

ENTWICKLUNG BIOTECHNOLOGISCHER VERFAHREN
ZUR SYSTEMATISCHEN EVALUIERUNG VON
BIOLOGISCHEN AKTIVITÄTEN AUS MYXOBAKTERIEN
UND ZUR GLEICHZEITIGEN CHARAKTERISIERUNG DER
JEWEILIGEN METABOLITE

Dissertation

zur Erlangung des Grades

des Doktors der Naturwissenschaften

der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät III

Chemie, Pharmazie, Bio- und Werkstoffwissenschaften

der Universität des Saarlandes

von

Stephan Hüttel

Saarbrücken

2013

Tag des Kolloquiums:	24.05.2013
Prüfungsvorsitz:	Prof. Dr. Volkhard Helms
Prüfer:	Prof. Dr. Rolf Müller
	Prof. Dr. Marc Stadler
Akademischer Beisitzer:	Dr. Josef Zapp

INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis.....	III
Abbildungsverzeichnis.....	IV
Tabellenverzeichnis.....	X
Abkürzungsverzeichnis.....	XI
Vorveröffentlichungen	XIII
Publikationen.....	XIII
Patente.....	XIII
Präsentationen.....	XIV
Zusammenfassung.....	XV
Abstract.....	XVI
1 Einleitung	1
1.1 Naturstoffe	1
1.1.1 Historischer Überblick	1
1.1.2 Die Goldene Ära der Naturstoffe	4
1.1.3 Herausforderungen an die moderne Naturstoffforschung	5
1.1.4 Naturstoffe versus kombinatorisch erzeugte Moleküle.....	8
1.2 Myxobakterien als Produzenten neuer Naturstoffe	14
1.3 Bioprozesstechniken für Screening und Produktion neuer Naturstoffe	19
1.4 Entdeckung und Charakterisierung neuer (biologisch aktiver) Naturstoffe.....	25
1.5 Zur vorliegenden Arbeit	28
2 <i>Repeated-Batch</i> -Verfahren für ein Wirkstoffscreening mit Prozessverbesserung	30
2.1 Hintergrund	30
2.2 Ergebnisse und Diskussion	33
2.2.1 Etablierung einer <i>Repeated-Batch</i> -Kultivierung (RBK)	33
2.2.2 Messung von Produktbildungs-Kinetiken und Produktivität	37
2.2.3 Prozessierung von Einzelkultivierungsextrakten.....	47
2.2.4 Charakterisierung neu entdeckter Substanzen.....	55
2.3 Zusammenfassung.....	64
3 Methoden zur Prozessverbesserung mittels Abgasanalyse.....	67
3.1 Hintergrund	67
3.2 Ergebnisse und Diskussion	69
3.2.1 Einfluss von CO ₂ - und O ₂ -Partialdruck auf die Sekundärstoff-produktion	69
3.2.2 Kontrollmethode für CO ₂ und O ₂	73

3.2.3	OCQ und COQ als neue Parameter zur Prozesskontrolle	77
3.3	Zusammenfassung.....	84
4	Entdeckung neuer Chondramide mit verbessertem Wirkungsspektrum.....	85
4.1	Hintergrund	85
4.2	Ergebnisse	88
4.2.1	Bioaktivitätsscreening von Chondromyces sp. SBCm007	88
4.2.2	Charakterisierung 14 neuer Chondramid Derivate.....	91
4.2.3	Biologische Evaluierung der neuen Chondramid Derivate.....	95
4.3	Diskussion.....	99
4.3.1	HCS versus Traditionelles Extrakt-Screening	99
4.3.2	Biosynthese und SAR Studien	100
4.3.3	Vorteile eines kombinierten Optimierungs- und HCS-Ansatzes	104
5	Kontinuierliche Produktionsprozesse.....	106
5.1	Hintergrund	106
5.2	Ergebnisse	108
5.2.1	Testkonstruktionen.....	108
5.2.2	Perfusionsprozess.....	114
5.2.3	Chemostatprozess	116
5.2.4	Zusammenfassung.....	118
6	Strukturen	123
7	Abschließende Diskussion und Ausblick	126
8	Material und Methoden.....	136
8.1	Chemikalien und Lösemittel	136
8.2	Geräte und Einstellungen.....	136
8.2.1	Bioreaktoren.....	136
8.2.2	NMR.....	137
8.2.3	Massenspektrometrie	138
8.3	Verwendete Mikroorganismen.....	139
8.3.1	Myxobakterien.....	139
8.3.2	Andere Mikroorganismen	139
8.4	Kultivierung der Mikroorganismen	140
8.4.1	Medien und Medienzusätze.....	140
8.4.2	Kultivierung der Mikroorganismen	141
8.5	Aufarbeitung von Extrakten	142
8.5.1	Lösemittelextraktion von XAD16 und Biomasse	142
8.5.2	Größenausschluss-Chromatographie.....	142

8.5.3	Kieselgelchromatographie	142
8.5.4	Präparative HPLC	142
8.6	Zellkultur	143
8.6.1	Untersuchungen zur Wachstumshemmung verschiedener Zelllinien	143
8.6.2	HCS-Assay auf Lysosomale Integrität	143
8.6.3	HCS-Assay auf Aktin-Filamente	144
8.6.4	Aktin-Polymerisations-Assay	144
9	Literatur	145
9.1	Einleitung	145
9.2	<i>Repeated-Batch</i> -Verfahren für ein Wirkstoffscreening mit Prozessverbesserung	151
9.3	Methoden zur Prozessverbesserung mittels Abgasanalyse	155
9.4	Entdeckung neuer Chondramide mit verbessertem Wirkungsspektrum	156
9.5	Verbesserung kontinuierlicher Prozesse mittels RBK	158
9.6	Diskussion	159
10	Anhang	161
10.1	Anhang A – Simulationsprogramm RBK	161
10.2	Anhang B – NMR Tabellen Kapitel RBK	162
10.3	Anhang C – NMR Tabellen Kapitel Chondramide	173
10.4	Anhang D – Simulationsprogramme Chemostat und Perfusion	187
10.5	Anhang E - NMR Tabellen Kapitel Strukturen	189
	Danksagung	192

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1.1:	Dreidimensionale Struktur des Morphin- und des Penicillin G Moleküls.....	4
Abbildung 1.2:	Strukturen ausgewählter relevanter Sekundärmetabolite.	5
Abbildung 1.3:	Schematischer Verlauf eines Naturstoff-Screenings mit Angabe benötigter Substanzmengen.....	7
Abbildung 1.4:	Auf ihre Herkunft bezogene Zusammensetzung der 1355 Medikamente die zwischen 1981-2010 zugelassen wurden.....	8
Abbildung 1.5:	Maitotoxin.	11
Abbildung 1.6:	Calicheamicin.	12
Abbildung 1.7:	Naturstoffe, die erfolgreich als Leitstrukturen für verschiedene Inhibitortypen verwendet wurden.....	13
Abbildung 1.8:	Schematischer Aufbau einer Polyketidsynthase vom Typ I.	15
Abbildung 1.9:	Schematischer Aufbau einer Nichtribosomalen Peptidsynthetase.....	17
Abbildung 1.10:	Exemplarische myxobakterielle Sekundärmetabolite.....	19
Abbildung 1.11:	Informationsgewinn gegenüber dem experimentellen Durchsatz.	21
Abbildung 1.12:	Bioreaktortypen.....	24
Abbildung 2.1:	Neue chemische Grundstrukturen aus Myxobakterien.	31
Abbildung 2.2:	Wachstumsphasen einer <i>Batch</i> -Kultur.	34
Abbildung 2.3:	Simulierter Kurvenverlauf von Biomasse- und Produktbildung sowie Substratverbrauch.	37
Abbildung 2.4:	Vergleich des relativen Substantiters zweier Substanzen bei unterschiedlichen Sauerstoffpartialdrücken.....	39
Abbildung 2.5:	Relativer Konzentrationsverlauf der Substanz SH-Cm7-487 während einer Kultivierung mit Überlagerung einer später erzeugten OCQ-Kurve.	40
Abbildung 2.6:	Vergleich der Produkttiter einer Substanz in Standardextrakten von verschiedenen Tagen mit zwischengeschalteter Produktionsänderung.	42
Abbildung 2.7:	Überlagerung von Base-Peak-Chromatogrammen (BPCs) standardisierter Messungen von fünf Chondramiden unter drei verschiedenen Produktionsbedingungen.	43

Abbildung 2.8:	Überlagerung von BPCs standardisierter Messungen von Extrakten nach einmaliger Zugabe einer unbekannt Substanz, die die Überproduktion von SH-Cm7-1839 anregt.....	44
Abbildung 2.9:	Überlagerung der BPCs zweier standardisierter Messungen unter Standard- und Chondramid-Produktionsbedingungen.....	45
Abbildung 2.10:	Überlagerung der BPCs zweier standardisierter Messungen unter Standard- und Hochsauerstoffbedingungen.....	46
Abbildung 2.11:	Isotopen-Cluster-Analyse eines Extraktes, mit den identifizierten Isotopenpattern, welches unter Zusatz von KBr bei der Kultivierung erzeugt wurde.	47
Abbildung 2.12:	IC ₅₀ Kurve des Rohextrakts von SBCm007.....	48
Abbildung 2.13:	UV/Vis und BP-Chromatogramme von vier Chondramiden.	50
Abbildung 2.14:	Auswertung der Aktivitäts-Testung einer Fraktionierung von SBCm007-Rohextrakt, auf <i>Candida albicans</i> , quantifiziert mittels Luziferase Lumineszenz.....	51
Abbildung 2.15:	Relative Peakflächenverhältnisse einer standardisiert vermessenen Lösemittel-Extraktionsreihe von SBCm007. Das Adsorberharz wurde in der angegebenen Reihenfolge mittels verschiedener Lösemittel extrahiert	52
Abbildung 2.16:	Relative Peakflächenverhältnisse standardisiert vermessenener Kieselgelfractionen eines methanolischen Extraktes von SBCm007.....	54
Abbildung 2.17:	Struktur von SH-Cm7-487 und Massenspektren mit Fütterungsexperiment.....	56
Abbildung 2.18:	Struktur von SH-Cm7-503 und Massenspektren mit Fütterungsexperiment.....	58
Abbildung 2.19:	Struktur von SH-Cm7-374 und Massenspektren mit Fütterungsexperiment.....	59
Abbildung 2.20:	Massendifferenzen einer Gruppe Substanzen deren Produktion durch hohe Sauerstoffpartialdrücke induziert wird.	60
Abbildung 2.21:	Strukturen von zwei kleinen Molekülen, die Tyrosin bzw. Tyrosinamid als Baustein enthalten.	61
Abbildung 2.22:	Hypothetische Struktur der Substanz SH-Cm7-394 und überlagerte Protonenspektren von SH-Cm7-374 (rot) und SH-Cm7-394 (blau).	62
Abbildung 2.23:	Strukturen einer kleinen Peptidgruppe, die als gemeinsames Strukturelement eine 4-carboxypeptidisch verknüpfte Glutaminsäure besitzen.	63
Abbildung 3.1:	Hydrogencarbonat und Carbonat Konzentration in Abhängigkeit vom pH.....	69

Abbildung 3.2:	Überlagerung zweier Base-Peak-Chromatogramme von Extrakten des Stammes SBCm007.	71
Abbildung 3.3:	Vergleich der relativen Unterschiede in der Produktivität verursacht durch Veränderungen der Gasphasenzusammensetzung.	72
Abbildung 3.4:	3D- Konturenplot des k_{1a} -Wertes in Abhängigkeit von Rührerdrehzahl und Begasungsrate, sowie k_{1a} -Werte in Abhängigkeit zur Rührerdrehzahl bei Headspace-Begasung.	74
Abbildung 3.5:	Fermentationsgraphen einer <i>Repeatet-Batch</i> -Kultivierung von Stamm SBCm007.	77
Abbildung 3.6:	Berechnete OCQ- und COQ-Kurven.	79
Abbildung 3.7:	Fermentationsgraphen einer <i>S. cerevisiae</i> Kultivierung.	80
Abbildung 3.8:	OCQ Kurve einer <i>Repeated-Batch</i> -Kultivierung von <i>Chondromyces</i> Stamm SBCm002.	81
Abbildung 3.9:	Vergleich der relativen Peakintensitäten zweier Substanzklassen von Extrakten aus einer <i>Batch</i> - und einer RB-Kultivierung.	82
Abbildung 3.10:	<i>Base-Peak</i> -Chromatogramme von Extrakten: Medium Blank, Kultivierung mit Zugabe von XAD (<i>Fed Batch</i>) und Kultivierung mit nachfolgender Inkubation des Überstands mit XAD (<i>Repeated Batch</i>).	83
Abbildung 4.1:	Verschiedene Sekundärstoffe, die von <i>Chondromyces</i> sp. produziert werden.	86
Abbildung 4.2:	Primärscreening von SBCm007.	90
Abbildung 4.3:	Vergleich der Sensitivität eines konventionellen MTT-Assays, mit <i>High-Content-Screening</i> , bei welchem die Aktinpolymerisation quantifiziert wird.	91
Abbildung 4.4:	Charakterisierte neue Chondramid-Derivate aus Extrakten von SBCm007.	94
Abbildung 4.5:	Biologische Evaluierung der neuen Chondramid Derivate.	97
Abbildung 4.6:	Austausch von Chondramid C mit zwei bromierten Analoga im Modell der vorgeschlagenen Bindetasche im F-Aktin.	98
Abbildung 4.7:	Chondramid-Gerüst mit markierten Positionen im Molekül, die eine Aktinbindung positiv beeinflussen sowie Positionen, die ausschlaggebend für eine spezifischere Toxizität auf Krebszellen sind.	103
Abbildung 5.1:	<i>Cell Roller</i> mit Rollerflasche die XAD16 für Metabolitenabreicherung aus Kulturüberständen enthält.	109
Abbildung 5.2:	Aufbau eines Durchlauf- und eines Rücklaufsettlers.	110

Abbildung 5.3:	Anordnung und Funktionalität seriell geschalteter Settler.....	111
Abbildung 5.4:	Aufbau eines Schwerkraftsettlers und Anbringung im Bioreaktor.....	113
Abbildung 5.5:	Homogenisator.....	113
Abbildung 5.6:	Vergleich der relativen Konzentration von Chondramid B im Überstand bei einfacher und doppelter Biomasse.....	114
Abbildung 5.7:	Vergleich eines <i>Base-Peak</i> -Chromatogramms einer <i>Repeated-Batch</i> -Kultivierung mit dem einer Umsetzung dieser Bedingungen als Perfusionskultur mit anschließender XAD-Inkubation.....	115
Abbildung 5.8:	Aufbau einer Chemostatkultivierung mit Zellsetzler und anschließender Abreicherung des Überstandes mit XAD16.....	117
Abbildung 5.9:	Vergleich der Biomasse (C_x) und Substratkonzentration (C_s) einer Chemostat- (Chem) und einer Perfusionssimulation (Per).....	120
Abbildung 5.10:	Parameterplot der in Abb. 5.10 gezeigten Chemostatsimulation.....	121
Abbildung 6.1:	Glycochondrochloren.....	123
Abbildung 6.2:	Peptid mit zytotoxischer Wirkung aus <i>Xenorhabdus</i> sp.....	124
Abbildung 6.3:	Peptid mit zytotoxischer Wirkung aus <i>Xenorhabdus</i> sp.....	124
Abbildung 7.1:	Biosynthetisches Potenzial einiger vollständig sequenzierter prokaryotischer Sekundärstoffproduzenten.....	129
Abbildung 7.2:	Zusammenhang der Produktivität mit dem Prozess und den Kultivierungsbedingungen.....	132
Abbildung 7.3:	Schematische Darstellung des RBK-Screeningprozesses.....	133

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1.1:	Geschätzte Zahlen von bekannten Sekundärmetaboliten.....	3
Tabelle 3.1:	Liste verschiedener Testläufe mit zugehöriger Gasphasen- zusammensetzung und Methode für die pO ₂ -Kontrolle.....	70
Tabelle 4.1:	Liste aller charakterisierten und postulierten Chondramid-Derivate.	93
Tabelle 5.1:	Vor- und Nachteile verschiedener Betriebsmodi von Rührkesselreaktoren.....	106

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Adenylierungsdomäne
ACP	Acylcarrier-Protein
AT	Acetyltransferase
ATP	Adenosintriphosphat
a. U.	<i>Arbitrary units</i> (beliebige Einheit)
BIOS	Biologisch Orientierte Synthese
BPC	<i>Base Peak Chromatogramm</i>
C	(C) Kondensationsdomäne
CER	<i>Carbon-Dioxide Evolution Rate</i> (Kohlendioxidproduktionsrate)
CHO	<i>Chinese Hamster Ovarial</i> (Zelllinie)
CKK	Cholecystokinin
CoA	Co-Enzym A
COQ	CO ₂ /O ₂ -Quotient
COSY	<i>Correlation Spectroscopy</i> (Korrelationsspektroskopie, NMR-Methode)
DAD	Dioden Array Detektor
DH	Dehydrogenase
DOS	Diversitätsorientierte Synthese
E	Epimerisierungsdomäne
eGFP	<i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i> (verbessertes GFP)
EIC	<i>Extracted Ion Chromatogramm</i>
EM	Elongations-Modul
ER	Enoylreductase
ESI	Elektronen Spray Ionisation
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> (Lebens- und Arzneimittelzulassungsbehörde)
GABA	<i>Gamma Aminobutyric Acid</i> (γ-Aminobuttersäure)
GC	Gaschromatographie
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i> (Grün Fluoreszierendes Protein)
GI ₅₀	<i>Growth Inhibition 50</i> (Konzentration bei der 50% Wachstumsinhibierung auftritt)
GSK	Glaxo Smith Kline
HCS	<i>High Content Screening</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple-Bond Correlation Spectroscopy</i> (NMR-Methode)
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatographie</i>
HRMS	<i>High Resolution Mass Spectrometry</i> (Hochauflösende Massenspektrometrie)
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i> (NMR-Methode)
HTS	<i>High Throughput Screening</i> (Hochdurchsatzscreening)
IC ₅₀	<i>Inhibitory Concentration 50</i> (Konzentration bei der eine 50% Inhibierung erreicht wird)
KBr	Kaliumbromid
KS	Ketosynthase
LM	Lade-Modul
MDR	<i>Multi Drug Resistant</i> (Multiresistent)
MS	<i>Mass-Spectrometry</i> (Massenspektrometrie)

MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NM	N-Methyltransferase
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i> (Kernspinresonanz (Spektroskopie))
NOESY	<i>Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy</i> (NMR-Methode)
NRPS	Nicht Ribosomale Peptid Synthetase
OCQ	O ₂ /CO ₂ -Quotient
OD600	Optische Dichte bei 600 nm
OUR	<i>Oxygen Uptake Rate</i> (Sauerstoffverbrauchsrate)
PCA	<i>Principal Component Analysis</i> (Hauptkomponenten-Analyse)
pCO ₂	Partialdruck des gelösten Kohlendioxids
PCP	Peptidyl-Carrier-Protein
PKS	Polyketidsynthase
pO ₂	Partialdruck des gelösten Sauerstoffs
RAMOS	<i>Respiration Activity Monitoring System</i> (Gerätename)
RBK	<i>Repeated-Batch</i> -Kultivierung
ROESY	<i>Rotating Frame Overhauser Effect Spectroscopy</i> (NMR-Methode)
RP	<i>Reverse Phase</i> (Umkehrphase in der Chromatographie)
RQ	Respiratorischer Quotient
SAR	<i>Structure Activity Relation</i> (Struktur-Aktivitätsbeziehungen)
SCOP	<i>Structural Classification of Proteins</i>
SD	<i>Standard Deviation</i> (Standardabweichung)
sp./spp.	<i>Species</i> (Plural spp.)
TE	Thioesterase
TOCSY	<i>Total Correlation Spectroscopy</i> (NMR-Methode)
TOF	<i>Time of Flight</i>
UPLC	<i>Ultra Performance Liquid Chromatographie</i>
XAD	Adsorberharz (Eigennahme)

VORVERÖFFENTLICHUNGEN

Ergebnisse dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät III, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht oder sind derzeit in Vorbereitung zur Veröffentlichung

PUBLIKATIONEN

S. Hüttel, R. Müller: **Methods to optimize myxobacterial fermentations using off-gas analysis.** *Microbial Cell Factories* 2012, **11:59**

Teile dieser Veröffentlichung wurden zur Teilnahme an der „Blue-Competition“, einem von der Firma BlueSens (Gas Sensor GmbH) weltweit ausgeschriebenen Wettbewerb, verwendet. Die Ergebnisse wurden im BlueSens Report 2 auf dem ersten Platz unter folgendem Titel veröffentlicht:

S. Hüttel, R. Müller: **Application of gas analyzers in process automation and production optimization of secondary metabolites from myxobacteria.** BlueSens Report No. 2, **2012.**

A. Plaza, R. Garcia, G. Bifulco, J. P. Martinez, S. Hüttel, F. Sasse, A. Meyerhans, M. Stadler, R. Müller: **Aetheramides A and B, potent HIV-Inhibitory depsipetides from a myxobacterium of the new genus „Aetherobacter“.** *Organic Letters*, **2012** (14), 2854-2857.

S. Hüttel, J. Herrmann, R. Müller: **Discovery of new Chondramide derivatives with Improved Bioactivity in Extracts of *Chondromyces sp.*** CHEMBIOCHEM, Eingereicht.

PATENTE

Novel Chondramide Derivatives. Am 23.11.2012 unter der Nummer EP 12 007 921.5 zur Anmeldung eingereicht.

PRÄSENTATIONEN

S. Hüttel, J. Herrmann, R. Müller: **Fermentation strategy and downstream processing of *Chondromyces* for identification of novel bioactive compounds.** Poster, VAAM-Konferenz **2011**.

S. Hüttel, J. Herrmann, K. Gerth, W. Kessler, H. Steinmetz, R. Müller: **More than 30 Years of Natural Product Isolation from Myxobacteria – What's Next?** Poster, HIPS-Symposium **2012**.

S. Hüttel, R. Müller: **Method to investigate the production of secondary metabolites at defined pO_2 and pCO_2 .** Poster, Bioprocess Engineering Course **2012**.

ZUSAMMENFASSUNG

Naturstoffe erleben derzeit aus verschiedenen Gründen eine Renaissance in der pharmazeutischen Wirkstoffforschung. Aufgrund ihrer Anpassungsfähigkeit an verschiedenste Umweltbedingungen sind besonders Mikroorganismen vielversprechende Produzenten biologisch aktiver Substanzen. Schwierigkeiten, die mit der Kultivierung, Aufarbeitung und Wirkstoffidentifizierung assoziiert sind, erschweren jedoch häufig eine Charakterisierung neuer Moleküle aus diesen Produzenten.

Den Schwerpunkt dieser Arbeit bildet die Entwicklung eines Screeningprozesses für eine möglichst umfassende Evaluierung des biosynthetischen Potenzials eines ausgewählten Myxobakteriums. Dies wurde mittels eines Ansatzes erreicht, der Wirkstoffscreening, -produktion, -aufreinigung und -charakterisierung nicht als separate, sondern als miteinander verbundene und voneinander abhängige Bausteine betrachtet. Die Prozessentwicklung fand deshalb unter Berücksichtigung dieser übergeordneten Gesichtspunkte statt, da die Optimierung eines Einzelschrittes nicht zwangsläufig zur Verbesserung des Gesamtprozesses führt.

Durch konsequente Aufzeichnung prozessrelevanter Daten während des Screening mit dem Myxobakterium SBCm007, konnten wichtige Faktoren zur beschleunigten Wirkstofffindung, -produktion und -charakterisierung identifiziert werden. Durch gezielte Anwendung dieser Ergebnisse konnten neue Chondramid-Varianten mit verbesserter Spezifität für Krebszellen, sowie neue chemische Grundstrukturen charakterisiert werden.

ABSTRACT

Natural products currently experience a renaissance in pharmaceutical research for several reasons. Due to their adaptability to various environmental conditions microorganisms are promising candidates for the production of bioactive substances. Difficulties associated with the cultivation, downstream processing, and the identification of bioactive molecules are frequent and complicate the characterization of new substances from these organisms.

The aim of this study was the development of a screening process for the in-depth evaluation of the biosynthetic potential of a selected microorganism. Therefore bioactivity-guided screening, production, purification and characterization of biologically active substances were considered as intimately connected building blocks in contrary to their perception as independent steps in the process. Process engineering took place, considering these superior principles because optimization of a single step doesn't necessarily improve the overall process.

Consistent mapping of process-relevant data during the screening of the myxobacterium SBCm007 enabled the identification of important factors for an accelerated identification, production, and characterization of bioactive compounds. Following these established guidelines, new chondramide variants exhibiting increased cancer cell specificity as well as two new compound classes could be characterized, which indicates the applicability of this approach.

1 EINLEITUNG

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Produktion und Identifizierung neuer Metabolite aus Myxobakterien. Der Fokus liegt hauptsächlich auf Metaboliten mit antimikrobiellen, zytostatischen oder antiinflammatorischen Eigenschaften, da für diese biologischen Aktivitäten bereits Assays innerhalb des Arbeitskreises verfügbar waren oder im Zeitraum der Erstellung dieser Arbeit etabliert wurden. Zum Zeitpunkt der chemischen Charakterisierung einer Substanz kann jedoch grundsätzlich nicht ausgeschlossen werden, dass eine Aktivität mangels spezifischer Assays unentdeckt bleibt. Deshalb wurden generell alle neuen Substanzen mit spektroskopischen Methoden (MS, NMR) charakterisiert und archiviert, um später eine umfangreichere Testung zu ermöglichen.

Das Hauptziel dieser Arbeit war die Entwicklung effizienter Verfahren im Kleinmaßstab zur Produktion von Rohextrakten für aktivitätsgeleitete Aufreinigungsverfahren. Das so gewonnene Rohmaterial sollte nach einer Kultivierung in ausreichenden Mengen zur Verfügung stehen, um eine anschließende Identifizierung und Charakterisierung der aktiven Substanzen - ohne zeitaufwändige Nachproduktion des Ausgangsmaterials - zu erlauben. Hierfür wurden Fermentationsprozesse dahingehend entwickelt, dass die Einflüsse unterschiedlicher Wachstumsbedingungen auf die Sekundärmetabolitproduktion zeitlich aufgelöst untersucht werden können. Die Aufarbeitung von Kulturüberständen, Zellen und Adsorberharz wurde mit standardisierten Methoden durchgeführt, die einerseits eine begleitende Aktivitätstestung erlauben und andererseits direkte Rückschlüsse bezüglich der nötigen Aufreinigungsschritte zur Isolierung von Reinsubstanzen ermöglichen. Dieses Vorgehen beschleunigt die anschließende Aufreinigung größerer Substanzmengen, die für eine spätere, ausführliche chemische und biologische Charakterisierung benötigt werden.

Im Folgenden soll zunächst eine kurze Übersicht über die für diese Arbeit relevanten Themengebiete gegeben werden.

1.1 NATURSTOFFE

1.1.1 HISTORISCHER ÜBERBLICK

Der Einsatz von Naturprodukten zieht sich durch viele Bereiche unseres Alltags, denn die Natur liefert dem Menschen seit jeher die für sein Überleben benötigten Rohstoffe. Was jedoch als rein passiver Konsum begann, erfuhr eine immer weitere Anpassung der natürlichen Gegebenheiten an spezielle Anforderungen.

Mittlerweile können Mikroben, Pflanzen und selbst Zellen, die aus komplexen Organismen entnommen wurden, genutzt und verändert werden um gewünschte Produkte zu erzeugen. So können heute nicht nur gemeinhin mit Naturprodukten assoziierte Substanzen wie Aminosäuren, sondern auch chemische Stoffe wie Aceton, Butanol und Ethanol im industriellen Maßstab mittels fermentativer Verfahren unter Verwendung verschiedener Mikroorganismen hergestellt werden [1, 2]. Techniken und Prozesse auf diesen Gebieten werden ständig verbessert und zunehmende wissenschaftliche Erkenntnisse führen zur Entwicklung neuer Verfahren. So kann beispielsweise Bioethanol, der heute weltweit als Ersatz und Supplement von fossilen Brennstoffen eingesetzt wird, in naher Zukunft möglicherweise durch Biodiesel aus Mikroalgen substituiert werden. Dies kann unter Umständen eine Verkleinerung der benötigten Anbauflächen für die Erzeugung der benötigten Rohstoffe zur Folge haben und diese für andere Zwecke freistellen [3]. Diese Entwicklungen verdeutlichen, dass selbst in Bereichen, die traditionell kaum mit Naturprodukten assoziiert werden, deren Einfluss immer bedeutender und für große Teile der Weltbevölkerung spürbar wird.

Eine spezielle Gruppe der Naturprodukte stellen solche mit spezifischen pharmazeutischen Aktivitäten dar; diese sogenannten Naturstoffe stehen im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit. Dabei handelt sich überwiegend um Stoffe mit einem relativ niedrigen Molekulargewicht (gewöhnlich $MW < 3000$ Dalton), die dem Sekundärstoffwechsel eines Organismus entstammen, weshalb sie auch als „Sekundärmetabolite“ (engl. „*secondary metabolites*“) bezeichnet werden [4]. Der Begriff Sekundärstoffwechsel wird im Allgemeinen als Überbegriff für Stoffwechselreaktionen verwendet, die nicht direkt an lebenswichtigen Funktionen beteiligt sind. Häufig werden diese Stoffwechselwege hochreguliert, wenn Limitierungen oder Stressbedingungen vorliegen und dienen beispielsweise der Bereitstellung von antibiotisch wirkenden Substanzen zur Abwehr von Fraßfeinden (bei Pflanzen) oder Nahrungskonkurrenten (bei Mikroorganismen).

Traditionell kommt der größte Teil der therapeutisch eingesetzten Medikamente aus pflanzlichen und tierischen Quellen und Schätzungen gehen davon aus, dass sich auch heute noch 80% der Weltbevölkerung überwiegend aus diesen Ressourcen bedienen [5]. Dies hat zum Teil gravierende Auswirkungen auf die betroffene Flora und Fauna, da nachhaltige Produktionsmethoden oftmals nicht gewährleistet sind. So werden beispielsweise in der traditionellen chinesischen Medizin über 1500 - teilweise gefährdete - Tierarten verwendet. Die Versorgung mit Rohmaterialien erfolgt häufig aus illegalen Quellen und trotz der Tatsache, dass Reglementierungen bestehen, existiert eine große Nachfrage auf Schwarzmärkten in Asien nach diesen Substanzen und Produkten [6, 7, 8].

Heute werden auch exotische Quellen wie die Jagd- und Verteidigungsgifte verschiedenster Insekten, Reptilien und Wirbelloser, mittels analytischer Methoden charakterisiert und deren pharmazeutische Verwendbarkeit im Sinne der modernen Medizin untersucht [9, 10, 11]. Allerdings stellt die Reproduzierbarkeit und generelle Verfügbarkeit dieser Substanzen ein gravierendes Problem für die weitere Anwendung dar, sofern keine hinreichende synthetische Zugänglichkeit gewährleistet ist. Tiere und vor allem Pflanzen waren und sind die am einfachsten zugänglichen Quellen zur Zubereitung komplexer Heiltinkturen, sowie für die Isolierung einzelner Wirkstoffe. Dies wird deutlich an den Zahlen bekannter Substanzen aus diesen beiden Gruppen (siehe Tabelle 1.1).

Das zunehmende medizinische Wissen und fortschreitende Entwicklungen auf allen Gebieten der Naturwissenschaften führten dazu, dass Sertürner im Jahre 1805 erstmals eine pharmazeutisch aktive Reinsubstanz isolieren konnte, das Morphin. Die Summenformel sowie die räumliche Konfiguration (siehe Abbildung 1.1) konnten allerdings erst sehr viel später aufgeklärt werden [12]. Die Möglichkeit der Gewinnung von Reinsubstanzen wie dem Morphin leitete die Ära der modernen Medizin ein. Erst dadurch konnten exakte Dosierungen und Wirkungen auf den menschlichen Organismus erforscht werden; unabhängig von der schwankenden Zusammensetzung an unterschiedlichsten Stoffen, die man in der ursprünglichen Quelle findet. Im Jahre 1896 wurden - von Gosio zum ersten Mal dokumentiert - Kristalle einer antibiotisch wirksamen Reinsubstanz (Mycophenolsäure) aus einer Pilzkultur gewonnen. Dies wurde von Florey, der diese Substanz ebenfalls aufreinigen konnte, 1946 zwar erwähnt [13], letztendlich führte jedoch die Beschreibung des Penicillins im Jahre 1929 (siehe Abbildung 1.1) durch Alexander Fleming [14] und die darauffolgende Industrialisierung der Penicillinproduktion, an welcher Florey maßgeblich beteiligt war, zu einer Flut von Entdeckungen neuer Sekundärmetabolite mikrobiellen Ursprungs. Eine der interessantesten Eigenschaften dieser Produzenten ist, dass die Produktion schon früh in sogenannten Bioreaktoren durchgeführt werden konnte. Somit kann eine von natürlichen Bedingungen unabhängige, nachhaltige und reproduzierbare Produktion gewährleistet werden [15].

Tabelle 1.1: Geschätzte Zahlen von bekannten Sekundärmetaboliten*

Quelle	Bekannte Substanzen	Bioaktive Substanzen	Antibiotika
Mikroben (keine Algen/Flechten)	>50000	22000-23000	ca. 17000
Höhere Pflanzen	500000-600000	ca. 100000	10000-12000
Marine Invertebraten	20000-25000	7000-8000	3000-4000
Terrestrische Invertebraten	8000-10000	800-1000	150-200
Vertebraten	200000-250000	50000-70000	ca. 1000

* Die Zahlen wurden aus [4] entnommen.

1.1.2 DIE GOLDENE ÄRA DER NATURSTOFFE

In den vierziger und frühen fünfziger Jahren wurden die wichtigen Klassen der heute verwendeten Antibiotika, wie die Tetracycline, Cephalosporine, Aminoglycoside, Chloramphenicol, Rifamycine und Macrolide entdeckt [4, 15, 16]. In den fünfziger und sechziger Jahren schien durch die ständige Entdeckung neuer Antibiotika, die hauptsächlich aus Streptomyceten isoliert wurden, eine unbegrenzte Versorgung mit diesen Wirkstoffen möglich zu sein. Mit verbesserten Assay- und Screeningmethoden wurden nun auch zunehmend Moleküle mit antitumoralen, antiviralen, enzyminhibierenden und anderen pharmakologisch interessanten Eigenschaften identifiziert [4].

Zwischen 1950 und 1955 stammten die meisten der entdeckten Antibiotika aus Pilzen oder Streptomyceten und anderen bakteriellen Produzenten. Danach stieg der Anteil der Neuentdeckungen aus Streptomyceten überdurchschnittlich an und machte bis in die Mitte der neunziger Jahre meist mehr als 50% der gesamten Entdeckungen pro Jahr aus. In den folgenden Jahren kam es jedoch zu einem Rückgang der Neuentdeckungen aus diesen Produzenten. Mitte der sechziger Jahre wurden die so genannten „*Rare Actinos*“ (Aktinomycetenstämme die durch Standardmethoden weniger häufig isoliert werden) immer interessanter für die Produktion neuer Antibiotika, aber auch bei diesen ging die Zahl der Neuentdeckungen ab Mitte der neunziger Jahre zurück. Ab Anfang der siebziger Jahre wurden andere bakterielle Produzenten immer interessanter und auch die Zahl neuer Antibiotika aus Pilzen stieg stetig an. Aus letzteren kamen Ende der neunziger Jahre anteilmäßig die meisten Neuentdeckungen [4]. Konkrete Zahlen, die den Zeitraum bis 2012 abdecken, sind kaum dokumentiert, jedoch werden Neuentdeckungen von Antibiotika aus allen Produzenten im Allgemeinen als rückläufig beschrieben [16].

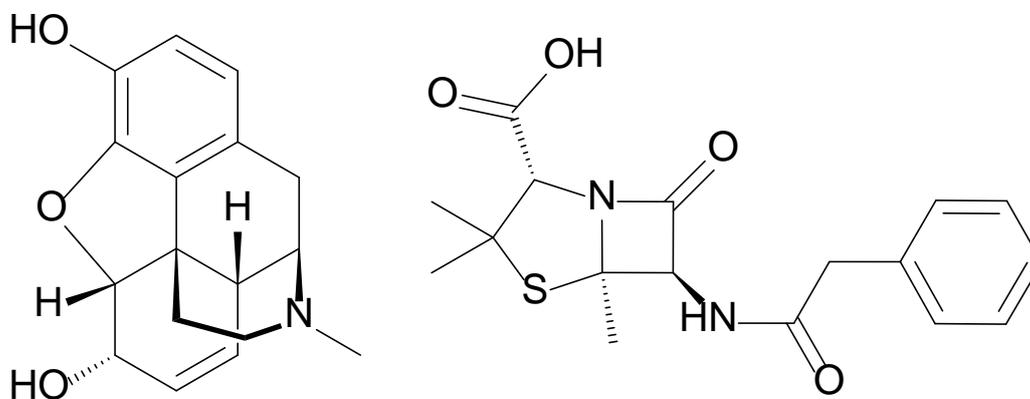


Abbildung 1.1: Dreidimensionale Struktur des Morphin- und des Penicillin G Moleküls

1.1.3 HERAUSFORDERUNGEN AN DIE MODERNE NATURSTOFFFORSCHUNG

Obwohl die Zahl der Antibiotika zwischen den siebziger und neunziger Jahren weiter anstieg, bestand der Großteil der Neuentdeckungen aus Derivaten bereits bekannter Strukturen. Das Wirkspektrum, auf das Naturstoffe hin untersucht wurden, hatte sich jedoch beträchtlich erweitert. So wurden zunehmend auch Moleküle mit beispielsweise herbizider oder antiparasitärer Wirkung interessant für die industrielle Produktion (siehe Abbildung 1.2). Beispielsweise lag der Anteil neu zugelassener Pestizide zwischen 1997 und 2010, die biologischen Ursprungs, Naturstoff oder davon abgeleitet waren, bei 22% [4, 17].

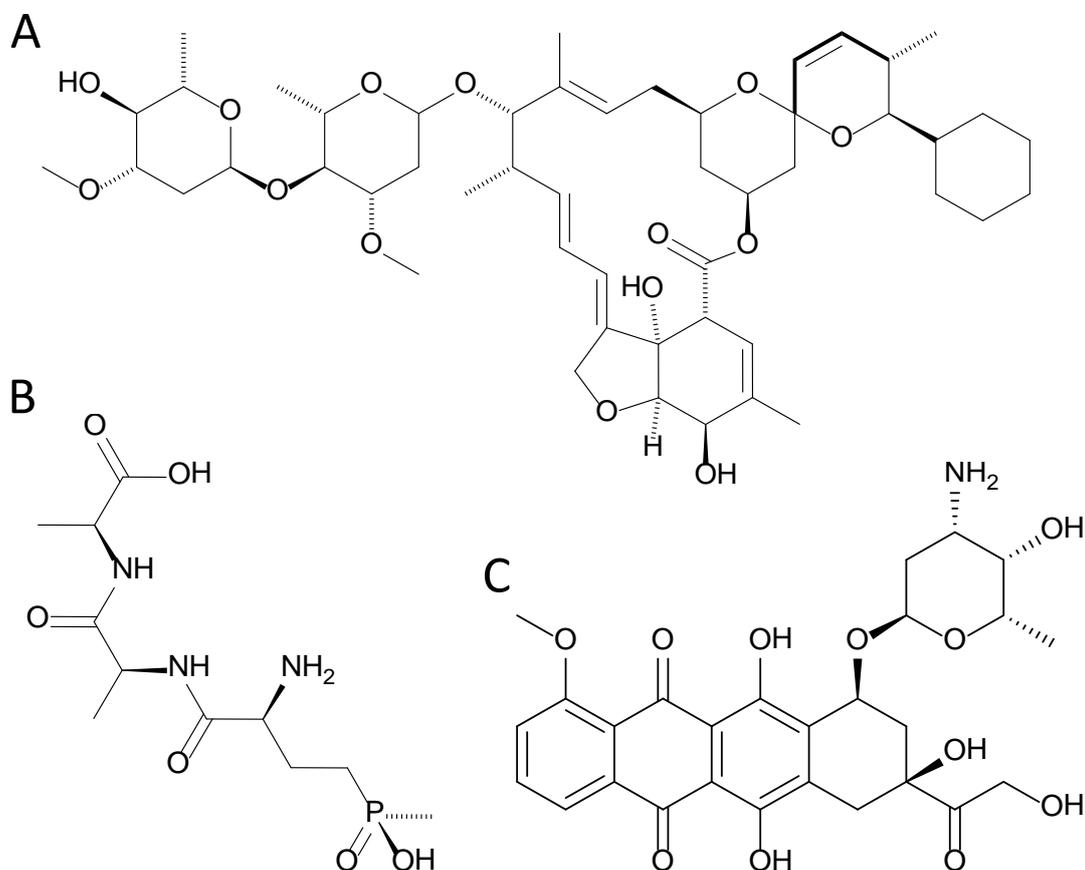


Abbildung 1.2: Strukturen ausgewählter relevanter Sekundärmetabolite. (A) Doramectin wird in der Tiermedizin als Antiparasitikum eingesetzt und gehört zur Gruppe der Avermectine. (B) Bialaphos wirkt aufgrund seiner Phosphinotricin-Gruppe herbizid und dient als Vorlage für das synthetisch hergestellte Glufosinat (Roundup/Monsanto). (C) Doxorubicin wird in der Onkologie eingesetzt und gehört zur Gruppe der Anthracycline. Alle drei Substanzen wurden aus Streptomyceten isoliert [4].

Die Suche nach biologisch aktiven Substanzen führte zu einem stetigen Anstieg an bekannter struktureller Vielfalt aus der Natur, der jedoch Anfang der neunziger Jahre stagnierte, da die Entdeckung neuer Grundstrukturen immer seltener wurde [4, 18]. Dieser Rückgang wird teilweise auf den Rückzug einiger großer Pharmafirmen wie GSK, Sanofi-

Aventis und Ely Lilly, aus dem Naturstoffscreening zurückgeführt. Dieser Rückzug erfolgte trotz der Tatsache, dass 80% der zu diesem Zeitpunkt zugelassenen Medikamente Naturstoffe oder zumindest von Naturstoffen abgeleitet waren [15, 19, 20]. Als Gründe für diese Abwendung werden in der Literatur folgende Faktoren genannt:

- Der Aufbau und die Unterhaltung einer qualitativ hochwertigen Naturstoff-Bibliothek erfordert Fähigkeiten und Qualitäten, die in der Industrie nicht generell verfügbar waren bzw. sind [15, 19, 21, 22].
- Probleme die mit den komplexen Extrakten assoziiert sind. Dazu gehören unter anderem Unlöslichkeit und fluoreszierende Inhaltsstoffe, was zu Messwertverfälschungen, falsch-positiven „Hits“ oder nicht reproduzierbaren Ergebnissen führen kann [15, 19, 21, 22].
- Naturstoffe werden vom ursprünglichen Produzenten oft nur in kleinen Mengen produziert, was eine Aufreinigung und Charakterisierung zeit- und damit kostenintensiv macht; dies gilt insbesondere dann, wenn für eine weitere pharmazeutische Entwicklung erhebliche Mengen (Gramm-Maßstab) benötigt werden [15, 19, 21, 22].
- Die häufige Wiederfindung von bekannten Substanzen und deren Derivaten kann nicht von vornherein ausgeschlossen werden und verschwendet Ressourcen [15, 19, 21, 22].
- Die Größe und Komplexität der Naturstoffe ist im Vergleich zu synthetisch hergestellten Molekülen sehr viel höher, bei gleichzeitiger Anwesenheit vieler reaktiver Gruppen. Dies erschwert eine spätere Modifizierung mittels kombinatorischer Chemie erheblich [15, 19, 21, 22].
- Unsicherheiten, die die Reglementierung bezüglich industriell genutzter Mikroorganismen aus anderen Ländern betreffen (*Convention on Biological Diversity*) und steigende Hürden bei Zulassungsverfahren und Sicherheitsvorschriften [15, 19, 21, 22].

Ein genereller Ablauf der Produktisolierung und Charakterisierung mit den jeweils benötigten Mengen an Reinsubstanz ist in Abbildung 1.3 schematisch dargestellt. Hier wird deutlich, dass schon relativ früh ausreichende Mengen an Reinsubstanz verfügbar sein müssen, um vielfältige Assays durchzuführen und die dreidimensionale Struktur des Moleküls etablieren zu können. Wenn eine potentielle neue Struktur vorliegt, müssen Wirkmechanismen und

Struktur-Aktivitätsbeziehungen (*Structure Activity Relationship, SAR*) etabliert werden, die letztendlich ausschlaggebend für weitere klinische Forschungen sind.

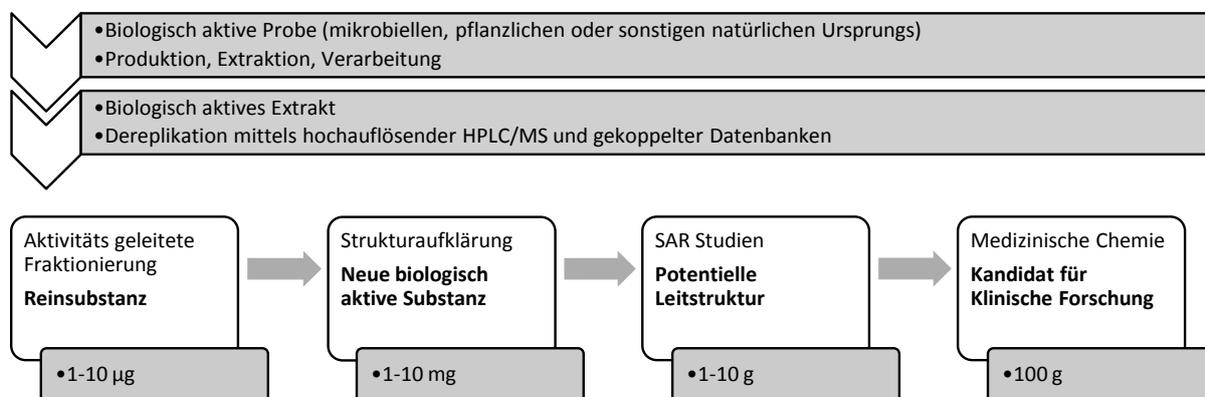


Abbildung 1.3: Schematischer Verlauf eines Naturstoff-Screenings mit Angabe benötigter Substanzmengen. Als Dereplikation wird die Untersuchung von Proben eines Substanzgemisches bezeichnet, die zum Ziel hat bereits bekannte und untersuchte Substanzen zu identifizieren und deren erneute, zeitaufwändige Charakterisierung zu vermeiden. Üblicherweise wird dies durch Abgleich von Retentionszeit- und UV- und/oder Massenspektrometriedatenbanken erreicht. Die Zahlen wurden aus [23] entnommen.

