachtet man die IC₅₀-Werte der Dermacozine B, C und L (38 µM, 8,4 µM bzw. 14 µM) erkennt man, dass diese maßgeblich von der Amidierung der Carboxylgruppen beeinflusst werden (vgl. Abbildung 51). Dabei scheint es förderlich zu sein, wenn eine der beiden Carboxylgruppen amidiert ist, wie dies bei Dermacozin C der Fall ist. Im Gegensatz dazu reduziert das Vorhandensein von zwei Carboxylgruppen (Dermacozin L) bzw. Carboxamidgruppen (Dermacozin B) die Radikalfänger-Eigenschaft.

Untersuchungen bzgl. der antiparasitischen Wirkung der Dermacozine befinden sich noch in Bearbeitung. Für die Dermacozine A bis G konnte bereits eine Hemmung von *Trypanosoma brucei brucei*, *Leishmania donovani* bzw. menschlichen Lungen-Fibroblasten

(MRC 5) nachgewiesen werden (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Frearson, Centre of Interdisciplinary Research, University of Dundee; unveröffentlichte Daten). Eine Hemmung von *Leishmania donovani*, dem Erreger der viszeralen Leishmaniose [NEUBER, 2008], zeigte vor allem Dermacozin F (EC_{50} von $0,39 \mu\text{M}$). Diese Substanz inhibierte ebenfalls menschliche Lungenfibroblasten (EC_{50} von $0,43 \mu\text{M}$), was für die anderen getesteten Dermacozine nicht beobachtet wurde (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Frearson; unveröffentlichte Daten). Die stärkste Hemmung von *Trypanosoma brucei brucei* zeigte Dermacozin C mit einem EC_{50} -Wert von $0,28 \mu\text{M}$ gefolgt von Dermacozin E ($1,57 \mu\text{M}$), Dermacozin F ($2,01 \mu\text{M}$), Dermacozin B ($2,71 \mu\text{M}$) und Dermacozin D ($20,53 \mu\text{M}$). Die mittlere inhibitorische Konzentration der Dermacozine A und G lag über $50 \mu\text{M}$. *Trypanosoma brucei brucei* ist ein für den Menschen nicht infektiöser Parasit, der jedoch mit den Erregern der Schlafkrankheit (*Trypanosoma brucei gambiense* und *Trypanosoma brucei rhodesiense*) verwandt ist [BARRETT *et al.*, 2003].

Kürzlich wurden für verschiedene Phenazin-Derivate ebenfalls hohe, spezifische inhibitorische Aktivitäten gegenüber *Trypanosoma brucei brucei* beschrieben. Dabei hob sich insbesondere Griseolone B mit einem IC_{50} -Wert von $0,4 \mu\text{M}$ hervor [OTOGURO *et al.*, 2010]. Somit stellen Phenazin-Derivate potente antiparasitische Hemmstoffe dar, weshalb für die in dieser Arbeit isolierten, jedoch bislang nicht getesteten Substanzen ebenfalls eine solche Wirkung erwartet wird, zumal sie chemisch große Ähnlichkeiten zu den Dermacozinen A - G aufweisen. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die unterschiedlichen Substitutionen die antiparasitische Aktivität beeinflussen.

4.4 Identifizierung des Dermacozin-Genclusters

Zur Identifizierung des Dermacozin-Genclusters in *Dermacoccus* sp. MT 1.2 wurde eine Genbibliothek des gesamten Genoms hergestellt, die ca. 20.000 Klone umfasste. Dies stellte eine ausreichende Größe dar, um mit großer Wahrscheinlichkeit einen Klon zu finden, der das gesamte Gencluster beinhaltet. Die Genbibliothek wurde nach *phzF* und *phzB* durchsucht, da diese für die Phenazin- und somit auch für die Dermacozin-Biosynthese essentiellen Gene hoch konserviert sind [MAVRODI *et al.*, 2010]. Dabei konnten mittels PCR relativ einfach unter ca. 500 Klonen neun Cosmide identifiziert werden, die dieses Kriterium erfüllten. Mit Hilfe von Restriktionsanalysen konnte abgeschätzt werden, dass die Inserts (Genomfragmente) dieser Cosmide theoretisch ausreichend groß sind, um das gesamte Gencluster zu tragen. Durch den Vergleich mit Genclustern anderer Phenazin-

Produzenten wurde die Größe von dem der Dermacozine auf ca. 20 kb geschätzt. Spätere Analysen der Sequenzdaten zeigten jedoch, dass die tatsächliche Größe deutlich höher liegt (s. u.). Die Sequenzierung der Insert-Enden führte zu dem Ergebnis, dass mit Ausnahme eines Cosmids vermutlich alle Cosmide das vollständige Gencluster enthalten, da an ihren Enden keine Gene des Sekundärstoffwechsels identifiziert wurden. Zur vollständigen Sequenzierung wurde das Cosmid MW_A9 ausgewählt, da es alle nötigen Kriterien erfüllte. Auf diesem Cosmid konnten die Gene *phzB*, *phzD*, *phzE*, *phzF* und *phzG* identifiziert werden, die essentiell für die Synthese der Phenazin-1,6-Dicarbonsäure sind [MAVRODI *et al.*, 2010] (vgl. 1.5.2). Dies korreliert mit der Annahme, die sich aus der Strukturaufklärung ergibt, dass dieses Molekül die Vorstufe der Dermacozine darstellt.

Ein Äquivalent zu PhzA, das die Dimerisierung von zwei Molekülen 6-Amino-5-Oxocyclohex-2-en-1-Carbonsäure zur Phenazin-1,6-Dicarbonsäure katalysiert, wurde nicht gefunden. Allerdings könnte *orf9* ein rudimentäres Gen hierfür darstellen, da das codierte Protein anhand bioinformatischer Analysen der NTF2-Proteinfamilie, zu der PhzA und PhzB gehören, zugeordnet wurde. Es wurde jedoch auch gezeigt, dass in anderen Phenazin-Produzenten, die hauptsächlich Phenazin-1,6-Dicarbonsäure und dessen Derivate bilden, kein Gen für PhzA vorliegt und dessen Funktion von PhzB übernommen wird [MAVRODI *et al.*, 2010].

Zu den Grundgenen gehört des Weiteren *phzC*, das für eine DAHP-Synthase codiert. Dieses Gen konnte vollständig zwischen *orf9* und *orf10* identifiziert werden, allerdings führte die Analyse der Sequenzdaten zu dem Ergebnis, dass es kein eigenes Stoppcodon besitzt und dieses mit dem von *orf10* (*phzD*) identisch ist. Eine Möglichkeit wäre, dass PhzC und PhzD ein Fusionsprotein bilden. Dies wird jedoch ausgeschlossen, da PhzD ein Homodimer bildet [PARSONS *et al.*, 2003], was durch die Fusionierung mit PhzC unmöglich wäre. Zudem treten die durch PhzC und PhzD katalysierten Reaktionen an zwei völlig unterschiedlichen Stellen im Biosyntheseweg auf. Während PhzC die Kondensation von Erythrose-4-Phosphat und Phosphoenolpyruvat zu DAHP katalysiert, spaltet PhzD Pyruvat von ADIC ab, so dass DHHA entsteht (vgl. Abbildung 5) [MENTEL *et al.*, 2009]. Um auszuschließen, dass die Sequenzierung im Bereich zwischen *orf9* und *orf10* fehlerhaft war oder dass während der Erstellung der Genbibliothek eine Mutation im Stoppcodon auftrat, wurde dieser Bereich auf dem Cosmid MW_A9 nochmals sequenziert und mit dem Ergebnis der Sequenzierung der entsprechenden Region auf der genomischen DNA von *Derma-coccus* sp. MT 1.2 verglichen. Alle Sequenzen waren dabei identisch, d. h. auch in der genomischen DNA besitzt *phzC* kein eigenes Stoppcodon. Auch im Phenazin-Gencluster

von *Erwinia herbicola* ist PhzC nicht codiert, das Endprodukt *D*-Alanylgriseolinsäure kann jedoch trotzdem synthetisiert werden [GIDDENS *et al.*, 2002]. Möglicherweise wird in solchen Fällen die Funktion von PhzC von anderen DAHP-Synthasen übernommen, die in jedem bakteriellen Primärstoffwechsel mehrfach vorkommen [HERRMANN, 1995a, 1995b]. Auf dem sequenzierten Gencluster wurden zudem die Gene *phzH* und *phzM* identifiziert. PhzH katalysiert die Transamidierung von Carbonsäuren in Säureamide, wobei Glutamin als Aminogruppen-Donor fungiert [CHIN-A-WOENG *et al.*, 2001; MAVRODI *et al.*, 2001]. PhzM ist eine N-Methyltransferase, die eine Methyl-Gruppe von S-Adenosyl-Methionin auf ein Stickstoffatom der Phenazin-1,6-Dicarbonsäure überträgt [GOHAIN *et al.*, 2006; MAVRODI *et al.*, 2001]. Dies korreliert mit der Annahme, die sich aus der Strukturaufklärung ergibt, dass derartige Reaktionen in der Biosynthese der Dermacozone stattfinden. Anhand der Ergebnisse der bioinformatischen Analysen (vgl. u. a. Tabelle 43 und 44) wurde ein Modell des Dermacozone-Biosynthese-Genclusters erstellt (Abbildung 53). Die Reihenfolge und Richtung der Gene wurde dabei anhand der Sequenzdaten unter Verwendung des Programms Artemis ermittelt.

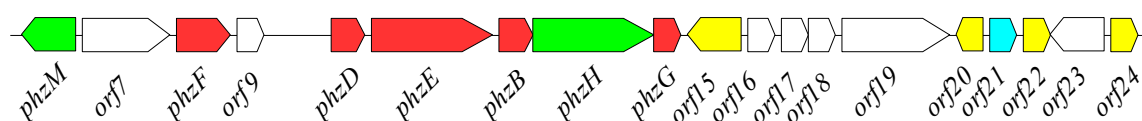


Abbildung 53: Schematische Genkarte des möglichen Dermacozone-Biosynthese-Genclusters in *Dermacoccus* sp. MT 1.2; rot = Grundgene; grün = modifizierende Gene; hellblau = Resistenzgen; gelb = regulatorische Gene; weiß = Beteiligung nicht bekannt

phzM (*orf6*) stellt mit großer Wahrscheinlichkeit das erste Gen des Clusters dar, da alle anderen Gene strangaufwärts (in 5'-Richtung) aufgrund ihrer Ähnlichkeit in Sequenz bzw. Faltung vermutlich dem Primärmetabolismus zuzuordnen sind. Diese codieren eine DNA-Methyltransferase (*orf2*), eine Topoisomerase (*orf4*) bzw. eine Transposase/Integrase (*orf5*). Die Funktion von *orf1* und *orf3* ist unbekannt, allerdings wird vermutet, dass sie nicht Teil des Genclusters sind, da sie sonst durch die Sequenzen der DNA-modifizierenden Enzyme (*orf2*, *orf4*, *orf5*) vom restlichen Gencluster abgetrennt wären, was in dieser Art bislang noch in keinem Phenazin-Produzenten gezeigt wurde. Für *Streptomyces cinnamonensis* wurde beschrieben, dass die Biosynthese-Gene auf zwei Genloci aufgeteilt sind, die jedoch ca. 40 kb auseinander liegen [SEEGER *et al.*, 2011]. Es ist dennoch nicht ausgeschlossen, dass die beiden Gene *orf1* und *orf3* für die Dermacozone-Synthese notwendige Enzyme codieren, dazu muss jedoch erst die Funktion der Proteine aufgeklärt werden.

