

**Neue Biofilminhibitions-Strategien, bioaktive  
Naturstoffe aus marinen Actinomyceten und  
semisynthetische Entwicklungen an  
Zellwandvorläufern**

**Dissertation**

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

vorgelegt von  
Matthias Szesny  
aus Achim

Tübingen  
2013

Tag der mündlichen Qualifikation:

18.04.2013

Dekan:

Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Stephanie Grond

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Martin E. Maier

Meinen Eltern



Die vorliegende Arbeit wurde im Institut für Organische Chemie der Eberhard Karls Universität Tübingen von April 2010 bis März 2013 durchgeführt.

Ich danke Frau Prof. Dr. Stephanie Grond für die interessante Aufgabenstellung, die wertvollen Diskussionen und Anregungen.



# Inhaltsverzeichnis

## A Allgemeiner Teil

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1	Herausforderungen in der Entwicklung pharmazeutischer Wirkstoffe.....	1
1.2	HPLC-UV-MS als leistungsfähiges Werkzeug der Dereplikation .....	5
<b>2</b>	<b>Aufgabenstellung</b> .....	<b>10</b>
<b>3</b>	<b>Neue Biofilminhibitions-Strategien</b> .....	<b>12</b>
3.1	Chemische Mechanismen der Biofilmbildung .....	12
3.2	Projektübersicht.....	16
3.3	Metagenomische Strategie zur Biofilminhibierung .....	19
3.3.1	Enzymatik des <i>N</i> -Acylhomoserinlactonen-Abbaus .....	19
3.3.2	Biologische Vorarbeiten zur Oxidoreduktase BpiB09 .....	21
3.3.3	Chemische Analytik zur Oxidoreduktase BpiB09 .....	23
3.3.4	Chemische Synthese zur Substratspezifität von BpiB09 .....	30
3.4	Niedermolekulare Verbindungen als Biofilminhibitoren .....	32
3.4.1	Verwendete Testsysteme.....	33
3.4.2	Naturstoffe in Anti-Biofilm-Testsystemen .....	35
3.4.3	Fluorierte <i>N</i> -Acylhomoserinlactone .....	40
3.5	Identifizierung des Autoinducers aus <i>Janthinobacterium</i> HH01 .....	42
3.5.1	Chemische Analytik.....	44
3.5.2	Targeted-Ansatz.....	46
3.5.3	Untargeted-Ansatz .....	52
3.6	Diskussion der Ergebnisse .....	56
<b>4</b>	<b>Bioaktive Naturstoffe aus marinen Actinomyceten</b> .....	<b>60</b>
4.1	Die Stämme <i>Rhodococcus</i> RV77, <i>Rothia</i> RV89 und <i>Micromonospora</i> RV115 .....	62
4.1.1	Variation der Kultivierungsbedingungen .....	62

4.1.2	Chemische Analytik der Extrakte .....	64
4.2	Diazepinomicin ( <b>118</b> ) aus <i>Micromonospora</i> RV115 .....	69
4.2.1	Fermentation und Isolierung .....	69
4.2.2	Charakterisierung.....	70
4.2.3	Antioxidative und proteaseinhibierende Aktivität.....	70
4.3	Der Stamm <i>Rothia</i> RV13.....	76
4.3.1	Aktivitätsbasiertes Screening .....	76
4.3.2	Isolierung und Charakterisierung des Massensignals $m = 373$ .....	79
4.4	Diskussion der Ergebnisse.....	82
<b>5</b>	<b>Semisynthetische Entwicklungen an Zellwandvorläufern .....</b>	<b>84</b>
5.1	Darstellung von Fmoc-Gly <sub>5</sub> ( <b>122</b> ) .....	86
5.2	Synthese der UDP-MurNAc-Hexapeptid-Glycin-Derivate .....	89
5.3	Diskussion der Ergebnisse.....	93
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung der Ergebnisse .....</b>	<b>95</b>
6.1	Neue Biofilminhibitionsstrategien .....	95
6.2	Bioaktive Naturstoffe aus marinen Actinomyceten.....	98
6.3	Semisynthetische Entwicklungen an Zellwandvorläufern.....	99
<b>7</b>	<b>Summary of the results .....</b>	<b>101</b>
7.1	New biofilm inhibition strategies .....	101
7.2	Bioactive natural substances from marine Actinomycetes .....	104
7.3	Semisynthetic developments on cell wall precursors .....	105
<b>B</b>	<b>Experimenteller Teil</b>	
<b>1</b>	<b>Allgemeines.....</b>	<b>107</b>
1.1	Instrumentelle Analytik .....	107
1.2	Chromatographische Methoden .....	108
1.3	Mikrobiologische Arbeiten .....	112
1.3.1	Nährmedien.....	112
1.3.2	Stammhaltung .....	113

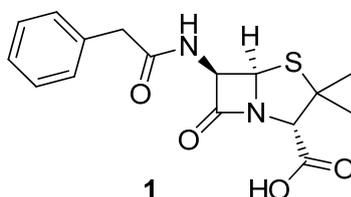
1.3.3	Geräte .....	114
<b>2</b>	<b>Bioaktive Naturstoffe aus marinen Actinomyceten .....</b>	<b>115</b>
2.1	Stammhaltung und Vorkulturen .....	115
2.2	Aufbau des chemisch biologischen Screenings .....	115
2.2.1	Variation der Kultivierungsbedingungen .....	115
2.2.2	Aufarbeitung .....	116
2.2.3	UV- datenbankgestützte HPLC-ESI-MS-Analytik <sup>[19]</sup> .....	117
2.2.4	Fermentationsansatz <i>Rhodococcus</i> RV77 im JR-11-Medium .....	118
2.3	Diazepinomicin ( <b>118</b> ) aus <i>Micromonospora</i> RV115 .....	118
2.3.1	Kultivierung .....	118
2.3.2	Aufarbeitung .....	118
2.3.3	Charakterisierung .....	119
2.4	Der Stamm <i>Rothia</i> RV13 .....	120
2.4.1	Fraktionierung der Extrakte .....	120
2.4.2	Isolierung des Massensignals $m/z = 373$ .....	121
<b>3</b>	<b>Semisynthetische Entwicklungen an Zellwandvorläufern .....</b>	<b>122</b>
3.1	Synthese des Fmoc-Gly <sub>5</sub> ( <b>122</b> ) .....	122
3.1.1	Erster synthetischer Ansatz .....	122
3.1.2	Zweiter synthetischer Ansatz .....	122
3.2	Synthese der Glycin-UDP-MurNAc-Hexapeptid-Glycin-Derivate .....	124
3.2.1	UDP-MurNAc-L-Ala- $\gamma$ -D-Glu-L-Lys( $\epsilon$ -Gly)-D-Ala-D-Ala ( <b>13</b> ) .....	124
3.2.2	UDP-MurNAc-L-Ala- $\gamma$ -D-Glu-L-Lys( $\epsilon$ -Gly <sub>3</sub> )-D-Ala-D-Ala ( <b>127</b> ) .....	125
3.2.3	UDP-MurNAc-L-Ala- $\gamma$ -D-Glu-L-Lys( $\epsilon$ -Gly <sub>5</sub> )-D-Ala-D-Ala ( <b>128</b> ) .....	126
<b>C</b>	<b>Literatur .....</b>	<b>127</b>
<b>D</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>131</b>

## A Allgemeiner Teil

### 1 Einleitung

#### 1.1 Herausforderungen in der Entwicklung pharmazeutischer Wirkstoffe

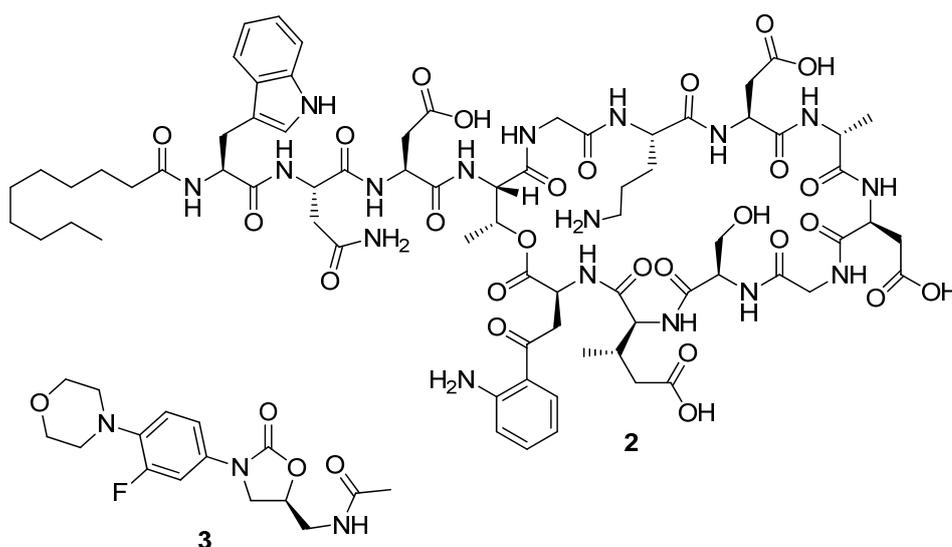
Der Aufbruch in die Ära der mikrobiellen pharmazeutischen Wirkstoffe begann 1928 mit der Entdeckung des Penicillins G (1) durch Alexander Flemming.<sup>[1]</sup> Er bemerkte, dass sich in mit *Staphylococcus aureus* bewachsenen Petrischalen ein Hemmhof um eine Kolonie des Schimmelpilzes *Penicillium notatum* gebildet hatte. Durch weitere Untersuchungen konnte die antibakterielle Aktivität dem Penicillin G (1) zugeschrieben werden. Charakteristisches Strukturelement ist der  $\beta$ -Lactam-Ring, der auch in weiteren antibiotischen Verbindungen vorhanden ist. Für diese Wirkstoffklasse wurde der Begriff der  $\beta$ -Lactam-Antibiotika geprägt.<sup>[2]</sup> Deren Wirkung beruht auf einer Inhibierung der Penicillin-Binde-Proteine (PBP), die für den Aufbau der Zellhülle verantwortlich sind. Dabei binden die  $\beta$ -Lactam-Antibiotika irreversibel an die Hydroxylgruppe des Serins im aktiven Zentrum der D-Alanin-Transpeptidase.<sup>[3]</sup>



Heutzutage werden pharmazeutische Wirkstoffe natürlicher Herkunft in drei unterschiedliche Gruppen unterteilt. Zum einen den ursprünglichen Naturstoff, zum anderen den chemisch synthetisch derivatisierten Naturstoff und als drittes den totalsynthetischen Ansatz auf Grundlage der Strukturelemente der natürlichen Verbindung.<sup>[4]</sup> Die Bedeutung von Wirkstoffen mikrobiellen Ursprungs lässt sich an deren Umsatzzahlen ablesen. So waren 1997 innerhalb der Gruppe der 25 meistverkauften Pharmazeutika 11 Naturstoffe oder deren Derivate.<sup>[4]</sup>

Um ihr Überleben zu sichern, verfügen Mikroorganismen über Mechanismen, die zu einer Resistenz gegenüber antibiotischen Wirkstoffen führen können. Aus diesem Grund ist es wenig überraschend, dass die meisten in den letzten 50

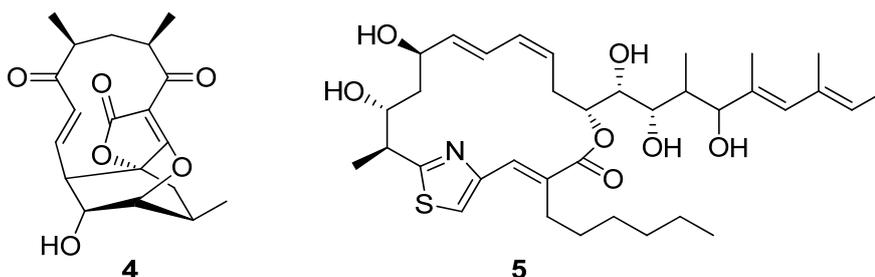
Jahren entwickelten antimikrobiellen Verbindungen ihre Wirksamkeit verloren haben.<sup>[5]</sup> 2004 waren mehr als 70 % der pathogenen Bakterien mindestens gegen ein aktuell verwendetes Antibiotikum resistent.<sup>[6]</sup> Dabei hat der Anstieg Methicillin-resistenter *S. aureus* (MRSA) ein besorgniserregendes Ausmaß angenommen und ist verantwortlich für viele Infektionen jedes Jahr.<sup>[4]</sup> Als Resistenzmechanismus werden von den MRSA PBPs gebildet, die eine geringere Affinität zu  $\beta$ -Lactamen besitzen. Alleine in den USA gibt es jährlich mehr als 2 Millionen bakterielle Infektionen. Für die Hälfte davon sind *S. aureus*-Keime verantwortlich. Diese führen schätzungsweise zu über 100 000 Todesfällen jedes Jahr.<sup>[7]</sup> Erschwert wird eine erfolgreiche Medikation zusätzlich durch die Fähigkeit der MRSA, einen Biofilm ausbilden zu können, der die Bakterien effektiv gegenüber schädlichen äußeren Einflüssen wie Antibiotika schützt. Äußerst problematisch ist diese Biofilmbildung z.B. auf offenen Wunden, Endoprothesen oder Herzklappen.<sup>[4]</sup>



Aus den genannten Gründen ist eine fortlaufende Entwicklung neuer potenter pharmazeutischer Wirkstoffe unerlässlich. Bei der Bekämpfung von MRSA und Vancomycin-resistenten *Enterococcus faecium* konnten mit dem Daptomycin (**2**) und Linezolid (**3**), welche im Jahr 2003 bzw. 2000 durch die FDA (*Food and Drug Administration*) in den USA zugelassen wurden, klinische Erfolge verzeichnet werden. Diese beiden Verbindungen waren die ersten neu gefundenen

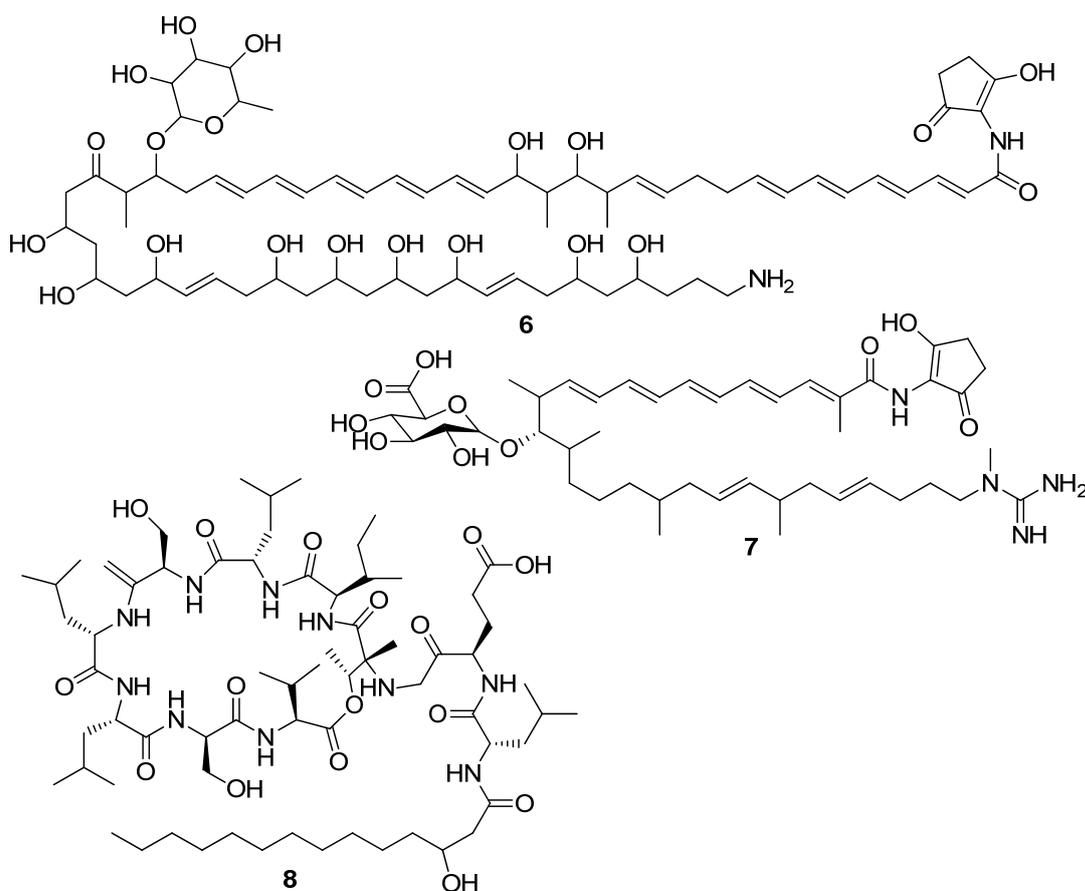
Strukturklassen im Bereich der Antibiotika seit den 1960er Jahren und kommen momentan als Reserveantibiotika zum Einsatz.<sup>[8]</sup>

Eine Methode bei der Suche nach neuen antibiotischen Wirkstoffen ist das Screening mikrobieller Stämme. Ansatzpunkte sind Variationen in der Kultivierung oder Manipulation der biosynthetischen Stoffwechselwege.<sup>[8]</sup> Dies kann zur Entdeckung neuer Strukturklassen führen oder die Erkenntnisse über bisher wenig untersuchte Verbindungen erweitern. Ein Beispiel hierfür ist das Abyssomicin C (**4**). Dieses polycyclische Antibiotikum konnte aus dem marinen Actinomyceten *Verrucosipora* isoliert werden.<sup>[9]</sup> Gefunden wurde diese Verbindung auf Grundlage eines einfachen Plattendiffusionstests. Die Abyssomicine stellen dabei eine neue Strukturklasse dar. Erste Untersuchungen legen nahe, dass die Wirkung auf die strukturelle Ähnlichkeit zum Chorismat zurückzuführen ist. Interessant ist, dass diese antibiotische Aktivität gegen Gram-positive Bakterien nur für das Abyssomicin C (**4**) und sein *atropes* Stereoisomer nachgewiesen werden konnte.<sup>[9] [10]</sup> Diese Ergebnisse bestätigen die Vermutung, dass ein intaktes Michael-Akzeptor-System bestimmend für die antibiotische Aktivität ist.<sup>[10]</sup> Ein weiteres Beispiel ist das Thuggacin (**5**). Dieses Thiazol enthaltende Makrolid wurde im Myxobakterium *Sorangium cellulosum* und *Chondromyces crocatus* gefunden.<sup>[11]</sup> Diese Verbindung zeigte Aktivität gegen *Mycobacterium tuberculosis*.<sup>[8]</sup>



Eine andere vielversprechende Methode ist die Auswertung der mikrobiellen DNA. Der erste Schritt des Screenings besteht in diesem Fall nicht in der Untersuchung von Fermentationsprodukten, sondern in der Erforschung möglicher Biosynthesewege innerhalb des mikrobiellen Genoms. Ermöglicht wird dieses Verfahren durch die Nutzung bioinformatischer Programme wie z.B.

CLUSEAN, die auf Grundlage der genetischen Information mögliche Sekundärmetabolite vorhersagen können.<sup>[8] [12]</sup> Mittels dieser bioinformatischen Vorarbeiten konnten beispielsweise das lineare Polyen ECO-02301 (**6**) mit antifungaler Aktivität aus *Streptomyces aizunensis*, ECO-0501 (**7**) ein Glycopeptid aus *Amycolatopsis orientalis* mit Wirkung gegen Gram-positive Pathogene, und das Lipopeptid Orfamid (**8**) aus *Pseudomonas fluorescens* isoliert werden.<sup>[13] [14] [15]</sup>



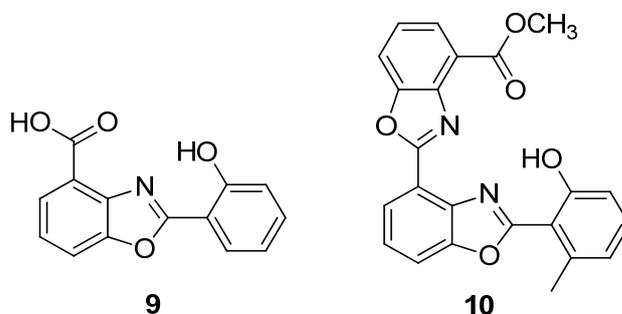
In der Zusammenfassung wird ersichtlich, wie wichtig die Suche nach neuen bioaktiven Verbindungen mikrobiellen Ursprungs ist. Als pharmazeutischer Wirkstoff oder als strukturelles Vorbild synthetisch hergestellter Analoga sind diese Verbindungen in der Entwicklung neuer Arzneimittel unerlässlich. Der hierfür zu betreibende Aufwand ist zwar hoch, aber der mögliche Nutzen dementsprechend groß.

### 1.2 HPLC-UV-MS als leistungsfähiges Werkzeug der Dereplikation

Für die effiziente Suche nach neuen Wirkstoffen aus mikrobiellen Extrakten sind Methoden erforderlich, die es ermöglichen, bereits bekannte und nicht zielführende Verbindungen schnell zu identifizieren. Methoden, die ein solches Vorgehen zum Ziel haben, werden unter dem Begriff der Dereplikation zusammengefasst. Ein mögliches Verfahren ist die Nutzung von datenbankbasierten Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-Systemen mit anschließender UV- und Massenspektrometrikopplung (HPLC-UV-MS).<sup>[16]</sup>

Diese Systeme lassen sich in zwei wesentliche Abschnitte unterteilen. Durch eine dem Detektor vorgeschaltete HPLC wird nicht die gesamte Probenmatrix vermessen, sondern im optimalen Fall die einzelnen Bestandteile. Wird ein Diodenarray-Detektor (DAD) verwendet, ermöglicht dies die Aufnahme eines UV-Spektrums der jeweiligen Verbindung aus dem HPLC-getrennten Gemisch. Erfolgt die Detektion mittels eines Massenspektrometers, wird durch die vorgeschaltete Auftrennung der Effekt einer möglichen Ionen-Suppression durch die Probenmatrix deutlich reduziert. Für eine effiziente Dereplikation sind umfassende Substanzdatenbanken des entsprechenden Forschungsgebiets unerlässlich, mit deren Hilfe gefundene Signale zugeordnet werden können. Diese Datenbanken können UV-Spektren oder Massenspektren enthalten. Sinnvoll erscheint besonders die Kombination dieser beiden Detektionsprinzipien. So sind Informationen über die Existenz konjugierter Doppelbindungssysteme mittels UV-Spektroskopie relativ leicht zugänglich.<sup>[17]</sup> Ein Beispiel hierfür ist die Entdeckung und Strukturaufklärung des Caboxamycin (**9**) aus *Streptomyces* sp. NTK 937.<sup>[18]</sup> Durch eine im Arbeitskreis *H. P. Fiedler* erstellte UV-Datenbank konnten schon zu einem sehr frühen Zeitpunkt Rückschlüsse über die Eigenschaften des in der Verbindung enthaltenen Chromophors erhalten werden.<sup>[19]</sup> Die größte Übereinstimmung des UV-Spektrums bestand dabei zu dem Nataxazol (**10**).<sup>[20]</sup> Bei diesem und bei dem Caboxamycin (**9**) ist jeweils das in den Strukturen enthaltene Benzoxazol der bestimmende Chromophor. Hieraus wird aber auch ersichtlich, dass für eine erfolgreiche Dereplikation ein UV-Spektrum alleine wenig Aussagekraft besitzt. In diesem Beispiel erfolgte zusätzlich noch ein Abgleich der Retentionszeit und des Massenspektrums,

wodurch die Verbindung als nicht datenbankbekannt identifiziert werden konnte. Dadurch konnte gezielt ein vergrößerter Fermentationsansatz zur Isolierung einer unbekannt Verbindung durchgeführt werden.



Aufgrund neuer technischer Entwicklungen und gesunkener Kosten ist heutzutage der Einsatz von Massenspektrometern ein zentraler Schritt in der Dereplikation. Ein entscheidendes Ereignis ist hier in der Etablierung von sanften Ionisierungsmethoden wie Elektrospray-Ionisation (ESI) und Chemische Ionisation bei Atmosphärendruck (APCI) zu sehen, mit denen es häufig möglich ist, den Analyten ohne dessen Zersetzung zu ionisieren.<sup>[16]</sup> Für die Aufnahme neuer Substanzen in eine Datenbank werden vielfach MS<sup>2</sup>-Spektren des Mutterions aufgenommen. Dieses Verfahren ermöglicht die eindeutige Zuordnung einer Struktur aufgrund seiner Fragmentierung. Zusätzlich können durch dieses Verfahren Rückschlüsse über die Struktur anhand charakteristischer Fragmentierungsprodukte erhalten werden. Sinnvoll ist hierbei die Aufnahme von MS<sup>2</sup>-Spektren bei verschiedenen Kollisionsenergien, um ein vollständiges Bild möglicher Bindungsbrüche zu erhalten. Die daraus resultierenden Ergebnisse sind jedoch vom jeweiligen Massenspektrometer abhängig und deshalb nicht allgemein übertragbar. Zusätzliche Informationen können durch die Verwendung von hochauflösenden Massenspektrometern (HRMS), wie z.B. Time of Flight (TOF), Orbitrap und Fourier-Transform-Ion-Cyclotron-Resonanz (FTICR) erhalten werden.<sup>[16]</sup> Aufgrund ihrer hohen Massengenauigkeit im Bereich von 0.5–1 ppm und besser kann die Anzahl der möglichen Strukturen stark eingegrenzt werden. Zusätzlich ist es häufig möglich, aus der hochaufgelösten Masse eine passende Summenformel zu generieren.

Somit ist eine schnelle und einfache Dereplikation mittels des Abgleichs von individuell erstellten Datenbanken möglich (Abb. 1).

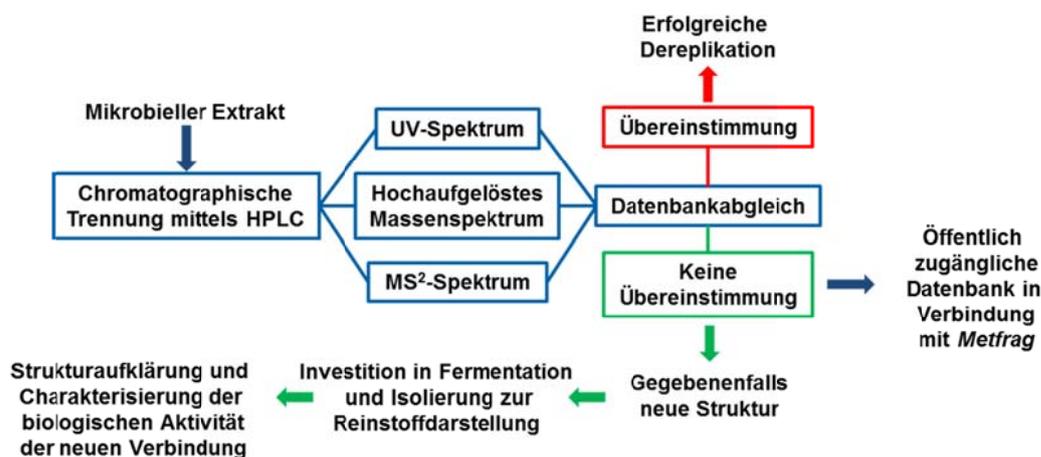


Abbildung 1: Aufbau eines chemischen Screenings unter Verwendung eines datenbankgestützten HPLC-UV-HRMS-Systems

Für nicht in der Datenbank hinterlegte Verbindungen ist durch dieses Verfahren eine Eingrenzung der Grundstruktur durch charakteristische Fragmente und die generierte Summenformel möglich. Ein nützliches Werkzeug für derartige Fragestellungen ist die Verwendung der frei zugänglichen browserbasierten Software *Metfrag*.<sup>[21]</sup> Diese nutzt öffentlich zugängliche Datenbanken wie *KEGG*, *PubChem* und *Chemspider*, indem sie die darin gespeicherten Substanzen und deren Masse mit der aus der HRMS-Messung abgleicht. Die in den Suchbereich fallenden Strukturen werden computergeneriert fragmentiert und dann mit den MS<sup>2</sup>-Spektren der eigenen Messung verglichen. Im Anschluss wird eine gewertete Trefferliste möglicher Kandidaten ausgegeben. Mithilfe dieses Softwaretools ist zwar keine vollständige Strukturaufklärung möglich, dennoch erlaubt es Rückschlüsse über die Grundstruktur der Verbindung (Kap. 3.5.3).

Neben den vielen Vorteilen, welche die Massenspektrometrie bietet, gibt es aber auch problematische Aspekte.<sup>[16]</sup> So ist die Möglichkeit, den Analyten zu ionisieren, stark von dessen Struktur abhängig. Verbindungen mit funktionellen Gruppen und polaren Eigenschaften weisen häufig eine gute Ionisierung in der ESI auf. Für eher lipophile Analyten ist die APCI besser geeignet. Es gibt jedoch

auch Verbindungen, die sich mit keinem dieser Verfahren ionisieren lassen. Es wird also weniger Informationen über die Konzentration einer Verbindung ausgegeben, sondern vielmehr über deren Ionisierbarkeit. Ein anderes Problem ist das besonders bei der ESI entstehende Adduktmuster ( $[M+H]^+$ ,  $[M+Na]^+$ ,  $[M+NH_4]^+$ ,  $[M-H]^-$ ,  $[M+COO]^-$  usw.). Diese können systemabhängig sehr unterschiedlich sein. Außerdem neigen einige Analyten zur Clusterbildung ( $[2M+H]^+$ ,  $[2M+Na]^+$ ,  $[3M+H]^+$ ,  $[2M-H]^-$  usw.). Als letzten Punkt gibt es Analyten, die sehr leicht fragmentieren und z.B. Wasser, Ameisensäure, Essigsäure oder Kohlenstoffdioxid abspalten. Alle diese Punkte können zu fehlerhaften Annahmen führen und müssen bei der Auswertung der Messdaten berücksichtigt werden.

Trotz dieser Einschränkungen stellt die HPLC-MS unter Einbeziehung von UV-Daten das momentan effizienteste Verfahren für eine schnelle Dereplikation aus mikrobiellen Extrakten dar.

Zukünftig könnten auch weitere technische Entwicklungen wie z.B. HPLC-UV-MS-SPE-NMR-Systeme eine breitere Anwendung finden.<sup>[22]</sup> Bei diesem Verfahren wird in einer ersten Messung die Probe mittels HPLC-UV-MS gescreent. Mögliche zielführende Verbindungen werden dann in einer zweiten Messung auf einer SPE-Kartusche (solid phase extraction) angereichert. Dieser Schritt erfolgt über ein Ventil, welches vom UV- bzw. Massendetektor gesteuert wird. Im Anschluss wird das Lösungsmittel von der Kartusche entfernt, der Analyt mit deuteriertem Lösungsmittel eluiert und die Probe ins NMR-Spektrometer (nuclear magnetic resonance) überführt (Abb. 2). Der Vorteil dieses Verfahrens ist, dass nicht nur bekannte Verbindungen derepliziert werden können, sondern auch Messdaten zur Verfügung stehen, die Erkenntnisse über Konstitution und Konfiguration liefern, also bis hin zu einer vollständigen Strukturaufklärung der unbekanntesten Verbindungen führen können.

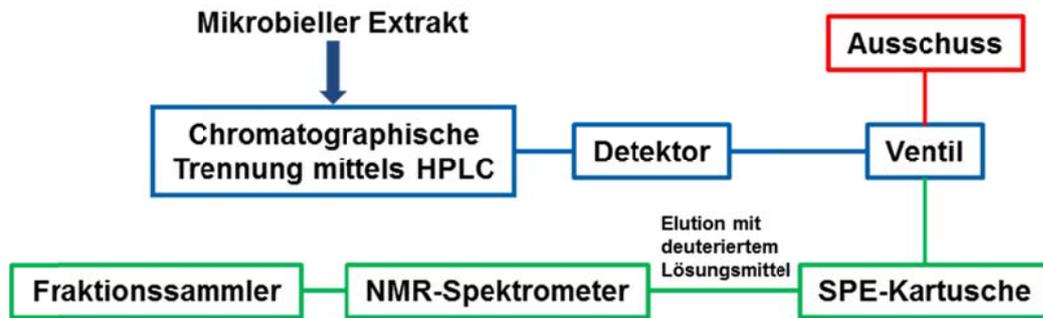


Abbildung 2: Aufbau eines HPLC-SPE-NMR-Systems

Die in diesem Kapitel vorgestellten gekoppelten Techniken stellen zwar in der Anschaffung einen nicht unerheblichen Kostenfaktor dar, dieser wird jedoch aufgrund der damit einhergehenden Zeitersparnis wieder mehr als ausgeglichen. Auf dieser Grundlage werden gekoppelte Systeme in Zukunft vermutlich einen sehr hohen Grad der Verbreitung erreichen.

## 2 Aufgabenstellung

### Neue Biofilminhibitions-strategien

Innerhalb des vom Bundesministerium für Forschung und Bildung (BMBF) geförderten Netzwerks „Innovative Strategien zur Biofilmbekämpfung und Proteasestabilisierung“ sollten im Teilprojekt „Chemische Analyse von Biofilminhibitions-Strategien und chemische Synthese“ insgesamt drei unterschiedliche Aufgabenfelder bearbeitet werden. Ziel war es, die spezifische Kommunikation der biofilmbildenden Mikroorganismen zu stören und somit das Biofilmwachstum zu verhindern. Im ersten Fall sollten analytische Verfahren entwickelt werden, um die enzymatischen Produkte von Anti-Quorum-Sensing-Bioaktivitäten aus einem metagenomischen Ansatz chemisch eindeutig charakterisieren zu können. Als zweites Aufgabenfeld sollte das Potential von niedermolekularen Verbindungen innerhalb der Biofilmbekämpfung näher untersucht werden. Erfolge sollte dies durch Bereitstellung von Naturstoffen und synthetisch hergestellten Substanzen unter Nutzung von etablierten biologischen Testsystemen der Kooperationspartner. Als dritter Aspekt sollte nach bekannten und unbekanntem an der Biofilmbildung beteiligten Signalmolekülen gesucht werden und diese mittels chemischer Analytik strukturell aufgeklärt werden.

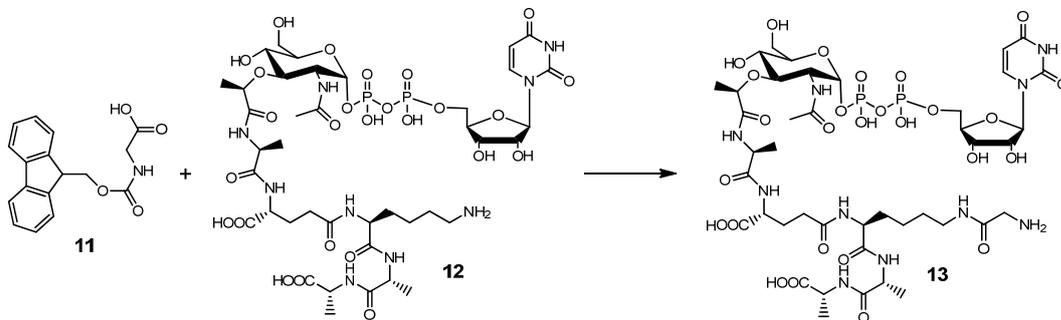
### Potente Naturstoffe aus marinen Actinomyceten

Vor dem Hintergrund eines steigenden Bedarfs an neuen pharmazeutischen Wirkstoffen sollte im zweiten Abschnitt dieser Arbeit mittels eines chemischen Screenings nach neuen und biologisch aktiven Naturstoffen aus vier verschiedenen Actinomyceten-Stämmen gesucht werden. Hierfür sollten Extrakte und chromatographisch aufgetrennte Fraktionen erstellt werden, die dann chemisch-analytisch untersucht werden sollten. Die vorherige Isolation der Mikroorganismen wurde vom Arbeitskreis *U. Hentschel* (Universität Würzburg) durchgeführt, welcher auch die Untersuchung zur biologischen Aktivität der bereitgestellten Extrakte bzw. Fraktionen vornehmen sollte.<sup>[23]</sup> Im Anschluss sollten aus den als zielführend erachteten Fermentationsansätzen Reinstoffe

dargestellt, charakterisiert und dem Kooperationspartner zur Erstellung biologischer Assays zur Verfügung gestellt werden. Zusätzlich sollten Methoden etabliert werden, die den benötigten Zeitaufwand über den gesamten Screening-Prozess reduzieren konnten.

### Semisynthetische Entwicklungen an Zellwandvorläufern

Diese Arbeiten waren die Voraussetzung für die Untersuchung der Funktion von Penicillin-Binde-Proteinen (PBP) durch den Arbeitskreis *U. Bertsche* (Universität Tübingen) mittels enzymatischer Assays. Hieraus sollten Erkenntnisse über den biosynthetischen Aufbau der bakteriellen Zellwand gewonnen werden, die im weiteren Verlauf Einfluss auf die Entwicklung neuartiger antibiotischer Wirkstoffe haben könnten. Dafür sollten synthetische Verfahren entwickelt werden, um unterschiedlich lange Glycinketten mit dem UDP-MurNAc-Hexapeptid zu koppeln (Abb. 3). Als weiterer Bestandteil sollten analytische Verfahren etabliert werden, um die Zielverbindungen chemisch eindeutig nachweisen zu können.



**Abbildung 3: Synthetisches Ziel am Beispiel der Kupplung des Monoglycins**

### **3 Neue Biofilminhibitions-Strategien**

#### **3.1 Chemische Mechanismen der Biofilmbildung**

##### Einleitung

Biofilme sind an Oberflächen anhaftende, schleimige Aufwüchse, mit dem sich Mikroorganismen ein eigenes Mikrohabitat geschaffen haben. Aufgebaut ist dieser hauptsächlich aus vernetzten Polysacchariden. Durch die Ausbildung eines Biofilms sind die darin lebenden Mikroorganismen deutlich besser gegenüber schädlichen Umwelteinflüssen geschützt. Deshalb zeigen sie auch eine ausgeprägt hohe Resistenz gegenüber Antibiotika und Bioziden. Von daher ist die Verhinderung der Biofilmbildung an Orten, wo ein Bakterienwachstum unerwünscht ist, von entscheidender Bedeutung. Hierbei können kommerzielle Gründe eine Rolle spielen, z.B. in industriellen Prozessen. Die durch Biorosion entstehenden Kosten, z.B. in Leitungssystemen und Tanks, können erheblich sein.<sup>[24]</sup> Von großer Bedeutung ist insbesondere der klinische Bereich. Bei 80 % der bakteriellen Infektionen im Körper sind Biofilme beteiligt. Typische Krankheitsbilder sind Lungeninfektionen, zystische Fibrosen, Entzündungen des Dickdarms, Harnwegsinfekt und weitere.<sup>[25]</sup> Aber auch der Biofilmbewuchs von körperfremden Materialien wie z.B. künstlichen Herzklappen, Endoprothesen und Kathetern stellt ein großes Problem dar.<sup>[26]</sup>

Die Methoden zum Entfernen bzw. Verhindern von Biofilmen sind vielfältig. Sie können physikalisch erfolgen, z.B. durch hohe magnetische Felder oder der Behandlung mit Ultraschall. Auch die Zugabe chemischer Substanzen stellt eine Möglichkeit dar.<sup>[27] [28]</sup> Durch chelatierende Komplexbildner wie EDTA können Calcium- und Magnesiumionen gebunden werden, was zu einer Destabilisierung der äußeren Zellmembran führt.<sup>[29]</sup> Ein anderer Ansatz, der auch in diesem BMBF-Projekt verfolgt wurde, ist die Störung der chemischen Kommunikation innerhalb des Biofilms, denn die Bildung der Biofilme ist direkt an chemische Signalstoffe und rezeptorabhängige Zellmechanismen gekoppelt.

### Quorum Sensing

Als Quorum-Sensing (QS) wird die chemische Kommunikation von Bakterien mittels niedermolekularer Signalmoleküle bezeichnet, den sogenannten Autoinducern (AI). Diese Verbindungen werden deshalb auch als „hormone-like“ bezeichnet, da sie in ihrer Funktion den Hormonen aus eukaryotischen Zellen sehr ähnlich sind.<sup>[30]</sup> Viele Bakterien können diese Autoinducer produzieren und in ihre Umgebung sezernieren. Kommt ein Bakterium mit dem ihm entsprechenden Autoinducer in Kontakt, wird seinerseits die eigene Produktion des entsprechenden Signalmoleküls angeregt. Mit steigender AI-Konzentration geht eine erhöhte Bakterienzeldichte einher. Das erste Mal wurde das Phänomen des Quorum-Sensing 1979 im marinen Bakterium *Vibrio fischeri* beschrieben.<sup>[31]</sup> Seitdem konnte eine Vielzahl von Autoinducern strukturell aufgeklärt werden. In Gram-negativen Bakterien sind die *N*-Acylhomoserinlactone (AHL) (**14–17**) die am besten erforschte Gruppe. Sie werden auch als Autoinducer-1 (AI-1) bezeichnet. Je nach Organismus können die Länge und die Struktur der Fettsäurekette variieren. Des Weiteren sind Furanone im Autoinducer-2 (AI-2) (**19–20**) und Chinoline im Pseudomonas Quinolone Signal (PQS) (**18**) bekannt. Aus bisherigen Forschungsarbeiten geht hervor, dass Gram-positive Bakterien hingegen eher modifizierte Oligopeptide als Signalmolekül nutzen.<sup>[32]</sup> Relativ neu ist die Entdeckung von  $\alpha$ -Hydroxyketonen als Signalmoleküle. So konnte der *Cholerae*-Autoinducer-1 (CAI-1) (**22**) in *Vibrio cholerae* nachgewiesen werden (Abb. 4).<sup>[33]</sup> Daraus lässt sich ableiten, dass bisher eventuell nur ein Bruchteil der Signalmoleküle charakterisiert werden konnte.