Aufgrund der oben aufgezählten Probleme wurde versucht, Naturstoffe als natürliche Quelle struktureller Vielfalt zunehmend durch synthetische Herangehensweisen, wie die kombinatorischen Chemie oder die diversitätsorientierte Synthese, abzulösen [15, 19, 21, 22]. Dadurch erhoffte man sich die oben diskutierten Schwierigkeiten, wie zu hohe Komplexität der Rohextrakte und zeitaufwändige Aufreinigungs- und Charakterisierungsprozeduren, zu umgehen. Gleichzeitig sollte es theoretisch möglich sein große, reproduzierbare Substanzbibliotheken aufzubauen, die für Hochdurchsatzscreenings geeignet sind. Der Erfolg scheint aus heutiger Sicht allerdings gering zu sein. Eine Untersuchung der zwischen 1981 und 2010 zugelassenen Medikamente ergab, dass nur ein einziges Molekül, welches mittels eines rein kombinatorischen Ansatzes generiert wurde, eine wirklich neue chemische Entität darstellte und zugelassen wurde [24]. Es handelt sich dabei um Sorafenib (Nexavar), das von der Firma Bayer zur Behandlung des Nierenzellkarzinoms auf den Markt gebracht und 2005 von der FDA zugelassen wurde [24]. Eine weitere Evaluierung aller zugelassenen Medikamente in diesem Zeitraum zeigte zudem, dass aus den insgesamt 1355 zugelassenen Substanzen nur 29% rein synthetischen Ursprungs waren (allerdings nicht mit kombinatorischen Ansätzen generiert), während 27% Naturstoffe oder Naturstoffderivate waren (siehe Abbildung 1.4). Weitere 24% dieser Zulassungen betrafen synthetische Substanzen, die jedoch den Pharmakophor eines Naturstoffes direkt beinhalten, oder den Pharmakophor eines Naturstoffes beziehungsweise diesen selbst imitieren. Der Rest der Zulassungen umfasst Vakzine und Moleküle

biologischen Ursprungs, wie beispielsweise Antikörper [24]. Diese Zahlen verdeutlichen, dass Naturstoffe immer noch die bedeutendste Rolle in der Medizin spielen und dass die organische Synthesechemie bislang noch keine ausreichend effizienten Methoden und Ideen für Leitstrukturen liefert, um auf Moleküle natürlichen Ursprungs verzichten zu können [19]. Nachfolgend sind einige Zahlen aufgeführt, um dies zu verdeutlichen: Im Jahr 2005 betrug die Anzahl bekannter Polyketid-Strukturen (siehe Kapitel 1.2) ca. 7000. Von dieser Naturstoffgruppe waren zu diesem Zeitpunkt bereits 20 kommerzialisiert. Dies entspricht einem Prozentsatz von ungefähr 0.3%. Diese „Umsetzungsrate“ ist deutlich höher als diejenigen die von herkömmlichen pharmazeutischen Screenings mit synthetischen Substanzbibliotheken berichtet werden. Diese liegen im Bereich von <math><0.001\%</math> [25].

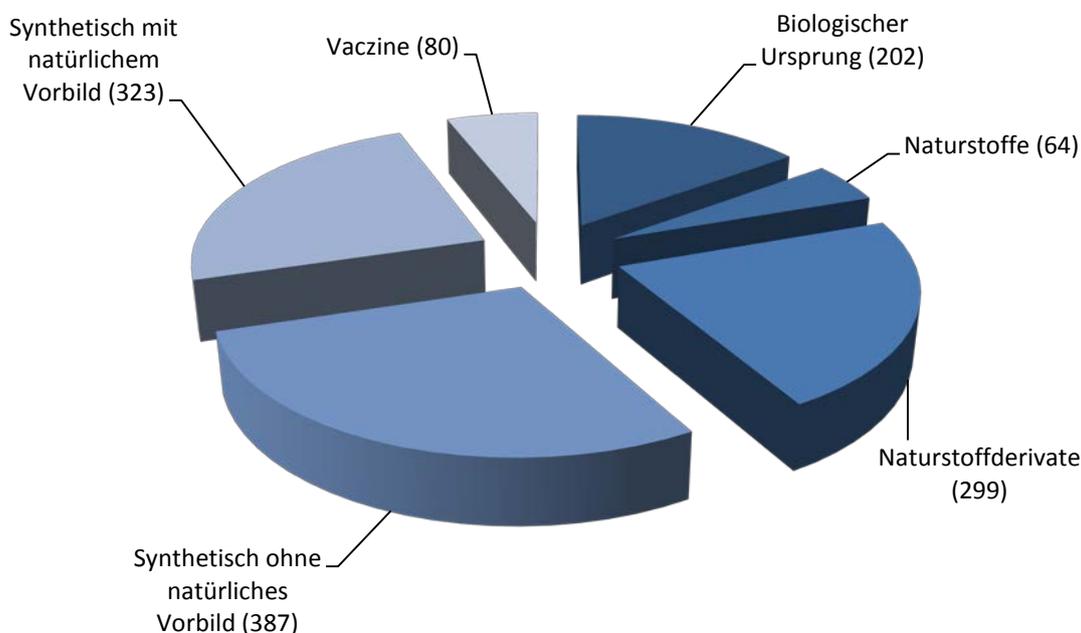


Abbildung 1.4: Auf ihre Herkunft bezogene Zusammensetzung der 1355 Medikamente die zwischen 1981-2010 zugelassen wurden. Vakzine: Meist biotechnologisch hergestellte Antigene. Biologischer Ursprung: Meist Antikörper, Proteine oder größere Peptide. Naturstoffe: Meist sogenannte kleine Moleküle (<math><3000\text{ Da}</math>) aus dem Sekundärmetabolismus eines Lebewesens. Naturstoffderivate: Naturstoffe, die nach der Gewinnung chemisch derivatisiert wurden um die Wirksamkeit zu beeinflussen. Synthetisch ohne natürliches Vorbild: Für diese Stoffgruppe existiert in der Natur kein Äquivalent. Synthetisch mit natürlichem Vorbild: Diese Gruppe wurde durch einen Naturstoff inspiriert, wird jedoch vollständig synthetisch hergestellt und ist keine Kopie des Naturstoffs [24].

1.1.4 NATURSTOFFE VERSUS KOMBINATORISCH ERZEUGTE MOLEKÜLE

An diesem Punkt stellt sich die Frage, weshalb Naturstoffe, im Vergleich zu Molekülen die mittels kombinatorischer Synthese hergestellt wurden, bessere Trefferquoten in Bioaktivitäts-Assays liefern. Theoretische Untersuchungen der chemisch-physikalischen Eigenschaften

einer Gruppe kombinatorisch synthetisierter Moleküle, einer Gruppe Naturstoffe und einer Gruppe von Medikamenten, lieferte die folgenden wichtigsten Unterschiede [26]:

- **Die Anzahl und Verteilung an chiralen Zentren.** Kombinatorisch erzeugte Moleküle besitzen meist 0-2 chirale Zentren, während Medikamente und Naturstoffe gleichmäßig verteilt zwischen 0 und >9 chirale Zentren aufweisen. Dies ist teilweise auf Schwierigkeiten mit stereospezifischen Synthesen und der Aufreinigung aus Racematen zurückzuführen [26].
- **Die Anzahl an frei rotierenden Bindungen, Ketten, ungesättigten Bindungen und Ringsystemen.** Naturstoffe weisen in der Regel weniger frei drehbare Bindungen als kombinatorisch erzeugte Moleküle auf, während die Gruppe der Medikamente zahlenmäßig dazwischen liegt. Längere Ketten, die frei drehbare Bindungen aufweisen und dadurch zu einer größeren Flexibilität des Moleküls führen, scheinen in Naturstoffen weniger häufig zu sein. Kombinatorisch erzeugte Moleküle enthalten weniger Doppelbindungen außerhalb aromatischer Ringsysteme als Naturstoffe; Medikamente enthalten statistisch jedoch noch weniger als diese. Ringe und im Speziellen verknüpfte Ringsysteme scheinen bei Naturstoffen häufiger zu sein als bei kombinatorisch erzeugten Molekülen, während deren Anzahl bei Medikamenten dazwischen liegt. Generell lässt sich sagen, dass Naturstoffe überwiegend unflexiblere Strukturen besitzen, was die spezifische Bindung an ein biologisches „Target“ verbessern kann [26, 27].
- **Element-Verteilung.** Kombinatorisch erzeugte Moleküle enthalten mehr Halogen-, Schwefel- und Stickstoffatome als Naturstoffe, während die Medikamentengruppe zahlenmäßig dazwischen, jedoch näher bei den Naturstoffen, liegt. Naturstoffe enthalten in der Regel mehr Sauerstoffatome als die beiden anderen Gruppen [26].
- **Lipophilie.** Naturstoffe und Medikamente sind im Durchschnitt lipophiler als kombinatorisch erzeugte Moleküle [26].

Eine statistische Hauptkomponentenanalyse (*Principle Component Analysis*, PCA) der zwei Parameter, die für 54% der Diversität der Moleküle in dieser Studie verantwortlich sind, nämlich die Anzahl der Chiralitätszentren und die der frei drehbaren Bindungen, zeigte, dass der Diversitätsraum der durch kombinatorisch erzeugte Moleküle belegt wird sehr viel kleiner ist als der von Medikamenten und Naturstoffen [26]. Allerdings besteht trotzdem eine sehr große Überlappung der Bereiche, so dass die rein statistisch erfassbaren Faktoren nicht alleine für die geringe Anzahl an Leitstrukturen aus rein kombinatorischen Ansätzen verantwortlich sein können. Der Grund für die höheren Erfolgsraten von Naturstoffen wird in

der evolutionären Entwicklung derselben in Wechselwirkung mit ihren Targets gesehen, insbesondere mit verschiedenen Proteinen innerhalb und auf der Oberfläche einer Zelle [23].

Aus heutiger Sicht betrachtet scheint es wahrscheinlich, dass keine - wie ursprünglich angenommen - unendliche strukturelle Vielfalt dieser essentiellen Zellbestandteile besteht. Recherchen in Proteindatenbanken zeigen, dass es derzeit (Stand 12.06.2012) 536029 Einträge in der Protein Datenbank UniProt [28] gibt, welche täglich mit anderen Datenbanken abgeglichen werden. Diese werden jedoch, sofern eine dreidimensionale Struktur vorliegt, in der SCOP Datenbank (Structural Classification of Proteins [29, 30]) aufgrund folgender struktureller Merkmale klassifiziert und in nur wenige Haupttypen (*Common Fold*) eingeteilt:

- **Domäne.** Die kleinste Einheit ist die Proteindomäne, die aus einer einzelnen Aminosäurekette besteht. Unter Umständen besteht ein Protein aus einer einzelnen Domäne, diese weist jedoch in der Regel ein typisches Faltungsmuster auf (α -Helix, β -Faltblatt etc.)
- **Familie.** Proteine werden zu Familien geclustert, wenn die Sequenzidentität der Aminosäuren >30% ist oder eine sehr ähnliche Struktur und Funktion mit einer Sequenzidentität >15% vorliegt.
- **Superfamilie.** Diese werden definiert, wenn Familien Proteine mit niedriger Sequenzidentität enthalten aber die Struktur und Funktion einen gemeinsamen Ursprung nahelegt.
- **Faltungstyp (*Common Fold*).** Diese stellen eine Zusammenfassung von Familien und Superfamilien dar, die aufgrund ihrer sehr ähnlichen Domänenanordnung gemeinsam klassifiziert werden. Die Faltung wird hier möglicherweise durch physikalische Einschränkungen verursacht die für die Funktionalität des Proteins benötigt werden. Sie kann aber auch durch eine divergente Evolution verursacht worden sein, die eine starke Veränderung der Aminosäuresequenz zur Folge hatte, bei der jedoch der Faltungstyp beibehalten wurde.

Trotz der hohen Zahl bekannter Proteinsequenzen beläuft sich die Zahl der Faltungstypen in der aktuellen Version der SCOP Datenbank (Version 1.75, 23.02.2009) auf nur 1195, die aus der dreidimensionalen Anordnung der bis dahin charakterisierten Proteine abgeleitet wurden [30]. Es scheint, dass die Natur keine unendliche Vielfalt an Proteinmolekülen entwickelt hat, sondern dass verschiedene Faltungstypen in Bakterien, Pflanzen und Säugetieren gleichermaßen auftauchen. Möglicherweise kann deshalb ein Sekundärmetabolit eines marinen Dinoflagellaten (einzelliges, eukaryotisches Lebewesen), dessen ursprüngliche

Funktion nicht bekannt ist, eine direkte und starke Wirkung auf ein Protein in einer Maus haben. Dies ist beispielsweise der Fall beim Maitotoxin (siehe Abbildung 1.5, [31]). Dem Dinoflagellaten entsteht durch die Produktion dieser Substanz kein direkter Vorteil gegenüber der Maus, da diese weder einen Fraßfeind darstellt, noch in irgendeiner Form in Kontakt mit dem Produzenten kommt. Dies verdeutlicht jedoch die Hypothese der *Common Folds*. Eine Substanz löst durch Wechselwirkung mit einem „fremden“ Protein eine Wirkung aus, für die sie im Produzenten nicht vorgesehen war. Diese Hypothese wird zusätzlich unterstützt durch Erkenntnisse, die bei der Synthese von Cholecystinin (CKK)-Antagonisten gewonnen wurden. Als Grundgerüst wurde Benzodiazepin verwendet und die Wirkung verschiedener Derivate auf CKK-Rezeptoren des Magens, Pankreas und des Gehirns untersucht. Trotz des gemeinsamen Grundgerüsts konnten minimale Strukturunterschiede, wie z. B. eine Methylgruppe, die Affinität des Antagonisten für einen der untersuchten Rezeptoren um vier Zehnerpotenzen vermindern, während andere Veränderungen die Spezifität für einen der drei Rezeptoren erhöhten, für die anderen beiden jedoch herabsetzten. Darüber hinaus binden Benzodiazepinderivate auch an andere Rezeptortypen, wie den GABA-Rezeptoren, und sind in der Lage Peptidasen zu inhibieren. Solche Eigenschaften, die auch von anderen Grundstrukturen, wie beispielsweise Cyproheptadin, beschrieben sind, prägten den Begriff der sogenannten „privilegierten Strukturen“ (*Privileged Structures*) [32, 33]. Diese stellen nach Meinung vieler Autoren die vielversprechendsten Ausgangspunkte für kombinatorische Substanzbibliotheken dar, da hier mittels gezielter Derivatisierung eine bereits biologisch relevante Struktur weiter optimiert werden kann [4, 19, 21, 32].

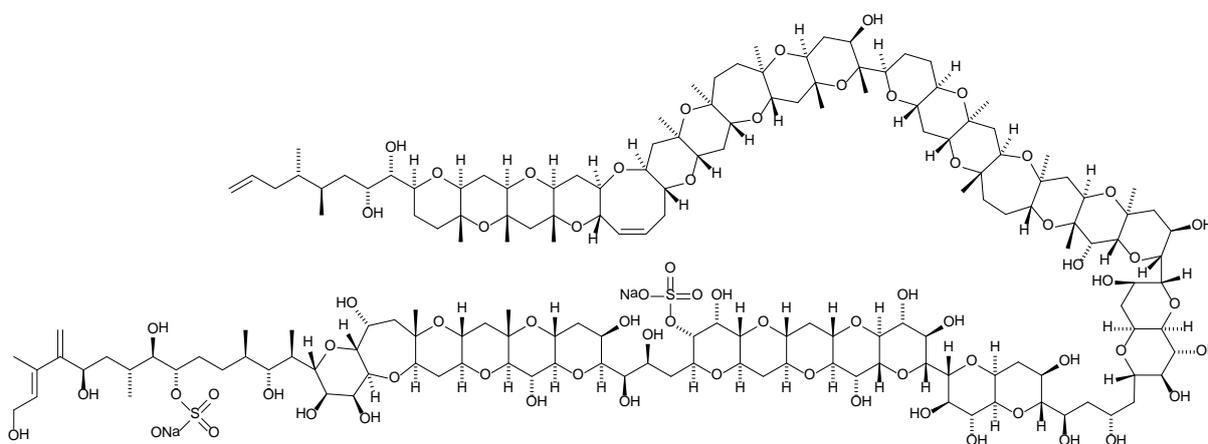


Abbildung 1.5: Maitotoxin: Das Maitotoxin [31] ist mit einer LD₅₀ von 50 ng/kg in der Maus eine der giftigsten natürlich vorkommenden Substanzen. Seine Wirkung beruht auf der Aktivierung calciumdurchlässiger Ionenkanäle. Die Komplexität des Moleküls, hervorgerufen durch die 98 chiralen Zentren, macht eine wirtschaftliche Synthese unmöglich.

Trotz ständiger Weiterentwicklung von Methoden in der organischen Synthese, stellen Moleküle wie Calicheamicin (Abbildung 1.6, [34]) mit einer Endiin-Gruppe oder Maitotoxin mit 98 chiralen Zentren aufgrund ihrer Komplexität immer noch höchste Ansprüche an den Chemiker, der für Moleküle dieser Art Synthesestrategien entwickelt. Häufig sind diese Synthesen nicht wirtschaftlich oder ökologisch schwer vertretbar, so dass eine Produktion aus natürlichen Quellen unabdingbar ist oder zumindest die Grundstoffe auf natürlicher Basis gewonnen werden müssen, um diese später mittels chemischer Methodik zu derivatisieren.

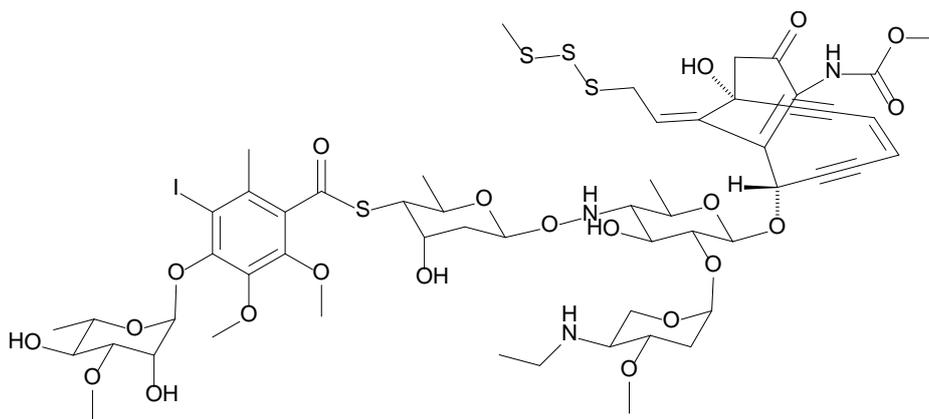


Abbildung 1.6: Calicheamicin. Der Naturstoff enthält neben einem Allyltrisulfit und einer Enongruppe eine ungewöhnliche Endiineinheit. Aufgrund seiner extremen Toxizität und völlig unspezifischen Wirkung kann es nur als Antikörperkonjugat zur Krebsbekämpfung eingesetzt werden [34].

Ein Beispiel dafür stellt Taxol dar, ein Krebsmedikament, welches aus verschiedenen *Taxus*-Arten gewonnen werden kann. Dieses kann zwar synthetisiert werden, jedoch sind derzeit nur semisynthetische Routen, unter Verwendung von natürlichen Vorstufen aus verschiedenen Eibenarten, ökonomisch vertretbar. Die Entwicklung biotechnologischer Prozesse, bei denen die Produktvorstufen mittels Pflanzenzellkultivierung produziert werden, stellen unter Umständen eine weitere zukünftige Produktionsmöglichkeit dieser Substanzen dar [35]. Die überwiegende Mehrheit der Autoren sieht Ansätze wie Klick-Chemie oder Diversitätsorientierte-Synthese (DOS) als geeignete Werkzeuge um Leitstrukturen, die aus natürlichen Quellen stammen, weiter zu optimieren und an ein spezifisches Target anzupassen. Beispiele hierfür sind die Synthese von hochselektiven Proteinkinase-Inhibitoren, bei denen Staurosporin als Leitstruktur verwendet wurde [36], oder die Entdeckung verschiedener Phosphatase-Inhibitor-Klassen mittels Biologisch-Orientierter-Synthese (BIOS), einer Unterform der diversitätsorientierten Synthese [37]. Diese Ansätze lieferten bei relativ kleinen Substanzbibliotheken gute Trefferraten, die deutlich zeigen, dass, ausgehend von einer schwach oder unspezifisch aktiven Leitstruktur (siehe Abbildung 1.7),

mittels der zur Verfügung stehenden Werkzeuge der organischen Chemie, hochspezifische Bindungen an ein Zielmolekül erzeugt werden können.

Die Weiterentwicklung der Analyse-, Prozessierungs- und Automatisierungstechniken erlaubt heute außerdem effizientere Screening- und Aufarbeitungsprozeduren. Dies macht es möglich, innerhalb relativ kurzer Zeit Reinsubstanzbibliotheken aus natürlichen Quellen zu gewinnen, die als Ressourcen für Screenings nach Leitstrukturen verwendet werden können [38, 39]. Diese Entwicklungen in Kombination mit Entwicklungen auf dem Gebiet der Metagenomics, der Erforschung sogenannter exotischer Habitate, wie der marinen Umgebung, und der Weiterentwicklung von Techniken, die die Kultivierung bislang als „unkultivierbar“ geltender Mikroorganismen erlauben (wie Difussionskammern), ermöglichen die Erforschung bislang unbekannter Naturstoffproduzenten. Diese stellen mit hoher Wahrscheinlichkeit Quellen bislang unbekannter Leitstrukturen dar, wie beispielsweise Substanzen, die aus der chemisch noch wenig erforschten gemeinsamen Entwicklung zweier Lebensformen hervorgegangen sein könnten [40, 41, 42, 43].

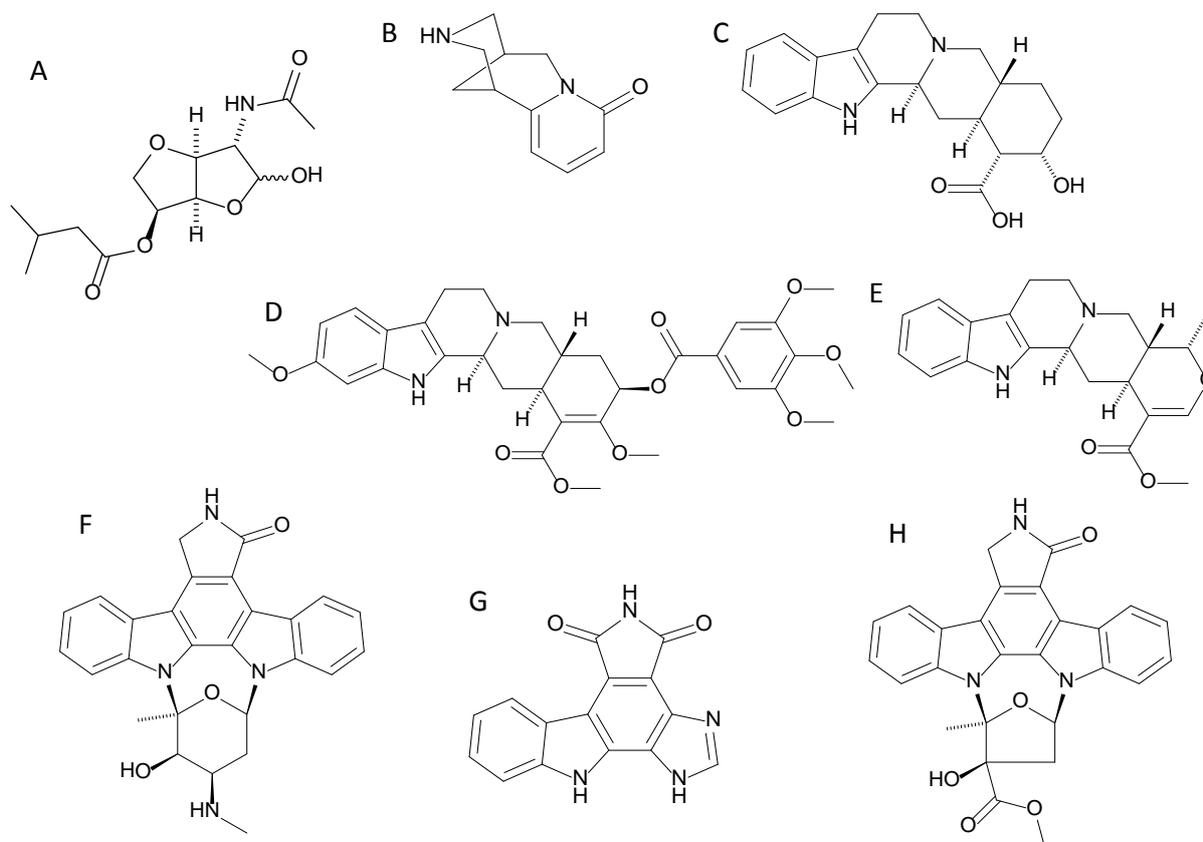


Abbildung 1.7: Naturstoffe, die erfolgreich als Leitstrukturen für verschiedene Inhibitortypen verwendet wurden. (A-E) wurden als Leitstrukturen für Phosphatase-Inhibitoren und **(F-H)** als Leitstrukturen für Protein-Kinase-Inhibitoren verwendet. **(A)** Furanodictin A lieferte potente Shp-2- und PTP1B-Inhibitoren. **(B)** Cytisin war Vorlage für VE-PTP-Inhibitoren. **(C)** Yohimbine, **(D)** Ajmalicin und **(E)** Reserpine wurden als natürliche Cdc25A-Inhibitoren identifiziert und weiter optimiert. **(F)** Staurosporin, **(G)** K252a und **(H)** Granulatimid sind natürliche Kinase-Inhibitoren, die als Leitstruktur für synthetisch erzeugte Inhibitorklassen verwendet wurden [36, 37].

Naturstoffe aus Endophyten von Pflanzen oder Schwämmen scheinen in dieser Hinsicht besonders vielversprechend zu sein, da möglicherweise manche Wirkstoffe, die ursprünglich dem Wirt zugeschrieben wurden, ihren Ursprung in einem bakteriellen oder fungalen Endosymbionten haben. Unter Umständen lassen sich diese auch sehr viel einfacher und nachhaltiger als ihre Wirte kultivieren [44, 45, 46]. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Naturstoffe, trotz immer noch vorhandener Schwierigkeiten bei der Bearbeitung komplexer Extrakte, eine hervorragende Quelle neuer Leitstrukturen darstellen. Auch heute noch stellen Naturstoffe, in Kombination mit Methoden der organischen und analytischen Chemie, sowie der Mikrobiologie und Bioverfahrenstechnik, einen wichtigen Zugang zu medizinisch relevanten Molekülen dar.

1.2 MYXOBAKTERIEN ALS PRODUZENTEN NEUER NATURSTOFFE

Myxobakterien gehören neben den Aktinomyzeten, die ca. 70% der bekannten mikrobiellen Naturstoffvielfalt stellen, und diversen Bacilli, die ca. 6.5% liefern, mit geschätzten 5% Gesamtanteil an Grundstrukturen zu den interessantesten Produzenten im Reich der Bakterien [47]. Myxobakterien gehören zu den Gram-negativen δ -Proteobakterien, kommen terrestrisch ubiquitär vor und werden auch in marinen Sedimenten detektiert [48]. Nach der Sequenzierung der beiden myxobakteriellen Genome von *Sorangium cellulosum* und *Myxococcus xanthus* wurde das Potenzial dieser Produzenten deutlich. Auf den mehr als 13 Mb wurden 17 Loci (~10 Mbp und 18 Loci in *M. xanthus*) für die Biosynthese von Sekundärmetaboliten und eine Fülle an regulatorischen Genen entdeckt [49]. Eine mögliche Erklärung für diese regulatorische Komplexität ist die Fähigkeit zu ungewöhnlichen „Verhaltensweisen“ der Myxobakterien. Sie sind z. B. beweglich auf Oberflächen und können auf unterschiedliche Reize der Umwelt reagieren. Einige Myxobakterien sind in der Lage, als sogenannte Predatoren, andere Bakterien abzutöten und für die eigene Versorgung mit Nährstoffen zu nutzen. Ein typisches Merkmal der Myxobakterien ist außerdem, dass unter Stressbedingungen (Trockenheit, Hitze, UV-Strahlung) komplexe multizelluläre Strukturen gebildet werden, welche die Myxosporen als Dauerform enthalten [48, 50]. Aus diesen gehen unter günstigeren Umweltbedingungen wieder vegetative Zellen hervor.

Von den heute mehr als 7500 identifizierten Myxobakterien in der Stammsammlung des HZI stammen ca. 120 unterschiedliche, in unserer Arbeitsgruppe bekannte, chemische Grundstrukturen, von denen ca. 80 in der Literatur beschrieben wurden [interne Daten]. Die Mehrzahl dieser Moleküle entsteht im Sekundärmetabolismus dieser Bakterien und wird an riesigen Enzymkomplexen synthetisiert. Zu diesen gehören die Polyketidsynthasen (PKS) vom Typ I sowie Nichtribosomale-Peptidsynthetasen (NRPS) und Mischformen aus diesen beiden Biosynthesewegstypen (siehe Abbildung 1.8 und 1.9). Des Weiteren werden auch

Terpenoide, Phenylpropanoide und Alkaloide gefunden, die den kleineren Anteil der strukturellen Vielfalt stellen [51].

Bei der Polyketidbiosynthese werden aus Acetateinheiten synthetisierte Vorstufen, wie Malonyl-CoA aber auch Methylmalonyl-CoA (welches durch Isomerisierung aus Succinyl-CoA gewonnen wird) verwendet. Diese werden von den Megaenzymen modulweise eingebaut und können dabei unterschiedliche Reduktionsstufen durchlaufen, was das Einfügen einer Vielzahl molekulspezifischer Stereozentren erlaubt.

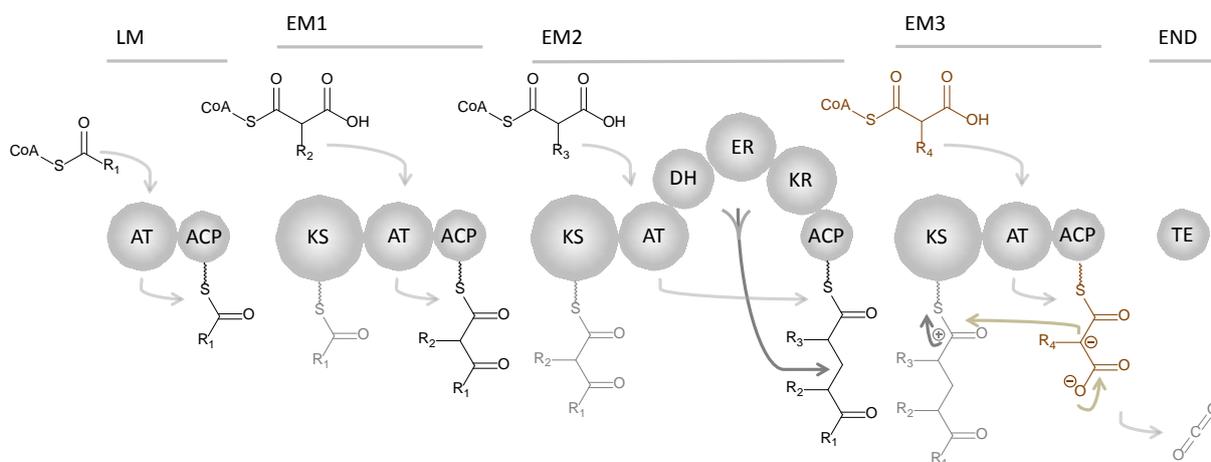


Abbildung 1.8: Schematischer Aufbau einer Polyketidsynthese vom Typ I. Die grauen Kugeln symbolisieren Proteindomänen, die in Modulen angeordnet sind. In schwarz dargestellt ist die wachsende Kette, sowie der CoA-Ester der von der AT auf das ACP geladen wird. In grau ist die jeweilige Kettenverlängerungseinheit, die von der KS vom ACP übernommen wird, dargestellt. Im EM3 ist der Mechanismus der Kettenverlängerung gezeigt. Das Produkt wird durch die KS vom ACP aus EM2 übernommen (dargestellt in grau), dann findet ein nukleophiler Angriff des α -Kohlenstoffes der Verlängerungseinheit (hier braun) an Position C1 statt. Die Kette wird um zwei Kohlenstoffe erweitert, während C3 der Verlängerungseinheit als CO_2 freigesetzt wird. Eine detaillierte Erläuterung, auch der Abkürzungen, findet sich im Text.

Bei einer vorhandenen Genomsequenz lassen sich mittels bioinformatischer Methoden die Gene, die für die Erzeugung dieser Stoffe benötigt werden, identifizieren. Diese liegen in der Regel dicht beieinander, weshalb sie als Biosynthesegencluster bezeichnet werden. Die Untersuchungen von aktiven Zentren dieser Proteine anhand von Kristallstrukturen zeigten, dass konservierte Bereiche für die Erkennung und Aktivierung spezifischer Substrate verantwortlich sind. Diese konservierten Domänen lassen sich häufig anhand von bekannten Sequenzmotiven in der Aminosäurekette, die sich aus der Genomsequenz ableiten lässt, erkennen. Dadurch können wertvolle Informationen über den Einbau spezifischer Substrate, aber auch die absolute Konfiguration dieser Moleküle gewonnen werden. Diese Kenntnisse können bei einer Strukturaufklärung dieser häufig komplex aufgebauten Moleküle unter Umständen hilfreich sein. Aus diesem Grund wird im Folgenden die Biosynthese dieser

beiden Substanzklassen genauer erläutert. Anhand konkreter Beispiele soll im Kapitel 2.3 erläutert werden, wie Genomdaten bei der Aufklärung der absoluten Konfiguration eines Naturstoffes helfen und für Strukturberechnungen verwendet werden können.

Abbildung 1.8 zeigt schematisch eine Anordnung von 4 PKS-Modulen, die wiederum aus einzelnen Elementen, sogenannten Domänen, bestehen, welche anhand ihrer Funktion benannt werden. Das Acylcarrier-Protein (ACP) des Lade-Moduls (LM) wird häufig mittels Acetyl-CoA aber auch anderen, manchmal deutlich größeren Einheiten beladen. Die einzelnen apo-ACPs (Apoenzym = inaktives Protein ohne Kofaktoren) werden durch Übertragen eines 4'-Phosphopantetheinrests von Coenzym A (CoA) auf ein konserviertes Serin mittels einer Phosphopantetheinyltransferase in das Holoenzym (aktives Enzym mit Kofaktoren) umgewandelt. Dann werden die ACPs der Extensionsmodule (EM) mittels der Acyltransferase (AT) gewöhnlich mit Malonyl-CoA, Methylmalonyl-CoA aber auch Ethylmalonyl-CoA oder anderen Verlängerungseinheiten beladen. Wie im EM3 gezeigt, belädt die AT das ACP mit der Verlängerungseinheit. Je nach Verlängerungseinheit besitzt diese ein Stereozentrum an C2, welches gewöhnlich *S*-Konfiguration aufweist (C1 bezeichnet das als Thioester gebundene Carboxyl-Kohlenstoffatom, siehe Abbildung 1.8 und 1.9). Nach der Kondensation kann dieses in die *2R*-Konfiguration epimerisiert werden oder im Originalzustand verbleiben. Der genaue Mechanismus dieser Konfigurationsänderung ist noch nicht vollständig geklärt. Im nächsten Schritt übernimmt die Ketosynthase (KS) die wachsende Kette vom ACP und katalysiert, nach Decarboxylierung von C3 der Verlängerungseinheit, einen nukleophilen Angriff vom C2 dieser Verlängerungseinheit am C1 des an der Ketosynthase gebundenen Intermediates (gezeigt in grau); analog einer Claisen-Esterkondensation. Das Intermediat befindet sich nach der Kondensation am ACP. EM1 zeigt das wachsende Produkt nach dem ersten Extensionsschritt. C1, C2 und der an C2 sitzende R2 stammen aus der Verlängerungseinheit, während der jetzt mit C3 bezeichnete Kohlenstoff (vorher C1) und der daran sitzende R1 vom Lademodul übernommen wurden. Diese Einheit (EM1) wird als minimales Extensionsmodul bezeichnet, da diese Schritte benötigt werden um eine Kettenverlängerung zu erreichen. EM2 besitzt zusätzlich zu KS, AT und ACP drei weitere Domänen, welche als „vollständiger reduktiver *loop*“ bezeichnet werden. Die Ketoreduktase reduziert die in der Esterkondensation entstehende β -Ketogruppe (an C3) zum Alkohol, wodurch es zur Einführung eines weiteren Stereozentrums kommt. Im Falle des gezeigten Moduls (EM2) wird das Produkt mittels einer Dehydratase (DH) durch Wasserabspaltung weiter reduziert, wobei eine Doppelbindung entsteht. Diese kann, je nach Enzymspezifität, *cis*- oder *trans*-konfiguriert sein. Der letzte Reduktionsschritt erfolgt durch eine Enoylreduktase (ER), wodurch kein Stereozentrum an C3 entsteht, jedoch die Stereospezifität an C2 nochmals verändert werden kann. Das fertige Produkt wird dann in der Regel mittels einer Thioesterase-Domäne (TE) vom Protein freigesetzt, wobei es

häufig zu einer intramolekularen Zyklisierung kommt [52, 53]. Durch das Zusammenspiel dieser Mechanismen kann das fertige Produkt außerordentlich komplex werden, da bei jedem Kettenverlängerungsschritt theoretisch zwei Stereozentren eingefügt werden können. Die Abfolge der Biosynthese muss allerdings nicht zwingend der Kolinearitätsregel folgen (Aufbau in der Reihenfolge der Module). Module können beispielsweise übersprungen werden oder „stottern“. Ausnahmen und Besonderheiten sind hier besonders in der neueren Literatur sehr zahlreich beschrieben [52, 54]. Die strukturelle Komplexität der Polyketide wird noch gesteigert durch die Möglichkeit weitere Methylgruppen - mittels spezifischer Domänen - auch am β -Kohlenstoff eines Intermediates einzufügen, dem sogenannten „ β -branching“. Zusätzlich können nach der Biosynthese durch Post-PKS-Schritte weitere Modifizierungen, wie z. B. Glykosilierungen und Halogenierungen, eingefügt werden [52, 54].

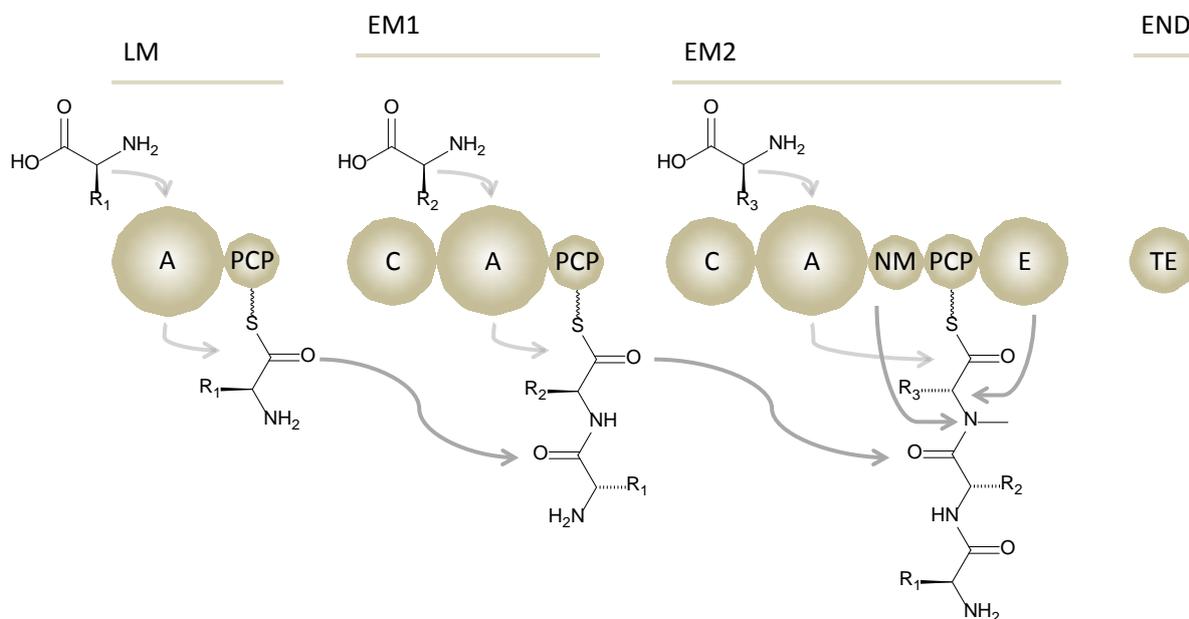


Abbildung 1.9: Schematischer Aufbau einer Nichtribosomalen Peptidsynthetase. Die braunen Kugeln symbolisieren Proteindomänen, die wie bei den PKS in Modulen gegliedert sind. Über den Domänen in schwarz dargestellt befinden sich die jeweiligen Aminosäuren, die von der A-Domäne erkannt, mittels ATP zum Adenylat aktiviert und anschließend auf das PCP transferiert werden (diese Zwischenreaktionen sind hier aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht dargestellt). Eine detaillierte Erläuterung, auch der Abkürzungen, findet sich im Text.

Auch bei den nichtribosomalen Peptidsynthetasen (NRPS) werden die Apo-Peptidylcarrierproteine (PCP, so benannt da sie die wachsende Peptidkette tragen) mittels Phosphopantetheinylierung aktiviert. Diese erfüllen eine ähnliche Funktion wie die ACP bei den PKS. Wie in Abbildung 1.9 gezeigt, belädt die Adenylierungsdomäne (A) das Peptidylcarrierprotein mit der Verlängerungseinheit. Dies ist in der Regel eine L-Aminosäure die, je nach Spezifität der Adenylierungsdomäne, proteinogen oder nicht proteinogen sein

kann (dies stellt eine Möglichkeit für strukturelle Vielfalt jenseits der ribosomalen Peptidsynthese dar). Diese Aminosäure wird unter ATP-Verbrauch als Adenylat aktiviert und dann auf das PCP transferiert. Der Mechanismus der Elongation ist ein ähnlicher wie bei der Polyketidbiosynthese.

Im ersten Verlängerungsschritt erfolgt ein von der Kondensationsdomäne (C) im EM1 katalysierter, nukleophiler Angriff des Stickstoffs am C1 des Substrates vom LM. Die drei Domänen des EM1 stellen das minimale NRPS-Elongationsmodul dar, die beiden Domänen des LM das minimale Lademodul. Im EM2 sind zwei zusätzliche Domänen gezeigt: eine *N*-Methyltransferase-Domäne (NM), welche die Verlängerungseinheit vor der Kettenverlängerung *N*-methyliert [53], sowie eine Epimerisierungsdomäne (E), die das Produkt nach der Kondensation an C2 epimerisiert [53]. Die Freisetzung erfolgt wieder über eine Thioesterase. Außer den gezeigten Domänen existieren weitere wie Cyclisierungs- und Oxidationsdomänen. Diese können Thiazolin- oder Oxazolinringe einführen, wenn vorher ein Cystein, Serin oder Threonin eingebaut wurde. Weitere Spezialfälle werden in der Literatur beschrieben, wie beispielsweise die Einführung einer Harnstoffbrücke in die Kette [56]. Post-NRPS-Modifikationen wie Glykosylierung, Halogenierung oder oxidative Zyklisierung phenolischer Seitenketten durch Cytochrom P450-Enzyme tragen weiter zur strukturellen Vielfalt dieser nichtribosomal produzierten Peptide bei [55, 57, 58].

Myxobakterielle Produkte sind in pharmazeutischer Hinsicht interessant, da bisher für ca. 50% der bekannten Substanzen eine antifungale, sowie für ca. 30% eine antibakterielle Wirkung beschrieben wurde [51]. Eine Vielzahl an myxobakteriellen Naturstoffen weist außerdem zytotoxische Eigenschaften auf [48, 51]. Abbildung 1.10 zeigt exemplarisch drei myxobakterielle Substanzen mit verschiedenen Bioaktivitäten.

Corallopyronin A wirkt antibakteriell durch Inhibierung der prokaryotischen RNA-Polymerase. Die Aktivität gegen Rifampicin-resistente Mycobakterien macht diese Substanz, sowie Myxopyronin und Ripostatin, zu interessanten Antibiotika aus Mycobakterien [51]. Soraphen inhibiert die fungale Acetyl-CoA Carboxylase mittels eines neuen Mechanismus'. Unglücklicherweise wurden bei den Soraphenen teratogene Eigenschaften festgestellt, die einen Einsatz dieser Substanzklasse limitieren [51]. Antimitotisch wirkende Disorazole weisen sehr hohe Zytotoxizitäten auf, die zu den höchsten in der Literatur beschriebenen Werten zählen (IC_{50} Disorazol A₁ = 3 pM für L929 Mausfibroblasten, [51]). Neue Grundstrukturen in Kombination mit bisher unbekanntem Wirkmechanismen machen Mycobakterien zu vielversprechenden Produzenten für Wirkstoffscreenings. Zusätzlich kommt die vergleichsweise geringe Zahl an untersuchten Stämmen und bisher isolierten Strukturen hinzu. Dadurch ist die Chance der Wiederentdeckung bereits bekannter

Substanzklassen weniger hoch als bei den mittlerweile sehr ausgiebig erforschten Aktinomyceten [48, 56].

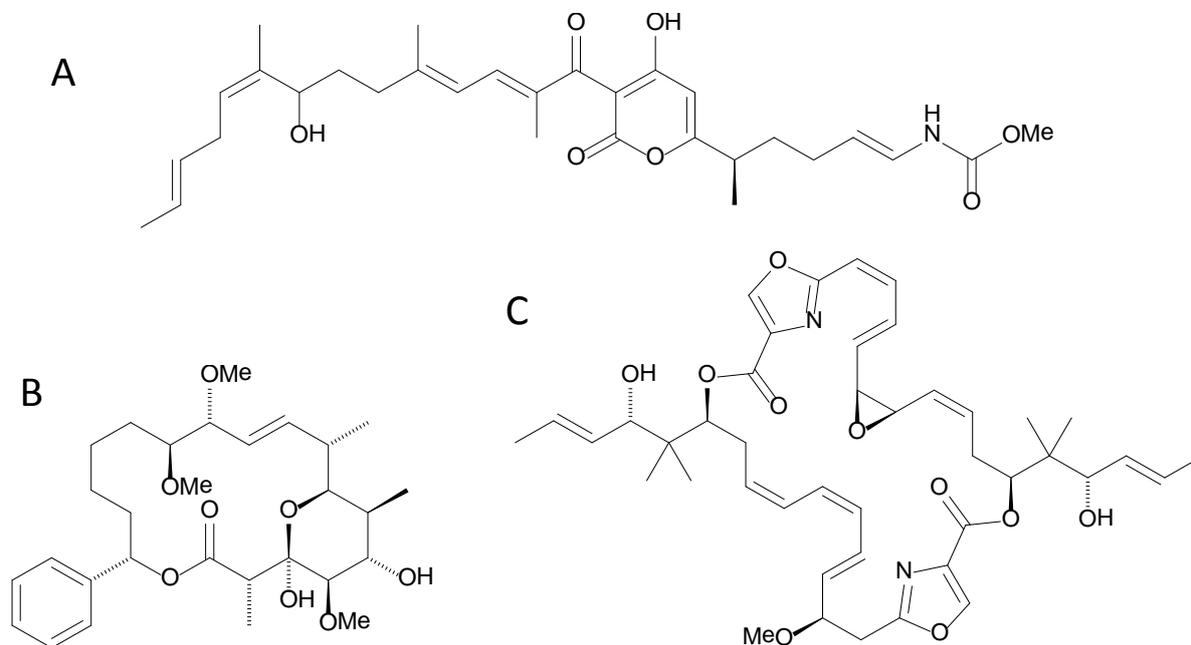


Abbildung 1.10: Exemplarische myxobakterielle Sekundärmetabolite. (A) Coralolopyronin A besitzt eine antibakterielle Aktivität durch Inhibition der RNA-Polymerase. (B) Soraphene wirken antifungal durch Inhibition der Acetyl-CoA-Carboxylase. (C) Disorazole weisen, aufgrund ihrer depolymerisierenden Wirkung auf Mikrotubuli, eine außerordentlich hohe Zytotoxizität auf [51].