Zwischen *orf24* und *orf25* liegt ein ca. 1,4 kb großer, nicht-codierender Bereich, der das Dermacozin-Gencluster am 3'-Ende abtrennen könnte. Diese Hypothese wird dadurch gestützt, dass alle Gene strangabwärts von *orf24* ebenfalls für Proteine aus dem Primärstoffwechsel codieren. Auffällig dabei ist, dass es sich wie auch schon bei den Genen strangaufwärts von *phzM* um DNA-modifizierende Enzyme handelt. Dies lässt vermuten, dass das Dermacozin-Gencluster im Laufe der Evolution in diese Region integriert wurde, so dass diese in zwei Teile getrennt wurde. Diese Annahme wird durch die Tatsache verstärkt, dass Orf5 und Orf7 Homologien zu einer Transposase/Integrase bzw. einem Rekombinationsfaktor zeigen. Diese Enzyme könnten die Integration des Dermacozin-Gencluster vermittelt haben. Ähnliche Vermutungen wurden auch für die Phenazin-Gencluster von *Burkholderia glumae* und *Burkholderia lata* getroffen, bei denen sich ebenfalls codierende Sequenzen für Transposasen in räumlicher Nähe zu den Phenazin-Synthesegenen befinden. Es wurde angenommen, dass diese über horizontalen Gentransfer in die Bakterien gelangt sind [MAVRODI *et al.*, 2010].

Orf15, Orf20, Orf22 und Orf24 zeigen Homologien zu regulatorischen Proteinen, was ihre Funktion als Regulatoren der Dermacozin-Biosynthese vermuten lässt. Derartige Proteine sind in Phenazin-Genclustern vor allem bei Pseudomonaden zu finden, wo sie eine Rolle beim Quorum Sensing spielen. PhzI produziert hierbei Homoserin-Lactone, die an PhzR binden, das wiederum die Expression bestimmter Gene aktiviert [MAVRODI *et al.*, 2006; PIERSON *et al.*, 1994; WOOD *et al.*, 1997]. Des Weiteren wurde Orf21 der Familie der Glyoxalasen/Bleomycin-Resistenzproteine zugeordnet, die u. a. dafür bekannt sind, dass sie toxische Substanzen unschädlich machen. Dies wurde beispielsweise für EhpR beschrieben, das *Enterobacter agglomerans* vor seinem eigens synthetisierten Phenazin-Derivat *D*-Alanylgriseoluteinsäure (vgl. Abbildung 2) schützt. Dieses ist toxisch, da es die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies fördert. EhpR bindet an die Substanz und unterstützt als Chaperon seinen Export aus der Zelle [YU *et al.*, 2011]. *orf21* könnte ebenfalls ein solches Resistenzgen darstellen, das den Dermacozin-Produzenten vor seinen hergestellten Phenazin-Derivaten schützt, vorausgesetzt, dass diese überhaupt toxisch für ihn sind. Im Agardiffusions- bzw. Mikrotiterplattentest wurden keine Dermacoccen als Testorganismen verwendet, allerdings zeigten die getesteten Dermacozine auch keine Aktivität gegenüber anderen Bakterien. Möglicherweise dient Orf21 unabhängig von seiner Wirkung auf den Produzenten dem Export der Dermacozine. Diese Sekundärmetabolite sind fast ausschließlich im Kulturfiltrat zu finden, was zeigt, dass sie aus der Zelle freigesetzt werden.

Als nächste Homologe mit bekannter Struktur wurden für Orf17 Thiosulfat-Sulfurtransferasen aus *E. coli*, *Mycobacterium tuberculosis* und *Arabidopsis thaliana* ermittelt. Inwieweit ein solches Enzym, das ein Schwefelatom von Thiosulfat auf ein anderes Molekül wie z. B. Cyanid überträgt [HOROWITZ & CRISCIMAGNA, 1982], an der Herstellung der Dermacozine beteiligt sein könnte, wird später anhand eines möglichen Biosynthese-Schemas erläutert (vgl. Abbildung 54). Dies gilt auch für Orf16, dessen Faltung Ähnlichkeit zu bakteriellen Chorismat-Mutasen zeigt, die an der Umsetzung von Chorismat zu Prephenat beteiligt sind [CHOOK *et al.*, 1994] sowie für Orf23, dessen Struktur ähnlich ist zu Aryles-terasen aus *Pseudomonas fluorescens*, die zu den alpha-/beta-Hydrolasen gehören. Diese Enzyme spalten aromatische Esterverbindungen, die anschließend unterschiedlich weiter genutzt werden können [SHAW *et al.*, 1994]. Die Funktion von Orf18 konnte anhand von Sequenz- und Strukturvergleichen nicht ermittelt werden, daher kann nichts über seine mögliche Beteiligung an der Dermacozin-Biosynthese ausgesagt werden.

Die Faltung von Orf19, die mittels Phyre vorhergesagt wurde, zeigt hohe Ähnlichkeit zu einer tRNA-abhängigen Amidotransferase aus *Pyrococcus abyssi*. Dieses Enzym wandelt Glutamat, das auf eine tRNA mit dem Anticodon für Glutamin beladen wurde, in Glutamin um [SCHMITT *et al.*, 2005]. Womöglich übernimmt dieses Enzym in der Dermacozin-Biosynthese eine Funktion entsprechend PhzH, das die Transamidierung von Carbonsäuren zu Carbonsäureamiden katalysiert. Eine andere Möglichkeit wäre, dass das Protein durch die Umwandlung von Glutamat in Glutamin sicherstellt, dass ausreichend Glutamin als Substrat für PhzH zur Verfügung steht. Sequenzvergleiche mittels BLASTx führten zu dem Ergebnis, dass Orf19 eine Ähnlichkeit zu *L*-Asparaginasen vom Typ II zeigt, die Asparagin in Aspartat spalten. Daraus könnte man schließen, dass Asparagin evtl. als Aminogruppen-Donor für Transamidierungsreaktionen dient. Die Zugabe von Asparagin resultierte jedoch in einer Abnahme der Konzentration von Dermacozin B und C (vgl. Abbildung 17), d. h. Asparagin fördert die Produktion bzw. Umsetzung in keinster Weise.

Falls alle diese Gene von *phzM* bis *orf24* Teil des Dermacozin-Genclusters sind, umfasst dieses 19 Gene und ist mit einer Größe von ca. 30 kb größer als alle anderen bislang identifizierten Phenazin-Gencluster, die zwischen 15 und 20 kb umfassen [MENTEL *et al.*, 2009]. Im Gegensatz dazu liegen die (vermuteten) Dermacozin-Biosynthesegene in einer anderen Reihenfolge vor (vgl. Abbildung 3). So liegt *phzF* vor *phzH* und *phzB*, während die Grundgene in den meisten anderen Phenazin-Produzenten in alphabetischer Reihenfolge vorkommen [MENTEL *et al.*, 2009].

Ausgehend von den annotierten Genen und deren eben beschriebenen Funktionen wurde ein mögliches Biosynthese-Schema erstellt (Abbildung 54).

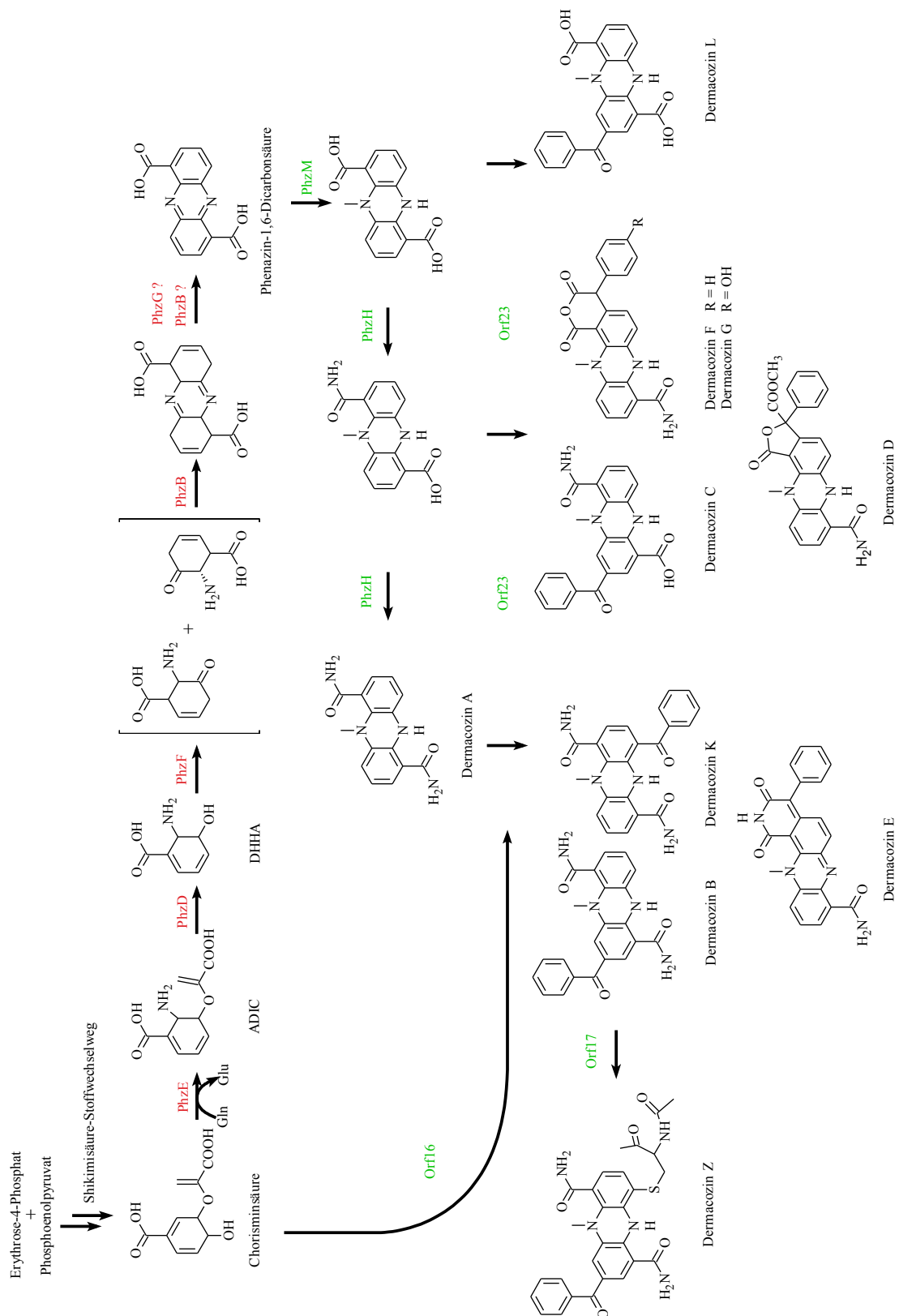


Abbildung 54: Modell der Biosynthese der bislang bekannten Dermacozine; rot = Grundenzyme; grün = modifizierende Enzyme; ADIC, 2-Amino-2-Desoxyisochorisminsäure; DHHA, 2,3-Dihydro-3-Hydroxyanthranilsäure; Gln, Glutamin; Glu, Glutamat