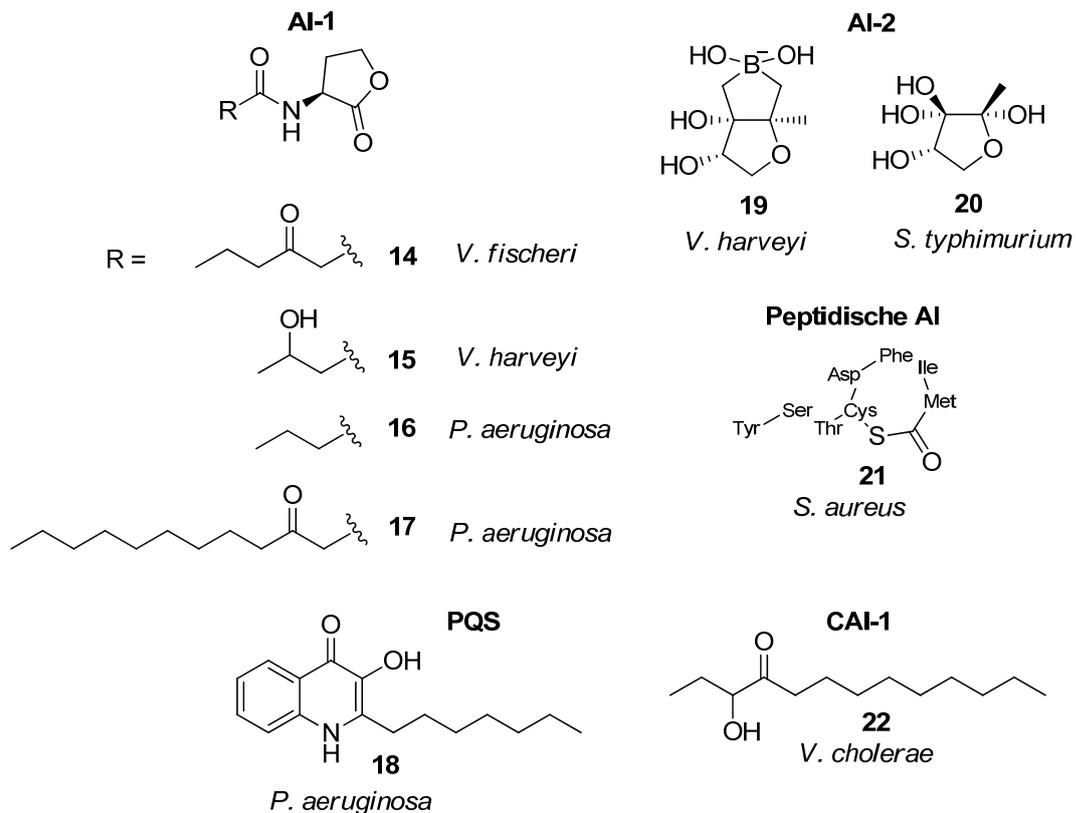


Abbildung 4: Unterschiedliche Autoinducersysteme und ihr Vorkommen

### Strategien zur Inhibition des Quorum-Sensing

Um das Quorum-Sensing zu stören oder ganz zu verhindern, gibt es im Wesentlichen zwei unterschiedliche Ansätze (Abb. 5).

Der erste Ansatz wird unter dem Begriff des Quorum-Quenching (QQ) zusammengefasst.<sup>[34]</sup> Hierbei wird das Signalmolekül enzymatisch so weit degeneriert, dass es nicht mehr aktiv ist (Kap. 3.3).

Der zweite Ansatz geht von einer signifikanten Reduktion der Expression von QS-kontrollierten Genen aus. In diesem Zusammenhang spricht man von Quorum-Sensing-Inhibition (QSI).<sup>[35]</sup> Zur Inhibierung QS-abhängiger Rezeptoren haben sich niedermolekulare Verbindungen als vielsprechende Kandidaten erwiesen, die die gesamte Signaltransduktion unterbinden können (Kap. 3.4).<sup>[25]</sup>

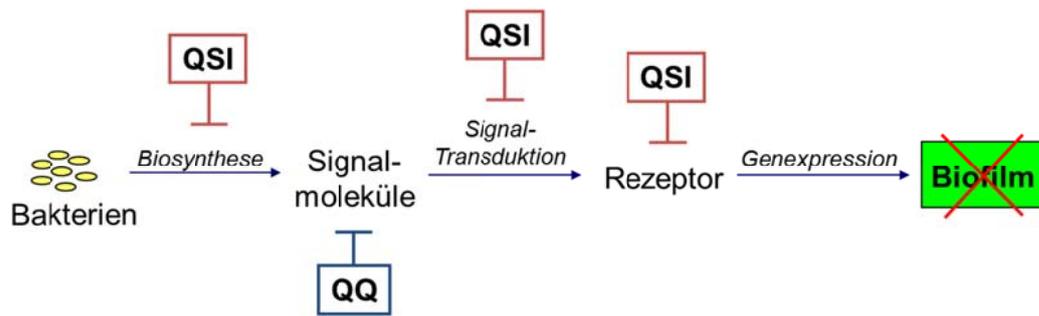


Abbildung 5: QSI und QQ innerhalb der Signalkaskade der Biofilmbildung

Beide Strategien zielen nicht darauf aus, die Bakterien zu töten. Sie beeinträchtigen vielmehr die spezifische Kommunikation der Bakterien. Ein Vorteil dieses Ansatzes ist, dass sie eine selektivere Wirkung gegen Mikroorganismen haben als Substanzen mit biozider Wirkung. Aufgrund der nicht vorhandenen Letalität verspricht man sich zusätzlich eine deutlich reduzierte Resistenzausbildung.

### 3.2 Projektübersicht

Das Projekt „Chemische Analyse von Biofilminhibitions-Strategien und chemische Synthese“ im Netzwerk „Innovative Strategien zur Biofilmbekämpfung und Proteasestabilisierung“ wurde vom Bundesministerium für Forschung und Bildung (BMBF) vom 01.04.2010 bis 31.01.2013 gefördert. Ziel des Projektes war es, das unerwünschte Wachstum von Biofilmen auf Oberflächen zu verhindern. Insbesondere im klinischen Bereich, aber auch bei industriellen Prozessen sind Biofilme problematisch. Ein Hauptgrund ist, dass die Mikroorganismen bei ihrer Bekämpfung mittels Antibiotika oder Bioziden durch den Biofilm geschützt werden und somit eine deutlich höhere Resistenz besitzen.

Die Suche nach Strategien für das Verhindern der Biofilmbildung erfolgte in diesem Projekt über einen metagenomischen Ansatz. Dieser Ansatz erlaubt auch die Nutzbarmachung der genetischen Information von nicht-kultivierbaren Mikroorganismen. Hierzu wurden Metagenom-Bibliotheken mit *Escherichia coli* und *Pseudomonas aeruginos* erstellt, die dann mittels Testsystemen auf Anti-Quorum-Sensing-Klone gescreent wurden. Die DNA hierfür wurde ungeachtet ihrer Herkunft aus Zellen, die aus der Umwelt stammten, isoliert. Herkunftsorte konnten z.B. Böden, Schleime oder Standorte mit erhöhter Feuchtigkeit sein. Eine weitere Strategie war die Verwendung von niedermolekularen Verbindungen. Diese sollten das QS inhibieren, aber zugleich keine zytotoxischen Eigenschaften besitzen.

Das finale Ziel sollte eine praxisnahe Anwendung der in diesem Projekt gewonnenen Ergebnisse, auch unter Einbeziehung der industriellen Partner sein.

#### Universität Hamburg

(Arbeitskreis Prof. W. Streit, Abteilung für Mikrobiologie und Biotechnologie, Biozentrum Klein Flottbek)

Im Arbeitskreis W. Streit wurden zunächst mittels des metagenomischen Ansatzes große Zahlen von Klonen als Bibliothek mit genetischer Information aus

terrestrischen Habitaten erstellt. Diese Bibliotheken wurden dann mittels eines selbst entwickelten Testsystems auf kleine und stabile Enzyme durchsucht (Kap. 3.4.1). Besonderes Augenmerk lag dabei auf solchen, die das Autoinducersystem AI-1 degenerieren.

Die entwickelten Testsysteme wurden ebenfalls dazu verwendet, niedermolekulare Reinstoffe auf ihr Potential der Biofilminhibierung hin zu untersuchen.

### Universität Kiel

(Arbeitskreis Prof. *R. Schmitz-Streit*, Institut für Allgemeine Mikrobiologie, Biotechnologiezentrum)

Im Arbeitskreis *R. Schmitz-Streit* wurden ebenfalls metagenomische Bibliotheken erstellt und mittels gezielter Testsysteme untersucht (Kap. 3.4.1). Diese stammten jedoch aus marinen Habitaten. Der Fokus der Aktivität lag dabei auf dem enzymatischen Abbau des Autoinducersystems AI-2.

Wie schon im AK *W. Streit* wurden die entwickelten Testsysteme ebenfalls dazu verwendet, niedermolekulare Reinstoffe auf ihr Potential der Biofilminhibierung hin zu untersuchen.

### Ludwig-Maximilians-Universität München

(Arbeitskreis Prof. Dr. *K. Jung*, Department Mikrobiologie I, Abteilung für Mikrobiologie)

Im Arbeitskreis *K. Jung* wurden Techniken entwickelt, um die phänotypische Heterogenität in der Kommunikation von Bakterien näher zu untersuchen. Mit den auf einem Reporterstamm basierenden Testsystemen konnten die Enzyme aus den Arbeitskreisen *Streit* und *Schmitz-Streit*, sowie niedermolekulare Verbindungen aus dem AK *Grond*, auf ihre Anti-Quorum-Sensing-Aktivität näher untersucht werden.

### Technische Universität Hamburg-Harburg

(Arbeitskreis Prof. Dr. A. *Liese*, Institut für technische Biokatalyse)

Im Arbeitskreis A. *Liese* wurde die technische Anwendbarkeit der aus den Arbeitskreisen W. *Streit* und R. *Schmitz-Streit* erhaltenen QQ-Enzyme untersucht. Hierzu wurden die Proteine, die die Fähigkeit besaßen, das Autoinducersystem zu degenerieren, auf festen Oberflächen wie z.B. medizinischen Schläuchen immobilisiert und ihre Bioaktivität mittels Ganz-Zell-Biofilm-Tests geprüft. Die Etablierung möglicher technischer Anwendungen stand hier im Vordergrund.

### Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

(Arbeitskreis Dr. H. *Rohde*, Zentrum für Diagnostik, Institut für medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene)

Im Arbeitskreis H. *Rohde* wurde die Biofilminhibierung mittels neuer Hexoamidasen identifiziert und charakterisiert. Die Forschungsarbeiten basierten vorwiegend auf einem medizinischen Hintergrund. Insbesondere dem unerwünschten Biofilmbewuchs von Staphylococcen auf klinischen Instrumenten.

### Eberhard Karls Universität Tübingen

(Arbeitskreis Prof. Dr. S. *Grond*, Institut für organische Chemie)

Im Arbeitskreis S. *Grond* wurden die aus den Arbeitskreisen W. *Streit* und R. *Schmitz-Streit* isolierten Anti-Quorum-Sensing-Klone auf einen enzymatischen Umsatz hin massenspektrometrisch untersucht. Des Weiteren wurde eine Substanzbibliothek biofilminhibierender niedermolekularer Verbindungen aufgebaut. Zusätzlich wurden Signalmoleküle und zielführende Substanzen chemisch-synthetisch bereitgestellt.

### 3.3 Metagenomische Strategie zur Biofilminhibierung

In der Arbeitsgruppe *W. Streit* wurden mittels eines metagenomischen Ansatzes 8000 Metagenomklone auf QQ-Aktivität gescreent. Besonderes Augenmerk lag dabei auf Enzymaktivitäten, die das AI-1-System degenerieren. Im Verlauf dieser Arbeit konnte ein Klon mit dem Genprodukt BpiB09 als ein Kandidat mit möglicherweise dieser enzymatischen Aktivität verifiziert werden. In der Arbeitsgruppe *S. Grond* wurden deshalb massenspektrometrische Methoden entwickelt, um den enzymatischen Umsatz bezüglich des AI-1-Abbaus chemisch eindeutig charakterisieren zu können. Es wurde angenommen, dass dieser den bereits literaturbekannten Mechanismen zum Abbau von AHLs folgt.

#### 3.3.1 Enzymatik des *N*-Acylhomoserinlactonen-Abbaus

Für den enzymatischen Abbau von *N*-Acylhomoserinlactonen konnten bisher drei Mechanismen eindeutig charakterisiert werden.<sup>[34]</sup>

##### AHL-Lactonasen:

AHL-Lactonasen spalten den Lactonring und führen zum *N*-Acylhomoserin (**24**) (Abb. 6). Die Reaktion ist prinzipiell die gleiche wie bei der säurekatalysierten Lactonspaltung. Es handelt sich somit um eine reversible Reaktion. Bei der am besten untersuchten Gruppe handelt es sich um sogenannte AiiA-Lactonasen.<sup>[34]</sup> Diese sind prototypische Metallohydrolasen der  $\beta$ -Lactamase-Familie, welche zwei  $Zn^{2+}$ -Ionen zur vollen Funktionalität benötigen.<sup>[36]</sup> Gefunden wurde eine solche AHL-Lactonase erstmals in einer *Bacillus*-Spezies.<sup>[37]</sup>

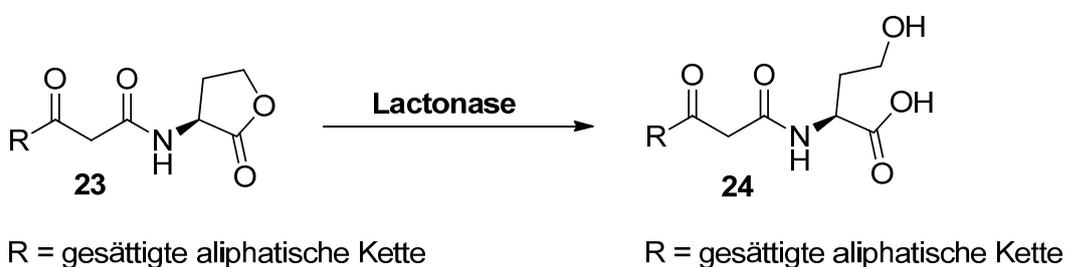


Abbildung 6: Enzymatische Reaktion von AHL-Lactonasen

AHL-Acylasen:

Im Gegensatz zu den AHL-Lactonasen spalten AHL-Acylasen den AI-1 irreversibel durch Spaltung der Amidbindung. Als Produkte entstehen das Homoserinlacton (**26**) und die entsprechende Fettsäure (**25**) (Abb. 7). Erstmals wurde ein solches System in *Variovorax paradoxus* gefunden.<sup>[38]</sup> Gemeinsam ist den bisher sechs gefundenen AHL-Acylasen, dass sie die Reaktion mit längeren Fettsäureketten am Homoserin besser katalysieren, wobei AhIM die einzige ist, die sezerniert wird.<sup>[34]</sup>

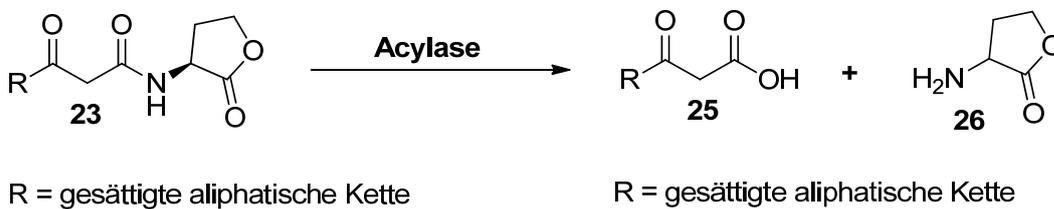


Abbildung 7: Enzymatische Reaktion von AHL-Acylasen

AHL-Oxidoreduktasen:

Bei den AHL-Oxidoreduktasen handelt es sich um eine sehr seltene Gruppe von Enzymen.<sup>[34]</sup> Die Reaktion findet dabei an der Fettsäurekette statt. Bei der ersten publizierten Oxidoreduktase-Aktivität in dem Stamm *Rhodococcus erythropolis* fand eine Reduktion der Ketogruppe im 3-Oxo-C<sub>14</sub>-AHL statt (Abb. 8). Der Nachweis erfolgte über HPLC-UV-MS sowie der Vermessung des kommerziell erhältlichen Edukts und enzymatischen Produkts. In diesem Beispiel konnte ein nahezu vollständiger Umsatz zum 3-OH-C<sub>14</sub>-AHL gezeigt werden.<sup>[39]</sup>

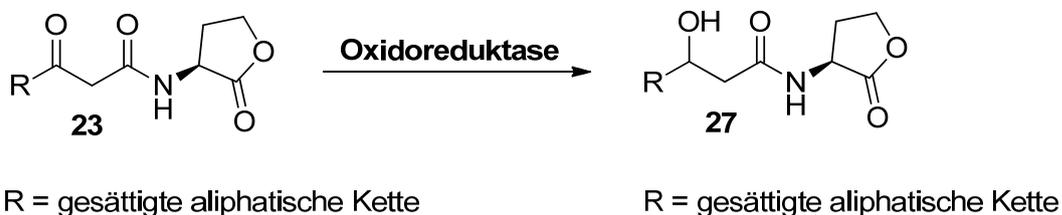


Abbildung 8: Enzymatische Reaktion von AHL-Oxidoreduktasen

### 3.3.2 Biologische Vorarbeiten zur Oxidoreduktase BpiB09

Das Screening der Metagenomklone und die Experimente zur Ausbildung des Biofilms wurden im Arbeitskreis *W. Streit* durchgeführt.

Im ersten Schritt wurden mit einer vorher angefertigten Metagenombibliothek insgesamt 8000 Metagenom-*E. coli*-Transformanten erstellt. Diese wurden mittels eines Blau-Weiß-Screenings untersucht, das auf dem Reporterstamm *A. tumefaciens* mit einem QS-abhängigem Gen und der Spaltung von X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indoyl- $\beta$ -D-galaktopyranosid) basierte (Kap. 3.4.1). Mittels dieses Testsystems konnte bestimmt werden, ob die Metagenomklone enzymatische Aktivität bezüglich des AI-1-Systems besaßen. Aus diesem Screening ging ein Klon mit der Bezeichnung Bio5 hervor. Der ORF (open reading frame) mit biofilminhibierender Wirkung konnte im weiteren Verlauf als *bpiB09* (biofilm inhibiting gene) charakterisiert werden. Die größte Ähnlichkeit wies dieses Gen zu einer Kurzketten-Oxidoreduktase aus dem *Acidobacterium capsulatum* auf (57 % Ähnlichkeit). Aus diesem Grund wurde bereits zu diesem frühen Zeitpunkt vermutet, dass es sich bei dem Genprodukt BpiB09 um eine Oxidoreduktase handelte (Abb. 9).

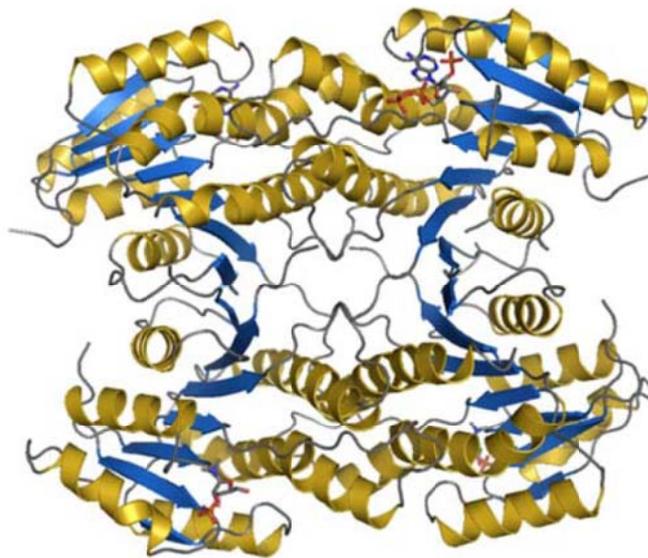


Abbildung 9: Kristallstruktur des Genproduktes BpiB09 mit NADP<sup>+</sup><sup>[40]</sup>

Die rekombinante Produktion des Proteins wurde in *E.coli* BL21 DE3 mittels Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG) induziert. Die anschließende Aufreinigung erfolgte chromatographisch mittels His-tag Ni TED.

Da die Motilität und die Biofilmbildung in *P. aeruginosa* QS-gesteuert ist, wurde *bpiB09* für die weitere Charakterisierung in diesen Expressionswirt kloniert. Dabei war, speziell auch für die spätere chemische Analytik, die Bereitstellung von Negativkontrollen unerlässlich. Zu diesem Zweck wurden auch Expressionsstämme von *P. aeruginosa* erstellt, in die statt dem Gen *bpiB09* ein Cellulase-Gen ähnlicher Größe aus dem *Acidobacterium capsulatum* kloniert wurde. Aus vorherigen Studien war hervorgegangen, dass dieses Gen keinerlei Einfluss auf die Biofilmbildung besaß.

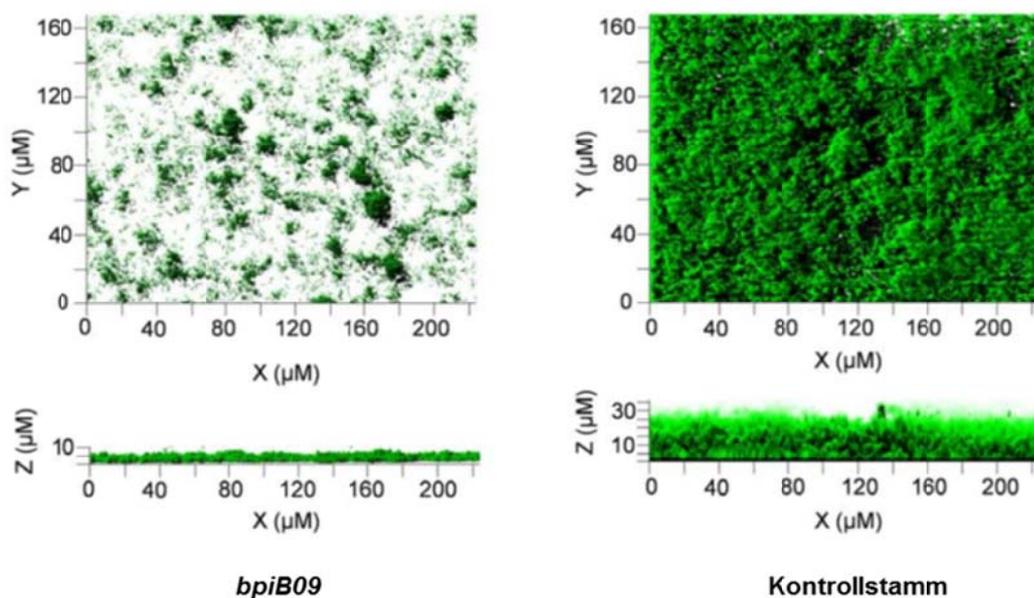


Abbildung 10: Einfluss von *bpiB09* auf die Biofilmbildung in *P. aeruginosa*<sup>[40]</sup>

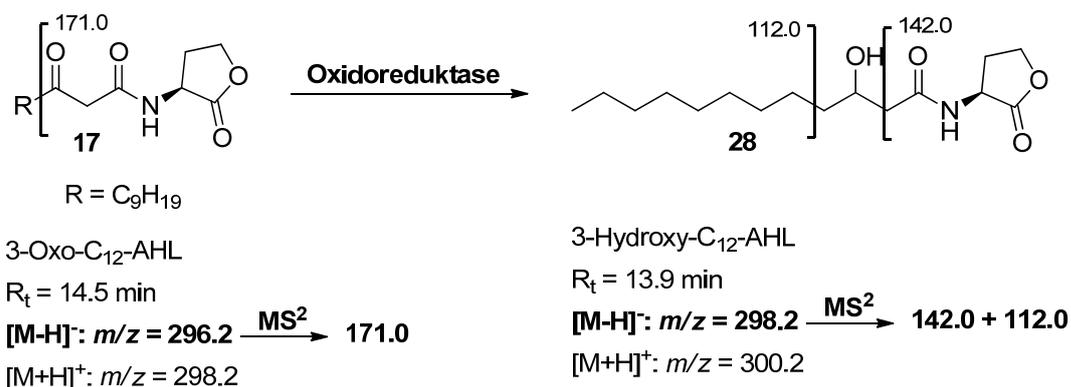
Unter anderem wurde der Einfluss des Genproduktes BpiB09 in *P. aeruginosa* auf die Biofilmbildung in einer Flusszelle untersucht. Die Experimente wurden einer Zellkultur von *P. aeruginosa*, die das Gen *bpiB09* trug und der Negativkontrolle durchgeführt. Nach einer Inkubationszeit von 72 h zeigte die Negativkontrolle eine Biofilmdicke von 30–35  $\mu\text{m}$ . Die Zellkultur mit dem Gen

*bpiB09* hingegen zeigte einen Bewuchs von 5–10 µm (Abb. 10). Dieses Ergebnis war ein weiterer Indikator für die biofilminhibierende Wirkung des Genproduktes BpiB09. Ähnlich wie die Biofilmbildung wurde auch die Motilität von *P. aeruginosa* durch *bpiB09* deutlich herabgesetzt. Des Weiteren wurde der Einfluss auf die Pyocyanin-Produktion und die reduzierte Paralyse von *Caenorhabditis elegans* näher untersucht. In beiden Fällen ist das Testergebnis QS-abhängig. Auch hier konnte gezeigt werden, dass das Genprodukt BpiB09 im Vergleich zur Negativkontrolle das QS unterbindet.<sup>[40]</sup>

### 3.3.3 Chemische Analytik zur Oxidoreduktase BpiB09

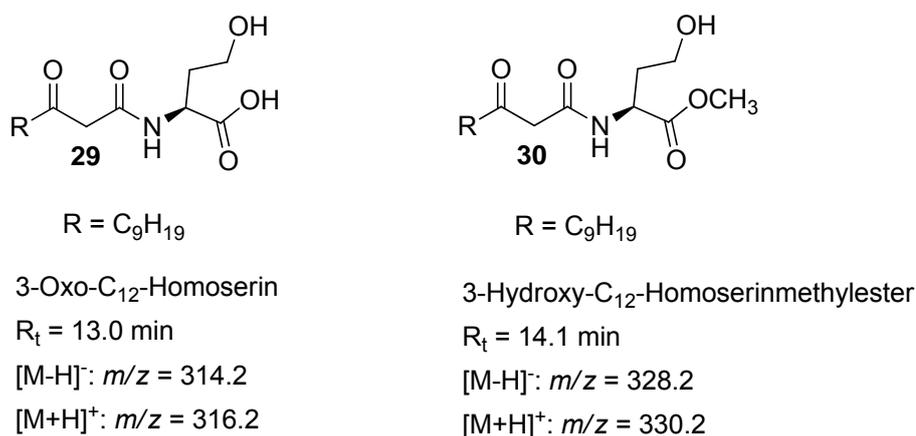
Im Arbeitskreis S. Grond sollte nun chemisch-analytisch untersucht werden, ob es sich bei dem gefundenen Genprodukt BpiB09 um eine Oxidoreduktase handelte, die den AI-1 degeneriert und somit ursächlich für die deutlich verminderte Biofilmbildung sein könnte.

Als Substrat diente das 3-Oxo-C<sub>12</sub>-AHL (**17**), welches nach enzymatischem Umsatz in das 3-Hydroxy-C<sub>12</sub>-AHL (**28**) umgewandelt werden könnte. Der erste Schritt der Analytik bestand darin, das kommerziell erhältliche Edukt und Produkt (*Sigma-Aldrich*) massenspektrometrisch zu vermessen, um Referenzwerte zu erhalten. Als wichtige Parameter galten die Ionisierbarkeit im Massenspektrometer, die Adduktbildung, die Fragmentierung in der MS<sup>2</sup> und die Retentionszeit. In Abbildung 11 sind die finalen Parameter der HPLC-ESI-MS-Messung nach vorhergehender Optimierung aufgeführt. Bezüglich der Fragmentierung des 3-Oxo-C<sub>12</sub>-AHL (**17**) konnte nicht abschließend geklärt werden, wie es zu einer Abweichung von 1 u aus der gemessenen Masse von  $m/z = 171.0$  und der berechneten Masse von  $m/z = 170.0$  des Hauptfragmentes kam. Genutzt wurde eine *Supersphere* C18-Säule, Acetonitril / Wasser als mobile Phase und 0.05 % Ameisensäure als Additiv (HPLC D, Säule B, Programm B). Für diese Messungen wurde eine Konzentration von 0.5 mg/mL der Reinsubstanz in Methanol eingestellt.



**Abbildung 11: Analytische Parameter für das Substrat 3-Oxo-C<sub>12</sub>-AHL (17) und das Oxidoreduktaseprodukt 3-Hydroxy-C<sub>12</sub>-AHL (28)**

Zusätzlich zu den Reinsubstanzen konnten je nach Verweildauer im Lösungsmittel zwei Nebenprodukte detektiert werden. Hierbei handelte es sich zum einen um das durch Autohydrolyse entstehende geöffnete Lacton **29** und zum anderen um den im Methanol entstehenden Methylester **30** (Abb. 12). Aufgrund dieser Tatsache wurde im weiteren Verlauf eine Zeit von 8 h vom Lösen der Probe bis zu ihrer Vermessung nicht überschritten. In diesem Zeitfenster war die Konzentration der Zerfallsprodukte konstant.



**Abbildung 12: Strukturen des geöffneten Lactons 29 und des Methylesters 30 des 3-Oxo-C<sub>12</sub>-AHL (17)**

Vom Arbeitskreis *W. Streit* wurden zwei unterschiedliche Arten von Proben zur Verfügung gestellt. Zum einen handelte es sich dabei um den Ethylacetat-Extrakt einer 16 h gewachsenen Kultur von *P. aeruginosa* mit dem Gen *bpiB09* und eine Negativkontrolle (Kap. 3.3.2). Hier sollte geprüft werden, ob sich in den *bpiB09*-Proben im Vergleich zu den Negativkontrollen deutlich erhöhte Konzentrationen des enzymatischen Abbauproduktes **28** detektieren lassen. Zum anderen handelte es sich um aufgereinigtes BpiB09, dem extern 3-Oxo-C<sub>12</sub>-AHL (**17**) zugesetzt wurde und ebenfalls eine Negativkontrolle. Der Vorteil bei diesem *in vitro*-Ansatz lag in der erhöhten Substrat- und Enzymkonzentration innerhalb der zu untersuchenden Probe. Die Zusammensetzung dieser Proben wurde im Laufe der Zusammenarbeit mehrfach optimiert.

Diese Proben setzten sich final wie folgt zusammen:

- 125 µL BpiB09 (0.4 mg/mL in 100 mM in Kalium-Phosphat-Puffer pH = 7.4)
- 95 µL DMSO
- 1.5 µL 3-Oxo-C<sub>12</sub>-AHL (**17**) (1 M in DMSO)
- 5 µL NADPH (100 mM in 100 mM in Kalium-Phosphat-Puffer pH = 7.4)
- 270 µL 100 mM in Kalium-Phosphat-Puffer pH = 7.4

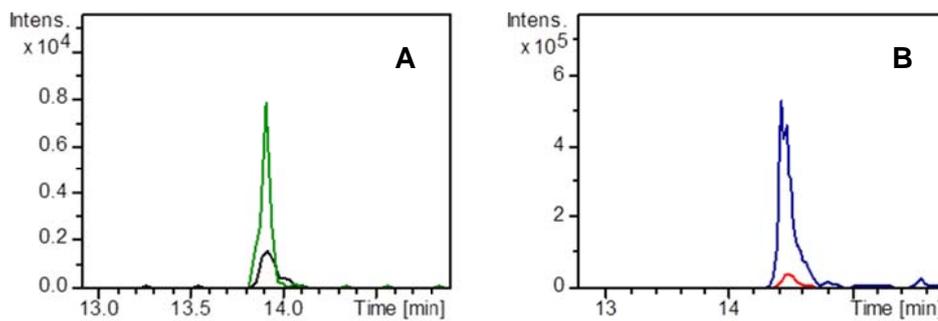
Die Proben wurden 16 h bei 28 °C inkubiert und mit Ethylacetat extrahiert.

Bei der hier verwendeten analytischen HPLC-MS Methode erfolgte ein positiver Nachweis der Oxidoreduktase-Aktivität durch den Vergleich der BpiB09-Proben mit den Negativkontrollen. In den Proben mit der eingefügten genetischen Sequenz (Insert) *bpiB09* sollten sich im Gegensatz zu den Negativkontrollen signifikant erhöhte Werte für das 3-Hydroxy-C<sub>12</sub>-AHL (**28**) nachweisen lassen. Um die Reproduzierbarkeit der gemessenen Daten zu gewährleisten wurde jede Probe dreifach bereitgestellt.

Für die Vermessung wurden die Proben gewogen und mit einer Konzentration von 5 mg/mL in Methanol gelöst. Bereits aus ersten Messungen mittels HPLC-ESI-MS (HPLC C, Säule A, Programm A) wurde ersichtlich, dass die Konzentrationen des reduzierten Produktes, wenn überhaupt vorhanden, äußerst

gering waren. In den Kulturüberständen ließ sich das natürliche Edukt 3-Oxo-C<sub>12</sub>-AHL (**17**) sowohl in der BpiB09-Probe als auch in der Negativkontrolle massenspektrometrisch nachweisen, wobei durch Berechnung des Flächenintegrals der Signale für das [M-H]<sup>-</sup> in der Negativkontrolle deutlich erhöhte Konzentrationen vorlagen. Dieses Phänomen konnte nicht als Indikator für eine Oxidoreduktase-Aktivität angesehen werden. In den Proben mit dem aufgereinigten Protein ließ sich ebenfalls nur das extern zugegebene 3-Oxo-C<sub>12</sub>-AHL (**17**) nachweisen, unabhängig von der Art der Probe. Aus diesem Grund wurde versucht, die Proben mittels C<sub>18</sub>-SPE-Kartuschen anzureichern. Zum Beladen wurde ein Verhältnis von Wasser/Methanol von 3/2 gewählt, da die Probe unter diesen Bedingungen komplett gelöst werden konnte. Die Elution des Analyten erfolgte dann mit einem Gemisch aus Wasser/Methanol im Verhältnis 1/4. Durch diesen Ansatz gelang es zwar, eine vierfach angereicherte Zielfraktion zu erhalten, allerdings ließ sich auch mit diesem System kein Umsatz detektieren.

Aufgrund dieser Ergebnisse erfolgte der Umstieg auf eine andere HPLC-ESI-MS-Anlage mit einer *Nucleosil* C18-Säule, Acetonitril / Wasser als mobiler Phase und 0.06 % / 0.1 % Ameisensäure als Additiv (HPLC D, Säule B, Programm B). Dieses Massenspektrometer ermöglichte sensitivere Messungen; zusätzlich war auf der *Nucleosil*-Phase eine bessere Auftrennung der Analyten zu verzeichnen. Mit dem neuen System war es erstmals möglich, sowohl das 3-Oxo-C<sub>12</sub>-AHL (**17**) als auch das 3-Hydroxy-C<sub>12</sub>-AHL (**28**) sicher zu detektieren. Im Fall der extrahierten Kulturüberstände zeigte sich allerdings, dass sich sowohl in den BpiB09-Proben als auch in den Negativkontrollen die reduzierte Form **28** nachweisen ließ. Die Unterschiede zwischen der BpiB09-Probe und der Negativkontrolle waren jedoch nicht signifikant. Aufgrund dieser Messungen ließ sich nur feststellen, dass der Stamm *P. aeruginosa* mit dem *bpiB09*-Insert in der Gesamtheit weniger des AI-1 (**17**) exprimiert. Ein Rückschluss auf eine Oxidoreduktase-Aktivität war somit aus den Extrakten von Kulturüberständen in diesem Fall nicht möglich (Abb. 13).

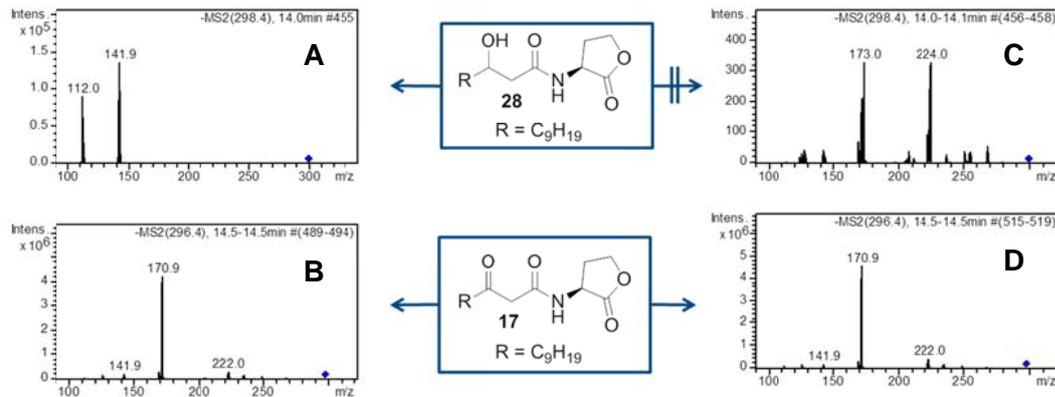


**Abbildung 13: Extrahierte MS<sup>2</sup>-Massenspektren (negative Ionen) der Ethylacetat-Extrakte aus *P. aeruginosa***

**A:**  $m/z = 142.0$ : BpiB09-Probe (schwarz); Negativkontrolle (grün)

**B:**  $m/z = 171.0$ : BpiB09-Probe (rot); Negativkontrolle (blau)

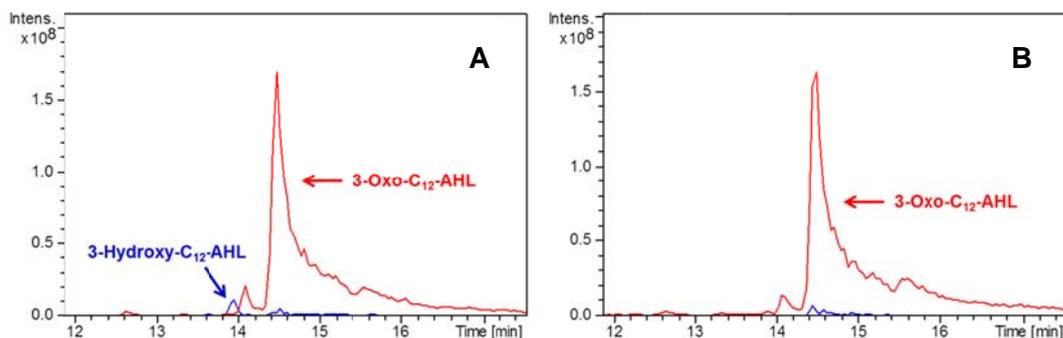
Ein anderes Bild ergab sich für die Messungen des aufgereinigten Proteins. In den BpiB09-Proben war eine eindeutige Detektion des 3-Hydroxy-C<sub>12</sub>-AHL (**28**) möglich, während sich in den Negativkontrollen nur Spuren nachweisen ließen. Nach Berechnung der Flächenintegrale für die MS<sup>2</sup>-Signale  $m/z = 142.0$  und  $m/z = 112.0$  des 3-Hydroxy-C<sub>12</sub>-AHL (**28**) ergab sich einen Faktor von 560 zwischen den BpiB09-Proben und den Negativkontrollen. Diese Abschätzung war direkt aus diesen Messungen möglich, da es sich um die gleiche Verbindung handelte. Zusätzlich bot die Integration von MS<sup>2</sup>-Spektren eine erhöhte Genauigkeit aufgrund des geringeren Signal-Rausch-Verhältnisses im Vergleich zum einfachen MS-Spektrum. Es war somit ein signifikanter Unterschied zwischen diesen Proben vorhanden, die belegten, dass das Genprodukt BpiB09 in der Lage ist, das 3-Oxo-C<sub>12</sub>-AHL (**17**) in das 3-Hydroxy-C<sub>12</sub>-AHL (**28**) umzuwandeln. Des Weiteren diente das zugegebene 3-Oxo-C<sub>12</sub>-AHL (**17**), welches immer noch im deutlichen Überschuss vorhanden war, als interner Standard, um die Verlässlichkeit der Messung zu gewährleisten. Durch diese Ergebnisse ließ sich das Genprodukt BpiB09 eindeutig als Oxidoreduktase charakterisieren (Abb. 14–15).



**Abbildung 14: MS<sup>2</sup>-Spektren (negative Ionen) zur Verifizierung der Oxidoreduktaseaktivität des Genprodukts BpiB09**

Probe mit dem Genprodukt BpiB09 (**A** und **B**) und die Negativkontrolle (**C** und **D**)

**A:** Oxidoreduktaseprodukt **28**; **B:** Eingesetztes Substrat **17**; **C:** Oxidoreduktaseprodukt nicht nachweisbar; **D:** Eingesetztes Substrat **17**



**Abbildung 15: Extrahierte Massenspuren (negative Ionen) für das 3-Hydroxy-C<sub>12</sub>-HSL (**28**) (blau) und das 3-Oxo-C<sub>12</sub>-HSL (**17**) (rot)**

**A:** Probe mit dem Genprodukt BpiB09; **B:** Negativkontrolle

Mittels der massenspektrometrischen Verfahren konnte zwar gezeigt werden, dass es sich bei dem Genprodukt BpiB09 um eine Oxidoreduktase handelt, die Umsätze waren allerdings relativ gering. Die in der Literatur beschriebene Oxidoreduktase aus dem Stamm *R. erythropolis* wies im Vergleich deutlich höhere Umsatzraten auf.<sup>[39]</sup> Eine Abschätzung für das Genprodukt BpiB09 ist auf Grundlage dieser Messungen schwierig, da das 3-Oxo-C<sub>12</sub>-HSL (**17**) und das

3-Hydroxy-C<sub>12</sub>-AHL (**28**) unterschiedliche Ionisationseigenschaften besitzen und somit kein direkter Vergleich der Signalflächenintegrale möglich ist. Die Umsätze dürften jedoch den kleinen einstelligen Prozentbereich nicht überschreiten. Auf eine mögliche Erklärung für den großen Einfluss auf die Biofilmbildung von BpiB09 in *P. aeruginosa* wird in Kapitel 3.6 näher eingegangen.