1.3 BIOPROZESSTECHNIKEN FÜR SCREENING UND PRODUKTION NEUER NATURSTOFFE

Bioprozesse finden in der Regel in einem von der Umwelt abgeschlossenen Raum unter Zuhilfenahme eines oder mehrerer Biokatalysatoren statt. Dieser Raum, innerhalb dessen ein stringent kontrollierter Stoffaustausch mit der Umwelt stattfinden kann, wird in der Regel als Bioreaktor bezeichnet und kann verschiedenste applikationsspezifische Formen aufweisen. So kann streng genommen auch eine intakte Zelle als eine Art Bioreaktor betrachtet werden. Die Aufgabe eines Bioreaktors ist es, kontrollierte und reproduzierbare Umgebungsbedingungen zu erzeugen, die in vielen Fällen dazu dienen, Mikroorganismen zu kultivieren und diese wiederholbar zur Produktion von erwünschten Biomolekülen zu veranlassen [60]. Die Mehrzahl aller Bioprozesse bzw. Kultivierungsexperimente in der biotechnologischen und mikrobiologischen Forschung findet in geschüttelten Kulturgefäßen jeglicher Art statt; Schätzungen gehen von etwa 90% aus [61]. Der Grund hierfür liegt in der Einfachheit der Bedienung von Schüttelinkubatoren und Schüttelflaschen in verschiedenen

Ausführungen. Weit weniger Beachtung findet allerdings die Standardisierung der Kultivierung in diesen Gefäßen. In vielen Fällen werden beispielsweise nur ungefähre Füllmengen der Schüttelgefäße verwendet. Hinzu kommen feste Drehzahlen der Schüttler, die entweder nicht optimiert wurden oder soweit reduziert sind, dass die größten, auf dem Gerät befindlichen Gefäße nicht heruntergeschleudert werden. Das hat zur Folge, dass viele Experimente im Hinblick auf die Sauerstoffversorgung der untersuchten Mikroorganismen unter unkontrollierten und oft nicht optimalen Bedingungen ablaufen. Diese können häufig nicht reproduziert werden, da die genauen Parameter, wie Schüttelfrequenz und -amplitude, Kultivierungsgefäß und Füllhöhe bzw. Füllmenge, nicht dokumentiert werden [61]. Die Folgen unterschiedlicher Füllhöhen, Drehzahlen und Viskositäten der Medien können das sogenannte „in-“ beziehungsweise „out of phase“ Schütteln der Kulturflüssigkeit sein, welches immensen Einfluss auf den Sauerstofftransfer ins Medium hat. Ein weiterer Faktor ist die Wahl des Gefäßverschlusses, welcher die Sauerstoffdiffusion erheblich behindern kann [61, 62]. Das Unterbrechen des Schüttelns kann zum vollständigen Verbrauch des gelösten Sauerstoffs im Kulturgefäß führen. Bei niedrigen Massentransferraten dauert es dementsprechend lange, bis sich das Gleichgewicht wieder eingestellt hat. Die Folgen können beispielsweise ein unvorhersehbares Stressverhalten des untersuchten Mikroorganismus aufgrund von Sauerstoffmangel sein [61]. Für verschiedene Sekundärmetabolite konnte zudem eine direkte Korrelation der Produktion mit dem Sauerstoffpartialdruck in der Flüssigphase des Schüttelgefäßes gezeigt werden, was die Wichtigkeit der Kontrolle speziell dieses Parameters schon bei Initialscreenings unterstreicht [63, 64].

Trotz der genannten Nachteile haben geschüttelte Prozesse bei kontrollierter Prozessführung den Vorteil der einfachen Durchführbarkeit und ermöglichen dadurch hohe Durchsatzraten bei geringem Arbeitsaufwand. Dies kann für ein Erstscreening von vielen Kandidatenorganismen von wesentlicher Bedeutung sein. Abbildung 1.11 zeigt das Verhältnis des Informationsgewinns zur entsprechenden Kultivierungsmethode. Je komplexer die Methode, desto höher ist in der Regel auch der Informationsgewinn. Dadurch werden jedoch lange Vorbereitungszeiten und Datenbearbeitungszeiten verursacht und der maximal mögliche Durchsatz wird in der Regel reduziert [65].

Kostengünstige kommerzielle Lösungen wie das Duetz-System ermöglichen den Einsatz von 96-Deepwell Mikrotiter-Platten zur Kultivierung. Mit diesen können bei entsprechender Prozessführung Ergebnisse vergleichbar zu denen in Schüttelkolben erzielt werden. Das System kann sowohl für filamentös- als auch suspendiert-wachsende Organismen verwendet werden. Der Einsatz des 96-Wellformats erlaubt die Automatisierung und Vereinfachung weiterer Arbeitsschritte im Vergleich zur Kultivierung in herkömmlichen Schüttelkolben [66, 67, 68]. Bedingt durch Weiterentwicklungen in allen Bereichen der

Analytik reduzieren sich auch die Substanzmengen, die für Aktivitätsassays und beispielsweise für HPLC-gekoppelte, massenspektrometrische Analysen benötigt werden. Dadurch werden selbst μl -Volumen für Screening-Kultivierungen immer interessanter [18, 19, 20, 21]. Bei allen diesen, oben beschriebenen Kultivierungen findet der Prozess allerdings weitgehend unkontrolliert statt. Durch die Parallelisierung können zwar unterschiedliche Bedingungen, wie z. B. Medienzusammensetzungen oder pH-Einfluss, im Hochdurchsatz getestet werden, die eigentliche Kultivierung verläuft allerdings ohne Erfassung der zugehörigen Messdaten. Diese können zwar nach Anhalten des Schüttlers off-line gemessen werden, was jedoch wie oben erwähnt gravierende Einflüsse auf den Metabolismus der untersuchten Organismen haben kann, da hierdurch die Sauerstoffzufuhr unterbrochen wird [61].

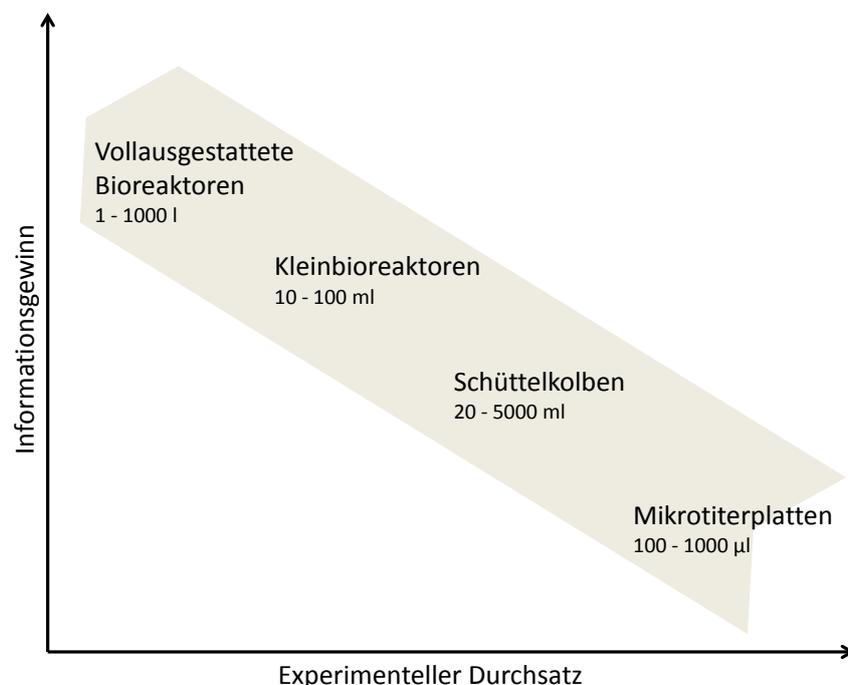


Abbildung 1.11: Informationsgewinn gegenüber dem experimentellen Durchsatz. Durch Vereinfachung der Kultivierungsbedingungen ist generell ein höherer Durchsatz an Experimenten möglich. Die Vorbereitungszeit, Kultivierungsdauer und Auswertung von erzeugten Daten minimiert in der Regel den Durchsatz bei Experimenten die in Bioreaktoren mit sehr viel Messsensorik durchgeführt werden.

Die Entwicklung von Indikator-Farbstoffen, welche für die Detektion von pH-Wert, Sauerstoff-, Ammonium-, CO_2 -, und Ionen-Konzentrationen verwendet werden können, stellt in dieser Hinsicht einen Durchbruch dar [69]. Diese erlauben eine platzsparende Unterbringung von so genannten Indikatortspots innerhalb eines Kulturgefäßes. Die Anregung und Auslesung dieser Spots erfolgt außerhalb des Kulturvolumens durch Lichtleiter und entsprechende Instrumente, wodurch gegenüber herkömmlichen Elektroden

sehr viel weniger Platz benötigt wird. Dies ermöglicht u. a. Kultivierungen in Mikrotiterplatten bei gleichzeitiger Onlinemessung relevanter Parameter. Zusätzlich können mit dieser Technik Werte wie Fluoreszenz und optische Dichte bzw. Lichtstreuung gemessen werden, was zusätzliche Rückschlüsse über das Wachstum der Kultur im Well erlaubt [70, 71]. Kommerzielle Systeme wie der Biolector der Firma m2p-labs ermöglichen so geschüttelte Kultivierungen von Zellen und Mikroorganismen bei gleichzeitigem Monitoring verschiedener Parameter. Der pH-Wert und die Gaszufuhr werden für alle Wells über die Schüttelfrequenz bzw. die Gasphasenzusammensetzung geregelt [70, 72]. Dieses System kann mit verschiedenen kommerziell erhältlichen Pipettierrobotern kombiniert werden, was automatisierte Fütterungen, Induktion usw. ermöglicht [72]. Diese Kultivierungsform eignet sich jedoch hauptsächlich für ein Primärscreening, bei dem ein Produzent eines Wirkstoffes oder ein verbesserter Produktionsklon aus einer Gruppe anderer gefunden, bzw. Medien optimiert werden sollen. Bauartbedingt lassen sich jedoch bestimmte physikalische Parameter nur für die gesamte Kultivierung ändern, was speziell im Hinblick auf eine Prozessentwicklung von Nachteil ist. Weiterentwicklungen geschüttelter und auslesbarer Mikrotiterplatten sind Systeme, die, in Kombination mit Mikrofluidik, beispielsweise eine pH-Kontrolle oder einen miniaturisierten *Fed-Batch*-Prozess ermöglichen [73].

Mikrofluide Systeme ermöglichen einen derartigen Miniaturisierungsgrad, dass mit dieser noch relativ neuen Technologie in naher Zukunft unter Umständen Miniaturkultivierungen durchgeführt werden können, welche ein automatisiertes Monitoring verschiedener Parameter bei sehr hohen Durchsatzraten erlauben. Die Steuerung, Mischung und Zusammenführung von Mikrotropfen innerhalb der Kapillaren ist bereits problemlos realisierbar. Diese können z. B. monoklonale Bakterienkolonien enthalten, die in einem Tropfenvolumen im niedrigen Nanoliterbereich innerhalb einer öligen Trägerflüssigkeit kultiviert werden. Biochemische Reaktionen können durchgeführt werden und selbst die Analyse einzelner Tröpfchen aus einem segmentierten Fluss durch massenspektrometrische Methoden wurde schon durchgeführt [74, 75, 76, 77]. Durch Anwendung sauerstoffpermeabler Materialien können auch länger dauernde Experimente mit Mikroorganismen durchgeführt werden. Obwohl bisher Fluoreszenz der überwiegende *Read-out* ist, erlaubt der Einsatz der oben erwähnten Indikatorfarbstoffe auch hier bereits ein pH-Monitoring im Miniaturmaßstab. Auch Säugerzellen, Drosophila-Embryos und Nematoden konnten über längere Zeit in segmentierten wässrigen Tröpfchen innerhalb einer öligen Trägerflüssigkeit kultiviert werden, was enormes Potenzial für miniaturisierte Hochdurchsatz-Screenings birgt [77, 78, 79]. Durch Mikrofluidik, in Kombination mit den oben beschriebenen Analysetechniken, lassen sich auch gerührte Mikrobioreaktoren realisieren, die trotz maßstabsbedingter Unterschiede zur makroskopischen Fluidik eine ähnliche Performance wie große Rührkesselreaktoren erzielen. Die relativ günstigen Produktionsbedingungen

durch Verwendung kostengünstiger Kunststoffe erlauben eine Einmalverwendung ohne vorheriges sterilisieren, was für Prozessoptimierungen im Hochdurchsatz eine hohe Zeit- und Aufwandsparnis gegenüber herkömmlichen *Bench-Top*-Geräten bedeutet [80, 81].

Das Problem bei Wirkstoffscreenings mit bakteriellen Produzenten in diesem Maßstab sind allerdings die geringen Mengen, die eine aktivitätsgeleitete Charakterisierung von Einzelsubstanzen nicht zulassen, sondern nur beschränkte Informationen, wie „Extrakt ist aktiv“ oder „inaktiv“, liefern können. Aus diesem Grund eignen sich diese Prozesse außerordentlich gut, wenn bekannte Variablen optimiert werden sollen. Für ein bakterielles Wirkstoffscreening sind solche miniaturisierten Ansätze jedoch eher ungeeignet, da hier meist Substanzmengen benötigt werden, die in solch kleinen Volumina nicht erzeugt werden können (siehe Abbildung 1.3). Einen weiteren wichtigen Faktor stellt das Wachstumsverhalten der untersuchten Mikroorganismen dar. Die wichtigsten Produzenten von bioaktiven Sekundärmetaboliten, wie Streptomyceten, Pilze und auch Myxobakterien, weisen häufig ein myzel- bzw. pelletartiges Wachstum auf und neigen oft dazu, sehr stark auf Oberflächen zu adhären. Dies ist sehr wahrscheinlich ein Grund dafür, dass in der Literatur bisher nur Mikrosysteme mit suspendiert wachsenden Organismen beschrieben werden. Größere Volumina im 10-100 ml Maßstab können mit sogenannten Minibioreaktoren erzeugt werden, was das Problem der geringen Mengen teilweise löst [82].

Traditionell werden in der biotechnologischen Forschung und Industrie überwiegend Rührkesselreaktoren verwendet. Diese haben in der chemischen Industrie eine lange Tradition, weshalb umfangreiche Erfahrungen für Applikationen und Auslegung dieser Geräte vorliegen [60]. Mittlerweile bieten mehrere Firmen Rührkesselreaktoren in den verschiedensten Größen an, die ein einfaches *Up-* und *Downscaling* zwischen verschiedenen Volumina ermöglichen, wenn die relevanten Kultivierungsparameter erfasst wurden. Auch hier geht die Tendenz zur Miniaturisierung, weil dadurch die Handhabbarkeit der Systeme vereinfacht und der Durchsatz erhöht werden kann. Die Firma DASGIP (Eppendorf) bietet z. B. parallele Bioreaktorsysteme an, die bedingt durch exakte Pump- und Messtechnik schon im 100 ml Volumen eine Prozessentwicklung ermöglichen, wie sie bis vor wenigen Jahren mit kommerziellen Systemen dieses Maßstabs nicht realisierbar war [82]. Die zugrunde liegenden Reaktorsysteme sind, wie oben bereits erwähnt, in den meisten Fällen Rührkesselreaktoren.

In der Literatur beschriebene Bioprozesse mit Myxobakterien stellen eher Ausnahmen dar. Für die Produktion von einzelnen Metaboliten, wie den Coralopyroninen, Soraphenen oder den Disorazolen (siehe Abbildung 1.10), finden sich zwar Beispiele, es wurden jedoch entweder teilweise unregelmäßige *Batch*-Prozesse oder einfache *Fed-Batch*-Prozesse in Rührkesselreaktoren angewendet [83, 84, 85]. Weiterentwickelte Prozessstrategien sind in

der Literatur sehr selten beschrieben. Eines der wenigen Beispiele stellt die heterologe Produktion von Epothilon D in *Myxococcus xanthus* dar, dem bislang am besten untersuchten Myxobakterium. Hier wurden unter anderem die Einflüsse des Sauerstoffpartialdrucks und die Einflüsse verschiedener Kultivierungsmethoden, wie *Batch*-, *Fed-Batch*- und Semikontinuierlicher-Kultivierung, auf die Produktivität hin untersucht [86, 87]. Gründe für das häufige Fehlen dieser Daten liegen sicherlich in der komplexen Handhabung dieser Organismen. Die Empfindlichkeit und die langen Wachstumszeiten verursachen Probleme und Kosten, die möglicherweise der Grund dafür sind, dass Myxobakterien bis heute weder in der Industrie noch an universitären Einrichtungen im Hinblick auf die Verfahrensentwicklung genauer untersucht wurden [88].

Dabei sind es diese aus verfahrenstechnischer Sicht negativen Eigenschaften, die eine verbesserte und verlängerte Produktivität des Produktionsprozesses nötig machen. Dadurch werden Ressourcen und Kosten gespart, bzw. ist es möglich, dass dadurch ein Prozess erst rentabel wird [86]. Zudem können manche auf den ersten Blick ungünstig erscheinenden Eigenschaften der Myxobakterien, wie ihre Fähigkeit zur Adhärenz, genutzt werden um Prozesse zu entwickeln die von eben diesen Eigenschaften profitieren. Als Grundmodelle können beispielsweise die in Abbildung 1.12 dargestellten Reaktortypen verwendet werden.

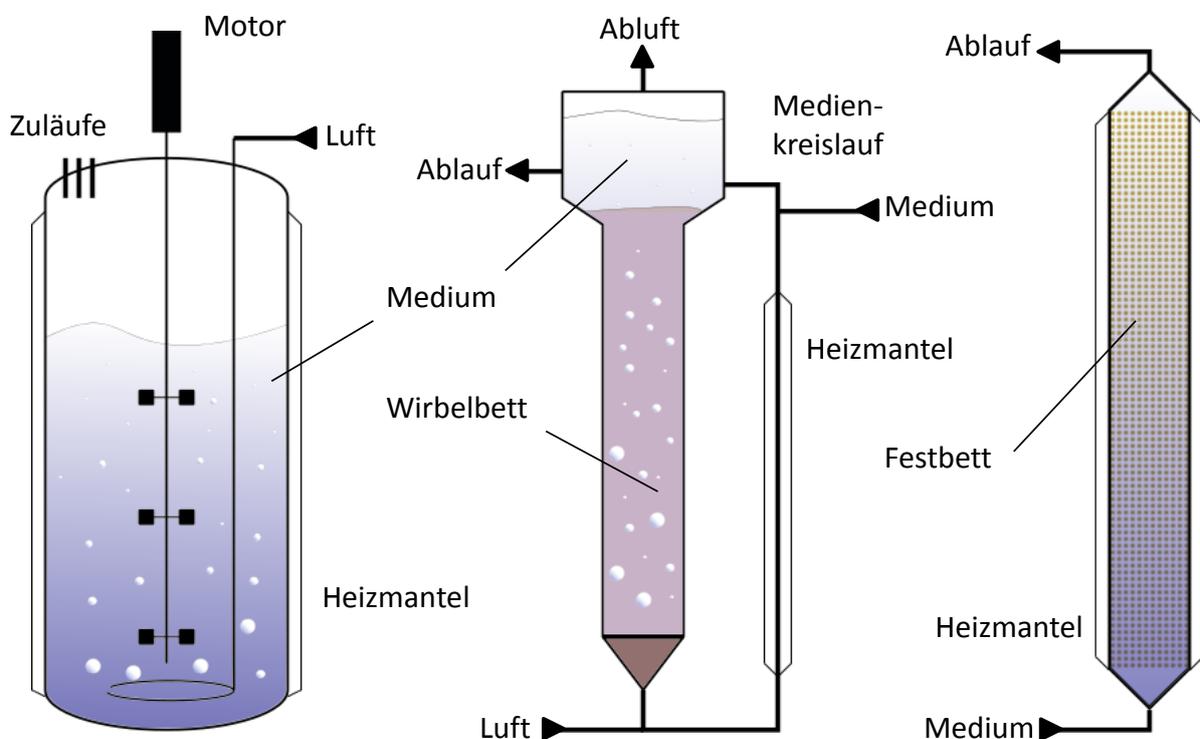


Abbildung 1.12: Bioreaktortypen. Von links nach rechts: Rührkessel, Wirbelschicht und Festbettreaktor

Rührkesselreaktoren, aber auch Wirbelschicht- und Festbettreaktoren, bieten aufgrund ihrer Einfachheit interessante Ausgangspunkte, um applikationsbedingte Spezialreaktoren zu konstruieren. In einem Festbettreaktor des in Abbildung 1.12 gezeigten Typs konnten z. B. unter anaeroben Bedingungen mit Biofilm-bildenden *Zymomonas mobilis* Zellen Ethanol-Ausbeuten von 536 g pro Liter und Stunde erzielt werden [89]. Dies ist zwar ein Produkt des Primärmetabolismus, die hohe Ausbeute ist dennoch eindrucksvoll und wurde durch das Besiedeln von so genannten Trägermaterialien, durch Ausbildung einer Art Biofilm, ermöglicht. Prinzipiell scheint das Wachstum als Biofilm auch ein begünstigender Faktor für die Sekundärmetabolitproduktion zu sein, was bei Bioprocessen mit fungalen Produzenten bereits gezeigt werden konnte [90]. Möglicherweise können auch Myxobakterien von ähnlichen Kultivierungsformen profitieren. Das Fehlen von Studien jedweder Art eröffnet hier ein interessantes Forschungsfeld. Aufgrund der ausschließlichen Verfügbarkeit von Rührkesselreaktoren an unserem Institut, beschränkt sich diese Arbeit allerdings auf Prozessoptimierung in diesem Reaktortyp.

1.4 ENTDECKUNG UND CHARAKTERISIERUNG NEUER (BIOLOGISCH AKTIVER) NATURSTOFFE

Die erfolgreiche Detektion, Isolierung und Charakterisierung von neuen, biologisch aktiven Molekülen aus natürlichen Quellen hängt von mehreren Faktoren ab. Zuerst wird ein Produzent bzw. eine Quelle für Ausgangsmaterial benötigt. Sobald Rohmaterial produziert wurde, muss ein Assay vorhanden sein oder entwickelt werden, um eine Wirksamkeit nachzuweisen. Dann erfolgen eine Auftrennung des normalerweise komplexen Substanzgemisches und eine erneute Testung der einzelnen Fraktionen. Dies geschieht meist in mehreren Durchläufen. Die physikalischen Trennprinzipien, die in einem Separationsprozess in der Regel Anwendung finden, haben in den letzten Jahrzehnten keine grundlegenden Erweiterungen erfahren. Üblicherweise werden Lösemittelextraktionen und *High Performance Liquid Chromatographie* (HPLC) für die Analytik und die präparative Aufarbeitung eingesetzt. Durch Weiterentwicklung der verwendeten Materialien konnten jedoch insbesondere im Bereich der Flüssigchromatographie bessere Trennleistungen bei gleichzeitig reduzierten Trennzeiten erreicht werden [91, 92].

Um den extrem hohen Arbeitsaufwand einzuschränken, der für die vollständige Charakterisierung eines Naturstoffes nötig ist, wird von Anfang an versucht mittels Dereplikation bereits bekannte Substanzen von der weiteren Bearbeitung auszuschließen. Üblicherweise wird das mit HPLC- oder UPLC-gekoppelte, hochauflösende Massenspektrometrie und UV/Vis Dioden Array Detektoren (DAD) versucht, ist jedoch nicht ausschließlich auf diese beschränkt und kann durch kernresonanzspektroskopische

Methoden erweitert werden [93, 94]. Einen wirkungsvollen und universellen Ansatz auf dem Gebiet der Massenspektrometrie stellen Geräte mit Elektrosprayionisierung (ESI) dar, da mittels dieser weichen Ionisierungstechnik meist intakte Moleküle ionisiert werden. Dies ermöglicht, in Kombination mit Time-of-Flight (TOF) oder Orbitrap-Messungen, die Bestimmung oder zumindest Eingrenzung der chemischen Summenformel eines Moleküls [95, 96]. Diese kann dann - vorzugsweise zusammen mit Retentionszeit-Datenbanken - für die automatisierte Dereplikation unbekannter Extrakte genutzt werden. Unglücklicherweise lassen sich nicht alle Substanzen gleichermaßen gut ionisieren, weshalb schätzungsweise bis zu 10% der Substanzen im positiven ESI-Modus (ESI^+) nicht detektiert werden können. Negative ESI oder eine andere Ionisierungsmethode wie z. B. die *Atmospheric Pressure Chemical Ionisation* (APCI). Kann hier unter Umständen Abhilfe schaffen [95, 96]. Es ist allerdings empfehlenswert ESI^+ und ESI^- immer in Kombination zu verwenden, da es auch bei dieser schonenden Ionisierung bereits in der Quelle zu Molekülfragmentierungen kommen kann und so z. B. Zuckerreste bei positiver Ionisierung häufig verloren gehen. Durch den Vergleich beider Spektren ($\text{ESI}^+/\text{ESI}^-$) besteht die Möglichkeit einer einfachen Kontrolle. Die Auswertung von Fragmentspektren eröffnet weitere Möglichkeiten, um auch Teilstrukturen in komplexen Gemischen zu identifizieren und dadurch auch Substanzderivate von vorneherein ausschließen zu können. Allerdings kann schon die Art des gebildeten Ions Einfluss auf die Fragmentierung haben, weshalb sich der Aufbau einer MS und MS/MS Bibliothek bekannter Reinstoffe unter den standardmäßig verwendeten Bedingungen auszahlt [97]. Der Einsatz von HPLC gekoppelter NMR-Spektroskopie für die Dereplikation wird durch die Tatsache erschwert, dass NMR-Spektren durch die Überlagerung mehrerer Substanzsignale unbrauchbar werden können. Dies hat bei MS-Spektren, bei geeigneter Wahl der Analysebedingungen und unterschiedlichen Massen der Analyten, kaum Einfluss auf die Auswertung der Daten. Zudem werden, aufgrund der sehr viel höheren Sensitivität im Vergleich zur Kernresonanz, für die Aufnahme von MS-Spektren sehr viel kleinere Substanzmengen benötigt. Bei sauberen Spektren ist allerdings der Informationsgewinn durch Kernresonanz höher, da anhand der chemischen Verschiebung aus einem ^1H -Spektrum strukturelle Elemente wie α -Protonen von Peptiden, Protonen in Doppelbindungen und Aromaten usw. ausgelesen werden können, was wiederum die schnelle Zuordnung eines Moleküls erleichtert. Es kommt jedoch vor, dass die Komplexität der Gemische und die Ähnlichkeit der Substanzen so hoch ist, dass nur mehrfache Separierung und die Zuhilfenahme verschiedener Techniken eine eindeutige Zuordnung erlaubt, was in solchen Fällen eine standardmäßige schnelle Dereplikation unmöglich macht [98].

Um ein aktivitätsbasiertes Screening durchzuführen, müssen spezifische Nachweise für eine gesuchte Aktivität existieren. Bei einem Primärscreening basiert der Aktivitätsnachweis in der

Regel auf einer Wirkung, die an lebenden Zellen (Pro- oder Eukaryoten) festgestellt wird. Testassays für spezifische Wirkungen stellen in der Regel Spezialentwicklungen dar, die beispielsweise ein aufgereinigtes Protein enthalten, wenn spezifische Inhibitoren für ein Enzym oder ein definiertes Target gesucht werden. Eine Inhibition oder Aktivität wird meist durch einen Farbumschlag oder eine ähnlich einfach messbare Reaktion wie Fluoreszenz angezeigt. Mittlerweile existieren unzählige Ganzzelltestsyste und enzymatische Assays, so dass auf eine Auflistung an dieser Stelle verzichtet wird. Eine generelle Tendenz bei allen Assays geht jedoch zur Miniaturisierung, da dadurch Substrate und Testsubstanzen eingespart werden können. Durch Miniaturisierung kann der Probendurchsatz in der Regel erhöht werden, woher auch die Bezeichnung *High Throughput Screening* (HTS) stammt. Auch in diesem Feld scheint die Mikrofluidik weiteres Potenzial für einen noch höheren Durchsatz mit ganzen Organismen im Picoliter-Maßstab zu bergen [99, 100,101]. Hochauflösende Mikroskopie, in Kombination mit automatisierter Bildauswertung, erlaubt die Beobachtung von Zellen und Zellkompartimenten, sowie die Quantifizierung von Änderungen auf den erzeugten Bildern, im Vergleich zu Standards. Diese neue Dimension an Information gab dem Verfahren den Namen *High-Content Screening* (HCS). Damit werden nicht nur Aussagen wie „Zellen sind tot“ oder „noch lebendig“ gemacht, sondern es können exakte Informationen über den metabolischen Zustand einer Zelle gewonnen werden. Reporterzelllinien in denen GFP-Fusionsproteine (*Green Fluorescent Protein*) exprimiert werden, ermöglichen beispielsweise Translokationsstudien. Die intrazelluläre Beobachtung spezifischer Signalmoleküle (z. B. Transkriptionsfaktor NF κ B) erlaubt dadurch beispielsweise Aussagen über mögliche entzündungshemmende Eigenschaften einer Substanz. Es besteht prinzipiell die Möglichkeit, alle Moleküle, die sichtbar gemacht werden können (wie z. B. Virenpartikel durch Antikörper), räumlich aufgelöst in der Zelle zu beobachten und dadurch zusätzlichen Informationsgewinn zu erhalten [102, 103].

Durch die große Zahl an dreidimensionalen Proteinstrukturen und Strukturdaten kleiner organischer Moleküle in öffentlich zugänglichen Datenbanken lassen sich heute auch sogenannte virtuelle Screens durchführen. Diese sind ein weiteres Hilfsmittel, z. B. bei der gezielten Vorauswahl bestimmter Kandidaten für ein reales Screening oder bei der Suche nach spezifischen Wirkstoffen für ein einzelnes Target [104, 105]. Das Grundprinzip dieser Methodik - sehr vereinfacht dargestellt - ist die Formulierung einer dreidimensionalen Struktur eines Moleküls sowie potentieller Bindetaschen auf Proteinoberflächen in einer Form, die computergestützte, automatisierte Analysen ermöglicht. Diese Form beinhaltet die räumliche Struktur und kann auch Daten zur Möglichkeit der Ausbildung polarer und unpolarer Wechselwirkungen und der Möglichkeit von Wasserstoffbrückenbildung enthalten. Sind diese Daten für eine Moleküldatenbank erzeugt worden, können sie beispielsweise automatisiert mit einzelnen Targets abgeglichen werden. Dadurch können z. B. von

vorneherein Moleküle ausgeschlossen werden, die aufgrund physikalischer Eigenschaften als Kandidaten für ein reales Screening ausscheiden. So läßt sich der häufig große Arbeitsaufwand der realen Versuche schon im Vorfeld reduzieren. Es können zudem auch Molekül- und Targetdatenbanken miteinander abgeglichen werden, um potentielle „Binder“ zu identifizieren [104, 105] und nachfolgend im realen Versuch zu untersuchen.

Nach der Aufreinigung einer Substanz erfolgt üblicherweise die Charakterisierung mittels kristallographischer- oder NMR-spektroskopischer Methoden. Im Falle einer nichtkristallisierenden Substanz erfolgt die Charakterisierung der planaren Struktur üblicherweise mittels ein- und zweidimensionaler NMR-Spektren wie ^1H , ^{13}C , HH-COSY, TOCSY, HMBC und HSQC. Die hochauflösende Massenspektrometrie liefert wichtige Informationen zur Summenformel und dadurch zu Heteroatomen, welche über Standard-Messungen am NMR nicht zugänglich sind [96, 106]. Für die Bestimmung der dreidimensionalen Konfiguration eines Moleküls werden Techniken wie ROESY oder NOESY genutzt, die anhand des Vorhandenseins eines Signals sowie der Signalstärke die räumliche Anordnung von Protonen im Molekül anzeigen können [106]. Häufig werden auch chemische Derivatisierungen durchgeführt, um die absolute Konfiguration eines Moleküls endgültig zu etablieren. Dazu gehören beispielsweise *Advanced Marfey's* in Kombination mit HPLC/MS um die Stereochemie von Aminosäuren zu bestimmen [107] oder eine Veresterung nach Mosher um die Konfiguration einer Carbinol-Gruppe mittels NMR zu bestimmen [108].

1.5 ZUR VORLIEGENDEN ARBEIT

Mit dieser Arbeit sollte die Möglichkeit untersucht werden, Screening- und Produktionsprozesse zu vereinen und miteinander abzustimmen. Durch die Kultivierung in einem Kleinbioreaktor konnten prozess- und damit produktionsrelevante Parameter überwacht und aufgezeichnet werden. Die produzierten Mengen waren gleichzeitig ausreichend für eine aktivitätsgeleitete Identifizierung sowie für eine teilweise Aufreinigung und Charakterisierung dieser Metabolite. Durch die Applikation einer speziellen Kultivierungstechnik, die im Folgenden näher beschrieben wird, war es möglich, die Einflüsse verschiedener physikalischer und chemischer Parameter auf das Produktionsverhalten eines Testorganismus zu untersuchen. Hierfür konnte eine einzelne Kultur verwendet werden, welche verschiedene Testzyklen durchlief. Die Einzelzyklen waren so gestaltet, dass die Produktivitäten direkt miteinander verglichen und dadurch Rückschlüsse auf verbesserte Produktionsbedingungen hinsichtlich einzelner Metabolite getroffen werden konnten. Dadurch war es möglich, diesem *in-depth* Screening eine Produktion interessanter Substanzen direkt in größerem Maßstab und unter verbesserten

Bedingungen anzuschließen. Somit konnten ausreichende Mengen Substanz für die Charakterisierung und Untersuchungen von Struktur-Aktivitätsbeziehungen einer Gruppe pharmazeutisch interessanter Moleküle produziert werden. Zusätzlich konnte mit den erzeugten Substanzmengen die Charakterisierung zweier Substanzklassen durchgeführt werden, die bis dahin nicht in der Literatur beschrieben waren.

Die Massenspektrometrie spielt für diese Arbeit eine wesentliche Rolle bei der Dereplikation, Quantifizierung und Charakterisierung von erzeugten Extrakten, sowie in Kombination mit Kernspinresonanzspektroskopie bei der Charakterisierung von Reinsubstanzen. Um eine möglichst breite und einfache Anwendbarkeit zu gewährleisten wurde auf die Entwicklung von Spezialmethoden und -gradienten verzichtet und es wurden überwiegend analytische Standardgradienten und -gerätekonfigurationen eingesetzt, was eine Adaption an spezielle Anforderungen jedoch nicht ausschließt. Dies gewährleistete die direkte Vergleichbarkeit der in dieser Arbeit erzielten Resultate mit Retentionszeit- und HRMS-Datenbanken, die mittels der am Institut etablierten Standardanalytik erzeugt wurden. Die primäre Zielsetzung war die Identifizierung, Charakterisierung und Produktionsoptimierung biologisch aktiver Substanzen. Aus diesem Grund wurde der Aufwand begrenzt, der für eine vollständige Charakterisierung von Substanzen mit bislang unklaren Wirkspektren nötig wäre. Substanzen die interessante biologische Aktivitäten aufwiesen, wurden für die weitere Bearbeitung in Kooperationsprojekten ausgewählt. Die grundlegenden Konzepte wurden mit einem ausgewählten Myxobakterium (Stamm SBCm007) erarbeitet. Die Gewinnung und Charakterisierung weiterer biologisch aktiver Substanzen aus anderen Produzenten wird in einem separaten Kapitel kurz beschrieben, da die Ergebnisse aus den Pilotversuchen auch erfolgreich auf andere Stämme übertragen werden konnten (Kapitel 6).

Da nach der Produktion der Extrakte bei der anschließenden Fraktionierung eine aktivitätsgeleitete Aufreinigung von Substanzen erfolgte, wurden Methoden benötigt mittels derer eine schnelle effiziente Auftrennung mit begleitender Testung möglich war. Hierfür waren vielfach Vorversuche zur Ermittlung der Assaykonditionen und Methodenerstellung unumgänglich. Aus diesem Grund wurde sehr eng mit Kooperationspartnern im Bereich der mikrobiellen- und eukaryotischen Testung zusammengearbeitet. Die meisten dieser Arbeiten übernahm Frau Dr. Jennifer Herrmann.

Da Teile der Arbeit bereits veröffentlicht wurden bzw. zur Veröffentlichung eingereicht sind, werden diese jeweils als eigenständiges abgeschlossenes Kapitel im Stil einer Publikation mit einem separaten Diskussionsteil sowie einem eigenem Literaturteil im Anhang präsentiert (Kapitel 2-5). Abschließend wird in Kapitel 7 die Arbeit im Gesamtkontext diskutiert.

2 REPEATED-BATCH-VERFAHREN FÜR EIN WIRKSTOFFSCREENING MIT PROZESSVERBESSERUNG

2.1 HINTERGRUND

Myxobakterien sind exzellente Lieferanten biologisch aktiver Naturstoffe mit neuen chemischen Grundstrukturen, die oftmals bisher nicht beschriebene Wirkmechanismen aufweisen [1]. Eine Evaluierung neuerer Literatur zeigt, dass immer noch Substanzen die neue chemische Strukturen darstellen, auch aus den schon lange bekannten und ausgiebig bearbeiteten Vertretern des Genus *Sorangium*, aufgereinigt werden können. Dazu gehören beispielsweise Sulfangolide, die einen Sulfatester enthalten (siehe Abbildung 2.1) und Chlorotonil A, mit ungewöhnlicher geminaler Chlorierung zwischen zwei Ketogruppen [2, 3]. Zudem liefern aktivitätsgeleitete Screenings nach wie vor neue Grundstrukturen mit pharmazeutisch interessanten Wirkungen, wie beispielsweise die antibakteriell wirksamen Thuggazine und Etnangiene [4, 5]. Hinzu kommt, dass durch die Entdeckung weiterer Arten und neuer Genera von Myxobakterien häufig der Zugang zu bislang unbekannter chemischer Diversität erschlossen wird [6]. Diese Tatsachen machen deutlich, dass das biosynthetische Potenzial dieser Produzenten - trotz aller in der Literatur dokumentierten Erfolge - bisher nur ansatzweise und für einige wenige Vertreter dieser Art erforscht wurde.

Die Suche nach neuen pharmazeutischen Leitstrukturen führte zu Weiterentwicklungen auf den Gebieten der chemischen und statistischen Analytik von bioaktiven Extrakten [7]. Ebenso erfuhr die angewandte Assaytechnik, die heutzutage von herkömmlichen Agardiffusions-Assays bis hin zu mikroskopiegestützten *High-Content-Assays* reicht, wesentliche Verbesserungen [8]. Dadurch konnten die für ein Screening benötigten Substanzmengen sehr stark reduziert werden. Eine der größten Limitierungen im Hinblick auf Myxobakterien stellt jedoch deren langsames Wachstum und die in den meisten Fällen sehr niedrigen Produkttiter, im Vergleich zu anderen Organismen wie den Aktinomyceten oder Bacilli, dar. Während bei diesen Produzenten Kultivierungsvolumina von 2-4 ml ausreichen, müssen für Myxobakterien Schüttelkolbenkultivierungen im bis zu 100 ml Maßstab für eine MS-basierte Dereplikation und ein Primärscreening durchgeführt werden. Dies erhöht den Arbeitsaufwand eines Screenings erheblich, da keine modularen Einheiten wie beispielsweise 24-Deepwell Platten - die im Streptomycetenscreening erfolgreich angewandt werden - eingesetzt werden können [9].

Der Einsatz geschüttelter Kulturgefäße zur Produktion von Ausgangsmaterial für ein Primärscreening ist, aufgrund der Einfachheit, in den meisten Fällen der beste Kompromiss für eine erste Vorselektion unter vielen möglichen Produzenten. Aus diesem Grund ist sie zu diesem frühen Zeitpunkt im „*Screening-Workflow*“ einer Kultivierung im Bioreaktor vorzuziehen. Aufgrund von in der Regel nicht vorhandener Mess-Sensorik in geschüttelten Kulturgefäßen, ist die Möglichkeit des Informationsgewinns bei dieser Kultivierungsform reduziert auf die Untersuchung der erzeugten Extrakte. Eventuelle Veränderungen des pH-Wertes oder Sauerstofflimitierungen werden nicht erkannt, wodurch unter Umständen interessante Produzenten aufgrund des Auftretens von suboptimalen Produktionsbedingungen unentdeckt bleiben, bzw. eine Produktion nicht reproduzierbar ist, da der auslösende Faktor nicht gemessen und erkannt wurde [10].

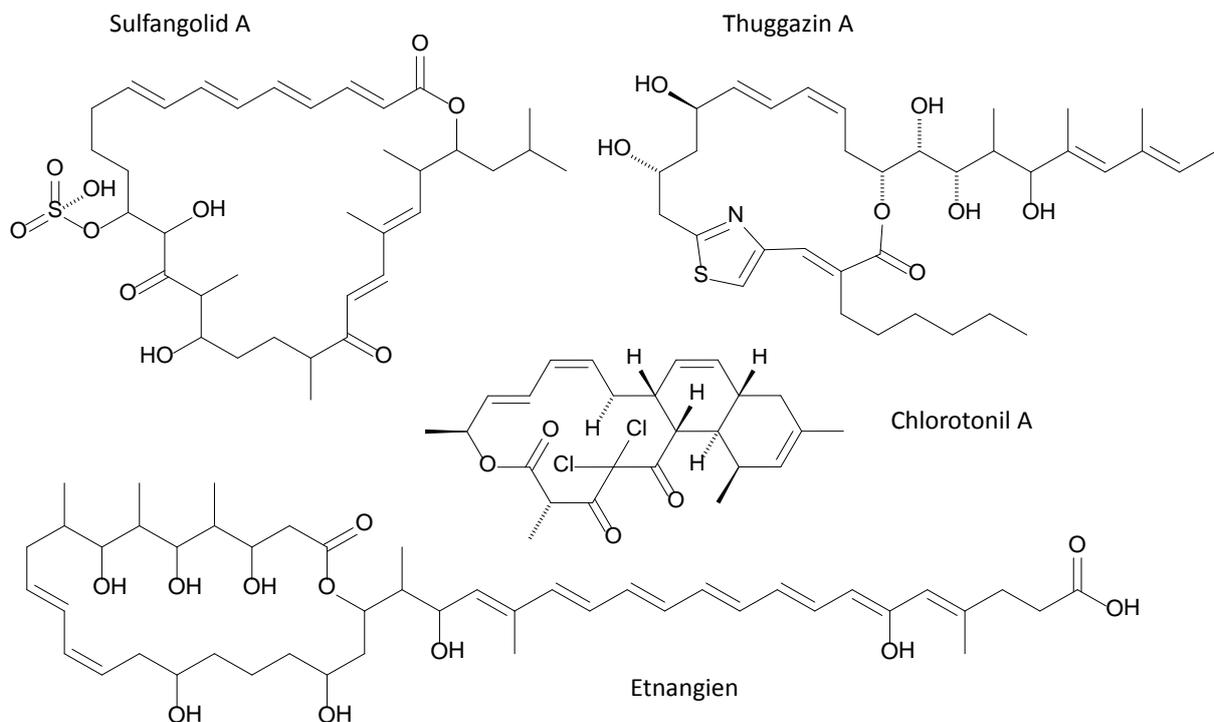


Abbildung 2.1: Neue chemische Grundstrukturen aus Myxobakterien. Sulfangolid weist einen seltenen Sulfatester auf, Chlorotonil A eine interessante geminale Chlorierung. Thuggazine besitzen eine antibiotische Aktivität gegen *Mycobacterium tuberculosis* und Etnangien wirkt gegen Gram-positive Bakterien [2, 3, 4, 5].

Obwohl kommerzielle Systeme wie RAMOS (*Respiration Activity Monitoring System*) erhältlich sind, mit denen ein Monitoring der respiratorischen Aktivität einer Schüttelkultur möglich ist, sind diese verhältnismäßig teuer und nur begrenzt bestückbar, was ein Screening im größeren Maßstab schwierig macht [11]. Allerdings liefert die Beobachtung des

Verlaufs der Atmungsaktivität häufig wertvolle Erkenntnisse bezüglich des metabolischen Zustandes einer Kultur, die für eine nachfolgende Prozessoptimierung unverzichtbar sind.

Ein weiteres Problem bei einer umfassenden Detektion von Bioaktivitäten im Primärscreening ist das Vorhandensein sogenannter „stiller“ Biosynthesegencluster in den Produzenten. Diese Cluster sind möglicherweise nur unter speziellen Kultivierungsbedingungen aktiv [12]. Diese Bedingungen können beispielsweise Variationen im pH-Wert, pO_2 , pCO_2 , Temperatur oder Scherstress sein. Auch Einflüsse verschiedener Salze, Chemikalien, Nährstoffe oder auch Wechselwirkungen mit anderen Mikroorganismen sind möglich [13]. Die Auswirkungen einiger der aufgezählten Faktoren können relativ einfach in geschüttelten Kulturgefäßen durch Zugabe entsprechender Substanzen stimuliert und untersucht werden. Die angeführten physikalischen Parameter benötigen jedoch eine Kontrolle, die nur in einem optimal durchmischten Bioreaktor zufriedenstellend gewährleistet werden kann. Rührkesselreaktoren (siehe Abbildung 1.12) bieten in dieser Hinsicht, zumindest im Labormaßstab, annähernd ideale Bedingungen, weshalb sie besonders gut für die Kontrolle und das Monitoring der oben genannten Faktoren geeignet sind.

Diese Teilarbeit befasst sich mit der Etablierung von Methoden, um die Einflüsse verschiedener Kultivierungsparameter auf das Metaboliten- und Bioaktivitätsprofil eines mykobakteriellen Produzenten innerhalb kurzer Zeit untersuchen zu können. Dabei sollten diese Einflüsse im zeitlichen Verlauf einer Kultivierung erfasst und quantifiziert werden. Zusätzlich sollte genügend Material für eine biologische und chemische Charakterisierung der unter spezifischen Bedingungen entstandenen Extrakte erzeugt werden. Diese Extrakte sollten im Idealfall ausreichend Substanzmengen für die Identifizierung und Strukturaufklärung von bioaktiven bzw. unbekanntem Einzelsubstanzen enthalten. Zu diesem Zweck wurde ein 2 l Rührkesselreaktor vom Typ Labfors 3 der Firma Infors verwendet, der aufgrund der Größe eine einfache Handhabung ermöglichte, mit dem jedoch genügend Rohextrakt für eine nachfolgende Charakterisierung erzeugt werden konnte. Der Bioreaktor wurde mit einem pH-, pO_2 - und Temperatursensor ausgestattet. Zu einem späteren Zeitpunkt kamen noch ein „Massflowcontroller“ für die exakt dosierte Begasung sowie eine Abgasanalyse für die O_2 - und CO_2 -Konzentration hinzu. Dadurch wurde eine Berechnung des Sauerstoffverbrauchs (OUR), der CO_2 -Produktion (CER) und des Respiratorischen-Quotienten (RQ) ermöglicht. Als Kultivierungsform wurde eine *Repeated-Batch*-Methode gewählt, mit der, im Gegensatz zur Chemostat- oder Perfusionskultivierung, auch Unterschiede innerhalb einer Kultivierung, welche beispielsweise durch Medienverbrauch und Nährstoffmangel hervorgerufen werden, erfasst werden können. Als Versuchsorganismus wurde ein pelletartig wachsendes Isolat aus der Familie Polyangiaceae eingesetzt, welches vorläufig als *Chondromyces* sp. (Stamm SBCm007) eingestuft wurde [R. Garcia, unveröffentlicht]. Die Auswahl erfolgte aufgrund der Produktion nur einer bis

dahin bekannten Substanzklasse, sowie der phänotypischen Einstufung als möglicherweise neue Gattung, da dies die Chance auf die Entdeckung neuer struktureller Vielfalt erhöht.