Die Biosynthese bis zur Phenazin-1,6-Dicarbonsäure wurde bereits ausführlich in 1.5.2 erläutert. Da alle bislang charakterisierten Dermacozine Derivate dieser Verbindung darstellen, dient diese wahrscheinlich als Vorstufe für die weitere Synthese. Im ersten Schritt wird Phenazin-1,6-Dicarbonsäure dabei vermutlich durch PhzM N-methyliert. Da alle Dermacozine an Position 5 einen solchen Methylrest aufweisen, deutet dies darauf hin, dass die Reaktion sehr früh während der Biosynthese stattfindet. Anschließend könnte PhzH die Säuregruppen amidieren, so dass Säureamid-Derivate entstehen; derartige Zwischenprodukte konnten im Rahmen dieser Arbeit anhand ihrer Masse identifiziert werden (Daten nicht gezeigt). Diese Reaktion scheint für die weitere Biosynthese jedoch nicht essentiell zu sein, da sowohl vollcarboxylierte, als auch halb- bzw. vollamidierte Zwischenprodukte nachgewiesen werden konnten (Daten nicht gezeigt). Im nächsten Schritt folgt vermutlich die Addition verschiedener aromatischer Seitenketten. Dies könnte von Orf23 katalysiert werden, das Homologie zu Arylesterasen aufweist, die aromatische Esterverbindungen spalten. Ein Vergleich aller bekannter Dermacozin-Strukturen zeigt, dass mindestens drei verschiedene aromatische Seitenreste, die Ähnlichkeiten zur Benzoesäure, Phenyllessigsäure bzw. *para*-Hydroxy-Phenyllessigsäure haben, vorkommen (vgl. Abbildungen 6 und 42). SHAW *et al.* [1994] beschrieben, dass Arylesterasen sich durch eine breite Substratspezifität auszeichnen, was bedeuten könnte, dass Orf23 für all diese Additionen verantwortlich ist. Welche Substrate das Enzym dabei tatsächlich verwendet, ist bislang nicht bekannt. Deren Bereitstellung könnte von Orf16 vorgenommen werden, dessen Faltung hohe Ähnlichkeit zu bakteriellen Chorismat-Mutasen aufweist, die Chorismat in Prephenat umsetzen. Die Aminosäuresequenz des Proteins ist zu 80 % identisch mit einer vorhergesagten Endoribonuklease aus *Streptomyces hygrosopicus*, die ebenfalls zur Proteinfamilie der Chorismat-Mutasen gehört. Eine Aufreinigung von Orf16 und *in vitro*-Untersuchungen zur Umsetzung von Chorismat könnten nähere Aufschlüsse bzgl. seiner Funktion liefern.

Die für Orf17 vorhergesagte Struktur weist hohe Ähnlichkeit zu Thiosulfat-Sulfurtransferasen auf. Ein solches Enzym könnte an der Synthese von Dermacozin Z beteiligt sein, indem es einen N-Acetyl-Cystein-Rest auf Dermacozin B überträgt. Um dies zu bestätigen sind *in vitro*-Analysen bzgl. der Umsetzung von Dermacozin B zu Z mit gereinigtem Protein durchzuführen. Allerdings ist nicht bekannt welches Substrat dabei verwendet wird, da bereits festgestellt wurde, dass die Zugabe von Cystein keinen Einfluss auf die Produktion der Dermacozine hat (vgl. 4.1). Evtl. stammt der Cysteinrest wie bei der Cephalosporin-Synthese in *Cephalosporium acremonium* von S-Adenosyl-Homocystein. Dabei wurde

gezeigt, dass das Substrat zunächst in Homocystein umgewandelt wird, bevor es anschließend in Cystathionin und letztendlich zu Cystein umgesetzt wird [DREW & DEMAIN, 1975]. Die N-Acetylierung des Cysteins könnte durch eine N-Acetyltransferase katalysiert werden. Auf dem Dermacozin-Gencluster konnte kein Gen für eine N-Acetyltransferase identifiziert werden, die die N-Acetylierung des Cysteins katalysiert. Derartige Enzyme übertragen Acetyl-Reste von Acetyl-Coenzym A auf Stickstoff-Atome [BUTCHER *et al.*, 2002]. Zudem ist nicht bekannt, ob diese Reaktion vor oder nach der Ausbildung der Thioetherbindung vermittelt wird.

Des Weiteren ist die Funktion von Orf18 und Orf19 bislang unbekannt, da in bioinformatischen Analysen lediglich Sequenz- bzw. Faltungsähnlichkeiten zu uncharakterisierten Proteinen gefunden wurden.

Somit sind zur Überprüfung des vorgeschlagenen Biosynthese-Wegs noch weitere Studien erforderlich. Vor allem müssen durch die Charakterisierung der Proteine bzw. durch Geninaktivierungsexperimente die Funktionen einzelner Gene identifiziert werden. Bislang waren Versuche zur DNA-Übertragung mittels Protoplastentransformation und Konjugation von *Dermaococcus* sp. MT 1.2 nicht erfolgreich (Daten nicht gezeigt), sodass eine Deletion der vermuteten Synthesegene nicht durchgeführt werden konnte. Daher sollte das auf MW_A9 identifizierte Gencluster mittels heterologer Expression in *Streptomyces lividans* TK23 verifiziert werden. Es zeigte sich jedoch, dass die Exokonjuganten keine Dermacozine bzw. Phenazine produzierten, obwohl nachgewiesen wurde, dass das Cosmid im Genom des *Streptomyces*-Stammes integriert worden war (vgl. Abbildung 49). Daher wurde vermutet, dass evtl. das Signal fehlt, das die Transkription regulatorischer Gene aktiviert. Derartige Regulatoren kontrollieren in anderen Phenazinproduzenten die Expression der Synthesegene [MAVRODI *et al.*, 2006]. Auf dem Cosmid MW_A9 wurden vier mögliche regulatorische Gene (*orf15*, *orf20*, *orf22* und *orf24*) identifiziert. Durch deren gezielte Überexpression auf einem Plasmid mit Hilfe des konstitutiven Promotors *ermE** wurde versucht, dieses externe Signal zu umgehen. Allerdings zeigte sich dabei ebenfalls keine Dermacozin-Produktion. Dies könnte zum einen darin begründet sein, dass die Proteine gar keine Regulatoren darstellen, allerdings zeigten sie in Sequenz und Faltung eine hohe Ähnlichkeit zu bekannten regulatorischen Proteinen. Des Weiteren wäre es möglich, dass es sich bei allen vier Genen nicht um Aktivatoren, sondern um Repressoren der Expression handelt. Zudem wäre es denkbar, dass ein weiteres Gen in der Regulationskette fehlt. So wurde beispielsweise bei Phenazin-produzierenden Pseudomonaden gezeigt, dass zwei Gene, *phzR* und *phzI*, essentiell für die Phenazin-Synthese sind. Fehlt eines der regulatori-

schen Gene, erfolgt keine Produktion [MAVRODI *et al.*, 2006]. Darüberhinaus wäre es möglich, dass der Produktionsstamm während der Kultivierung das Plasmid verloren hat, das das jeweilige regulatorische Gen enthielt. Es wurde jedoch stets auf entsprechende Antibiotika selektioniert, sodass der Verlust des Plasmids zum Absterben der Zellen geführt hätte, allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass resistente Klone entstanden sind. Da keines der regulatorischen Gene einen positiven Einfluss auf die Transkription des Dermacozin-Genclusters zeigte, sollte dessen Aktivierung durch die Einführung des konstitutiven Promotors *ermE** erreicht werden. Dieser wurde dabei vor *phzF* kloniert, das das erste Grundgen auf dem Cluster darstellt. Es zeigte sich wiederum keine Produktion der Dermacozine in den Exokonjuganten, obwohl die Integration des Cosmids MW_A9_int_ermE ins Genom von *S. lividans* TK23 nachgewiesen werden konnte (Abbildung 50). Kürzlich wurde mit der gleichen Methode ein stilles Phenazin-Gencluster aus *Streptomyces tendae* in *Streptomyces coelicolor* M512 erfolgreich exprimiert [SALEH *et al.*, 2012]. Daher wurde erwartet, dass die identifizierten Dermacozin-Biosynthesegene mit Hilfe dieses Promotors exprimiert werden können, selbst wenn es sich um ein stilles Gencluster handelt. Eine mögliche Erklärung wäre, dass während bzw. nach der Integration des Cosmids in das *Streptomyces*-Genom Mutationen im Promotorbereich auftraten, sodass die Expression nicht aktiviert werden konnte. Es wurden jedoch vier verschiedene Exokonjuganten getestet, so dass es unwahrscheinlich ist, dass dies in allen vier Fällen auftrat. Es wäre auch denkbar, dass die Dermacozine toxisch auf *S. lividans* TK23 wirken und somit nur die Klone selektioniert werden, in denen das Gencluster aufgrund von Mutationen nicht mehr funktionsfähig ist. Eine weitere Erklärung wäre, dass das Fehlen des Stoppcodons von *phzC* (Bereich zwischen *orf9* und *orf10*) dazu führt, dass das Gen gemeinsam mit *phzD* exprimiert wird und sich ein Fusionsprotein bildet, das nicht mehr funktionstüchtig ist. Dies könnte darin resultieren, dass die von PhzD katalysierte Hydrolyse von ADIC zu DHHA nicht mehr durchgeführt werden kann (vgl. Abbildung 54). Eine Akkumulation von ADIC konnte jedoch nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Dies ist vermutlich darin begründet, dass es nicht nur als Vorstufe für Phenazine, sondern auch für weitere aromatische Verbindungen wie Anthranilsäure, Tryptophan oder *pABA* dient [MOROLLO & BAUERLE, 1993; SCHADT *et al.*, 2009]. Mittels Sequenzierung wurde festgestellt, dass das *phzC*-Gen auch im Genom von *Dermacoccus* sp. MT 1.2 kein eigenes Stoppcodon besitzt. Da der Stamm trotzdem *phzC* Dermacozine produzieren kann, spricht dies dafür, dass das in dieser Arbeit identifizierte Gencluster nicht funktionell ist. Dies könnte auf eine oder mehrere Mutationen in den Grundgenen zurückzuführen sein, so dass

funktionell nicht mehr aktive Proteine entstehen und die Umsetzung der Zwischenprodukte blockiert ist. Darüber hinaus wäre es möglich, dass auf dem Genom von *Dermacoccus* sp. MT 1.2 noch ein weiteres funktionstüchtiges Phenazin-Gencluster vorhanden ist, das die Synthese der Dermacozine erlaubt, dieses jedoch nicht auf dem Cosmid enthalten ist. Ebenso könnte sich ein weiteres Gen für PhzD an einer anderen Stelle im Genom befinden, das für ein funktionell aktives Protein codiert. Eine ähnliche Beobachtung wurde für *Streptomyces cinnamomensis* gemacht, dessen Phenazin-Gencluster in zwei 40 kb auseinanderliegende Bereiche getrennt wurde, wobei die Gene *phzC* und *phzG* doppelt vorkommen [SEEGER *et al.*, 2011].

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass das in der vorliegenden Arbeit identifizierte Gencluster aus *Dermacoccus* sp. MT 1.2 nicht verifiziert werden konnte. Dafür sind weitere Studien notwendig (vgl. Kapitel 5).