### 3.3.4 Chemische Synthese zur Substratspezifität von BpiB09

Aus der chemischen Analytik zum Genprodukt BpiB09 wurde ersichtlich, dass die Umsatzraten für das 3-Oxo-C<sub>12</sub>-AHL (**17**) gering waren. Es wurde daher angenommen, dass es sich hierbei nicht um das natürliche Substrat dieses Enzyms handelte. Aus diesem Grund wurden durch den Arbeitskreis S. *Grond* strukturell ähnliche Verbindungen zur Verfügung gestellt, um die Substratspezifität näher zu untersuchen. Dies geschah in Zusammenarbeit mit dem Lehramtskandidaten J. *Stengel* im Rahmen seiner Zulassungsarbeit.<sup>[41]</sup>

Der ursprüngliche Ansatz bestand darin, strukturverwandte *N*-Acetylcysteaminthioester (SNAC-Ester) zu synthetisieren, da diese eine höhere Membranpermeabilität und eine geringere Polarität aufweisen, als die entsprechenden Fettsäurecarboxylate.<sup>[42]</sup> Die Synthesestrategie sah vor, unterschiedliche  $\beta$ -Ketosäuren mit *N*-Acetylcysteamin (**33**) zu verestern. Es war allerdings bekannt, dass diese Säuren äußerst instabil sind und sehr leicht decarboxylieren.<sup>[43]</sup> Daher sollten 1,3-Diole zu  $\beta$ -Ketosäuren aufoxidiert werden und *in situ* weiter verestert werden (Abb.16).

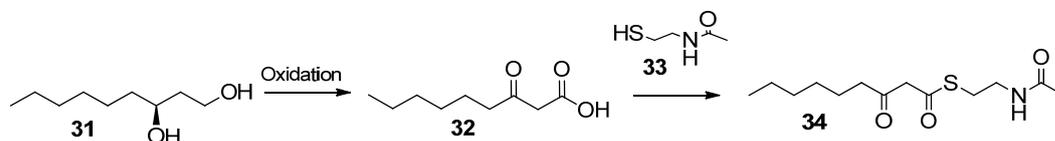
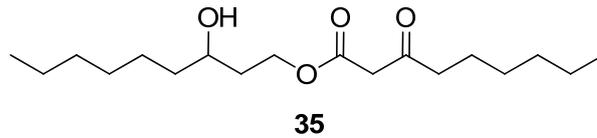
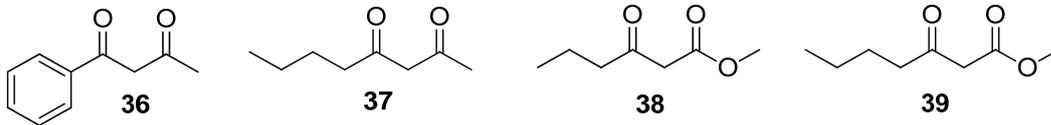


Abbildung 16: Synthesestrategie zur Darstellung der SNAC-Ester ausgehend vom 1,3-Nonadiol (**31**)

Am Beispiel des 1,3-Nonadiols (**31**) zeigte sich allerdings, dass diese Strategie nicht zum Erfolg führte, da bei der Oxidation das entstehende Produkt **32** mit dem Edukt **31** zu **35** kondensiert. Dieses Phänomen zeigte sich sowohl bei der Oxidation mittels Chromsäure als auch bei einer Ruthenium-katalysierten Reaktion. Des Weiteren wurde noch eine zweistufige Synthese über die Oxidation zum Keton und dann weiter zur Carbonsäure durchgeführt. Alle diese Ansätze führten jedoch nicht zur erfolgreichen Synthese des SNAC-Esters **34**.<sup>[41]</sup>



Aufgrund seiner Struktur wurde das bei der Oxidation entstehende Produkt **35** als mögliches Substrat erachtet. Dieses wurde neben den vier kommerziell erhältlichen Substanzen **36–39** dem Arbeitskreis *W. Streit* für Aktivitätstests zur Verfügung gestellt. Bei keiner der Verbindungen konnte allerdings deutlich erhöhte Aktivität nachgewiesen werden. Auch Versuche mit einem durch den Kooperationspartner erweiterten Substanzspektrum führten zu keinem abschließenden Ergebnis.



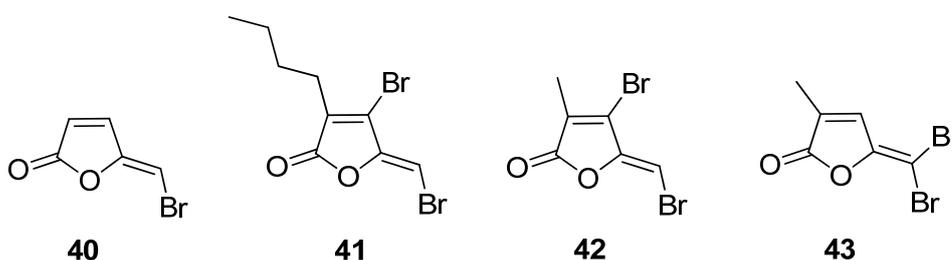
Diese Resultate legten den Schluss nahe, dass es sich bei dem Genprodukt BpiB09 um eine Oxidoreduktase mit einem sehr weiten, aber unspezifischen Substratspektrum handelt.

### 3.4 Niedermolekulare Verbindungen als Biofilminhibitoren

Innerhalb des Verbundprojekts wurden von der Arbeitsgruppe S. Grond niedermolekulare Verbindungen bereitgestellt. Diese wurden dann von den Kooperationspartnern auf biologische Aktivität hin untersucht. Bei diesen Testsystemen war der Fokus auf der QSI. Die getesteten Substanzen sollten also das QS stören, zugleich aber keine Zytotoxizität besitzen.

Auf diesem Gebiet gab es bisher einige vielversprechende Ansätze. Diese lassen sich im Wesentlichen auf zwei unterschiedliche Gruppen reduzieren. Zum einen stammen die aktiven Substanzen aus dem Bereich der Naturstoffe. Zum anderen handelt es sich um chemisch-synthetische Verbindungen, die strukturelle Analogien zu den AI-Systemen aufweisen können.<sup>[25]</sup>

Eine Verbindungsklasse, die bisher sehr detailliert untersucht wurde, sind die halogenierten Furanone (HF) **40–43** aus der Rotalge *Delisea pulchra*. Studien konnten belegen, dass diese die Biofilmbildung in *E. coli* und *B. subtilis* nachhaltig beeinflussen.<sup>[44]</sup> Strukturell fällt die Analogie zu den AHLs aus dem AI-1-System auf. Auch hier lässt sich eine relativ polare Kopfgruppe mit lipophilem Rest finden. Es wird angenommen, dass die biologische Aktivität der HFs (**40–43**) aufgrund einer starken Bindungsaffinität zum Rezeptor zustande kommt. Diese erfolgt durch einen nucleophilen Angriff des Enon-Teils vom HF in der Bindungstasche. Als Konsequenz ergibt sich eine Veränderung der Struktur des Proteins, welche es anfälliger für die Zersetzung macht.<sup>[45]</sup>



Ein Beispiel für synthetisch hergestellte Biofilminhibitoren wurde von der Arbeitsgruppe H. E. Blackwell erarbeitet (Abb. 17).<sup>[46]</sup> Hier wurde der Einfluss von natürlichen und unnatürlichen AI-1-Strukturanaloga auf die Biofilmbildung in *P. aeruginosa* und *Agrobacterium tumefaciens* untersucht. Als gemeinsames

Strukturmerkmal wiesen alle Verbindungen eine relativ polare Kopfgruppe mit lipophilem Rest auf. Am wirksamsten stellten sich dabei die Derivate **44** und **45** heraus. Mit einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  der jeweiligen Verbindung konnte ein signifikanter Rückgang der Biofilmbildung festgestellt werden.

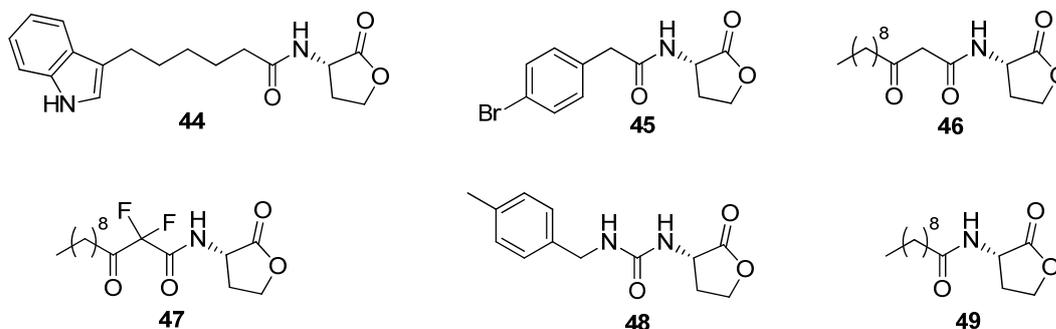


Abbildung 17: Synthetisch hergestellte Biofilminhibitoren

Es gibt noch viele weitere Arbeiten, die die Strukturmerkmale des AI-1 aufnehmen und entsprechend variieren. Beispiele hierfür können Thiolactone, Sulfonamide und *N*-acylierte Cyclopentylamide als polare Kopfgruppe sein. Für alle diese Verbindungsklassen gibt es Strukturen, die in der Lage sind, die Biofilmbildung zu verhindern. Beispielsweise konnte mit dem *N*-acylierten Cyclopentylamid **49** die Ausbildung eines Biofilms in einer Flusszelle bei einer Konzentration von 250  $\mu\text{M}$  vollständig unterbunden werden.<sup>[25]</sup>

### 3.4.1 Verwendete Testsysteme

Die vom Arbeitskreis S. Grond zur Verfügung gestellten niedermolekularen Verbindungen wurden im Verbund von unterschiedlichen Arbeitskreisen auf biologische Aktivität hin untersucht. Dabei kamen unterschiedliche Testsysteme zum Einsatz.

### Arbeitskreis W. Streit (Universität Hamburg)

Bei dem ersten Testsystem handelte es sich um ein Blau-Weiß-Screening, welches vom Aufbau dem aus dem Metagenomscreening ähnlich war (Kap. 3.3.2). In diesem Fall wurden allerdings keine Extrakte von *E. coli* verwendet, sondern die niedermolekularen Verbindungen eingesetzt. Kernstück war der Reporterstamm *A. tumefaciens* NTL4, der von sich aus nicht mehr in der Lage war, AHLs zu exprimieren und in den mehrfach das AHL-Rezeptorgens *traR* kloniert wurde. Als weiteres trug der Stamm ein *lacZ*-Gen mit vorgeschaltetem Promoter, der durch den TraR-AHL-Komplex aktiviert werden konnte. Das gesamte Testsystem wurde in Mikrotiterplatten durchgeführt. Als wesentliche Bestandteile wurden in diesem Fall der Reporterstamm in einem Softagar, die entsprechende niedermolekulare Verbindung, 3-Oxo-C<sub>8</sub>-AHL (0.1–10 µM) und X-Gal zusammengegeben. Ohne QSI wurde durch das extern zugegebene AHL das Ablesen des *traR*-Gen induziert, wodurch ebenfalls das *lacZ*-Gen aktiviert wurde, welches das Enzym  $\beta$ -Galactosidase exprimierte. Dadurch konnte das im Agar befindliche X-Gal gespalten werden und eine Blaufärbung trat auf. Wurde durch die niedermolekulare Verbindung das QS inhibiert, konnte das entsprechende Gen nicht abgelesen werden und das X-Gal wurde nicht gespalten. Im Falle eines positiven Testergebnisses trat somit keine Blaufärbung auf.

Ein weiteres Testsystem war der sogenannte Biofilmdesintegrationsassay. Dieser Test erfolgte ebenfalls in Mikrotiterplatten. Hierfür wurde ein Stamm *Staphylococcus epidermidis* 1457 im Nährmedium in Mikrotiterplatten pipettiert und anschließend die jeweilige niedermolekulare Verbindung zugegeben. Die Kulturen wurden für 48 h bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurden die planktonischen, also die freischwimmenden Zellen und das Medium entfernt und der getrocknete Biofilm mit Kristallviolett-Lösung eingefärbt. Ein positives Testergebnis war durch eine deutlich verminderte violette Färbung gegeben.

Im letzten Testsystem wurde die Biofilmbildung von *P. aeruginosa* in Reagenzgläsern untersucht. Hierfür wurden 5 mL Nährmedium und die niedermolekulare Verbindung in ein Reagenzglas gegeben. Der Ansatz wurde

mit *P. aeruginosa* angeimpft und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Im Falle eines positiven Testergebnisses musste sich im Vergleich zu einer Kultur ohne niedermolekulare Verbindung am Rand des Reagenzglas ein deutlich geringerer Biofilm abzeichnen.

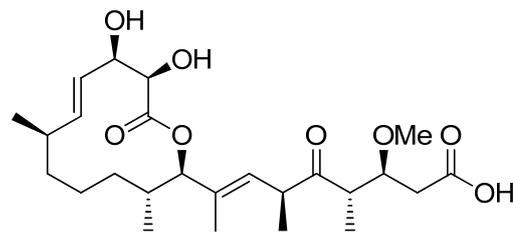
### Arbeitskreis R. Schmitz-Streit (Universität Kiel)

Das Detektionsprinzip dieses Testsystems beruhte auf dem Wachstum des Reporterstamms *E. coli* K12 auf einer Agarplatte. Dieser enthielt ein Plasmid mit QSI-abhängigem Promotor mit letalem Gen und war in der Lage, das AI-1-System zu exprimieren. Im ersten Schritt wurden Löcher in eine Agarplatte gestanzt und diese mit dem Stamm *E. coli* K12 beimpft. Im Anschluss wurde die jeweilige niedermolekulare Verbindung in die Vertiefungen pipettiert und über Nacht inkubiert. Im Falle von QSI durch die niedermolekulare Verbindung wurde der Promotor nicht aktiviert und das letale Gen konnte nicht abgelesen werden. Der Stamm zeigte also normales Wachstum. Ein großer Vorteil dieses Detektionsprinzips beruhte darauf, dass sicher zwischen QSI und Zytotoxizität unterschieden werden konnte.

### **3.4.2 Naturstoffe in Anti-Biofilm-Testsystemen**

Die erste Art von niedermolekularen Verbindungen, die von der Arbeitsgruppe S. Grond zur Verfügung gestellt wurde, kam aus dem Bereich der Naturstoffe. Diese wurden entweder selbst fermentiert oder kommerziell durch die Firma *Bioviotica GmbH* bezogen.

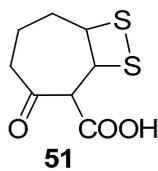
Als ein exemplarischer Vertreter aus dieser Substanzklasse kann das Carolacton (**50**) aus dem Myxobakterium *Sorangium cellulosum* gesehen werden.<sup>[47]</sup> Dieser Sekundärmetabolit beeinträchtigt die Biofilmbildung von *S. mutans* bereits in nanomolaren Konzentrationen.<sup>[48]</sup> Diese Verbindung hat dabei weniger Einfluss auf das Wachstum der planktonischen Zellen, sondern vielmehr auf diese, die sich bereits in einem Biofilm befinden.



**50**

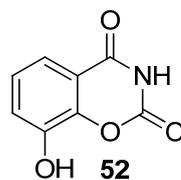
Es konnte gezeigt werden, dass das Carolacton (**50**) die Expression von verschiedenen Zweikomponenten-Signaltransduktion-Systemen (TCS) stört. TCS ist ein Regulationssystem, welches man hauptsächlich in Prokaryoten, aber auch in einer kleinen Zahl in Eukaryoten findet. Dieses System ist vorherrschend bei der Kommunikation von Bakterien. Es erlaubt ihnen, Veränderungen in ihrer Umgebung wahrzunehmen und darauf zu reagieren.<sup>[25]</sup> Microarray-Analysen identifizierten die Proteine VicKRX und ComDE als zentrales Element im Wirkmechanismus des Carolactons (**50**); zusätzlich wurden bekannte VicR kontrollierte Gene runterreguliert.<sup>[48]</sup> Obwohl das Carolacton (**50**) in der Lage ist, die Biofilmbildung in *S. mutans* zu beeinträchtigen, weist es ansonsten keine biozide Wirkung auf. Diese Eigenschaft verdeutlicht das Potenzial von Naturstoffen für die Biofilmbekämpfung.

In einem ersten Schritt wurde daher eine Zusammenstellung von 27 Reinsubstanzen und vier biologisch aktiven Rohextrakten mittels der Antibiofilm-Testsysteme gescreent (Abb. 18–19) (Kap. 3.3.1)



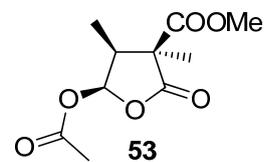
**51**

Tropodithiolsäure



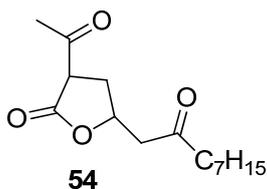
**52**

Benadrostin



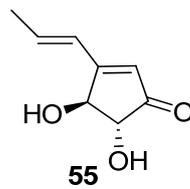
**53**

Acetomycin



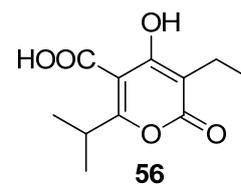
**54**

Octanoylacetomycin



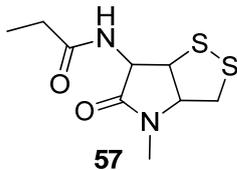
**55**

Terrein

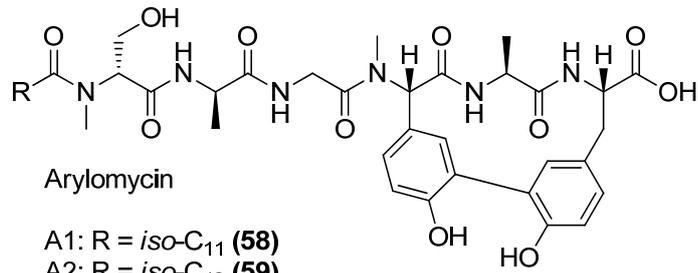


**56**

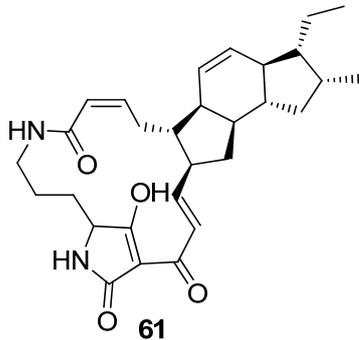
Germicidinsäure A



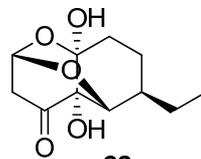
Aureothricin



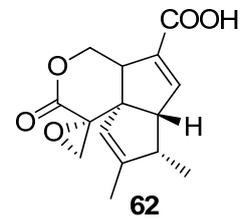
Arylomycin



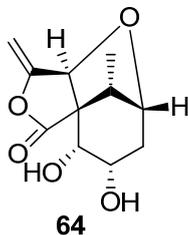
Ikarugamycin



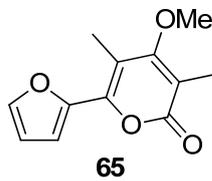
Agistatin E



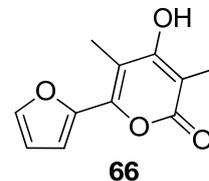
Pentalenolacton (Epoxyd)



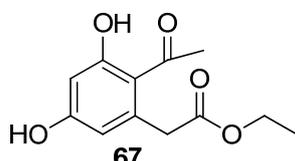
Massarilacton A



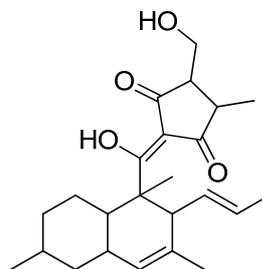
3,5-Dimethyl-6-(2-furanyl)-  
4-methoxy-2H-pyran-2-one



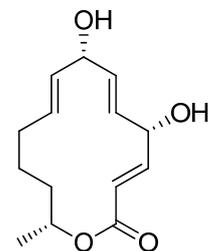
3,5-Dimethyl-6-(2-furanyl)-  
4-hydroxy-2H-pyran-2-one



Cuvulin



CJ-21058



Mutolid

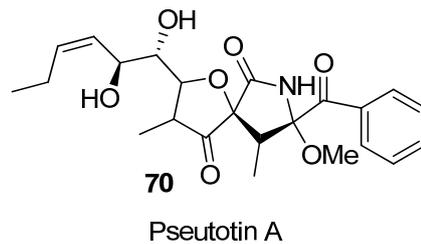


Abbildung 18: Substanzen ohne nachweisbare biofilminhibierende Wirkung (51–70)

Aus dem Screening-Prozess konnten vier Verbindungen als mögliche Biofilminhibitoren verifiziert werden (Abb. 19). Im Blau-Weiß-Screening wurden das Aspyron (**74**) und das Asperlacton (**72**) als aktiv getestet. Im Biofilmdesintegrationsassay und dem Plattendiffusionstest stellten sich Ascolacton (**71**) und Concanamycin (**73**) als potentiell biofilminhibierend heraus. Innerhalb des Blau-Weiß-Screening wurde auch das beschriebene Carolacton (**50**) untersucht. Interessanterweise konnte hier zwar eine Aktivität detektiert werden, jedoch war die Entfärbung für das Aspyron (**74**) und Asperlacton (**72**) deutlich höher. Dies spricht zumindest in diesem Testsystem für ein deutlich höheres Potential, das QS zu inhibieren.

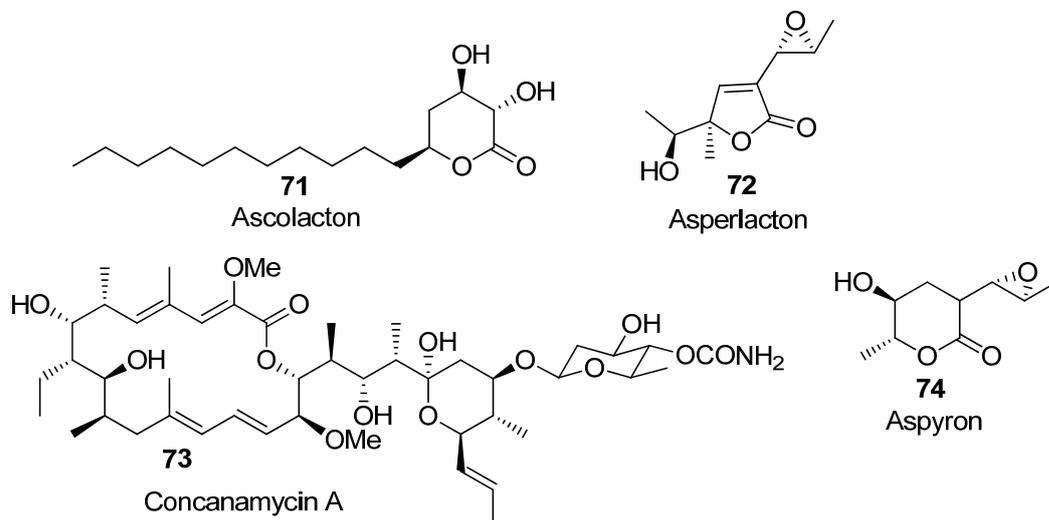


Abbildung 19: Substanzen mit potentiell biofilminhibierender Wirkung (71–74)

Im Rahmen einer ersten Abschätzung der physiochemischen Eigenschaften durch die Berechnung der Elektronendichteverteilung wurde ersichtlich, dass insbesondere das Asperlacton (**72**), Ascolacton (**71**) und Aspyron (**74**) starke Analogien zu dem AI-1-System aufwiesen (Abb. 20). Ob für diese Verbindungen ein ähnlicher Wirkmechanismus vorliegt, wie bei den bromierten Furanonen (**40–43**), konnte nicht abschließend geklärt werden. Ein solcher Mechanismus wäre allerdings denkbar.

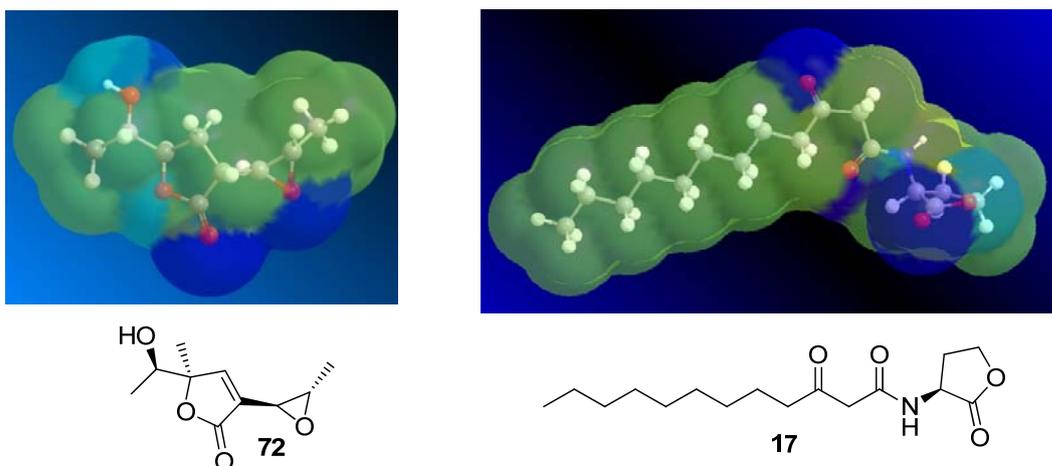
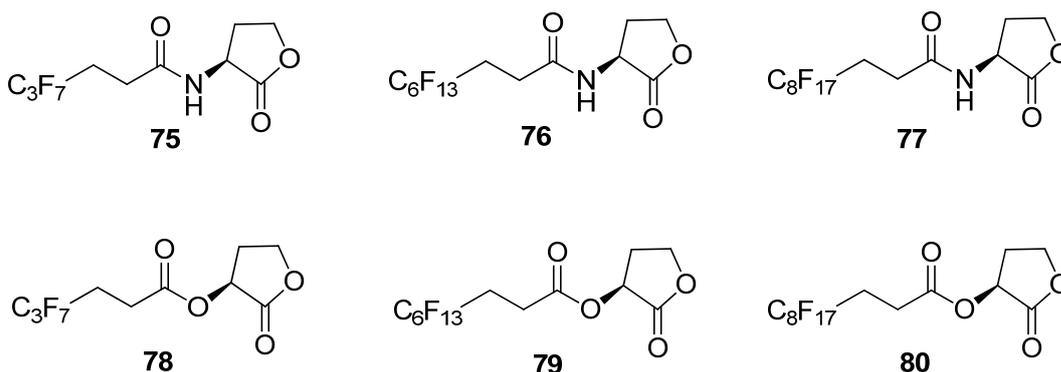


Abbildung 20: Vergleich der Elektronendichteverteilung des Asperlactons (**72**) und des 3-Oxo-C<sub>12</sub>-AHL (**17**)

Im ersten Schritt dieses Screenings stand zunächst die Suche nach potentiell biofilminhibierenden Substanzen im Vordergrund. Aus diesem Grund lagen die Untersuchungen zur minimalen Wirkstoffkonzentration und dem molekularen Wirkmechanismus zum Zeitpunkt dieser Arbeit noch nicht vor, sind aber in Kooperation mit dem Arbeitskreis *K. Jung* in Arbeit. Im Falle des Blau-Weiß-Screenings zeigten die aktiv getesteten Substanzen **72** und **74** allerdings bereits ab Konzentrationen von ungefähr 50  $\mu\text{M}$  einen deutlichen Farbumschlag. Aufgrund dieser Tatsache dürfte die minimale Wirkstoffkonzentration ebenfalls in diesem Bereich liegen.

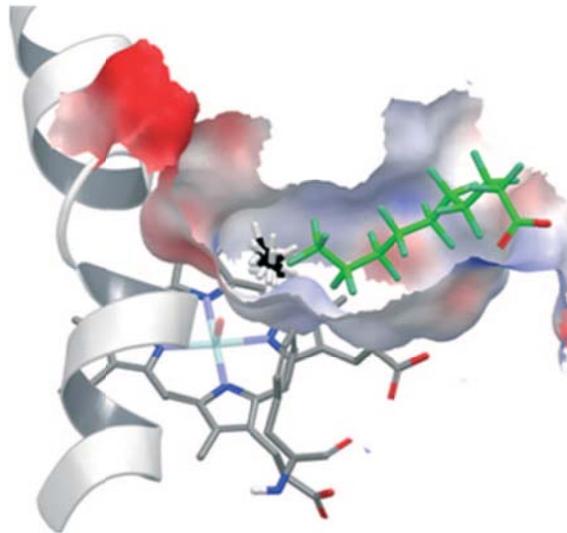
### 3.4.3 Fluorierte *N*-Acylhomoserinlactone

Als weitere Substanzklasse wurden von der Arbeitsgruppe *S. Grond* die perfluorierte Al-1-Derivate **75–80** zur Verfügung gestellt. Bei diesen ist der Wasserstoff innerhalb der aliphatischen Kette durch Fluor substituiert. Die Verbindungen unterschieden sich in der Länge der Fettsäurekette und deren Verknüpfung als Ester oder Amid.



Der Grundgedanke war, dass durch den Einbau von Fluor die Hydrophobizität der Seitenkette deutlich zunimmt.<sup>[49]</sup> Des Weiteren konnte ein deutlich erhöhter Raumbedarf durch das Fluor im Vergleich zu nicht perfluorierten aliphatischen Ketten angenommen werden. Der sterische Anspruch einer CF<sub>3</sub>-Gruppe ist etwa mit dem einer CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-Gruppe vergleichbar.<sup>[50]</sup> Diese beiden Faktoren sollten dazu führen, dass die fluorierten AHLs eine deutlich stärkere Bindung zum Rezeptor eingehen und diesen irreversibel blockieren.

Wie deutlich perfluorierte Verbindungen die Bindungseigenschaften beeinflussen können, zeigt sich in der Verbesserung der Fähigkeit eines P450-Enzyms, Methan zu oxidieren.<sup>[51]</sup> Normalerweise besitzen diese Enzyme nur ein sehr geringes Potential, kleine Verbindungen umzusetzen. Durch die Zugabe von perfluorierten Fettsäuren konnten diese eine feste Bindung mit der Enzymtasche eingehen. In Folge dessen war der Raum im aktiven Zentrum deutlich verkleinert und somit eine bessere Geometrie zur Oxidation kleiner Moleküle wie Methan in der Bindungstasche gegeben (Abb. 21).



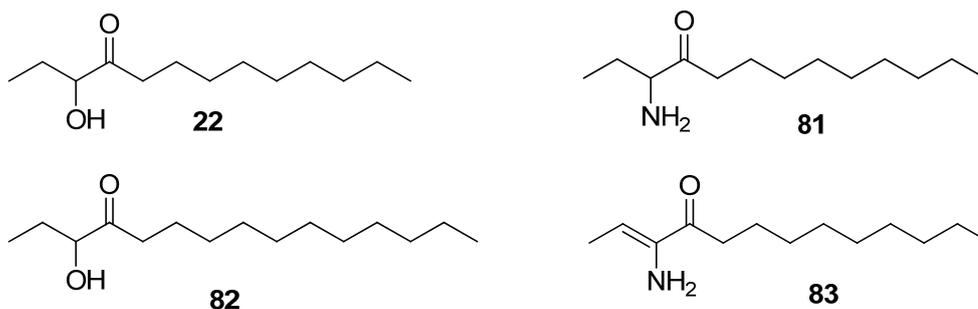
**Abbildung 21: P450-Bindungstasche mit perfluorierter Fettsäure (grüne Kette) und Methan (Kohlenstoffatome in schwarz und Wasserstoffatome in weiß)<sup>[51]</sup>**

Mittels der verschiedenen Testsysteme konnte keine biofilminhibierende Wirkung der perfluorierten AI-1-Derivate festgestellt werden. Allerdings stellte sich im Blau-Weiß-Screening heraus, dass diese als AHL-Agonisten fungieren können. Insbesondere bei Verbindung **76** war dieser Effekt besonders deutlich. Von der Länge der Fettsäure und deren Verknüpfung ist diese Substanz dem im Testsystem 3-Oxo-C<sub>8</sub>-AHL am ähnlichsten.

Die Hypothese, dass sich mittels perfluorierter AI-1-Derivate die Biofilmbildung verhindern lässt, konnte mittels der angewendeten Testsysteme nicht bestätigt werden. Dennoch konnte für diese Verbindungen ein Einfluss auf die Signaltransduktion innerhalb der Biofilmbildung gezeigt werden; allerdings war dieser gegenteilig zu ersten Annahme. Inwieweit sich dieser Effekt nutzen lässt, muss durch weitere Untersuchungen geklärt werden.

### 3.5 Identifizierung des Autoinducers aus *Janthinobacterium* HH01

Im Rahmen des Verbundprojekts konnte vom Arbeitskreis *W. Streit* ein Violacin-Produzent im Loki-Schmidt botanischen Garten der Universität Hamburg aus einer wässrigen Umgebung isoliert werden, der das Gen 2353 enthält.<sup>[52]</sup> Dieses wies eine große Ähnlichkeit zur *Vibrio cholerae*-Autoinducer-Synthase *CqsA* bzw. *Legionella pneumophila*-Autoinducer-Synthase *LqsA* auf. Die Violacinproduktion dieses Stammes war mit diesem Gen verknüpft. So wiesen Knockout-Mutanten dieses Gens nicht die typische Farbigkeit auf. Aus diesem Grund wurde angenommen, dass das *Janthinobacterium* HH01 auch ein solches oder ähnliches AI-System zum QS nutzt. Auf dieser Grundlage wurden im weiteren Verlauf Methoden entwickelt, die es ermöglichten, die Struktur des vorliegenden Autoinducers zu bestimmen.



Als Grundstruktur liegt bei diesen AI-Systemen ein  $\alpha$ -Hydroxyketon vor. Im Falle von *V. cholerae* handelt es sich um den CAI-1 (*Cholerae* Autoinducer-1) (**22**).<sup>[33]</sup> *L. pneumophila* nutzt hingegen den LAI-1 (*Legionella* Autoinducer-1) (**82**).<sup>[53]</sup> Die beiden AI-Synthasen *CqsA* und *LqsA* sind zu 45 % identisch. Außerdem lässt sich deren Funktion als Pyridoxalphosphat-abhängige Aminotransferase vorhersagen.<sup>[54]</sup> Kristallographische und biochemische Charakterisierung konnten diese Funktion zumindest für *CqsA* bestätigen. Zusätzlich konnten weitere Verbindungen wie das Am-CAI-1 (**81**) und das Ea-CAI-1 (**83**) gefunden werden. Diese stellen wahrscheinlich biosynthetische Vorläufer dar, die vermutlich vom (S)-Adenosylmethionin (SAM) (**84**) bzw. (S)-2-Aminobuttersäure (SAB) (**85**) ausgehen und dann unabhängig von *CqsA* bzw. *LqsA* durch den Mikroorganismus in das  $\alpha$ -Hydroxyketon umgewandelt werden (Abb. 22).<sup>[55]</sup>

## Neue Biofilminhibitions-Strategien

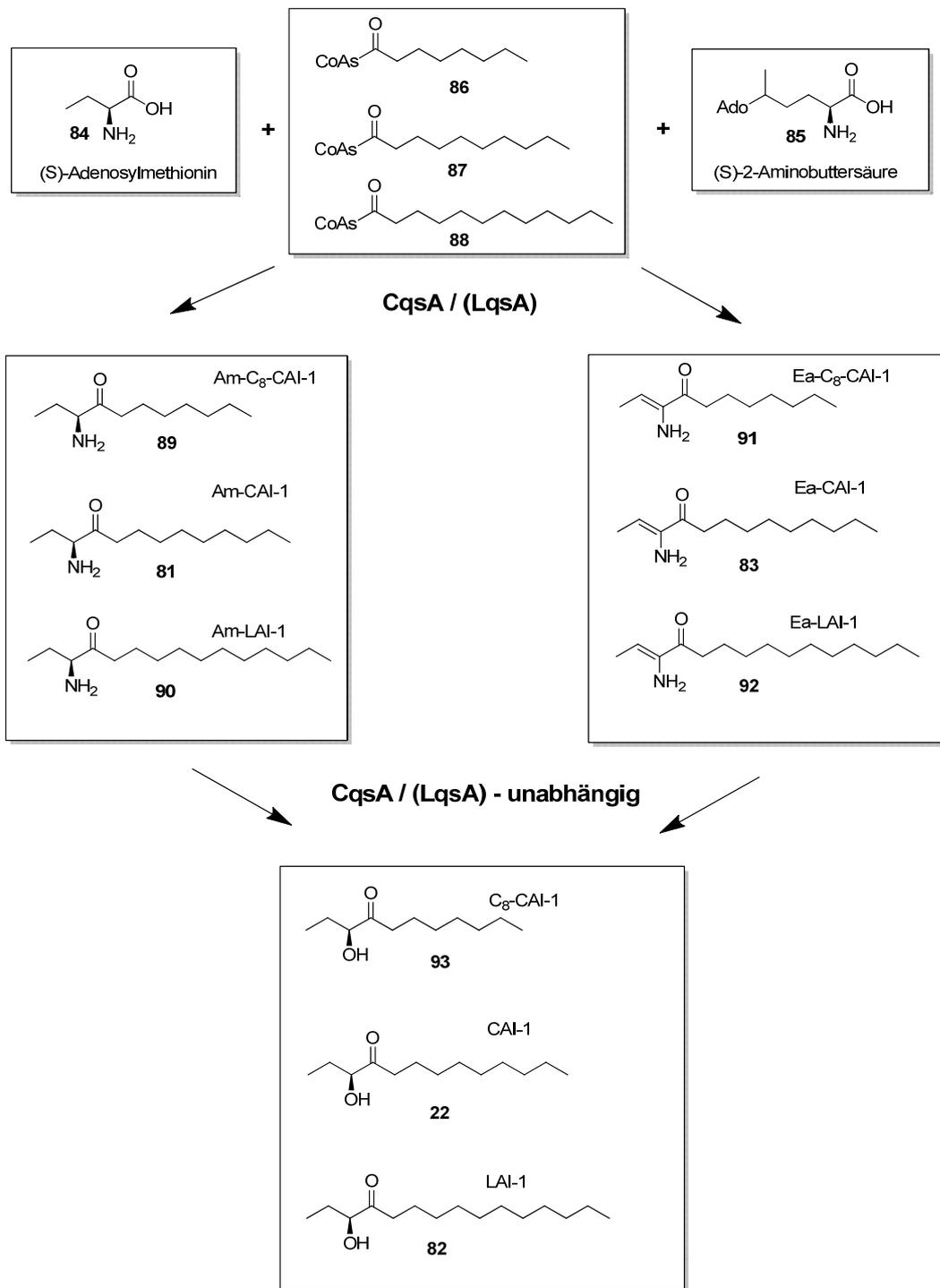
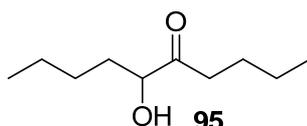


Abbildung 22: Biosyntheseweg der unterschiedlichen CAI-1- bzw. LAI-1-Verbindungen<sup>[56]</sup>

### 3.5.1 Chemische Analytik

Der erste Schritt der Analytik bestand in der massenspektrometrischen Untersuchung einer kommerziell erhältlichen Referenzsubstanz (HPLC D, Säule B, Programm C). Da der CAI-1 (**22**) in dieser Form nicht erhältlich war, wurden diese Experimente mit dem 6-Hydroxy-5-decanon (**95**) durchgeführt, welches die für die Massenspektrometrie wesentlichen Strukturmerkmale des CAI-1 aufwies.



Bei diesen Messungen lag der Fokus auf Detektionsverhalten und der Stabilität im Massenspektrometer. Aufgrund der Struktur war anzunehmen, dass Verbindungen dieses Typs sehr leicht Wasser abspalten. Aus diesem Grund und um ein aussagekräftigeres MS<sup>2</sup>-Spektrum zu erhalten, wurden ebenfalls die Derivatisierung mittels O-PFB (O-(2, 3, 4, 5, 6-pentafluorobenzyl)-hydroxylamin hydrochlorid) (**96**) näher untersucht (Abb. 23).<sup>[53]</sup>

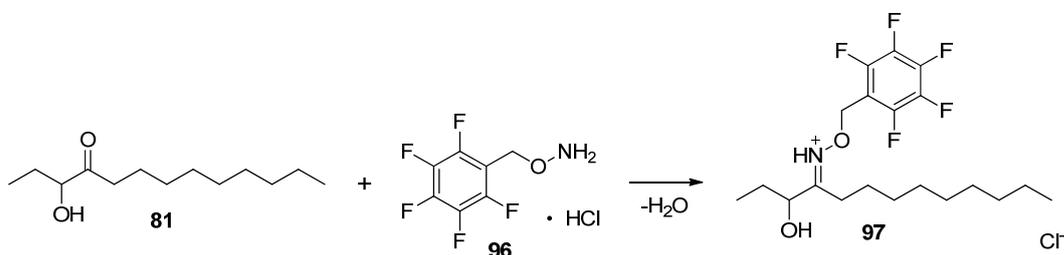


Abbildung 23: O-PFB-Derivatisierung am Beispiel des CAI-1 (**81**)

Aus diesen ersten Messungen wurde ersichtlich, dass bei der nicht-derivatisierten Referenzsubstanz das Mutterion praktisch nicht zu detektieren war. Anstelle der Masse  $m/z = 173.2$  für das  $[M+H]^+$  konnte die Masse  $m/z = 155.2$  für das  $[M+H-H_2O]^+$  nachgewiesen werden. Die Ursache hierfür war eine spontane Wasserabspaltung in der Ionenquelle. Dieses Phänomen war unabhängig von der Art der Ionisierung. Getestet wurden zwei unterschiedliche Arten der Ionisierung. Zum einen eine ESI- und zum anderen eine APCI-Quelle.