2.2 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

2.2.1 ETABLIERUNG EINER REPEATED-BATCH-KULTIVIERUNG (RBK)

Die *Repeated-Batch*-Kultivierung (RBK) wurde gewählt um nährstoffabhängige Änderungen im Metabolitenprofil erkennen zu können, da hier, im Gegensatz zu einer Perfusions- oder Chemostatkultivierung, die einzelnen Wachstumsphasen einer herkömmlichen *Batch*-Kultivierung auftreten (siehe Abbildung 2.2). Dieser Faktor muss berücksichtigt werden, da beispielsweise für *Aspergillus nidulans* und *Streptomyces coelicolor* eine wachstumsphasenabhängige Produktion verschiedener Sekundärstoffe gezeigt werden konnte [13, 14]. Bei pelletiert wachsenden Organismen ergab sich der Vorteil, dass die Zellen vor dem Medienwechsel sedimentiert werden konnten. Dadurch wurden lange Lag-Phasen vermieden, was besonders bei langsam wachsenden Organismen von Bedeutung sein kann. Die RBK besitzt den zusätzlichen Vorteil gegenüber einer Perfusion- oder Chemostat-Kultivierung, dass ein nahezu vollständiger Medienwechsel, im Vergleich zur kontinuierlichen Kultivierungsform, sehr schnell durchgeführt werden kann, da in der Regel nur die sedimentierten Zellklumpen in etwas Restmedium im Bioreaktor verbleiben. Beim Chemostat- oder Perfusionsprozess findet eine kontinuierliche Verdünnung des im Bioreaktor befindlichen Mediums über einen wesentlich längeren Zeitraum statt.

Mittels dieses regelmäßigen Medienwechsels können für jeden Kultivierungszyklus, der mit dem Medienwechsel beginnt, annähernd vergleichbare Ausgangsbedingungen geschaffen werden. Für eine Suspensionskultur sind diese Überlegungen leicht nachzuvollziehen, da jede Wiederholung einem *Batch* mit einem definierten Inokulum entspricht. Für eine pelletartig wachsende Kultur mit Biomassesedimentation musste jedoch erst gezeigt werden, dass dies tatsächlich der Fall ist.

Durch regelmäßigen, kompletten Medienaustausch bei SBCm007 Kultivierungen konnte ein Zustand erreicht werden, der als „*Repeated Pattern State*“ bezeichnet wurde. Dieser Status war dadurch gekennzeichnet, dass nach einer gewissen Zeit ein Gleichgewicht zwischen Aufbau von Biomasse zu Beginn eines Zyklus, sowie Absterben gegen Ende des Zyklus bestand. Dieser Auf- und Abbau verlief in allen Kultivierungszyklen nahezu identisch (Daten nicht gezeigt). Als Konsequenz waren auch Basen- und Säureverbrauchsmuster sowie die veratmete Luftmenge pro Zyklus vergleichbar. Die Verwendung einer Abgasanalyse für die CO₂- und O₂-Konzentration in Kombination mit einem *Massflowcontroller* zur Kontrolle des verbrauchten Sauerstoffs erlaubte zudem eine Quantifizierung der verbrauchten Sauerstoff-

und der produzierten CO₂-Mengen, wodurch dieses wiederkehrende Verbrauchsmuster ebenfalls bestätigt werden konnte (Daten nicht gezeigt).

Vorgreifend sei hier der im Kapitel 3 „Methoden zur Prozessverbesserung mittels Abgasanalyse“ eingeführte Parameter OCQ erwähnt [17]. Dieser stellt ein zusätzliches sehr sensitives Instrument dar, mit welchem gezeigt werden kann, dass sich ein *Repeated Pattern* nach einiger Zeit einstellt. Abbildung 3.8 (im Kapitel 3) zeigt das repetitive Muster des OCQ-Wertes im Verlauf einer Kultivierung. Dieser OCQ-Verlauf wurde, basierend auf einem unteren Grenzwert dieses Parameters, als Auslöser für einen automatischen Medienwechsel verwendet. Der in Abbildung 3.8 dargestellte OCQ-Wert und dessen zeitlicher Verlauf ist exakt reproduzierbar, obwohl der OCQ bereits auf kleinste Veränderungen wie Schwankungen der Zelldichte sehr stark reagiert. Im, in Abbildung 3.8 abgebildeten Fall stellte sich dieses *Repeated Pattern* durch Autoregulation ein, da die gemessene, nachlassende Atmungsaktivität aufgrund von Nährstoffmangel an einem vorher definierten Punkt zu einer Fütterung führt. Dies führt nach einer Adaptionszeit zu einer harmonischen Schwingung des Bakterienwachstums.

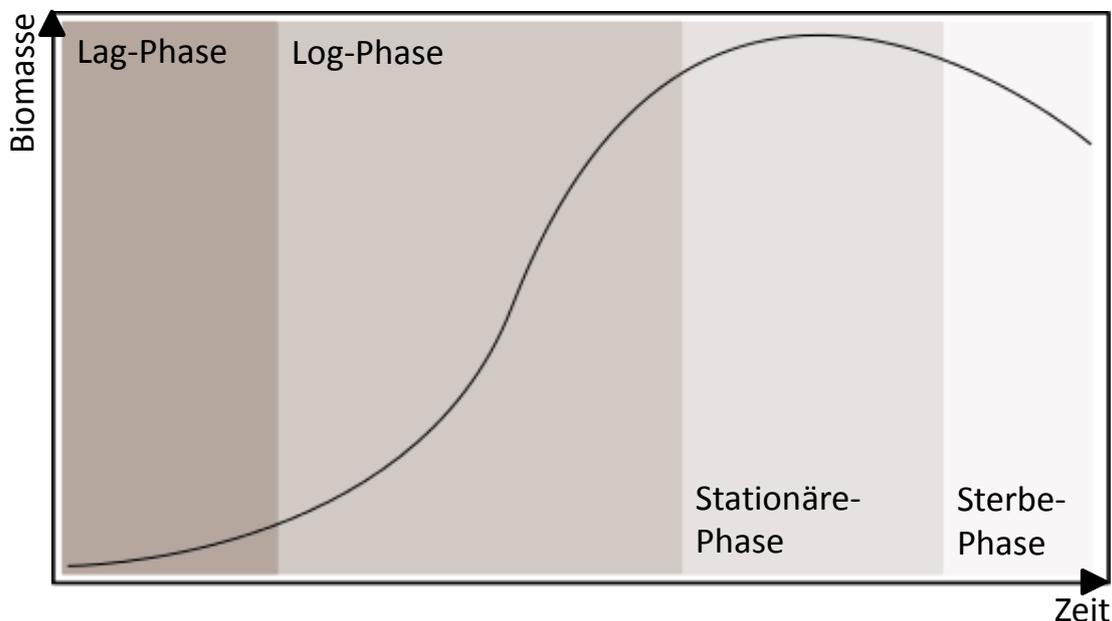


Abbildung 2.2: Wachstumsphasen einer Batch-Kultur. Zu Beginn einer Kultivierung erfolgt eine Adaption der Organismen an ihre neue Umgebung, charakterisiert durch langsames Wachstum und Enzymexpression um Nährstoffe aufnehmen und verarbeiten zu können. In der Log-Phase erfolgt das exponentielle Wachstum. In der stationären Phase sind die Nährstoffe weitestgehend verbraucht und der Organismus stellt sich auf Hungerbedingungen ein. In Streptomycetenkulturen werden hier häufig Stoffe des sogenannten Sekundärmetabolismus im Überstand gefunden. In der Sterbephase stirbt ein Teil der Organismen ab während ein anderer Teil sich aus den Überresten ernährt.

Abbildung 2.3 zeigt zur Verdeutlichung einen simulierten 24-stündigen RB-Kultivierungsverlauf über insgesamt 300 Stunden mit zugrundeliegendem Monod-Modell in der *Batch*-Phase [15]. Für die Wachstumsgeschwindigkeit μ [1/h] gilt folgende Formel:

$$\mu = \mu_{max} \times \frac{c_s}{c_s + K_s} \quad (2.1)$$

μ_{max} [1/h] stellt die maximale Wachstumsgeschwindigkeit dar, c_s [g/l] die Substratkonzentration und K_s [g/l] die Sättigungskonstante des Substrats. Diese wurde sehr hoch angesetzt, um den verzögerten enzymatischen Abbau der Hefezellen, der einer Bioverfügbarkeit vorausgeht, in das Modell mit einzubeziehen. Zur Berechnung der Substratkonzentration im zeitlichen Verlauf wird der sogenannte Ausbeutekoeffizient $Y_{X/S}$ benötigt:

$$Y_{X/S} = \frac{\text{Zuwachs an Zellen}}{\text{Verbrauch von Substrat}} = \frac{\Delta c_x}{\Delta c_s} \quad (2.2)$$

Da $Y_{X/S}$ der Quotient der Differenz der Biomassekonzentration c_x [g_{cx}/l] und der Differenz der Substratkonzentration c_s [g_{cs}/l] ist, wäre formell die Einheit [g_{cx}/g_{cs}] richtig. $Y_{X/S}$ wird jedoch in der Regel einheitenlos dargestellt. Der zeitliche Verlauf der Biomassekonzentration lässt sich mit folgender Formel berechnen:

$$\frac{dc_x}{dt} = \mu \times c_x - k_d \times c_x \quad (2.3)$$

Wobei k_d ein zusätzlicher einheitenloser Faktor ist, der die Sterberate der Zellen darstellt. Für den zeitlichen Verlauf der Substratkonzentration gilt:

$$\frac{dc_s}{dt} = -\frac{\mu}{Y_{X/S}} \times c_x \quad (2.4)$$

Für die Produktbildungsrate q_p [1/h] wird ein sehr stark vereinfachender Zusammenhang angenommen:

$$q_p = \alpha \times \mu + \beta \quad (2.5)$$

Wobei α und β jeweils einheitenlose Produktbildungsfaktoren sind. α hängt in diesem Fall mit der Wachstumsrate der Zellen zusammen. Für die in Abbildung 2.3 dargestellte Simulation wurde ein willkürlicher Wert für α eingesetzt, da er nur zur Veranschaulichung einer hypothetischen Produktbildung dient. Diese Produktion unterliegt in der Regel, ebenso wie das Monod-Modell, wesentlich komplexeren Zusammenhängen. Für eine Demonstration dieser Art sind diese Vereinfachungen jedoch ausreichend. β wurde im Beispiel auf null gesetzt, könnte aber z. B. ein Faktor sein, der von den Kultivierungsbedingungen abhängt. Mittels der Rate q_p kann dann der zeitliche Verlauf der Produktkonzentration c_p [g/l] berechnet werden. Da die Konzentrationen von produzierten Sekundärmetaboliten in der

Regel im mg/l Bereich oder darunter liegen, wurde der Einfluss der Produktbildungsrate auf die Substratkonzentration in der Simulation nicht extra berücksichtigt. Der zeitliche Verlauf von c_p wurde folgendermaßen berechnet:

$$\frac{dc_p}{dt} = q_p \times c_x \quad (2.6)$$

Detailliertere Beschreibungen und Herleitungen dieser Zusammenhänge finden sich in der Literatur [15]. Eine Auflistung der einzelnen, zur Berechnung verwendeten Parameter mit den verwendeten Werten, sowie das Programm das zur Simulation verwendet wurde befinden sich im Anhang A. Die verwendeten Parameter wurden abgeschätzt, da eine genaue Messung der Biomasse und des Substratverbrauchs bei den pelletartig wachsenden *Chondromyces* sp. in Komplexmedium sehr schwierig ist. Das vereinfachte Modell reicht jedoch aus, um zu verdeutlichen, dass ein wiederkehrendes Muster bereits nach wenigen Tagen erreicht werden kann, was sich mit den Ergebnissen der realen Versuche deckt. Die Simulation zeigt, dass kleinere Abweichungen in der Biomassekonzentration, die durch Änderung der Kultivierungsparameter hervorgerufen werden, einen relativ geringen Einfluss auf das sehr vereinfachte Modell der Produktbildung haben (siehe Abbildung 2.3, roter Pfeil). Größere Einflüsse sind dagegen zu erwarten, wenn die Produktbildung direkt durch die veränderten Parameter beeinflusst wird und nicht nur von der vorhandenen Biomasse. Die numerischen Lösungen der Differenzialgleichungen dieser Simulation wurden mit dem Simulationsprogramm Berkeley Madonna ausgeführt. Eine Demoversion dieser Software ist frei erhältlich und kann zu Testzwecken verwendet werden [16].

Die Medienwechsel der RB- Kultivierungen mit SBCm007 wurden so geplant, dass diese alle zwölf Stunden stattfanden. Dadurch konnte jeweils über Nacht mit den Bedingungen kultiviert werden, unter denen am nächsten Tag die zeitlichen Änderungen der Produktion von Sekundärstoffen experimentell erfasst werden sollten. Zur Erfassung zeitaufwändigerer Kinetiken wurden diese Intervalle teilweise auch verlängert. Der 12 Stunden Rhythmus erwies sich in der Praxis für eine manuelle Probenahme und Bearbeitung als am besten durchführbar, da dadurch gewährleistet wurde, dass keine nächtliche Probenbearbeitung stattfinden musste.

Durch das Aufzwingen des Wechselrhythmus wird das Wachstum der Kultur an diesen Wechsel angepasst was sich in dem beschriebenen *Repeated Pattern* bemerkbar macht. Diese Methode eignet sich dementsprechend um mit einer einzigen Kultur mehrere Versuche durchzuführen, solange durch die Experimente nicht zu stark in die Balance zwischen Wachstum und Absterben eingegriffen wird [17]. Durch die Zellrückhaltung war es möglich, im Bioreaktor genügend Biomasse zu erzeugen, so dass Versuche mit dem langsam wachsenden SBCm007 innerhalb eines Tages durchgeführt werden konnten. Trotz

dieser Verkürzung kann ein ähnliches Wachstumsverhalten wie bei einer herkömmlichen *Batch*-Kultivierung erzeugt werden. Im Anschluss an jede Kultivierung wurde der Überstand mit 2 g XAD16 inkubiert. Dadurch konnten gelöste Metaboliten gebunden und der schwer zu prozessierende, wässrige Überstand verworfen werden. Das Adsorberharz wurde anschließend mit Methanol extrahiert und gewogen, um exakte Extraktmengen für eine Endpunktquantifizierung zu erhalten und Aktivitätstests durchführen zu können.

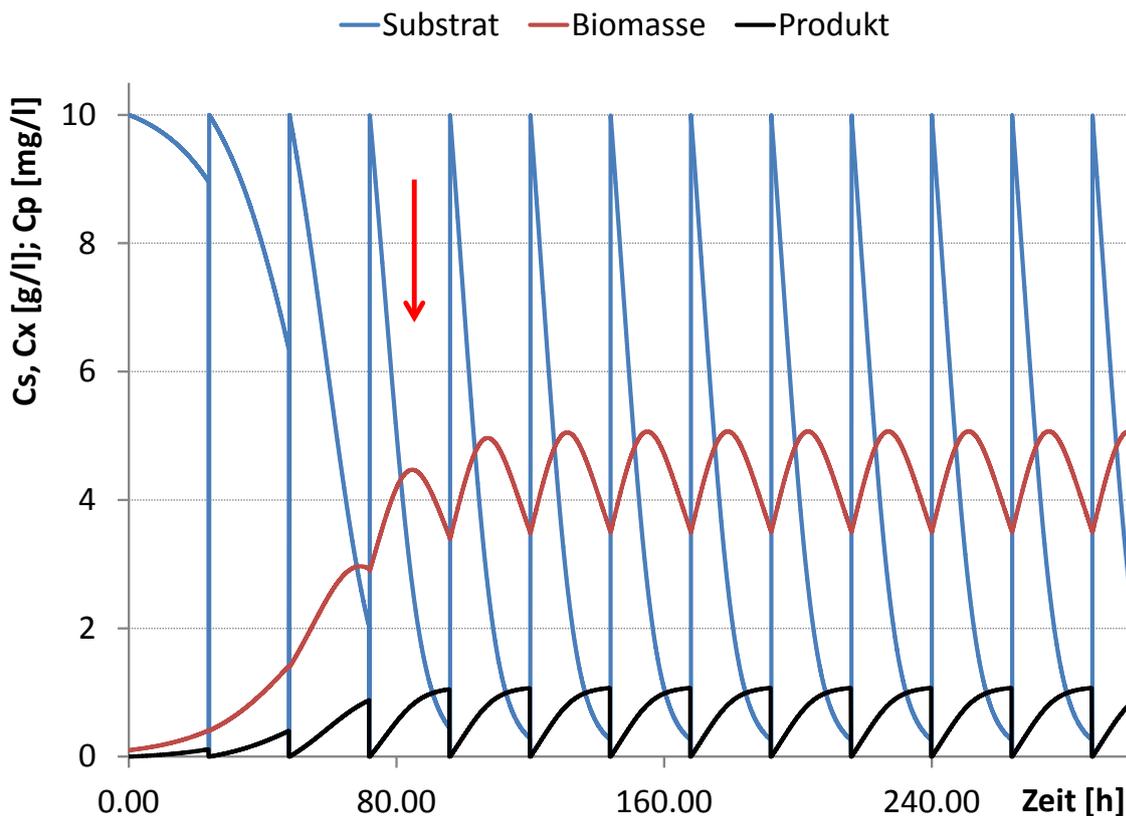


Abbildung 2.3: Simulierter Kurvenverlauf von Biomasse- und Produktbildung sowie Substratverbrauch. Dem Modell liegt die Annahme zugrunde dass, das Medium und damit verbleibende Nährstoffe sowie gelöstes Produkt nach 24 h komplett ausgetauscht wird während die Biomasse im Reaktor verbleibt (Simuliert mit Berkeley Madonna [15], $\mu_{\max}=0.2$, $K_s=8$, $Y_{X/S}=0.55$, $\alpha=0.0002$, $\beta=0$, $k_d=0.05$, initiale Substratkonzentration $c_s=10$, initiale Biomassekonzentration $c_x=0.1$, initiale Produktkonzentration $c_p=0$).

2.2.2 MESSUNG VON PRODUKTBILDUNGS-KINETIKEN UND PRODUKTIVITÄT

Für die Messung von Produktbildungs-Kinetiken wurde Kulturüberstand verwendet, da durch Vorversuche ermittelt wurde, dass ein Zusatz von XAD16 zur Produktion der Zielsubstanzen mit dem Stamm SBCm007 nicht benötigt wird (Daten nicht gezeigt). XAD16 wird üblicherweise bei Kultivierungen zur Produktion von degradationsempfindlichen und wachstums- oder produktionsinhibierenden Molekülen zugesetzt, um diese an das Harz zu binden. Dadurch werden diese Substanzen aus der Lösung entfernt und so entweder vor

Degradation geschützt oder für den verwendeten Organismus „unsichtbar“, da dieser unter Umständen die Produktion aufgrund einer Feedbackinhibierung oder Selbstintoxikation einstellen würde. Dies scheint beispielsweise für den überwiegenden Teil der Metabolite aus Vertretern des Genus *Sorangium* wichtig zu sein, da die Produktion verschiedener Substanzen durch die Addition des Adsorberharzes wesentlich verbessert werden konnte [18]. Für SBCm007 kann der Zusatz von XAD16 die Produktion mancher Metabolite verbessern, kann sich jedoch aus bislang nicht geklärten Gründen auf die Produktion anderer Metabolite auch nachteilig auswirken [17]. Dies muss im Einzelfall für den verwendeten Organismus und die gewünschte Zielsubstanz abgeklärt werden. Für die vorliegende Studie mit SBCm007 wurde die Kultivierung ohne direkte Addition des Adsorberharzes durchgeführt. Für Prozesse in denen dies nötig sein sollte, werden im Kapitel 5 „Verbesserung kontinuierlicher Prozesse mittels RBK“ Lösungen beschrieben, die eine kontinuierliche Abreicherung von Metaboliten aus dem Überstand, sowohl klumpig- als auch suspendiert wachsender Organismen, ermöglichen ohne das Harz direkt in den Bioreaktor zu geben.

Zur Messung der Kinetiken wurden 10 ml des Überstandes gefriergetrocknet und anschließend in 500 µl Methanol mit internem Standard resuspendiert. Als Standard wurde Sulfadimethoxin in einer Konzentration von 6.75 mg/l verwendet. In dieser Konzentration ist es möglich, 1 bis 5 µl für eine chromatographische Trennung zu injizieren und bei einer anschließenden Detektion mittels Massenspektrometrie, im linearen Messbereich des Standards zu messen. Der Zusatz dieses internen Standards ermöglichte Vergleiche und Quantifizierungen unterschiedlicher HPLC-Läufe und der darin enthaltenen Substanzen. Durch Anwendung von am Lehrstuhl verwendeten Standardgradienten zur chromatographischen Auftrennung können Daten direkt mit der vorhandenen Retentionszeit- und Substanzdatenbank abgeglichen werden, der Einsatz des internen Standards stört hierbei nicht. Bei dem verwendeten Chromatographiesystem handelte es sich um eine Dionex Ultimate RSLC Anlage. Die Trennung wurde auf einer Waters BEH C18 Säule (100 x 2,1 mm; mit 1,7 µm Partikeldurchmesser) mittels eines linearen Gradienten von (A) H₂O + 0,1% Ameisensäure nach (B) Acetonitril + 0,1% Ameisensäure bei einer Flussrate von 600 µl/min bei 45°C durchgeführt. Der Standardgradient erfolgte nach einem 0,5 min dauernden isokratischen Schritt bei 5% B bis zu einer Konzentration von 95% B innerhalb von 18 min, gefolgt von einem weiteren isokratischen Schritt bei 95% B (wurde bei Bedarf jedoch angepasst). UV-Spektren wurden mittels eines Diodenarraydetektors (DAD) im Wellenlängenbereich 200-600 nm aufgenommen. Für die Aufnahme von Massenspektren wurden zwei verschiedene Geräte verwendet. Für das maXis 4G hr-ToF Massenspektrometer (Bruker Daltonics, Bremen Germany) wurden 75 µl vom Fluss gesplittet und mittels einer Standard ESI-Quelle ionisiert. Die Massenspektren wurden im Bereich

zwischen 150-2000 m/z mit 2 Hz aufgenommen. Für das Advion Triversa nano-ESI System, welches an ein Thermo Fisher Orbitrap Massenspektrometer gekoppelt war, wurden die Spektren zwischen 200-2000 m/z bei einer Auflösung von $R = 30000$ aufgenommen. Die Massenspektren wurden ohne Fragmentierung im positiven und im Falle des TOF-Gerätes mittels eines zusätzlichen Laufs im negativen Ionisierungsmodus aufgenommen.

Zwecks Vergleichs zwischen verschiedenen Kultivierungsbedingungen, wurde die Peakfläche vom *Extracted Ion Chromatogramm* (EIC) des internen Standards mit dem EIC einer zu untersuchenden Substanz ins Verhältnis gesetzt. Bei gleicher Überstandmenge lassen sich so Aussagen treffen, inwiefern sich der Substantziter im Laufe der Zeit im Vergleich zum internen Standard ändert. Die computerunterstützte Auswertung erfolgte mittels der Software Quant Analysis der Firma Bruker. Diese erlaubt eine einfache teilautomatisierte Bearbeitung der Daten. Wie in Abbildung 2.4 gezeigt, kann so die Produktion unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen direkt verglichen werden. So wird hier z. B. ersichtlich, dass die Produktion der Substanz SH-Cm7-568 durch hohe Sauerstoffpartialdrücke verbessert wird, während bei Chondramid B [19] eine Steigerung der Produktion mit sinkendem pO_2 zu verzeichnen ist. Es musste allerdings beachtet werden, dass - wie beispielsweise bei Chondramid B - am Anfang der Kultivierung gelegentlich unterschiedliche Startwerte zu beobachten waren, obwohl theoretisch vom Nullwert ausgegangen werden sollte. Dies lag daran, dass vom vorhergehenden Kultivierungszyklus Chondramid im Restvolumen vorhanden war und dadurch die Initialbedingungen verändert wurden. Aus diesem Grund empfiehlt es sich, direkt nach dem Medienwechsel eine Kontrollprobe zu nehmen, um im Sediment verbleibende Restmengen mit einkalkulieren zu können.

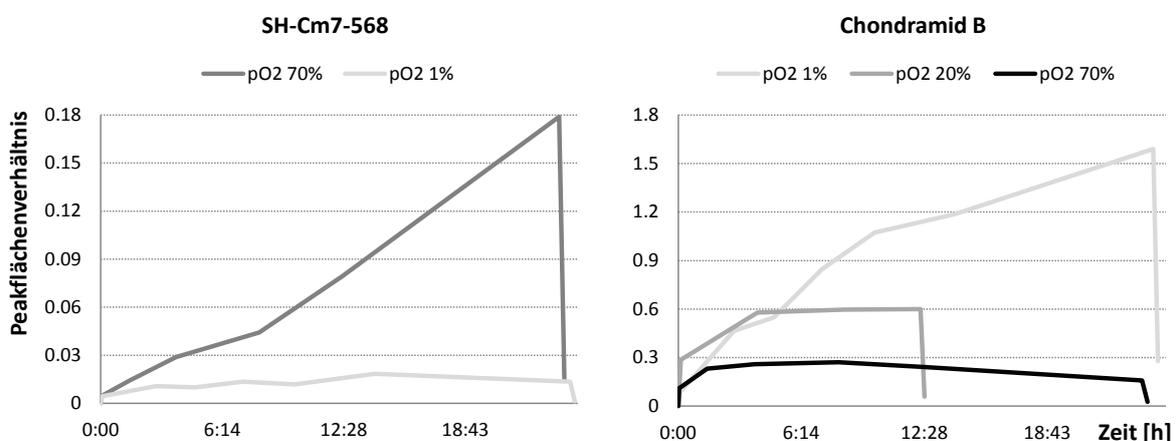


Abbildung 2.4: Vergleich des relativen Substantzitors zweier Substanzen bei unterschiedlichen Sauerstoffpartialdrücken. Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der Peakflächen im Verhältnis zum internen Standard. Hier wird deutlich, dass die Substanz SH-Cm7-568 ein gegenläufiges Produktionsverhalten wie Chondramid B aufweist.

Mittels einer Endpunktbestimmung der Mengen im XAD-Extrakt könnten Informationen über die Gesamtproduktion verschiedener Metabolite gewonnen werden. Eine weit wichtigere Aussage hinsichtlich einer Produktions- bzw. Prozessoptimierung, ist der Konzentrationsverlauf eines Produkts über den Kultivierungszeitraum. Mithilfe der ermittelten Kinetiken kann beispielsweise der optimale Zeitpunkt der Ernte des Kulturüberstands festgelegt werden. Abbildung 2.5 zeigt exemplarisch den zeitlichen Verlauf der relativen Konzentration von Substanz SH-Cm7-487 während einer Kultivierung von SBCm007 mit 15 g/l Ganzzellhefe im Medium. Dieser Verlauf macht deutlich, dass hier eine Ernte des Überstands wesentlich früher stattfinden sollte.

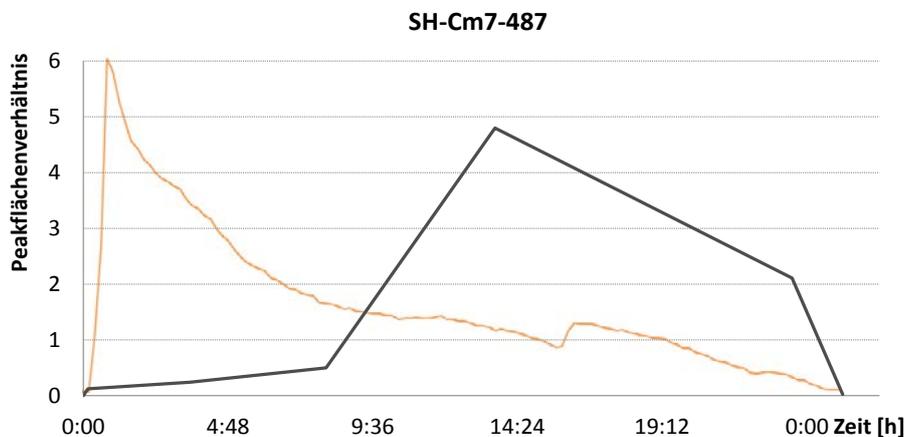


Abbildung 2.5: Relativer Konzentrationsverlauf der Substanz SH-Cm7-487 während einer Kultivierung mit Überlagerung einer später erzeugten OCQ-Kurve. Der Kurvenverlauf verdeutlicht, dass ein starker Anstieg des Substanztiters erst mit Einsetzen einer Art Plateauphase des OCQ-Verlaufs eintritt. Mögliche Gründe die zu diesem Anstieg führen werden im Text diskutiert.

Abbildung 2.5 zeigt, dass am Anfang der Kultivierung nur wenig der Substanz SH-Cm7-487 produziert wird. Nach ca. 8 h steigt die Produktion jedoch rapide an und sinkt gegen Ende wieder ab. Dies verdeutlicht, dass für manche Substanzen eine Extraktion des Überstands mittels XAD16 hilfreich sein kann, um den Abbau der Substanz zu verhindern; oder aber der Zeitpunkt der Ernte sehr genau gewählt sein muss. Beim Erstellen dieser Kinetik wurde noch keine Abgasanalyse eingesetzt, weshalb die Ursache der verzögert einsetzenden Produktion nicht geklärt werden konnte. Durch den Einsatz einer Abgasanalyse war es zu einem späteren Zeitpunkt möglich, mittels Einführung des neuen Parameters OCQ [17], sehr stark wachstums- und substratverbrauchsabhängige Kurven zu erzeugen (siehe Kapitel 3 „Methoden zur Prozessverbesserung mittels Abgasanalyse“). Beim verwendeten VY2 Medium wurde immer ein charakteristischer OCQ Verlauf beobachtet: Zuerst erfolgte ein steiler Anstieg, gefolgt von einem relativ starken Abfall. Anschließend (bei ca. 9:00 h) konnte

eine Plateauphase beobachtet werden die einige Zeit anhält (bis ca. 19:00 h), gefolgt von einem weiteren Abfall. In Abbildung 2.5 wird ein exemplarischer OCQ-Verlauf, der bei einer vergleichbaren Kultivierung jedoch ohne Aufnahme einer Kinetik erzeugt wurde, überlagert, um einen möglichen Zusammenhang zwischen Produktion und Substratverbrauch zu verdeutlichen. Der beobachtete steile An- und Abstieg des OCQ's in Abbildung 2.5 hängt sehr wahrscheinlich mit lysierten Hefezellen zusammen, da diese die einzige Nährstoffquelle im Medium darstellen. Die Zellen werden beim Autoklavieren teilweise zerstört und setzen dadurch intrazelluläre Bestandteile frei. Nachdem die freien Nährstoffe verbraucht sind, müssen zuerst die restlichen, nicht lysierten Hefezellen aufgeschlossen werden. Dies hat mit hoher Wahrscheinlichkeit einen Einfluss auf den Metabolismus der Bakterien, da entsprechende Enzyme zum Aufschluss der Hefezellen bereitgestellt werden müssen. Möglicherweise führt diese Umstellung zur verstärkten Produktion der Substanz SH-Cm7-487 nach ca. 9:00 h. Der Atmungsabhängige OCQ-Verlauf, in Verbindung mit einer Produktionskinetik, legt dies zumindest nahe. Durch die Verwendung möglichst umfangreicher *Online*-Messungen in Kombination mit Produktionskinetiken, können so Faktoren zur Verbesserung von Kultivierungen identifiziert werden, die eine Produktionsverbesserung einzelner Zielsubstanzen ermöglichen. So können beispielsweise Einflüsse von limitierenden Substraten wie Stickstoff oder Phosphat untersucht werden. Gleichzeitig können Unterschiede in der Produktion des Großteils der sich im Überstand befindlichen Naturstoffe quantifiziert werden. Die Elektrosprayionisation (ESI) eignet sich hervorragend für diese Messungen, da schätzungsweise bis zu 90% der im Überstand befindlichen Moleküle mittels dieser schonenden Ionisierungsmethode detektiert werden können [20].

Um abzusichern, dass die oben beschriebenen Messungen reproduzierbar sind, wurden Kinetiken unter hohem Sauerstoffpartialdruck und unter Standardbedingungen gemessen und miteinander verglichen. Von Substanz SH-Cm7-568 war aus Vorversuchen bereits bekannt, dass der pO_2 einen Einfluss auf die Produktion hat. Abbildung 2.6 zeigt die zeitabhängigen relativen Substanztiter verschiedener Standardkultivierungen, die über einen Zeitraum von 19 Tagen verteilt waren. Obwohl diese Messungen leichte Schwankungen aufweisen, können nach längeren Zeiträumen Bedingungen reproduziert bzw. wiederhergestellt werden, die eine ähnliche Produktivität zeigen. Betrachtet man eine Kinetik, die unter Hochsauerstoffbedingungen erzeugt wurde (oranger Verlauf, Abbildung 2.6), erkennt man deutliche, aber reversible Abweichungen von den Standardbedingungen. Wenn solche Kinetiken einmal gemessen wurden, können sie auch zu einem späteren Zeitpunkt, für Substanzen die zum Zeitpunkt der Erstellung der Kinetik noch nicht gezielt untersucht wurden, herangezogen werden. Dadurch kann das Produktionsverhalten eines Stammes hinsichtlich bestimmter Substanzen auch nachträglich analysiert werden. Damit

diese Analysen teilautomatisiert bearbeitet werden können, müssen hochauflösende MS-Daten und Retentionszeiten gemessen werden. Dies ermöglicht zudem einen Datenbankabgleich mit der am Institut erstellten Substanzbibliothek. Bei der Probennahme für die Kinetik ist zu beachten, dass das Kultivierungsvolumen durch die Probennahme nicht zu sehr verringert wird. In Kombination mit sensitiver Analytik sind 10 ml Kulturüberstand auch bei niedrigen Substanztitern - die bei Myxobakterien die Regel sind – ausreichend, um Kinetiken zu erzeugen.

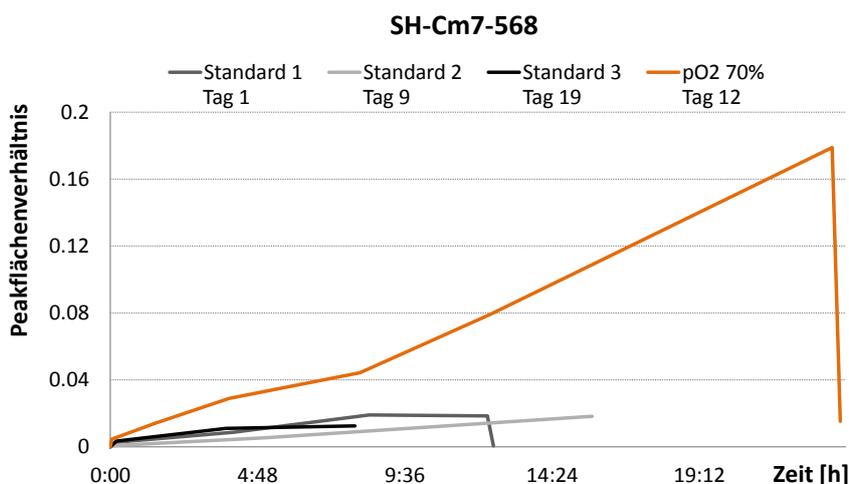


Abbildung 2.6: Vergleich der Produkttiter einer Substanz in Standardextrakten von verschiedenen Tagen mit zwischengeschalteter Produktionsänderung. Die grauen Peakflächenverhältnisse wurden unter Standardbedingungen erzeugt, während der orange Verlauf verbesserte Bedingungen anzeigt. Dadurch konnte gezeigt werden, dass Veränderungen im Produktionsverhalten reversibel sind und Ausgangsbedingungen wieder erreicht werden können.

Für Endpunktmessungen und die Produktion von Extrakten, die repräsentativ für verschiedene Wachstumsbedingungen sind, wurde der Überstand einer Kultivierung (1 l) nach Sedimentation der Biomasse für 30 min mit 2 g XAD16 inkubiert und danach verworfen. Das XAD16 wurde anschließend eine Stunde mit 200 ml Methanol extrahiert. Das Extrakt wurde getrocknet und gewogen. Abhängig von den Kultivierungsbedingungen wurden mit Stamm SBCm007 Ausbeuten zwischen 30-200 mg Rohextrakt pro Liter erzielt. Nach der Gewichtsbestimmung wurde ein kleiner Teil der Extrakte für die Analytik verwendet. Definierte Extraktmengen wurden in Methanol, mit Sulfadimethoxin als internem Standard in einer Endkonzentration von 6.75 mg/l, mit den oben beschriebenen UPLC/MS Systemen gemessen. Dadurch konnte eine relative Quantifizierung der ionisierenden Substanzen durchgeführt werden.

Der manuelle Vergleich einiger Extrakte zeigt, dass innerhalb der Standardextrakte leichte Variationen auftreten (siehe Abbildung 2.7, obere Chromatogramme). Vergleicht man diese

Chromatogramme von Standardextrakten mit Chromatogrammen von Extrakten bei denen ein oder mehrere produktionsbeeinflussende Faktoren bei der Erzeugung verändert wurden, so wird deutlich, dass Schwankungen bei Standardextrakten verhältnismäßig klein sind (Abbildung 2.7, mittlere und untere Chromatogramme).

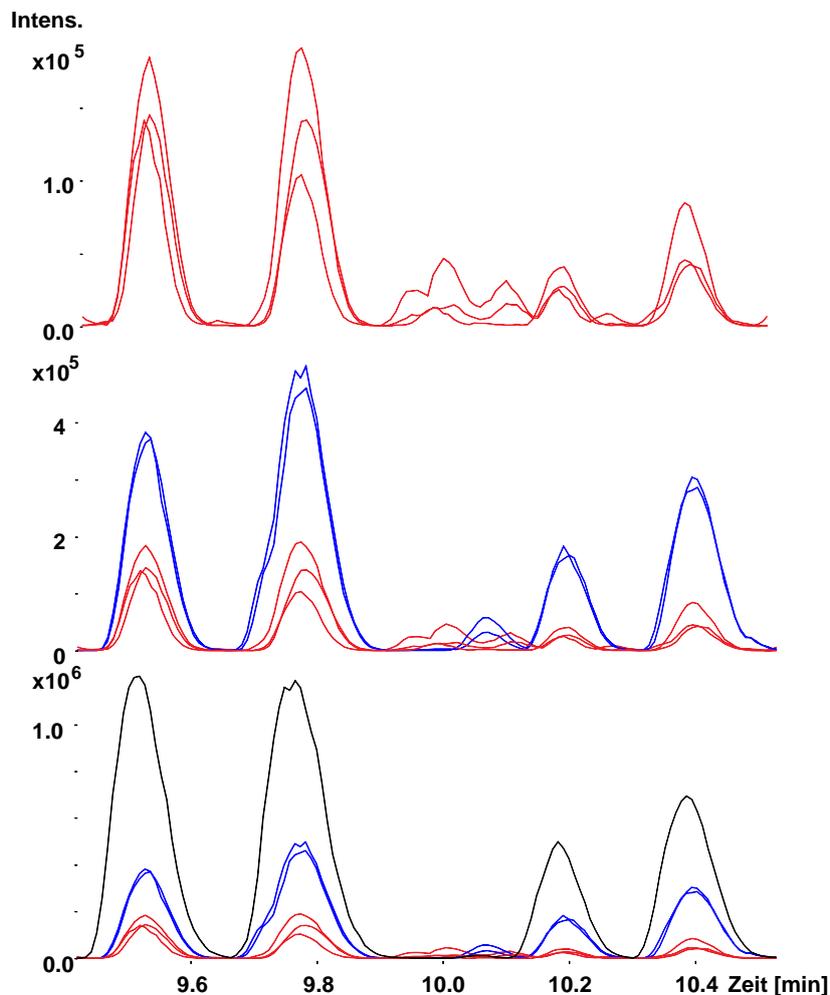


Abbildung 2.7: Überlagerung von Base-Peak-Chromatogrammen (BPCs) standardisierter Messungen von fünf Chondramiden unter drei verschiedenen Produktionsbedingungen. Rot dargestellt sind Standardbedingungen, blau dargestellt niedrig pO_2 -Bedingungen und schwarz niedrig pO_2 -Bedingungen mit doppelt Nährstoffen und KBr-Addition. Es wird deutlich, dass Schwankungen innerhalb der Standardbedingungen vernachlässigbar sind im Vergleich zu verbesserten Produktionsbedingungen.

Dies verdeutlicht, dass, obwohl leichte Variationen bei gleichen Produktionsbedingungen auftreten, Trends klar erkennbar sind und Produkttiter reproduziert werden können. Die Auswertung der Endpunktmessungen erfolgt analog der Auswertung von Kinetiken, durch den Vergleich der Peakflächen mit dem gleichen internen Standard. Um absolute Unterschiede in der Produktivität zu berücksichtigen, müssen jedoch die Gesamt-Extraktmengen in die Berechnungen einbezogen werden. Ein ausführliches Beispiel dieser

Berechnungen ist im Kapitel 3 „Methoden zur Prozessverbesserung mittels Abgasanalyse“ gezeigt. Wenn anstatt einer Veränderung von physikalischen Parametern Additive verwendet werden, die eine Produktionsänderung auslösen, so muss berücksichtigt werden, dass von diesen Stoffen Reste im Sediment verbleiben und die nachfolgenden Messungen verfälschen können.

Ein Beispiel hierfür ist in Abbildung 2.8 dargestellt. Hier wurden jeweils 3 x 30 ml verschiedener autoklavierter Bakterienkulturen in EBS-Medium zu einer RB-Kultivierung zugegeben. Die Überlagerung der entsprechenden Chromatogramme zeigt, dass selbst kleine Mengen Induktor, die im Sediment verbleiben, drastische Effekte auslösen können. Erst bei der vierten Messung, nach einmaligem Zusatz der Kulturen, wurde wieder ein ähnlicher Substanzkiter wie in einer Standardkultivierung erreicht. Dies entspricht einem sechsmaligen Entfernen des Überstandes (bei einer *Batch*-Dauer von jeweils 12 h), bis wieder Ausgangsbedingungen erreicht werden. Aus diesem Grund empfiehlt es sich, zuerst Parameter wie pH, Temperatur, pO_2 , und pCO_2 zu messen, bei denen keine Additive verwendet werden. Anschließend können Zusätze verwendet und deren Einfluss gemessen werden. In der Regel werden keine extremen Effekte auf Einzelsubstanzen, wie im oben beschriebenen Fall der Substanz SH-Cm7-1839, erwartet, wenn z. B. eine erhöhte Salzkonzentration oder Verdopplung der Kohlenstoff- oder Stickstoffquelle sowie Änderungen physikalischer Parameter untersucht werden. Deshalb empfiehlt es sich diese Versuche vor denen durchzuführen, bei denen mit größerer Wahrscheinlichkeit spezifische Reaktionen zu erwarten sind, wie beispielsweise die Zugabe von Extrakten, Kulturüberständen anderer Bakterien oder dem Zusatz spezifischer Substanzen.

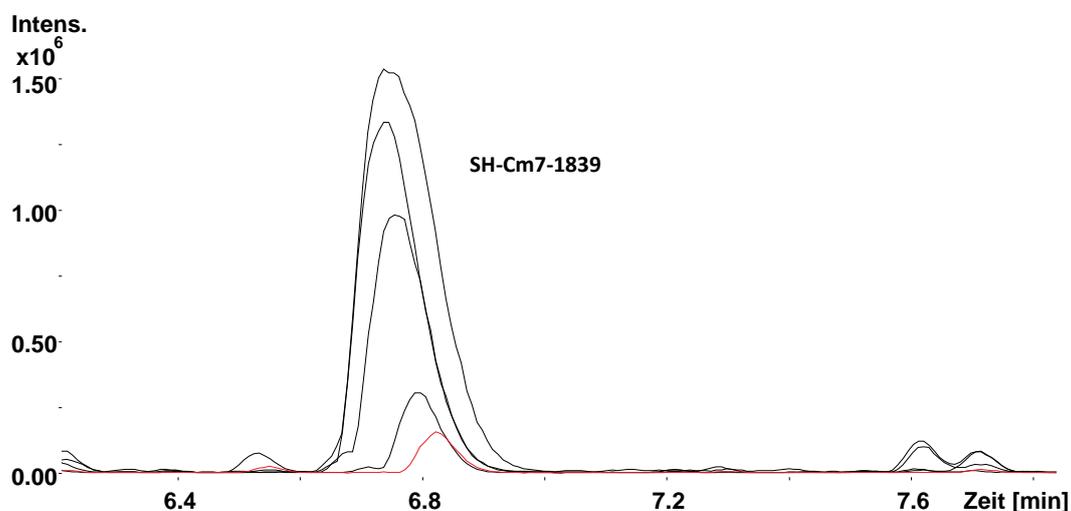


Abbildung 2.8: Überlagerung von BPCs standardisierter Messungen von Extrakten nach einmaliger Zugabe einer unbekanntem Substanz, die die Überproduktion von SH-Cm7-1839 anregt. Diese standardisierten Chromatogramme verdeutlichen, dass sechs Medienwechsel nötig waren, um die Produktion dieser Substanz wieder auf das Standardniveau zu reduzieren.

Allerdings gibt es auch hier Beispiele für einen signifikanten Einfluss der Salzkonzentration und dem Sauerstoffpartialdruck. So führte beispielsweise die Herabsetzung des pO_2 in Kombination mit verdoppelten Nährstoffen und 2 g/l KBr in einer Kultivierung zur erwarteten Steigerung der Chondramidbiosynthese. Zusätzlich wurden jedoch zwei weitere Substanzen sehr stark produziert, von denen die eine vorher nicht im Überstand beobachtet worden war (SH-Cm7-502 siehe Abbildung 2.9) und die andere (SH-Cm7-487) nur bei niedrigem pO_2 in Kombination mit niedrigem pCO_2 sowie nach dem Verbrauch der leicht zugänglichen Nährstoffe detektiert wurde (siehe Abbildung 2.9 und Kapitel 3 „Methoden zur Prozessverbesserung mittels Abgasanalyse“, Abb. 3.3, Compound C). Beide Substanzen wurden aufgereinigt und strukturell charakterisiert (siehe Kapitel 2.2.4 „Charakterisierung neu entdeckter Substanzen“). Da nicht nur im Falle von SB-Cm7-487 und der Chondramide ein derartig erheblicher Einfluss der Gasphasenzusammensetzung auf die Sekundärstoffproduktion festgestellt wurde, ist der Untersuchung dieses Phänomens ein eigenes Kapitel gewidmet (Kapitel 3 „Methoden zur Prozessverbesserung mittels Abgasanalyse“).