5 Ausblick

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Wasserqualität einen großen Einfluss auf die Dermacozin-Synthese von *Dermaococcus* sp. MT 1.2 hat, allerdings konnte nicht geklärt werden, welche im Wasser gelösten Spurenelemente dabei entscheidend sind. Um dies zu untersuchen, könnte man NL 410 erneut mit deionisiertem Wasser herstellen und verschiedene Spurenelemente einzeln bzw. in Kombination in verschiedenen Konzentrationen zusetzen. Evtl. könnte man somit weitere Bedingungen ermitteln, die die Dermacozin-Produktion steigern.

Mittels heterologer Expression in *Streptomyces lividans* konnte nicht bestätigt werden, dass das identifizierte Gencluster tatsächlich für die Synthese der Dermacozine in *Dermaococcus* sp. MT 1.2 verantwortlich ist. Daher könnte durch Knockout der essentiellen Grundgene im ursprünglichen Produzenten versucht werden, die Produktion auszuschalten und durch Komplementation wiederherzustellen. Somit könnte ausgeschlossen werden, dass in *Streptomyces lividans* entscheidende Signale zur Regulation der Expression der Synthesegene oder weitere essentielle Gene fehlen. Bisherige Versuche zur Übertragung von Plasmid-DNA in *Dermaococcus* sp. MT 1.2 mittels Protoplastentransformation und biparentaler Konjugation waren jedoch erfolglos, sodass dazu weitere Untersuchungen nötig sind. Es könnte versucht werden, Fremd-DNA mittels Transduktion oder Elektroporation zu übertragen. Um auszuschließen, dass ein anderer Codongebrauch die Produktion inhibiert, könnte man weitere Stämme für die heterologe Expression testen, wie z. B. Micrococen, andere Streptomyceten oder genetisch manipulierbare Dermacocen, die selbst keine Phenazine produzieren.

Da für *phzC* kein eigenes Stoppcodon gefunden wurde, wird es vermutlich gemeinsam mit dem nachfolgenden Gen *phzD* abgelesen, so dass evtl. ein nicht funktionstüchtiges Fusionsprotein entsteht. Um zu überprüfen, ob PhzD dabei noch aktiv ist, könnte man dessen Substrat ADIC bei der Kultivierung von *S. lividans*, der das identifizierte Gencluster hinter dem konstitutiven Promotor *ermE** im Genom enthält, zusetzen. Wird ADIC anschließend zu DHHA umgesetzt, ist dies ein Nachweis für die Funktionalität von PhzD. Im Kontrollstamm wird PhzD einzeln, d. h. nicht in Fusion mit PhzC, überproduziert und der Umsatz von ADIC bestimmt.

Um zu überprüfen, ob alle Grundgene überhaupt exprimiert werden, könnte man deren Expressionsraten mittels quantitativer Echtzeit-PCR messen. Dabei könnte man auch feststellen, ob *phzC* und *phzD* gemeinsam transkribiert werden. Zum Nachweis, dass die modifizierenden Gene funktionell sind, könnte man die Umsetzung von Phenazin-1,6-Dicarbonsäure bzw. Phenazin-1-Carbonsäure nach Zugabe zu *S. lividans*, der das identifizierte Gencluster hinter dem konstitutiven Promotor *ermE** im Genom enthält, mittels HPLC-ESI-MS untersuchen.

Um zu überprüfen, ob die vermutlich an der Modifikation von Phenazin-1,6-Dicarbonsäure beteiligten Proteine Orf16, Orf17 und Orf23 diese Funktion tatsächlich ausüben, könnten sie konstitutiv in bekannten Phenazin-1,6-Dicarbonsäure-Produzenten exprimiert werden. Durch Analyse der Produkte mittels HPLC-ESI-MS könnte festgestellt werden, ob die codierten Proteine diese Vorstufe modifizieren können. Des Weiteren könnte man die codierenden Gene auch im Produzenten *Dermaococcus* sp. MT 1.2 deletieren, um zu überprüfen, ob bzw. welche Modifikationen anschließend noch möglich sind. Eine Voraussetzung dafür wäre allerdings, dass der Stamm genetisch manipulierbar.

Zudem könnten *in vitro*-Versuche mit gereinigtem Orf17 Aufschluss darüber geben, inwieweit dieses Protein an der Umsetzung von Dermacozin B zu Dermacozin Z beteiligt ist. Hierzu müsste jedoch zunächst der Donor für den N-Acetyl-Cysteinrest identifiziert werden. Ebenso könnte die Umsetzung von Chorismat durch Orf16 untersucht werden. Mittels HPLC-ES-MS könnte dabei nachvollzogen werden, ob und in welches Produkt die Chorisminsäure umgewandelt wird.

6 Zusammenfassung

Die aus dem Marianengraben isolierten Stämme *Dermaococcus abyssi* MT 1.1 und *D. sp* MT 1.2 sind als Produzenten von sieben neuartigen Phenazin-Derivaten, den Dermacozi-
nen A - G, bekannt. Bei Kultivierung von *Dermaococcus sp.* MT 1.2 wurden neun weitere
Substanzen identifiziert, die aufgrund ihrer UV-Vis-Spektren ebenfalls den Phenazinen zu-
geordnet wurden. Die Produktion dieser Metabolite konnte im Rahmen dieser Arbeit deut-
lich erhöht werden, indem das Kultivierungsmedium und die Fermentationsbedingungen
optimiert wurden. Dabei stellte sich der Zusatz von Glucose und CaCO₃ als besonders ef-
fektiv heraus. Im 10 Liter-Bioreaktor zeigte sich, dass die Verwendung von Vorkulturen,
die zunächst unter Schütteln und anschließend stehend inkubiert worden waren, nicht nur
die Schaumbildung herabsetzten, sondern auch die Produktion aller Zielsubstanzen ver-
doppelte. Die Dermacozine K, L, P, W, Z, RT 2.3, RT 3.37, RT 4.6 und RT 6.8 wurden als
Reinsubstanzen isoliert. Des Weiteren konnte die chemische Struktur von Dermacozin K,
L, Z und RT 3.37 aufgeklärt werden. In biologischen Aktivitätstests stellte sich heraus,
dass einige der isolierten Substanzen sehr gute antioxidative Eigenschaften aufweisen,
wohingegen nur geringe bzw. gar keine antibakterielle, antifungische, antitumorale bzw.
enzymhemmende Wirkungen festgestellt wurden. Zur Identifizierung der für die Derma-
cozin-Produktion verantwortlichen Biosynthesegene wurde eine Cosmid-Genbibliothek
von *Dermaococcus sp.* MT 1.2 hergestellt und erfolgreich nach zwei essentiellen Grundge-
nen des Phenazin-Genclusters durchsucht. Die vollständige Sequenzierung eines ausge-
wählten Cosmids führte zu dem Ergebnis, dass das ca. 40 kb große Insert alle essentiellen
Phenazin-Grundgene (*phzB*, *phzD*, *phzE*, *phzF* und *phzG*) sowie sechs weitere Gene, die
vermutlich an der Modifikation des Phenazin-Grundkörpers beteiligt sind, beinhaltet. Dar-
unter befanden sich u. a. *phzH* und *phzM*, die in anderen Phenazin-Produzenten eine Rolle
bei der Modifikation von Phenazin-1-Carbonsäure bzw. Phenazin-1,6-Dicarbonsäure spie-
len. Des Weiteren wurden vier mögliche regulatorische und ein potentiell Resistenzenz-
bzw. Exportgen identifiziert. Anhand der Ergebnisse der bioinformatischen Analysen wur-
de ein Modell für die Biosynthese der Dermacozine erstellt. Allerdings konnte mittels he-
terologer Expression in *Streptomyces lividans* nicht festgestellt werden, ob es sich um das
für die Reaktionsabfolge der Dermacozin-Biosynthese verantwortliche Gencluster han-
delt, da die Exokonjuganten keine Phenazine produzierten. Dies wurde selbst durch Klo-
nierung eines konstitutiven Promotors vor das erste Phenazin-Grundgen nicht erreicht.

7 Anhang

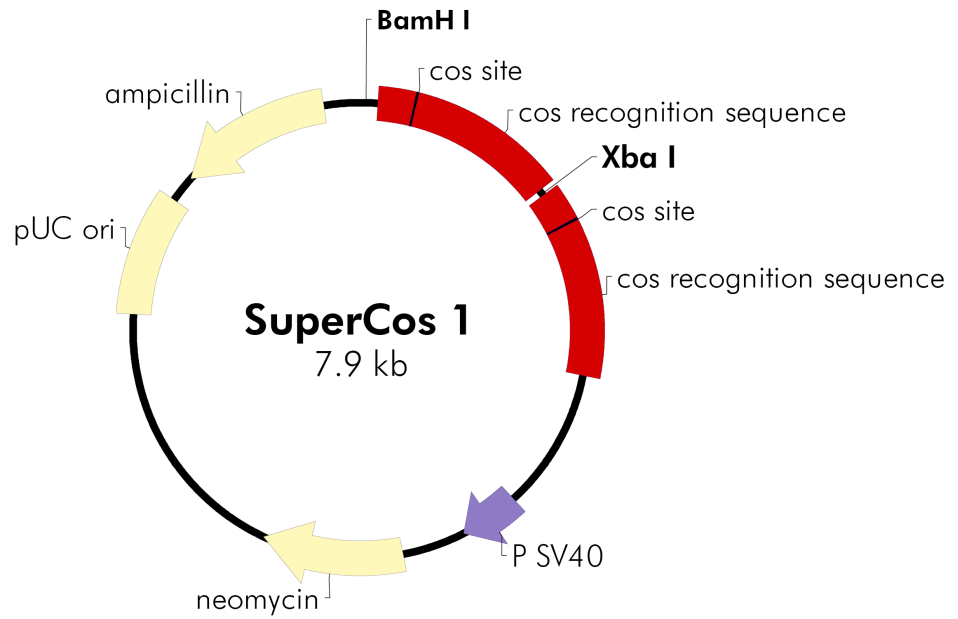


Abbildung 55: Vektorkarte von SuperCos 1 (Stratagene) [EVANS *et al.*, 1989]

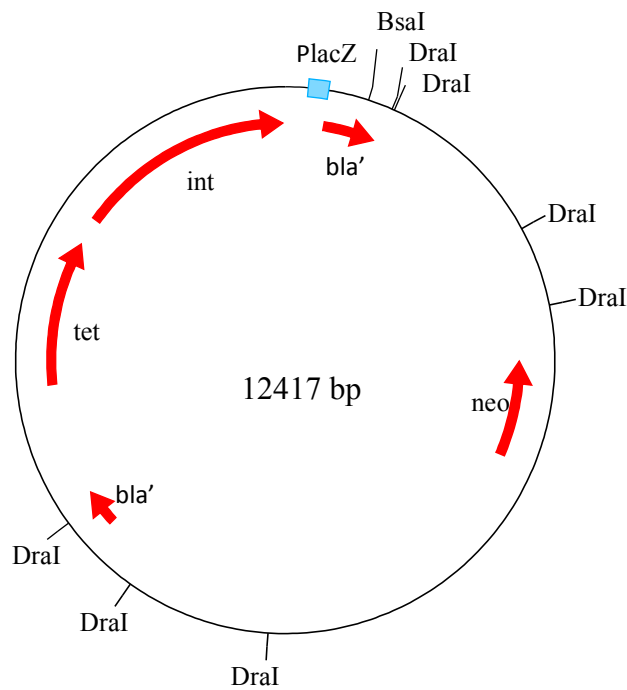


Abbildung 56: Plasmidkarte von pIJ787 (erstellt mit CloneManager 5) [GUST *et al.*, 2004]