Die mittels APCI vermessenen Proben wiesen einen insgesamt deutlich niedrigeren Hintergrund auf, da ein deutlich kleinerer Teil der Gesamtmatrix ionisiert wurde. Unter Berücksichtigung des Signal-Rausch-Verhältnisses konnte jedoch keine Verbesserung gegenüber den Proben, die mittels ESI vermessen wurden, festgestellt werden. Aus diesem Grund wurde für alle weiteren Messungen ESI als Methode zur Ionisierung gewählt.

Durch die Zugabe von O-PFB (**96**) konnte die Modellkomponente zur Struktur (**97**) erfolgreich derivatisiert werden. Bei den gewählten HPLC-Bedingungen, also Ameisensäure mit einer Konzentration von 0.06 % bzw. 0.1 % als Additiv in der mobilen Phase war anzunehmen, dass der durch die Derivatisierung eingebrachte Stickstoff zu einer deutlich besseren Ionisierung in der Ionenquelle führen würde. Dieser Effekt stellte sich jedoch als nur geringfügig heraus, die Intensitäten für das  $[M+H]^+$  der derivatisierten und für das  $[M+H-H_2O]^+$  der nicht derivatisierten Verbindung lagen in etwa in der gleichen Größenordnung.

Vom Arbeitskreis *W. Streit* wurden im ersten Schritt zwei unterschiedliche Arten von Proben zur Verfügung gestellt. Die Proben lagen jeweils als Zweifachbestimmung vor. Es handelte sich um Extrakte des Wildtyps des *Janthinobacterium* HH01, die im weiteren Verlauf als Janthino-Proben bezeichnet werden und als Negativkontrollen um eine Mutante, bei der die Al-Synthase ausgeschaltet wurde. Zum anderen lagen Extrakte von *E. coli* DH5 $\alpha$  vor, in den die Al-Synthase kloniert wurde, die im weiteren Verlauf als Synthase2353-Probe bezeichnet wird und als Negativkontrolle lagen *E. coli* DH5 $\alpha$  mit einem Leervektor vor. Als Extraktionsmittel wurde Dichlormethan verwendet, da aufgrund seiner im Vergleich zu Ethylacetat stärkeren lipophilen Eigenschaften eine höhere Anreicherung von  $\alpha$ -Hydroxyketonen anzunehmen war.<sup>[53]</sup>

Im weiteren Verlauf wurden zwei unterschiedliche Ansätze zur Aufklärung des Al gewählt. Zum einen ein targeted-Ansatz, bei dem die Proben auf bereits bekannte  $\alpha$ -Hydroxyketon-Systeme mittels HPLC-ESI-MS untersucht wurden, und zum anderen ein untargeted-Ansatz, in dem Unterschiede im Expressionsspektrum der Synthase-Proben im Vergleich zu den

Negativkontrollen durch HPLC-ESI-MS überprüft wurden. Zentraler Punkt dieser Analytik war, wie schon bei der Untersuchung der Oxidoreduktase-Aktivität des Genprodukts BpiB09 (Kap. 3.2), der Vergleich von der zu überprüfenden Probe mit der Negativkontrolle.

### 3.5.2 Targeted-Ansatz

Für den targeted-Ansatz wurden die durch den Arbeitskreis *W. Streit* doppelt bereitgestellten Proben massenspektrometrisch vermessen (HPLC D, Säule B, Programm C). Im Anschluss wurde überprüft, ob sich Signale in den Synthese-Proben detektieren ließen, die sich den literaturbekannten  $\alpha$ -Hydroxyketonen (Abb. 24) und deren biosynthetischen Vorläufern (Abb. 25) zuordnen ließen.<sup>[56]</sup> Dies geschah durch Extraktion der jeweiligen Massenspur bei positiver Ionisierung. Berücksichtigt wurden dabei die wahrscheinlichsten Addukte ( $[M+H]^+ = M + 1.0073$ ;  $[M+Na]^+ = M + 22.9892$ ;  $[M+K]^+ = M + 38.9632$ ) sowie eine Wasserabspaltung für die  $\alpha$ -Hydroxyketon-Strukturen ( $[M+H-H_2O]^+ = M - 17.0033$ ). Wurde ein Signal in den Synthese-Proben gefunden, welches der Masse von einem der  $\alpha$ -Hydroxyketone entsprach und sich nicht in der Negativkontrolle nachweisen ließ, wurde dieses als vorläufiger Treffer angesehen.

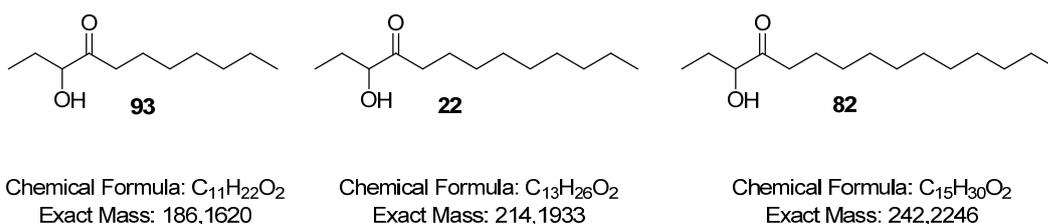
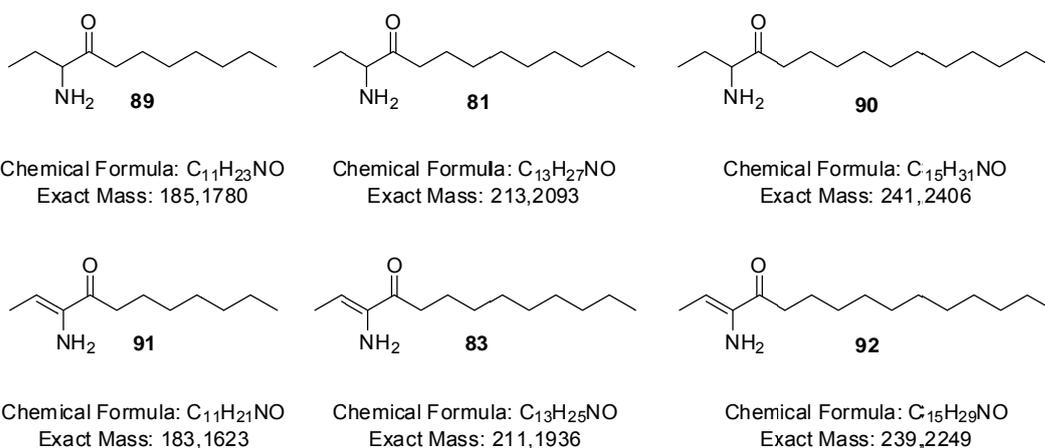
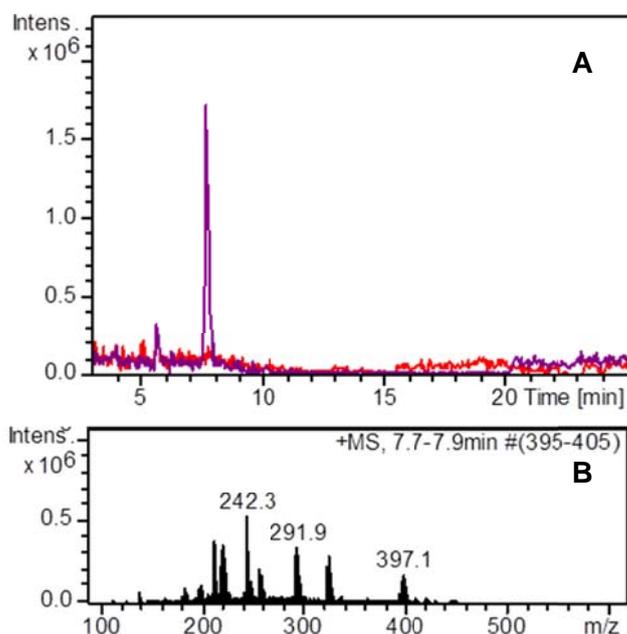


Abbildung 24: Literaturbekannte  $\alpha$ -Hydroxyketon-Autoinducer<sup>[56]</sup>



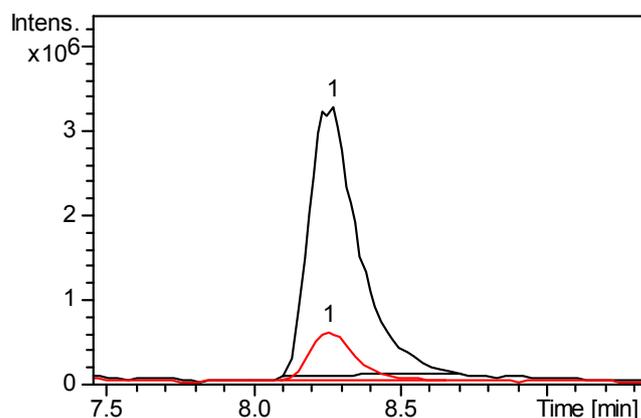
**Abbildung 25: Vermutliche biosynthetische Vorläufer bekannter  $\alpha$ -Hydroxyketon-Autoinducer<sup>[56]</sup>**

Ein Signal, welches diese Bedingungen erfüllte, ließ sich in den Janthino-Proben, also denen des Wildtyps wiederfinden. Zu dem Signal mit der Masse  $m/z = 242.3$  für das  $[M+H]^+$ , welches in den Negativkontrollen nicht vorhanden war, ließ sich die Verbindung **90** zuordnen (Abb. 26).



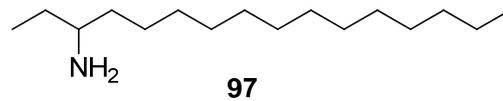
**Abbildung 26: HPLC-ESI-MS-Analytik des  $[M+H]^+$  mit der Masse  $m/z = 242.3$**   
**A:** Extrahierte Massenspuren (positive Ionen;  $m/z = 242.3 \pm 0.3$ ) der Synthese-Probe (violett) und Negativkontrolle (rot); **B:** Massenspektrum bei 7.7 min der Synthese-Probe

Allerdings fiel auf, dass innerhalb der Synthese-Doppelbestimmung die Konzentration sehr unterschiedlich war. Nach Berechnung des Signalflächenintegrals erhielt man einen Unterschied um ungefähr den Faktor sieben für die beiden Synthese-Proben (Abb. 27).



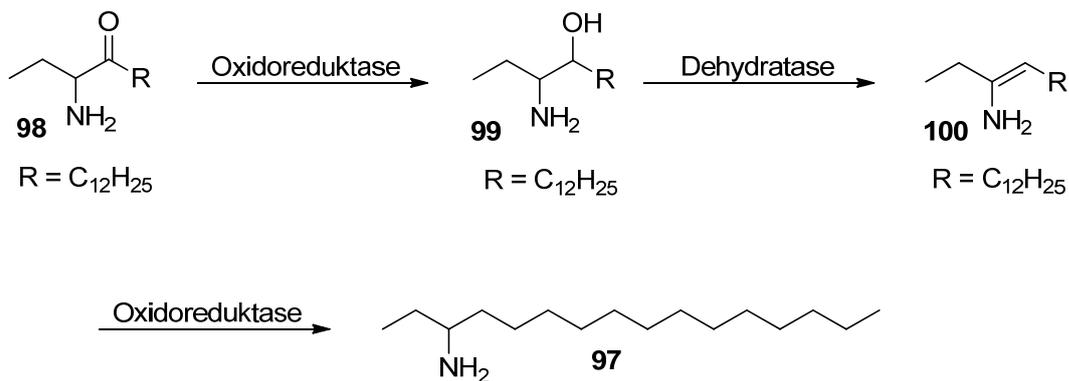
**Abbildung 27: Extrahierte MS-Massenspuren der Doppelbestimmung von den Janthino-Proben für das  $[M+H]^+$  der Masse  $m/z = 242.3 \pm 0.3$  (negative Ionen)**

Eine derartig hohe Abweichung wurde als ungewöhnlich für unter gleichen Bedingungen fermentierte Mikroorganismen, die einen AI ausschleusen, erachtet. Dennoch wurden diese Proben an einem hochauflösenden Massenspektrometer (HRMS) vermessen, um die Summenformel der Verbindung zu erhalten (HPLC E, Säule B, Programm C). Die Messungen ergaben für das  $[M+H]^+$  eine Masse von  $m/z = 242.2844$ . Diese Masse stützt jedoch nicht die angenommenen Struktur der Verbindung **90**. Durch die hochaufgelösten Masse konnte eine Summenformel  $C_{16}H_{36}N$  für das  $[M+H]^+$  vorgeschlagen werden. Verwendet wurde hierfür das Softwaretool *SmartFormula*, welches Bestandteil der Software *DataAnalysis 4.0* der Firma *Bruker Daltonik GmbH* ist. Auf dieser Grundlage wurde die Verbindung **97** als biosynthetisch mögliche Strukturidee angenommen (Abb. 28). Ein möglicher Biosyntheseweg ist in Abbildung 29 dargestellt. Es handelt sich dabei um eine vierstufige enzymatische Reaktion ausgehend von einem hypothetischen Am- $C_{16}$ -CAI-1.



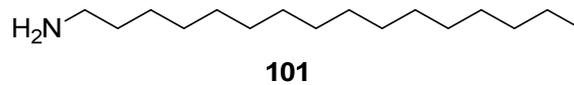
Chemical Formula: C<sub>16</sub>H<sub>35</sub>N  
Exact Mass: 241,2770

**Abbildung 28: Biosynthetisch sinnvolle Strukturidee 97 für die Summenformel C<sub>16</sub>H<sub>35</sub>N**

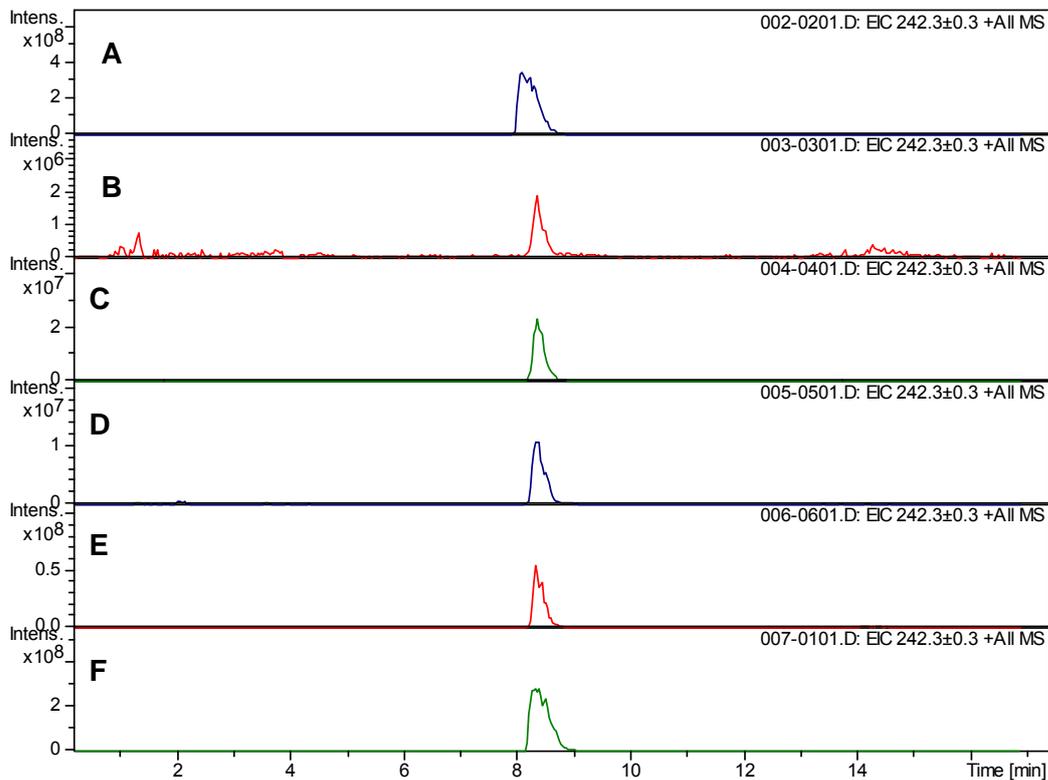


**Abbildung 29: Hypothetischer Biosyntheseweg für die Verbindung 97**

Um diese Strukturidee massenspektrometrisch zu bestätigen und um Material für biologische Tests zur Verfügung zu stellen, wurden Überlegungen für die Synthese der Verbindung erwogen. Aufgrund der HRMS-Messungen konnte die Summenformel relativ sicher bestimmt werden, jedoch ließen diese Ergebnisse keine Rückschlüsse über die Position der Aminogruppe zu. Auch zusätzlich aufgenommene MS<sup>2</sup>-Spektren zeigten zwar die Fragmentierung entlang der aliphatischen Kette, lieferten aber keine zusätzlichen Informationen bezüglich der Konstitution. Somit konnte nicht ausgeschlossen werden, dass es sich bei dem gemessenen Signal um das 1-Hexadecylamin (**101**) handelte. Hierbei handelt es sich um einen weit verbreiteten Inhaltsstoff in kosmetischen Produkten.



Aus diesem Grund wurde erneut eine Dreifachbestimmung Janthino-Proben und den entsprechenden Negativkontrollen vermessen, um auszuschließen, dass es sich um diese Verbindung handelte. Diese Untersuchung führte zu dem Ergebnis, dass es sich bei dem vermuteten Janthino-Autoinducer um eine externe Kontamination handelte. In allen Proben, unabhängig davon, ob eine Janthino-Probe oder eine Negativkontrolle vorlag, konnte die Verbindung nachgewiesen werden. Die Schwankungen in der Signalhöhe waren unabhängig von der Art der Probe und sogar in der Negativkontrolle im Mittel leicht erhöht (Abb. 30).



**Abbildung 30: Extrahierte Massenspuren (positive Ionen;  $m/z = 242.3 \pm 0.3$ ) der Dreifachbestimmung**  
**A–C: Janthino-Proben; D–E: Negativkontrollen**

Es konnte somit kein Zusammenhang zwischen der Masse  $m/z = 242.3$  für das  $[M+H]^+$  und dem Produkt der AI-Synthese festgestellt werden. Es handelte sich somit mit hoher Wahrscheinlichkeit um eine Verunreinigung durch das 1-Hexadecylamin (**101**).

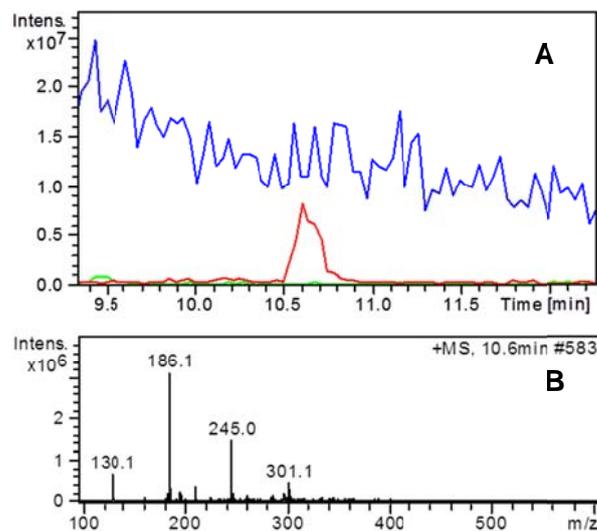
Der targeted-Ansatz wurde auch mit den Extrakten aus *E. coli* DH5 $\alpha$  durchgeführt. Bei diesen Synthase2353-Proben gab es ebenfalls einen vorläufigen Treffer mit der Masse  $m/z = 186.1$  für das  $[M+H]^+$ . Dieses Signal könnte demnach der Verbindung **89** entsprechen. Untersuchungen mittels HRMS konnten diese Vermutung jedoch nicht bestätigen. Es ergab sich für das  $[M+H]^+$  eine Masse von  $m/z = 186.1292$ , während für Verbindung **89** eine Masse von  $m/z = 186.1852$  für das  $[M+H]^+$  detektiert wurde.

Da sich in den Extrakten keine weiteren charakteristischen Signale finden ließen, die der beschriebenen Vorgehensweise entsprachen, wurde zu dem targeted noch ein untargeted-Ansatz durchgeführt.

### 3.5.3 Untargeted-Ansatz

Innerhalb des Untargeted-Ansatzes ging es darum, Signale zu finden, die nur in den Synthese-Proben vorhanden waren und in den Negativkontrollen fehlten. Es wurde also nicht nach definierten Massen gesucht, sondern nach Unterschieden im Signalsatz. Die Proben wurden als Doppelbestimmung vermessen und in einem Massenbereich von  $m/z = 160\text{--}399$  durchsucht. Es handelte sich dabei um die Janthino- und Synthese2353-Proben im Vergleich zur entsprechenden Negativkontrolle. Im Anschluss sollten passende Signale identifiziert und charakterisiert werden. Des Weiteren sollten für gefundene Strukturen Referenzsubstanzen für biologische Tests zur Verfügung gestellt werden, um zu prüfen, ob sich die biologische Aktivität der jeweiligen Verbindung zuordnen ließ.

Im ersten Schritt wurden von den vermessenen Proben Massenspuren mit einem Bereich von  $\Delta m/z = 10$  extrahiert, da durch diesen Vorgang Signale ersichtlich wurden, die sonst bei alleiniger Betrachtung der kompletten Ionenspur unauffindbar gewesen wären (Abb. 31).



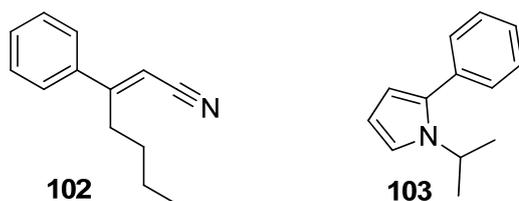
**Abbildung 31: HPLC-ESI-MS-Analytik des Signals  $m/z = 186.1$  unter Verwendung von  $\Delta m/z = 10$  extrahierten Massenspuren**

**A:** Komplette Ionenspur (blau),  $\Delta m/z = 10$  Extrahierte Massenspuren (positive Ionen;  $m/z = 180\text{--}189$ ) der Synthese-Probe (rot) und Negativkontrolle (grün); **B:** Massenspektrum bei 10.6 min der Synthese-Probe

Wurde eine Masse gefunden, die sich nur in den Synthese-Proben, nicht aber in der Negativkontrolle detektieren ließ, wurde diese als vorläufiger Treffer angenommen. Von diesen Treffern wurden hochaufgelöste Massenspektren und MS<sup>2</sup>-Spektren aufgenommen. Des Weiteren erfolgte, wenn möglich, ein Abgleich der UV-Daten mittels Datenbank, um nähere Informationen über den Chromophor zu erhalten.<sup>[19]</sup> Als weiteres Mittel zur Eingrenzung der Strukturen wurde die frei verfügbare browserbasierte Software *Metfrag* verwendet.<sup>[21]</sup>

Um *Metfrag* nutzen zu können, werden hochaufgelöste Massenspektren und MS<sup>2</sup>-Daten benötigt. Die Software nutzt nun öffentlich zugängliche Datenbanken wie *KEGG*, *PubChem* und *Chemspider*, indem sie die darin gespeicherten Substanzen und deren Masse mit der aus der HRMS-Messung abgleicht. Die in den Suchbereich fallenden Strukturen werden computergeneriert fragmentiert und dann mit den MS<sup>2</sup>-Spektren der eigenen Messung verglichen. Im Anschluss wird eine gewertete Trefferliste möglicher Kandidaten ausgegeben.<sup>[21]</sup> Mithilfe dieses Softwaretools ist generell zwar keine vollständige Strukturaufklärung möglich, dennoch erlaubt es Rückschlüsse über die mögliche Grundstruktur der Verbindung.

Dieses Verfahren lieferte allerdings für die Janthino-Proben keine signifikanten Ergebnisse. Bei den Synthese2353-Proben hingegen konnten 12 signifikant unterschiedliche Signale im Vergleich mit der Negativkontrolle detektiert werden, wobei das Signal mit der Masse  $m/z = 186.1292$  für das  $[M+H]^+$  die höchste Signalintensität aufwies. Von diesem Signal wurden ebenfalls MS<sup>2</sup>-Daten aufgenommen und diese mittels *Metfrag* abgeglichen. Für diese Art von biologischen Extrakten stellte sich dabei die Datenbank *Chemspider* als am besten geeignet heraus. Die so erhaltenen Daten deuteten auf ein Chinolin-Grundgerüst mit aliphatischer Seitenkette hin. Andere Verbindungen mit hoher Gewichtung wie z.B. **102** und **103** wurden als biosynthetisch schwer realisierbar verworfen, zumal das UV-Spektrum der Verbindung für ein Chinolin bzw. Indol sprach.<sup>[19]</sup>



Die genaue Position des Stickstoffs konnte aus den vorliegenden Daten nicht bestimmt werden. Am biosynthetisch sinnvollsten erschien jedoch das 2-Butylchinolin (**110**), welches von seiner Grundstruktur dem PQS (**18**) aus *P. aeruginosa* bzw. dem Vorläufer 2-Heptyl-4(1*H*)-chinolon (HHQ) (**108**) sehr ähnlich ist.<sup>[57]</sup> Biosynthetisch gehen die Verbindungen von der Anthranilsäure aus (Abb. 32). Für das 2-Butylchinolin (**110**) wäre ein ähnlicher 3-Stufen-Mechanismus zum Entfernen des Sauerstoffs wie bei dem 3-Hexadecylamin aus Kapitel 3.5.2 (Abb. 29) ausgehend vom 2-Butyl-4(1*H*)-chinolon (**109**) denkbar.

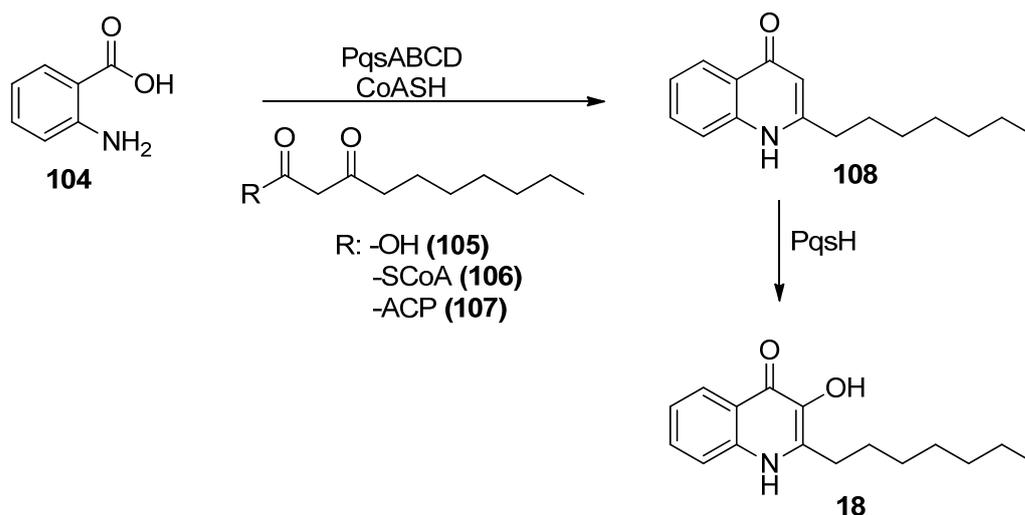
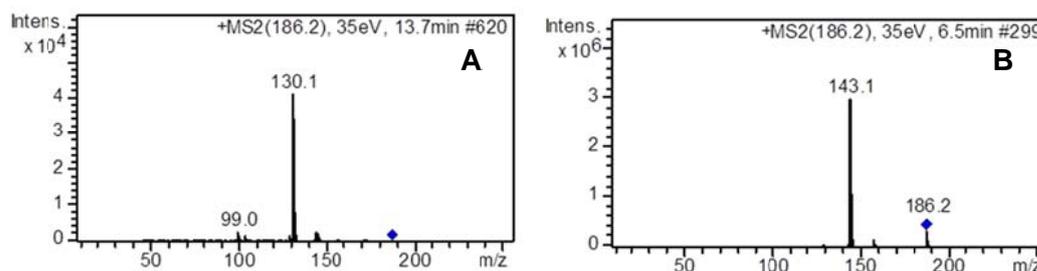


Abbildung 32: PQS-Biosynthese



Abbildung 33: Hypothetischer Biosynthese für das 2-Butylchinolin (**110**)

Um diese Strukturidee zu überprüfen, wurden mit dem kommerziell erhältlichen 2-Butylchinolin (**110**) Vergleichsmessungen vorgenommen. Die Vermessung dieser Referenz konnte zwar die Summenformel bestätigen, jedoch zeigte sich, dass die Retentionszeit und das MS<sup>2</sup>-Spektrum nicht mit dem gefundenen Signal übereinstimmten (Abb. 34). Das 2-Butylchinolin(**110**) scheint unter den gewählten Bedingungen deutlich polarere Eigenschaften im Vergleich zu dem unbekanntem Analyten zu besitzen. Außerdem tritt bei der kommerziell erhältlichen Referenz **110** unter den eingestellten Fragmentierungsenergien das 2-Methylchinolin-Ion mit der Masse  $m/z = 143.1$  als detektierbares Hauptfragment auf. Diese Masse lässt sich bei der unbekanntem Verbindung jedoch nur im deutlich geringeren Maß nachweisen. Auf Grundlage dieser Daten konnte somit ausgeschlossen werden, dass es sich bei der Verbindung in den Synthase2353-Proben um das 2-Butylchinolin (**110**) handelte.



**Abbildung 34: MS<sup>2</sup>-Spektren (positive Ionen)**

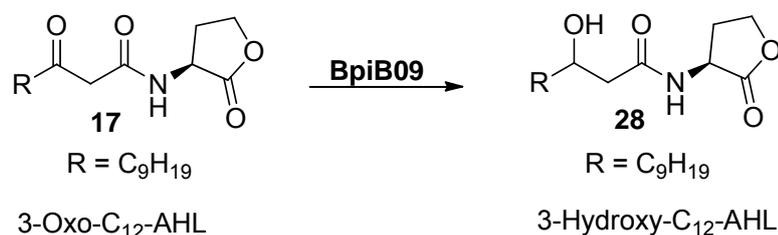
**A:** Signal  $m/z = 186.1$  der Synthase-Probe bei 13.7 min **B:** 2-Butylchinolin (**110**) bei 6.5 min

Nach Rücksprache mit dem Kooperationspartner wurde die weitere Untersuchung dieser Proben eingestellt. Der Fokus sollte nun auf Proben des Wildtyps liegen, in die mehrfach das Synthase-Gen kloniert wurde. Eine Überexpression im ursprünglichen Mikroorganismus wurde als beste Strategie zur Strukturaufklärung des Autoinducers erachtet. Diese Proben lagen jedoch zum Zeitpunkt dieser Arbeit noch nicht vor.

### 3.6 Diskussion der Ergebnisse

#### Anti-Biofilm-Strategien aus dem Metagenom

Im Rahmen dieser Arbeit konnte das Genprodukt BpiB09, welches durch einen metagenomischen Ansatz als biofilminhibierend identifiziert wurde, massenspektrometrisch als Oxidoreduktase charakterisiert werden. Es konnte gezeigt werden, dass das aufgereinigte BpiB09 in der Lage ist, das 3-Oxo-C<sub>12</sub>-AHL (**17**) in das 3-Hydroxy-C<sub>12</sub>-AHL (**28**) umzuwandeln (Abb. 35).



**Abbildung 35: Enzymatische Reaktion des Genprodukts BpiB09**

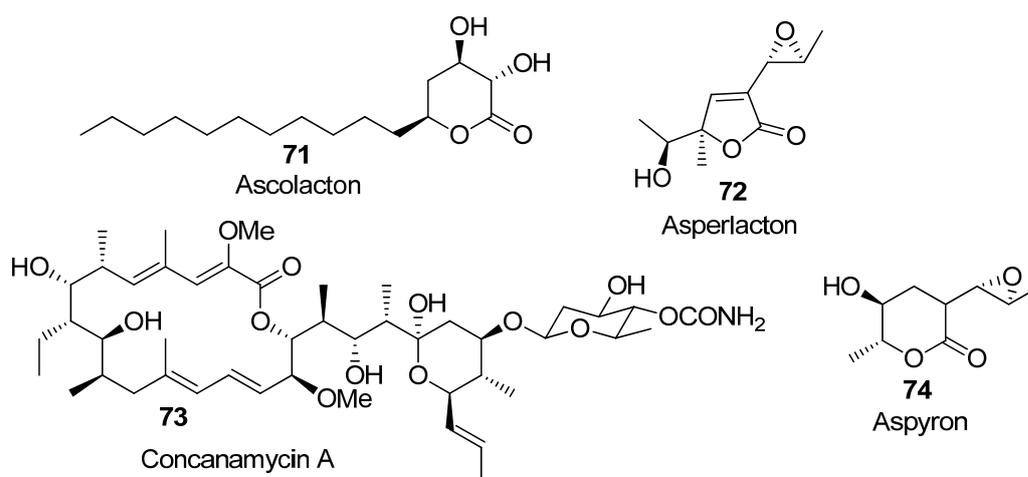
Voraussetzung für den Nachweis waren aufgrund der geringen Umsatzraten im kleinen einstelligen Prozentbereich, Messungen an einem empfindlichen Massenspektrometer und die gemeinsame Optimierung der Probenvorbereitung im Forschungsverbund mit dem Kooperationspartner. Ein weiterer Schlüsselschritt war die Aufnahme von MS<sup>2</sup>-Spektren. Durch Fragmentierung des Mutter-Ions konnten die Signale chemisch eindeutig der jeweiligen Verbindung zugeordnet werden und somit falsch-positive Ergebnisse ausgeschlossen werden. Des Weiteren führte die Berechnung von Signalflächen-Integralen aus Fragmentspektren, im Vergleich zu einfachen MS-Spektren, zu Ergebnissen mit erhöhter Genauigkeit. Der Grund hierfür war das deutlich verbesserte Signal-Rausch-Verhältnis.

Zu diesem Zeitpunkt konnte allerdings nicht abschließend geklärt werden, wie es aufgrund der geringen Umsatzraten in der chemischen Analytik zu dem großen Effekt der signifikanten Inhibition der Biofilmbildung kommt (Kap. 3.3.2). Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass die Degenerierung des AI-1 nicht der einzige Grund ist. Der Vergleich der Proben von *P. aeruginosa* mit dem Gen

*bpiB09* und einem Leervektor zeigte, dass sich in beiden Proben das 3-Oxo-C<sub>12</sub>-AHL (**17**) und das 3-Hydroxy-C<sub>12</sub>-AHL (**28**) detektieren ließen. In den BpiB09-Proben lag eine deutlich verminderter Konzentration vor, allerdings mit nahezu den gleichen Verhältnissen von 3-Oxo-C<sub>12</sub>-AHL (**17**) zu 3-Hydroxy-C<sub>12</sub>-AHL (**28**). Ursache hierfür könnte sein, dass *bpiB09* suppressiven Einfluss auf den gesamten Fettsäurestoffwechsel, insbesondere der 3-Oxo-Fettsäuren hat und somit auch das Wachstum des Mikroorganismus beeinflusst wird.

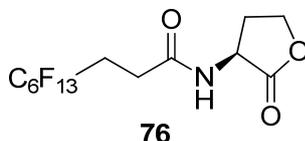
### Niedermolekulare Verbindungen als Biofilminhibitoren

Von den 27 zur Verfügung gestellten Reinsubstanzen konnten bisher vier als potentiell biofilminhibierend charakterisiert werden (Abb. 36). Insbesondere im Blau-Weiß-Screening zeigten die Verbindungen Aspyron (**74**) und Asperlacton (**72**) eine höhere Aktivität als der literaturbekannte Biofilminhibitor Carolacton.<sup>[48]</sup> Strukturell weisen diese Verbindungen Analogien zu dem AI-1-System auf. Es handelt sich dabei um eine relativ polare Kopfgruppe mit lipophilem Rest. Das Ascolacton (**71**) und das Concanamycin A (**73**) wurden im Textsystem des Arbeitskreises *R. Schmitz-Streit* positiv getestet. Durch dessen Aufbau konnte festgestellt werden, dass die QSI-Eigenschaften die, wenn überhaupt vorhandene, Zytotoxizität deutlich überwiegen.



**Abbildung 36: Substanzen mit potentiell biofilminhibierender Wirkung**

Des Weiteren konnten das perfluorierte AI-Derivat **76** als AHL-Agonist charakterisiert werden.

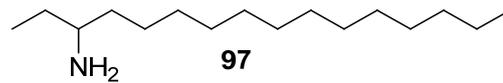


Die ursprüngliche Annahme, dass diese als AHL-Antagonisten dienen könnten, konnte nicht bestätigt werden. Allerdings konnte gezeigt werden, dass diese Verbindungen Einfluss auf das QS besitzen. In dieser Studie zu niedermolekularen Verbindungen als Biofilminhibitoren konnte die Grundlage für weitere Untersuchungen gelegt werden. Fragestellungen wären dabei die Bestimmung von IC<sub>50</sub>-Werten und das genaue molekulare Verständnis der Inhibitorwirkung. Die Untersuchungen sollen zeitnah, auch unter zur Verwendung der Testsysteme der Arbeitskreises *K. Jung*, durchgeführt werden. Bezüglich der perfluorierten Verbindungen ist eine noch unbeantwortete Frage, wie man den agonistischen Effekt nutzen kann, um die Biofilmbildung zu unterbinden.

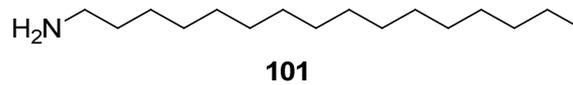
Mittels dieser Ergebnisse könnten Rückschlüsse über Struktur-Wirk-Beziehungen zwischen der Biofilmbildung und den eingesetzten aktiven Naturstoffen gezogen werden, die zu wirkungsvollen und einfach herzustellenden niedermolekularen Biofilminhibitoren führen könnten. Dieser Ansatz stellt dabei wahrscheinlich eine wirkungsvolle Alternative zu dem metagenomischen Screening dar, das von seinem Aufbau her deutlich zeit- und kostenintensiver ist.

### Identifizierung des Autoinducer-Systems aus dem *Janthinobacterium* HH01

Im Rahmen dieser Arbeit konnten Methoden entwickelt werden, die ein zeiteffizientes Screening mittels HPLC-ESI-MS nach sowohl bekannten, als auch unbekanntem Autoinducern ermöglichen. Allerdings konnte die Struktur des im *Janthinobacterium* HH01 vermuteten Autoinducers **97** nicht mehr im zeitlichen Rahmen abgeschlossen werden.

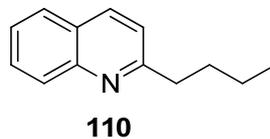


Im spezifischen Screening-Ansatz konnte eine Kontamination der Synthase-Proben durch 1-Hexadecylamin (**101**) detektiert werden.



Die Abwesenheit in den Negativkontrollen könnte durch eine separate Probenvorbereitung erklärt werden. Denkbar wäre, dass im Falle der Synthase-Proben vor deren Erstellung eine Handcreme oder ähnliches benutzt wurde, die bei Anfertigung der Negativkontrollen nicht verwendet wurde. An diesem Beispiel lässt sich erkennen, wie wichtig ein standardisiertes Vorgehen für eine erfolgreiche Analytik ist.

Die vermutete Struktur des im untargeted-Ansatz untersuchten 2-Butylchinolin (**110**) konnte nach Vermessung einer kommerziell erhältlichen Referenz ausgeschlossen werden.

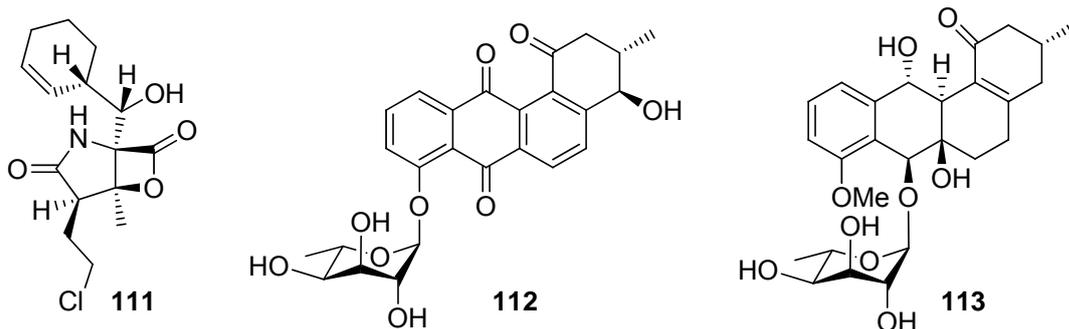


Mittels der in dieser Arbeit etablierten Verfahren zur Auffindung sowohl bekannter als auch unbekannter Metabolite ist die Grundlage für eine erfolgreiche Analytik von weiteren optimierten Proben gegeben. Geeignet erscheinen hier zukünftig Proben des Wildtyps, in die mehrfach das Synthase-Gen kloniert wurde, um somit eine Überexpression des Signalmoleküls zu bewirken. Bei den bisher vermessenen Proben des Wildtyps wurde dieses Verfahren nicht angewendet. Aus diesem Grund konnten bisher keine signifikanten Unterschiede zwischen den Synthase-Proben und den Negativkontrollen des Wildtyps detektiert werden. Die Kombination aus den in der HPLC-ESI-MS entwickelten Methoden und einem überexprimierenden Wildtyp könnte die finale Strukturaufklärung des Autoinducers im *Janthinobacterium* HH01 ermöglichen.