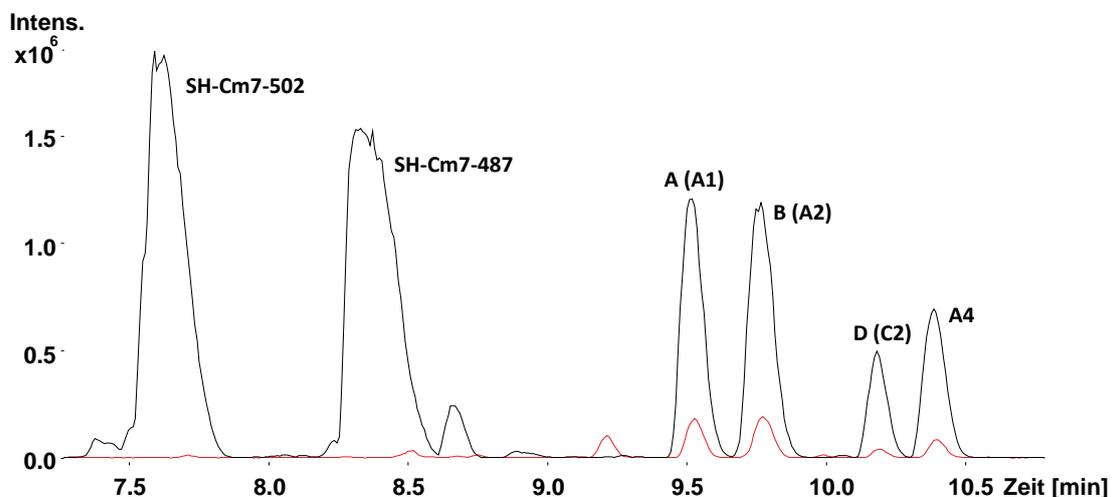


Abbildung 2.9: Überlagerung der BPCs zweier standardisierter Messungen unter Standard- und Chondramid-Produktionsbedingungen. Das BPC des bei Standardbedingungen erzeugten Extrakts ist in rot dargestellt und das BPC des Extrakts welches mit Bedingungen für eine verbesserte Chondramidproduktion erzeugt wurde in schwarz. Die letzteren Bedingungen führten zur zusätzlichen Produktion zweier Substanzen von denen eine unter keiner der getesteten Bedingungen beobachtet worden war und die andere nur unter sehr spezifischen Gasphasenzusammensetzungen.

Der Einfluss der Gasphasenzusammensetzung konnte auch bei der Substanz SH-Cm7-375 beobachtet werden (siehe Kapitel 3, Abb. 3.3, Compound H). Bei der Produktion dieser Substanz spielt der Sauerstoffpartialdruck ebenfalls eine erhebliche Rolle. Die in Abbildung 2.10 gezeigten Peaks treten immer in Kombination miteinander auf, was nahe legt, dass es sich um eine Substanzklasse handelt. Um Rückschlüsse auf die anderen Substanzen dieser

Gruppe, sowie auf die Gründe für eine verstärkte Produktion bei diesen Bedingungen ziehen zu können wurde die Substanz SH-Cm7-374, welche aufgrund der Peakfläche die höchsten Ausbeuten erwarten ließ, aufgereinigt und charakterisiert (siehe Kapitel 2.2.4).

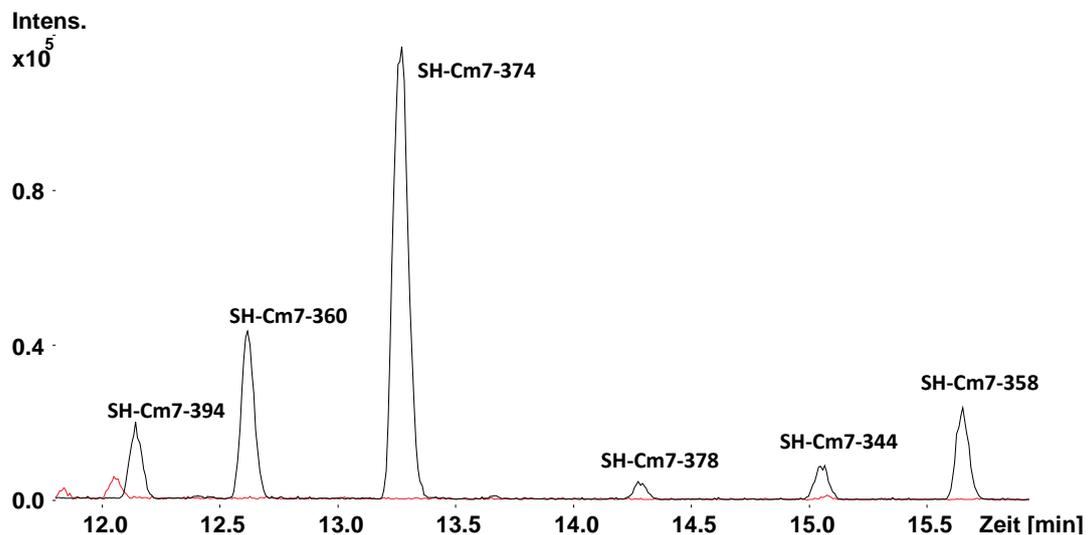


Abbildung 2.10: Überlagerung der BPCs zweier standardisierter Messungen unter Standard- und Hochsauerstoffbedingungen. Es wird deutlich, dass die veränderten Bedingungen einen signifikanten Einfluss auf die Produktion der dargestellten Substanzen haben. Diese zwei Dreiergruppen treten immer gleichzeitig auf, was einen gemeinsamen biosynthetischen Ursprung nahelegt.

Alle der in den Abbildungen 2.4 bis 2.10 gezeigten BPCs zeigen die Massenpeaks von Substanzen, bei denen die Änderung der jeweils angeführten Kultivierungsparameter einen sehr deutlichen Einfluss hat. Abgesehen von diesen Substanzen existieren noch weitere, die hier jedoch nicht alle einzeln aufgeführt sind. Die Quantifizierung der Extrakte mittels eines internen Standards erlaubt zusätzlich die automatisierte Erfassung von schwächer produzierten Substanzen, welche bei einer manuellen/visuellen Auswertung mit großer Wahrscheinlichkeit nicht erfasst werden würden. Wenn nun Zielmassen, basierend auf einer HRMS unterstützten Fraktionierung eines Extraktes und anschließender Aktivitätsdetektion, definiert werden (siehe Kapitel 2.2.3), ist eine schnelle halbautomatisierte Untersuchung der Extrakte nach den besten Produktionsbedingungen möglich. Dann kann eine direkte Aufreinigung der Zielsubstanz aus dem RBK-Extrakt mit der höchsten Konzentration erfolgen. Falls die Mengen, die mittels einer RBK erzeugt wurden, nicht ausreichend sind, ist eine schnelle Nachproduktion mittels angepasster Kultivierungsbedingungen möglich. So wurden beispielsweise die bereits vorhandenen Daten verwendet, um Extrakte, mittels einer Isotopen-Cluster-Analyse, nach der Fütterung von Kaliumbromid auf das Vorhandensein von bromierten Naturstoffen zu untersuchen. Dadurch konnte bereits im Vorfeld gezeigt werden,

dass neue, mittels der im nächsten Kapitel beschriebenen aktivitätsgeleiteten Fraktionierung, gefundene Chondramide bromiert vorliegen können (siehe Abbildung 2.11).

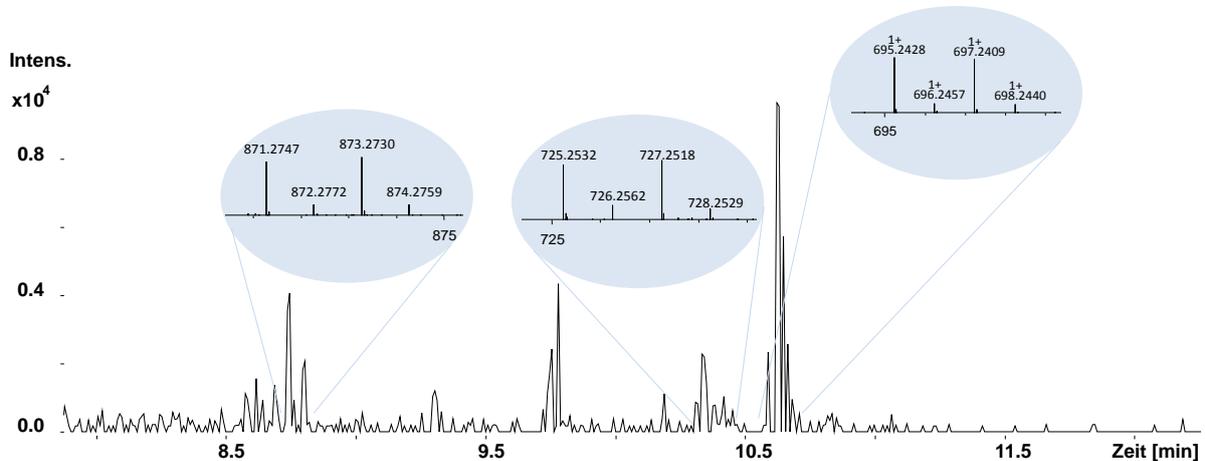


Abbildung 2.11: Isotopen-Cluster-Analyse eines Extraktes, mit den identifizierten Isotopenpattern, welches unter Zusatz von KBr bei der Kultivierung erzeugt wurde. Die blau hervorgehobenen Isotopenpattern zeigen deutlich das typische Isotopenverhältnis bromierter Substanzen.

Diese bromierten Chondramide konnten daraufhin, mittels einer *Batch*-Kultivierung im 10 l Maßstab, unter verbesserten Bedingungen produziert werden (siehe Kapitel 3 „Methoden zur Prozessverbesserung mittels Abgasanalyse“ und Kapitel 4 „Entdeckung neuer Chondramide mit verbessertem Wirkspektrum“). Generell kann die Zugabe von KBr sinnvoll sein, wenn chlorierte Substanzen in Extrakten gefunden werden, da Chlor-Halogenasen gelegentlich, in Abhängigkeit von der Bioverfügbarkeit von Brom, auch in der Lage sind dieses einzufügen [21]. Anhand ihres typischen Isotopenmusters können diese beiden Halogenierungen leicht erkannt und detektiert werden (siehe Abbildung 2.11).

Prinzipiell sind verschiedenste Arten von Testungen möglich. So können beispielsweise Erdextrakte als Induktoren verwendet werden, da diese möglicherweise Substanzen enthalten, die im natürlichen Umfeld der untersuchten Organismen ebenfalls vorkommen und diese dort beeinflussen. Empfehlenswert ist jedoch in jedem Fall die Untersuchung von Einflüssen der Gasphase, des pH-Wertes, verschiedener Kohlenstoff- und Stickstoffquellen, Phosphat, Salzen, aber auch die Einflüsse von Kulturüberständen anderer Organismen, spezifischer Chemikalien und Substanzen.

2.2.3 PROZESSIERUNG VON EINZELKULTIVIERUNGSEXTRAKTEN

Nach der Produktion und anschließenden Quantifizierung der Extrakte wurden mit den Rohextrakten Aktivitätstests durchgeführt. Standardmäßig wurden für die Detektion

zytotoxischer Aktivitäten *Chinese Hamster Ovary* (CHO) Zellen in 96-Wellplatten mit einem Kulturvolumen von 180 μl verwendet. Für Aktivitätstests wurden Konzentrationen von 100 $\mu\text{g/l}$ und 10 $\mu\text{g/ml}$ eingesetzt. Im Falle einer über Tetrazoliumsalzreduktion (MTT) detektierten Aktivität, erfolgte anschließend eine zusätzliche IC_{50} Bestimmung mittels einer Verdünnungsreihe. Die in Abbildung 2.12 dargestellte IC_{50} -Kurve zeigt, dass das Extrakt von SBCm007 eine außergewöhnlich hohe zytotoxische Aktivität besitzt. Aus diesem Grund wurden Extrakte dieses Stammes mittels einer *High-Content* Analyse genauer untersucht (siehe Kapitel 4 „Entdeckung neuer Chondramide mit verbessertem Wirkungsspektrum“). Für eine standardisierte antimikrobielle Aktivitätsbestimmung erfolgte die Kultivierung der Indikatorstämme ebenfalls im 96-Wellformat in 150 μl Medienvolumen. Die inhibitorische Aktivität der Extrakte wurde mittels einer 1:2 Verdünnungsreihe bei einer Startkonzentration von 1 mg/ml ermittelt (entspricht 150 μg Extrakt im ersten Well). Die Auswertung erfolgte durch Messung der optischen Dichte bei 600 nm.

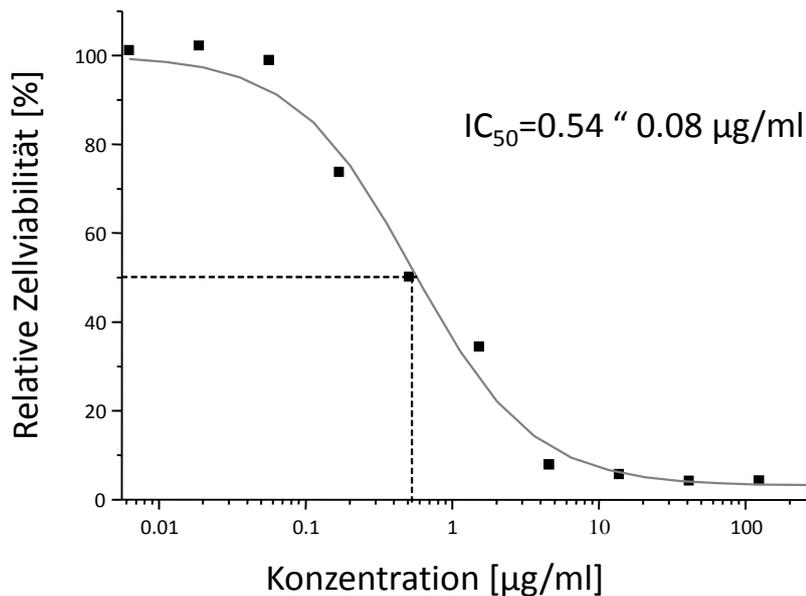


Abbildung 2.12: IC_{50} Kurve des Rohextrakts von SBCm007. Deutlich wird hier die außergewöhnlich hohe Aktivität auf Säugerzellen mit einem IC_{50} -Wert von ca. 0,5 $\mu\text{g/ml}$ (Daten Jennifer Herrman).

Sind Substanzen mit sehr hoher biologischer Aktivität in Rohextrakten vorhanden (wie beispielsweise die zytotoxischen Chondramide), führt dies unter Umständen zu einer „Maskierung“ gleichartiger Aktivitäten. Wenn beispielsweise durch massenspektrometrie- und datenbankunterstützte Dereplikation Substanzen detektiert werden, welche bestimmte biologische Aktivitäten erwarten lassen, kann das dazu führen, dass das jeweilige Rohextrakt

nicht weiter untersucht wird. In solchen Fällen besteht die oben bereits erwähnte Möglichkeit, *High-Content* Methoden auf den unfraktionierten Rohextrakt anzuwenden. Dies hat jedoch den Nachteil, dass gefundene Aktivitäten nicht ohne Weiteres mit Massen korreliert werden können. Aus diesem Grund wurden Möglichkeiten untersucht, eine UPLC-HRMS basierte Separation mit anschließender Wirkstofffindung zu etablieren. Eine Anordnung aus der Advion Nanomate-Ionenquelle (mit integrierter Mikrofluidik und Flussteilung), in Kombination mit der oben beschriebenen Dionex Chromatographieanlage und dem Orbitrap Massenspektrometer, erwies sich hierfür als geeignet.

Mit dieser Anordnung kann der oben beschriebene 18 min Standardgradient verwendet werden, um innerhalb dieser Zeit eine 96-Wellplatte mit chromatographisch getrennten Fraktionen zu beschicken. Der Gradient kann gegebenenfalls den Erfordernissen an die Trennleistung angepasst werden. Das Einzelfraktionsvolumen beträgt bei dieser Zeitspanne knapp 110 µl und die Fraktionierungsdauer 12 s pro Well. Die Platten können innerhalb von ca. 3 h eingetrocknet werden. Die Extraktmengen, die hierbei injiziert werden können, erwiesen sich als ausreichend für zytotoxische Testungen, waren in der Regel jedoch zu gering um schwache antimikrobielle Aktivitäten in den 96-Wellplatten zu detektieren. So konnte z. B. eine antifungale Wirkung, die letztendlich auf mehrere unbekannte Chondrochloren Derivate [22] zurückgeführt werden konnte (siehe Kapitel 6 „Strukturen“), im 96-Wellformat nicht detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Die aktiven Substanzen konnten in diesem Fall erst nach aufwändiger, manueller Fraktionierung identifiziert werden. Aus diesem Grund wurden Möglichkeiten untersucht, diese Aktivitäten mittels einer ähnlich automatisierten Lösung wie bei den Zytotoxizitätsassays zu detektieren. Als wesentlich besser geeignet hierfür erwies sich die Fraktionierung in 384-Wellplatten. Der Grund hierfür liegt in den höheren Substanzkonzentrationen pro Well, die bei der Anwendung dieser Platten erreicht werden kann, wie weiter unten deutlich wird. Ein Extrakt kann dabei ebenfalls über einen 18 min Gradienten auf eine ganze Platte verteilt werden und auch hier sind alle Anpassungsmöglichkeiten, wie Gradientenvariationen und Beschickung halber Platten, möglich. Ein einzelnes Well wird bei einer Fraktionierungsdauer von 3 s pro Well mit maximal 28 µl befüllt. Die Fraktionsdauer ist exemplarisch für eine 96- sowie eine 384-Wellplatte in Abbildung 2.13 dargestellt um zu verdeutlichen, dass der Hauptanteil eines Substanzpeaks in einem, maximal zwei Wells aufgefangen wird.

Die Kultivierung der Testorganismen erfolgt nach Trocknung der Platte in einem Volumen von 25 µl. Dies bedeutet eine Volumenreduktion um das Sechsfache im Vergleich zur 96-Wellplatte. Hinzu kommt die Tatsache, dass selbst große Peaks (wie in Abbildung 2.13 gezeigt) kaum längere Retentionszeiten als 10 s aufweisen. Dadurch wird der überwiegende Teil einer Substanz, wie oben bereits erwähnt, in einem oder maximal zwei der 384 Wells aufgefangen. Das Aufteilungsverhältnis einer Substanz in zwei Wells beträgt also im

schlechtesten Fall 1:1. In den meisten Fällen wird jedoch der überwiegende Anteil der Substanz in einem einzelnen Well aufgefangan. Demgegenüber steht eine Konzentrationserhöhung durch Verringerung des Kultivierungsvolumens um den Faktor 6. Zusätzlich ermöglicht der Einsatz eines luziferase-basierten Assays (Bactiter Glo, Promega), eine sehr viel sensitivere Detektion der Zellviabilität als mittels OD-Messung möglich ist. Mittels Lumineszenz kann in diesem Assay die Vitalität der Organismen quantitativ erfasst werden. Das durch lebende Organismen produzierte ATP dient als Kofaktor bei der Substratumsetzung mittels einer Luziferase. Die dabei erzeugte Lumineszenz dient als Maß für die ATP-Konzentration die mit der Anzahl aktiver, lebender Zellen ansteigt. Abbildung 2.14 zeigt die Auswertung eines BacTiter Assays. Ein SBCm007 Rohextrakt wurde fraktioniert und die in einer 384-Wellplatte gesammelten Fraktionen auf Aktivität gegen *Candida albicans* getestet. Bei diesem Extrakt konnte mittels Standard-Assays (OD-Testung im 96-Wellformat) keine Aktivität festgestellt werden, obwohl bekannt ist, dass Chondramide eine schwache antifungale Aktivität besitzen. Mit dem verbesserten und sensitiveren Assay hingegen war es möglich, diese schwache Aktivität deutlich zu detektieren.

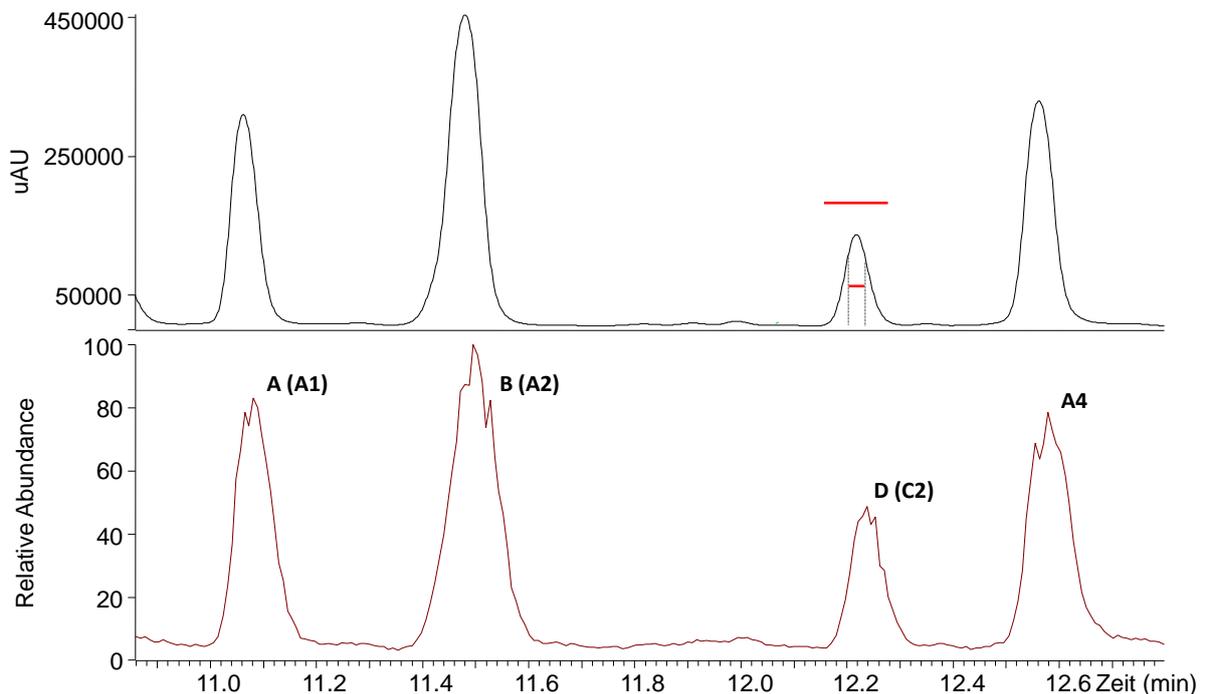


Abbildung 2.13: UV/Vis und BP-Chromatogramme von vier Chondramiden. Die roten Balken deuten jeweils den Bereich an, der in einem 96er Well (groß) und in einem 384er Well (klein) gesammelt wird.

Für die Aufarbeitung der Extrakte aus den Screeningkultivierungen wurde zuerst eine Größenausschlusschromatographie mittels Sephadex LH20 durchgeführt. Dies führt, im Gegensatz zur Flash-Chromatographie, zu einer relativ verlustfreien Vorseparation (siehe

unten im Text und Abbildung 2.16). Anschließend erfolgte eine semipräparative Aufreinigung der vorher definierten Zielmassen mittels *reverse-phase* HPLC (Säulen: Phenomenex Luna C18 bzw. Synergi Fusion). Dadurch werden zwei völlig unterschiedlicher Trennprinzipien miteinander kombiniert (Größenausschluss und unpolare Wechselwirkungen), die sich sehr gut ergänzen. Aufgrund der sehr guten Vorfraktionierung durch Sephadex-Chromatographie, sind diese zwei Schritte in vielen Fällen ausreichend, um eine hinreichend hohe Reinheit für eine chemische und biologische Charakterisierung von Einzelsubstanzen zu erzielen. Die für die präparative HPLC-Chromatographie benötigten Gradienten wurden im Vorfeld analytisch ermittelt. Als Fließmittel wurden dabei Wasser/Acetonitril oder Wasser/Methanol-Gemische verwendet, deren pH-Wert mittels Ameisensäure, Trifluoressigsäure oder Ammonium-Formiat eingestellt wurde.

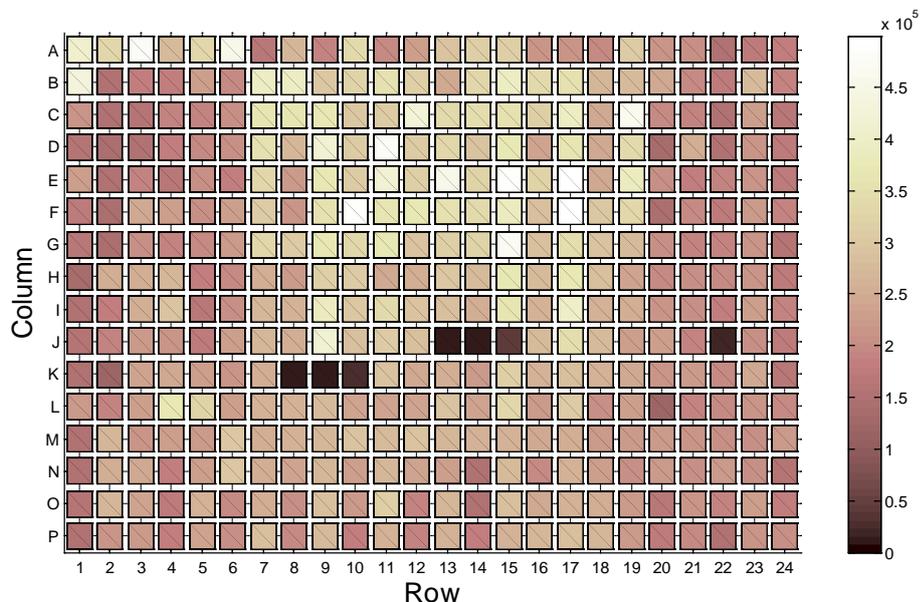


Abbildung 2.14: Auswertung der Aktivitäts-Testung einer Fraktionierung von SBCm007-Rohextrakt, auf *Candida albicans*, quantifiziert mittels Luziferase Lumineszenz. Die Aktivität konnte anhand der zugehörigen hochaufgelösten Massenspektren auf die Chondramide A(A1), B(A2) und A4 zurückgeführt werden (Testung Jennifer Herrmann).

Die Aufarbeitung von größeren Extraktmengen aus XAD oder Biomasse mittels Größenausschluss-Chromatographie, ist häufig nicht praktikabel, da nur relativ geringe Mengen auf die Säule aufgetragen werden können. Aus diesem Grund wurden verschiedene Möglichkeiten untersucht, um die Extraktmenge im Vorfeld zu reduzieren. Als einfache aber effektive Möglichkeit erwies sich hierbei die Extraktion des verwendeten XAD16 mittels verschiedener Lösemittel. Es wurde mit einem unpolaren Lösemittel wie Hexan oder Heptan

begonnen und im darauffolgenden Schritt mit einem polarerer fortgefahren. In Abbildung 2.15 ist eine Extraktionsreihe mit 5 verschiedenen Lösemitteln gezeigt. Diese zeigt, dass dadurch für viele Substanzen eine gute Vorseparation erzielt werden kann. Die dargestellten Fraktionen wurden mittels der oben beschriebenen Methode mit einem internen Standard gemessen. Im Vergleich dazu ist eine Messung des methanolischen Gesamtextraktes gezeigt. Mit Methanol wird der überwiegende Teil der Substanzen direkt vom Adsorberharz eluiert. Die kleineren absoluten Peakflächenverhältnisse dieser Messung, im Vergleich zu den Lösemittelfraktionen, erklären sich durch den reduzierten Gesamtanteil der dargestellten Einzelsubstanzen im Substanzgemisch.

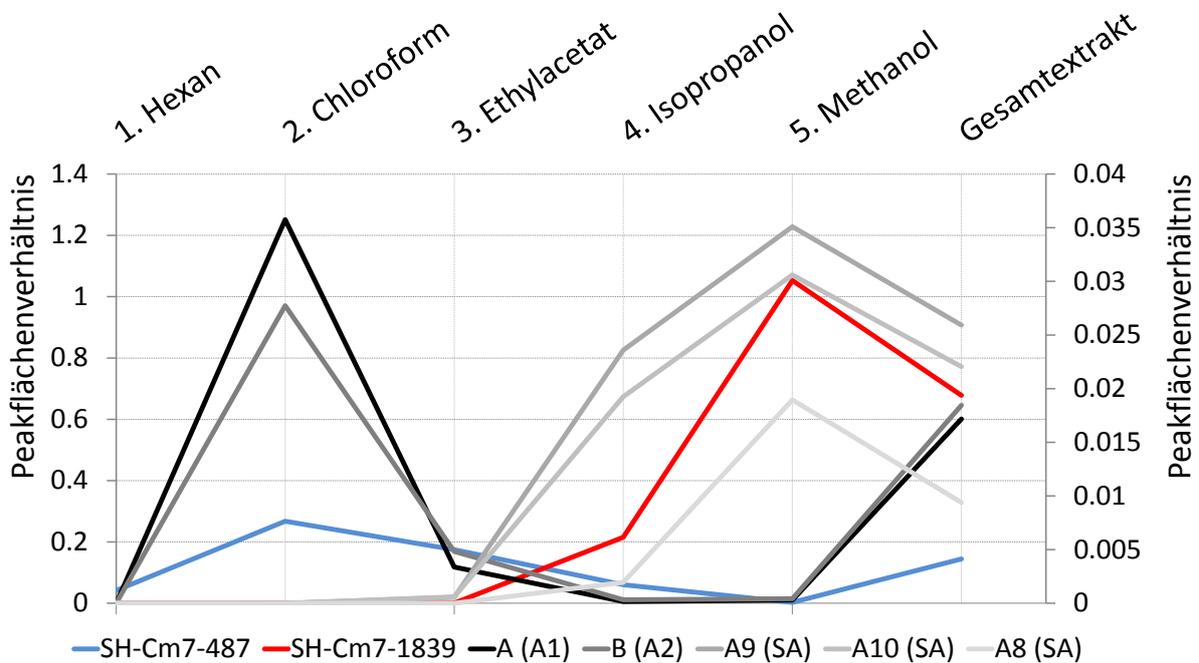


Abbildung 2.15: Relative Peakflächenverhältnisse einer standardisiert vermessenen Lösemittel-Extraktionsreihe von SBCm007. Das Adsorberharz wurde in der angegebenen Reihenfolge mittels verschiedener Lösemittel extrahiert(SA) zeigt an, dass gegen die Sekundärachse aufgetragen wurde. Erklärung siehe Text.

Prinzipiell kann mit Biomasse in ähnlicher Weise verfahren werden. Es empfiehlt sich allerdings eine intensive Extraktion mit Hexan durchzuführen, da dadurch Fette entfernt und somit nachfolgende Aufreinigungsschritte erleichtert werden (Daten nicht gezeigt). Das Restwasser kann mittels Gefriertrocknung sehr einfach vom XAD und der Biomasse entfernt werden. Eine anschließende Entfettung kann dann direkt mit der trockenen Biomasse/XAD durchgeführt werden. Dadurch wird keine Erstextraktion mit wassermischbaren Lösemitteln benötigt. Diese bringt meist ein aufwändiges Ausschütteln im Scheidetrichter und anschließende Trocknung der wässrigen Phase mit sich. Der für die Separation genutzte

Effekt beruht sehr wahrscheinlich auf der Unlöslichkeit mancher Substanzen in den unpolaren Lösungsmitteln. Das Adsorberharz oder die Biomasse dient in diesem Fall als Matrix, welche diese unlöslichen Substanzen bindet. Da Substanzen die lipophil genug sind nur bei direktem Kontakt mit dem jeweiligen unpolaren Extraktionsmittel in Lösung gehen können, ist es wichtig Wasser vor der Extraktion durch Gefriertrocknung quantitativ zu entfernen. Ansonsten findet keine vollständige Benetzung der noch wasserhaltigen Matrix in einem zweiphasigen Wasser/Lösemittel-Gemisch statt, was ein möglichst vollständiges Herauslösen lipophiler Substanzen aus der Matrix verhindert und zu einer verschlechterten Trennleistung führt.

Eine weitere effiziente Möglichkeit der Vorfraktionierung größerer Extraktmengen stellt die Flashchromatographie dar. Bei dieser Methode wird das Substanzgemisch auf Kieselgur aufgetragen und anschließend mittels eines Lösemittelgradienten über Kieselgel aufgetrennt. Dieses Verfahren wird häufig als einfache Methode für eine Vorseparierung verwendet, birgt jedoch die Gefahr, dass speziell hydrophile Substanzen mit der polaren Kieselgelmatrix interagieren und nicht mehr von dieser eluiert werden können. Dabei handelt es sich nicht um eine Stabilisierung unlöslicher Substanzen wie bei der oben beschriebenen Lösemittelfraktionierung. Es treten ionische, aber teilweise auch kovalente Wechselwirkungen reaktiver Gruppen am Molekül mit der Kieselgelmatrix auf. Dies führt zwar letztendlich zu einer Auftrennung des Molekülgemisches, verhindert jedoch die vollständige Elution einiger Substanzen. Die in Abbildung 2.16 gezeigte Elutionsreihe zeigt dies deutlich. Zu Beginn wird eine sehr gute Trennung erreicht, wie anhand der am Tyrosinrest nicht derivatisierten Chondramide beobachtet werden kann (Strukturen der einzelnen Chondramide sind in Kapitel 4 „Entdeckung neuer Chondramide mit verbessertem Wirkspektrum“ dargestellt). Diese stellen die lipophilste Untergruppe dieser Substanzklasse und der dargestellten Moleküle dar. Eine Glykosylierung des Tyrosinrests erhöht die Polarität der Chondramide und eine Phosphorylierung erhöht diese noch weiter. Da die Wechselwirkung der polaren Substanzen mit der Kieselgelmatrix sehr stark ist, erfolgt eine Elution hier „verschleppt“ über mehrere Fraktionen.

Dasselbe Elutionsverhalten kann auch für die in Abbildung 2.16 dargestellte Substanz SH-Cm7-1839 beobachtet werden. Hier kann die Substanz bereits in Fraktionen mit 50% Methanolanteil nachgewiesen werden, ist jedoch selbst bei zweifachem Waschen mit reinem Methanol noch nicht vollständig von der Säule eluiert. Erschwerend kommt hinzu, dass ab ca. 70% Methanol das Kieselgel selbst gelöst und in den Fraktionen wiedergefunden wird.

Diese Resultate zeigen, dass die sorgfältige Auswahl der Fraktionierungsmethode ausschlaggebend für den Erfolg einer Identifizierung und direkten Charakterisierung aus den Rohextrakten des RBK-Screenings ist, da hier teilweise nur 40 mg Ausgangsmaterial zur

Verfügung stehen, wovon noch die Mengen für biologische und analytische Tests abgezogen werden müssen. Aus diesem Grund muss sehr genau abgewogen werden, welche Vorfraktionierungsmethode die sinnvollste darstellt. Aufgrund des unterschiedlichen Trennprinzips im Vergleich zur HPLC, sowie der meist relativ verlustfreien Fraktionierung verglichen mit Silikagel, erwies sich hier, wie oben bereits erwähnt, die Größenausschluss-Chromatographie als ideale Methode.

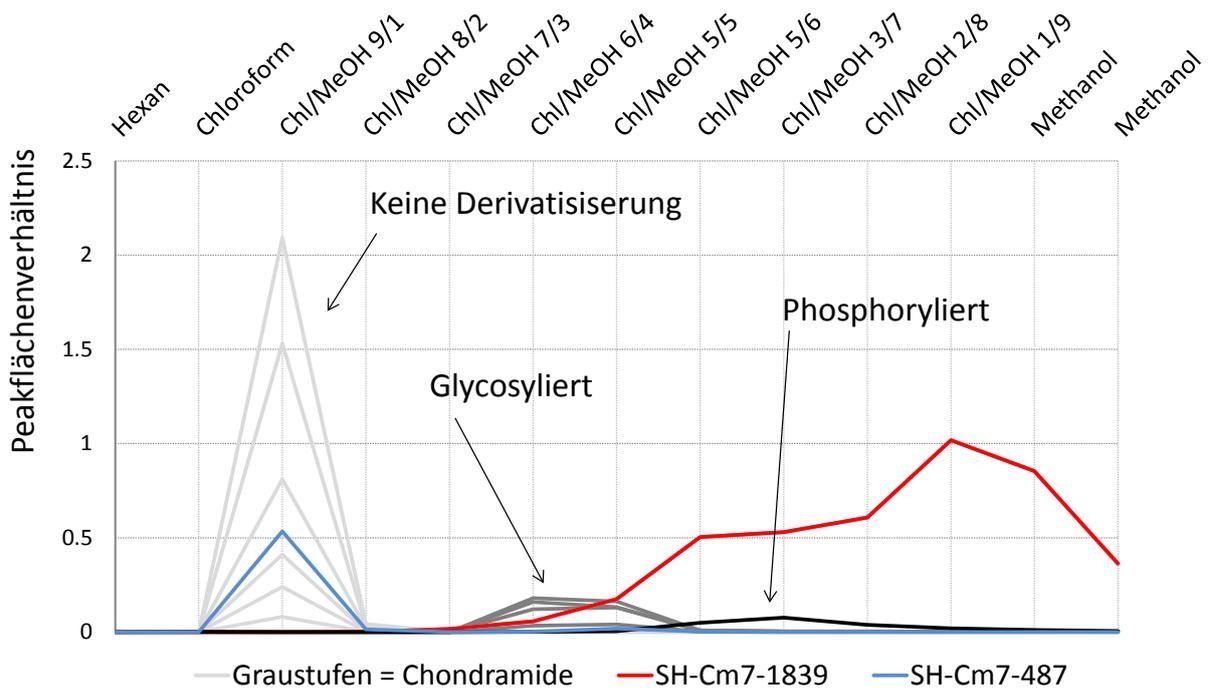


Abbildung 2.16: Relative Peakflächenverhältnisse standardisiert vermessenener Kieselgelfractionen eines methanolischen Extraktes von SBCm007. Erklärung siehe Text.

Im folgenden Kapitel wird gezeigt, dass mit geeigneten chromatographischen Methoden aus den RBK-Extrakten bereits Substanzen aufgereinigt und charakterisiert werden können. Diese Substanzen wären in einigen Fällen mittels einer herkömmlichen Kultivierung nicht entdeckt worden. In Fällen, in denen die produzierten Mengen nicht ausreichend waren, konnten die erzeugten Daten verwendet werden um verbesserte Produktionsbedingungen zu identifizieren. Ein erfolgreiches Anwendungsbeispiel stellt die Entdeckung von über 30 neuen Chondramidvarianten dar (siehe Kapitel 4 „Entdeckung neuer Chondramide mit verbessertem Wirkspektrum“). Diese Ergebnisse konnten durch die schnelle Umsetzung der mittels RBK erzielten Erkenntnisse realisiert werden. Dies zeigt die praktische Anwendbarkeit der entwickelten Methode, da innerhalb von zwei bis drei Wochen ein ganzes Panel an Experimenten ausgeführt werden kann. Durch diese wird im günstigen Fall eine

direkte Charakterisierung einer interessanten Substanz ermöglicht. Bei nicht ausreichenden Extraktmengen werden jedoch zumindest Hinweise geliefert, wie anhand von verbesserten Produktionsbedingungen mehr Substanz erzeugt werden kann. Da alle Experimente in der kontrollierten Umgebung eines Bioreaktors ablaufen, ist eine Aufzeichnung aller prozessrelevanten Daten möglich. Dies verbessert die Reproduzierbarkeit und den Informationsgewinn im Vergleich zu herkömmlichen „Blindversuchen“ in geschüttelten Gefäßen erheblich.

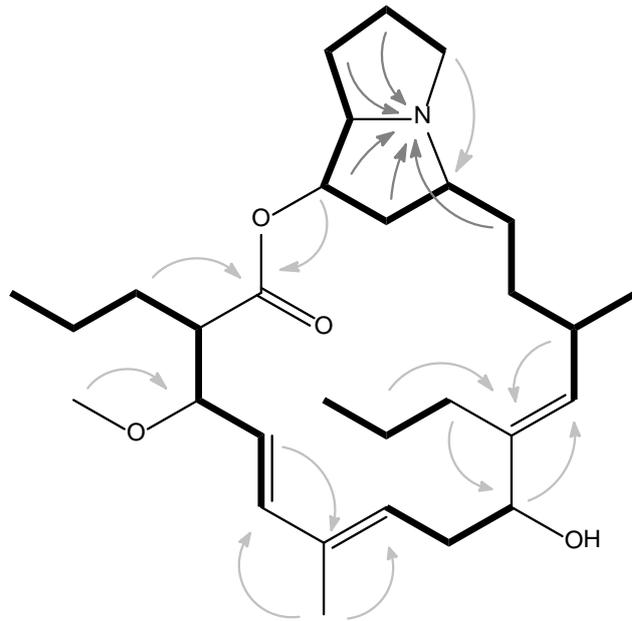
2.2.4 CHARAKTERISIERUNG NEU ENTDECKTER SUBSTANZEN

Die Auswahl von Zielsubstanzen erfolgte aktivitätsbasiert mittels der Festlegung von Kandidatenmassen, die in den biologischen Assays einzelnen aktiven Fraktionen zugeordnet wurden. So konnte z. B. Chondramid A10 identifiziert, aufgereinigt und charakterisiert werden (siehe Kapitel 4 „Entdeckung neuer Chondramide mit verbessertem Wirkungsspektrum“). Zusätzlich wurde versucht möglichst alle Substanzen, deren Produktion durch eine spezifische Bedingung induziert wurde, aufzureinigen und zu charakterisieren. Dadurch sollten eventuelle Rückschlüsse über die Art der Induktion ermöglicht werden.

Die Substanz SH-Cm7-487 (siehe Abbildung 2.17) fiel beispielsweise auf, da sie bei niedrigem pO_2 in Kombination mit niedrigem pCO_2 produziert wurde (siehe Kapitel 3 „Methoden zur Prozessverbesserung mittels Abgasanalyse“, Compound C). Eine noch höhere Produktion konnte bei niedrigem O_2 -Partialdruck in Kombination mit 2 g/l KBr und hohem Nährstoffgehalt beobachtet werden. Unter diesen Bedingungen fiel, neben SH-Cm7-487, eine weitere Substanz (SH-Cm7-503) auf (siehe Abbildung 2.9). Beide Substanzen wurden aus dem RBK-Extrakt aufgereinigt, mit Ausbeuten von ca. 1,5 mg pro Liter. Die Struktur beider Moleküle konnte anhand von 1H -, HH-COSY-, HSQC- und HMBC-Spektren aufgeklärt werden. Die planare Struktur von SH-Cm7-487 ist in Abbildung 2.17 dargestellt. Anhand der aufgenommenen Daten war lediglich das Vorhandensein eines tertiären Stickstoffes fraglich. Der Einbau von Stickstoff wurde zwar anhand von HRMS-Daten für die Summenformel errechnet, das beinhaltende Strukturelement ist jedoch für eine myxobakterielle Substanz äußerst ungewöhnlich. Aus diesem Grund wurde ein ^{15}N -HMBC aufgenommen, welches mittels der dunkelgrau gezeigten Korrelationen das Vorhandensein eines Pyrrolizidins verifizierte und den Strukturvorschlag bestätigte (vollständige Listen der chemischen Shifts und Kopplungskonstanten befinden sich im Anhang B).

Pyrrolizidine werden gewöhnlich aus höheren Pflanzen isoliert und dienen diesen als Schutz gegen Fraßfeinde. Die Biosynthese erfolgt in Pflanzen aus Arginin, welches zu Putrescin und Spermidin umgewandelt und woraus nachfolgend Homospermidin gebildet wird. Aus diesem wird mittels Zyklisierung Pyrrolizidin gebildet [23]. Die größte literaturbeschriebene

Ähnlichkeit mit SH-Cm7-487 haben die revidierten Epohelmine. Diese wurden aufgrund ihrer inhibierenden Wirkung auf die Lanosterin-Synthase aus einem Pilz isoliert und besitzen als einziger, durch Literaturrecherchen bestätigter Naturstoff ein vollständig gesättigtes Pyrrolizidinsystem [24, 25].



Summenformel: $C_{30}H_{49}NO_4$
 Exakte Masse: 487.3662
 Molekulargewicht: 487.7144
 m/z : $[M+H^+]$ 488.3734

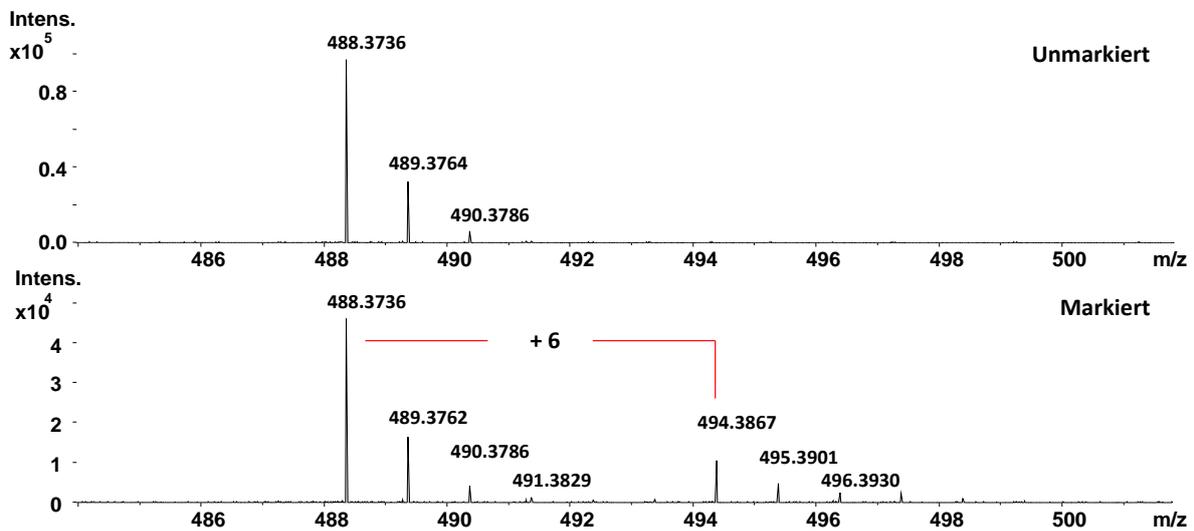


Abbildung 2.17: Struktur von SH-Cm7-487 und Massenspektren mit Fütterungsexperiment. Die dunklen Balken zeigen COSY-Korrelationen an, graue Pfeile HMBC- und dunkelgraue Pfeile ^{15}N -HMBC-Korrelationen. Das Fütterungs Experiment wurde mit ^{15}N , ^{13}C -markiertem Prolin durchgeführt. Der erwartete Massenshift von 6 m/z ist im markierten Massenspektrum angezeigt, was den Einbau des markierten Prolins bestätigt.

Ungewöhnlich ist die relativ starke Tieffeldverschiebung, die für den Stickstoff gemessen wird und bei ca. 160 ppm liegt (Ammonium als 0). Dies deutet auf ein *N*-Oxid hin. Da jedoch die chemischen Shifts der umliegenden Kohlenstoffe und Protonen nahezu identische Werte

wie die synthetischen Epohelmine aufweisen [25] und auch massenspektrometrisch kein *N*-Oxid nachgewiesen werden kann, wird von der Korrektheit der gezeigten Struktur ausgegangen. Benachbarte Atome zu einem *N*-Oxid in Sechsring-Systemen weisen normalerweise erhebliche chemische Verschiebungen im Vergleich zur nicht oxidierten Form auf [26]. Die starke Tieffeldverschiebung des Stickstoffes wird hier möglicherweise durch Spannungen im doppelten Fünfring-System verursacht. Unglücklicherweise existieren keine veröffentlichten ¹⁵N-Daten für ähnliche Systeme, mit denen ein Vergleich möglich wäre. Die zweite Substanz (SH-Cm7-503) weist große Ähnlichkeit mit SH-Cm7-487 auf. Der einzige Unterschied besteht im Vorhandensein einer Hydroxylgruppe an einem der Propylreste des Makrolaktons (siehe Abbildung 2.18).