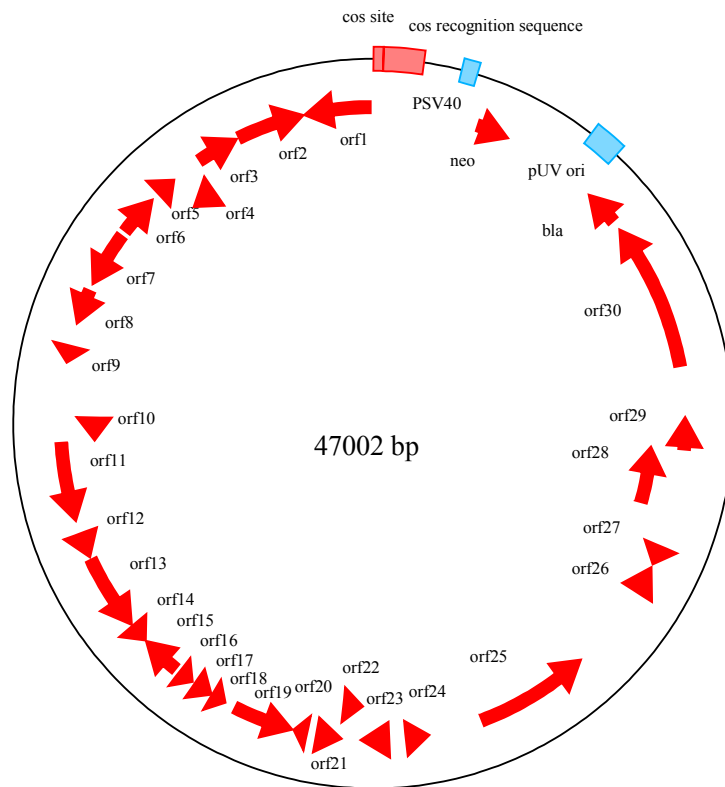


Abbildung 57: Cosmidkarte von MW_A9 (erstellt mit CloneManager 5), diese Arbeit

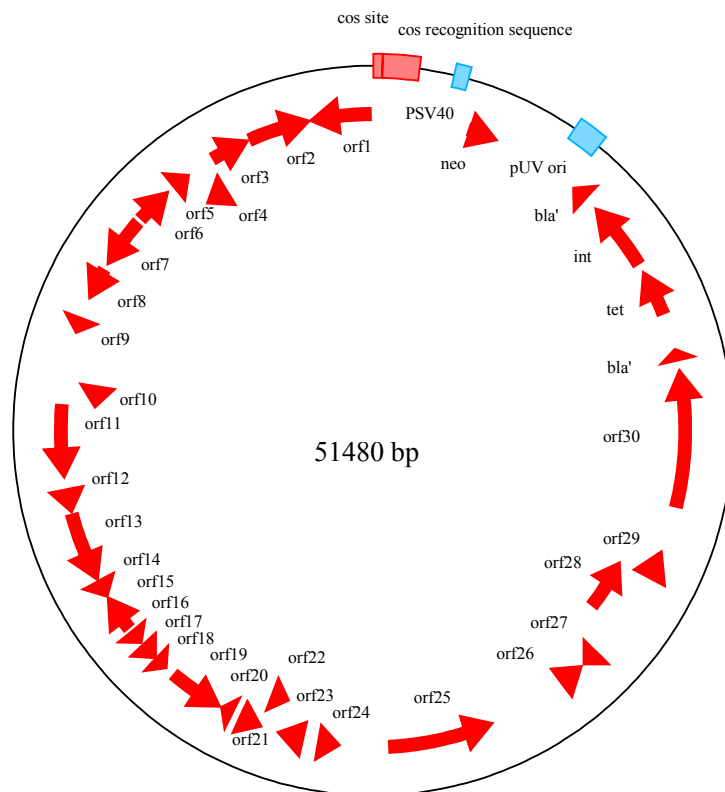


Abbildung 58: Cosmidkarte von MW_A9_int (erstellt mit CloneManager 5), diese Arbeit

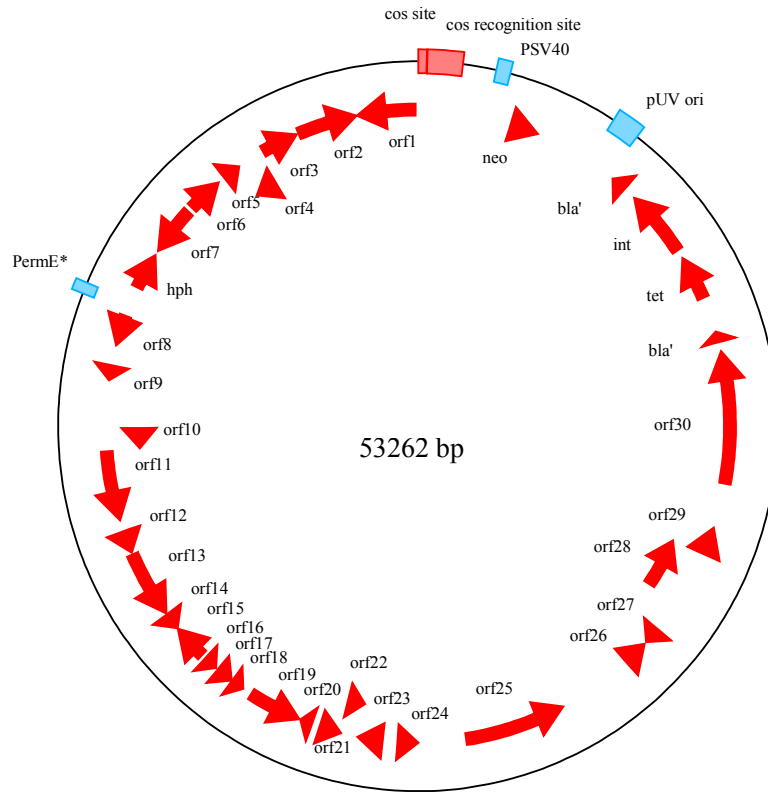


Abbildung 59: Cosmidkarte von MW_A9_int_ermE (erstellt mit CloneManager 5), diese Arbeit

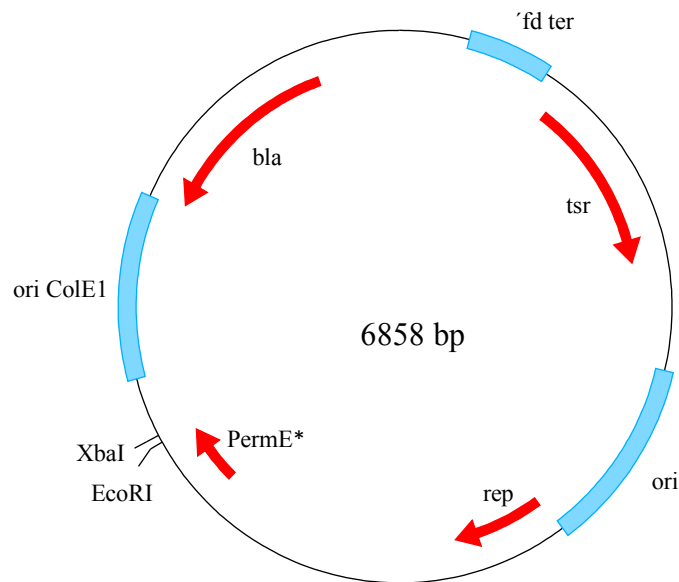


Abbildung 60: Plasmidkarte von pUWL201 (erstellt mit CloneManager 5) [DOUMITH *et al.*, 2000]

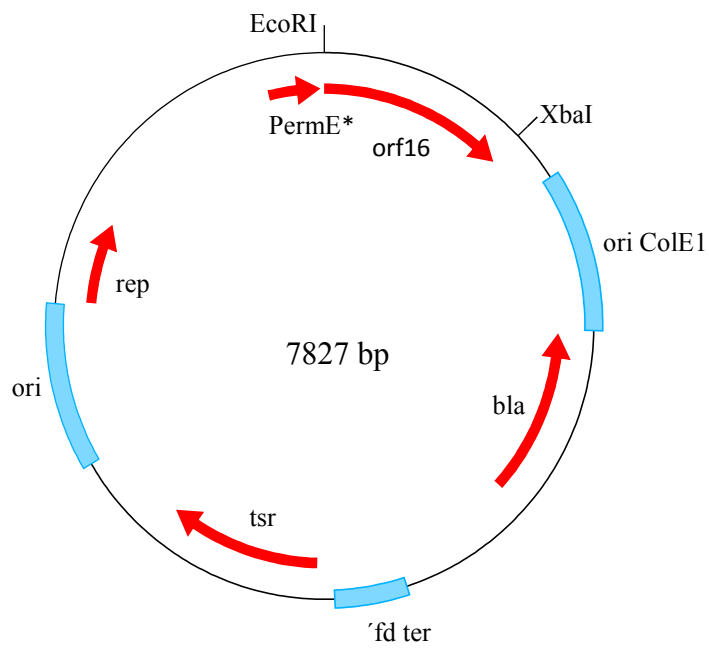


Abbildung 61: Plasmidkarte von pUWL201_orf16 (erstellt mit CloneManager 5), diese Arbeit

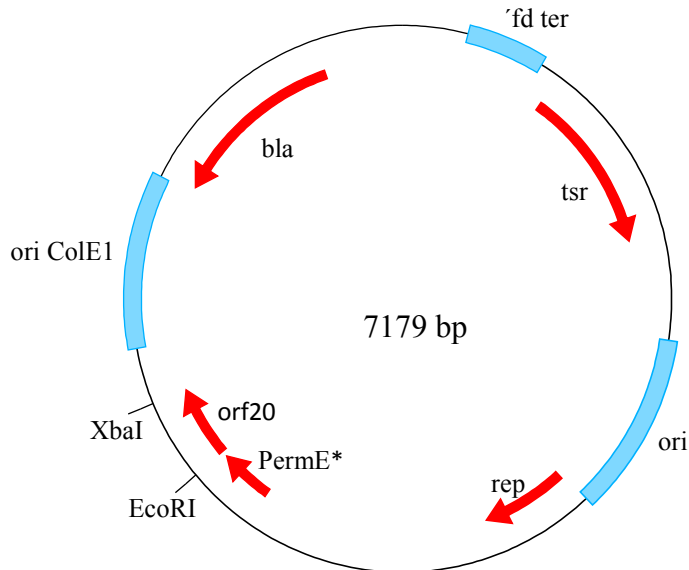


Abbildung 62: Plasmidkarte von pUWL201_orf20 (erstellt mit CloneManager 5), diese Arbeit