## 4 Bioaktive Naturstoffe aus marinen Actinomyceten

Dieses Projekt war eine Kooperation mit dem Arbeitskreis *U. Hentschel* (Universität Würzburg). Innerhalb dieser Zusammenarbeit wurden durch den Kooperationspartner neue Actinomyceten-Stämme aus marinen Schwämmen isoliert und auf biologische Aktivität hin untersucht. Die Aufgabe des Arbeitskreises *S. Grond* (Universität Tübingen) bestand in der Fermentation der Mikroorganismen und der Isolierung von neuen und biologisch aktiven Sekundärmetaboliten.

Das Screening nach Naturstoffen aus marinen Actinomyceten lässt sich mit der Tatsache begründen, dass diese eine große Rolle in der Entwicklung neuer pharmazeutischer Wirkstoffe spielen.<sup>[58]</sup> So sind aus der Ordnung der Actinomyceten mehr als 7000 zum Teil pharmakologisch bedeutsame Substanzen im *Dictionary of Natural Products* verzeichnet. Diese stammen aus über 140 bisher beschriebenen Stämmen der Gattung *Actinomyces*.<sup>[59]</sup> Actinomyceten sind sowohl in terrestrischer als auch mariner Umgebung lebensfähig. Allerdings weisen diese je nach Lebensraum eine unterschiedliche Taxonomie und einen veränderten Sekundärmetabolismus auf.<sup>[23]</sup> 1991 konnte eine neue Gruppe Actinomyceten aus marinen Sedimenten isoliert werden.<sup>[60]</sup> Als Grundvoraussetzung benötigten diese Mikroorganismen Meerwasser. Das war einer der ersten Beweise dafür, wie deutlich sich marine Stämme an ihre Umgebung anpassen. Später wurde der Name *Salinospira* für diese Art von marinen Actinomyceten gewählt.<sup>[61]</sup> Eine Isolierung dieser Stämme ist jedoch nicht nur aus Sedimenten, sondern auch aus marinen Invertebraten wie z.B. Schwämmen möglich.<sup>[62]</sup> Beispiele hierfür sind das Salinosporamid A (**111**) aus *Salinospira* CNB-392 oder die Salinichinone **112** und **113** aus *Salinispora arenicola*.<sup>[63] [64]</sup>



Im ersten Schritt dieses Projektes wurden marine Schwämme durch den Arbeitskreis *U. Hentschel* in Ägypten und Kroatien gesammelt. Diese wurden auf für Actinomyceten selektive Nährmedien ausplattiert und die gewachsenen Mikroorganismen isoliert. Als nächstes wurde die komplette 16S rRNA-Gensequenz mit der NCBI-GenBank verglichen und die Gattung der isolierten Stämme bestimmt. Als Ergebnis konnten 90 verschiedene Actinomyceten isoliert werden. Bei 14 von diesen konnte zusätzlich die Spezies als neu beschrieben werden. Im weiteren Verlauf wurden diese im Flüssigmedium fermentiert und die Kulturüberstände auf biologische Aktivität hin untersucht. Dabei kamen Plattendiffusionstests gegen pathogene Bakterien (*S.aureus* 8325, *E. faecalis* JH212, *E. coli* 536, *P. aeruginosa* Nr. 3) und Hefen (*C. albicans* S314) zum Einsatz. Des Weiteren wurde die Wirkung gegen Trypanosomen (*Trypanosoma brucei brucei* TC 221) untersucht. Diese Assays wurden auch im weiteren Verlauf dieses Projekts zur Charakterisierung der biologischen Aktivität verwendet.

#### **4.1 Die Stämme *Rhodococcus* RV77, *Rothia* RV89 und *Micromonospora* RV115**

Aus Plattendiffusionstests gingen *Rhodococcus* RV77, *Rothia* RV89 und *Micromonospora* RV115 als vielversprechende Kandidaten für ein chemisches Screening hervor. Die biologische Aktivität sollte nun einer entsprechenden chemischen Verbindung zugeordnet werden. Zu diesem Zweck wurden dem Arbeitskreis S. Grond Agarkulturen der jeweiligen Stämme zu Verfügung gestellt. Diese wurden unter verschiedenen Bedingungen fermentiert. Die daraus erhaltenen Extrakte sollten auf Metabolite hin untersucht und vom Arbeitskreis U. Hentschel auf biologische Aktivität getestet werden.

##### **4.1.1 Variation der Kultivierungsbedingungen**

Durch den von der Arbeitsgruppe A. Zeeck entwickelten OSMAC-Ansatz (one strain many compounds) konnte gezeigt werden, dass je nach Wahl der Kultivierungsbedingungen ein Stamm ein sehr unterschiedliches Metabolitenspektrum aufweisen kann.<sup>[65]</sup> Auf Grundlage dieser Ergebnisse wurden im Folgenden das Medium und die Art der Kultivierung variiert, um die Produktion von unterschiedlichen Naturstoffen anzuregen. Eine Übersicht der durchgeführten Fermentationen ist in Tabelle 1 dargestellt. Zusätzlich wurden von jedem Medium Extrakte hergestellt, ohne das beimpft worden war, die sogenannten Leermedien, die im weiteren Verlauf als Negativkontrolle dienten. Der überwiegende Teil der Fermentationen wurde dabei in Flüssigkultur durchgeführt. Um dem Mikroorganismus eine deutlich veränderte Wachstumsumgebung zu geben, wurden auch Kultivierungsansätze auf Agarplatten durchgeführt. Insgesamt wurden die Stämme in sieben verschiedenen Medien fermentiert. Bei dem ISP-2 handelte es sich um ein Standardmedium für marine Actinomyceten. Das HT-Medium verfügte im Vergleich dazu über eine andere Kohlenstoffquelle und bot durch Casein eine weitere Stickstoffquelle. JR-11 war aufgrund des Sojamehls ein sehr komplexes und lipidhaltiges Medium. Bei Hafer und dem MA 1 handelte es sich um sogenannte Mangelmedien. Im Falle des Hafermediums ist Haferkleie neben

anorganischen Salzen der einzige Bestandteil. MA 1 enthält als einzige Kohlenstoffquelle Mannitol und Stickstoff kann nur durch Asparagin bereitgestellt werden. M1 und Bennett's broth sind hingegen weit verbreitete Nährmedien im Bereich der marinen Actinomyceten.

Fermentierter Stamm	Verwendetes Medium	Art der Kultivierung
RV77 / RV89 / RV115	ISP-2 in artificial sea water (ASW)	Flüssigkultur
RV77	HT	Flüssigkultur
RV89 / RV115	HT in ASW	Flüssigkultur
RV89	JR-11	Flüssigkultur
RV77 / RV115	JR-11 in ASW	Flüssigkultur
RV77 / RV89 / RV115	Hafer in ASW	Flüssigkultur
RV77 / RV89 / RV115	M1 in ASW	Flüssigkultur
RV77 / RV89 / RV115	Bennett's broth	Flüssigkultur
RV77 / RV89 / RV115	HT in ASW	Festphasenkultur
RV77 / RV89 / RV115	MA1	Festphasenkultur
RV77 / RV89 / RV115	M1 in ASW	Festphasenkultur

**Tabelle 1: Durchgeführte Fermentationsansätze**

Durch die Auswahl dieser unterschiedlichen Medien sollte die Produktion von Sekundärmetaboliten dementsprechend angeregt werden. Im Falle der Flüssigkulturen wurden das Kulturfiltrat und das Mycel separat aufgearbeitet. Für das Kulturfiltrat wurde ein pH von 5 eingestellt, um eventuell vorhandene Carbonsäuren zu protonieren und somit den Übergang in die organische Phase zu ermöglichen. Anschließend wurde dieses mit Ethylacetat extrahiert und die wässrige Phase verworfen. Das Mycel wurde mit einer Mischung aus Methanol und Aceton extrahiert. Es stellte sich allerdings heraus, dass durch diesen

Extraktionsschritt eine große Salzlast aufgrund der Fermentation in ASW vorhanden war, die eine weitere Analytik verhinderte. Daher wurden die erhaltenen Extrakte nochmals mit Ethylacetat extrahiert, wobei die wässrige Phase verworfen wurde. Ein ähnliches Problem bestand auch bei der Aufarbeitung der lyophilisierten Festphasenkulturen. Hier wurde ebenfalls nach Extraktion mit einer Mischung aus Methanol und Aceton mit Ethylacetat extrahiert und die organische Phase als Wertfraktion angesehen.

Die so erhaltenen Extrakte wurden im nächsten Schritt einer chemischen Analytik unterzogen.

### 4.1.2 Chemische Analytik der Extrakte

Von den in der chemischen Analytik untersuchten Extrakten wurde jeweils ein Aliquot zum Test der Bioaktivität an den Arbeitskreis *U. Hentschel* versendet. Der zentrale Schritt innerhalb dieses Screenings war die Messung der Proben auf einem HPLC-ESI-MS-System (HPLC D, Säule B, Programm B) mit einer mehr als 1000 Substanzen umfassenden UV-Datenbank.<sup>[19]</sup> Die in der Datenbank gespeicherten Verbindungen sind überwiegend Naturstoffe und Verbindungen, die bei der Fermentation von Actinomyceten gebildet werden können.

Nach Vermessung der Extrakte wurden diese mit dem Leermedium verglichen, um Medienbestandteile effektiv erkennen zu können. Der Abgleich erfolgte sowohl mittels UV-Spektren als auch mittels Massenspektren. Wurde ein Signal gefunden, welches nicht in der Negativkontrolle vorhanden war, wurde dieses als vorläufiger Treffer angesehen. Im Anschluss wurde dieses Signal mit der UV-Datenbank abgeglichen. Eine eindeutige Zuordnung wurde für den Fall angenommen, wenn bei Abgleich des UV-Spektrums eine Übereinstimmung von mehr als 98 % vorlag und diesem Signal eine passende Masse im Massenspektrum zugeordnet werden konnte (Abb.37).

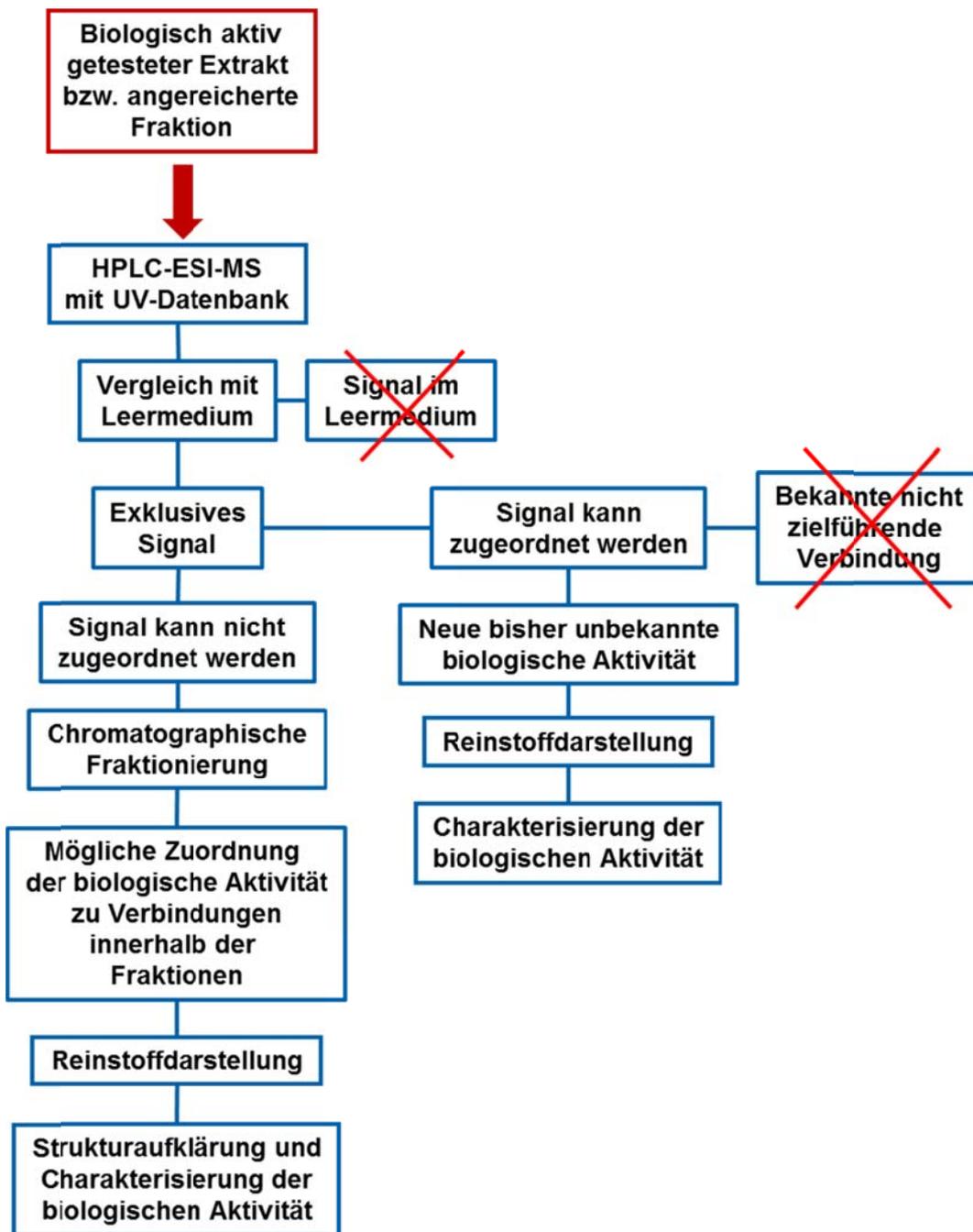


Abbildung 37: Analytische Vorgehensweise des chemischen Screenings

Durch dieses Verfahren konnten die folgenden in der Datenbank vorhandenen Verbindungen eindeutig zugeordnet werden:

- RV77: Anthranilsäure (**114**) (M1); Zink-Protoporphyrin (**115**) (Bennett's broth)
- RV89: 3-Methylindol (**117**) (ISP-2, HT, Hafer); Indol-3-essigsäure (**116**) (ISP-2, HT, Hafer), Zink-Protoporphyrin (**115**) (Bennett's broth)
- RV115: Diazepinomicin (**118**) (HT, Hafer, Bennett's broth); Zink-Protoporphyrin (**115**) (ISP-2, HT, Hafer, Bennett's broth)

Bei gemessenen Extrakten bzw. Fraktionen gab es keine neuen Signale, die physikochemisch interessant und in ausreichenden Mengen zur weiteren Aufreinigung vorhanden waren.

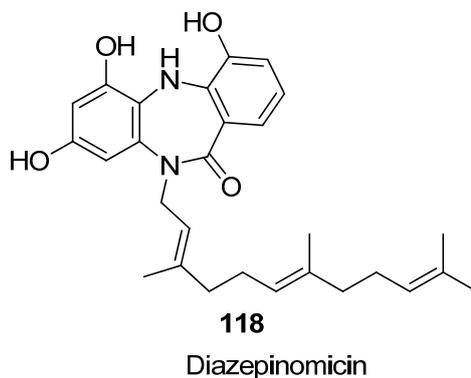
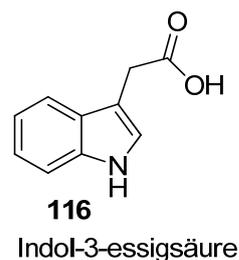
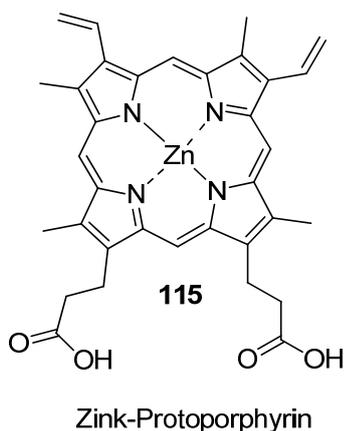
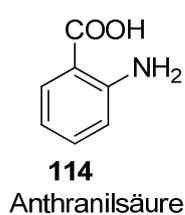


Abbildung 38: Strukturen der zuordenbaren Signale

Aus den Testreihen zur biologischen Aktivität gingen nach Rücksprache mit dem Kooperationspartner insgesamt vier Extrakte hervor, die weiter untersucht wurden. Der Grund hierfür lag insbesondere in der Fähigkeit, unterschiedliche Proteasen zu inhibieren. Untersucht wurden die humanen Proteasen Cathepsin B und Cathepsin L, die *Plasmodium* Cystein-Proteases Falcipain, die parasitäre Protease Rhodesain und zwei weitere SARS-Proteasen mit jeweils einer Konzentration von 100 µg/mL (Tab. 2). Als zielführend wurde eine Inhibition von mehr als 50 % angesehen.

	<b>RV77 in JR-11</b> <b>[% Inhibition]</b>	<b>RV115 in HT</b> <b>[% Inhibition]</b>	<b>RV115 in Hafer</b> <b>[% Inhibition]</b>
<b>Cathepsin B</b>	91.0 (68.8)	77.3 (67.7)	96.8 (73.6)
<b>Cathepsin L</b>	91.9 (74.3)	83.9 (70.6)	94.9 (90.3)
<b>Falcipain</b>	94.8 (69.8)	81.0 (74.2)	96.6 (81.7)
<b>Rhodesain</b>	95.5 (62.6)	70.9 (61.8)	92.8 (68.0)
<b>SARS Mpro</b>	34.4 (22.8)	35.3 (36.4)	50.7 (33.1)
<b>SARS plpro</b>	64.8 (48.2)	66.8 (42.3)	82.2 (75.2)

**Tabelle 2: Protease-Inhibition der aktiven Extrakte bei einer Konzentration von 100 µg/mL**  
 Angegebene Werte beziehen sich auf das Kulturfiltrat, Werte in () beziehen sich auf den Mycelextrakt

Auf Grundlage dieser Ergebnisse wurden im weiteren Verlauf diese Extrakte weiter untersucht. Für den Stamm RV115 wurde ein Zusammenhang zwischen der biologischen Aktivität und dem Diazepinomicin (**118**) vermutet (Kap. 4.2). Der Stamm RV77, fermentiert in JR-11, wies jedoch in der chemischen Analytik keine signifikanten Signale auf, die die biologische Aktivität hätten erklären können. Deshalb wurde für diesen Stamm und dieses Medium ein größerer Fermentationsansatz gewählt, um durch eine weitere Fraktionierung auch kleinere Mengen an Sekundärmetaboliten detektieren können. Der große Ansatz wurde unter den gleichen Bedingungen wie der Screening-Ansatz fermentiert

und aufgearbeitet. Da die Aktivität jedoch erhöht nur im Kulturfiltrat zu finden war, wurde im weiteren Verlauf das Mycel verworfen. Der Ethylacetat-Extrakt des Kulturfiltrats wurde dann mittels einer Mitteldruckanlage in fünf Fraktionen aufgeteilt. Diese wurden dann erneut mittels HPLC-ESI-MS untersucht. Es konnten jedoch auch nach dieser weiteren Aufreinigung keine neuen Signale gefunden werden, die nicht denen aus dem Leermedium entsprachen. Daher wurde nach Rücksprache mit dem Kooperationspartner eine umfassende Untersuchung mittels weiterer Fraktionierung dieses Fermentationsansatzes nicht weiterverfolgt.

## 4.2 Diazepinomicin (118) aus *Micromonospora* RV115

Aus dem chemisch-biologischen Screening wiesen die Extrakte, die das Diazepinomicin (118) enthielten, eine erhöhte proteaseinhibierende Aktivität auf (Kap. 4.1). Bei dieser Verbindung handelt es sich um ein farnesyliertes Dibenzodiazepinon, welches im Vergleich zu anderen bekannten Sekundärmetaboliten eine sehr ungewöhnliche Struktur besitzt. Neben diesen strukturellen Eigenschaften weist das Diazepinomicin (118) inhibierende Eigenschaften bezüglich des Wachstums von Krebszellen auf.<sup>[66]</sup> Die Wirkung kann auf eine selektive Bindung an den peripheren Benzodiazepin-Rezeptor (PBR) zurückgeführt werden, was einen programmierten Zelltod (Apoptose) der Tumorzelle zur Folge hat. Des Weiteren kommt es zu einer Inhibition des Ras/MAP-Kinase-Signalwegs, welcher an der zellulären Ausbreitung und Wanderung beteiligt ist.<sup>[67]</sup> Daher befindet sich Diazepinomicin (118) gerade in der Phase II der klinischen Prüfung.<sup>[68]</sup> Vor diesem Hintergrund wurde beschlossen, Diazepinomicin (118) in größeren Mengen als Reinstoff darzustellen und dieses für weitere biologische Testsysteme bereitzustellen, um es näher zu charakterisieren. Ausgangspunkt hierfür waren bisher nicht bekannte proteaseinhibierende Eigenschaften, die in Extrakten, die das Diazepinomicin (118) enthielten, nachgewiesen werden konnten.

### 4.2.1 Fermentation und Isolierung

Bei dem Diazepinomicin (118) handelte es um eine bereits bekannte Struktur aus *Micromonospora*.<sup>[69]</sup> Als Fermentationsmedium wurde Bennett's broth mit einer Ansatzgröße von 5 L gewählt. Denn schon in den Screening-Ansätzen hatte sich gezeigt, dass in diesem Medium das Diazepinomicin (118) deutlich stärker produziert wurde. Die Kultivierungsdauer der Hauptkultur betrug 9 Tage. Durch die Zugabe des Adsorberharzes XAD-16 erfolgte keine separate Aufarbeitung des Kulturfiltrats und des Mycels. Das beladene XAD-16 und das Mycel wurden mit einer Mischung aus Methanol und Aceton extrahiert und der erhaltene Extrakt erneut mit Ethylacetat extrahiert. Die Reinstoffdarstellung erfolgte durch ein orthogonales Trennverfahren aus Normalphasen-Mitteldruckchromatographie

und Umkehrphasen-Hochdruckchromatographie. Nach dem finalen Aufreinigungsschritt konnten 11.1 mg Diazepinomicin (**118**) (2.2 mg/L) als farbloser Feststoff isoliert werden.

### 4.2.2 Charakterisierung

Durch das datenbankbasierte Screening war davon auszugehen, dass es sich um das Diazepinomicin (**118**) handelte.<sup>[19]</sup> Zur Überprüfung der Naturstoffstruktur wurden zusätzlich <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR-, COSY-, HSQC- und HMBC-Spektren aufgenommen. Des Weiteren wurde noch die Summenformel mittels hochaufgelöster Massenspektrometrie bestimmt.

Die Vermessung mittels FT-ICR-ESI-MS ergab für das [M+Na]<sup>+</sup> eine Masse von  $m/z = 485.24095$ . Daraus konnte die plausible Summenformel C<sub>28</sub>H<sub>34</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>Na mit einer Abweichung von 0.27 ppm vorgeschlagen werden. Die NMR-spektroskopischen Messungen wurden in deuteriertem Methanol durchgeführt. Im <sup>1</sup>H-NMR konnten die Signale insgesamt 34 Protonen und im <sup>13</sup>C-NMR 28 Kohlenstoff-Atomen zugeordnet werden. Die chemischen Verschiebungen und die Kopplungskonstanten entsprachen den bereits literaturbekannten Daten für das Diazepinomicin (**118**).<sup>[69]</sup> Somit war zweifelsfrei belegt, dass es sich bei der Verbindung um den genannten Naturstoff **118** handelt.

### 4.2.3 Antioxidative und proteaseinhibierende Aktivität

Nach erfolgter Reinstoffdarstellung und Charakterisierung wurden 10 mg des Diazepinomicin (**118**) den Arbeitskreisen *U. Hentschel*, *H. Stopper* (Universität Würzburg) und *T. Schirmeister* (Universität Mainz) für eine nähere Bestimmung der biologischen Aktivität zur Verfügung gestellt. In den folgenden Testsystemen wurde das Diazepinomicin (**118**) untersucht. Mithilfe dieser Testreihen wurden neue und bisher nicht publizierte antioxidative und proteaseinhibierende Eigenschaften gefunden.<sup>[68]</sup>

Die spezifische antioxidative Kapazität wurde in diesem Testsystem ohne Zusatz von Zellen in einem FRAP-Assay (ferric-reducing-antioxidant-power) bestimmt. Im Wesentlichen basierte dieses Testsystem auf der Eigenschaft des Analyten,  $\text{Fe}^{3+}$  zu  $\text{Fe}^{2+}$  zu reduzieren. Dabei zeigte das Diazepinomicin (**118**) mit einer Konzentration von 30 nM ein ähnliches Potential wie Tempol (**119**) mit einer Konzentration von 50 nM, welches ein sehr starkes Antioxidans ist (Abb. 39).

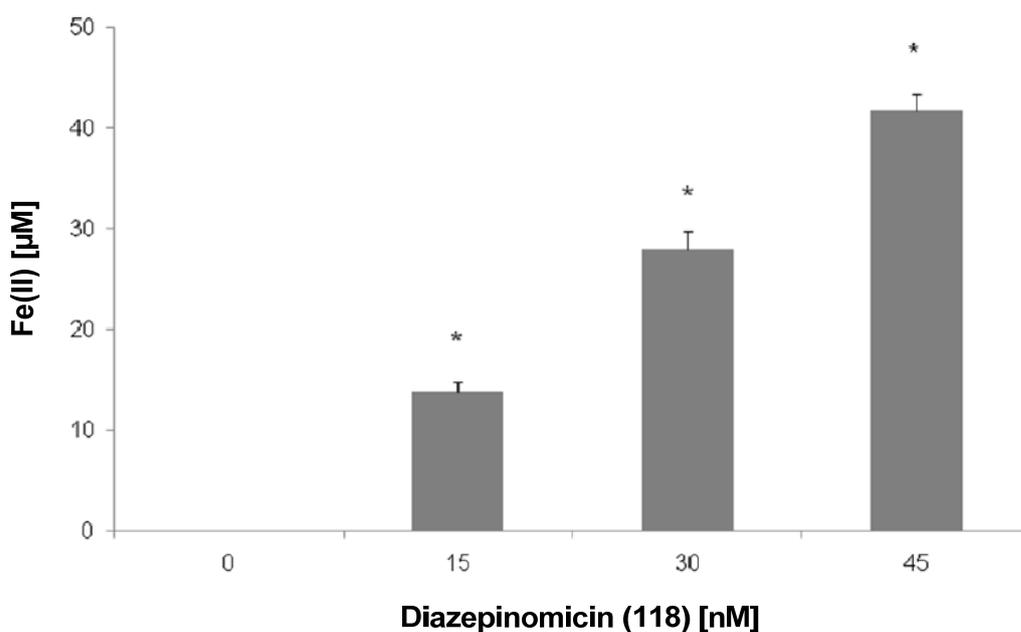
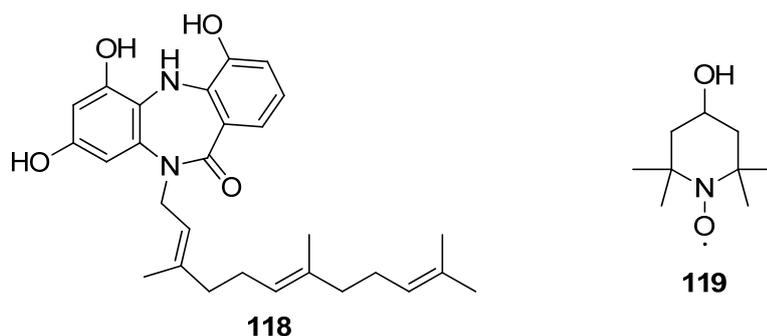
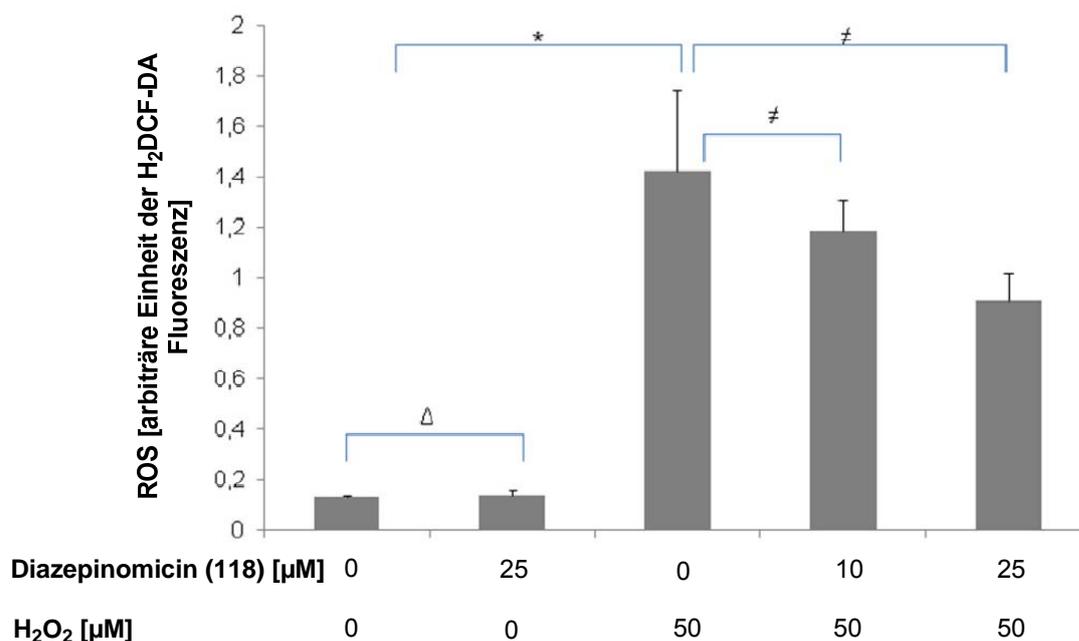


Abbildung 39: FRAP-Assay ohne Zellzusatz<sup>[68]</sup>

Im DCF-DA-Test wurden die chemischen Verbindungen auf das antioxidative Potential *in vitro* mittels eines Farbumschlags von 2'-7'-Dichlorodihydrofluorescein-diacetat ( $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ ) getestet. Die Acetylgruppen

werden durch zelluläre Esterasen beim Eintritt in eine lebende Zelle abgespalten. Besteht nun oxidativer Stress durch eine reaktive Sauerstoffspezies (ROS), wird in Folge dessen der Farbstoff Dichlorofluorescein (DCF) gebildet. Durch die Zugabe von Antioxidantien fällt dieser Farbumschlag dementsprechend geringer aus. In dem Testsystem wurde die humane promyelozytische Zelllinie HL-60 verwendet, welche besonders empfindlich auf oxidativen Stress reagiert. Für die Testansätze wurde eine Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  Wasserstoffperoxid sowie eine Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  bzw. 25  $\mu\text{M}$  Diazepinomicin (**118**) eingestellt. Nach einer Inkubationszeit von 30 min wurde die DCF-Fluoreszenz vermessen. Diazepinomicin (**118**) hatte keinerlei Einfluss auf die ROS-Konzentration in der Zelle allein, jedoch konnte durch induzierten oxidativen Stress mittels der Zugabe von Wasserstoffperoxid eine signifikant verringerte ROS-Konzentration in Anwesenheit einer Diazepinomicinkonzentration von 25  $\mu\text{M}$  festgestellt werden (Abb. 40).



**Abbildung 40: Antioxidatives Potential von Diazepinomicin (118) in einer HL-60 Zelllinie<sup>[68]</sup>**  
 $\Delta$  = nicht signifikant gegen die Kontrolle; \* = signifikant gegen die Kontrolle;  $\neq$  = signifikant gegen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

In dem dritten ausgewählten Testsystem wurde die schützende Wirkung des Diazepinomicins (**118**) gegen den von ROS induzierten Zelltod untersucht. Dafür wurde eine HK-2-Zelllinie mit Konzentrationen von 2–25 µM Diazepinomicin (**118**) und Wasserstoffperoxid einer Konzentration von 100 µM für 24 h inkubiert. Als Positivkontrolle für die antioxidative Wirkung diente in diesem Testsystem ein Ansatz mit Tempol (**119**). Die Resultate zeigten, dass Diazepinomicin (**118**) im Gegensatz zum Wasserstoffperoxid keinen Einfluss auf das Absterben der Zellen besaß. Durch die Anwesenheit des Diazepinomicins wurden die Zellen hingegen signifikant gegen oxidative Schäden und den Zelltod geschützt (Tab. 3).

Zusammensetzung	Zelltod (% toter Zellen)
Kontrolle	4 ± 1.0
25 µM Diazepinomicin	4.5 ± 0.0 (Δ gegen Kontrolle)
50 µM Tempol ( <b>119</b> )	9.7 ± 4.3
100 µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	21 ± 5.8 (* gegen Kontrolle)
100 µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + 2 µM Diazepinomicin ( <b>118</b> )	6.5 ± 4.4 (≠ gegen H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )
100 µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + 5 µM Diazepinomicin ( <b>118</b> )	7.5 ± 1.8 (≠ gegen H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )
100 µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + 10 µM Diazepinomicin ( <b>118</b> )	5.3 ± 1.0 (≠ gegen H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )
100 µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + 25µM Diazepinomicin ( <b>118</b> )	6.3 ± 2.5 (≠ gegen H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )
100 µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + 50 µM Tempol ( <b>119</b> )	14.7 ± 5.8

**Tabelle 3: Zelltod nach 24 h Inkubation einer HK-2-Zelllinie<sup>[68]</sup>**

Δ = nicht signifikant erhöhter Zelltod; \* = signifikant erhöhter Zelltod; ≠ = signifikant reduzierter Zelltod

In einem weiteren Testsystem wurde die schützende Wirkung des Diazepinomicins (**118**) für die oxidative Schädigung von DNA untersucht. Durch die Zugabe von Wasserstoffperoxid entstanden Bindungsbrüche im Doppelstrang, die ein Indikator für oxidativen Stress waren. In diesem Testsystem wurde eine HK-2-Zelllinie mit unterschiedlichen Konzentrationen von Diazepinomicin (**118**) bzw. Tempol (**119**) und einer Konzentration von 100 µM

Wasserstoffperoxid für 30 min inkubiert. Als Indikator für die Schädigung der DNA wurde ein sogenannter „Kometen-Assay“ verwendet. Der zentrale Punkt der Analytik war dabei die Gelelektrophorese. Findet keine Schädigung der DNA statt, zeigt sich eine scharfe Bande auf dem Gel. Geschädigte DNA tritt hingegen als Schweif dahinter auf. Das Diazepinomicin (**118**) allein zeigte keinen Einfluss auf die Schädigung der DNA, jedoch konnte es die des Wasserstoffperoxids signifikant reduzieren (Abb. 41).

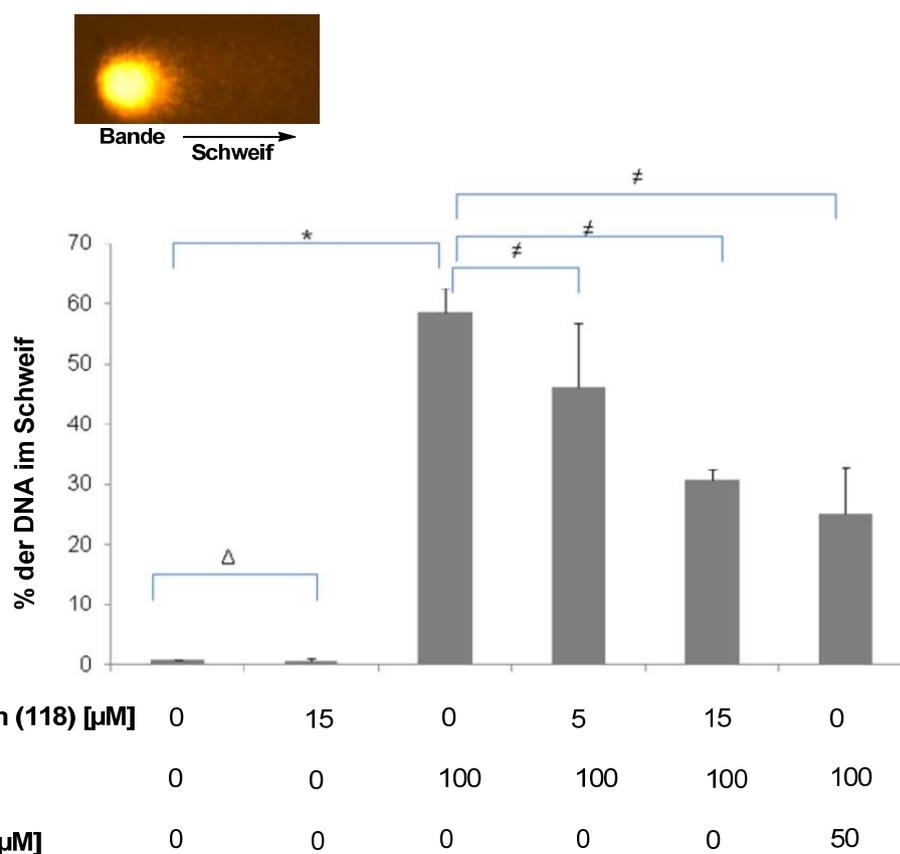


Abbildung 41: DNA-Schädigung (% DNA im Schweif)<sup>[68]</sup>

$\Delta$  = nicht signifikant gegen die Kontrolle; \* = signifikant gegen die Kontrolle;  $\neq$  = signifikant gegen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Neben den antioxidativen Eigenschaften wurde auch die Wirkung gegen Trypanosomen untersucht. Für die Testreihen wurde der Stamm *Trypanosoma brucei brucei* TC221 verwendet. Die Bestimmung des IC<sub>50</sub>-Wertes erfolgte nach

48 h und 72 h. Daraus ergab sich ein Wert von 13.57  $\mu\text{M}$  bzw. 17.06  $\mu\text{M}$  für das Diazepinomicin (**118**). Im weiteren Verlauf wurde auch die Wirkung auf die parasitäre Protease Rhodesain näher untersucht. Dies geschah durch die Messung des hydrolytischen Abbaus von Cbz-Phe-Arg-AMC. Aus diesen Versuchen bei drei unterschiedlichen Substratkonzentrationen ging das Diazepinomicin (**118**) als kompetitiver Inhibitor hervor. Für die Dissoziationskonstante  $K_i$  der Inhibierung von Rhodesain konnte ein Wert von 98  $\mu\text{M}$  bestimmt werden. Des Weiteren wurde die Wirkung auf die humane Protease Cathepsin L. untersucht. Es ergab sich ein  $\text{IC}_{50}$ -Wert von 72.4  $\mu\text{M}$  bei einer Substratkonzentration von 6.25  $\mu\text{M}$ .<sup>[68]</sup>

Durch die beschriebenen Testreihen konnten bisher unbekannte antioxidative und proteaseinhibierende Eigenschaften für das Diazepinomicin (**118**) untersucht werden. Diese Eigenschaften lassen diesen Naturstoff in der Zusammenfassung als potenten Wirkstoff gegen oxidativen Stress innerhalb von Zellen charakterisieren. Es schützt die Zelle effektiv gegen die toxische Wirkung von Wasserstoffperoxid und bewahrt diese vor einer Schädigung des Genoms. Eine mögliche Anwendung ist in der Chemotherapie gegen verschiedene Arten von Krebs zu sehen. Die nachgewiesene proteaseinhibierende Aktivität kann ebenfalls zu einer erfolgreichen Medikation in diesem Bereich führen.

### 4.3 Der Stamm *Rothia* RV13

Aufgrund von Plattendiffusionstests mit der die biologische Aktivität von Extrakten aus *Rothia* RV13 gegen *Bacillus* sp. und *Fusarium* sp. bestimmt wurde, wurde dieser Stamm ebenfalls als vielversprechender Kandidat für ein Screening erachtet.<sup>[23]</sup> Dafür wurde vom Arbeitskreis U. Hentschel ein 25 L-Ansatz in ISP-2 fermentiert. Dem Arbeitskreis S. Grond wurden davon ein Ethylacetat-Extrakt des Kulturfiltrats und ein Methanol-Aceton-Extrakt des Mycels zur Verfügung gestellt.

#### 4.3.1 Aktivitätsbasiertes Screening

In dem im Kapitel 4.1 beschriebenen Screening-Ansatz sollte durch Nährmedien-Variation eine Anreicherung von Sekundärmetaboliten erreicht werden. Für den Stamm *Rothia* RV13 jedoch sollte durch den vergrößerten Ansatz auf eine Optimierung des Nährmediums verzichtet werden und letztendlich durch chromatographische Trennung eine oder mehrere aktive Fraktionen erhalten werden. Aufgrund der Ansatzgröße wurde die Wahrscheinlichkeit erhöht, dass isolierte Reinstoffe in ausreichender Menge für eine Strukturaufklärung mittels NMR zur Verfügung standen.