Dies und die gleichzeitige Erhöhung der Produktion deuten auf einen gemeinsamen biosynthetischen Ursprung hin. Diese Hypothese wird durch das Vorhandensein eines NRPS/PKS-Biosynthese-genclusters im Genom von SBCm007 unterstützt. Das Cluster weist die passende Anzahl an PKS-Modulen und eine A-Domäne mit einer vorhergesagten Spezifität für Prolin auf (Daten nicht gezeigt). Aufgrund dieser Befunde wurde ¹⁵N- und 6-fach ¹³C-markiertes Prolin zu einer Schüttelkolbenkultivierung zugegeben. Um ähnliche Kultivierungsbedingungen wie bei der RBK zu erzeugen, wurden die Nährstoffe verdoppelt. Zusätzlich wurde KBr zugegeben und das Gefäß mittels Parafilm versiegelt.

Bei beiden Substanzen konnte der Einbau des markierten Prolins mittels HRMS nachgewiesen werden (siehe Abbildung 2.17 und 2.18). Des Weiteren wurde in direkter Nachbarschaft des Biosynthese-genclusters ein Gen mit hoher Ähnlichkeit zu Crotonyl-CoA Carboxylasen/Reduktasen gefunden, welches unter Umständen für die Biosynthese der ungewöhnlichen Propionyl-CoA Verlängerungseinheiten benötigt wird [27]. Dies legt nahe, dass das identifizierte Gencluster das zugehörige ist. Weitere Arbeiten zur Biosynthese sind geplant. Interessant ist ebenfalls der Mechanismus des Ringschlusses zum Pyrrolizidin, für einen Naturstoff konnte kein vergleichbarer Mechanismus in der Literatur gefunden werden. Auch hier sind molekularbiologische Arbeiten zur Biosynthese geplant.

Ohne die Untersuchung verschiedener Produktionsbedingungen wäre eine erfolgreiche Charakterisierung dieser neuen Naturstoffklasse nicht möglich gewesen. Trotzdem ist es derzeit noch nicht möglich, Aussagen zu treffen, weshalb diese Bedingungen zu einer Verbesserung der Produktion geführt haben. Osmotischer Stress scheint ein auslösender Faktor zu sein. Es ist jedoch nicht geklärt, weshalb nur unter bestimmten Bedingungen die hydroxylierte Form der Pyrrolizidine auftritt. Möglicherweise stellt diese eine inaktive Form des Moleküls dar oder das hydroxylierende Enzym wird durch die erzeugten Bedingungen beeinflusst. Beide Substanzen wurden auf antimikrobielle und zytotoxische Aktivität getestet. Bei SH-Cm7-487 konnte bei einer Konzentration von 10 µg/ml eine schwache Zytotoxizität

festgestellt werden. Möglicherweise ist diese auf eine Enzyminhibierung, wie im Fall der strukturell verwandten Epohelmine, und nicht auf eine direkte Toxizität zurückzuführen [24].

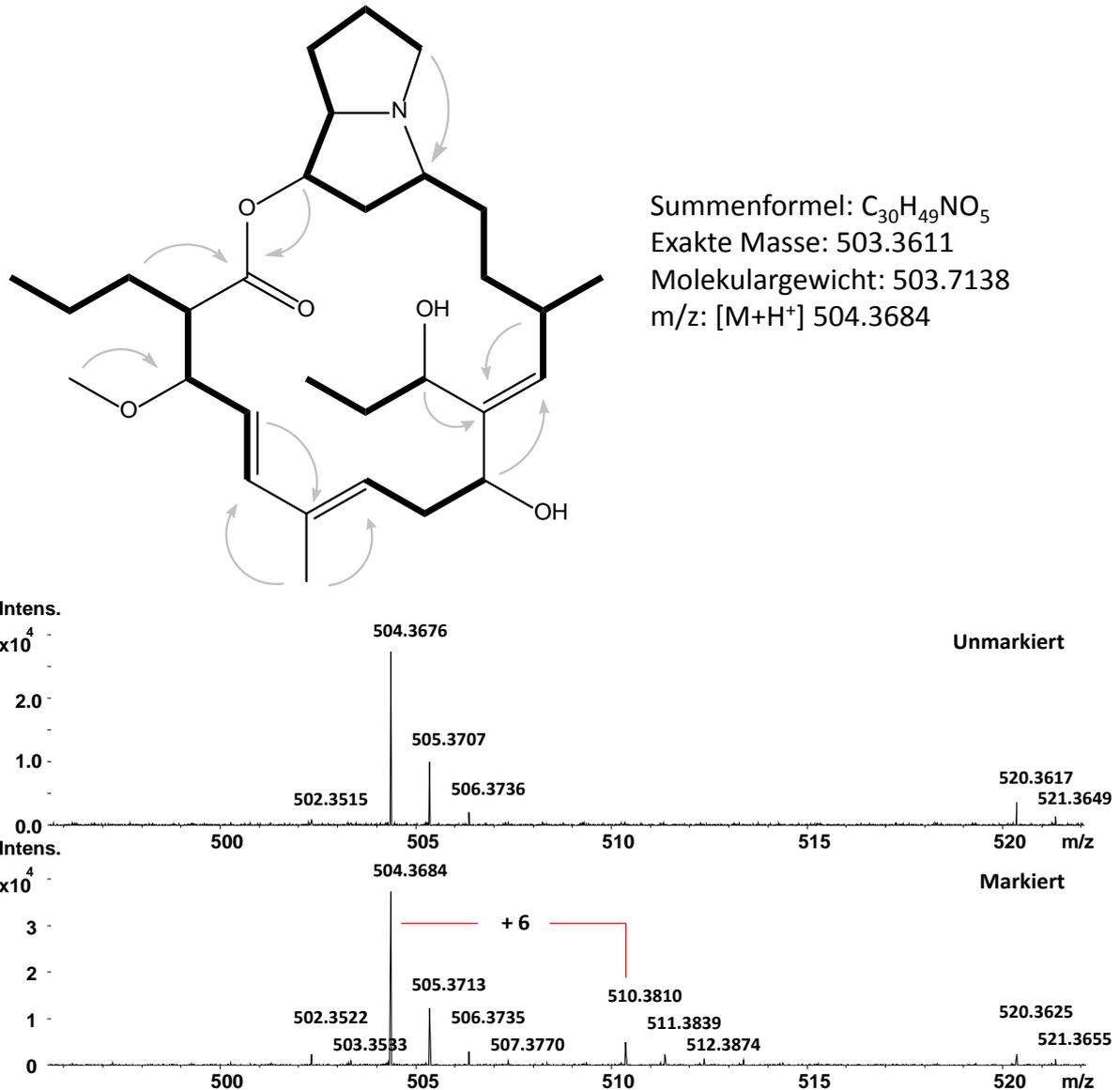


Abbildung 2.18: Struktur von SH-Cm7-503 und Massenspektren mit Fütterungsexperiment. Die dunklen Balken zeigen COSY-Korrelationen an, graue Pfeile HMBC- und dunkelgraue Pfeile ^{15}N -HMBC-Korrelationen. Das Fütterungs-Experiment wurde mit ^{15}N , ^{13}C -markiertem Prolin durchgeführt. Der erwartete Massenshift von 6 m/z ist im markierten Massenspektrum angezeigt, was den Einbau des markierten Prolins bestätigt.

Eine weitere interessante Gruppe induzierbarer Substanzen, stellt die im vorigen Kapitel 2.2.3 in Abbildung 2.10 repräsentierte Klasse dar. Bei diesen Substanzen war vor allen Dingen die Zufuhr von ausreichend Sauerstoff für eine verbesserte Produktion verantwortlich (siehe Kapitel 3 „Methoden zur Prozessverbesserung mittels Abgasanalyse“, Compound H). Aus dem Screeningextrakt konnten aus einem Liter Kulturüberstand nur wenige Mikrogramm

der am stärksten produzierten Substanz SH-Cm7-374 aufgereinigt und charakterisiert werden, weshalb im *Batch*-Verfahren unter verbesserten Bedingungen nachproduziert wurde. Interessanterweise handelt es sich hierbei um ein 2,6-Diketopiperazin (siehe Abbildung 2.19). Anscheinend ist dies das erste beschriebene Beispiel eines natürlichen Diketopiperazins mit der 2,6-Konformation, wohingegen sehr viele literaturbeschriebene Beispiele vom Typ der 2,5-Diketopiperazine existieren [28]. Auch für synthetisch erzeugte 2,6-Diketopiperazine finden sich kaum Beispiele in der Literatur [29], was einen Vergleich der vorhandenen NMR-Daten mit den Daten bereits beschriebener Moleküle unmöglich machte.

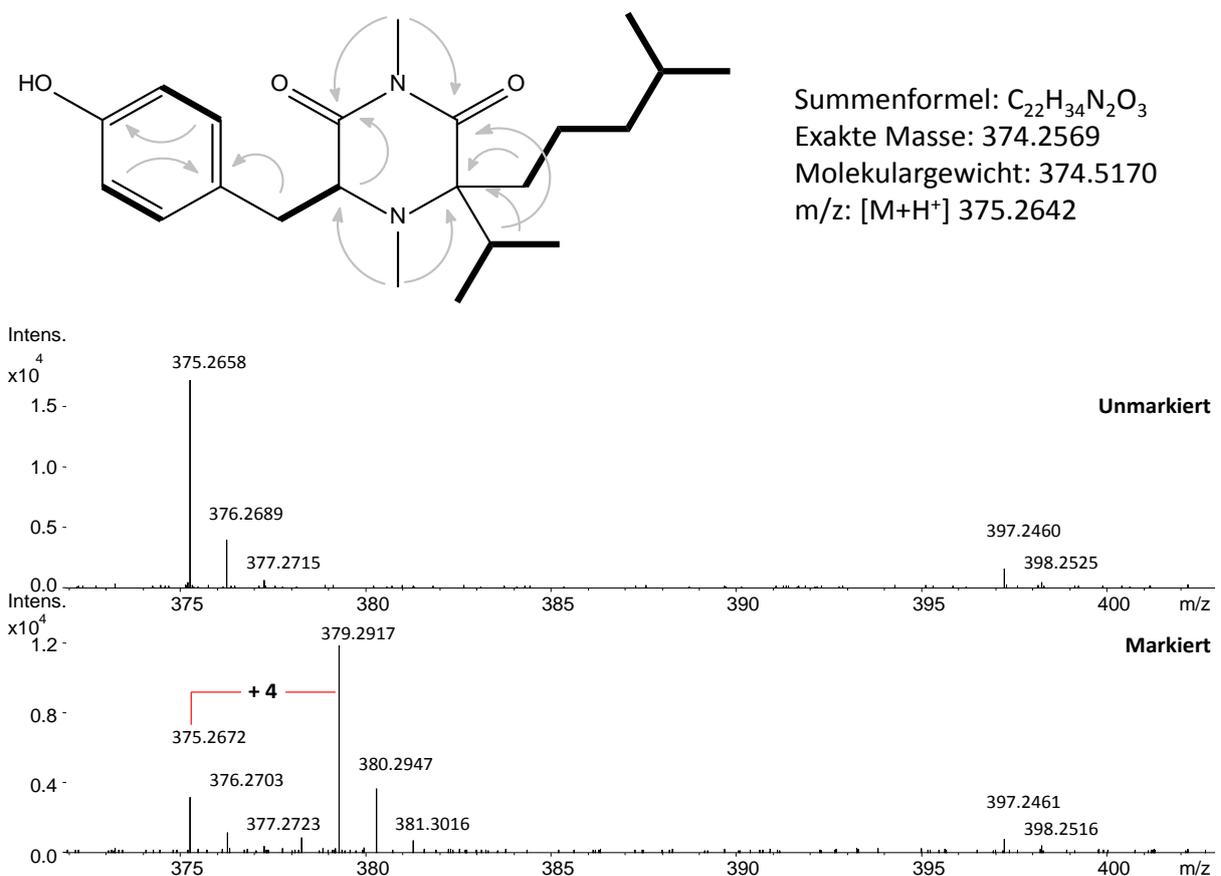


Abbildung 2.19: Struktur von SH-Cm7-374 und Massenspektren mit Fütterungsexperiment. Die dunklen Balken zeigen COSY-Korrelationen an, graue Pfeile HMBC-Korrelationen. Das Fütterungs Experiment wurde mit 4-fach deuteriertem Tyrosin durchgeführt, der erwartete Massenschift von 4 ist im gelabelten Massenspektrum angezeigt was den Einbau des markierten Tyrosins bestätigt.

Um abzusichern, dass es sich bei SH-Cm7-374 um einen Naturstoff (und keinen Medienbestandteil) handelt, sowie um erste Einsichten in die Biosynthese zu bekommen, wurde *L*-Tyrosin-2,3,5,6-D₄ zu einer Schüttelkultur zugefüttert. Zur Erzeugung ähnlicher Produktionsbedingungen wie in der RB-Kultivierung, wurde ein Kolben mit Schikanen

eingesetzt. Dadurch konnte der Sauerstoffeintrag in das Medium erhöht werden. Die 4-fache Deuterierung konnte bei SH-Cm7-374 mittels HRMS nachgewiesen werden (siehe Abbildung 2.19) und wurde ebenfalls bei Substanz SH-Cm7-360 detektiert, während SH-Cm7-394 nicht in ausreichenden Mengen produziert wurde um einen Einbau nachzuweisen.

Die Massendifferenzen innerhalb dieser sechs Substanzen, die sich in zwei Gruppen aufteilen (siehe Abbildung 2.10 und 2.20), sind bei dreien sehr wahrscheinlich auf den Einbau von Phenylalanin anstatt Tyrosin und/oder das Fehlen einer Methylgruppe zurückzuführen (siehe Abbildung 2.20). Dies sind Variationen, die sich durch unspezifischen Einbau ähnlicher Aminosäuren bzw. nicht stattfindender Methylierung erklären lassen. Für die Massendifferenz zum jeweils kleinsten Peak einer Gruppe von 33,9842 Da bzw. 19,9682 Da lässt sich allerdings keine offensichtliche Strukturvariation herleiten. Für einen endgültigen Beweis dieser Vorschläge müssen jedoch alle Derivate vollständig charakterisiert werden. Derzeit wird versucht die Bedingungen, die für eine verbesserte Produktion dieser hypothetischen Substanzklasse identifiziert wurden, auf einen kontinuierlichen Prozess im 10 l Maßstab zu übertragen (siehe Kapitel 5 „Anwendung von *Repeated Batch* Ergebnissen auf kontinuierliche Prozesse). Dadurch sollen ausreichende Substanzmengen für eine Charakterisierung mittels NMR produziert werden.

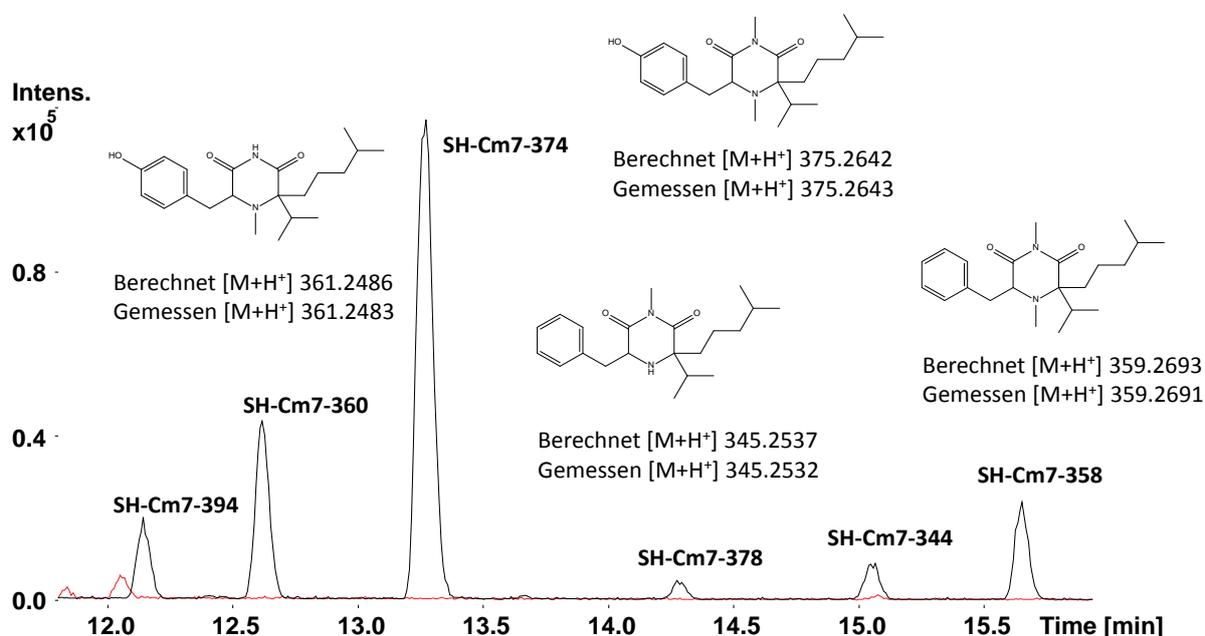


Abbildung 2.20: Massendifferenzen einer Gruppe Substanzen deren Produktion durch hohe Sauerstoffpartialdrücke induziert wird. Die Namen leiten sich aus der gemessenen Masse ab. SH-Cm7-374 konnte charakterisiert werden. Aufgrund der Massendifferenzen und polaritätsbedingten Retentionszeitunterschiede lassen sich mittels HRMS Summenformeln generieren, die die gezeigten Strukturvorschläge für SH-Cm7-360, SH-Cm7-345 und SH-Cm7-359 nahelegen.

Einen Hinweis zu Aufklärung der Biosynthese der 2,6-Diketopiperazine liefern möglicherweise zwei kleine Moleküle, die ebenfalls Tyrosin als Baustein enthalten. Diese in Abbildung 2.21 dargestellten Substanzen unterscheiden sich voneinander nur durch eine Amid- anstelle einer Carbonsäuregruppe im Molekül. Möglicherweise wird diese Amidvorstufe ebenfalls für den ungewöhnlichen Ringschluss im 2,6-Diketopiperazin benötigt.

Diese Annahmen werden unterstützt durch Teilstrukturen, die anhand von NMR-Spektren aufgereinigter Substanz SH-Cm7-394 abgeleitet wurden. Die Substanz wurde aus ersten Extrakten einer Pilotkultivierung aufgereinigt (Details zur Produktion finden sich im Kapitel 5.2.2). Abbildung 2.22 zeigt den Vergleich der Protonenspektren von SH-Cm7-374 und SH-Cm7-394 und einen Strukturvorschlag der sich aus den NMR-Spektren (^1H , HH-COSY, HSQC, HMBC) und HRMS-Daten ableiten lässt. Hier muss jedoch erwähnt werden, dass diese Spektren mit 80 μg Reinsubstanz aufgenommen wurden. Dadurch war es nicht möglich quartäre C-Atome zu bestimmen, weshalb diese Resultate als vorläufig betrachtet werden müssen. Allerdings deutet die gemeinsame Auf- und Abregulation der Produktion, der in Abbildung 2.20 gezeigten Substanzen, auf einen gemeinsamen biosynthetischen Ursprung hin. Durch die hypothetische Struktur in Abbildung 2.22 lassen sich auch die oben erwähnten Massendifferenzen von 33,9842 Da bzw. 19,9682 Da erklären.

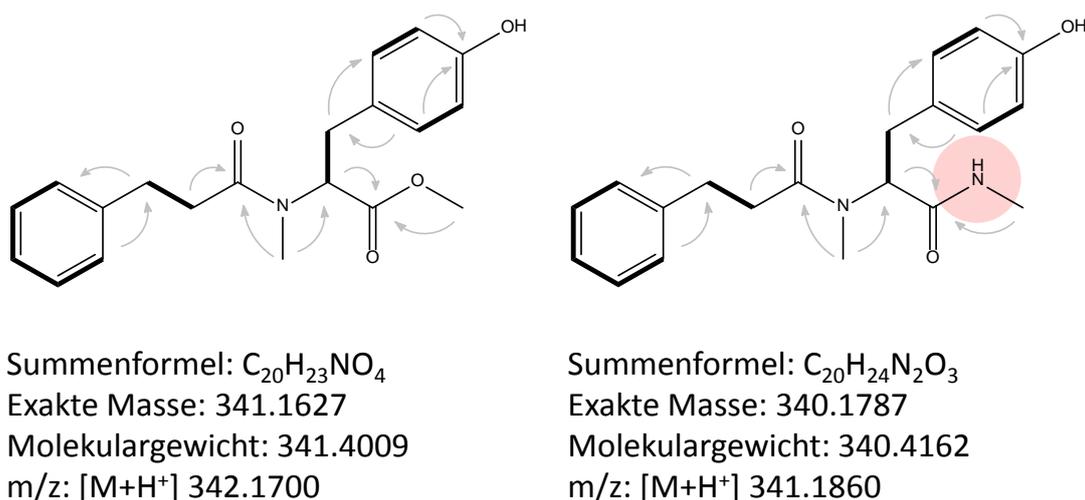


Abbildung 2.21: Strukturen von zwei kleinen Molekülen, die Tyrosin bzw. Tyrosinamid als Baustein enthalten. Die dunklen Balken zeigen COSY-Korrelationen an, graue Pfeile HMBC-Korrelationen.

Bei diesen Substanzen stellt jedoch nicht nur die 2,6-Konformation ein ungewöhnliches Strukturelement dar, sondern auch das quartäre α -Kohlenstoffatom. Die Herkunft dieses Bausteins erschließt sich nicht ohne Weiteres. Aus diesem Grund sind auch hier weitere

Versuche geplant, um die Biosynthese dieser interessanten Substanzklasse aufzuklären. Möglicherweise stellt dieser Ringschluss ebenfalls einen neuen, bisher noch nicht beschriebenen Reaktionsmechanismus dar. SH-Cm7-375 wurde auf antibiotische Wirkung und Zytotoxizität getestet und es konnte eine schwache Zytotoxizität sowie eine schwache antimikrobielle Wirkung im mikromolaren Bereich gegen *Staphylococcus aureus* festgestellt werden.

Eine weitere Substanzgruppe ist in Abbildung 2.23 dargestellt. Die Massen dieser Peptide wurden mit jeweils verschiedenen Anteilen in so gut wie allen untersuchten Extrakten von diversen Myxobakterien detektiert. Es handelt sich hierbei nicht um Medienbestandteile, da sie auch bei Wachstum in Minimalmedien gefunden werden (Daten nicht gezeigt). Es ist jedoch nicht bekannt, ob es sich um Peptide mit einer spezifischen Funktion für den Produzenten oder um Fragmente anderer Substanzen handelt.

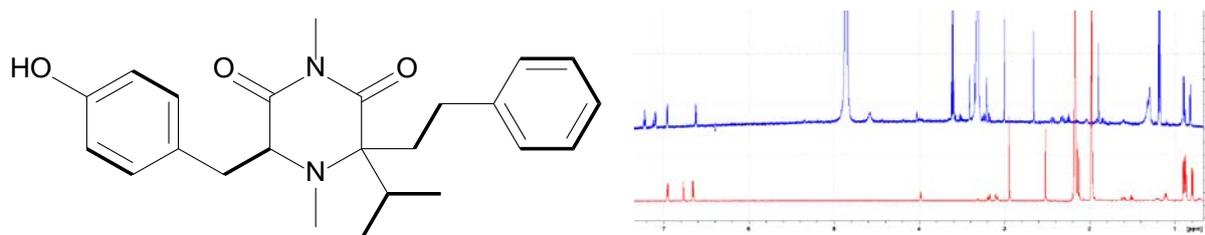
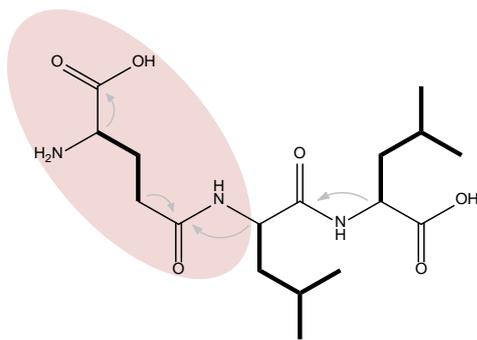


Abbildung 2.22: Hypothetische Struktur der Substanz SH-Cm7-394 und überlagerte Protonenspektren von SH-Cm7-374 (rot) und SH-Cm7-394 (blau). Der Vergleich der Protonenspektren zeigt, dass im blauen Spektrum ein zusätzlicher aromatischer Ring vorhanden ist. Zwei *N*-Methyl Gruppen können in beiden Spektren identifiziert werden. Im roten Spektrum lassen sich vier Methylgruppen im Hochfeldbereich identifizieren, im blauen nur zwei. Die exakte Masse dieser Substanz beträgt 394.2256 Da. Erläuterung siehe Text.

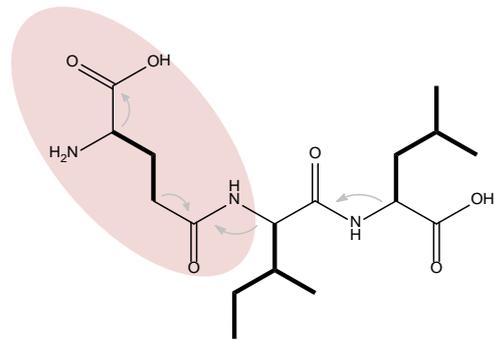
Interessant ist, dass in allen Peptiden eine Glutaminsäure über ihre 4-Carboxygruppe peptidisch verknüpft ist. Diese befindet sich entweder *N*-terminal oder innerhalb der Peptidkette. In allen Peptiden wird Valin, Leucin oder Isoleucin eingebaut. Die, durch den Austausch dieser Aminosäuren untereinander, generierten Massen lassen sich häufig in Chromatogrammen myxobakterieller Extrakte nachweisen. Oft findet man auch zwei Peaks identischer Masse die sich durch ihre Retentionszeit unterscheiden, wie beispielsweise im Fall der beiden 373er Peptide (Daten nicht gezeigt). Da bisher noch keine Funktion bzw. Aktivität für diese Substanzen nachgewiesen wurde, wurden bislang noch keine Untersuchungen zur Aufklärung der absoluten Konfiguration dieser Moleküle unternommen.

Von SH-Cm7-1839 konnten aus dem Überstand der RBK-Kultivierung ca. 0.7 mg Reinsubstanz isoliert werden. Diese waren jedoch nicht ausreichend für eine Charakterisierung. Aus diesem Grund wird unter verbesserten Bedingungen Substanz

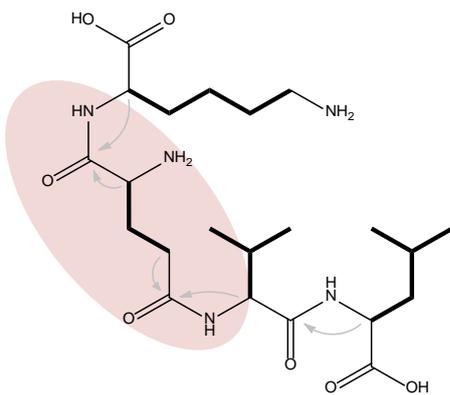
nachproduziert. Dasselbe gilt für einige andere Moleküle, die ebenfalls unter angepassten Bedingungen nachproduziert werden. Die hier beschriebenen Moleküle wurden aus einzelnen Fraktionen weniger Extrakte aufgearbeitet und es ist zu erwarten, dass im Rest der Extrakte weitere interessante Substanzen zu finden sind.



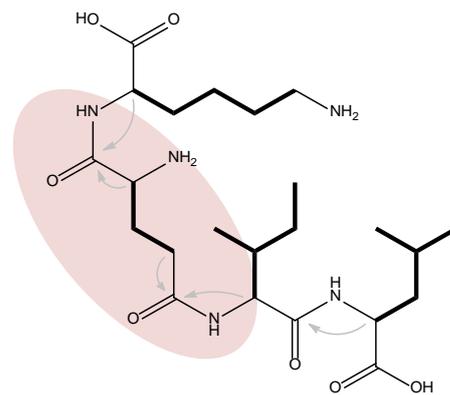
m/z 373.2213



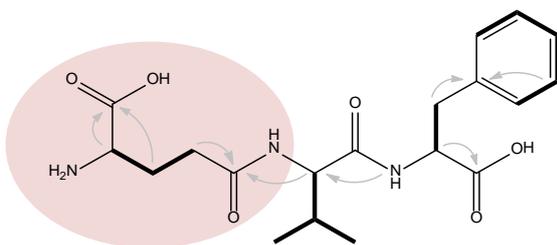
m/z 373.2213



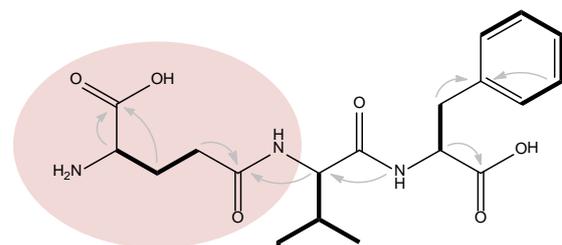
m/z 487.3006



m/z 501.3162



m/z 393.1900



m/z 407.2056

Abbildung 2.23: Strukturen einer kleinen Peptidgruppe, die als gemeinsames Strukturelement eine 4-carboxypeptidisch verknüpfte Glutaminsäure besitzen. Die dunklen Balken zeigen COSY-Korrelationen an, graue Pfeile HMBC-Korrelationen. Diese Peptide lassen sich in vielen myxobakteriellen Extrakten nachweisen. Die rot unterlegte Glutaminsäure ist ein gemeinsames Strukturelement. In den Peptiden treten Substitutionen des Valins, Leucins oder Isoleucins untereinander auf. Weitere Massen, die anhand dieser Variationen erzeugt werden, lassen sich ebenfalls in verschiedenen Extrakten nachweisen.

2.3 ZUSAMMENFASSUNG

Mit den hier beschriebenen Methoden ist es möglich, innerhalb eines relativ kurzen Zeitraums, verschiedene Einflüsse auf die Produktion von Sekundärmetaboliten eines Myxobakteriums zu untersuchen. Der Vorteil besteht vor allem in der Anwendung eines einzelnen Bioreaktors, der nur einmal mit einer Vorkultur beschickt werden muss. Durch die Verwendung eines Bioreaktors ist eine vollständige Kontrolle und Aufzeichnung der wichtigsten Parameter gewährleistet. Die Interpretation dieser Daten ermöglicht detaillierte Aussagen über den metabolischen Zustand einer Kultur, welcher aufgrund der MS-basierten Kinetiken mit Produktionsänderungen korreliert werden kann. Bei geschüttelten Kultivierungen ist dies in der Regel nicht möglich. Die RBK erlaubt durch das Einstellen sich wiederholender Bedingungen reproduzierbare Einzelkultivierungen, die für produktionsbezogene Vergleiche gut geeignet sind (siehe Abbildung 2.3).

Eines der Argumente, das gegen verlängerte Kultivierungszeiträume spricht, ist die adaptive Anpassung eines Organismus an die Kultivierungsbedingungen. Dadurch bedingt, können unter Umständen Produktionsänderungen auftreten, beispielsweise durch den Verlust nicht benötigter Gene. Langzeituntersuchungen zu den adaptiven Anpassungen des untersuchten Mikroorganismus SBCm007 an diese Kultivierungsform wurden bisher nicht durchgeführt. In den untersuchten Zeiträumen (bis zu 19 Tage) wurden jedoch immer wieder sogenannte Standardbedingungen untersucht. Hier konnte jeweils annähernd gleiche Produktivität für die untersuchten Sekundärstoffe festgestellt werden (siehe Abbildung 2.6). Dies deutet darauf hin, dass, innerhalb der untersuchten Zeiträume, diese Art der Adaption für den untersuchten Stamm vernachlässigbar ist.

Die Verwendung einer klumpig wachsenden Kultur erleichtert die Zellrückhaltung, wodurch in einem sehr kurzen Zeitraum der erwünschte *Repeated Pattern* Status erreicht wird. Dadurch ist eine nahezu vollständige Medienentfernung möglich, was Versuche mit induzierenden Substanzen vereinfacht, da diese schnell entfernt werden können. Hierbei muss jedoch immer beachtet werden, dass sich diese Effekte auch noch in späteren Kultivierungszyklen auswirken können (siehe Abbildung 2.8). Ein weiterer Vorteil der Zellrückhaltung ist, dass durch diese die Intervallzeiten so eingestellt werden können, dass eine Testphase innerhalb von 12 h durchlaufen werden kann. Dies kann unter Umständen ausschlaggebend für eine Durchführung von manuellen Messungen sein. Analoge Versuche mit suspendiert wachsenden Stämmen des Genus *Sorangium* zeigten, dass eine RBK mit diesen Organismen ebenfalls durchführbar ist. Es wurden jedoch deutlich längere Kultivierungsintervalle benötigt. Dies beruht auf dem langsamen Wachstum in Kombination mit der Entnahme von Suspensionskultur beim Medienwechsel, was jeweils zu einer starken Reduktion der Biomasse führt (Daten nicht gezeigt).

Für einen Medienwechsel wurden automatisierte Protokolle entwickelt, welche mittels der Kontrollsoftware IRIS der Firma Infors implementiert wurden. Dadurch sind unbeaufsichtigte Medienwechsel mit anschließender oder integrierter, separater XAD-Inkubation problemlos möglich und auch längere vollautomatisierte Kultivierungen konnten bereits realisiert werden. Die Automatisierungssignale, die hierfür benötigt wurden, konnten aus der Abgasanalyse abgeleitet werden. Die genaue Anwendung und Realisierung einer solchen Kultivierung ist im Kapitel 3 „Methoden zur Prozessverbesserung mittels Abgasanalyse“ beschrieben.

Der Erfolg des hier gewählten Ansatzes für die Produktion myxobakterieller Naturstoffe lässt sich daran erkennen, dass (obwohl bisher weniger als die Hälfte der erzeugten Einzelextrakte aufgearbeitet und zur Substanzaufreinigung verwendet wurden) bereits elf neue Strukturen charakterisiert werden konnten, die in diesem Kapitel beschrieben wurden. Diese beinhalten zwei bis dahin nicht literaturbeschriebene chemische Grundstrukturen. Weiterhin wurden Untersuchungen, die zur Entdeckung neuer aktiverer Chondramide führten, mittels RBK durchgeführt. Die Resultate der Produktionsquantifizierungen wurden dazu verwendet, mittels angepasster Kultivierungsparameter, innerhalb kurzer Zeit 11 dieser neuen Chondramidderivate aufzureinigen und zu charakterisieren. Dadurch konnten 30 neue hypothetische Strukturvarianten dieser, bis dahin 4 Moleküle umfassenden, Substanzklasse massenspektrometrisch in Extrakten von SBCm007 nachgewiesen werden. Die damit einhergehende Entdeckung einer zweiten Halogenase und deren Promiskuität hinsichtlich der Chlorierung oder Bromierung des Chondramidgrundgerüsts, erlaubte die zusätzliche Produktion und Charakterisierung von drei bromierten Chondramidvarianten. Eine genaue Beschreibung dieser Arbeiten befindet sich in Kapitel 4 „Entdeckung neuer Chondramide mit verbessertem Wirkungsspektrum“. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bisher 25 neue Strukturen charakterisiert wurden, darunter zwei neue, bisher noch nicht beschriebene Substanzklassen, sowie neue aktivere Analoga einer bekannten Substanzklasse. Diese konnten aufgrund verbesserter Produktionsbedingungen, die durch ausführliche Datenerhebung bereits in der Screeningphase identifiziert wurden, innerhalb kurzer Zeit aufgereinigt und charakterisiert werden.

Wenn die Nachproduktion von Ausgangsmaterial für die Substanzisolierung nötig war, wurde diese im sogenannten *Batch*-Verfahren durchgeführt, da dieses die einfachste Kultivierungsform in einem Bioreaktor darstellt. Für eine Nachproduktion empfiehlt sich in vielen Fällen jedoch ein kontinuierliches Verfahren, da dadurch die Produktivität unter Umständen wesentlich verbessert werden kann [30]. Erste vielversprechende Versuche zur Etablierung kontinuierlicher Prozesse werden im Kapitel 5 „Anwendung von *Repeated-Batch*-Ergebnissen für kontinuierliche Prozesse“ beschrieben.

Zum Abschluss dieses Kapitels soll noch kurz diskutiert werden, wie vorhandene Genomsequenzen unter Umständen bei der Aufklärung der absoluten Konfiguration von Molekülen genutzt und in den beschriebenen „*Workflow*“ integriert werden könnten. Die Untersuchung von Proteinen, die an der Biosynthese von Polyketiden und nichtribosomalen Peptiden beteiligt sind, zeigte, dass sowohl Substratspezifitäten als auch die absolute Konfiguration von Produktintermediaten, anhand von konservierten Domänen in den beteiligten Proteinen, vorausgesagt werden kann. Für eine detaillierte Diskussion dieser Thematik sei auf die entsprechende Literatur verwiesen [31-38]. Diese konservierten Bereiche können durch bioinformatische Analyse von Genomdaten erkannt und teilweise bereits automatisch detektiert werden. Dies hat die Identifizierung von Biosynthesegenclustern erheblich vereinfacht und ermöglicht zudem die teilweise Vorhersage von hypothetischen Produkten anhand einer Genomsequenz; unter Umständen inklusive derer absoluten Konfiguration. Auch hier sei auf die entsprechende Literatur verwiesen [39, 40]. Beispiele erfolgreicher Anwendungen bioinformatischer Analysen zur Aufklärung der absoluten Konfiguration myxobakterieller Substanzen existieren bereits. Durch Kombination dieser Analysen mit NMR-basierten- und klassischen chemischen Methoden sowie *Molecular Modeling* konnten bereits die absoluten Konfigurationen des Chivosazols, der Thuggazine und des Etnangiens bestimmt werden [40, 41, 42, 43, 44]

Unter gewissen Voraussetzungen können intramolekulare Abstände von Protonen mittels NMR durch Quantifizierung des *Nuclear Overhauser Effects* (NOE) exakt bestimmt werden [44]. Ist die planare Struktur eines Moleküls etabliert, können diese Abstände als Einschränkungen (*restraints*), in Kombination mit homo- und heteronuklearen Kopplungskonstanten, bei Strukturberechnungen mittels Distanz-Geometrie verwendet werden [45]. Bei der Strukturaufklärung von Proteinen und Peptiden mittels NMR, werden diese Werkzeuge standarmäßig, in Kombination mit vereinfachten Moleküldynamik-Berechnungen, eingesetzt. Sie scheinen aber auch erfolgreich zur Berechnung der absoluten Konfiguration kleiner Moleküle verwendet werden zu können, wenn die Konfiguration von unbekanntem Stereozentren vor der Berechnung nicht fixiert wird. Ein Ansatz welcher als „*floating chirality*“ bezeichnet wird [46, 47, 48]. In weiterführenden Studien soll untersucht werden, ob für akademische Zwecke frei verfügbare Software, wie XPLOR-NIH [49, 50], die diese Funktionalitäten vereint, in den in diesem Kapitel beschriebenen Arbeitsablauf integriert werden können. Diese könnten unter Umständen, in Kombination mit Strukturinformationen, die anhand von Genomanalysen erhalten werden, einen schnellen Zugang zur absoluten Konfiguration von Naturstoffen ermöglichen. Als Modellsubstanzen könnten solche Moleküle verwendet werden, bei denen die absolute Konfiguration bereits etabliert wurde.

3 METHODEN ZUR PROZESSVERBESSERUNG MITTELS ABGASANALYSE

3.1 HINTERGRUND

Der Einfluss des Sauerstoff- und Kohlendioxid-Partialdrucks auf die Produktion von Sekundärmetaboliten in Myxobakterien ist bislang nicht systematisch untersucht worden. Aus diesem Grund wurden mit *Chondromyces* sp. SBCm007 Versuche unternommen, um herauszufinden, ob durch Änderung des Partialdrucks eines oder beider Gase Änderungen des Sekundärmetabolitenprofils auftreten. Weiterhin wurde mit *Chondromyces* sp. SBCm002 untersucht, ob Änderungen der Abgaszusammensetzung für eine Prozessautomatisierung bei Kultivierungen verwendet werden können. Herkömmliche Signale, wie Kohlenstoffdioxid-Entwicklungsrate (*Carbon Dioxide Evolution Rate*, CER), Sauerstoffverbrauchs- oder Transferrate (*Oxygen Transfer Rate*, OTR) und der daraus berechenbare Respiratorische Quotient (RQ) sind, aufgrund der schwachen metabolischen Aktivität dieser Bakterien, in der Regel sehr fehlerbehaftet. Insbesondere dann, wenn kostengünstige, unsensitive Abgasanalysen verwendet werden. SBCm007 wurde aufgrund der Beobachtung ausgewählt, dass dieser Stamm außer den bekannten Chondramiden A-D [1] keine anderen, zu diesem Zeitpunkt bekannten, Substanzen produziert. SBCm002 dagegen produziert zwei Substanzklassen - Apicularene [2] und Crocapeptine [Struktur nicht veröffentlicht] - die beide in der Lage sind die Replikation des Hepatitis C Virus zu inhibieren [3].

In der Literatur existieren viele Beispiele, die den Einfluss eines definierten Sauerstoffpartialdrucks (pO_2) in der Flüssigphase von Bioprocessen dokumentieren. Die meisten dieser Versuche wurden allerdings mit Bakterien der Ordnung Actinomycetales durchgeführt und es existieren so gut wie keine Daten zu Myxobakterien. Bei einer *Streptomyces clavuligerus* Kultivierung konnte beispielsweise gezeigt werden, dass eine 100%-Sättigung des pO_2 über den gesamten Kultivierungsverlauf, gegenüber einem unkontrollierten Experiment, zu einer 2,4-fach erhöhten Cephامycin C Produktion führte. Beim unkontrollierten Experiment sank der pO_2 auf unter 40% während der exponentiellen Wachstumsphase. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass während dieser Phase die Aufrechterhaltung einer 100%-Sättigung am wichtigsten ist, obwohl keine nennenswerte Produktion von Cephامycin C nachweisbar war. Eine Reduktion des pO_2 von 100% auf 50% nach der exponentiellen Wachstumsphase lieferte gleiche Ausbeuten wie eine Kultivierung mit durchgehend 100%-Sättigung. Im Gegensatz dazu wurde mit einer durchgehenden 50%-Sättigung eine 4-fach geringere Ausbeute erzielt, obwohl die Biomasse in allen Fällen

vergleichbar war [4]. Anhand von Kultivierungsexperimenten mit *Amycolatopsis orientalis* konnte gezeigt werden, dass hohe Sauerstoffpartialdrücke auch nach der exponentiellen Wachstumsphase ausschlaggebend für die Produktion von Vancomycin sind. Die Transkription der Biosynthesegene konnte jedoch sowohl bei hohen als auch bei niedrigen pO_2 -Werten in den Zellen nachgewiesen werden [5]. Diese Effekte auf die Produktion von Cephامycin C und Vancomycin können durch regulatorische Einflüsse von Sauerstoff auf Genexpression und Enzymfunktionen erklärt werden. Darüberhinaus dient Sauerstoff als Substrat für enzymatische Reaktionen. Die Verfügbarkeit von ausreichenden Sauerstoffmengen als Enzymsubstrat, kann z. B. das Verhältnis von Tetracyclin, Oxytetracyclin und Chlortetracyclin bei Hochdruckkultivierungen von verschiedenen *Streptomyces* spp. beeinflussen [6]. Einen ähnlichen gelagerten Fall stellt die heterologe Expression von Epothilon in *Myxococcus xanthus* bei 50% und 0% Sauerstoffsättigung dar. Diese Variationen hatten einen signifikanten Einfluss auf das Verhältnis der Epothilone A-D untereinander. Zusätzlich wurde ein weiteres Produkt - Epo506 - entdeckt, welches vorzugsweise unter hohen Sauerstoffkonzentrationen produziert wird [7].

Ein Beiprodukt der respiratorischen Energiegewinnung ist CO_2 . Die Entstehung von CO_2 und die daran beteiligten Stoffwechselwege wurden und werden intensiv erforscht. Im Gegensatz zu Sauerstoff tritt Kohlenstoffdioxid in wässriger Lösung allerdings in verschiedenen Formen auf. Die Konzentration an gelöstem CO_2 steht im Zusammenhang mit der Konzentration in der Gasphase über der Flüssigkeit. CO_2 bildet zusammen mit Wasser Kohlensäure (H_2CO_3) und diese wird, in Abhängigkeit vom pH, in Hydrogencarbonat (HCO_3^-) und Carbonat (CO_3^{2-}) umgewandelt. Abbildung 3.1 zeigt die Konzentration dieser beiden pH-abhängigen Formen in dem Bereich, der für mikrobielle Kultivierungen üblicherweise von Interesse ist. Es wird deutlich, dass ab ca. pH 7 ein starker Anstieg beider pH-abhängigen Formen zu beobachten ist. Diese Eigenschaft des Kohlendioxids erschwert eine Untersuchung des regulatorischen Einflusses dieses Gases, da man schwer zuordnen kann welche Zustandsform letztendlich für einen beobachteten Effekt verantwortlich ist. Mögliche Effekte auf Zellen, Enzyme und Produktbildung wurden ausführlich in der Literatur diskutiert [9, 10]. Im Allgemeinen scheint es, dass höhere CO_2 Konzentrationen bei aerobem Wachstum meist mit inhibitorischen Eigenschaften einhergehen. Zusätzlich gibt es Hinweise, dass niedrige CO_2 -Konzentrationen für das Zellwachstum benötigt werden und einen positiven Einfluss auf Biomasse- und Produktbildung haben. Im Gegensatz zu diesen generellen Ergebnissen stehen Beispiele wie die Produktion des antibakteriell wirksamen Amylovorin L durch *Lactobacillus amylovorus*, welche bei hohen CO_2 -Konzentrationen unter anaeroben Bedingungen optimal ist [11]. Auch für die optimale Produktion des *Toxic Shock Syndrom Toxins 1*, in *Staphylococcus aureus* MN8 wurden CO_2 -Konzentrationen von 7% und O_2 -Konzentrationen von 21% in der Gasphase benötigt [12].

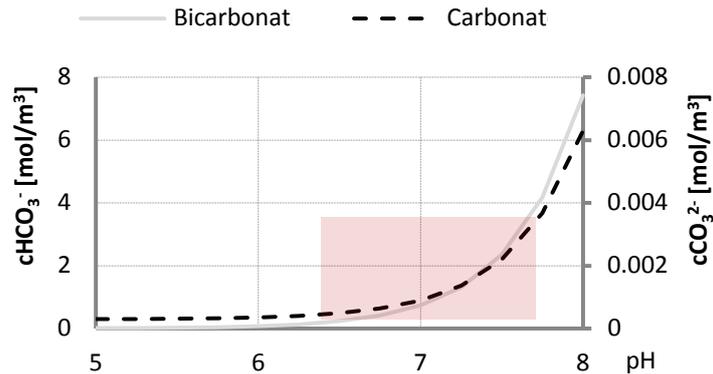


Abbildung 3.1 Bicarbonat und Carbonat Konzentration in Abhängigkeit vom pH. Die Grafik zeigt die berechneten molaren, pH-abhängigen Konzentrationen beider Substanzen bei einer konstanten Gasphasenkonzentration von 1% CO_2 . Die gelösten Konzentrationen von CO_2 und H_2CO_3 hängen nur von der Gasphasenkonzentration und nicht vom pH-Wert ab [Abb. Aus 8].