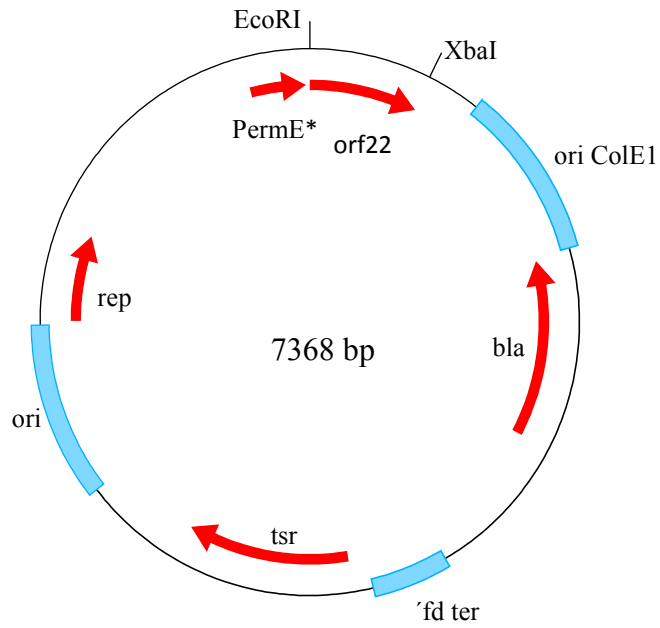


Abbildung 63: Plasmidkarte von pUWL201_orf22 (erstellt mit CloneManager 5), diese Arbeit

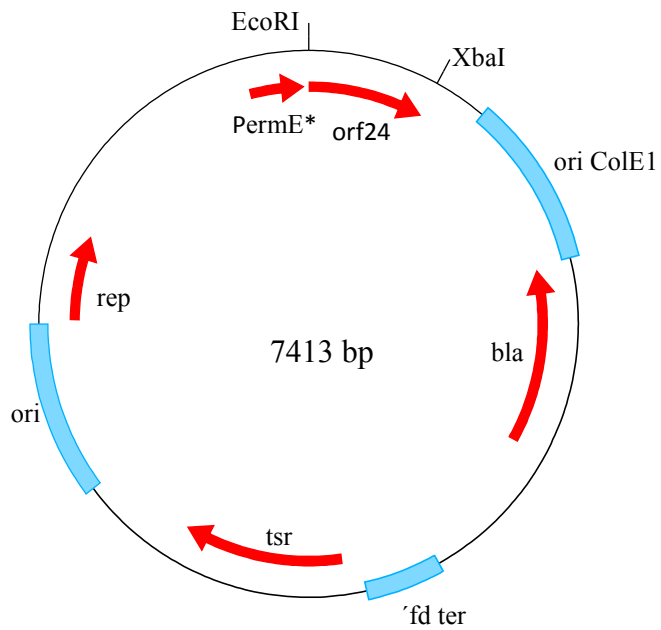


Abbildung 64: Plasmidkarte von pUWL201_orf24 (erstellt mit CloneManager 5), diese Arbeit

8 Literaturverzeichnis

- Abdel-Mageed, W.M., Milne, B.F., Wagner, M., Schumacher, M., Sandor, P., Pathom-aree, W., Goodfellow, M., Bull, A.T., Horikoshi, K., Ebel, R., Diederich, M., Fiedler, H.-P. & Jaspars, M.: Dermacozines, a new phenazine family from deep-sea dermacocci isolated from a Mariana Trench sediment. *Org. Biomol. Chem.* **8**, 2352-2362, 2010.
- Abken, H.J., Tietze, M., Brodersen, J., Bäumer, S., Beifuss, U. & Deppenmeier, U.: Isolation and characterization of methanophenazine and function of phenazines in membrane-bound electron transport of *Methanosarcina mazei* Gö1. *J. Bacteriol.* **180**, 2027-2032, 1998.
- Ahuja, E.G., Janning, P., Mentel, M., Graebisch, A., Breinbauer, R., Hiller, W., Costisella, B., Thomashow, L.S., Mavrodi, D.V. & Blankenfeldt, W.: PhzA/B catalyzes the formation of the tricycle in phenazine biosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 17053-17061, 2008.
- Akimoto, K., Hattori, M., Uematsu, K. & Kato, C.: The deepest living foraminifera, Challenger Deep Mariana Trench. *Mar. Micropaleontol.* **42**, 95-97, 2001.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D.J.: Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**, 3389-3402, 1997.
- Antal, N.: Isolierung und taxonomische Charakterisierung von Actinomyceten aus unterschiedlichen Habitaten Rumäniens – Screening, Fermentation und Sekundärstoffcharakterisierung. Dissertation, Universität Tübingen, 2004.
- Baltz, R.H.: Renaissance in antibacterial discovery from actinomycetes. *Curr. Opin. Pharmacol.* **8**, 557-563, 2008.
- Barrett, M.P., Burchmore, R.J.S., Stich, A., Lazzari, J.O., Frasch, A.C., Cazzulo, J.J. & Krishna, S.: The trypanosomiases. *Lancet* **362**, 1469-1480, 2003.
- Beifuss, U., Tietze, M., Bäumer, S. & Deppenmeier, U.: Methanophenazine: structure, total synthesis, and function of a new cofactor from methanogenic archaea. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **39**, 2470-2472, 2000.
- Bennett, P.M., Grinsted, J. & Richmond, M.H.: Transposition of TnA does not generate deletions. *Mol. Gen. Genet.* **154**, 205-211, 1977.

- Bennett-Lovsey, R.M., Herbert, A.D., Sternberg, M.J.E. & Kelley, L.A.: Exploring the extremes of sequence/structure space with ensemble fold recognition in the program Phyre. *Proteins* 70, 611-625, 2008.
- Benzi, G. & Moretti, A.: Is there a rationale for the use of acetylcholinesterase inhibitors in the therapy of Alzheimer's disease? *Eur. J. Pharmacol.* 346, 1-13, 1998.
- Bérdy, J.: Bioactive microbial metabolites. *J. Antibiot.* 58, 1-26, 2005.
- Bernstein, F.C., Koetzle, T.F., Williams, G.J., Meyer, E.F.J., Brice, M.D., Rodgers, J.R., Kennard, O., Shimanouchi, T. & Tasumi, M.: The protein data bank: a computer-based archival file for macromolecular structures. *J. Mol. Biol.* 112, 535-542, 1977.
- Blankenfeldt, W., Kuzin, A.P., Skarina, T., Korniyenko, Y., Tong, L., Bayer, P., Janning, P., Thomashow, L.S. & Mavrodi, D.V.: Structure and function of the phenazine biosynthetic protein PhzF from *Pseudomonas fluorescens*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 16431-16436, 2004.
- Bull, A.T. & Stach, J.E.M.: Marine actinobacteria: new opportunities for natural product search and discovery. *Trends Microbiol.* 15, 491-499, 2007.
- Bull, A.T., Ward, A.C. & Goodfellow, M.: Search and discovery strategies for biotechnology: the paradigm shift. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64, 573-606, 2000.
- Bull, A.T., Stach, J.E.M., Ward, A.C. & Goodfellow, M.: Marine actinobacteria: perspectives, challenges, future directions. *Antonie van Leeuwenhoek* 87, 65-79, 2005.
- Butcher, N.J., Boukouvala, S., Sim, E. & Minchin, R.F.: Pharmacogenetics of the arylamine N-acetyltransferases. *Pharmacogen. J.* 2, 30-42, 2002.
- Chin-A-Woeng, T.F., Thomas-Oates, J.E., Lugtenberg, B.J. & Bloemberg, G.V.: Introduction of the *phzH* gene of *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 extends the range of biocontrol ability of phenazine-1-carboxylic acid-producing *Pseudomonas* spp. strains. *Mol. Plant Microbe Interact.* 14, 1006-1015, 2001.
- Chook, Y.M., Gray, J.V., Ke, H. & Lipscomb, W.N.: The monofunctional chorismate mutase from *Bacillus subtilis*. Structure determination of chorismate mutase and its complexes with a transition state analog and prephenate, and implications for the mechanism of the enzymatic reaction. *J. Mol. Biol.* 240, 476-500, 1994.
- Ciba-Geigy: Wissenschaftliche Tabellen, Ciba-Geigy, Basel, 1979.

- Cortés, J., Liras, P., Castro, J.M. & Martín, J.F.: Glucose regulation of cephamycin biosynthesis in *Streptomyces lactamdurans* is exerted on the formation of α -aminoadipyl-cysteinyl-valine and deacetoxycephalosporin C synthase. *J. Gen. Microbiol.* *132*, 1805-1814, 1986.
- Datsenko, K.A. & Wanner, B.L.: One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *97*, 6640-6645, 2000.
- Davies, J. & Davies, D.: Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* *74*, 417-433, 2010.
- Dieter, A.: Screening nach Naturstoffen aus acidophilen und alkalophilen Streptomyceten sowie Actinomyceten aus der Antarktis und der Tiefsee. Dissertation, Universität Tübingen, 2002.
- Doumith, M., Weingarten, P., Wehmeier, U.F., Salah-Bey, K., Benhamou, B., Capdevila, C., Michel, J.M., Piepersberg, W. & Raynal, M.C.: Analysis of genes involved in 6-deoxyhexose biosynthesis and transfer in *Saccharopolyspora erythraea*. *Mol. Gen. Genet.* *264*, 477-485, 2000.
- Drew, S.W. & Demain, A.L.: Production of cephalosporin C by single and double sulfur auxotrophic mutants of *Cephalosporium acremonium*. *Antimicrob. Agents Chemother.* *8*, 5-10, 1975.
- Evans, G.A., Lewis, K. & Rothenberg, B.E.: High efficiency vectors for cosmid microcloning and genomic analysis. *Gene* *79*, 9-20, 1989.
- Feling, R.H., Buchanan, G.O., Mincer, T.J., Kauffman, C.A., Jensen, P.R. & Fenical, W.: Salinosporamide A: a highly cytotoxic proteasome inhibitor from a novel microbial source, a marine bacterium of the new genus *Salinospora*. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* *42*, 355-357, 2003.
- Fenical, W. & Jensen, P.R.: Developing a new resource for drug discovery: marine actinomycete bacteria. *Nat. Chem. Biol.* *2*, 666-673, 2006.
- Fiedler, H.-P.: Biosynthetic capacities of actinomycetes. 1. Screening for secondary metabolites by HPLC and UV-visible absorbance spectral libraries. *Nat. Prod. Lett.* *2*, 119-128, 1993.
- Fiedler, H.-P., Bruntner, C., Bull, A.T., Ward, A.C., Goodfellow, M., Potterat, O., Puder, C. & Mihm, G.: Marine actinomycetes as a source of novel secondary metabolites. *Antonie van Leeuwenhoek* *87*, 37-42, 2005.