In der HPLC-UV-ELSD-Kopplung (HPLC A, Säule B, Programm B) zeigte sich, dass im Mycel-Extrakt eine zu hohe Salzlast vorlag, die eine weitere zielführende Analytik verhinderte. Aus diesem Grund wurde dieser zunächst mit Ethylacetat extrahiert und die wässrige Phase verworfen. Im nächsten Schritt wurden die Extrakte mittels HPLC-ESI-MS (HPLC D, Säule B, Programm B) vermessen und die erhaltenen Daten wie in Kapitel 4.1.2 beschrieben ausgewertet. Der Vergleich mit dem Leermedium zeigte jedoch keine Signale, die auf neue Sekundärmetabolite im Kulturfiltrat hindeuteten. Aus diesem Grund wurden die Extrakte über Normalphasen-Mitteldruckchromatographie fraktioniert. Dadurch sollten Signale, die sich zum jetzigen Zeitpunkt im chromatographischen Hintergrund befanden, stärker angereichert werden. Für den Extrakt des Kulturfiltrats wurde eine Anzahl von sechs Fraktionen gewählt, für den Mycel-Extrakt eine Anzahl von acht. Aliquote dieser Fraktionen (6–8 mg) wurden dem

Kooperationspartner zur Testung der biologischen Aktivität zur Verfügung gestellt. An dieser Stelle wurden Plattendiffusionstests mit *Bacillus* sp., *E. coli* und *Fusarium* sp. durchgeführt. Insgesamt konnten hier vier aktive Fraktionen bestimmt werden (Tab. 4.). Zwei wiesen dabei eine Aktivität gegen *Bacillus* sp. und drei gegen *Fusarium* sp. auf. Diese wurden dann mittels HPLC-ESI-MS vermessen.

Probenname	Durchmesser des Hemmhofes [mm]		
	<i>Bacillus</i> sp.	<i>E. coli</i>	<i>Fusarium</i> sp.
MPLC 2 KF	0	0	0
MPLC 3 KF	8	0	0
MPLC 4 KF	0	0	0
MPLC 5 KF	12	0	0
MPLC 6 KF	9	0	8
MPLC 3 M	0	0	0
MPLC 4 M	0	0	14
MPLC 5 M	0	0	0
MPLC 6 M	0	0	0
MPLC 7 M	0	0	0
MPLC 8 M	0	0	0

Tabelle 4: Hemmhofdurchmesser der verschiedenen Fraktionen aus *Rothia* RV13 der Normalphasen-Mitteldruckchromatographie

Es konnten jedoch für die Fraktionen MPLC 3 KF, MPLC 5 KF, MPLC 6 KF und MPLC 4 M erneut nur Signale aus dem Medium detektiert werden. Deshalb wurden Messungen an einem HPLC-System mit nachgeschaltetem Lichtstreuendetektor (ELSD) (HPLC A, Säule B, Programm B) durchgeführt, um

weitere analytische Informationen zu erhalten. Mit diesem Verfahren wäre es möglich gewesen, auch Analyten ohne Chromophor und schlechter Ionisierung zu detektieren. Es konnten jedoch keine weiteren Rückschlüsse durch diese Methode gezogen werden. Aus diesem Grund wurde beschlossen, durch eine erneute Fraktionierung eine weitere Anreicherung der einzelnen Komponenten zu erreichen. Die Probe MPLC 3KF wies in den Plattendiffusionstests eine vergleichsweise geringe biologische Aktivität auf. Zusätzlich zeigte die chemische Analytik mittels HPLC-UV-ELSD (HPLC A, Säule B, Programm B) nur Signale im stark lipophilen Bereich. Es sprach sehr viel dafür, dass es sich bei dieser Probe hauptsächlich um Lipide aus dem Medium und dem Primärstoffwechsel des Mikroorganismus handelte. Aus diesem Grund wurde die Probe verworfen. Die restlichen aktiven Isolate wurden mittels Umkehrphasen-Hochdruckchromatographie weiter fraktioniert. Aliquote (1–2 mg) wurden erneut vom Kooperationspartner auf biologische Aktivität hin untersucht. Insgesamt konnten vier aktive Fraktionen identifiziert werden (Tab. 5). Diese wurden dann mittels HPLC-ESI-MS und HPLC-UV-ELSD untersucht, um signifikant hohe Signale möglicher Zielverbindungen zu erhalten.

Probenname	Durchmesser des Hemmhofes [mm]		
	<i>Bacillus</i> sp.	<i>E. coli</i>	<i>Fusarium</i> sp.
HPLC 5 KF (20-28)	0	9	0
HPLC 6 KF (15-17)	0	10	0
HPLC 6 KF (20-25)	0	0	11
HPLC 4 M (43-56)	0	0	13
HPLC 4 M (36-55)	8	0	0

Tabelle 5: Hemmhofdurchmesser der verschiedenen Fraktionen aus der Umkehrphasen-Hochdruckchromatographie

Es stellte sich jedoch heraus, dass die Hauptbestandteile der Proben dem Medium zugeordnet werden konnten. Die Proben HPLC 5 KF (20–28) und

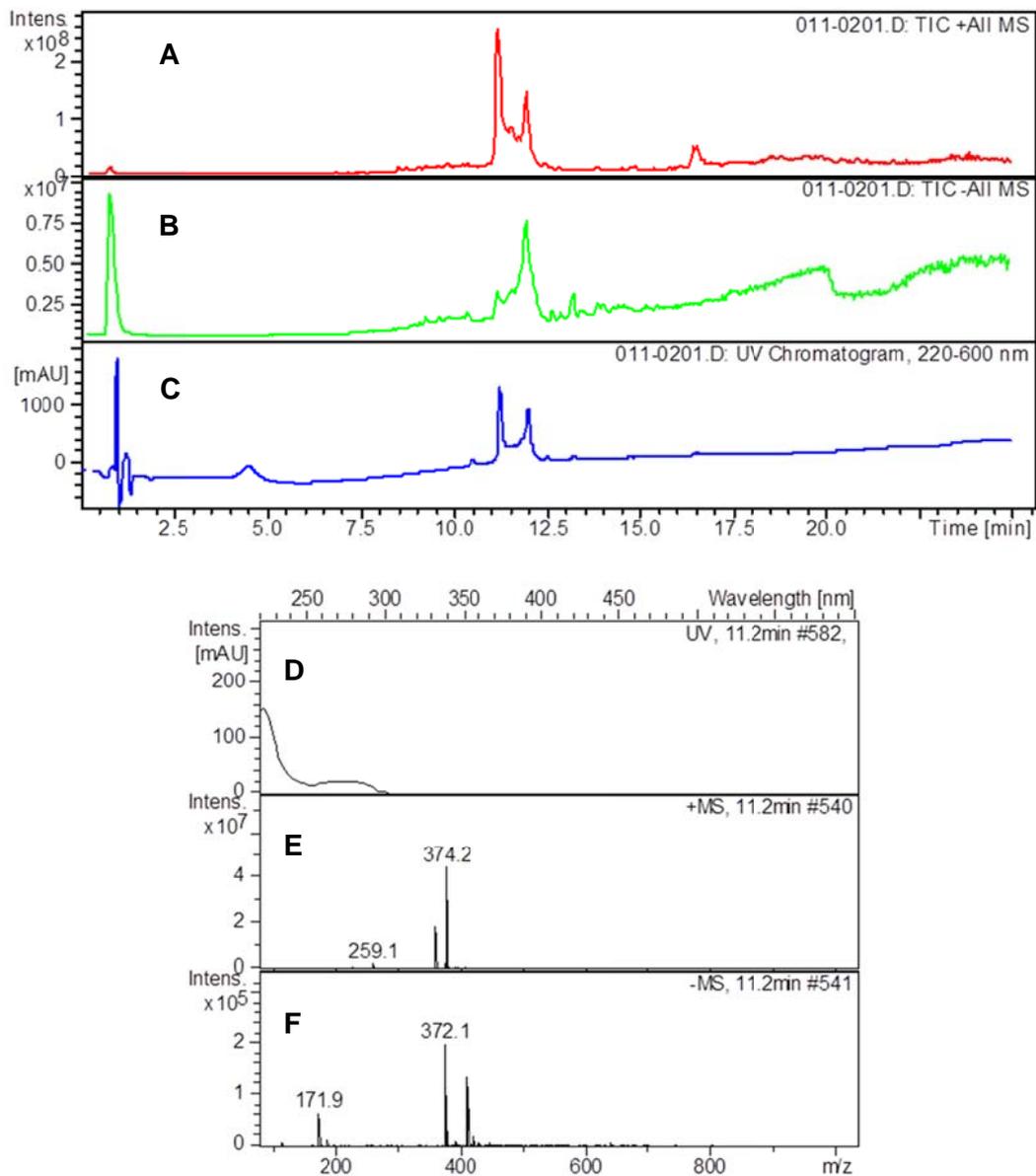
HPLC 6 KF (15–17) zeigten eine Aktivität gegen *E. coli*, die vorher nicht festzustellen war. Die Ursache hierfür könnte der höhere Grad der Anreicherung oder neu entstandene Zerfallsprodukte sein. Da sich in diesen Proben jedoch keine signifikanten Signale außer denen der Mediumbestandteile befanden, wurden diese Proben verworfen. Für die Probe HPLC 4 M (43–56) konnte eine Fremdkontamination mit Novobiocin, welches im Arbeitskreis *S. Grond* verwendet wird, nach der ersten chromatographischen Aufreinigung nachgewiesen werden. Aus diesem Grund wurde diese Probe ebenfalls verworfen. Als einzige Wertfraktion wurde daher die Probe HPLC 6 KF (20–25) angesehen. Da diese schon bei der vorhergehenden Fraktionierung eine Aktivität gegen *Fusarium* sp. aufwies, wurde vermutet, dass die gleiche Substanz für das positive Testergebnis verantwortlich war.

### 4.3.2 Isolierung und Charakterisierung des Massensignals $m = 373$

Durch die Analytik zur Probe HPLC 6 KF (20–25) mittels HPLC-ESI-MS und HPLC-UV-ELSD konnte festgestellt werden, dass die Hauptkomponenten Bestandteile des Nährmediums waren. Im Unterschied zu den anderen Proben ließ sich jedoch eine Masse für das  $[M+H]^+$  von  $m/z = 374.2$  detektieren, die nicht im Nährmedium nachgewiesen werden konnte. Zu diesem Zeitpunkt lag deshalb die Vermutung nahe, dass es sich um die gegen *Fusarium* sp. aktive Verbindung handeln könnte. Interessanterweise lag bei dieser Verbindung ein doppeltes Signal vor, welches vermutlich auf unterschiedliche Protonierungszustände zurückzuführen war. Die nächsten analytischen Schritte bestanden in der Aufnahme eines hochaufgelösten Massenspektrums,  $MS^n$ -Messungen, dem Abgleich mittels UV-Datenbank und *Metfrag* (Kap. 3.5.3).<sup>[19] [21]</sup> Durch HRMS konnte eine Masse für das  $[M+H]^+$  von  $m/z = 374.1879$  bestimmt werden (HPLC E, Säule B, Programm B). Die Auswertung der  $MS^n$ -Daten mittels *Metfrag* in Verbindung mit der Datenbank *Chemspider* lieferte kein zielführendes Ergebnis, bis auf die Tatsache, dass wahrscheinlich ein Indol vorlag. So enthielten die in *Chemspider* gespeicherten indolhaltigen Verbindungen aufgrund des computergenerierten Fragmentspektrums die beste Übereinstimmung mit dem

MS<sup>2</sup>-Spektrum der untersuchten Verbindung. Diese Vermutung wurde ebenfalls durch das UV-Spektrum unterstützt, welches ein Maximum bei 272 nm besaß. Ein Datenbankabgleich lieferte Indol-3-essigsäure als Substanz mit der größten Übereinstimmung.<sup>[19]</sup> Diese Verbindung konnte jedoch aufgrund einer Masse von  $m/z = 176.0706$  für das  $[M+H]^+$  und der deutlich unterschiedlichen Retentionszeit ausgeschlossen werden. Eine weitere Beschreibung der Struktur konnte aufgrund der vorliegenden Daten nicht vorgenommen werden. Durch die Fraktionsgröße von 9.5 mg und dem hohen Anteil von Medienbestandteilen wurde ersichtlich, dass die Zielverbindung wahrscheinlich nur in Spuren vorlag. Vor diesem Hintergrund war die Strategie, die Substanz zu isolieren und dem Kooperationspartner für einen Aktivitätstest gegen *Fusarium* sp. zur Verfügung zu stellen. Im Falle eines positiven Testergebnisses sollte dann eine Fermentationsoptimierung vorgenommen werden, um genug Substanzmenge für eine Strukturaufklärung zu erhalten. Durch semipräparative Umkehrphasen-Hochdruckchromatographie konnte die Substanz in einer Menge von 0.3 mg isoliert werden. Die Reinheit wurde aufgrund der geringen Menge massenspektrometrisch überprüft. Bei positiver Ionisierung und im UV-Chromatogramm ließen sich keine Verunreinigungen feststellen. Die Massenspektren bei negativer Ionisierung zeigten hingegen eine Kontamination der Masse  $m/z = 408.1$ . Diese stammte jedoch aus dem Nährmedium (Abb. 42). Dieses Isolat wurde dem Kooperationspartner zur Verfügung gestellt. Der Aktivitätstest gegen *Fusarium* sp. führte allerdings zu einem negativen Testergebnis. Das bedeutete, dass es sich bei der Verbindung mit der Masse  $m = 373$  nicht um die Verbindung handelte, die für die biologische Aktivität verantwortlich war. Aus diesem Grund wurde das Projekt an dieser Stelle zunächst nicht weiter bearbeitet.

Aus den bereitgestellten Extrakten des 25 L-Fermentationsansatzes konnten somit keinen neuen bioaktiven Sekundärmetabolite isoliert werden. Ursächlich hierfür war hauptsächlich die Zusammensetzung der Extrakte. So konnten selbst nach zweifacher chromatographischer Fraktionierung nur Medienbestandteile als Hauptkomponenten der einzelnen Fraktionen nachgewiesen werden.



**Abbildung 42: HPLC-ESI-MS-Analytik der Verbindung  $m = 373$  nach dem letzten Aufreinigungsschritt**

**A:** Komplette Ionenspur (positive Ionen); **B:** Komplette Ionenspur (negative Ionen); **C:** UV-Chromatogramm (220–600 nm); **D:** UV-Spektrum; **E:** Massenspektrum (positive Ionen); **F:** Massenspektrum (negative Ionen)

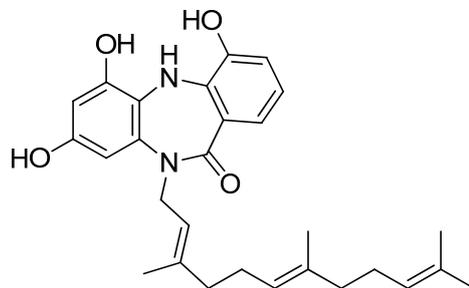
#### 4.4 Diskussion der Ergebnisse

Innerhalb dieses Projektes konnte auf Grundlage eines datenbankbasierten HPLC-UV-ESI-MS-Screening eine zeitsparende und effiziente Dereplikation durchgeführt werden. Durch diese Anwendung konnten bereits in einem sehr frühen Stadium bekannte, nicht zielführende Verbindungen wie Medienbestandteile oder Verbindungen, die bekannt und nicht für dieses Projekt von Interesse waren, z.B. die Indol-3-essigsäure, ausgeschlossen werden.

Insgesamt konnte für die vier untersuchten Stämme nur ein relativ kleines Metabolitenspektrum nachgewiesen werden. Speziell für den Stamm *Rothia* RV13 könnte eine andere Herangehensweise zu besseren Ergebnissen führen (Kap. 4.3). Bei dem hier beschriebenen Verfahren eines großen Fermentationsansatzes ohne weitere Medienoptimierung konnten selbst nach zweifacher chromatographischer Fraktionierung nur Medienbestandteile als Hauptkomponenten innerhalb der Fraktionen nachgewiesen werden. Dieser Eindruck zeichnete sich schon bei ersten Untersuchungen der Rohextrakte ab. Aus diesem Grund erscheint es sinnvoll, in diesem Fall die Actinomyceten in kleinen Ansätzen und unterschiedlichen Nährmedien zu fermentieren und deren Extrakte sowohl chemisch-analytisch als auch auf biologische Aktivität hin zu untersuchen. Durch diese Kombination kann dann entschieden werden, welcher Fermentationsansatz in größeren Mengen dargestellt werden sollte. Für diesen Teil des Projektes könnte das den nächsten Schritt darstellen.

Das beschriebene Verfahren der kleinen, unterschiedlichen Fermentationsansätze wurde für die Stämme *Rhodococcus* RV77, *Rothia* RV89 und *Micromonospora* RV115 angewendet. Insgesamt wurden diese in sieben von ihrer Zusammensetzung her sehr unterschiedlichen Nährmedien fermentiert. Aus diesem Screening-Prozess konnte das bereits bekannte Diazepinomicin (**118**) aus *Micromonospora* RV115 isoliert werden. Aufgrund der ersten kleinen Fermentationsansätze, deren chemischer Analytik und der Untersuchung der biologischen Aktivität konnte schon zu einem sehr frühen Zeitpunkt eine Verbindung zwischen der Substanz und deren biologischer Aktivität hergestellt werden. Aus diesem Grund erschien es sinnvoll, die Verbindung als Reinstoff

darzustellen, wodurch neue antioxidative und proteaseinhibierende Aktivitäten gezeigt werden konnten.



**118**

Das Diazepinomicin (**118**) ließ sich als potenter Wirkstoff gegen oxidativen Stress innerhalb von Zellen charakterisieren. Es schützte Zellen effektiv gegen die toxische Wirkung von Wasserstoffperoxid und bewahrte diese vor einer Schädigung des Genoms. Mögliche Anwendungen sind in der Chemotherapie gegen verschiedene Arten von Krebs zu sehen. Die nachgewiesene proteaseinhibierende Aktivität kann ebenfalls zu einer erfolgreichen Medikation in diesem Bereich führen.

In der Zusammenfassung stellte sich das Verfahren aus Kapitel 4.2 als beste untersuchte Variante für ein Screening aus marinen Actinomyceten heraus, wobei die Auswahl von sieben unterschiedlichen Nährmedien die Obergrenze darstellen sollte. Es erscheint in diesem Zusammenhang sinnvoller, die Anzahl der zu untersuchenden Stämme zu erhöhen, anstatt weitere Nährmedien zu untersuchen.

## 5 Semisynthetische Entwicklungen an Zellwandvorläufern

Dieses Projekt war eine Kooperation mit dem Arbeitskreis *U. Bertsche* (Universität Tübingen). Ziel war die Untersuchung von Penicillin-Bindeproteinen (PBP) mit semisynthetischen Zellwandvorläufern, die durch den Arbeitskreis *S. Grond* bereitgestellt wurden.

Alle Bakterien besitzen eine aus Murein bestehende Zellhülle. Diese sorgt für die osmotische Stabilität und bestimmt deren Zellform. Die Grundstruktur besteht aus zwei Strängen von glycosidisch verbundenem *N*-Acetylglucosamin (GlcNAc) und *N*-Acetylmuraminsäure (MurNAc). Diese Stränge sind über Peptidketten miteinander quervernetzt (Abb. 43). Die peptidische Struktur kann abhängig von der Gattung der Mikroorganismen sehr unterschiedlich sein.<sup>[70]</sup> Charakteristisch sind hier die sogenannten Interpeptidbrücken. Bei *S. aureus* befindet sich an dieser Stelle eine Pentaglycinbrücke, während z.B. bei *Streptomyces coelicolor* ein einfaches Glycin zur Verknüpfung dient.<sup>[71] [72]</sup> Aufgebaut wird das Murein mit Hilfe der Vorstufe Lipid II, welches nach erfolgter glykosidischer Knüpfung freigesetzt wird und wiederverwertet werden kann. Dabei synthetisiert z.B. das PBP 1A, eine Glycosyltransferase, die als Penicillin-bindendes Protein entdeckt wurde, eine neue Mureinkette durch eine Glycosyltransfer-Reaktion mit dem Lipid II. Durch eine Transpeptidase-Reaktion wird diese neue Kette mit dem bereits vorhandenen Mureingerüst verknüpft.<sup>[70]</sup>

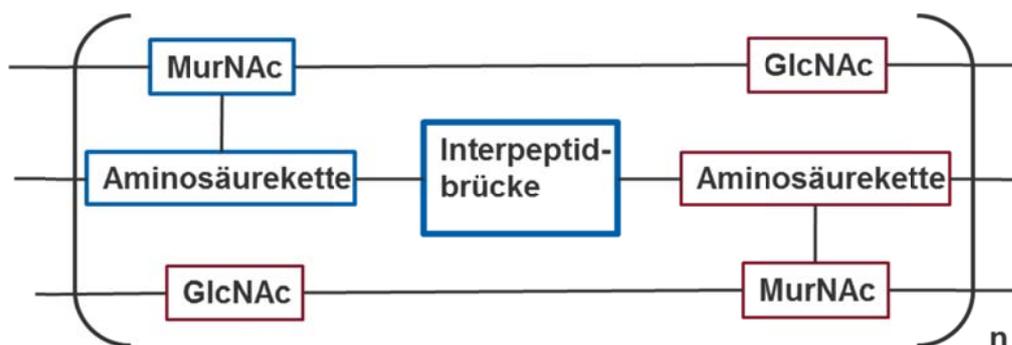
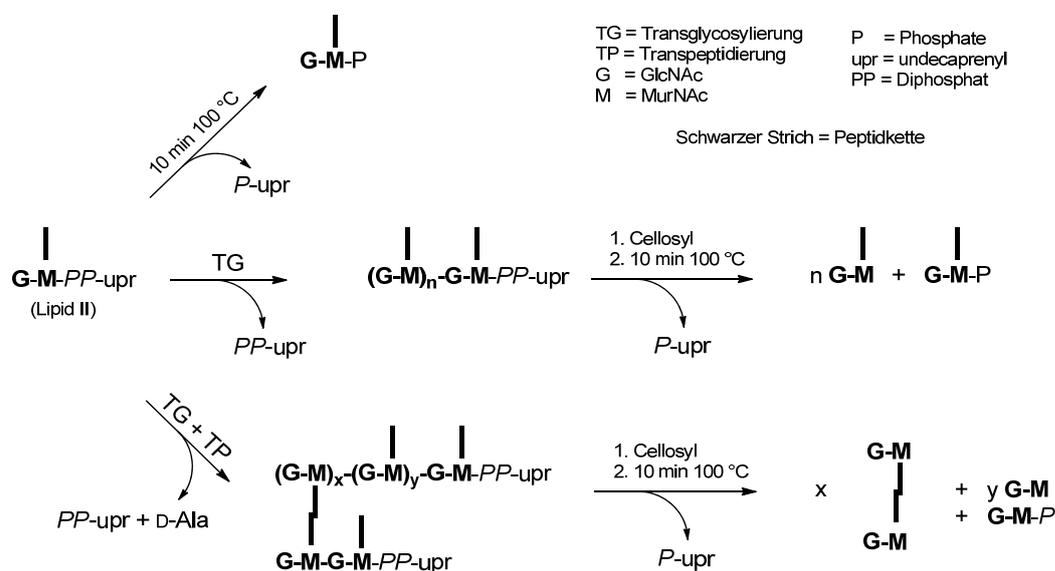


Abbildung 43: Schematischer Aufbau des Mureingerüsts

Der Arbeitskreis S. *Grond* hatte in diesem Projekt die Aufgabe, die Interpeptidbrücke mit dem Zellwandvorläufer, einem UDP-MurNAC-Hexapeptid (**12**), zu koppeln. Diese Reaktion ist zwar auch enzymatisch möglich, allerdings ist dies deutlich aufwendiger als die semisynthetische Darstellung.<sup>[73]</sup> Deshalb wurde eine semisynthetische Synthesestrategie gewählt. Im weiteren Verlauf sollte im Arbeitskreis U. *Bertsche* das erhaltene Produkt zum Lipid II umgesetzt werden. Das Lipid II wiederum sollte mit den zu untersuchenden PBP's umgesetzt werden. Das erhaltene Makromolekül sollte im Anschluss mittels Cellosyl und dem Erhitzen auf 100 °C für 10 min teilweise gespalten werden. Mittels einer HPLC-UV-Analytik sollte dann aufgrund charakteristischer Signale der Bruchstücke die Funktion des Enzyms aufgeklärt werden (Abb. 44).



**Abbildung 44:** Schematische Darstellung zur Untersuchung der Funktionalität von PBP's<sup>[74]</sup>

Im Rahmen dieser Arbeit sollten drei unterschiedliche Interpeptidbrücken bereitgestellt werden, um ein erweitertes Substratspektrum untersuchen zu können. Es handelt sich dabei um ein Mono- (Gly), Tri- (Gly<sub>3</sub>) und Pentaglycin (Gly<sub>5</sub>). Bei dieser Synthesestrategie wurden als Edukt die 9-Fluorenylmethoxycarbonyl-geschützten (Fmoc) Aminosäureketten gewählt. Die Darstellung des Fmoc-Gly<sub>5</sub> (**122**) erfolgte synthetisch. Fmoc-Gly (**11**) und Fmoc-Gly<sub>3</sub> waren hingegen kommerziell erhältlich (*Bachem*).

### 5.1 Darstellung von Fmoc-Gly<sub>5</sub> (122)

Für die Darstellung des Fmoc-Gly<sub>5</sub> (**122**) wurden unterschiedliche Strategien gewählt. Der erste Syntheseansatz orientierte sich an den ersten Arbeiten zur Verwendung von Fmoc als Schutzgruppe (Abb. 45).<sup>[75]</sup> Aufgrund seiner schlechten Lösungseigenschaften in Wasser bei Raumtemperatur wurde das Gly<sub>5</sub> (**121**) bei 80 °C in Lösung gebracht und im Anschluss auf Raumtemperatur heruntergekühlt. Für die Synthese wurde das Gly<sub>5</sub> (**121**) in 2 N Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung vorgelegt und Fmoc-Cl (**120**) (1.0 Äq.) in Dioxan zugetropft. Durch die Zugabe von Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> wurde ein basischer pH-Wert erreicht, um eine Deprotonierung der Aminofunktion des Glycins und damit einhergehend ein besseres Nucleophil zu erhalten. Dieses Vorgehen stellt für einfache Aminosäuren ein etabliertes Verfahren dar. Allerdings zeigte sich schon während der Zugabe, dass ein weißer Feststoff ausfiel, der auch durch die Erhöhung der Lösungsmittelmengen nicht wieder in Lösung gebracht werden konnte. Nach einer Reaktionszeit von 2 h wurde Wasser hinzugefügt und mit Diethylether gewaschen, um polymere Dibenzofulvene zu entfernen. Im nächsten Schritt wurden die verwendeten Salze durch Extraktion mit Ethylacetat entfernt. Untersuchungen mittels HPLC-ESI-MS (HPLC D, Säule B, Programm B) zeigten jedoch, dass unter diesen Reaktionsbedingungen nur sehr geringe und stark verunreinigte Mengen des Produktes (**122**) vorlagen (12 % Ausbeute). Es wurde vermutet, dass es während der Reaktion zu einer inter- und intramolekularen „Verdrillung“ der Glycinketten ineinander kommt, welche die Bildung eines schwer löslichen Clusters zur Folge haben. Dieser Ansatz der Reaktionsführung wurde deshalb als nicht zielführend nicht weiter verfolgt.

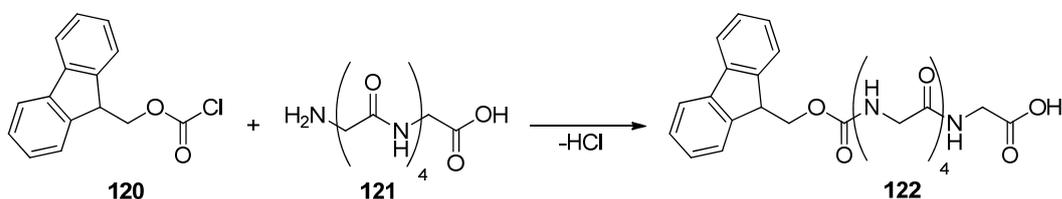
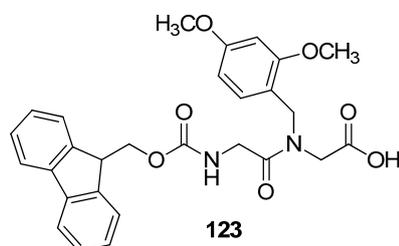
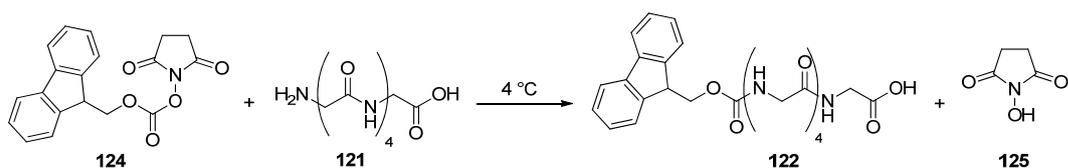


Abbildung 45: Erster synthetischer Ansatz zur Darstellung des Fmoc-Gly<sub>5</sub>

Als nächstes sollte das Fmoc-Gly<sub>5</sub> (**122**) mittels Peptidsynthesizer hergestellt werden. Diese Arbeiten wurden durch den Arbeitskreis S. *Stevanovic* (Universität Tübingen) durchgeführt. Aus zeitlichen Gründen war jedoch nur eine Herstellung mittels der durch Arbeitskreis S. *Stevanovic* etablierten Methoden möglich, es wurde also keine für das Fmoc-Gly<sub>5</sub> (**122**) optimierte Methode entwickelt. Der erste Versuch, fünf Glycine miteinander zu verknüpfen, führte zu schlechten Ausbeuten. Mittels massenspektrometrischer Untersuchungen konnte die Zielverbindung nicht nachgewiesen werden. Es wurde angenommen, dass sich beim Aufbau der Kette die kleinen und sterisch wenig gehinderten Glycine ineinander verdrehten und somit kein Reaktionszentrum mehr zu Verfügung stand. Aus diesem Grund wurde ein weiterer Versuch mit dem Fmoc-L-glycyl-*N*- $\alpha$ -(2, 4-dimethoxybenzyl)-Glycin (Fmoc-Gly-(Dmb)Gly-OH) (**123**) unternommen. Dafür sollten zwei dieser Bausteine mit einem Glycin gekuppelt werden. Das Dmb sollte dabei durch seinen sterischen Anspruch das Ineinander-Verdrillen der einzelnen Glycine verhindern. Bei der Abspaltung des Peptids vom Harz mittels Trifluoressigsäure (TFA) sollte diese Gruppe ebenfalls abgespalten werden und das Fmoc-Gly<sub>5</sub> (**122**) entstehen.<sup>[76]</sup> Doch auch bei diesem Ansatz ließ sich im Produktgemisch die Zielverbindung nicht nachweisen.



Auf Grundlage der bisherigen Synthesestrategien wurde versucht, das kommerziell erhältliche Gly<sub>5</sub> (**120**) synthetisch mit Fmoc-OSu (**124**) umzusetzen (Abb. 46). Prinzipiell handelt es sich um die gleiche Reaktion wie im ersten synthetischen Ansatz, allerdings wurden in diesem zweiten synthetischen Ansatz die Art des Lösungsmittels, dessen Menge, die Temperatur und die Reaktionszeit verändert.<sup>[77]</sup> Durch das gewählte Lösungsmittelgemisch aus Acetonitril und Wasser konnten die Reaktanden über den gesamten Reaktionsverlauf in Lösung gehalten werden.



**Abbildung 46: Zweiter synthetischer Ansatz zur Darstellung des Fmoc-Gly5**

In der Literatur wurde eine Aufreinigung durch Extraktion mittels Dichlormethan angegeben.<sup>[77]</sup> Durch Untersuchungen des Dichlormethanextraktes und der wässrigen Phase mittels HPLC-ESI-MS (HPLC D, Säule B, Programm D) konnte jedoch festgestellt werden, dass die Zielverbindung (**122**) mit der Masse  $m/z = 524.2$  für das  $[M-H]^-$  in der wässrigen Phase verblieb. Aus diesem Grund wurde für die finale Aufreinigung eine Umkehrphasen-Mitteldruckchromatographie durchgeführt. Durch diesen Schritt konnte die in der Literatur beschriebene Ausbeute für **122** von 68 % auf 84 % gesteigert werden.<sup>[77]</sup> Da durch HPLC-ESI-MS keine Verunreinigungen detektiert werden konnten, wurde das erhaltene Produkt für die weiteren Synthesen eingesetzt.

## 5.2 Synthese der UDP-MurNAc-Hexapeptid-Glycin-Derivate

Die Fmoc-geschützten Oligoglycine wurden nun semisynthetisch an ein UDP-MurNAc-Hexapeptid (**12**) gekuppelt. Diese Reaktion war für Alanin und Serin bereits literaturbekannt.<sup>[72]</sup> Die Synthesestrategie sah eine 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid-vermittelte (EDC) Aktivierung der Carboxylfunktion der Fmoc-geschützten Aminosäure durch *N*-Hydroxysuccinimid (NHS) vor. Aufgrund der besseren Aktivität wurde dieser Reaktionsschritt bei pH = 5 durch die Zugabe von 2-(*N*-Morpholino)ethansulfonsäure (MES) durchgeführt. Anschließend erfolgte die selektive Kupplung der aktivierten Aminosäure an den Lysinrest des UDP-MurNAc-Hexapeptids (**12**). Während dieses Schrittes wurde pH = 10 durch Zugabe von NaHCO<sub>3</sub> eingestellt, um durch Deprotonierung der Aminofunktion des Lysins ein besseres Nucleophil zu erhalten. Die Reaktion wurde mit Ethanolamin beendet und die Fmoc-Schutzgruppe mittels Piperidin entfernt.

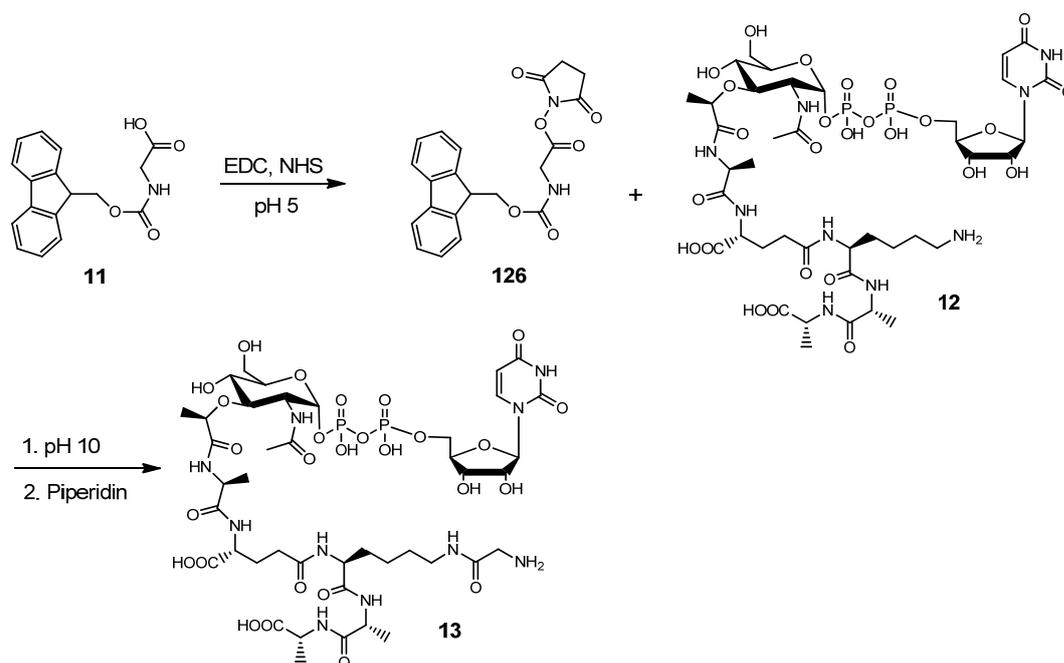
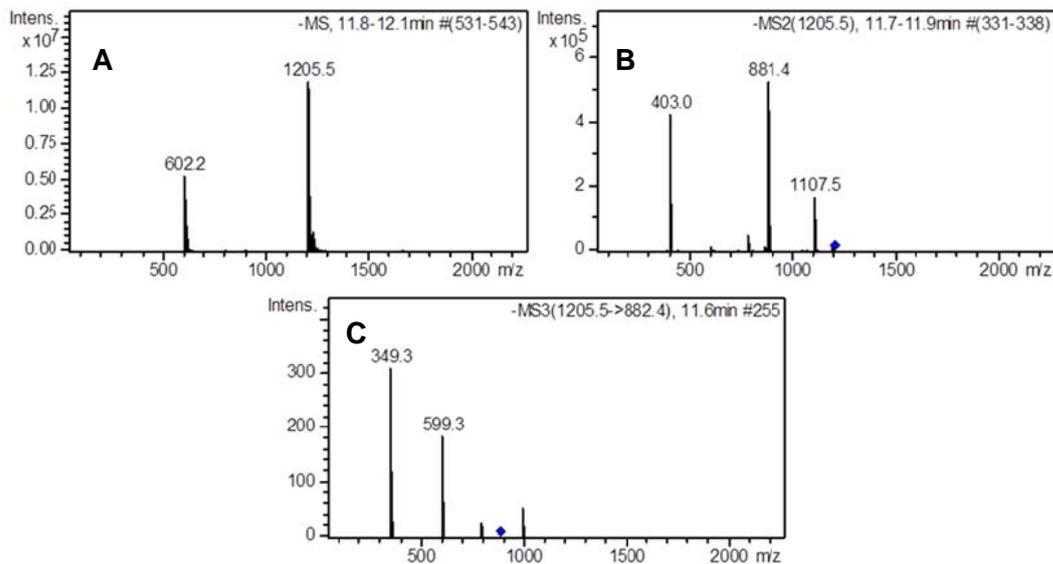
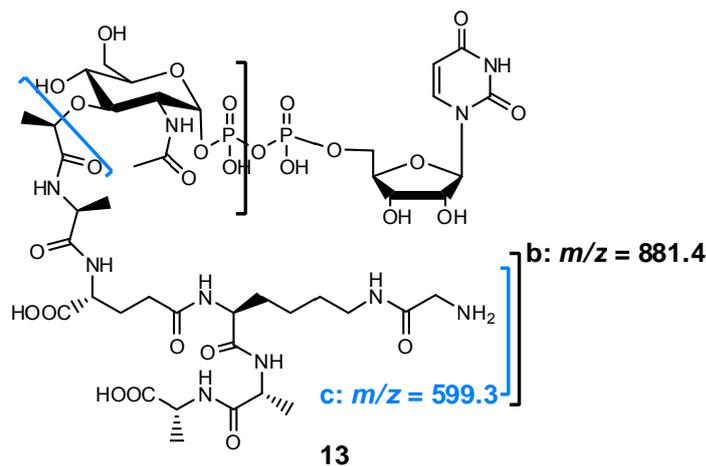


Abbildung 47: Syntheseweg am Beispiel der Kupplung zum Monoglycinanalogon (**13**)

Im Verlauf dieses Projektes wurde diese Vorschrift für die Kupplung der Glycinketten weiter angepasst und optimiert. Die wesentlichen Veränderungen betrafen dabei das Lösungsmittel und dessen Zusammensetzung. In der Originalvorschrift wurde eine Zusammensetzung von 80 % Acetonitril in Wasser verwendet.<sup>[72]</sup> Dies führte jedoch insbesondere bei der Kupplung des Gly<sub>3</sub> und Gly<sub>5</sub> (**122**) zu einer signifikanten Verminderung der Ausbeute. Deshalb wurde die Bildung des NHS-Ester nun in reinem Acetonitril durchgeführt. Dazu wurden EDC und MES in Acetonitril vorgelegt, NHS zugegeben und für 20 min bei Raumtemperatur gerührt. Im Anschluss wurde die Fmoc-geschützte Aminosäure in Wasser hinzugefügt und somit die Acetonitrilkonzentration auf 55 % reduziert. Dieser Schritt war nötig, um eine gute Löslichkeit aller Komponenten zu gewährleisten. Die Erhöhung des Wasseranteils stellte kein Problem dar, da die NHS-Ester vergleichsweise hydrolysestabil sind.<sup>[78]</sup> Die Zugabe des UDP-MurNAc-Hexapeptids (**12**) erfolgte in 500 mM NaHCO<sub>3</sub>-Lösung, um die Reaktionslösung von pH = 5 auf pH = 10 anzuheben. Die Reaktionszeit wurde auf 3 h festgelegt, da sich nach dieser Zeit kein Edukt mehr detektieren ließ. Nach Beenden der Reaktion und Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe mittels Piperidin wurde Wasser hinzugefügt, was zum Ausfällen des entstandenen Harnstoffderivats führte. Die Reaktionslösung wurde über einen Spritzenfilter gegeben, das Filtrat lyophilisiert und dem Kooperationspartner zur Verfügung gestellt. Eine Isolierung der Zielverbindungen **13**, **127** und **128** mittels HPLC war aufgrund der weiteren Verwendung nicht erforderlich.