Zusammengenommen wird deutlich, dass viel über optimale O_2 -Konzentrationen für einzelne Produktionsprozesse bei Aktinomyceten sowie über inhibitorische bzw. stimulierende Effekte des CO_2 auf die Bildung einzelner Metabolite und das Wachstum verschiedener Mikroorganismen bekannt ist. Allerdings ist es nicht möglich, eine Vorhersage über den Einfluss hoher oder niedriger Konzentrationen dieser Gase auf die Produktion von Sekundärstoffen zu machen, speziell bei unbekanntem Metaboliten. Hinzu kommt, dass zum Zusammenwirken beider Gase so gut wie keine Literatur existiert. Somit bestehen durch Untersuchung dieser Parameter noch Verbesserungsmöglichkeiten für Produktionsprozesse. In dieser Studie wurde der Einfluss von O_2 und CO_2 auf die Sekundärmetabolitproduktion des *Chondromyces*-Stammes SBCm007 untersucht. Die Ergebnisse verdeutlichen, dass definierte Konzentrationen beider Gase vorteilhaft sein können, weshalb eine Methode zur simultanen Kontrolle entwickelt wurde. Weiter konnte gezeigt werden, dass die Messung beider Gaskonzentrationen in der Abluft für die Ableitung zweier Parameter verwendet werden konnte, die für die Kontrolle und Automatisierung eines *Repeated-Batch*-Prozesses verwendet wurden. Dadurch wurde eine verbesserte Produktion sowie ein vereinfachtes *Downstream-Processing* ermöglicht.

3.2 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

3.2.1 EINFLUSS VON CO_2 - UND O_2 -PARTIALDRUCK AUF DIE SEKUNDÄRSTOFF-PRODUKTION

Die Tests wurden mit dem oben erwähnten Stamm SBCm007 durchgeführt. Aufgrund der technischen Schwierigkeiten, die durch das pelletartige Wachstum dieses Stammes entstehen, wurde das in Kapitel 2 beschriebene RBK-Setup verwendet, um vergleichbare

Kultivierungen durchführen zu können. Dadurch konnte gewährleistet werden, dass vergleichbare Ausgangsbedingungen für die zu testenden Konditionen bestehen. Die Kultivierungsparameter, wie Rührerdrehzahl und Begasungsrate, für reproduzierbare Effekte auf die Metabolitproduktion waren in vorangegangenen unabhängigen Fermentationen in 3- bis 10-facher Ausführung ermittelt worden. Die Testläufe wurden in der in Tabelle 3.1 aufgelisteten Reihenfolge durchgeführt.

Tabelle 3.1: Liste verschiedener Testläufe mit zugehöriger Gasphasenzusammensetzung und Methode für die pO₂-Kontrolle.

Niedrig O ₂ Moderat CO ₂	Niedrig O ₂ Niedrig CO ₂	Moderat O ₂ Moderat CO ₂	Hoch O ₂ Hoch CO ₂	Hoch O ₂ Niedrig CO ₂	Moderat O ₂ Hoch CO ₂
pO ₂ 5% CO ₂ 0,3-0,6%	pO ₂ 5% CO ₂ <0,1%	pO ₂ 20% CO ₂ 0,2-0,3%	pO ₂ 55% CO ₂ 1,0-2,0%	pO ₂ 55% CO ₂ <0,1%	pO ₂ 20% CO ₂ 1,8%
Scherstress wie Standard	Scherstress wie Standard	Standard	Scherstress wie Standard	Scherstress wie Standard	Scherstress rührerabhängig
Gasphase und pO ₂ reguliert durch Raumluftbegasung	Gasphase und pO ₂ reguliert durch Raumluftbegasung, CO ₂ Stripping mit Stickstoff	Gasphase und pO ₂ reguliert durch Raumluftbegasung	Gasphase und pO ₂ reguliert durch O ₂ - Begasung	Gasphase und pO ₂ reguliert durch Raumluftbegasung	Gasphase und pO ₂ reguliert durch Raumluftbegasung

* Die Versuche wurden in der dargestellten Reihenfolge durchgeführt. Vor und nach den Tests wurde ein Standardlauf ausgeführt um abzusichern, dass keine signifikanten Abweichungen durch die Testbedingungen verursacht wurden [Tab. aus 8].

Vor und nach den veränderten Kultivierungsbedingungen wurden Standardbedingungen getestet und mit der Standardkultivierung im Testzeitraum verglichen. Dadurch konnte ausgeschlossen werden, dass Abweichungen durch Adaption an die vorherigen Bedingungen oder adaptive Mutationen auftreten. Um Einflüsse durch Scherstress auszuschließen, wurde die Rührerdrehzahl konstant gehalten und der pO₂ über die Begasungsrate kontrolliert.

Um die Produktivität unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen zu vergleichen, wurden 12 Substanzen ausgewählt, für deren Produktion, unter den zuvor ermittelten Testbedingungen, ein reproduzierbarer Einfluss ermittelt worden war. Unter diesen 12 Naturstoffen befanden sich auch die zwei bereits bekannten Substanzen Chondramid A und B. Abbildung 3.2 zeigt eine exemplarische Überlagerung zweier *Base-Peak*-Chromatogramme (BPC) von Extrakten unterschiedlicher Testbedingungen. Diese wurden mittels *Electro-Spray-Ionisation* (ESI) im positiven Ionisierungsmodus gemessen. Diese Chromatogramme, die für jede Testbedingung erstellt wurden, wurden für die

Ausbeutekalkulation verwendet. Die 12 Zielsubstanzen wurden, abhängig von ihrer Retentionszeit, mit A bis J benannt.

Die Ausbeutekalkulation wurde, wie in Kapitel 2 „*Repeated-Batch-Verfahren* für ein Wirkstoffscreening mit Prozessverbesserung“ beschrieben, mit Sulfatdimethoxin (kleine Box in Abbildung 3.2) als internem Standard durchgeführt. Die Produktivitätsunterschiede bei verschiedenen Bedingungen sind in Abbildung 3.3 als relative Produktivität gezeigt. Die 12 Zielsubstanzen wurden in die Gruppen hohes-, mittleres und niedriges Peakflächenverhältnis eingeteilt, um die Übersichtlichkeit der Abbildung zu gewährleisten. Die grau umrahmte Box kennzeichnet relative Ausbeuten, die mittels einer neuen, in Kapitel 3.2.2 beschriebenen Methode, erzielt wurden. Die rot umrahmte Box zeigt die Peakflächenverhältnisse der Ausbeuten, die mit den üblicherweise angewandten Bedingungen (Standard) erzielt wurden.

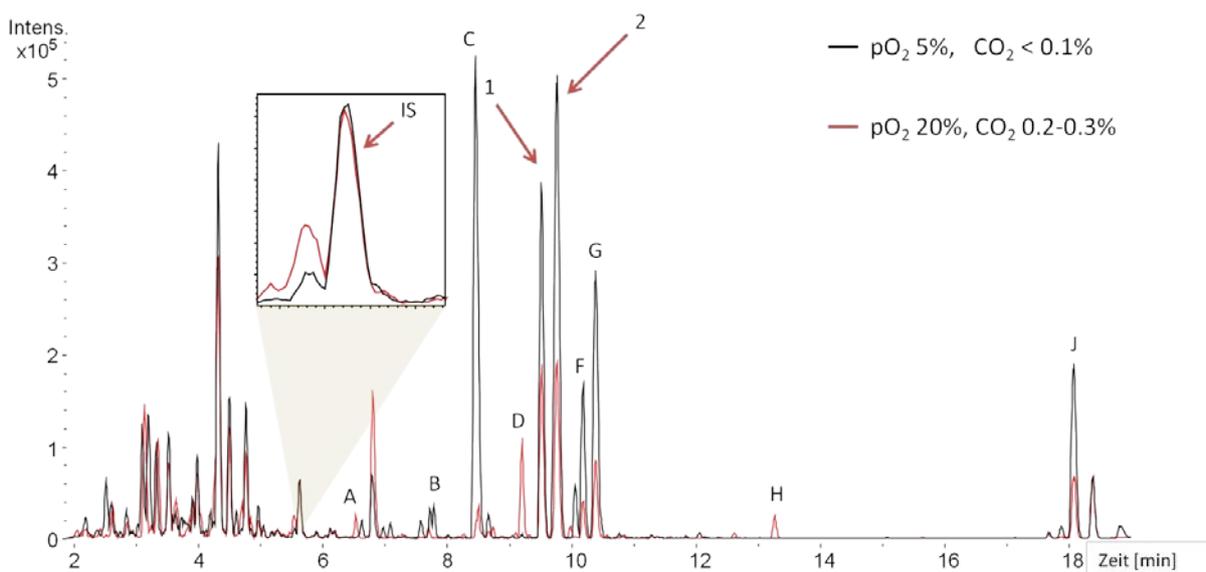


Abbildung 3.2: Überlagerung zweier Base-Peak-Chromatogramme von Extrakten des Stammes SBCm007. Beide wurden im positiven Ionisierungsmodus gemessen. Peaks, die zu Substanzen gehören, die im Text erwähnt werden sind mit Buchstaben markiert. (1) markiert Chondramid A und (2) Chondramid B. Die kleine Box zeigt die Überlagerung des Peaks des internen Standards (IS) [Abb. aus 8].

Die Berechnungen zeigen deutlich, dass die Produktionsbedingungen für Chondramid A und B unter niedrigen Sauerstoffpartialdrücken am besten sind. Dasselbe gilt für die Substanzen F und G. Die Produktion der Substanzen C und J profitiert von niedrigen Konzentrationen beider Gase. Die Substanzen A und E hingegen werden bei höheren Konzentrationen beider Gase verstärkt produziert. Die Substanzen B, D, H und I scheinen nur hohe Sauerstoffpartialdrücke zu benötigen, während der CO₂-Gehalt eine

untergeordnete Rolle zu spielen scheint. Anhand von Abbildung 3.3 wird ersichtlich, dass die „Standard“-Bedingungen für keine der untersuchten Substanzen ideal sind.

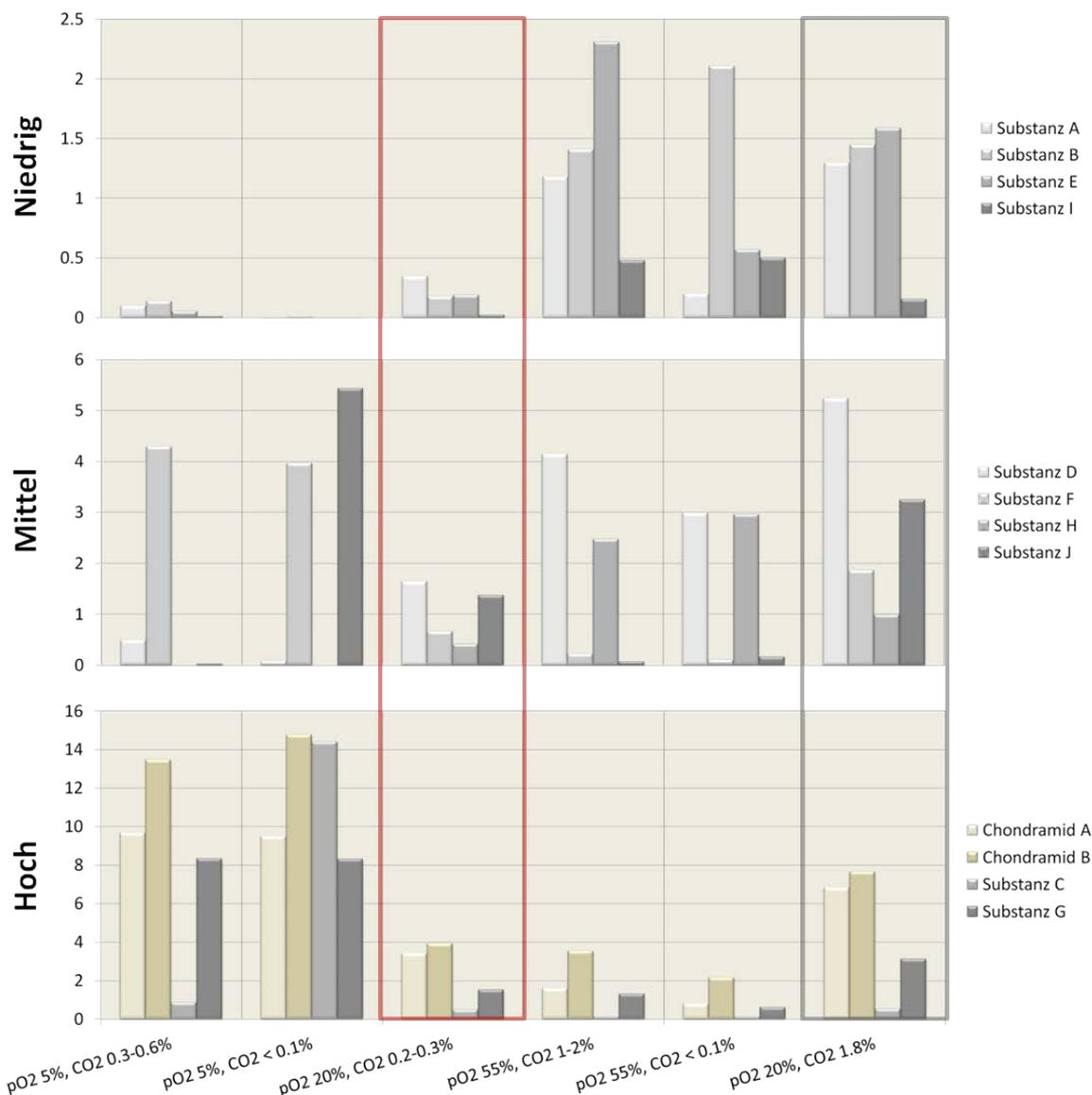


Abbildung 3.3: Vergleich der relativen Unterschiede in der Produktivität verursacht durch Veränderungen der Gasphasenzusammensetzung. Die Werte sind dimensionslos da sie anhand ihrer Peakfläche im Vergleich zu einem internen Standard berechnet wurden. Die 12 Zielsubstanzen wurden anhand ihrer Peakflächenverhältnisse in drei Gruppen eingeteilt. Die rote Box markiert Standardbedingungen, die graue Testbedingungen einer neuentwickelten Methode (siehe Text [Abb. aus 8]).

Erste Tests zeigten stark zytotoxische Aktivitäten für die Substanzen F und G (IC_{50} ca. 28 und 44 nM auf HCT-116 Zellen), die später als neue Chondramid-Derivate identifiziert wurden. Für Substanz H (SH-Cm7-374, siehe Kapitel 2.2.4) konnte eine schwache Zytotoxizität und eine antibakterielle Wirkung gegen *Staphylococcus aureus* festgestellt werden.

Für Substanz I zeigte keine der getesteten Bedingungen sehr starke Auswirkungen auf die Ausbeuten. Allerdings können schon 20% Produktionserhöhung bei schwach produzierten Substanzen ausschlaggebend für die Detektion, erfolgreiche Aufreinigung und Charakterisierung sein. Für einige Substanzen wie C (SH-Cm7-487, siehe Kapitel 2.2.4), E und J scheinen spezielle Bedingungen für die Produktion benötigt zu werden.

Diese Analyse zeigt, dass geringe Chancen bestehen, mittels einer einzelnen Standardkultivierung, das komplette, durch die Gasphase beeinflussbare, Substanzspektrum identifizieren zu können. Zusätzlich muss berücksichtigt werden, dass bei herkömmlichen Kultivierungen gewöhnlicherweise nur der pO_2 reguliert wird und der CO_2 -Gehalt entweder nur gemessen und für Berechnungen verwendet oder nicht beachtet wird. Die gezeigten Daten machen allerdings deutlich, dass eine Kontrolle beider Gase von Bedeutung sein kann. Mit den, für diese Tests zur Verfügung stehenden, Kultivierungsmethoden war allerdings keine exakte Regulation der CO_2 -Konzentration möglich. Für diese konnten immer nur ungefähre Konzentrationsbereiche anhand der Kultivierungsbedingungen eingestellt werden. Aus diesem Grund wurde eine Methode entwickelt, die eine genaue Regulation des pO_2 und der CO_2 -Konzentration ermöglicht.

3.2.2 KONTROLLMETHODE FÜR CO_2 UND O_2

Der Einfluss der Zusammensetzung der Gasphase auf die Produktion verschiedener Sekundärmetabolite verdeutlicht, dass eine stringente Kontrolle des Sauerstoff- und Kohlenstoffdioxidgehalts wichtig ist. Da eine entsprechende Methode nicht zur Verfügung stand, wurde das Verhalten des k_a -Wertes (volumetrischer Massentransfer-Koeffizient) des verwendeten Bioreaktors in Bezug auf Rührerdrehzahl und Begasungsrate untersucht. Dadurch sollten Möglichkeiten gefunden werden, die Gasphasenzusammensetzung innerhalb gewisser Grenzen kontrollieren zu können. Der Einfluss der beiden Parameter wurde mittels der sogenannten dynamischen Methode (siehe Kapitel 8 „Material und Methoden“) ohne Mikroorganismen untersucht.

Abbildung 3.4 zeigt die Abhängigkeit des k_a -Wertes von Rührerdrehzahl und Begasungsrate gemessen in Wasser. Der 3D-Plot und das Konturdiagramm geben die Abhängigkeiten des k_a -Wertes bei Durchgasung des Wassers an. Der dritte Graph zeigt die Abhängigkeit des k_a -Wertes von der Rührerdrehzahl, bei konstantem Austausch des Kopfvolumens des Bioreaktors mittels *Headspace Aeration*. Bei niedrigen Drehzahlen ist ein linearer Zusammenhang des k_a -Wertes mit der Begasungsrate zu beobachten. Bei höheren Rührerdrehzahlen erfolgt zuerst ein starker Anstieg, der bei moderaten Begasungsraten wieder einen linearen Verlauf zeigt. Bei der Rührerdrehzahl lässt sich ein exponentieller Zusammenhang des k_a -Wertes bei ansteigenden Werten erkennen.

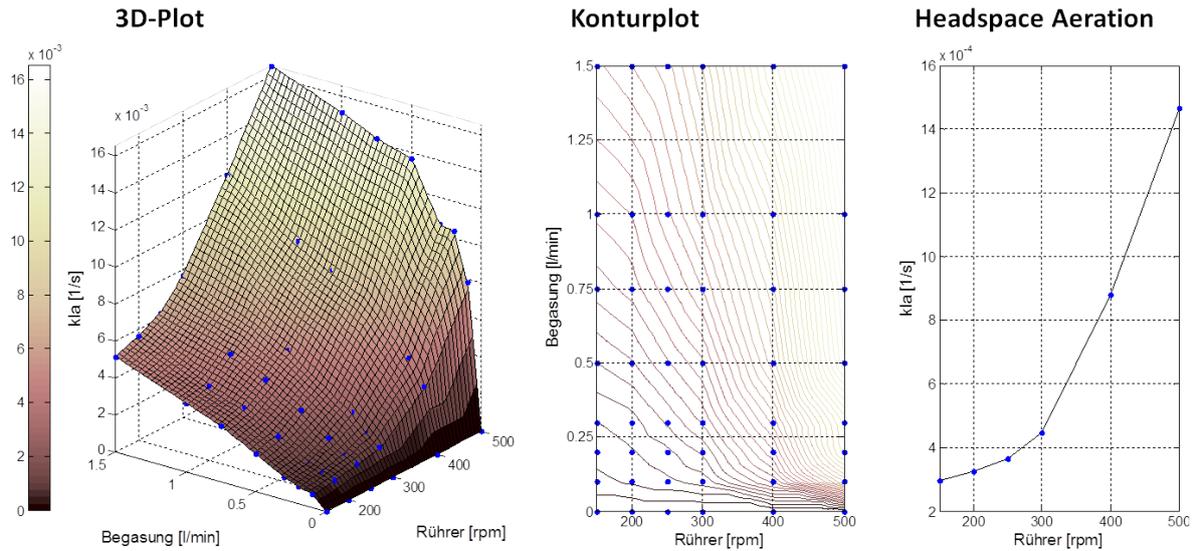


Abbildung 3.4: 3D- Konturenplot des $k_L a$ -Wertes in Abhängigkeit von Rührerdrehzahl und Begasungsrate, sowie $k_L a$ -Werte in Abhängigkeit von der Rührerdrehzahl bei *Headspace*-Begasung. Die blauen Punkte kennzeichnen gemessene Werte. Aus den Graphen wird ersichtlich, dass der Einfluss der Rührerdrehzahl sehr viel größer als der der Begasungsrate ist. Höhere Begasungsraten resultieren in einem linearen Anstieg des $k_L a$, während die Rührerdrehzahl einen exponentiellen Einfluss hat, wie dem 3D-Plot zu entnehmen ist. Bei *Headspace*-Begasung haben niedere Rührerdrehzahlen wenig Einfluss, während hohe Drehzahlen ebenfalls einen exponentiellen Anstieg verursachen [Abb. aus 8].

Diese Effekte können mit folgenden Gleichungen erklärt werden, welche im Allgemeinen für die Kalkulation der Sauerstoff Transfer Rate (*Oxygen Transfer Rate*, OTR) verwendet werden.

$$OTR = k_L a (C_{O_2}^* - C_L) \quad (3.1)$$

$C_{O_2}^*$ [mg/l] ist die bei den aktuellen Bedingungen maximal lösliche Sauerstoffmenge (nach dem Henry Gesetz) und C_L [mg/l] stellt die momentan gelöste Menge dar. Der $k_L a$ [1/s] ist der volumetrische Massentransfer-Koeffizient (auch Sauerstofftransfer-Koeffizient) und kann auch folgendermaßen ausgedrückt werden:

$$k_L a = k_L \frac{A}{V} \quad (3.2)$$

k_L [m/s] ist der Massentransfer-Koeffizient, A [m²] ist die Grenzfläche zwischen Gas- und Flüssigphase innerhalb des Bioreaktors und V [m³] stellt das Flüssigkeitsvolumen dar. Diese Gleichungen veranschaulichen, dass zwei Triebkräfte für den Sauerstofftransfer existieren. Zum einen der Konzentrationsgradient (Gleichung 3.1) und zum anderen der $k_L a$ Wert selbst und mit ihm assoziiert die Gas/Flüssigkeit-Grenzfläche. Da der k_L eine Konstante darstellt, kann eine Veränderung des $k_L a$ -Wertes nur über die Veränderung der Phasengrenzfläche im Verhältnis zum Volumen erfolgen (Gleichung 3.2). Dies kann beispielsweise durch Erhöhung der Begasungsrate erreicht werden. Dadurch wird eine größere Anzahl Blasen mit einem

ähnlichen Volumen und einer annähernd gleichen Oberfläche erzeugt. Dies erklärt den linearen Zusammenhang des $k_L a$ -Wertes mit der Flussrate. Eine weitere Möglichkeit besteht darin die Rührerdrehzahl zu erhöhen und dadurch die Blasen zu dispergieren. Dadurch werden aus einer großen mehrere kleine Blasen, was eine quadratisch ansteigende Oberflächenvergrößerung zur Folge hat. Dies erklärt den exponentiellen Zusammenhang des $k_L a$ -Wertes, der in Abbildung 3.4 erkennbar ist, mit der Rührerdrehzahl.

Im Weiteren wurde der Einfluss des Sauerstoffgehalts im Kopfvolumen des Bioreaktors untersucht. Hierfür wurde das Kopfvolumen permanent durch Frischluft ausgetauscht, während keine Begasung durch die Flüssigphase stattfand. Abbildung 3.4 zeigt, dass bei niedrigen Rührerdrehzahlen wenig Sauerstoffeintrag über die Oberfläche stattfindet. Bei ca. 500 Umdrehungen werden allerdings schon Werte erreicht, die ungefähr 10% der Werte ausmachen, die durch Mediendurchgasung erzielt werden. Dies kann durch Einziehen der Luft, bei höheren Drehzahlen, von der Oberfläche in die Flüssigphase erklärt werden. Abbildung 3.4 zeigt, dass durch Begasungsraten von 1.5 l/min und 150 rpm ähnliche $k_L a$ -Werte erreicht werden wie durch Begasungsraten von 0.1 l/min und 500 rpm. Dies kann partiell auf *Headspace*-Effekte zurückgeführt werden.

Die kombinierten Eigenschaften von *Headspace*-Effekten und Mediendurchgasung können genutzt werden, um die Akkumulation von autogen durch die Bakterien produziertem CO_2 im Bioreaktor zu kontrollieren. Dafür muss der pO_2 durch die Begasungsrate und der CO_2 -Gehalt im Abgas durch die Rührerdrehzahl konstant gehalten werden. In beiden Fällen sollte eine negative Abweichung der Regelgröße eine Hochregulierung der Stellgröße zur Folge haben und umgekehrt. So würde beispielsweise eine CO_2 -Konzentration unterhalb des Sollwertes einen Anstieg der Rührerdrehzahl bewirken und dadurch den $k_L a$ Wert erhöhen. Dies hat zur Folge, dass die Begasungsrate herabgesetzt wird. Die reduzierte Flussrate bewirkt einen langsameren Austausch des Kopfvolumens, wodurch sich vermehrt CO_2 innerhalb des Bioreaktors anreichern kann. Bei richtiger Einstellung der Reglerparameter nähern sich so beide Werte den gewünschten Größen an. Die Regelung sollte nicht zu „scharf“ reagieren, da sich die beiden Regelkreise untereinander beeinflussen und in diesem Fall ein Aufschaukeln zu erwarten ist. Bei diesen Versuchen wurde von der Annahme ausgegangen, dass der pCO_2 in der Flüssigphase eines ideal gemischten Bioreaktors, gemäß dem Henry-Gesetz, im Gleichgewicht mit der Gasphase ist. Das liegt nahe, da der geschwindigkeitslimitierende Schritt die Diffusion in der Flüssigphase ist. Diese Annahme wird durch Beispiele in der Literatur bestätigt, gilt allerdings nur für niedrigviskose Kulturbrühen, in denen die Gasdiffusion nicht zu sehr behindert wird [13, 14].

Für diese Studie wurde *Saccharomyces cerevisiae* als Modellorganismus für Kultivierungsstudien eingesetzt, da diese innerhalb von 1-2 Tagen durchgeführt werden

konnten, wohingegen die Vorbereitungszeit für myxobakterielle Kultivierungen zwischen 5-7 Wochen liegt. Die zugrundeliegenden Prinzipien, der für diese Studie relevanten Effekte, konnten hiermit unabhängig vom respiratorisch aktiven Organismus untersucht- und die Ergebnisse anschließend auf den Zielorganismus übertragen werden. Erste Tests zeigten, dass der Einfluss des Scherstress' bei dieser Kultivierungsform berücksichtigt werden muss, da hohe CO₂-Werte nur durch erhöhte Rührerdrehzahlen erreicht werden können. Eine Testkultivierung mit *S. cerevisiae* zeigte beispielsweise, dass endogen produzierte und kontrollierte CO₂-Level zwischen 0.5 und 8.0% mit Raumluftegung in Minimalmedium möglich sind. Hierfür wurden allerdings Rührerdrehzahlen zwischen 200-800 rpm benötigt, wenn der pO₂ bei 20% gehalten wurde. Wenn höhere CO₂-Konzentrationen benötigt werden, empfiehlt sich die Verwendung reinen Sauerstoffs für die Begasung. Dadurch können die Flussraten weiter reduziert werden, wodurch CO₂ akkumuliert. Um die initiale CO₂-Ladephase bei endogen produziertem Kohlendioxid zu verkürzen kann CO₂-Gas eingesetzt werden. Wenn sehr geringe CO₂-Konzentrationen (Abbildung 3.3, Compound C und J) bei hoher respiratorischer Aktivität oder niedrigen O₂-Partialdrücken erzeugt werden sollen, muss CO₂ mit Stickstoffgas ausgeblasen werden.

Shang und Mitarbeiter entwickelten die sogenannte „Autogene CO₂ Methode“, bei welcher die CO₂-Konzentration durch Begasung mit purem Sauerstoff erhöht wird. Hier wird der Effekt genutzt, dass die Begasungsrate durch die erhöhte Sauerstoffkonzentration herabgesetzt werden kann [15]. Diese Methode erlaubt allerdings nur atmungsabhängige Variationen der CO₂-Konzentration im Kulturgefäß und keine echte Kontrolle (dies wurde beispielsweise bei den Versuchen zum Einfluss der Gasphasenzusammensetzung in Kapitel 3.2.1 genutzt). Mit der hier beschriebenen Methode ist hingegen eine genaue Kontrolle und Steuerung der CO₂-Konzentration möglich; bei gleichzeitiger Einhaltung des pO₂.

Abbildung 3.5 zeigt drei Zyklen einer RBK mit dem Stamm SBCm007, bei denen der pO₂ jeweils bei 20% gehalten wurde. Die CO₂-Konzentrationen in der Gasphase wurden jeweils bei 0,3, 0,6 und 1,4% gehalten. Diese Resultate veranschaulichen die einfache Anwendbarkeit dieser Technik. Die graue Box in Abbildung 3.3 zeigt Ausbeuten, die mit SBCm007 mittels dieser Methode erzielt wurden. Der pO₂ wurde hier während der gesamten Kultivierung bei 20% und die CO₂-Konzentration bei 1.8% gehalten. Für die Substanzen A, B und D sind diese Kultivierungsbedingungen die besten, unter den in Abbildung 3.3 dargestellten, und für alle Substanzen sind diese Bedingungen besser als die dargestellten Standardbedingungen. Dies zeigt das Potenzial dieser Methode zur Entwicklung verbesserter Produktionsprozesse. Wie oben bereits erwähnt, ist diese Kontrolle jedoch nur in gewissen Grenzen möglich. Wenn sehr niedrige CO₂-Werte bei niedrigem pO₂ benötigt werden, kann eine zusätzliche Entgasung mit Stickstoff nötig sein. Im umgekehrten Fall

(hohe O_2 - und CO_2 -Werte) ist es möglicherweise nötig mit reinem O_2 zu begasen um die Begasungsrate zu reduzieren.

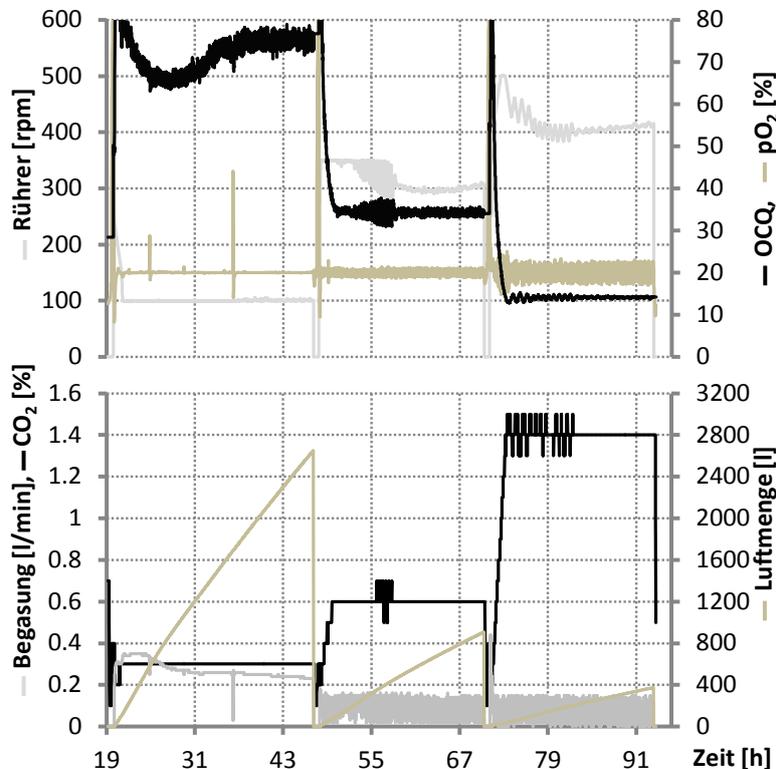


Abbildung 3.5: Fermentationsgraphen einer Repeatet-Batch-Kultivierung von Stamm SBCm007. Die CO_2 Konzentration im Abgas wurde bei 0,3, 0,6 und 1,4% gehalten und der pO_2 bei 20%. Beide Parameter wurden mittels der im Text beschriebenen Methode kontrolliert. Gezeigt sind außerdem der OCQ-Wert (siehe Text), Rührerdrehzahl und Gesamtluftvolumen (Airflow). Die reduzierte Begasungsrate bei höheren CO_2 -Werten führte zu Begasungspulsen, da ein unterer Grenzwert von 0,2 l/min vom Massflowcontroller nicht unterschritten werden konnte. Die Ausbauchung des OCQ-Wertes während der ersten *Batch*-Phase wird durch ein unteres Limit der Rührerdrehzahl erzeugt. Diese konnte nicht unter einen bestimmten Grenzwert fallen, weshalb die Begasungsrate nicht beliebig gesteigert werden konnte um CO_2 auszublasen. Aus diesem Grund kommt es zur Reduktion des OCQ-Wertes obwohl beim CO_2 -Gehalt selbst noch keine offensichtlichen Auswirkungen bemerkbar sind [Abb. aus 8].

3.2.3 OCQ UND COQ ALS NEUE PARAMETER ZUR PROZESSKONTROLLE

Wie in Abschnitt 3.2.2 gezeigt wurde, ist die Abgaszusammensetzung einer Fermentation ein direktes Ergebnis der respiratorischen Aktivität, der Begasungsrate und des Leistungseintrags des Bioreaktors. Die genaue Beobachtung der O_2 - und CO_2 -Konzentration im Abgas verschiedener Kultivierungen zeigten, dass beide Gase hochspezifische wachstums- und nährstoffabhängige Konzentrationskurven erzeugen. Diese Konzentrationen können mittels kostengünstiger Sensoren in der Abluft des Bioreaktors gemessen werden. Aufgrund der schwachen respiratorischen Aktivität der verwendeten Organismen, ist allerdings das Signal/Rausch Verhältnis relativ schlecht und die Konzentrationsdifferenz im

Abgas so klein, dass die darauf basierenden Parameter CER, OUR und der RQ häufig nicht ausreichend sensitiv und zu fehlerbehaftet für eine Prozessautomatisierung sind (zumindest mit den verwendeten Sensoren, Daten nicht gezeigt). Aus diesem Grund wurde nach anderen verwendbaren Signalen gesucht.

Untersuchungen ergaben, dass die Division der gemessenen O_2 - mit der gemessenen CO_2 -Konzentration (O_2 - CO_2 -Quotient oder OCQ), oder umgekehrt (CO_2 - O_2 -Quotient, COQ), unter Umständen anwendbar sind. Die Tatsache, dass O_2 - und CO_2 -Konzentration bei respiratorischer Aktivität einen gegenläufigen Konzentrationsverlauf im Abgas zeigen, „verstärkt“ die berechneten Werte. Hinzu kommt, dass beide Messwerte in die Berechnung einbezogen werden und nicht nur einer, wie bei der OUR- und CER-Berechnung. Durch die gezielte Beeinflussung der Kultivierungsbedingungen kann eine weitere Verstärkung der Effekte erreicht werden. Die Steuerung des pO_2 über die Begasungsrate führt beispielsweise zu hohen OCQ-Werten, bei hoher metabolischer Aktivität der Zellen in den verwendeten Bioreaktoren. Dies resultiert aus der Tatsache, dass CO_2 aufgrund des hohen Sauerstoffbedarfs - welcher durch hohe Flussraten bedient wird - konstant ausgeblasen wird. Wird der pO_2 durch die Rührerdrehzahl geregelt, tritt der umgekehrte Fall ein. Bei hohem Sauerstoffbedarf - der über ausreichende Dispergierung eines langsam fließenden Luftstroms gedeckt wird - steigt die CO_2 -Konzentration innerhalb des Bioreaktors an und der OCQ-Wert kann sehr klein werden. Bei geringer Atmungsaktivität hingegen sinkt der OCQ-Wert, bei einer pO_2 -Regelung über die Begasungsrate, auf niedrige Werte, da die Begasungsrate reduziert wird und der Massentransfer vom Kopfvolumen mehr ins Gewicht fällt. Dies führt zu einer Anreicherung von CO_2 im Bioreaktor. Bei einer Regelung des pO_2 über die Rührerdrehzahl tritt wiederum der umgekehrte Fall ein. Die Rührerdrehzahl wird reduziert und CO_2 ausgeblasen, was zu einem hohen OCQ-Wert führt.

Der resultierende OCQ-Verlauf einer Kultivierung mit pO_2 -Regelung via Begasung beginnt deshalb bei niedrigen Werten. Er steigt an, wenn die Zellen die exponentielle Wachstumsphase erreichen und sinkt wieder ab, wenn die Nährstoffe verbraucht sind und die Atmungsaktivität zurückgeht. Der entsprechende COQ-Verlauf verhält sich jeweils genau entgegengesetzt, da er den Kehrwert des OCQ's darstellt. Die Form dieser Verläufe (OCQ und COQ) kann, bei einer Kontrolle des pO_2 durch Variationen in der Begasungsrate, wesentlich durch die Einstellung der Rührerdrehzahl beeinflusst werden. Optimale Einstellungen müssen im Vorfeld getestet werden.

Wird der pO_2 über die Rührerdrehzahl konstant gehalten, beginnt der OCQ-Verlauf bei hohen Werten. Dies ist bedingt durch das konstante Ausblasen des CO_2 zu Beginn der Kultivierung, wenn die respirative Aktivität sehr schwach ist. Bei höheren Zelldichten und erhöhter Verstoffwechslung des Sauerstoffs sinkt der OCQ ab und steigt gegen Ende der

Kultivierung wieder an, wenn die Nährstoffquellen verbraucht sind. Die Form der Kurve hängt hier sehr stark von der initialen Begasungsrate ab. Abbildung 3.6 zeigt die berechneten Werte der beiden Parameter, wenn Raumluft bei einem angenommenen RQ von 1 verwendet wird. Dies bedeutet, dass die stöchiometrisch erzeugte Menge an CO_2 gleich der verbrauchten Menge O_2 ist.

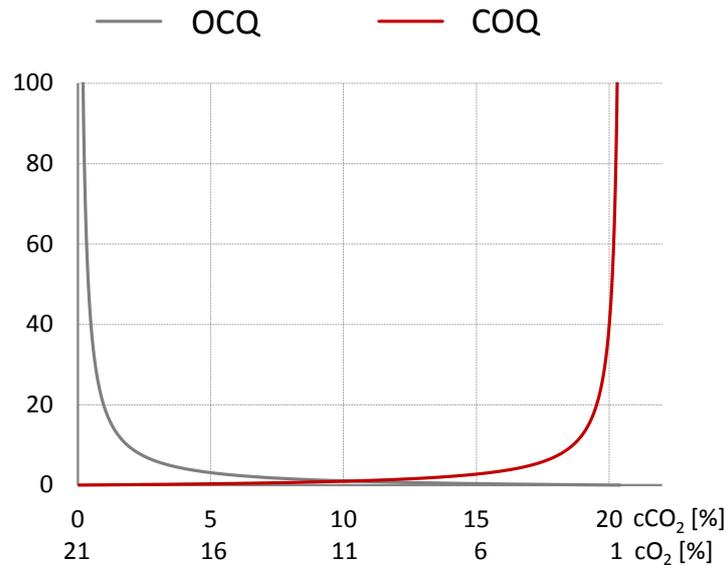


Abbildung 3.6: Berechnete OCQ- und COQ-Kurven. Die Abbildung zeigt die theoretischen OCQ ($c\text{O}_2/c\text{CO}_2$ Abgas) und COQ ($c\text{CO}_2/c\text{O}_2$ Abgas) Werte aufgetragen gegen die Abgaskonzentrationen. Angenommen wurde ein RQ von 1 was bedeutet, dass pro Mol Sauerstoff ein Mol Kohlendioxid produziert wird. Der Kurvenverlauf zeigt, dass die höchste Sensitivität des OCQ zwischen 0-5% CO_2 im Abgas zu erwarten ist [Abb. aus 8].

Durch Verändern der Begasungsrate und Rührerdrehzahl können die Bedingungen so eingestellt werden, dass man sich auf der in Abbildung 3.6 dargestellten Abszisse nach rechts oder links bewegt. Durch entsprechende Prozessführung können, mittels dieser Parameter, außerordentlich aussagekräftige Kurvenverläufe, bezüglich des metabolischen Zustandes einer Kultur, erzeugt werden. Die Abbildung verdeutlicht, dass für den OCQ die höchste Sensitivität bei moderaten CO_2 - und höheren O_2 -Konzentrationen zu erwarten ist. Da erfahrungsgemäß der überwiegende Anteil von Kultivierungen mykobakterieller und anderer schwach metabolisch aktiver Organismen in diesem Bereich abläuft, ist infolgedessen speziell dieser Parameter interessant für eine Anwendung.

Abbildung 3.7 zeigt den zeitlichen Verlauf des OCQ- und COQ-Wertes bei einer *Batch*-Kultivierung des Modellorganismus *Saccharomyces cerevisiae*, bei welcher der $p\text{O}_2$ über die Rührerdrehzahl geregelt wurde. Die rote Box zeigt die Rohdaten in grau, sowie die gemittelten Signale von drei Minuten Messzeit in schwarz. Ein direkter Vergleich dieser Parameter mit CER/OUR ist nicht sinnvoll, da diese mehr oder weniger unabhängig von den

Kultivierungsbedingungen sind. Dies ist für OCQ/COQ nicht der Fall. Diese Parameter hängen vollständig von den gewählten Kultivierungsbedingungen ab. Aus diesem Grund reagieren sie jedoch sehr sensitiv (in ihrem optimalen Bereich) auf Änderungen der Rührerdrehzahl, Begasungsrate und insbesondere der Atmungsaktivität der Organismen im Bioreaktor. Die erhaltenen Kurven sind typisch und reproduzierbar, wenn Kultivierungen unter denselben, standardisierten Bedingungen durchgeführt werden.

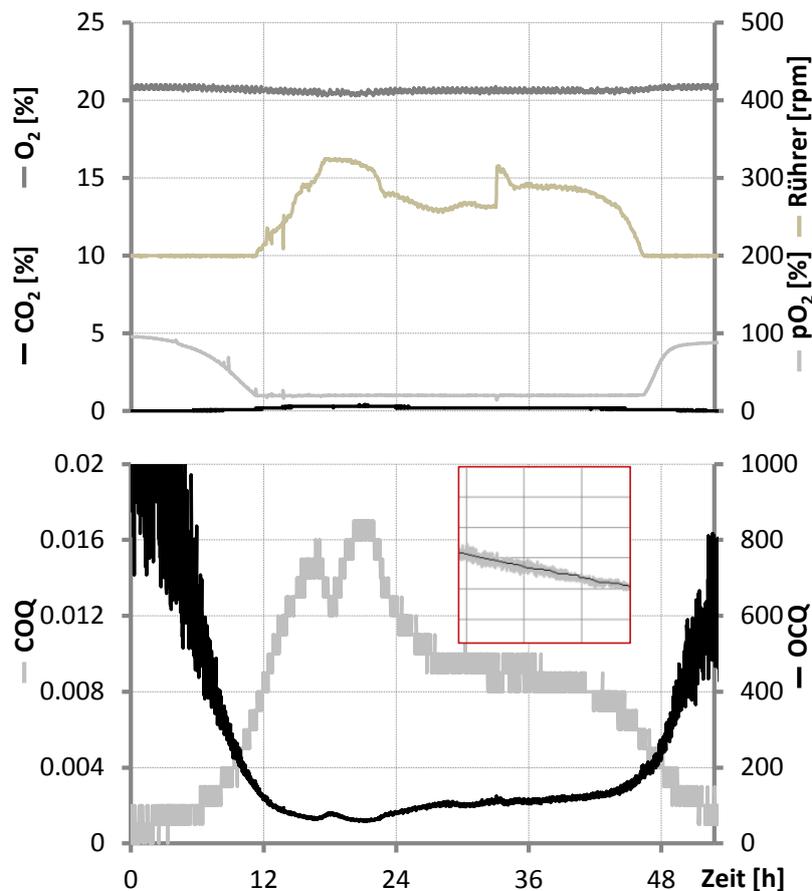


Abbildung 3.7: Fermentationsgraphen einer *S. cerevisiae* Kultivierung. Dargestellt sind O_2 , CO_2 , pO_2 und Rührerdrehzahl. Der pO_2 wurde über die Rührerdrehzahl kontrolliert. Der Verlauf der OCQ- und COQ-Kurven ist für eine Kultivierung dieser Art typisch und bei gleichen Kultivierungsbedingungen sehr gut reproduzierbar. Die rote Box zeigt den, durch den zeitlichen Mittelwert von drei Minuten, geglätteten COQ an. Durch diese Glättung können Messungenauigkeiten und Rauschen herausgefiltert werden [Abb. aus 8].

Diese Reproduzierbarkeit wurde genutzt, um den Medienwechsel einer Testkultivierung zu automatisieren. Für diesen Versuch wurde SBCm002 verwendet, nachdem eine 1 l Kultur den oben beschriebenen *Repetitive-Pattern* Status erreicht hatte (siehe Kapitel 2 „*Repeated-Batch*-Verfahren für ein Wirkstoffscreening mit Prozessverbesserung“). Der pO_2 wurde während dieser Kultivierung mittels der Begasungsrate geregelt. Die erhaltenen OCQ-Kurven (Abbildung 3.8) zeigen eine leichte Abweichung von der, weiter oben, als typisch

beschriebenen Form. Dies ist bedingt durch relativ hohe Zelldichten im Bioreaktor, die ein Überspringen der Lag- und einen direkten Eintritt in die Logphase bewirken. Der Zeitpunkt der Medienerneuerung wurde unter Kontrolle des OCQ gesetzt und eingeleitet, wenn ein unterer Grenzwert erreicht war. Dieser Wert wurde bei einem ersten, manuellen Medienwechsel abgelesen und danach als Grenzwert eingesetzt. Danach wurde die Kultivierung vollautomatisch, unter der Kontrolle der Steuersoftware des Bioreaktors, durchgeführt, mit etwa anderthalb Medienwechseln pro Tag. Die im Überstand befindlichen Metabolite wurden danach an ein Adsorberharz (Amberlite XAD16) gebunden und konnten am Ende des Versuchs vom Harz eluiert werden. Der Prozess konnte dadurch problemlos über 22 Tage gefahren werden und wurde letztendlich manuell gestoppt. Abbildung 3.8 zeigt einen Ausschnitt der OCQ-Kurve dieser Kultivierung.