- Fleming, A.: On the antibacterial action of cultures of a *Penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. *Brit. J. Exp. Pathol.* *10*, 226-236, 1929.
- Fordos, M.J.: Recherches sur la matiere colorante des suppurations bleues: pyocyanine. *C. R. Acad. Sc.* *51*, 215-217, 1860.
- Fryer, P., Becker, N., Applegate, B., Martinez, F., Edwards, M. & Fryer, G.: Why is the Challenger Deep so deep? *Earth Planet. Sci. Lett.* *211*, 259-269, 2003.
- Galbraith, M.D., Giddens, S.R., Mahanty, H.K. & Clark, B.: Role of glutamine synthetase in phenazine antibiotic production by *Pantoea agglomerans* Eh1087. *Can. J. Microbiol.* *50*, 877-881, 2004.
- Giddens, S.R., Feng, Y. & Mahanty, H.K.: Characterization of a novel phenazine antibiotic gene cluster in *Erwinia herbicola* Eh1087. *Mol. Microbiol.* *45*, 769-783, 2002.
- Gierth, A.: Untersuchungen zum Wachstumsverhalten und zur Sekundärstoffproduktion von marinen Actinomyceten aus dem Marianengraben. Diplomarbeit, Universität Tübingen, 2006.
- Gohain, N., Thomashow, L.S., Mavrodi, D.V. & Blankenfeldt, W.: The purification, crystallization and preliminary structural characterization of PhzM, a phenazine-modifying methyltransferase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* *62*, 887-890, 2006.
- Goodfellow, M. & Fiedler, H.-P.: A guide to successful bioprospecting: informed by actinobacterial systematics. *Antonie van Leeuwenhoek* *98*, 119-142, 2010.
- Gurtu, A.K. & Heding, H.: Fermentation studies on elimination of calcium carbonate from streptomycin production medium. *Hindust. Antibiot. Bull.* *21*, 1-10, 1978.
- Gust, B., Challis, G.L., Fowler, K., Kieser, T. & Chater, K.F.: PCR-targeted *Streptomyces* gene replacement identifies a protein domain needed for biosynthesis of the sesquiterpene soil odor geosmin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *100*, 1541-1546, 2003.
- Gust, B., Chandra, G., Jakimowicz, D., Yuqing, T., Bruton, C.J. & Chater, K.F.: λ Red-mediated genetic manipulation of antibiotic-producing *Streptomyces*. *Adv. Appl. Microbiol.* *54*, 107-128, 2004.
- Gust, B., O'Rourke, S., Bird, N., Kieser, T. & Chater, K.F.: Recombineering in *Streptomyces coelicolor*. *FEMS Microbiol. Prot.* #5, 2006.
- Haefner, B.: Drugs from the deep: marine natural products as drug candidates. *Drug Discov. Today* *8*, 536-544, 2003.

- Hayakawa, M.: Studies on the isolation and distribution of rare actinomycetes in soil. *Actinomycetologica* 22, 12-19, 2008.
- Hénaut, A., Rouxel, T., Gleizes, A., Moszer, I. & Danchin, A.: Uneven distribution of GATC motifs in the *Escherichia coli* chromosome, its plasmids and its phages. *J. Mol. Biol.* 257, 574-585, 1996.
- Herbert, D., Phipps, P.J. & Strange, R.E.: Chemical analysis of microbial cells. In: J.R. Norris & D.W. Ribbons (eds.) *Methods in microbiology*, pp. 209-344. Academic Press, London, 1971.
- Herrmann, K.M.: The shikimate pathway as an entry to aromatic secondary metabolism. *Plant Physiol.* 107, 7-12, 1995a.
- Herrmann, K.M.: The shikimate pathway: early steps in the biosynthesis of aromatic compounds. *Plant Cell* 7, 907-919, 1995b.
- Hornbaek, T., Nielsen, A.K., Dynesen, J. & Jakobsen, M.: The effect of inoculum age and solid versus liquid propagation on inoculum quality of an industrial *Bacillus licheniformis* strain. *FEMS Microbiol. Lett.* 236, 145-151, 2004.
- Horowitz, P. & Criscimagna, N.L.: The specificity of active-site alkylation by iodoacetic acid in the enzyme thiosulfate sulfurtransferase. *Biochim. Biophys. Acta* 702, 173-177, 1982.
- Iwai, Y. & Omura, S.: Culture conditions for screening of new antibiotics. *J. Antibiot.* 35, 123-141, 1982.
- Iwai, Y., Awaya, J., Kesado, T., Yamada, S., Omura, S. & Hata, T.: Selective production of cerulenin by *Cephalosporium caerulens* KF-140. *J. Ferment. Technol.* 51, 575-581, 1973.
- Jensen, P.R., Mincer, T.J., Williams, P.G. & Fenical, W.: Marine actinomycete diversity and natural product discovery. *Antonie van Leeuwenhoek* 87, 43-48, 2005.
- Junker, B.: Foam and its mitigation in fermentation systems. *Biotechnol. Prog.* 23, 767-784, 2007.
- Junker, B., Mann, Z., Burgess, B., King, J. & Greasham, R.: Carbon and complex nitrogen source selection for secondary metabolite cultivation at the pilot scale. *J. Biosci. Bioeng.* 91, 462-468, 2001.
- Kanthakumar, K., Taylor, G., Tsang, K.W., Cundell, D.R., Rutman, A., Smith, S., Jeffery, P.K., Cole, P.J. & Wilson, R.: Mechanisms of action of *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin on human ciliary beat *in vitro*. *Infect. Immun.* 61, 2848-2853, 1993.

- Kato, C., Inoue, A. & Horikoshi, K.: Isolating and characterizing deep-sea marine microorganisms. *Trends Biotechnol.* *14*, 6-12, 1996.
- Kato, C., Li, L., Nogi, Y., Nakamura, Y., Tamaoka, J. & Horikoshi, K.: Extremely barophilic bacteria isolated from the Mariana Trench, Challenger Deep, at a depth of 11,000 meters. *Appl. Environ. Microbiol.* *64*, 1510-1513, 1998.
- Kelly, M.: Yeast extract. In: T. Godfrey & M. Reichelt (eds.) *Industrial enzymology, the application of enzymes in industry*, pp. 457-464. Nature Press, New York, 1983.
- Kieser, T., Hopwood, D.A., Wright, H.M. & Thompson, C.J.: pIJ101, a multi-copy broad host-range *Streptomyces* plasmid: functional analysis and development of DNA cloning vectors. *Mol. Gen. Genet.* *185*, 223-228, 1982.
- Kim, J.S., Rhee, H., Park, H.J., Lee, I., Lee, S.K., Suh, M., Lee, H.J., Ryu, C. & Choo, H.P.: Synthesis of 6-chloroisoquinoline-5,8-diones and pyrido[3,4-b]phenazine-5,12-diones and evaluation of their cytotoxicity and DNA topoisomerase II inhibitory activity. *Bioorg. Med. Chem.* *15*, 451-457, 2007.
- Kim, W.G., Ryoo, I.J., Yun, B.S., Shin-ya, K., Seto, H. & Yoo, I.D.: Phenazostatin C, a new diphenazine with neuronal cell protecting activity from *Streptomyces* sp. *J. Antibiot.* *52*, 758-761, 1999.
- Kocur, M., Schleifer, K.H. & Kloos, W.E.: Taxonomic status of *Micrococcus nishinomiyaensis* Oda 1935. *Int. J. Syst. Bacteriol.* *22*, 218-223, 1975.
- Kondratyuk, T.P., Park, E., Yu, R., van Breemen, R.B., Asolkar, R.N., Murphy, B.T., Fenical, W. & Pezzuto, J.M.: Novel marine phenazines as potential cancer chemopreventive and anti-inflammatory agents. *Mar. Drugs* *10*, 451-464, 2012.
- Kyo, M., Miyazaki, E., Tsukioka, S., Ochi, H., Armitani, Y., Tsuchiya, T., Aoki, T. & Takagawa, S.: The sea trial of "Kaiko", the full ocean depth research ROV. *Oceans* *48*, 59-68, 1995.
- Lam, K.S.: Discovery of novel metabolites from marine actinomycetes. *Curr. Opin. Microbiol.* *9*, 245-251, 2006.
- Lau, G.W., Ran, H., Kong, F., Hassett, D.J. & Mavrodi, D.: *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin is critical for lung infection in mice. *Infect. Immun.* *72*, 4275-4278, 2004.
- Laursen, J.B. & Nielsen, J.: Phenazine natural products: biosynthesis, synthetic analogues, and biological activity. *Chem. Rev.* *104*, 1663-1686, 2004.
- Lazzarini, A., Cavaletti, L., Toppo, G. & Marinelli, F.: Rare genera of actinomycetes as potential producers of new antibiotics. *Antonie van Leeuwenhoek* *78*, 399-405, 2000.

- Leeb, M.: Gasping for victory. *Nature* 430, 608-609, 2004.
- Li, D., Wang, F., Xiao, X., Zeng, X., Gu, Q. & Zhu, W.: A new cytotoxic phenazine derivative from a deep sea bacterium *Bacillus* sp. *Arch. Pharm. Res.* 30, 552-555, 2007.
- Li, L., Kato, C. & Horikoshi, K.: Microbial diversity in sediments collected from the deepest cold-seep area, the Japan Trench. *Mar. Biotechnol.* 1, 391-400, 1999.
- Lipworth, B.J.: Phosphodiesterase-4 inhibitors for asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet* 365, 167-175, 2005.
- Mantzouridou, F., Naziri, E. & Tsimidou, M.Z.: Industrial glycerol as a supplementary carbon source in the production of β -carotene by *Blakeslea trispora*. *J. Agric. Food Chem.* 56, 2668-2675, 2008.
- Masurekar, P.S.: Nutritional and engineering aspects of microbial process development. *Prog. Drug Res.* 65, 291-328, 2008.
- Mavrodi, D.V., Blankenfeldt, W. & Thomashow, L.S.: Phenazine compounds in fluorescent *Pseudomonas* spp. biosynthesis and regulation. *Annu. Rev. Phytopathol.* 44, 417-445, 2006.
- Mavrodi, D.V., Bonsall, R.F., Delaney, S.M., Soule, M.J., Phillips, G. & Thomashow, L.S.: Functional analysis of genes for biosynthesis of pyocyanin and phenazine-1-carboxamide from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J. Bacteriol.* 183, 6454-6465, 2001.
- Mavrodi, D.V., Ksenzenko, V.N., Bonsall, R.F., Cook, R.J., Boronin, A.M. & Thomashow, L.S.: A seven-gene locus for synthesis of phenazine-1-carboxylic acid by *Pseudomonas fluorescens* 2-79. *J. Bacteriol.* 180, 2541-2548, 1998.
- 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.: Diversity and evolution of the phenazine biosynthesis pathway. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 866-879, 2010.
- McDonald, M., Mavrodi, D.V., Thomashow, L.S. & Floss, H.G.: 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, 2001.
- McFarlane, G.J.B., Macharay, G.C. & Stewart, W.D.P.: A simplified method for conjugal gene transfer into the filamentous cyanobacterium *Anabaena* sp. ATCC 27893. *J. Microbiol. Methods* 6, 301-305, 1987.