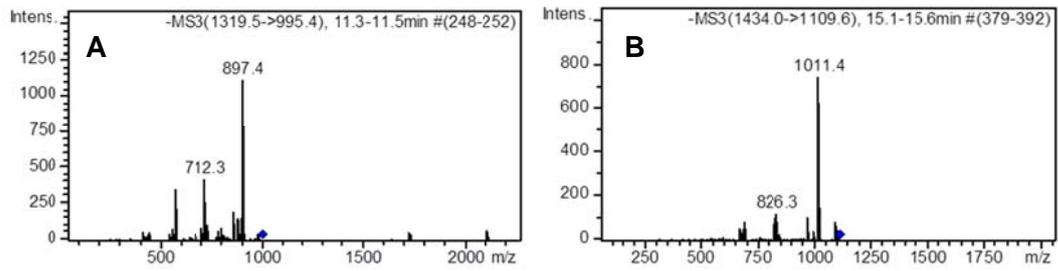
Aufgrund der geringen Mengen und der Größe der Zielverbindungen wurde die Struktur massenspektrometrisch überprüft. Als zielführend erwies sich hierbei eine MS<sup>3</sup>-Analytik, um sicherzustellen, dass bei der entsprechenden Zielmasse keine Veresterung am Zucker stattgefunden hatte (HPLC D, Säule B, Programm D). Im ersten MS<sup>2</sup>-Schritt konnten keine eindeutigen Signale erhalten werden, da bei den Hauptfragmenten noch das *N*-Acetylmuramin vorhanden war. Aufgrund der enthaltenen Hydroxylgruppen hätte es zu falschen Reaktionsprodukten gleicher Masse kommen können. Erst in einem darauffolgenden MS<sup>3</sup>-Schritt durch erneute Fragmentierung des Fragments b konnte ein eindeutiges Signal erhalten werden. In Abbildung 48 ist der entsprechende Fragmentierungsweg am

Beispiel des gekuppelten Monoglycins (**13**) dargestellt. Das Fragment c mit der Masse  $m/z = 599.3$  war nur möglich, wenn eine Veresterung des Monoglycins am Lysinrest stattgefunden hat. Für das Triglycinderivat (**127**) ergab sich ein c-Fragment mit einer entsprechende Masse von  $m/z = 712.3$  und für das Pentaglycinderivat (**128**) von  $m/z = 1011.4$  (Abb. 49).



**Abbildung 48: Fragmentierungsweg am Beispiel des gekuppelten Monoglycins (negative Ionen)**

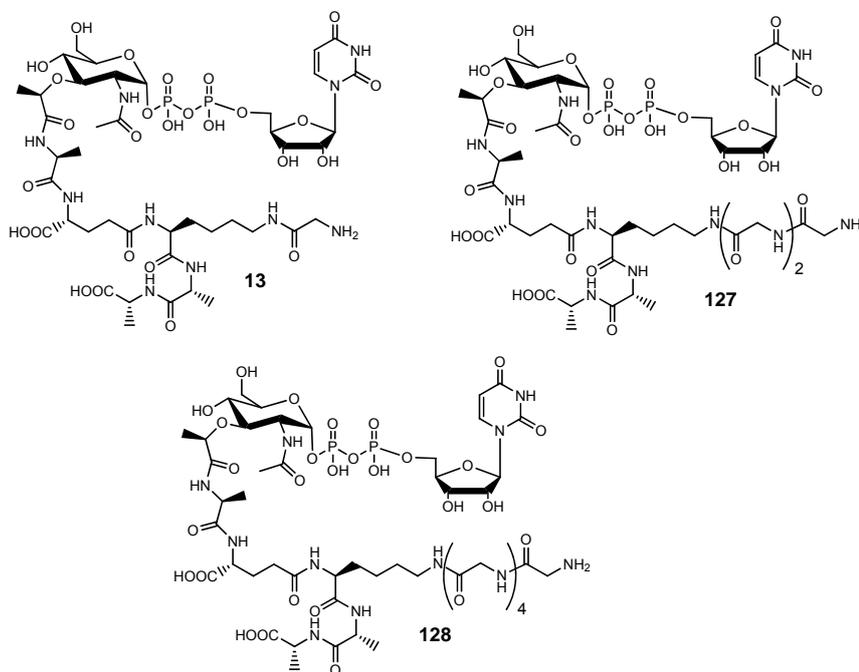
**A:** Massenspektrum des gekuppelten Monoglycins; **B:** Resultierendes MS<sup>2</sup>-Spektrum  $m/z = 881.4$  entspricht **b**; **C:** Resultierendes MS<sup>3</sup>-Spektrum  $m/z = 599.3$  entspricht **c**



**Abbildung 49: MS<sup>3</sup>-Spektren der c-Fragmente (negative Ionen)**  
A: Gekoppeltes Triglycin; B: Gekoppeltes Pentaglycin

### 5.3 Diskussion der Ergebnisse

Ziel der vorliegenden Arbeiten war die Herstellung von drei UDP-MurNAc-Hexapeptid-Glycin-Derivaten **13**, **127** und **128**, um dem Arbeitskreis *U. Bertsche* die Untersuchung der Funktion potentieller neuer PBPs zu ermöglichen. Durch einen fortlaufend verbesserten Syntheseweg konnten diese drei Derivate erfolgreich semisynthetisch dargestellt werden. Ein zentraler Aspekt war die Optimierung der Lösungsmittelzusammensetzung. Mittels einer Erhöhung des Wasseranteils auf 50 % nach vorhergehender Aktivierung der Carbonsäure war es möglich, längere schwer lösliche Peptide, wie z.B. das Fmoc-Gly<sub>5</sub> (**122**) an das UDP-MurNAc-Hexapeptid (**12**) mit guten Umsatzraten zu koppeln. Zusätzlich konnte eine MS<sup>3</sup>-Analytik zur korrekten Bestimmung der Zielverbindungen etabliert werden. Diese ermöglichte es, die Peptidbindung am Lysinrest zweifelsfrei zu belegen. Für diese Aufgabenstellung der chemischen Synthese stellt dieses Verfahren eine zeiteffiziente Methode dar, die es zudem ermöglicht, auch kleine Substanzmengen chemisch eindeutig zu charakterisieren.



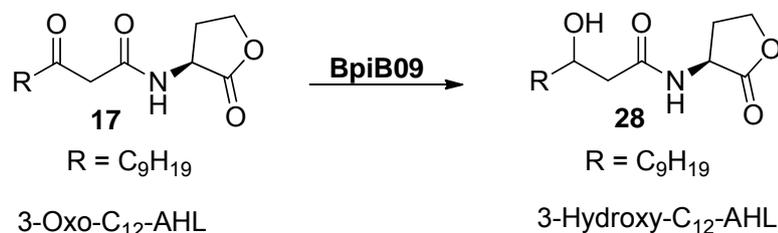
Die hier dargestellten Substrate **13**, **127** und **128** wurden vom Arbeitskreis *U. Bertsche* enzymatisch in den Zellwandvorläufer Lipid II umgewandelt und mit aufgereinigten PBPs inkubiert. Das erhaltene Makromolekül wurde im Anschluss gespalten und mittels HPLC vermessen. Aufgrund charakteristischer Signale von Bruchstücken konnten Rückschlüsse über die Funktion der einzelnen PBPs gezogen werden (Abb. 44).<sup>[74]</sup> Die abschließenden Ergebnisse aus diesen Versuchen lagen zu diesem Zeitpunkt allerdings noch nicht vor.

## 6 Zusammenfassung der Ergebnisse

### 6.1 Neue Biofilminhibitionsstrategien

#### Anti-Biofilm-Strategien aus Metagenomexperimenten

Im Rahmen dieser Arbeit konnten HPLC-ESI-MS basierte Methoden etabliert werden, mit denen sich auch geringe enzymatische Umsätze von QQ-Proteinen detektieren lassen. Dieses Ziel wurde unter Verwendung von empfindlichen Massenspektrometern, der Aufnahme von MS<sup>2</sup>-Spektren, wodurch falschpositive Ergebnisse ausgeschlossen werden konnten, und die gemeinsame Optimierung der Probenvorbereitung im Forschungsverbund mit dem Kooperationspartner erreicht. Mittels dieser entwickelten Methoden konnte das Genprodukt BpiB09 als Oxidoreduktase charakterisiert werden, welches durch Screening von 8000 Metagenomklonen durch den Arbeitskreis *W. Streit* isoliert werden konnte. Es konnte massenspektrometrisch belegt werden, dass BpiB09 in der Lage war, das 3-Oxo-C<sub>12</sub>-AHL (**17**) in das 3-Hydroxy-C<sub>12</sub>-AHL (**28**) umzuwandeln (Abb. 50). Damit konnte erstmals in dem seit 2006 bestehenden Verbundprojekt eine AHL-abbauende Oxidoreduktase, die die seltenste Enzymklasse der QQ-Proteine darstellt, publiziert werden.<sup>[40]</sup>



**Abbildung 50: Enzymatische AHL-Umsatz des Genprodukts BpiB09**

Die geringen Umsatzraten des Genprodukts BpiB09 ließen die Vermutung zu, dass ein zusätzlicher Faktor für die deutlich verminderte Biofilmbildung in *P. aeruginosa* mit dem Insert *bpiB09* ursächlich sein könnte. Denkbar wäre, dass dieses Gen suppressiven Einfluss auf den gesamten Fettsäurestoffwechsel des Expressionswirts nimmt und somit auch dessen Wachstum beeinflusst wird.

Niedermolekulare Verbindungen als Biofilminhibitoren

Durch die Nutzung von verschiedenen Testsystemen der Arbeitskreise *W. Streit* und *R. Schmitz-Streit*, mit denen sich QQ- und QSI-abhängige Effekte beschreiben lassen, konnten vier der 27 bereitgestellten Naturstoffe als potentiell biofilminhibierend charakterisiert werden (Abb. 51).

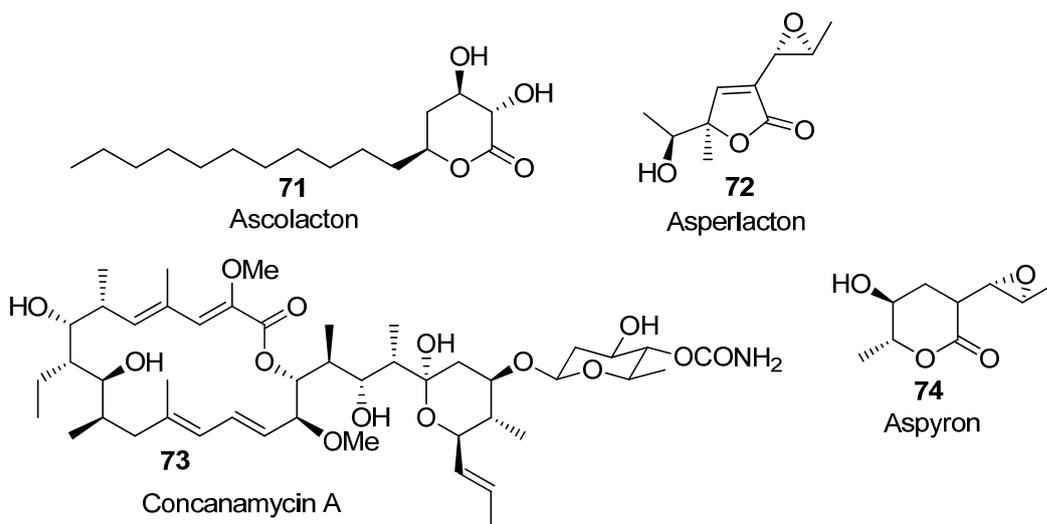
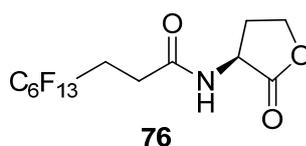


Abbildung 51: Substanzen mit potentiell biofilminhibierender Wirkung

In einem nächsten Schritt sollen zeitnah weitere Untersuchungen bezüglich der  $IC_{50}$ -Werte und Versuche zum genauen molekularen Verständnis der Inhibitorwirkung, auch unter Verwendung der Testsysteme des Arbeitskreises *K. Jung*, durchgeführt werden. Mittels dieser Ergebnisse könnten Rückschlüsse über Struktur-Wirk-Beziehungen zwischen der Biofilmbildung und den eingesetzten aktiven Naturstoffen gezogen werden, die zu wirkungsvollen und einfach herzustellenden niedermolekularen Biofilminhibitoren führen könnten.

Zudem konnte für das synthetisch dargestellte perfluorierte AI-1-Derivat **76** eine agonistische Wirkung festgestellt werden.

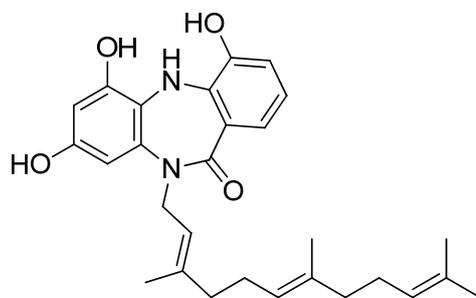




Wildtyp wurde dieses Verfahren nicht angewendet. Die Kombination aus den in der HPLC-ESI-MS entwickelten Methoden und einem überexprimierenden Wildtyp könnte die finale Strukturaufklärung des Autoinducers im *Janthinobacterium* HH01 ermöglichen.

### 6.2 Bioaktive Naturstoffe aus marinen Actinomyceten

Die Entdeckung neuer Naturstoffe und die Kenntnis ihrer biologischen Eigenschaften ist ein wichtiger Bestandteil in der Entwicklung neuer pharmazeutischer Wirkstoffe. In diesem Projekt wurden vier neue Gattungen von marinen Actinomyceten-Stämmen auf neue und biologisch aktive Verbindungen hin untersucht. Die Screening-Strategie umfasste unter anderem die Variation der Kultivierungsbedingungen und die aktivitätsbasierte Fraktionierung von Kulturextrakten. Zentrales Element der Analytik war die effiziente Dereplikation von nicht zielführenden Verbindungen mittels einer HPLC-ESI-MS und einer mehr als 1000 Substanzen umfassenden UV-Datenbank.<sup>[19]</sup> Im Verlauf dieses chemischen Screenings konnte das Diazepinomicin (**118**) in *Micromonospora* RV115 nachgewiesen werden und als Reinstoff dargestellt werden (2.2 mg/L).



**118**

Für diese Verbindung konnten im weiteren Verlauf neue antioxidative und proteaseinhibierende Eigenschaften nachgewiesen und publiziert werden.<sup>[68]</sup> Bereits ab Konzentrationen von 2  $\mu\text{M}$  Diazepinomicin (**118**) konnte eine deutliche Verminderung des oxidativen Stresses in Testreihen mit unterschiedlichen Zelllinien und DNA verzeichnet werden. Die Aufnahme des  $\text{IC}_{50}$ -Wertes für den Stamm *Trypanosoma brucei brucei* TC221 erfolgte nach 48 h und 72 h. Daraus

ergab sich ein Wert von 13.57  $\mu\text{M}$  bzw. 17.06  $\mu\text{M}$  für das Diazepinomicin (**118**). Des Weiteren wurde auch die Wirkung des Diazepinomicins (**118**) für die parasitäre Protease Rhodesain näher untersucht. Für die Dissoziationskonstante  $K_i$  der Inhibierung von Rhodesain konnte ein Wert von 98  $\mu\text{M}$  bestimmt werden. Für die humane Protease Cathepsin L ergab sich ein  $\text{IC}_{50}$ -Wert von 72.4  $\mu\text{M}$  bei einer Substratkonzentration von 6.25  $\mu\text{M}$ .<sup>[68]</sup>

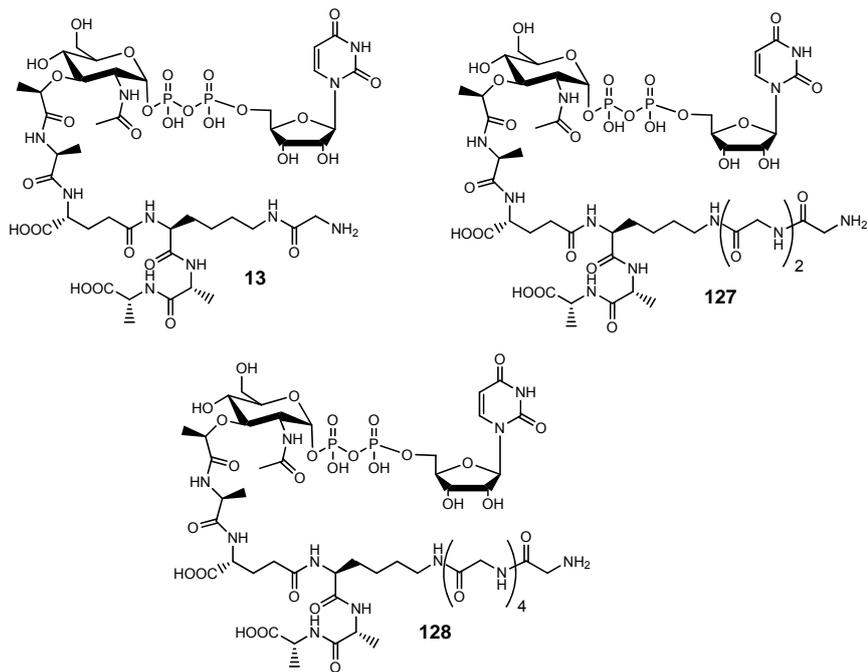
Durch Fraktionierung von Extrakten des Stammes *Rothia* RV13 konnte ein Signal mit der Masse  $m = 373$  als potentiell zielführender Sekundärmetabolit isoliert werden. Aufgrund der geringen Mengen von weniger als 0.3 mg konnte jedoch keine NMR-spektroskopische Strukturaufklärung erfolgen. Da die isolierte Verbindung keine biologische Aktivität aufwies, wurde auf eine Darstellung größerer Mengen als Reinstoff verzichtet. Zukünftig könnte wahrscheinlich eine vorhergehende Nährmedienoptimierung bei diesem Stamm zu einer erhöhten Anreicherung von Sekundärmetaboliten führen und somit dessen chemische und biologische Analytik erleichtern.

### 6.3 Semisynthetische Entwicklungen an Zellwandvorläufern

Das detaillierte Verständnis der Funktion von PBSs kann zu neuen Konzepten in der antibiotischen Wirkstoffforschung führen. Für die Aufklärung solcher Funktionalitäten wurden in diesem Projekt drei benötigte Glycinderivate **13**, **127** und **128** erfolgreich semisynthetisch dargestellt. Neben dem kommerziell erhältlichen Fmoc-Gly (**11**) und Fmoc-Gly<sub>3</sub> konnte das Fmoc-Gly<sub>5</sub> (**122**) synthetisch hergestellt werden. Die Kupplung der Fmoc-geschützten Aminosäuren an ein UDP-MurNAc-Hexapeptid zum Glycin-Derivate **13**, **127** und **128** im mg-Maßstab erfolgte über Aktivierung der Carbonsäure des Glycins und anschließender selektiver Veresterung am Lysinrest des Hexapeptids. Ein zentraler Aspekt war die Optimierung der Lösungsmittelzusammensetzung. Mittels einer Erhöhung des Wasseranteils auf 50 % nach vorhergehender Aktivierung der Carbonsäure war es möglich, längere schwer lösliche Peptide wie z.B. das Fmoc-Gly<sub>5</sub> (**122**) an das UDP-MurNAc-Hexapeptid (**12**) in guten Umsatzraten zu koppeln.

## Zusammenfassung der Ergebnisse

---



Mittels einer MS<sup>3</sup>-Analytik konnte ein Verfahren zur chemisch eindeutigen Charakterisierung der bereitgestellten Produkte etabliert werden. Diese ermöglichte es, die Peptidbindung am Lysinrest zweifelsfrei zu belegen.

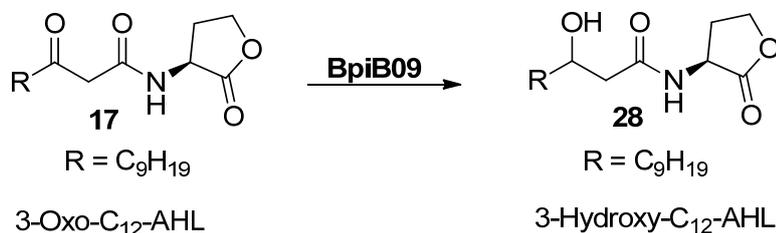
Die hier dargestellten Substrate wurden vom Arbeitskreis *U. Bertsche* enzymatisch in den Zellwandvorläufer Lipid II umgewandelt und mit aufgereinigten PBPs inkubiert. Das erhaltene Makromolekül wurde im Anschluss gespalten und mittels HPLC vermessen. Aufgrund charakteristischer Signale von Bruchstücken konnten Rückschlüsse über die Funktion der einzelnen PBPs gezogen werden.<sup>[74]</sup> Die abschließenden Ergebnisse aus diesen Versuchen lagen zu diesem Zeitpunkt allerdings noch nicht vor.

## 7 Summary of the results

### 7.1 New biofilm inhibition strategies

#### Anti-biofilm strategies by means of metagenome experiments

In this paper, HPLC-ESI-MS-based methods were established, making it possible to detect, inter alia, small enzymatic conversions of QQ proteins. This goal was achieved by sensitive mass spectrometers, the use of MS<sup>2</sup> spectra in order to exclude negative predictive values (NPV), and cooperative optimization of the sample preparation between the science group and the cooperation partner. With the help of these methods, the gene product BpiB09 was extracted as an oxidoreductase that could be isolated through a screening of 8,000 metagenome clones carried out by the working group *W. Streit*. Mass spectrometry showed that BpiB09 was able to convert the 3-Oxo-C<sub>12</sub>-AHL (**17**) into the 3-Hydroxy-C<sub>12</sub>-AHL (**28**) (cf. figure 52). This was the first time that the cooperative project, founded in 2006, could publish an AHL-decomposing oxidoreductase, representing the rarest enzyme group of QQ proteins.<sup>[40]</sup>

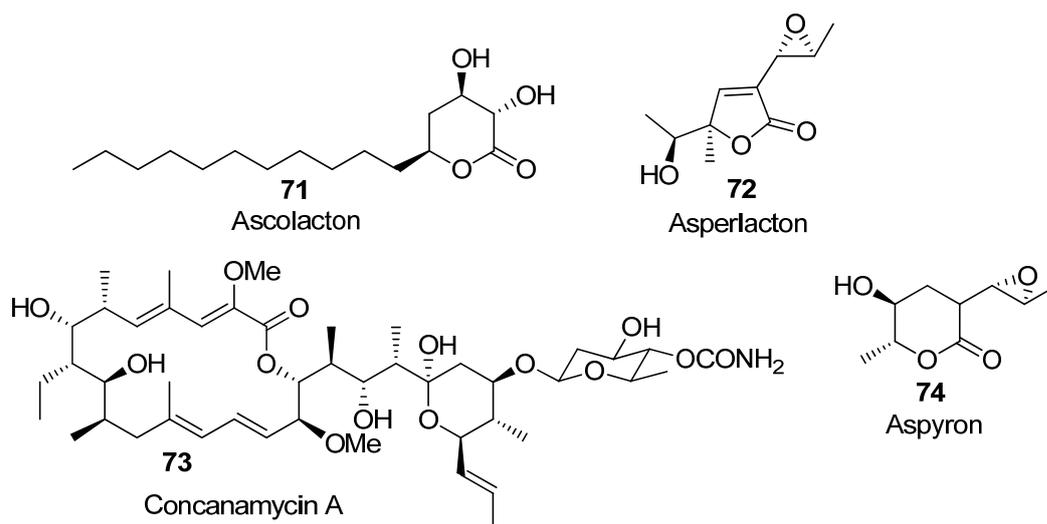


**Abbildung 52: Enzymatic AHL conversion of the gene product BpiB09**

Considering the low conversion rates of the gene product BpiB09, it can be assumed that an additional factor may be responsible for the significantly reduced formation of biofilms in *P. aeruginosa* with the insertion BpiB09. It is conceivable that this gene has a suppressive effect on the whole fatty acid metabolism of the expression host and, thus, affects its growth.

Small molecules as biofilminhibitors

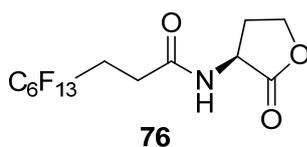
The use of various testing systems proving QQ and QSI-related effects enabled the working group *W. Streit* and *R. Schmitz-Streit* to characterize 4 out of 27 natural products as potentially biofilm-inhibiting (cf. figure 53).



**Abbildung 53: Substances with a potential biofilm-inhibiting effect**

Further examinations of the  $IC_{50}$  figure will be conducted soon as well as experiments on the exact molecular comprehension of the inhibition effect, including the use of testing systems of the working group *K. Jung*. With the help of these results, one may draw conclusions concerning the structure-activity relationship between the formation of biofilms and the employed active natural products, which may lead to a creation of small molecular biofilm-inhibitors that are both effective and easy to produce.

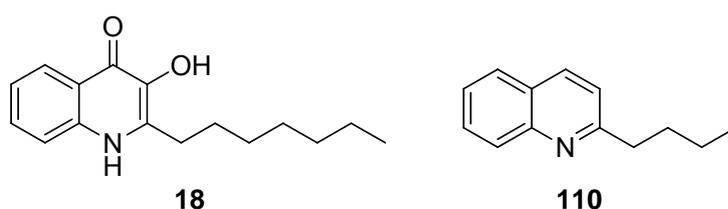
Furthermore, an agonistic effect was detected for the synthetic perfluorinated AI-1 derivative **76**.



### Identification of the autoinducer synthase from *Janthinobacterium* HH01

Currently, the examination of new autoinducer synthases is a popular area of research. At this point of the cooperative project, the expression pattern of the gene product 2353 from *Janthinobacterium* HH01 was chemically analyzed. This gene showed a striking similarity to the *Vibrio-cholerae*-autoinducer-synthase CqsA or the *Legionella-pneumophila*-autoinducer synthase LqsA. For this purpose, HPLC-UV-ESI-MS methods were developed to allow an efficient screening of known and unknown autoinducers. Key elements of the analysis included the development of time-saving transcripts when using high-resolution mass spectrometry as well as a comparison with UV- or MS-databases.<sup>[19] [21]</sup> By comparing samples containing the said synthase gene with the accompanying negative controls, a quick and detailed overview of the expression pattern of the gene product could be gained.

In the targeted part of the screening, no signals corresponding to the known CAI-1, LAI-1 or their biosynthetic precursors were found in the samples. In the untargeted part, however, compounds indicating that indole or quinoline might be the structural key element were found in the extracts of a heterologous expression host. On the other hand, the 2-butylquinoline (**110**), which showed a striking similarity to the PQS (**18**) from *P. aeruginosa*, could be excluded as a possible structure.

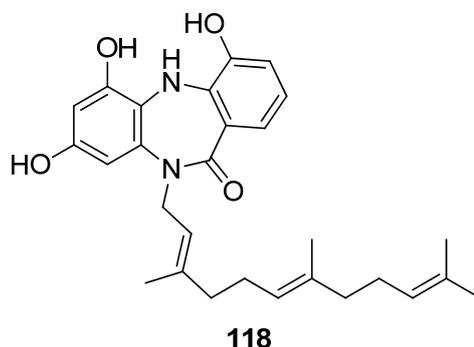


Nevertheless, further optimized samples will be analyzed with the help of the introduced methods in the near future. Suitable samples would be samples of the wild type in which the synthase gene has been cloned several times in order to trigger an overexpression of the autoinducer. This procedure was not applied to the samples analyzed so far. The combination of the methods developed within

the HPLC-ESI-MS and an over-expressed wild type might reveal the full structure of the autoinducer in *Janthinobacterium* HH01.

## 7.2 Bioactive natural substances from marine Actinomycetes

The discovery of new natural products and the knowledge of their biological characteristics is an important part of the development of new pharmaceutical agents. In this project, four new genera of marine Actinomycetes were examined for new and biologically active compounds. The screening method comprised, inter alia, varied cultivation conditions and an activity-based fractionation of the extracts. The key elements of the analysis comprised an efficient dereplication of useless compounds with the help of an HPLC-ESI-MS and an UV-database with more than 1,000 substances.<sup>[19]</sup> In the course of this screening, the Diazepinomicin (**118**) could be detected in *Micromonospora* RV115 and isolated in its pure form (2.2 mg/mL).



New antioxidant and protease-inhibiting characteristics of this compound could be detected and published later.<sup>[68]</sup> Diazepinomicin concentrations of 2  $\mu\text{m}$  (or more) already showed a sharp decrease of the oxidative stress in a series of tests with various cell lines and DNA. The intake of the  $\text{IC}_{50}$  value for the *Trypanosoma brucei brucei* TC221 strain took place after 48 hours and 72 hours, which resulted in Diazepinomicin concentrations of 13.57  $\mu\text{m}$  and 17.06  $\mu\text{m}$  respectively. Moreover, the effect of Diazepinomicin on the parasitic protease Rhodesain was also examined more closely. A value of 98  $\mu\text{m}$  was detected for the dissociation constant  $K_i$  of the inhibition of Rhodesain. As far as the humane

protease Cathepsin is concerned, an  $IC_{50}$  value of 72.4  $\mu\text{m}$  was detected with a substrate concentration of 6.25  $\mu\text{m}$ .

By fractioning extracts of the *Rothia* RV13 strain, a signal with the mass  $m = 373$  could be isolated as a potentially useful secondary metabolite. Owing to the small amounts of less than 0.3 mg, however, an NMR-spectroscopical structural elucidation could not take place. As the isolated compound did not show any biological activity, no large amounts of the pure substance were prepared. A preceding optimization of the strain's culture media might result in an increased enrichment of secondary metabolites and, thus, simplify its chemical and biological analysis.

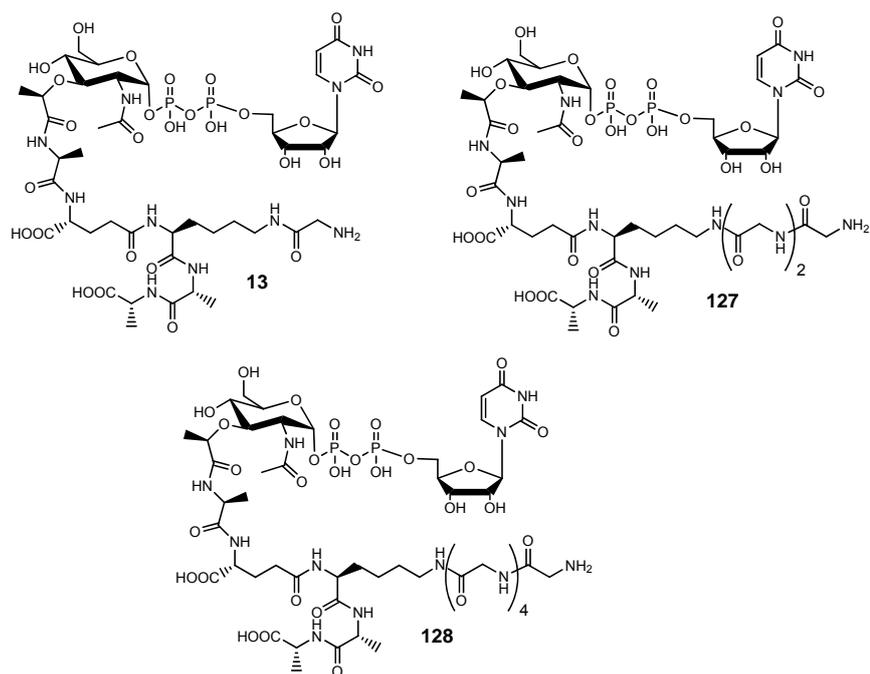
### 7.3 Semisynthetic developments on cell wall precursors

A profound comprehension of the function of PBSs may reveal new concepts in antibiotic agent research. To clarify such functionalities, three glycine derivatives **13**, **127** and **128** were successfully prepared. Apart from Fmoc-Gly (**11**) and Fmoc-Gly<sub>3</sub>, which are commercially available, Fmoc-Gly<sub>5</sub> (**122**) was also produced synthetically. The coupling of Fmoc-protected to UDP-MurNAc-hexapeptide-glycine-derivatives **13**, **127** and **128** on a milligram scale was achieved by activating the glycine's carboxylic acid and a subsequent selective esterification on the hexapeptide's remaining lysine. The optimization of the solvent's ingredients was a central aspect. By increasing the water proportion by 50 %, it was possible to couple longer, difficultly soluble peptides such as Fmoc-Gly<sub>5</sub> (**122**) to the UDP-MurNAc-hexapeptide (**12**) in good yields.

With the help of MS<sup>3</sup> analytics, a method for the chemically unambiguous characterization of the provided products could be established. This method made it possible to prove the peptide bond at the remaining lysine conclusively.

## Summary of the results

---



The substrates prepared here were enzymatically converted into the cell wall precursor lipid II and incubated with purified PBPs by the working group *U. Bertsche*. The resulting macromolecule was subsequently cleaved and measured with HPLC. Characteristic signals of fragments allowed conclusions to be drawn about the function of individual PBPs. However, the final results of these experiments were not yet available at that point in time.

## B Experimenteller Teil

### 1 Allgemeines

#### 1.1 Instrumentelle Analytik

##### **Massenspektrometer:**

ESI-MS: *Bruker* Esquire 3000+ Trap LC/MS-System mit ESI Interphase.

ESI-MS: *Agilent* LC/MS UltraTrap System XCT 6330 mit ESI Interphase.

HR-ESI-MS: *Bruker* Apex II (FTICR) mit ESI Interphase

Ausgewertet wurde mit der Software *Bruker* DataAnalysis 4.0.

##### **<sup>1</sup>H-NMR-Spektren:**

*Bruker* Avance (400 MHz) und *Bruker* AMX 600 (600 MHz). Die Auswertung der Spektren wurde durchgeführt mit MestReNova 6.2.1–7569 von *Mestrelab Research*. Chemische Verschiebungen  $\delta$  [ppm] sind in relativ zum jeweiligen Lösungsmittel als internen Standard, Kopplungskonstanten  $J$  [Hz].

Abkürzungen: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, dd = Dublett vom Dublett, m = Multiplett.

Alle <sup>1</sup>H-NMR-Spektren wurden näherungsweise als Spektren erster Ordnung interpretiert.

##### **<sup>13</sup>C-NMR-Spektren:**

*Bruker* Avance (100.6 MHz) und *Bruker* AMX 600 (150.9 MHz). Die Auswertung der Spektren wurde durchgeführt mit MestReNova 6.2.1–7569 von *Mestrelab Research*. Chemische Verschiebungen  $\delta$  [ppm] relativ zum jeweiligen Lösungsmittel als internen Standard angegeben.

**2D-NMR-Spektren:**

<b><math>^1\text{H}</math>, <math>^1\text{H}</math>-COSY</b>	$^1\text{H}$ , $^1\text{H}$ - <u>C</u> orrelated- <u>S</u> pectroscopy
<b>HSQC</b>	<u>H</u> eteronuclear <u>S</u> ingle <u>Q</u> uantum <u>C</u> oherence
<b>HMBC</b>	<u>H</u> eteronuclear <u>M</u> ultiple <u>B</u> ond <u>C</u> orrelation

**1.2 Chromatographische Methoden**

**Lösungsmittel:**

Die in der Chromatographie verwendeten Lösungsmittel wurden vor Verwendung destilliert. Für die HPLC und LCMS wurden analysenreine Lösungsmittel (*Acros Organics, Roth, VWR*) sowie Reinstwasser (*Millipore Milli-Q Reference A<sup>+</sup>*) verwendet. Für die semipräparative und präparative HPLC wurden diese 10 min im Ultraschallbad entgast.

**Adsorberharz:**

*Amberlite XAD-16 (Rohm & Haas).*

**Festphasenextraktion:**

*Biotage Isolute C18 100 mg/1 mL*

Die SPE-Kartuschen wurden vor Verwendung mit 2 mL MeOH gewaschen und dann mit 1 mL des jeweiligen Lösungsmittels auf Startbedingungen konditioniert.

**Mitteldruckchromatographie (MPLC):**

Varian 971-FP Flash Purification mit Varian 385-LC Evaporative Light Scattering Detector, Fertigsäulen von *Agilent*. Die Programme sind im entsprechenden Abschnitt des experimentellen Teils aufgeführt.

## High Performance Liquid Chromatographie (HPLC)

### Analytische/semipräparative HPLC:

#### HPLC A:

Pumpe: Jasco PU-2080plus, Mischkammer: Jasco LG-2080-02, Entgaser: Jasco DG-2080-53, PDA-Detektor: Jasco MD-2010plus, ELSD-Detektor: Varian 385-LC, AD-Wandler: Jasco LC-Net II/ADC, Säulenofen: Jasco CO-2065 (Messungen bei 25 °C durchgeführt). Autosampler: Jasco AS-2055plus mit Rheodyne 100 µL Auftragsschleife (analytisch).

### Präparative HPLC:

#### HPLC B:

Thermo Scientific Ultimate 3000, Pumpe: HPG 3200 BX, Knauer Online Degasser, Autosampler: WPS-3000SL mit 2.5 mL Auftragsschleife, manuelles Rheodyne Bioline Probenauftragsventil mit 1.0 mL Auftragsschleife, DAD-Detektor: DAD-3000RS mit semipräparativer Messzelle, Ultimate 3000 Fraction Collector AFC-3000, SR 3000 Solvent Rack, Software: Chromeleon® Version 6.80.

### Analytische HPLC mit ESI-MS-Kopplung:

#### HPLC C:

*Agilent* 1100 series; Massendetektor: *Bruker Daltonik*, Esquire 3000+ (Ionenfalle, Reaktandgas: He); Software: HPLC: *Agilent* ChemStation for LC, Version: Rev.A.08.03 (847); ESI-MS: *Bruker Daltonik* esquireControl Version 5.0 Build No. 65.0; *Bruker Daltonics* esquire 5.0 Build 169; DataAnalysis Version 3.0 (Build 49).

#### HPLC D:

*Agilent* 1200 series mit Diodenarraydetektor (DAD), 10 mm Standard Flusszelle; Massendetektor (ESI-MS): *Agilent* LC/MSD Ultra Trap System XCT 6330. Software: *Agilent* LC/MSD ChemStation Rev. B.01.03; *Bruker Daltonik*, 6300 Series Trap Control Version 6.1.

### HPLC E:

Thermo Scientific Ultimate 3000 mit DAD, analytischer Messzelle;  
Massendetektor: *Bruker* Maxis 4G. Software: Chromeleon® Version 6.80.;  
DataAnalysis Version 4.0

### **HPLC-Säulen:**

#### **Analytisch:**

Säule A: *Grom* Supersphere-100 RP-18, endcapped, 100 x 2 mm, 4 µm, mit  
Vorsäule, Flussrate: 0.3 mL/min.

Säule B: *Dr. Maisch* Nucleosil-100 C18, 100 x 2 mm, 3 µm, mit Vorsäule,  
Flussrate: 0.4 mL/min.

#### **Semipräparativ:**

Säule C: *Jasco* Nucleosil-100 C18, 250 x 8 mm, 5 µm, mit Vorsäule, Flussrate:  
2.7 mL/min.

#### **Präparativ:**

Säule D: *Macherey-Nagel* Nucleodur-100 C18ec, 250 x 20 mm, 5 µm, mit  
Vorsäule, Flussrate: 16 mL/min.

Säule E: *Dr. Maisch* Kromasil-100 C18, 250 x 20 mm, 7 µm, mit Vorsäule,  
Flussrate: 20 mL/min.

### **HPLC-Programme:**

#### **Analytisch:**

Programm A: Lösungsmittel A: Wasser mit 0.05 % Ameisensäure, Lösungsmittel  
B: Acetonitril mit 0.05 % Ameisensäure; Gradient: von 20 % auf 100 % B in 20  
min, 10 min bei 100 % B, von 100 % auf 20 % B in 2 min, 8 min bei 20 % B.

Programm B: Lösungsmittel A: Wasser mit 0.1 % Ameisensäure, Lösungsmittel B: Acetonitril mit 0.06 % Ameisensäure; Gradient: von 0 % auf 100 % B in 20 min, 3 min bei 100 % B, Posttime: 5 min.

Programm C: Lösungsmittel A: Wasser mit 0.1 % Ameisensäure, Lösungsmittel B: Acetonitril mit 0.06 % Ameisensäure; Gradient: von 30 % auf 100 % B in 15 min, 2 min bei 100 % B, Posttime: 5 min.

Programm D: Lösungsmittel A: Wasser mit 0.1 % Ameisensäure, Lösungsmittel B: Methanol mit 0.06 % Ameisensäure; Gradient: von 0 % auf 30 % B in 30 min, in 2 min auf 100 % B, 3 min bei 100 % B, Posttime: 5 min.

### **Semipräparativ/präparativ:**

Die Programme sind im entsprechenden Abschnitt des experimentellen Teils aufgeführt.

### **HPLC-Probenvorbereitung:**

Die Proben wurden zentrifugiert (13200 U/min, 2 min) und der Überstand in Probengläschen mit Inlet überführt. Sofern nicht anders angegeben wurde für Extrakte und komplexe Mischungen eine Konzentration von 5 mg/mL eingestellt. Für Reinsubstanzen betrug die Konzentration 0.5 mg/mL.

Für derivatisierte Proben wurde das gleiche Volumen des Derivatisierungsreagenz mit einer Konzentration von 15 mg/mL in Acetonitril zugegeben und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert.

### 1.3 Mikrobiologische Arbeiten

Alle mikrobiologischen Methoden wurden unter den üblichen sterilen Bedingungen durchgeführt.<sup>[79]</sup>

#### 1.3.1 Nährmedien

Für alle Nährmedien, sofern nicht anders angegeben, wurde Leitungswasser verwendet. Zur Herstellung von ASW wurde dest. Wasser verwendet.

#### ASW:

NaCl 23.5 g/L, MgCl<sub>2</sub> • 6 H<sub>2</sub>O 10.6 g/L, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3.91 g/L, CaCl<sub>2</sub> • 2 H<sub>2</sub>O 1.10 g/L, KCl 0.66 g/L, NaHCO<sub>3</sub> 0.19 g/L, KBr 0.096 g/L, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> g/L, SrCl<sub>2</sub> 0.024 g/L, NaF 0.030 g/L.

Die Nährmedienbestandteile wurden von folgenden Firmen bezogen:

Bestandteile	Firma
Malzextrakt, Pepton	<i>Fluka</i>
D-Glucose, Mannitol	<i>Riedel-de Haën</i>
Stärke, Glycerin	<i>Roth</i>
Cornsteep Powder	<i>Marcor</i>
Hefeextrakt, Fleischextrakt, Casein-Pepton	<i>Oxoid</i>
Sojamehl (entfettet)	<i>Hensel GmbH</i>
Haferkleie	<i>Pur Aliment</i>

Der pH-Wert wurde mit 1 N Natronlauge und 1 N Salzsäure eingestellt. Für die Herstellung von Agarplatten wurden 20 g/L Agar hinzugefügt. Alle Nährmedien

wurden durch Autoklavieren (feuchte Hitze, 121 °C, 1 bar Überdruck, 20 min) sterilisiert.