- Mentel, M., Ahuja, E.G., Mavrodi, D.V., Breinbauer, R., Thomashow, L.S. & Blankenfeldt, W.: Of two make one: the biosynthesis of phenazines. *ChemBioChem* *10*, 2295-2304, 2009.
- Millican, C.R.: Biosynthesis of pyocyanine. Incorporation of [¹⁴C] shikimic acid. *Biochim. Biophys. Acta* *57*, 407-409, 1962.
- Moore, A.E., Sabachewsky, L. & Toolan, H.W.: Culture characteristics of four permanent lines of human cancer cells. *Cancer Res.* *15*, 598-602, 1955.
- Morollo, A.A. & Bauerle, R.: Characterization of composite aminodeoxyisochorismate synthase and aminodeoxyisochorismate lyase activities of anthranilate synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *90*, 9983-9987, 1993.
- Muller, M.: Pyocyanin induces oxidative stress in human endothelial cells and modulates the glutathione redox cycle. *Free Radic. Biol. Med.* *33*, 1527-1533, 2002.
- Murray, T.S., Egan, M. & Kazmierczak, B.I.: *Pseudomonas aeruginosa* chronic colonization in cystic fibrosis patients. *Curr. Opin. Pediatr.* *19*, 83-88, 2007.
- Murzin, A.G., Brenner, S.E., Hubbard, T. & Chothia, C.: SCOP: a structural classification of proteins database for the investigation of sequences and structures. *J. Mol. Biol.* *247*, 536-540, 1995.
- Neuber, H.: Leishmaniasis. *J. Dtsch. Dermatol. Ges.* *6*, 754-765, 2008.
- Neves, A.A., Vieira, L.M. & Menezes, J.C.: Effects of preculture variability on clavulanic acid fermentation. *Biotechnol. Bioeng.* *72*, 628-633, 2001.
- O'Malley, Y.Q., Reszka, K.J., Spitz, D.R., Denning, G.M. & Britigan, B.E.: *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin directly oxidizes glutathione and decreases its levels in airway epithelial cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* *287*, 94-103, 2004.
- Otoguro, K., Ishiyama, A., Iwatsuki, M., Namatame, M., Nishihara-Tukashima, A., Nakashima, T., Shibahara, S., Kondo, S., Yamada, H. & Omura, S.: *In vitro* and *in vivo* anti-*Trypanosoma brucei* activities of phenazinomycin and related compounds. *J. Antibiot.* *63*, 579-581, 2010.
- Pachón, O.G., Azqueta, A., Lavaggi, M.L., López de Cerain, A., Creppy, E., Collins, A., Cerecetto, H., González, M., Centelles, J.J. & Cascante, M.: Antitumoral effect of phenazine N⁵,N¹⁰-dioxide derivatives on Caco-2 cells. *Chem. Res. Toxicol.* *21*, 1578-1585, 2008.
- Parsons, J.F., Calabrese, K., Eisenstein, E. & Ladner, J.E.: Structure and mechanism of *Pseudomonas aeruginosa* PhzD, an isochorismatase from the phenazine biosynthetic pathway. *Biochemistry* *42*, 5684-5693, 2003.

- Parsons, J.F., Calabrese, K., Eisenstein, E. & Ladner, J.E.: Structure of the phenazine biosynthesis enzyme PhzG. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* *60*, 2110-2113, 2004a.
- Parsons, J.F., Song, F., Parsons, L., Calabrese, K., Eisenstein, E. & Ladner, J.E.: Structure and function of the phenazine biosynthesis protein PhzF from *Pseudomonas fluorescens* 2-79. *Biochemistry* *43*, 12427-12435, 2004b.
- Parsons, J.F., Greenhagen, B.T., Shi, K., Calabrese, K., Robinson, H. & Ladner, J.E.: Structural and functional analysis of the pyocyanin biosynthetic protein PhzM from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemistry* *46*, 1821-1828, 2007.
- Pathom-aree, W., Nogi, Y., Sutcliffe, I.C., Ward, A.C., Horikoshi, K., Bull, A.T. & Goodfellow, M.: *Dermaococcus abyssi* sp. nov., a piezotolerant actinomycete isolated from the Mariana Trench. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* *56*, 1233-1237, 2006a.
- Pathom-aree, W., Nogi, Y., Ward, A.C., Horikoshi, K., Bull, A.T. & Goodfellow, M.: *Dermaococcus barathri* sp. nov. and *Dermaococcus profundi* sp. nov., novel actinomycetes isolated from deep-sea mud of the Mariana Trench. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* *56*, 2303-2307, 2006b.
- Pathom-aree, W., Stach, J.E.M., Ward, A.C., Horikoshi, K., Bull, A.T. & Goodfellow, M.: Diversity of actinomycetes isolated from Challenger Deep sediment (10,898 m) from the Mariana Trench. *Extremophiles* *10*, 181-189, 2006c.
- Pierson, L.S.3. & Thomashow, L.S.: Cloning and heterologous expression of the phenazine biosynthetic locus from *Pseudomonas aureofaciens* 30-84. *Mol. Plant Microbe Interact.* *5*, 330-339, 1992.
- Pierson, L.S.3., Keppenne, V.D. & Wood, D.W.: Phenazine antibiotic biosynthesis in *Pseudomonas aureofaciens* 30-84 is regulated by PhzR in response to cell density. *J. Bacteriol.* *176*, 3966-3974, 1994.
- Pierson, L.S.3., Gaffney, T., Lam, S. & Gong, F.: Molecular analysis of genes encoding phenazine biosynthesis in the biological control bacterium. *Pseudomonas aureofaciens* 30-84. *FEMS Microbiol. Lett.* *134*, 299-307, 1995.
- Pietra, F.: Secondary metabolites from marine microorganisms: bacteria, protozoa, algae and fungi. Achievements and prospects. *Nat. Prod. Rep.* *14*, 453-464, 1997.
- Plaga, A., Stümpfel, J. & Fiedler, H.: Determination of carbohydrates in fermentation processes by high-performance liquid chromatography. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *32*, 45-49, 1989.

- Poteete, A.R.: What makes the bacteriophage λ Red system useful for genetic engineering: molecular mechanism and biological function. *FEMS Microbiol. Lett.* *201*, 9-14, 2001.
- Pujari, V. & Chandra, T.S.: Statistical optimization of medium components for enhanced riboflavin production by a UV-mutant of *Eremothecium ashbyii*. *Process Biochem.* *36*, 31-37, 2000.
- Riedlinger, J., Reicke, A., Zähler, H., Krismer, B., Bull, A.T., Maldonado, L.A., Ward, A.C., Goodfellow, M., Bister, B., Bischoff, D., Süssmuth, R.D. & Fiedler, H.-P.: Abyssomicins, inhibitors of the *para*-aminobenzoic acid pathway produced by the marine *Verrucosisspora* strain AB-18-032. *J. Antibiot.* *57*, 271-279, 2004.
- Rose, T.M., Schultz, E.R., Henikoff, J.G., Pietrokovski, S., McCallum, C.M. & Henikoff, S.: Consensus-degenerate hybrid oligonucleotide primers for amplification of distantly related sequences. *Nucleic Acids Res.* *26*, 1628-1635, 1998.
- Rutherford, K., Parkhill, J., Crook, J., Horsnell, T., Rice, P., Rajandream, M.A. & Barrell, B.: Artemis: sequence visualization and annotation. *Bioinformatics* *16*, 944-945, 2000.
- Saleh, O., Bonitz, T., Flinspach, K., Kulik, A., Burkard, N., Mühlenweg, A., Vente, A., Polnick, S., Lämmerhofer, M., Gust, B., Fiedler, H.-P. & Heide, L.: Activation of a silent phenazine biosynthetic gene cluster reveals a novel natural product and a new resistance mechanism against phenazines. *Med. Chem. Comm.* 2012.
- Schadt, H.S., Schadt, S., Oldach, F. & Süssmuth, R.D.: 2-Amino-2-deoxyisochorismate is a key intermediate in *Bacillus subtilis* *p*-aminobenzoic acid biosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.* *131*, 3481-3483, 2009.
- Schimana, J.: Simocyclinone und weitere neue Metabolite aus *Streptomyces antibioticus* TÜ 6040. Dissertation, Universität Tübingen, 2000.
- Schmitt, E., Panvert, M., Blanquet, S. & Mechulam, Y.: Structural basis for tRNA-dependent amidotransferase function. *Structure* *13*, 1421-1433, 2005.
- Seeger, K., Flinspach, K., Haug-Schifferdecker, E., Kulik, A., Gust, B., Fiedler, H.-P. & Heide, L.: The biosynthetic genes for prenylated phenazines are located at two different chromosomal loci of *Streptomyces cinnamonensis* DSM 1042. *Microb. Biotechnol.* *4*, 252-262, 2011.
- Shaw, J.F., Chang, R.C., Chuang, K.H., Yen, Y.T., Wang, Y.J. & Wang, F.G.: Nucleotide sequence of a novel arylesterase gene from *Vibrio mimicus* and characterization of the enzyme expressed in *Escherichia coli*. *Biochem. J.* *298*, 675-680, 1994.

- Shinya, K., Furihata, K., Teshima, Y., Hayakawa, Y. & Seto, H.: Benthocyanins B and C, new free radical scavengers from *Streptomyces prunicolor*. *J. Org. Chem.* *58*, 4170-4172, 1993.
- Stackebrandt, E., Koch, C., Gvozdiak, O. & Schumann, P.: Taxonomic dissection of the genus *Micrococcus*: *Kocuria* gen. nov., *Nesterenkonia* gen. nov., *Kytococcus* gen. nov., *Dermacoccus* gen. nov., and *Micrococcus* Cohn 1872 gen. emend. *Int. J. Syst. Bacteriol.* *45*, 682-692, 1995.
- Tang, Y. & Liu, Z.: Free-radical-scavenging effect of carbazole derivatives on AAPH-induced hemolysis of human erythrocytes. *Bioorg. Med. Chem.* *15*, 1903-1913, 2007.
- Todaro, G.J. & Green, H.: Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. *J. Cell Biol.* *17*, 299-313, 1963.
- Turnbaugh, P.J., Ley, R.E., Hamady, M., Fraser-Liggett, C.M., Knight, R. & Gordon, J.I.: The human microbiome project. *Nature* *449*, 804-810, 2007.
- Vardar-Sukan, F.: Efficiency of natural oils as antifoaming agents in bioprocesses. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* *43*, 39-47, 1988.
- Vardar-Sukan, F.: Effects of natural oils on foam collapse in bioprocesses. *Biotechnol. Lett.* *13*, 107-112, 1991.
- Wagner, M.: Optimierung der Sekundärstoffproduktion bei marinen *Dermacoccus*-Isolaten aus einem Sediment des Marianengrabens. Diplomarbeit, Universität Tübingen, 2009.
- Wang, Y., Kern, S.E. & Newman, D.K.: Endogenous phenazine antibiotics promote anaerobic survival of *Pseudomonas aeruginosa* via extracellular electron transfer. *J. Bacteriol.* *192*, 365-369, 2010.
- Watve, M.G., Tickoo, R., Jog, M.M. & Bhole, B.D.: How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*? *Arch. Microbiol.* *176*, 386-390, 2001.
- Webby, C.J., Baker, H.M., Lott, J.S., Baker, E.N. & Parker, E.J.: The structure of 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase from *Mycobacterium tuberculosis* reveals a common catalytic scaffold and ancestry for type I and type II enzymes. *J. Mol. Biol.* *354*, 927-939, 2005.
- Wood, D.W., Gong, F., Daykin, M.M., Williams, P. & Pierson, L.S.3.: N-acyl-homoserine lactone-mediated regulation of phenazine gene expression by *Pseudomonas aureofaciens* 30-84 in the wheat rhizosphere. *J. Bacteriol.* *179*, 7663-7670, 1997.

- Yang, P., Yang, Q., Qian, X. & Cui, J.: Novel synthetic isoquinolino[5,4-ab]phenazines: inhibition toward topoisomerase I, antitumor and DNA photo-cleaving activities. *Bioorg. Med. Chem.* *13*, 5909-5914, 2005.
- Yu, S., Vit, A., Devenish, S., Mahanty, H.K., Itzen, A., Goody, R.S. & Blankenfeldt, W.: Atomic resolution structure of EhpR: phenazine resistance in *Enterobacter agglomerans* Eh1087 follows principles of bleomycin/mitomycin C resistance in other bacteria. *BMC Struct. Biol.* *11*, 33, 2011.
- Zhang, J., Reddy, J., Buckland, B. & Greasham, R.: Toward consistent and productive complex media for industrial fermentations: studies on yeast extract for recombinant yeast fermentation process. *Biotechnol. Bioeng.* *82*, 640-652, 2002.