### **ISP-2:**

Hefeextrakt 4 g/L, Malzextrakt 8 g/L, Glucose 4 g/L.

### **HT:**

Dextrin 10 g/L, Casein-Pepton 2 g/L, Hefeextrakt 1 g/L, Malzextrakt 1 g/L,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  2 g/L.

### **JR-11:**

Stärke 20 g/L, Glucose 10 g/L, Sojamehl (entfettet) 15 g/L, Casein-Pepton 5 g/L,  $\text{CaCO}_3$  3 g/L.

### **Hafer:**

Haferkleie 20 g/L,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  3 g/L, Fe(III)-Citrat 1 g/L,  $\text{MnSO}_4$  0.2 g/L,  $\text{ZnCl}_2$  0.1 g/L,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$  0.025 g/L,  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$  0.02 g/L,  $\text{CoCl}_2$  0.004 g/L,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  0.01 g/L, pH = 7.2.

### **MA1 (Maurer *et. al.*)<sup>[80]</sup>:**

Mannitol 40 g/L, Asparagin 2.5 g/L,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  2 g/L, NaCl 1 g/L,  $\text{MgSO}_4$  1 g/L,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  3 g/L,  $\text{CaCl}_2$  0.4 g/L,  $\text{FeSO}_4$  0.02 g/L,  $\text{ZnSO}_4$  0.01 g/L, pH = 6.2.

### **M1:**

Stärke 10 g/L, Hefeextrakt 4 g/L, Casein-Pepton 2 g/L.

### **Bennett's broth**

Stärke 10 g/L, Fleischextrakt 0.77 g/L, Hefeextrakt 1 g/L, N-Z-Amin 2 g/L, pH = 7.3 in 50 % ASW.

## **1.3.2 Stammhaltung**

### **Glycerineinlagerung:**

Nach Kultivierung für 48 h in Flüssigkultur wurden ca. 0.8–1 mL einer dicht angewachsenen Kultur des jeweiligen Mikroorganismus in ein steriles 2 mL

Kryoröhrchen pipettiert und dieselbe Menge einer sterilen Glycerinmischung (20 % Glycerin, 10 % Saccharose, 70 % H<sub>2</sub>O) hinzugefügt. Die Suspension wurde gut durchmischt und anschließend bei -80 °C gelagert.

### 1.3.3 Geräte

Autoklav: *Thermo SCIENTIFIC* Varioklav 135S

Sterile Werkbank: *Thermo SCIENTIFIC* MSC-ADVANTAGE

Fraktionssammler: *Pharmacia Biotech* RediFrac

Inkubationsschüttelschränke: *B. Braun* BS-1 und BS-4,  
Inkubationsschüttelschrank *B. Braun* Certomat HK mit Rundschüttler *B. Braun*  
Certomat U, Rundschüttler *B. Braun* Certomat RM

Küvetten: *Helma* Präzisions-Küvetten, 10 mm Schichtdicke

pH-Meter: *WTW* mit *WTW* pH-Elektrode SenTix 41

Reinstwasseranlage: *Milipore* Mili-Q Reference A+

Thermomixer: *Eppendorf* Thermomixer compact

Ultraschallbad: *Bandelin* Sonorex RK 1065

UV-Lampe: *Benda* Labor- und UV-Strahler

UV-Vis-Spectrophotometer: *Varian* Cary 50

Zentrifugen: *Eppendorf* Centrifuge 5415D, *Sigma* Labartory Centrifuge 4K15

## 2 Bioaktive Naturstoffe aus marinen Actinomyceten

### 2.1 Stammhaltung und Vorkulturen

Für die Stammhaltung bzw. Vorkulturen wurden 300 mL Erlenmeyerkolben mit Schikane mit 100 mL ISP-2-Medium befüllt, mit Schaumstoffkappen verschlossen und autoklaviert. Nach Inokulation mit jeweils 800 µL der entsprechenden Glycerineinlagerung, wurde für 120 h bei 28 °C und 180 U/min kultiviert. Die Flüssigkultur wurde im Anschluss für das Inokulieren einer Hauptkultur oder eine Glycerineinlagerung verwendet (Kap. 1.3.2).

### 2.2 Aufbau des chemisch biologischen Screenings

#### 2.2.1 Variation der Kultivierungsbedingungen

Im Rahmen dieses Screenings wurden die Art der Fermentation und die Zusammensetzung des Mediums variiert. Für jedes verwendete Medium wurde eine Leerkontrolle in Form eines nicht beimpften Kulturmediums erstellt, um Medienbestandteile von Metaboliten unterscheiden zu können.

Folgende Fermentationsansätze wurden durchgeführt (Tab. 6):

Fermentierter Stamm	Verwendetes Medium	Art der Kultivierung
RV77 / RV89 / RV115	ISP-2 in ASW	Flüssigkultur
RV77	HT	Flüssigkultur
RV89 / RV115	HT in ASW	Flüssigkultur
RV89	JR-11	Flüssigkultur
RV77 / RV115	JR-11 in ASW	Flüssigkultur
RV77 / RV89 / RV115	Hafer in ASW	Flüssigkultur
RV77 / RV89 / RV115	M1 in ASW	Flüssigkultur
RV77 / RV89 / RV115	Bennett's broth	Flüssigkultur

RV77 / RV89 / RV115	HT in ASW	Festphasenkultur
RV77 / RV89 / RV115	MA1	Festphasenkultur
RV77 / RV89 / RV115	M1 in ASW	Festphasenkultur

**Tabelle 6: Durchgeführte Fermentationsansätze**

### **Flüssigkultur:**

Für die Fermentation im Flüssigmedium wurden Vorkulturen wie beschrieben angesetzt (Kap. 2.1). Die Fermentation der Hauptkultur erfolgte in 1 L Erlenmeyerkolben mit Schikane und Schaumstoffkappen. Diese wurden mit 200 mL des jeweiligen Mediums befüllt, autoklaviert und mit jeweils 8 mL der entsprechenden Vorkultur inokuliert. Die Fermentationsdauer betrug 9 d bei 28 °C und 180 U/min. Als Ansatzgröße wurde ein Volumen von 400 mL pro Fermentation gewählt.

### **Festphasenkultivierung:**

Die Kultivierung auf der Festphase erfolgte auf Agarplatten des entsprechenden Mediums. Diese wurden mit jeweils 100 µL einer Glycerineinlagerung beimpft und für 12 d bei 28 °C inkubiert. Die Ansatzgröße betrug ca. 20 Agarplatten pro Fermentation.

## **2.2.2 Aufarbeitung**

### **Flüssigkulturen:**

Durch Zentrifugation (6000 U/min, 10 min, 4 °C) wurde das Kulturfiltrat vom Mycel getrennt und separat aufgearbeitet:

#### Kulturfiltrat:

Mit 1 N Salzsäure wurde ein pH-Wert von pH = 5.0 unter kräftigem Rühren eingestellt. Anschließend wurde das Kulturfiltrat dreimal mit Ethylacetat extrahiert

(Volumina Ethylacetat:Kulturfiltrat 1,5:1), über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Vakuum entfernt.

### Mycel:

Das Mycel wurde dreimal mit Methanol/Aceton 7:3 extrahiert (Volumina Aceton/Methanol:Kulturbrühe 1:2) und jeweils für 10 min im Ultraschallbad aufgeschlossen. Nach Filtration wurde das Lösungsmittel der vereinigten organischen Extrakte am Vakuum entfernt, Wasser zugesetzt (Volumina Wasser:Kulturbrühe 1:5), der pH-Wert mit 1 N Salzsäure auf pH = 5.0 eingestellt, dreimal mit Ethylacetat extrahiert (Volumina Ethylacetat:Kulturfiltrat 1,5:1), über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Vakuum entfernt.

### **Festphasenkultivierung:**

Die bewachsenen Agarplatten wurden dispergiert, lyophilisiert, dreimal mit Methanol/Aceton 7:3 extrahiert (Volumina Aceton/Methanol:Gesamtansatz 1:2), jeweils 10 min im Ultraschallbad aufgeschlossen, filtriert und das Lösungsmittel am Vakuum entfernt. Es wurde Wasser zugesetzt (Volumina Wasser:Gesamtansatz 1:5), der pH-Wert mit 1 N Salzsäure auf pH = 5.0 eingestellt, dreimal mit Ethylacetat extrahiert (Volumina Ethylacetat:Wasser 1,5:1), über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Vakuum entfernt.

### **2.2.3 UV- datenbankgestützte HPLC-ESI-MS-Analytik<sup>[19]</sup>**

Um eine reproduzierbare Datenaufnahme zu gewährleisten, wurden alle zu untersuchenden Extrakte auf eine Konzentration von 5 mg/mL in Methanol eingestellt. Die Proben wurden zentrifugiert (13200 U/min, 2 min), der Überstand in Probengläschen mit Inlet überführt und mittels HPLC-ESI-MS vermessen (HPLC D, Säule B, Programm B). Nach Vergleich mit der Leerkontrolle wurden Medienbestandteile ausgeschlossen und die noch vorhandenen Signale mit einer UV-Datenbank verglichen. Konnte der entsprechenden Datenbankstruktur eine passende Massenspur zugeordnet werden, wurde diese als korrekt

angenommen (UV-Übereinstimmung > 98 %, passendes Massenspektrum und Retentionszeit).

### **2.2.4 Fermentationsansatz *Rhodococcus* RV77 im JR-11-Medium**

Der Fermentation der Hauptkultur des Stammes *Rhodococcus* RV89 erfolgte im JR-11-Medium und einer Ansatzgröße von 2.5 L. Die Fermentation und die Erstellung des Ethylacetat-Extraktes des Kulturfiltrats erfolgten nach den Bedingungen, wie sie in Kapitel 2.2.1 und 2.2.2 beschrieben wurden. Das Mycel wurde verworfen. Zur weiteren Fraktionierung des Ethylacetat-Extraktes wurde eine Normalphasen-Chromatographie (MPLC, Cyclohexan (A)/ Ethylacetat (B), Si25 40 g, Gradient: 15 min bei 0 % B, in 5 min auf 20 % B, 15 min bei 20 % B, in 5 min auf 40 % B, 20 min bei 40 % B, in 5 min auf 60 % B, 15 min bei 60 % B, in 5 min auf 80 % B, 15 min bei 80 % B, in 5 min auf 100 % B, 25 min bei 100 % B) durchgeführt.

## **2.3 Diazepinomicin (118) aus *Micromonospora* RV115**

### **2.3.1 Kultivierung**

Die Fermentation der Hauptkultur des Stammes *Micromonospora* RV115 erfolgte in Bennett's broth und einer Ansatzgröße von 5 L. Hierzu wurden 1 L Erlenmeyerkolben mit Schikane und Schaumstoffkappe mit 200 mL Medium befüllt, autoklaviert, 5 g steriles XAD-16 pro Erlenmeyerkolben zugegeben und mit je 8 mL einer Vorkultur (Kap. 2.1) inokuliert. Die Fermentationsdauer betrug 9 d bei 28 °C und 180 U/min.

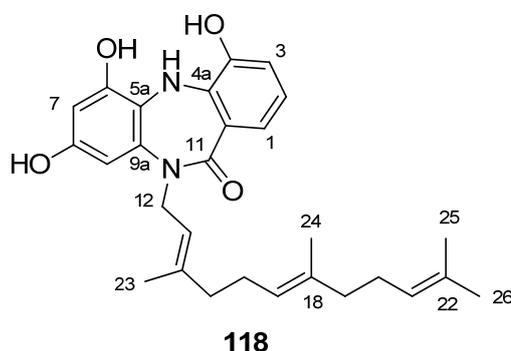
### **2.3.2 Aufarbeitung**

Die Kulturbrühe wurde zentrifugiert (9000 U/min, 10 min, 4 °C) und das Mycel zusammen mit dem XAD-16 dreimal mit 500 mL Methanol/Aceton 7:3 extrahiert und jeweils für 10 min im Ultraschallbad aufgeschlossen. Nach Filtration wurde

das Lösungsmittel der vereinigten organischen Extrakte am Vakuum entfernt, 250 mL Wasser zugesetzt, der pH-Wert mit 1 N Salzsäure auf pH = 5.0 eingestellt, dreimal mit 350 mL Ethylacetat extrahiert, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Vakuum entfernt. Nach weiterer Aufreinigung über Säulenchromatographie an der Normalphase (MPLC, Cyclohexan (A)/ Ethylacetat (B), Si25 40 g, Gradient: 15 min bei 0 % B, in 5 min auf 20 % B, 15 min bei 20 % B, in 5 min auf 40 % B, 20 min bei 40 % B) und Umkehrphase (HPLC B, Wasser mit 0,05 % Ameisensäure (A)/Methanol mit 0,05 % Ameisensäure (B), Säule D, Gradient: in 20 min von 80 % B auf 100 % B) wurden 11.1 mg Diazepinomicin (**118**) isoliert (2.2 mg/L).

### 2.3.3 Charakterisierung

#### Diazepinomicin (**118**)



**C<sub>28</sub>H<sub>34</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>** (462.2519)

Farbloser Feststoff

**HR-ESI-MS:**  $m/z = 485.24095$  [M+Na]<sup>+</sup>

**LC-ESI-MS:**  $m/z = 463.3.2$  [M+H]<sup>+</sup>, 461.2 [M-H]<sup>-</sup>

**<sup>1</sup>H-NMR** (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta = 1.55$  (s, 3H, 25-H<sub>3</sub>), 1.59 (s, 3H, 24-H<sub>3</sub>), 1.64 (s, 3H, 26-H<sub>3</sub>), 1.72 (s, 3H, 23-H<sub>3</sub>), 1.94 (m, 2H, 15-H<sub>2</sub>), 2.01 (m, 2H, 16-H<sub>2</sub>), 2.03

(m, 2H, 20-H<sub>2</sub>), 2.09 (m, 2H, 19-H<sub>2</sub>), 4.53 (d,  $J = 6.1$  Hz, 2H, 12-H<sub>2</sub>), 5.08 (m, 1H, 17-H), 5.08 (m, 1H, 21-H), 5.36 (t,  $J = 5.9$  Hz, 1H, 13-H), 6.22 (s, 1H, 7-H), 6.26 (s, 1H, 9-H), 6.75 (dd,  $J = 7.8$  Hz, 1H, 2-H), 6.84 (d,  $J = 7.5$  Hz, 1H, 3-H), 7.16 (d,  $J = 7.8$  Hz, 1H, 1-H).

<sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta = 16.1$  (C-24), 16.6 (C-23), 17.7 (C-25), 25.9 (C-26), 27.3 (C-20), 27.8 (C-16), 40.6 (C-19), 40.8 (C-15), 49.5 (C-12), 101.0 (C-7), 102.2 (C-9), 117.9 (C-3), 122.1 (C-2), 122.3 (C-13), 123.5 (C-1), 125.2 (C-17), 125.5 (C-21), 126.3 (C-11a), 127.6 (C-5a), 132.0 (C-22), 136.2 (C-18), 139.5 (C-14), 143.2 (C-4a), 147.1 (C-4), 149.3 (C-6), 154.4 (C-8), 171.3 (C-11).

## 2.4 Der Stamm *Rothia* RV13

### 2.4.1 Fraktionierung der Extrakte

Durch den Arbeitskreis *U. Hentschel* (Universität Würzburg) wurden ein Ethylacetat-Extrakt und ein Methanol-Aceton-Extrakt eines 25 L-Fermentationsansatzes in ISP-2 von *Rothia* RV13 zur Verfügung gestellt.

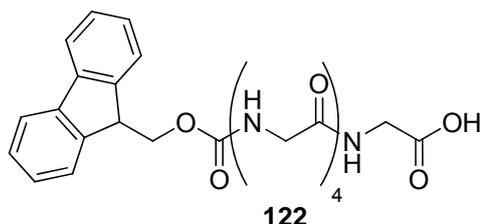
Dem Methanol-Aceton-Extrakt wurde zunächst 250 mL Wasser zugesetzt, mit 1 N Salzsäure Wert von pH = 5.0 eingestellt, dreimal mit 350 mL Ethylacetat extrahiert, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Vakuum entfernt. Die wässrige Phase wurde verworfen. Im Anschluss wurde eine Fraktionierung der Ethylacetat-Extrakte durch Normalphasenchromatographie durchgeführt (MPLC, Cyclohexan (A)/ Ethylacetat (B), Si25 40 g, Gradient: 15 min bei 0 % B, in 5 min auf 20 % B, 15 min bei 20 % B, in 5 min auf 40 % B, 20 min bei 40 % B, in 5 min auf 60 % B, 15 min bei 60 % B, in 5 min auf 80 % B, 15 min bei 80 % B, in 5 min auf 100 % B, 25 min bei 100 % B). Die darauffolgende Fraktionierung erfolgte durch Umkehrphasen-Chromatographie (HPLC B, Wasser mit 0,05 % Ameisensäure (A)/Acetonitril mit 0,05 % Ameisensäure (B), Säule E, Gradient: in 20 min von 20 % B auf 100 % B, 10 min auf 100 % B).

#### **2.4.2 Isolierung des Massensignals $m/z = 373$**

Die finale Aufreinigung des Massensignals  $m/z = 373$  erfolgte durch Umkehrphasen-Chromatographie (HPLC B, Wasser mit 0,06 % Ameisensäure (A)/Acetonitril mit 0,1 % Ameisensäure (B), Säule C, Gradient: in 20 min von 25 % B auf 50 % B). Es konnten 0.3 mg isoliert werden.

### 3 Semisynthetische Entwicklungen an Zellwandvorläufern

#### 3.1 Synthese des Fmoc-Gly<sub>5</sub> (**122**)



##### 3.1.1 Erster synthetischer Ansatz

Gly<sub>5</sub> (25.0 mg, 82  $\mu$ mol, 1.00 Äq.) wurde in einer Lösung aus Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1 mL, 1 M) bei 80 °C gelöst. Fmoc-Cl (**120**) (21.3 mg, 82  $\mu$ mol, 1.00 Äq.) in Dioxan (0.2 mL) wurde tropfenweise zugegeben und für 2 h gerührt. Im Anschluss wurde Wasser hinzugefügt (20 mL), mit Diethylether (2 x 20 mL) gewaschen und mit Ethylacetat (3 x 20 mL) extrahiert. Nach Entfernen des Lösungsmittels am Vakuum wurde die Zielverbindung (**122**) verunreinigt als weißer Feststoff erhalten (5.02 mg, 9.6  $\mu$ mol, 12 %).

##### 3.1.2 Zweiter synthetischer Ansatz

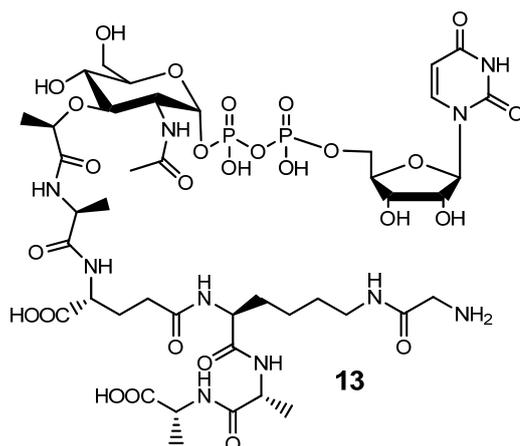
Gly<sub>5</sub> (100 mg, 330  $\mu$ mol, 1.00 Äq.) wurde in Wasser (50 mL) bei 80 °C gelöst. Die Lösung wurde auf 4 °C gekühlt und NaHCO<sub>3</sub> (70 mg) zugegeben. Anschließend wurde Fmoc-OSu (**124**) (111 mg, 330  $\mu$ mol, 1.00 Äq.) in Acetonitril (50 mL) tropfenweise hinzugefügt und das Reaktionsgemisch für 1 h bei 4 °C gerührt. Nach Auftauen und 3 h Rühren bei Raumtemperatur wurde das Lösungsmittel am Vakuum entfernt. Die Zielverbindung (**122**) wurde nach Umkehrphasenchromatographie (MPLC, H<sub>2</sub>O (A)/ MeOH (B), SF15 30 g, Gradient: 6 min bei 0 % B, in 2 min auf 20 % B, 5 min bei 20 % B, in 2 min auf

80 % B, 7 min bei 80 % B) als weißer Feststoff erhalten (145 mg, 276  $\mu\text{mol}$ , 84 %).

**LC-ESI-MS:**  $m/z = 526.2$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ ,  $524.2$   $[\text{M}-\text{H}]^-$

### 3.2 Synthese der Glycin-UDP-MurNAc-Hexapeptid-Glycin-Derivate

#### 3.2.1 UDP-MurNAc-L-Ala- $\gamma$ -D-Glu-L-Lys( $\epsilon$ -Gly)-D-Ala-D-Ala (**13**)

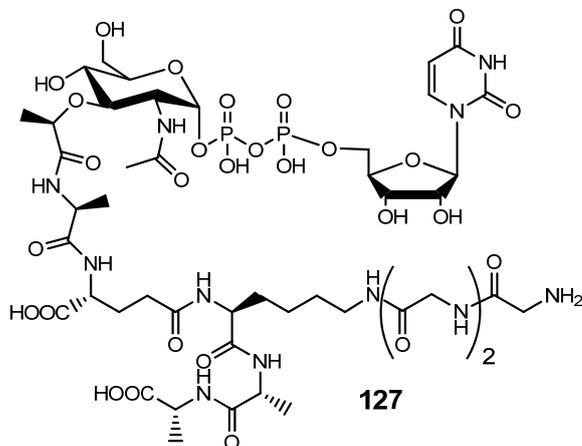


1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid Hydrochlorid (9.16 mg, 48  $\mu$ mol), *N*-hydroxysuccinimide (3.10 mg, 27  $\mu$ mol) und *N*-(ethylsulfite)-morpholin (0.82 mg) wurden in Acetonitril (1 mL) unter Rühren gelöst. Nach 5 min wurde Fmoc-Gly (**11**) (3.10 mg, 10  $\mu$ mol) und Wasser (0.8 mL) zugesetzt. Die Mischung wurde für 20 min bei RT gerührt. Im Anschluss wurde UDP-MurNAc-L-Ala- $\gamma$ -D-Glu-L-Lys-D-Ala-D-Ala (**12**) (1.00 mg, 87 nmol) in NaHCO<sub>3</sub> (100  $\mu$ L, 500 mM, pH = 10) hinzugefügt, für 3 h gerührt und die Reaktion anschließend mit Ethanolamin (88  $\mu$ L) gequencht. Nach 20 min wurde Piperidin (88  $\mu$ L) und nach weiteren 30 min Wasser (16 mL) zugesetzt. Danach wurde die Suspension über einen Nitrocellulose Spritzenfilter (0.20  $\mu$ m Porengröße) filtriert und lyophilisiert. Das so erhaltene Rohprodukt von (**13**) wurde bei -20 °C zur weiteren Verwendung gelagert.

**LC-ESI-MS:**  $m/z = 1207.5$  [M+H]<sup>+</sup>, 1205.5 [M-H]<sup>-</sup>

**ESI-MS<sup>3</sup>:** (negative Ionen)  $m/z = 1205,5 \rightarrow 882,4 \rightarrow 599,3$

### 3.2.2 UDP-MurNAc-L-Ala- $\gamma$ -D-Glu-L-Lys( $\epsilon$ -Gly<sub>3</sub>)-D-Ala-D-Ala (127)

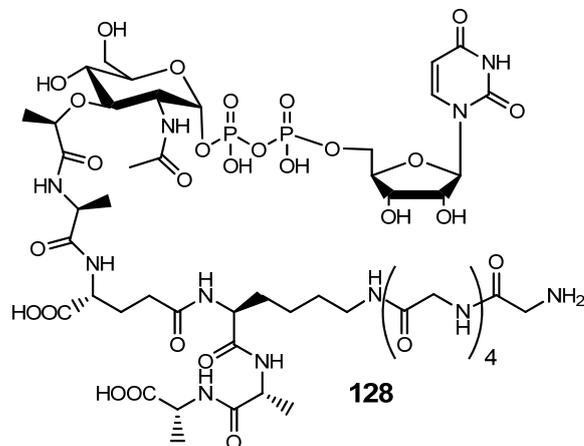


Die Synthese erfolgte unter den Bedingungen wie in 3.2.1 beschrieben. Statt des Fmoc-Gly (**11**) wurde Fmoc-Gly<sub>3</sub> (4.30 mg, 10  $\mu$ mol) eingesetzt. Das so erhaltene Rohprodukt von (**127**) wurde bei -20 °C zur weiteren Verwendung gelagert.

**LC-ESI-MS:**  $m/z = 1321.5 [M+H]^+$ ,  $1319.5 [M-H]^-$

**ESI-MS<sup>3</sup>:** (negative Ionen)  $m/z = 1319.5 \rightarrow 995.4 \rightarrow 712.3$

### 3.2.3 UDP-MurNAc-L-Ala- $\gamma$ -D-Glu-L-Lys( $\epsilon$ -Gly<sub>5</sub>)-D-Ala-D-Ala (**128**)



Die Synthese erfolgte unter den Bedingungen wie in 3.2.1 beschrieben. Statt des Fmoc-Gly wurde Fmoc-Gly<sub>5</sub> (**122**) (5.45 mg, 10  $\mu$ mol) eingesetzt. Das so erhaltene Rohprodukt von (**128**) wurde bei -20 °C zur weiteren Verwendung gelagert.

**LC-ESI-MS:**  $m/z$  = 1436.5 [M+H]<sup>+</sup>, 1434.5 [M-H]<sup>-</sup>

**ESI-MS<sup>3</sup>:** (negative Ionen)  $m/z$  = 1434,5  $\rightarrow$  1109.5  $\rightarrow$  826.3

## C Literatur

- [1] A. Fleming, *Br. J. Exp. Pathol.* **1929**, *10*, 226-236.
- [2] A. L. Demain, *Med Res Rev* **2009**, *29*, 821-842.
- [3] J. F. Fisher, S. O. Meroueh, S. Mobashery, *Chem Rev* **2005**, *105*, 395-424.
- [4] A. L. Demain, S. Sanchez, *J Antibiot (Tokyo)* **2009**, *62*, 5-16.
- [5] R. E. W. Hancock, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2007**, *6*.
- [6] M. L. Katz, L. V. Mueller, M. Polyakov, S. F. Weinstock, *Nat Biotechnol* **2006**, *24*, 1529-1531.
- [7] N. Balaban, G. Dell'Acqua, *Scientist* **2005**, *19*, 42-43.
- [8] S. Donadio, S. Maffioli, P. Monciardini, M. Sosio, D. Jabes, *J Antibiot (Tokyo)* **2010**, *63*, 423-430.
- [9] B. Bister, D. Bischoff, M. Strobele, J. Riedlinger, A. Reicke, F. Wolter, A. T. Bull, H. Zahner, H. P. Fiedler, R. D. Sussmuth, *Angew Chem Int Ed Engl* **2004**, *43*, 2574-2576.
- [10] S. Keller, G. Nicholson, C. Drahl, E. Sorensen, H. P. Fiedler, R. D. Sussmuth, *J Antibiot (Tokyo)* **2007**, *60*, 391-394.
- [11] H. Steinmetz, H. Irschik, B. Kunze, H. Reichenbach, G. Hofle, R. Jansen, *Chemistry* **2007**, *13*, 5822-5832.
- [12] T. Weber, C. Rausch, P. Lopez, I. Hoof, V. Gaykova, D. H. Huson, W. Wohlleben, *J Biotechnol* **2009**, *140*, 13-17.
- [13] J. B. McAlpine, B. O. Bachmann, M. Pirae, S. Tremblay, A. M. Alarco, E. Zazopoulos, C. M. Farnet, *J Nat Prod* **2005**, *68*, 493-496.
- [14] A. H. Banskota, J. B. McAlpine, D. Sorensen, A. Ibrahim, M. Aouidate, M. Pirae, A. M. Alarco, C. M. Farnet, E. Zazopoulos, *J Antibiot (Tokyo)* **2006**, *59*, 533-542.
- [15] H. Gross, V. O. Stockwell, M. D. Henkels, B. Nowak-Thompson, J. E. Loper, W. H. Gerwick, *Chem Biol* **2007**, *14*, 53-63.
- [16] K. F. Nielsen, M. Mansson, C. Rank, J. C. Frisvad, T. O. Larsen, *J Nat Prod* **2011**, *74*, 2338-2348.
- [17] T. O. Larsen, J. Smedsgaard, K. F. Nielsen, M. E. Hansen, J. C. Frisvad, *Nat Prod Rep* **2005**, *22*, 672-695.
- [18] C. Hohmann, K. Schneider, C. Bruntner, E. Irran, G. Nicholson, A. T. Bull, A. L. Jones, R. Brown, J. E. Stach, M. Goodfellow, W. Beil, M. Kramer, J. F. Imhoff, R. D. Sussmuth, H. P. Fiedler, *J Antibiot (Tokyo)* **2009**, *62*, 99-104.

- [19] H. P. Fiedler, *Nat. Prod. Lett.* **1993**, *2*, 119-128.
- [20] P. S. Sommer, R. C. Almeida, K. Schneider, W. Beil, R. D. Sussmuth, H. P. Fiedler, *J Antibiot (Tokyo)* **2008**, *61*, 683-686.
- [21] S. Wolf, S. Schmidt, M. Muller-Hannemann, S. Neumann, *BMC Bioinformatics* **2010**, *11*, 148.
- [22] M. Lambert, D. Staerk, S. H. Hansen, M. Sairafianpour, J. W. Jaroszewski, *J Nat Prod* **2005**, *68*, 1500-1509.
- [23] U. R. Abdelmohsen, S. M. Pimentel-Elardo, A. Hanora, M. Radwan, S. H. Abou-El-Ela, S. Ahmed, U. Hentschel, *Mar Drugs* **2010**, *8*, 399-412.
- [24] S. E. Coetser, T. E. Cloete, *Crit Rev Microbiol* **2005**, *31*, 213-232.
- [25] R. J. Worthington, J. J. Richards, C. Melander, *Org Biomol Chem* **2012**, *10*, 7457-7474.
- [26] H. Rohde, C. Burdelski, K. Bartscht, M. Hussain, F. Buck, M. A. Horstkotte, J. K. Knobloch, C. Heilmann, M. Herrmann, D. Mack, *Mol Microbiol* **2005**, *55*, 1883-1895.
- [27] K. Okuno, K. Tuchiya, T. Ano, M. Shoda, *Journal of Fermentation and Bioengineering* **1993**, *75*, 103-106.
- [28] W. G. Pitt, M. O. McBride, J. K. Lunceford, R. J. Roper, R. D. Sagers, *Antimicrob Agents Chemother* **1994**, *38*, 2577-2582.
- [29] M. H. Turakhia, K. E. Cooksey, W. G. Characklis, *Appl Environ Microbiol* **1983**, *46*, 1236-1238.
- [30] V. Sperandio, A. G. Torres, B. Jarvis, J. P. Nataro, J. B. Kaper, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2003**, *100*, 8951-8956.
- [31] K. H. Nealson, J. W. Hastings, *Microbiol Rev* **1979**, *43*, 496-518.
- [32] C. M. Waters, B. L. Bassler, *Annu Rev Cell Dev Biol* **2005**, *21*, 319-346.
- [33] D. A. Higgins, M. E. Pomianek, C. M. Kraml, R. K. Taylor, M. F. Semmelhack, B. L. Bassler, *Nature* **2007**, *450*, 883-886.
- [34] S. Uroz, Y. Dessaux, P. Oger, *Chembiochem* **2009**, *10*, 205-216.
- [35] T. B. Rasmussen, M. Givskov, *Microbiology* **2006**, *152*, 895-904.
- [36] M. H. Kim, W. C. Choi, H. O. Kang, J. S. Lee, B. S. Kang, K. J. Kim, Z. S. Derewenda, T. K. Oh, C. H. Lee, J. K. Lee, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2005**, *102*, 17606-17611.
- [37] Y. H. Dong, L. H. Wang, J. L. Xu, H. B. Zhang, X. F. Zhang, L. H. Zhang, *Nature* **2001**, *411*, 813-817.
- [38] J. R. Leadbetter, E. P. Greenberg, *J Bacteriol* **2000**, *182*, 6921-6926.
- [39] S. Uroz, S. R. Chhabra, M. Camara, P. Williams, P. Oger, Y. Dessaux, *Microbiology* **2005**, *151*, 3313-3322.
- [40] P. Bijtenhoorn, H. Mayerhofer, J. Muller-Dieckmann, C. Utpatel, C. Schipper, C. Hornung, M. Szesny, S. Grond, A. Thurmer, E.

- Brzuszkiewicz, R. Daniel, K. Dierking, H. Schulenburg, W. R. Streit, *PLoS One* **2011**, *6*, e26278.
- [41] J. Stengel, University of Tübingen (Tübingen), **2011**.
- [42] Y. Katsuyama, Y. Ohnishi, S. Horinouchi, *Chembiochem* **2010**, *11*, 2034-2041.
- [43] J. Clayden, N. Greeves, S. Warren, P. Wothers, *Organic Chemistry* **2001**.
- [44] aD. Ren, J. J. Sims, T. K. Wood, *Lett Appl Microbiol* **2002**, *34*, 293-299;  
bD. Ren, J. J. Sims, T. K. Wood, *Environ Microbiol* **2001**, *3*, 731-736.
- [45] M. I. Konaklieva, B. J. Plotkin, *Mini Rev Med Chem* **2006**, *6*, 817-825.
- [46] G. D. Geske, R. J. Wezeman, A. P. Siegel, H. E. Blackwell, *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127*, 12762-12763.
- [47] R. Jansen, H. Irschik, V. Huch, D. Schummer, H. Steinmetz, M. Bock, T. Schmidt, A. Kirschning, R. Muller, *European Journal of Organic Chemistry* **2010**, 1284-1289.
- [48] M. Reck, K. Rutz, B. Kunze, J. Tomasch, S. K. Surapaneni, S. Schulz, I. Wagner-Dobler, *J Bacteriol* **2011**, *193*, 5692-5706.
- [49] B. W. Purse, J. Rebek, Jr., *Chem Commun (Camb)* **2005**, 722-724.
- [50] D. M. Lemal, *J Org Chem* **2004**, *69*, 1-11.
- [51] F. E. Zilly, J. P. Acevedo, W. Augustyniak, A. Deege, U. W. Hausig, M. T. Reetz, *Angew Chem Int Ed Engl* **2011**, *50*, 2720-2724.
- [52] C. Hornung, A. Poehlein, F. S. Haack, M. Schmidt, K. Dierking, A. Pohlen, H. Schulenburg, M. Blokesch, L. Plener, K. Jung, A. Bonge, I. Krohn-Molt, C. Utpatel, G. Timmermann, E. Spieck, A. Pommerening-Roser, E. Bode, H. B. Bode, R. Daniel, C. Schmeisser, W. R. Streit, *PLoS One* **2013**, *8*, e55045.
- [53] T. Spirig, A. Tiaden, P. Kiefer, C. Buchrieser, J. A. Vorholt, H. Hilbi, *J Biol Chem* **2008**, *283*, 18113-18123.
- [54] A. Tiaden, T. Spirig, S. S. Weber, H. Bruggemann, R. Bosshard, C. Buchrieser, H. Hilbi, *Cell Microbiol* **2007**, *9*, 2903-2920.
- [55] R. C. Kelly, M. E. Bolitho, D. A. Higgins, W. Lu, W. L. Ng, P. D. Jeffrey, J. D. Rabinowitz, M. F. Semmelhack, F. M. Hughson, B. L. Bassler, *Nat Chem Biol* **2009**, *5*, 891-895.
- [56] A. Tiaden, H. Hilbi, *Sensors (Basel)* **2012**, *12*, 2899-2919.
- [57] E. C. Pesci, J. B. Milbank, J. P. Pearson, S. McKnight, A. S. Kende, E. P. Greenberg, B. H. Iglewski, *Proc Natl Acad Sci U S A* **1999**, *96*, 11229-11234.
- [58] D. J. Newman, G. M. Cragg, K. M. Snader, *J Nat Prod* **2003**, *66*, 1022-1037.
- [59] P. R. Jensen, T. J. Mincer, P. G. Williams, W. Fenical, *Antonie Van Leeuwenhoek* **2005**, *87*, 43-48.

- [60] P. R. Jensen, R. Dwight, W. Fenical, *Appl Environ Microbiol* **1991**, *57*, 1102-1108.
- [61] T. J. Mincer, P. R. Jensen, C. A. Kauffman, W. Fenical, *Appl Environ Microbiol* **2002**, *68*, 5005-5011.
- [62] T. K. Kim, A. K. Hewavitharana, P. N. Shaw, J. A. Fuerst, *Appl Environ Microbiol* **2006**, *72*, 2118-2125.
- [63] R. H. Feling, G. O. Buchanan, T. J. Mincer, C. A. Kauffman, P. R. Jensen, W. Fenical, *Angew Chem Int Ed Engl* **2003**, *42*, 355-357.
- [64] B. T. Murphy, T. Narender, C. A. Kauffman, M. Woolery, P. R. Jensen, W. Fenical, *Aust. J. Chem.* **2010**, *63*, 929-934.
- [65] H. B. Bode, B. Bethe, R. Hofs, A. Zeeck, *Chembiochem* **2002**, *3*, 619-627.
- [66] C. Campas, *Drugs of the Future* **2009**, *34*, 349-351.
- [67] K. K. Wong, *Recent Pat Anticancer Drug Discov* **2009**, *4*, 28-35.
- [68] U. R. Abdelmohsen, M. Szesny, E. M. Othman, T. Schirmeister, S. Grond, H. Stopper, U. Hentschel, *Mar Drugs* **2012**, *10*, 2208-2221.
- [69] R. D. Charan, G. Schlingmann, J. Janso, V. Bernan, X. Feng, G. T. Carter, *J Nat Prod* **2004**, *67*, 1431-1433.
- [70] W. Vollmer, U. Bertsche, *Biochim Biophys Acta* **2008**, *1778*, 1714-1734.
- [71] O. Schneewind, A. Fowler, K. F. Faull, *Science* **1995**, *268*, 103-106.
- [72] G. De Pascale, A. J. Lloyd, J. A. Schouten, A. M. Gilbey, D. I. Roper, C. G. Dowson, T. D. Bugg, *J Biol Chem* **2008**, *283*, 34571-34579.
- [73] T. Schneider, M. M. Senn, B. Berger-Bachi, A. Tossi, H. G. Sahl, I. Wiedemann, *Mol Microbiol* **2004**, *53*, 675-685.
- [74] U. Bertsche, E. Breukink, T. Kast, W. Vollmer, *J Biol Chem* **2005**, *280*, 38096-38101.
- [75] L. A. Carpino, G. Y. Han, *J. Org. Chem* **1972**, *37*, 3404-3409.
- [76] V. Cardona, I. Eberle, S. Barthelemy, J. Beythien, B. Doerner, P. Schneeberger, J. Keyte, P. D. White, *International Journal of Peptide Research and Therapeutics* **2008**, *14*, 285-292.
- [77] S. Sandhu, J. A. Schouten, J. Thompson, M. Davis, T. D. Bugg, *Analyst* **2012**, *137*, 1130-1136.
- [78] G. Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, Academic Press, New York, **1996**.
- [79] H. G. Schlegel, *Allgemeine Mikrobiologie. 41 Tabellen*, Thieme, Stuttgart, **1992**.
- [80] K. H. Maurer, F. Pfeiffer, H. Zehender, D. Mecke, *J Bacteriol* **1983**, *153*, 930-936.

## **D Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die durch ihr Mitwirken diese Arbeit erst ermöglicht haben. Dieser Dank gilt zuerst Prof. Dr. Stephanie Grond für die interessante Aufgabenstellung, die großartige Unterstützung während dieser Arbeit und der Möglichkeit eigene Ideen mit der nötigen Freiheit umzusetzen. Vielen Dank!

Besonderer Dank gebührt auch Andreas Kulik für die kompetente Hilfe während der massenspektrometrischen Problemstellungen. Ohne dich wären viele Fragen unbeantwortet geblieben!

Sehr großer Dank gebührt auch meiner gesamten Familie und speziell meinen Eltern. Ohne euch würde ich jetzt nicht diese Danksagung schreiben!

Aus dem Arbeitskreis bedanke ich mich bei Konni, Philipp, Doro, Nadja und Zufl für das fleißige Korrekturlesen dieser Arbeit. Ihnen sowie Martina, Verena, Jan, Christian, Jochen und Torben danke ich für die tolle Arbeitsatmosphäre. Mit euch verging die Zeit wie im Flug!

Bei Malte möchte ich mich ganz herzlich für die Hilfe bei der englischsprachigen Übersetzung und für das Korrekturlesen bedanken.

Ebenfalls bedanke ich mich bei Prof. Dr. Streit und seinen Mitarbeitern, insbesondere Patrick, Christian, Frederike und Ines, für die spannenden analytischen Fragestellungen und die Nutzung der biologischen Testsysteme. Für die Nutzung der unterschiedlichen Testsysteme gilt mein Dank auch Prof. Dr. Schmitz-Streit und speziell Nancy Weiland-Bräuer.

Prof. Dr. Hentschel und Usama danke ich ganz herzlich für die gute und erfolgreiche Zusammenarbeit.

Bei Dr. Bertsche und Stephanie bedanke ich mich für Bereitstellung der Edukte und die gute Zusammenarbeit.

Außerdem möchte ich mich bei den Mitarbeitern der NMR-Spektroskopie und der Werkstätten für die schnelle und unkomplizierte Hilfe bedanken.