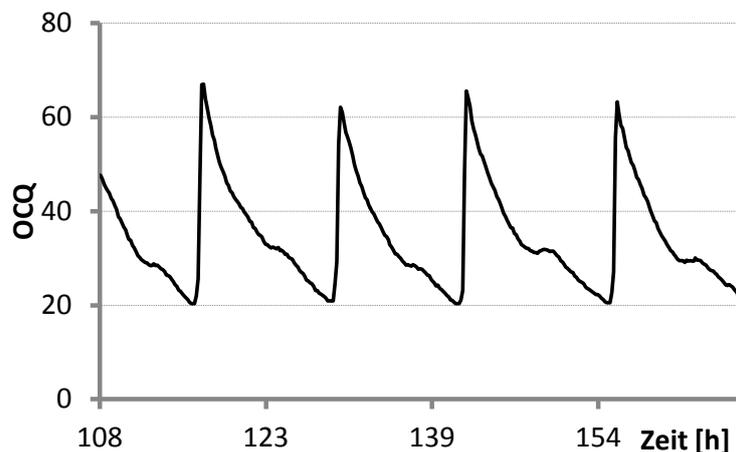


Abbildung 3.8: OCQ Kurve einer *Repeated-Batch*-Kultivierung von *Chondromyces* Stamm SBCm002. Der pO_2 dieser Kultivierung wurde über Begasung kontrolliert während die Rührerdrehzahl konstant gehalten wurde. Dadurch kommt es zu einem Anstieg der CO_2 - und Abfall der O_2 -Konzentration, wenn die Atmungsaktivität der Organismen nachlässt, da genügend Sauerstoff vom Kopfraum eingetragen und wenig durchgast wird. Ein unterer Schwellenwert wurde als Auslöser für einen automatisierten Medienwechsel mit anschließender Inkubation mit XAD16 verwendet. Die Kultur konnte dadurch 22 Tage automatisiert mit ca. 1,5 Medienwechseln pro Tag betrieben werden [Abb. aus 8].

Ein Vorteil dieser Methode ist die kurze Zeit, die benötigt wurde um einen Automatisierungsauslöser zu etablieren. Nach nur einem Kultivierungszyklus konnte der, auf der Erfahrung des Mikrobiologen basierende, Zeitpunkt des Medienwechsels in ein Automatisierungsskript integriert werden. Dies wurde durch die Berechnung des OCQ-Wertes und der dadurch möglichen Rückschlüsse auf den Zustand der kultivierten Bakterien ermöglicht. Dadurch konnte das Produktions-Potenzial der Organismen problemlos mehr als 20 Tage aufrechterhalten werden, bevor der Testlauf manuell gestoppt wurde. Zum Vergleich: *Batch*-Prozesse dauern in der Regel nicht länger als eine Woche und *Fed-Batch*-Prozesse müssen meist, aufgrund von Selbstintoxikation der Bakterien in den komplexen

Kulturmedien, nach etwa zwei Wochen beendet werden. Um die Produktivität dieses Prozesses mit einer herkömmlichen *Fed-Batch*-Kultivierung vergleichen zu können, wurde der zellfreie Überstand im Anschluss an eine Kultivierungsrunde mit XAD16 inkubiert, um die Sekundärstoffe daran binden zu lassen. Bei einer herkömmlichen Fermentation erfolgt eine Addition des XADs schon zu Beginn einer Kultivierung. Abbildung 3.9 zeigt einen Vergleich der relativen Produktivität von Apicularen A und zwei Crocapeptin-Derivaten, die Stamm SBCm002 bei den gewählten Kultivierungsbedingungen produziert. Dieser Vergleich zeigt, dass nicht alle Substanzen von der *Repeated-Batch*-Methode mit einer an die Kultivierung angeschlossenen Extraktion des Überstands profitieren. So ist die Produktivität hinsichtlich der Substanz Apicularen A bei Abwesenheit von XAD16 geringer. Im Falle der Crocapeptide ist jedoch eine verbesserte Produktion, bei zumindest einer Variante, beim *Repeated-Batch*-Verfahren zu beobachten. Der Vergleich anderer Substanzen aus den Extrakten zeigt, dass einige Substanzen von diesem Verfahren hinsichtlich der Ausbeute profitieren, jedoch nicht generell verbesserte Ausbeuten erzielt werden (Daten nicht gezeigt). Gründe für eine verminderte Produktion können unter anderem Degradation des Produkts oder eine *Feedback*-Inhibierung durch dieses sein. Dies bedeutet, dass die Ausbeuten von Einzelsubstanzen die durch eine nachfolgende Extraktion erzielt werden können, jeweils für den Einzelfall untersucht werden müssen. Unter entsprechenden Umständen kann der OCQ jedoch eine nützliche Hilfe für die Prozessautomatisierung und Optimierung sein. Durch eine OCQ-basierte Prozesskontrolle kann die Produktivität dieser schwierig handhabbaren Organismen unter Umständen verbessert und wesentlich verlängert werden.

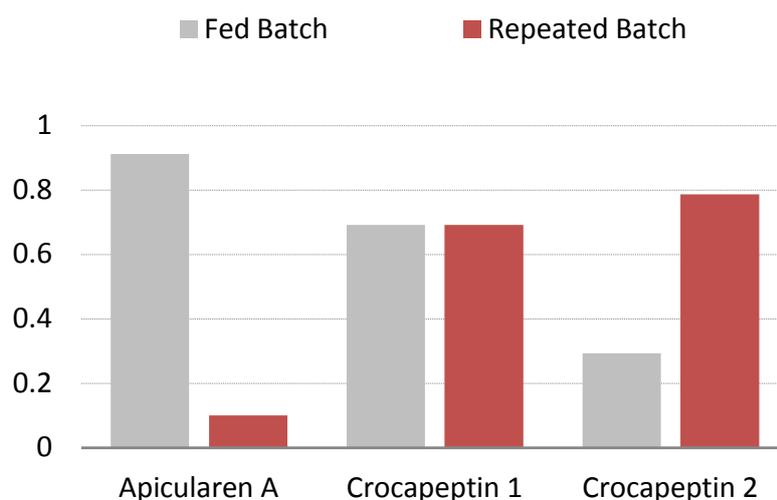


Abbildung 3.9: Vergleich der relativen Peakintensitäten zweier Substanzklassen von Extrakten aus einer *Batch*- und einer *RB*-Kultivierung. Die Graphen zeigen die relativen Peakflächen im Vergleich zu Sulfadimethoxin als internem Standard. Die Apicularenproduktion profitiert von der direkten Addition des XAD16, während für eines der Crocapeptinderivate dessen Fehlen eine bessere Produktion herbeiführt [Abb. aus 8].

Dieser Vergleich der Produktivität dieser zwei Prozesstypen hinsichtlich der Apicularen- und Crocapeptin-Mengen lieferte einen zusätzlichen Vorteil dieser Kultivierungsmethode. Durch die nach der Kultivierung erfolgende Inkubation des Kulturüberstandes mit dem Adsorberharz, wurde das Binden von unverbrauchten Medienkomponenten an das Harz weitgehend verhindert. Dieses so genannte „*Resin Fouling*“ stellt eines der Hauptprobleme beim Aufreinigen von Sekundärstoffen dar: Zum einen wird die Bindekapazität des Harzes reduziert, zum anderen erschweren die gebundenen Medienbestandteile die nachfolgende Aufarbeitung. Die Medienbestandteile müssen häufig unter großem Aufwand von den Zielsubstanzen getrennt werden. Abbildung 3.9 zeigt drei BPCs vergleichbarer Kultivierungen, die im positiven Ionisierungsmodus aufgenommen wurden. Durch eine der Fermentation angeschlossene Extraktion des Überstands mit einem Adsorberharz, kann eine deutliche Reduzierung des „*Foulings*“ erzielt werden (Schattierte Box, Abbildung 3.10).

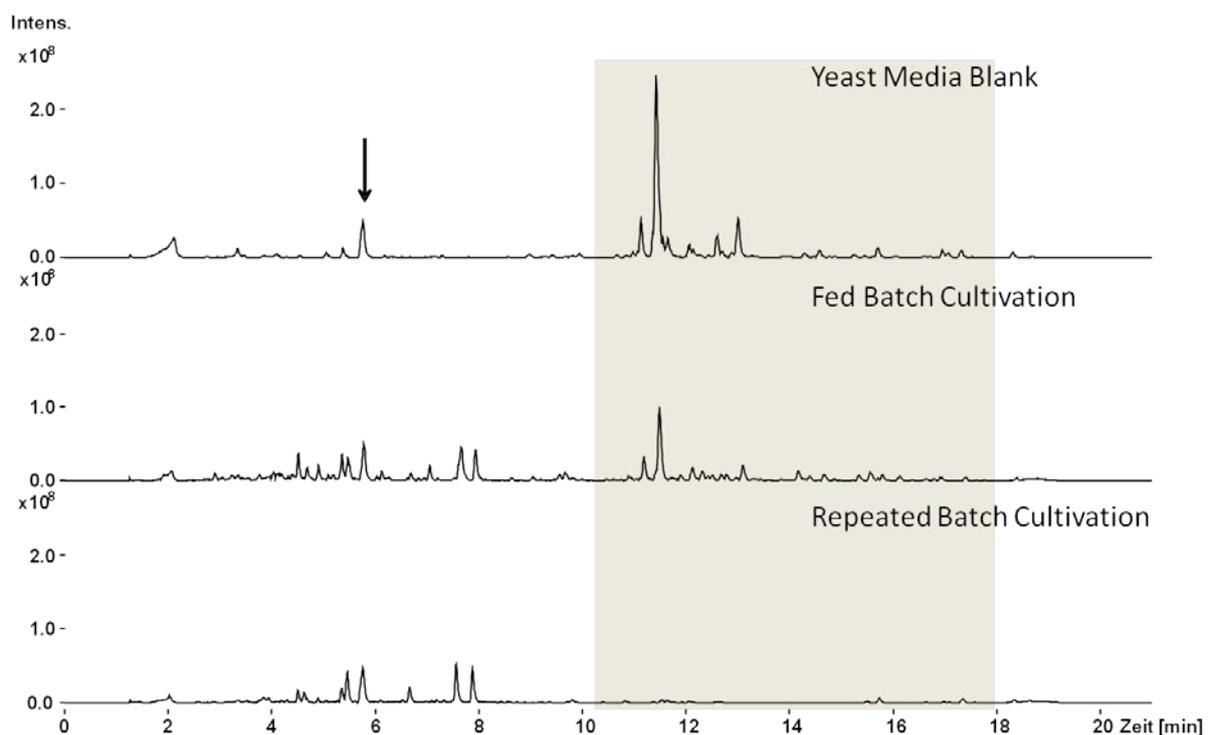


Abbildung 3.10: Base-Peak-Chromatogramme von Extrakten: Medium Blank, Kultivierung mit Zugabe von XAD (*Fed Batch*) und Kultivierung mit nachfolgender Inkubation des Überstands mit XAD (*Repeated Batch*). Die beiden Kultivierungen wurden unter vergleichbaren Bedingungen durchgeführt. Die Abbildung verdeutlicht das sogenannte *Resin Fouling* anhand eines Medium Blanks. Die graue Box umrahmt den Retentionszeit-Bereich innerhalb dessen im *Fed-Batch*-Extrakt Medienbestandteile identifiziert werden können. Diese Peaks sind bei einer der Kultivierung angeschlossenen Inkubation mit XAD wesentlich reduziert. Der schwarze Pfeil zeigt den Peak des internen Standards an [Abb. aus 8].

Aufgrund der hohen Sensitivität des OCQs und COQs besteht die Möglichkeit diese einzusetzen, wenn beispielsweise bei kontinuierlichen Kultivierungen *Steady-State*-

Bedingungen erreicht und gehalten werden sollen. Der OCQ-Wert könnte beispielsweise als Stellgröße für die Verdünnungsrate in Chemostat- oder Perfusionsprozessen verwendet werden. Erste Versuche diesbezüglich sind sehr vielversprechend (siehe Kapitel 5). Die Sensitivität dieses Parameters wird ersichtlich, wenn man Abbildung 3.5 genauer betrachtet. Es ist deutlich zu erkennen, dass der OCQ konstant bleibt, wenn die eingestellten Bedingungen erreicht sind. Im abgebildeten Fall sind das die gewünschten CO_2 - und O_2 -Konzentrationen. Im ersten Kultivierungszyklus konnte allerdings aufgrund eines unteren Grenzwertes die Rührerdrehzahl nicht weiter reduziert werden. Dies führt zu einem deutlichen Ausbauchen des OCQ-Verlaufs, während bei der CO_2 -Konzentration noch kein offensichtlicher Effekt sichtbar wird. Dies verdeutlicht, wie empfindlich der OCQ auf kleinste Veränderungen reagiert und wie dadurch bereits frühzeitig Änderungen im Sauerstoffverbrauch angezeigt werden. Dadurch können, wenn das Wachstumsverhalten eines Stammes bekannt und die Kultivierungsbedingungen etabliert sind, OCQ und COQ als einfache Auslöser oder zusätzliche Kontrollen zu CER/OUR-basierten Kultivierungsstrategien verwendet werden.

3.3 ZUSAMMENFASSUNG

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass der Einfluss des pO_2 und insbesondere des pCO_2 auf die Sekundärstoffproduktion von Myxobakterien bislang unterschätzt bzw. vernachlässigt wurde. Die Ergebnisse, die mit dem Genus *Chondromyces* erzielt werden konnten, lassen sich, basierend auf ersten Versuchen, auch auf den Genus *Sorangium* übertragen. Es ist wahrscheinlich, dass die Produktivität anderer Mikroorganismen ebenfalls durch eine stringente Kontrolle der Gaszusammensetzung beeinflusst werden kann. Durch die Methode zur Kontrolle beider Gaskonzentrationen besteht die Möglichkeit, mit einem sehr einfachen instrumentellen Aufbau Fragestellungen diesbezüglich zu untersuchen. Weiterhin erlaubt die Anwendung derselben Prinzipien eine Automatisierung und Kontrolle von Bioprozessen ohne umfassende Kenntnisse der benötigten Substrate und involvierten Stoffwechselforgänge der untersuchten Organismen zu besitzen. Hierfür wurden die sensitiven Parameter OCQ und COQ eingesetzt. Diese ermöglichen, trotz der schwachen respiratorischer Aktivität von Myxobakterien, den Einsatz kostengünstiger, aber wenig sensitiver, Abgassensoren, um eine zuverlässige Prozessautomatisierung zu erzielen. Weitere Versuche werden zeigen, inwiefern diese Ergebnisse auch für die verbesserte Kultivierung anderer Organismen eingesetzt werden können.

4 ENTDECKUNG NEUER CHONDRAMIDE MIT VERBESSERTEM WIRKUNGSSPEKTRUM

4.1 HINTERGRUND

Die Zielsetzung der nachfolgend beschriebenen Arbeiten war es, die im Kapitel 2 („*Repeated-Batch*-Verfahren für ein Wirkstoffscreening mit Prozessverbesserung“) gezeigten Verfahren weiterzuentwickeln. Zusätzlich sollte dem dort verwendeten Wirkstoffassay *High-Content-Screening* (HCS) hinzugefügt werden. Dadurch sollten zusätzliche Informationen, hinsichtlich der unterschiedlichen biologischen Aktivitäten eines Substanzgemisches, gewonnen werden. Zudem sollte auf das Ziel hingearbeitet werden, eventuell überlagerte Aktivitäten zu unterscheiden und dadurch Substanzen zu identifizieren, die ansonsten nicht entdeckt worden wären. Die gesamte Aktivitätstestung für diese Arbeiten sowie die *in vitro* Aktin-Assays wurden von Jennifer Herrmann durchgeführt.

Seit der Entwicklung und Anwendung von *High-Content-Screening* in den späten neunziger Jahren, wurde diese Technik, im Zuge von Weiterentwicklungen in Wirkstofffindungs- und Screeningprozessen, immer weiter verbessert und für spezielle Fragestellungen optimiert. HCS findet vor allem im Sekundärscreening, bei der Aufklärung von Struktur-Aktivitätsbeziehungen (*Structure-Activity-Relationship*, SAR), sowie der Wirkmechanismusvalidierung und Wirkstoffoptimierung Anwendung. In den letzten Jahren wurde allerdings immer wieder versucht, die Qualität eines Primärscreening zu verbessern, indem zellbasierte HCS-Assays mit einer höheren physiologischen Relevanz eingesetzt wurden [1, 2, 3]. Traditionell erfolgt die Wirkstoffsuche nach bioaktiven Substanzen aus natürlichen Quellen durch Untersuchung mehr oder weniger vorfraktionierter Extrakte, gefolgt von arbeitsintensiver, aktivitätsgeleiteter Aufreinigung und Charakterisierung. Dieser Prozess kann möglicherweise durch fokussierte, aussagekräftige sowie durch Dereplikation unterstützte Assays beschleunigt werden. Aus diesem Grund wurden methanolische Extrakte von SBCm007, einem *Chondromyces*-Isolat aus unserem Labor, untersucht. Der hier gewählte Ansatz sollte ermöglichen, mittels HCS, chemisch neue Substanzen zu identifizieren. Die so entdeckten Substanzen besäßen dann bereits zugeordnete biologische Aktivitäten hinsichtlich eines apoptotischen Wirkmechanismus' auf eukaryotische Zellen. Myxobakterien im Allgemeinen, darunter auch der Genus *Chondromyces*, stellen eine Besonderheit dar, da viele der produzierten Sekundärstoffe einzigartige Strukturelemente und neue Wirkmechanismen aufweisen. In Abbildung 4.1a sind einige Metabolite dargestellt, die von verschiedenen *Chondromyces* spp. produziert werden. SBCm007 wurde ausgewählt, da die durchgeführte

Dereplikation von Kultivierungsextrakten mittels HPLC/MS ergab, dass außer den bereits bekannten Chondramiden A-D (siehe Abbildung 4.1b), keine weiteren von dieser Gattung produzierten Substanzen detektiert werden. Chondramide sind zyklische Depsipeptide, die ursprünglich aus *Chondromyces crocatus* isoliert wurden [4]. Strukturell sind die Chondramide sehr eng mit den Jaspamiden und Jasplakinoliden verwandt, welche aus marinen Quellen isoliert wurden [5, 6] und wirken wie diese auf Aktin, eine der Hauptkomponenten des eukaryotischen Zytoskeletts.

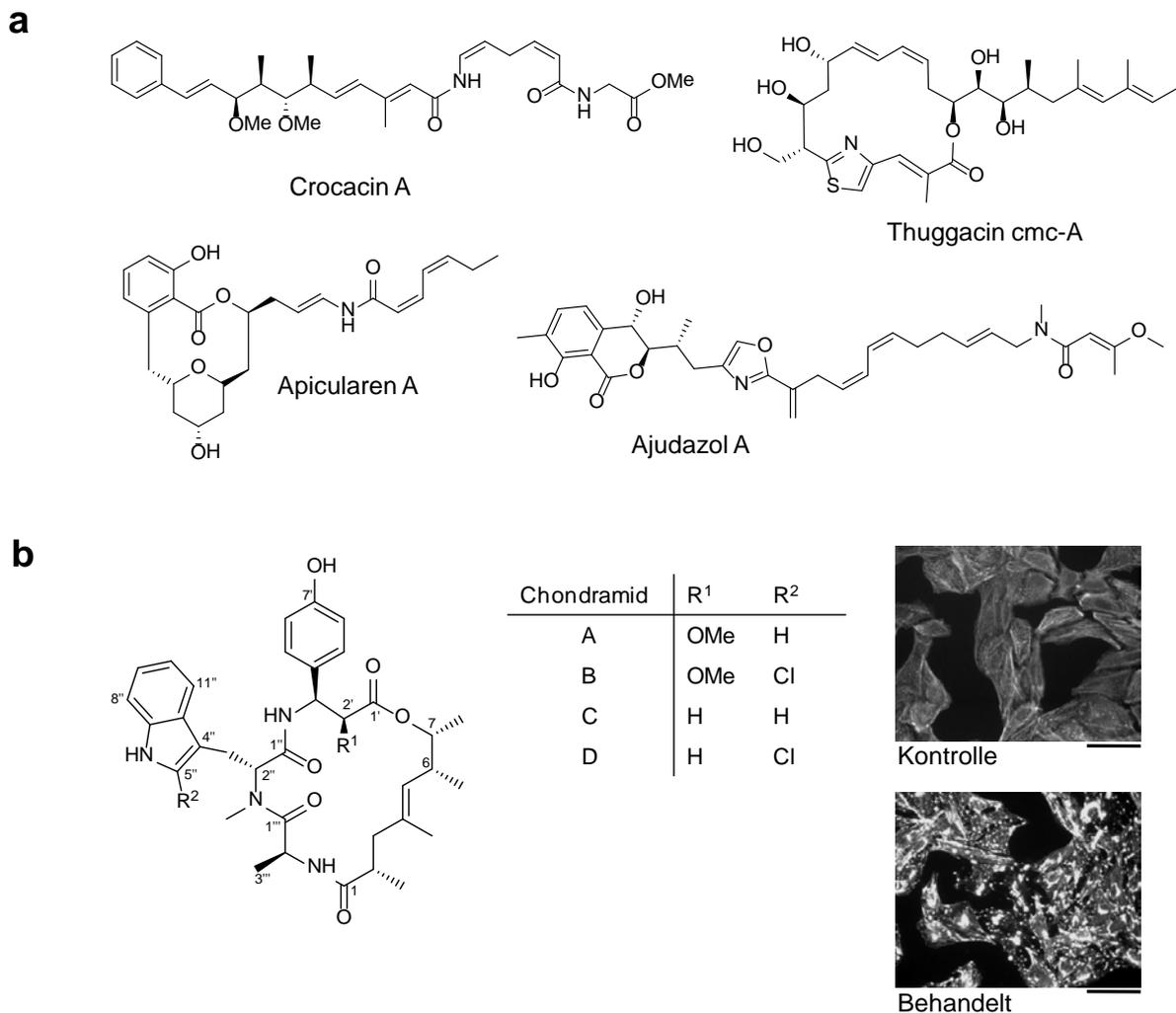


Abbildung 4.1: Verschiedene Sekundärstoffe, die von *Chondromyces* sp. produziert werden. (a) Vier beispielhaft gewählte Metabolite aus *Chondromyces* sp., die nicht in Extrakten von SBCm007 gefunden werden. (b) Chemische Struktur der Chondramide A-D, die von SBCm007 produziert werden. Die beiden Bilder zeigen Aktinfilamente von humanen U-2 OS Osteosarcom-Zellen vor und nach der Behandlung mit 100 nM Chondramid C. Typische F-Aktin Verklumpungen werden bereits nach 4 h beobachtet [Abb. aus 7].

Die Strukturen beinhalten ein halogeniertes D-Tryptophan sowie eine ungewöhnliche (*R*)- β -Tyrosin Einheit, was durch Arbeiten an den zugehörigen Biosyntheseenzymen dieser

Stoffgruppe belegt werden konnte [8]. Beide Substanzgruppen, Jaspamide/Jasplakinolide und Chondramide, induzieren *in vitro* die Polymerisation von G-Aktin unter Niedrigsalzbedingungen [9, 10]. Aufgrund der kompetitiven Verdrängung von gebundenem Phalloidin und unterstützt durch Co-Kristallisationsstudien mit diesem, wurde eine gemeinsame Bindestelle dieser Substanzen an F-Aktin mit dem Pilztoxin vorgeschlagen [11, 12]. Im Gegensatz zu Phalloidin sind die Depsipeptide allerdings in der Lage in lebende Zellen einzudringen, was sie zu wertvollen Werkzeugen für die Untersuchung der Aktindynamik *in vivo* macht [13, 14].

Die beiden Zytoskelettproteine Aktin und Tubulin, welche u. a. für die Aufrechterhaltung der Zellstruktur benötigt werden, sind auch an vielen anderen wichtigen Funktionen der Zelle beteiligt. Dazu gehören die Zell-Zell-Kommunikation, Transportvorgänge, die Zytokinese und die Mitose. Aus diesem Grund stellen diese Proteine interessante Ansatzpunkte für Pharmazeutika dar. So sind speziell antimitotische Substanzen, die direkt auf Mikrotubuli wirken, gut untersuchte Chemotherapeutika, die für die Krebsbehandlung verwendet werden [15]. Im Gegensatz dazu befindet sich keine Substanz, die auf Aktin wirkt, in klinischer Anwendung, obwohl sowohl Tubulin als auch Aktin als mögliche Zielstrukturen bei der Krebsbehandlung diskutiert werden. Speziell die Migration von Krebszellen ist möglicherweise durch aktinwirksame Zytostatika positiv beeinflussbar [16, 17]. Ein weiteres Anwendungsgebiet der Chondramide stellt, wie oben bereits angedeutet, die Möglichkeit dar, diese Moleküle als molekulare Sonden einzusetzen. Derivatisierungen am Alaninrest des Moleküls haben gezeigt, dass Fluorophore gekoppelt werden können. Das synthetische Derivat konnte für eine effiziente Färbung von Aktin in nicht permeabilisierten Zellen verwendet werden [14].

Mehr als 10 Jahre nach der Entdeckung der Chondramide, wurden zwei unabhängige Berichte über die Totalsynthese von Chondramid C veröffentlicht; und weitere zwei Jahre später die Totalsynthese von Chondramid A, mit welcher letztendlich die absolute Konfiguration dieser Moleküle geklärt werden konnte [12, 18, 19]. Dies erlaubte wichtige Einsichten in Struktur-Aktivitätsbeziehungen. So konnte z. B. gezeigt werden, dass die Konfiguration an C6-C7 des Polyketidsegments ausschlaggebend für die Konformation des Peptidteils des Moleküls, und damit auch für seine Aktivität, ist [18]. Diese Ergebnisse werden unterstützt durch Vergleiche von Chondramid C mit einem Modell des aktin gebundenen Phalloidins [12]. Weiterhin konnte mit synthetischen Analoga gezeigt werden, dass die Arylgruppe für eine Aktivität wichtig ist. Kleinere Modifikationen an der *para*-Position dieser Einheit werden toleriert, während ein Austausch der Hydroxygruppe mit voluminöseren Einheiten eine Verminderung der Aktivität zur Folge hat [20, 21].

Diese Studie befasst sich mit der Entdeckung und Charakterisierung von 14 neuen Chondramid-Derivaten aus Extrakten von SBCm007. Die dabei gefundenen Derivatisierungen des Chondramid-Grundgerüsts deuten auf 21 weitere theoretische Strukturvariationen hin, von denen 16 mittels HRMS nachgewiesen wurden. Diese Strukturvielfalt wird durch unterschiedliche Derivatisierungen am Grundgerüst erzeugt, die in verschiedenen Kombinationen auftreten. Von jeder strukturellen Variante wurde mindestens ein Vertreter aufgereinigt, chemisch charakterisiert und sowohl *in vivo* als auch *in vitro* hinsichtlich der biologischen Aktivität untersucht. Dadurch konnten Struktur-Aktivitätsbeziehungen aufgezeigt werden, welche nahelegen, dass bromierte Chondramid-Varianten möglicherweise als vielversprechende Leitstrukturen für therapeutische Substanzen oder als biologische Sonden dienen können.

4.2 ERGEBNISSE

4.2.1 BIOAKTIVITÄTSSCREENING VON *CHONDRAMYCES SP. SBCM007*

Das Neuisolat *Chondromyces sp. SBCm007* wurde für die Produktion des Screeningextrakts in einem 2 l Bioreaktor kultiviert (siehe Kapitel 2 „Repeated-Batch-Verfahren zur kombinierten Prozessoptimierung mit Wirkstoffscreening“). Für die Untersuchung mittels HCS wurde ein Standardextrakt einer RB-Kultivierung verwendet, welches mittels der in Kapitel 2 beschriebenen Methoden charakterisiert wurde. Die spätere Produktion größerer Mengen von Substanzen wurde mittels eines *Batch*-Prozesses in einem 10 l Bioreaktor mit direkter Addition von XAD16 durchgeführt. Dabei wurden die verbesserten Produktionsbedingungen eingesetzt, die in den beiden vorhergehenden Kapiteln identifiziert und beschrieben wurden. Das Adsorberharz wurde jeweils mit Methanol extrahiert und das methanolische Extrakt entsprechend verarbeitet.

Bei Testungen mit humanen HL-60 Leukämie-Zellen lagen die GI_{50} -Werte unter 1 $\mu\text{g/ml}$ (siehe Abbildung 2.12), was hinsichtlich der Zytotoxizität eines Rohextraktes sehr niedrig ist. Die LC/MS basierte Dereplikation mittels des Datenbanksystems Myxobase [Daniel Krug, Srikanth Dudela, nicht veröffentlicht] zeigte, dass SBCm007 die bekannten Chondramide A-D produziert. Typische morphologische Veränderungen der Testzelllinie wiesen ebenfalls auf das Vorhandensein von Chondramiden in den Extrakten hin. Nach Inkubation mit dem Rohextrakt wurden Zellen mit zwei oder mehr Kernen beobachtet, einem charakteristischen Phänomen bei auf Aktin wirksamen Substanzen (siehe Abbildung 4.2a). Die außergewöhnlich hohe Toxizität des Extrakts legte jedoch nahe, dass außer den bekannten Chondramiden, noch weitere - bislang unbekannte - zytotoxische Substanzen im Extrakt vorhanden sein mussten. Durch die Verwendung spezifischerer Bioassays, sollten bekannte

Effekte, wie die durch die Chondramide A-D hervorgerufene Aktinpolymerisation, von möglichen anderen zytostatischen Effekten unterschieden werden. Die Testung des Rohextraktes zeigte, dass neben der sehr starken Polymerisation von Aktin auch ein Anstieg des lysosmalen pH-Wertes zu beobachten war. Aus diesem Grund wurde das Rohextrakt mittels Kieselgelfraktionierung aufgetrennt und diese Primärfractionen in verschiedenen *High-Content-Assays* getestet. Die Testauswertung beinhaltete eine Analyse und Quantifizierung morphologischer Veränderungen, z. B. Zellvergrößerung/-schrumpfung, Zerstörung von Aktinfilamenten und Änderungen des lysosomalen pH-Wertes von humanen U-2 OS Zellen.

Obwohl in den getesteten Silikagelfractionen eine Überlappung beider oben genannter Effekte beobachtet wurde, konnte durch Tests mit Reinsubstanzen gezeigt werden, dass die Chondramide keine Änderung des lysosomalen pH-Wertes auslösen (siehe Abbildung 4.2b). Durch Fraktionierung mittels semipräparativer HPLC konnten die Substanzen, die eine Veränderung des pH-Wertes auslösten, von denen, die eine polymerisierende Wirkung auf Aktin haben, getrennt werden (Auswertung nicht gezeigt). Aufgrund der geringen Mengen war es jedoch nicht möglich, die Substanzen, die eine Veränderung des lysosomalen pH-Wertes auslösten, aufzureinigen und zu charakterisieren.

Die Auswertung der HC-Daten zeigte, dass der aktinpolymerisierende Effekt durch nahezu allen Kieselgelfractionen ausgelöst wurde. Im Gegensatz dazu bestätigte ein Tetrazoliumsalz-Assay, (MTT) in Kombination mit MS-Dereplikation, jedoch nur in den Fractionen C und D das Vorhandensein von Chondramiden (siehe Abbildung 4.3). Aus diesem Grund wurden ausgewählte Kieselgelfractionen mittels präparativer HPLC/MS-Chromatographie subfractioniert und diese Fractionen ebenfalls einer HC-Analyse zugeführt. Diese Vorgehensweise führte letztendlich zur Identifizierung einiger Zielmassen mit denen eine Aktinpolymerisation assoziiert werden konnte. Dies war ausschlaggebend für die Aufreinigung verschiedener Substanzen.

Die Aufreinigung verschiedener Zielsubstanzen mittels semipräparativer HPLC, basierend auf den HC-Bioaktivitäts-Assays, führte letztendlich zu einigen Reinsubstanzen, die die aktinpolymerisierende Aktivität aufwiesen. Diese Substanzen wurden einer vollständigen chemischen Charakterisierung mittels MS- und NMR-basierter Methoden zugeführt. Dies führte letztendlich zur Identifizierung verschiedener neuer Chondramid Derivate mit interessanten, bis dahin für diese Substanzklasse noch nicht beschriebenen, strukturellen Erweiterungen. Die erste entdeckte Variante (A10), ist beispielsweise am Tryptophanrest halogeniert, wie es für Chondramid B und D bereits beschrieben wurde. Es konnte jedoch eine zusätzliche Chlorierung an C6' sowie eine Glykosylierung am Tyrosinrest nachgewiesen werden (siehe Abbildung 4.4a).

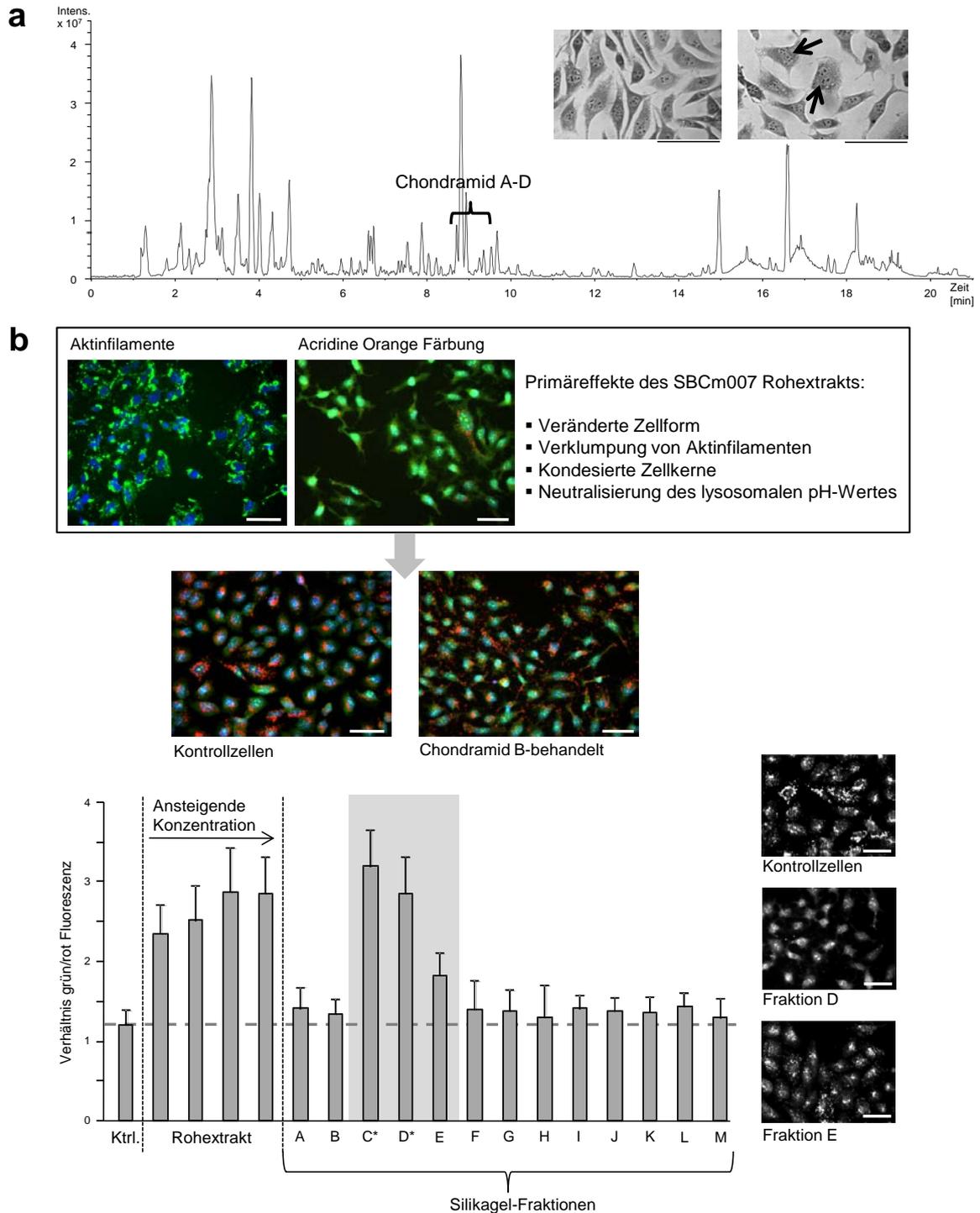


Abbildung 4.2: Primärscreening von SBCm007. (a) BPC des Rohextrakts vom XAD einer SBCm007 Kultur, analysiert mittels HPLC-MS im positiven Ionisierungsmodus. Die Abbildungen zeigen die typischen morphologischen Veränderungen von U-2 OS Zellen nach Behandlung mit dem Extrakt. Die Pfeile zeigen die häufig auftretenden doppelkernigen Zellen an. (b) Als Indikator für den Lysosomalen pH-Wert wurde Acridinorange verwendet. Die oberen Abbildungen zeigen extraktbehandelte U-2 OS Zellen, Aktin wurde mittels Antikörperfärbung sichtbar gemacht. Linkes Bild: grün für β -Aktin, blau für Hoechst-gefärbte Zellkerne. Rechtes Bild: grün für Acridinorange in ganzen Zellen, rot für akkumuliertes Acridinorange in sauren Kompartimenten, blau für Hoechst-gefärbte Zellkerne. Chondramide allein beeinflussen den lysosomalen pH bei einer Endkonzentration von 100 nM nicht (untere Bildreihe). Für eine HCS Analyse (Diagramm) wurden U-2 OS Zellen 4 h mit Extrakt oder Fraktionen behandelt bei einer Endkonzentration von 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ und dann mit Acridinorange und Hoechst33342 gefärbt. Das Acridinorange Fluoreszenzverhältnis $\text{grün}_{\text{Zytoplasma}}/\text{rot}_{\text{Lysosomen}}$ wurde aus Mittelwerten aller Zellen eines Wells berechnet. Die gestrichelte Linie zeigt den Wert der Kontrolle an. Die Fehlerbalken geben jeweils die Standardabweichung an. Die drei Abbildungen zeigen Kontrollzellen und Zellen, die mit Fraktion D und E behandelt wurden. Hier wird deutlich, dass die lysosomale Aktivität nur teilweise mit den Fraktionen die den überwiegenden Anteil an Chondramiden enthalten (*) überlappt [Abb. aus 7].

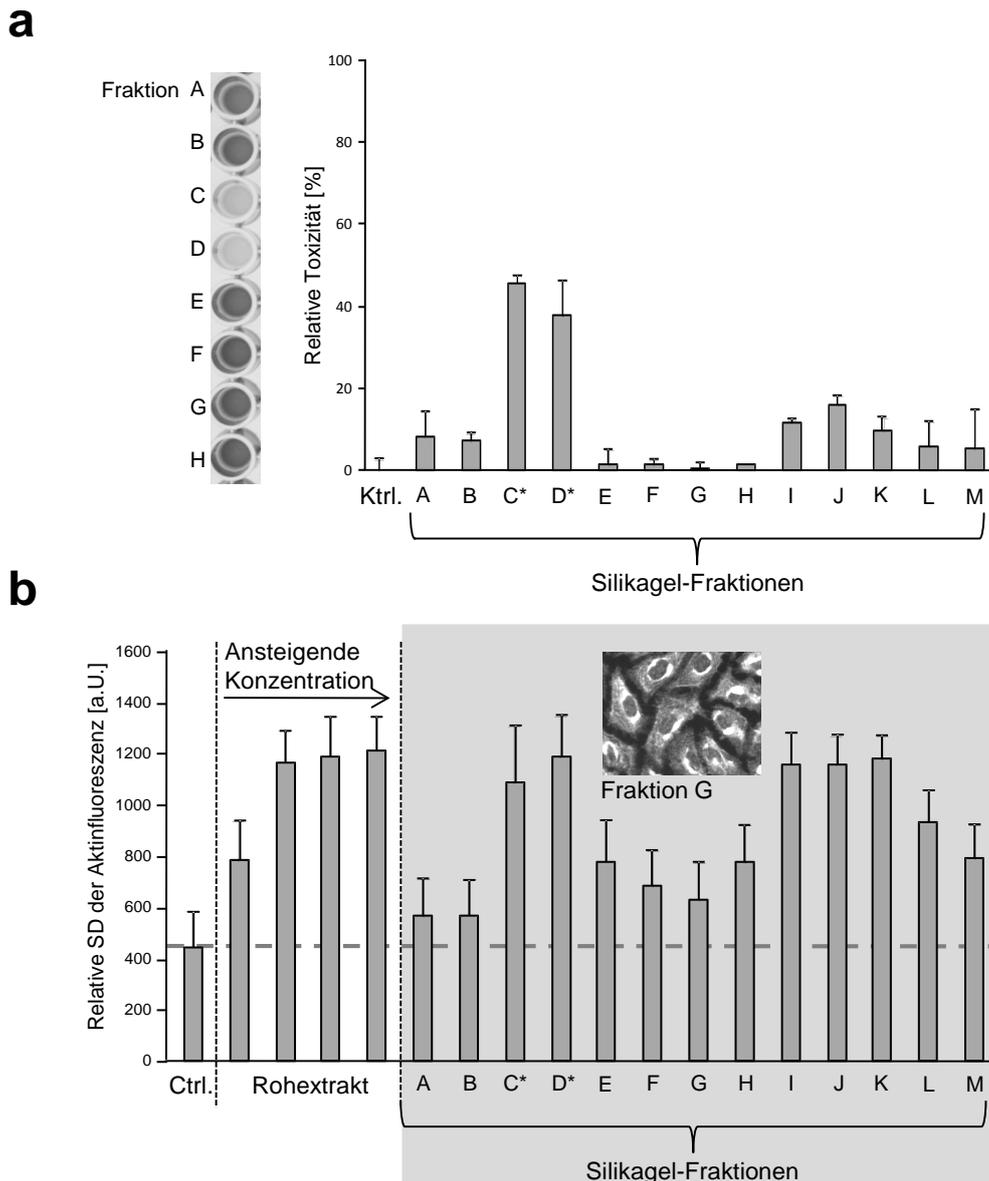


Abbildung 4.3: Vergleich der Sensitivität eines konventionellen MTT-Assays, mit High-Content-Screening, bei welchem die Aktinpolymerisation quantifiziert wird. (a) Kieselgelfractionen wurden bei einer Endkonzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ getestet. Nach 2 Tagen Behandlung wurde die Viabilität der U-2 OS Zellen mittels Tetrazoliumsalzreduktion (MTT) getestet. Die Balken zeigen den Mittelwert dreier Messungen mit der jeweiligen Standardabweichung an. Die Kontrolle wurde auf 0% Wachstumsinhibierung gesetzt. Die Abbildung links zeigt die Wells der Fraktionen A-H. Die Chondramide enthaltenden Hauptfraktionen sind mit einem Stern markiert. (b) HCS vom Rohextrakt und Kieselgelfractionen bei einer Endkonzentration von 25 $\mu\text{g/ml}$. U-2 OS Zellen wurden nach einem Tag Behandlung auf β -Aktin immungefärbt. Die Standardabweichung der zytoplasmischen Aktinfluoreszenz wurde auf Einzelzellbasis als Mittelwert pro Well ermittelt. Die Fehlerbalken geben diese an. Die gestrichelte Linie gibt den Wert der Kontrolle an, wobei hohe Werte eine starke Aktinpolymerisation anzeigen. Die Abbildung zeigt, dass eine signifikante Polymerisation auch in Fraktion G zu beobachten ist [Abb. aus 7].

4.2.2 CHARAKTERISIERUNG 14 NEUER CHONDRAMID DERIVATE

Die Entdeckung dieser neuen Chondramidderivate führte dazu, dass HRMS Daten von Biomassen- und XAD-Extrakt intensiv nach weiteren möglichen Variationen von Chondramiden untersucht wurden. Diese Suche nach theoretischen Massen in den RBK-

Extrakten basierte auf der Hypothese, dass neue Chondramide potentiell Variationen im Halogenierungsmuster aufweisen und/oder Glykosyliert sein können. Zusätzlich wurden häufige Variationen, wie Änderung einer Methylierung, berücksichtigt und auch weniger wahrscheinliche, wie beispielsweise eine Phosphorylierung, mit in die Betrachtung einbezogen. In der Tat konnten mehr als 30 Varianten, basierend auf der theoretischen Masse und den Isotopenmustern, mittels hochaufgelöster MS-Daten identifiziert werden. Um Substanzen zu produzieren, die diese Annahmen untermauern, wurden weitere Kultivierungen geplant. Diese Kultivierungen wurden schließlich unter Bedingungen, die anhand der RBK-Versuche als vorteilhaft für die Chondramidproduktion eingestuft worden waren, durchgeführt (siehe Kapitel 2 und 3). So war es möglich, von jeder strukturellen Variation mindestens einen Vertreter aufzureinigen und einer kompletten chemischen Charakterisierung mittels MS und NMR zu unterziehen. In Tabelle 4.1 ist jeweils angegeben, welches Derivat mittels NMR charakterisiert wurde und welches mittels UPLC/HRMS nachgewiesen wurde.

Um eine Einteilung der zahlreichen neuen Derivate zu erleichtern (siehe Abbildung 4.4b, Tabelle 4.1 und Anhang C - NMR-Tabellen Chondramide) wurde eine Nomenklatur, basierend auf der originalen Bezeichnung, eingeführt. Die Variationen an Position R^1 bestimmt den Buchstaben des betreffenden Chondramidderivates (siehe Abbildung 4.4b). Da Chondramid A bereits in der Literatur benannt war, wurde dafür die Erweiterung Chondramid A1 verwendet (siehe Tabelle 4.1). Chondramid B weist, im Vergleich mit Chondramid A, keine Variation an R^1 auf, weshalb die Erweiterung A2 eingeführt wurde. Chondramid C besitzt an R^1 ein H, aus diesem Grund wurde die Erweiterung C1 eingeführt. An R^1 verhält Chondramid D sich zu Chondramid C (C1), wie Chondramid B (A2) sich zu Chondramid A (A1), weshalb die Erweiterung C2 eingeführt wird. Die Buchstaben B und D wurden nicht vergeben, da diese bereits in der ursprünglichen Nomenklatur vorhanden waren. Der Buchstabe E wurde neu eingeführt. Diese Bezeichnung wurde für die bislang an der Position R^1 nicht beschriebene Hydroxylierung vergeben. Diese Nomenklatur vereinfacht die Namensgebung dahingehend, dass nun alle Derivate bezüglich ihres Substitutionsmusters an R^2 - R^4 durchnummeriert werden können. Der Buchstabe hingegen gibt an, welche Strukturvariante an R^1 zu finden ist. Dies bedeutet beispielsweise, dass die Chondramide A5, C5 und E5 das gleiche Substituentenmuster aufweisen - außer an Position R^1 . Seltene Derivate, wie beispielsweise das Propionyl-Chondramid, von welchem sich nur zwei Varianten nachweisen ließen, wurden nicht in die Nomenklatur mit einbezogen. Diese bekamen einen Eigennamen, welcher die entsprechende Derivatisierung eines, in der Nomenklatur bezeichneten, Grundgerüsts beschreibt. Da manche Derivate, wie z. B. die Chondramide A2 und A3, aufgrund ihrer Masse und ihres Isotopenmusters nicht unterschieden werden konnten, wurde eines der Derivate aufgereinigt und charakterisiert.

Tabelle 4.1: Liste aller charakterisierten und postulierten Chondramid-Derivate. Spalte 2-6 geben den jeweiligen Rest an (siehe Abbildung 4.4b). In Spalte 7 ist die theoretische und in Spalte 8 die detektierte Masse angegeben. Wurden Derivate vollständig charakterisiert ist NMR in Spalte 8 eingetragen. Aufgrund der geringen Abundanz konnten einige Derivate nur nach Aufkonzentrierung detektiert werden. 5 Derivate aus der C- und E-Reihe, die ein Äquivalent in der A-Reihe besitzen, konnten nicht detektiert werden und sind in Spalte 8 mit n. d. markiert.

	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	m/z [M+H] ⁺ theor.	m/z [M+H] ⁺ found
Chondramide A (A1)	OMe	H	OH	H	Me	647.3445	NMR
Chondramide B (A2)	OMe	Cl	OH	H	Me	681.3056	681.3049
Chondramide A3	OMe	H	OH	Cl	Me	681.3056	NMR
Chondramide A4	OMe	Cl	OH	Cl	Me	715.2666	NMR
Chondramide A5	OMe	H	P	H	Me	727.3109	727.3102
Chondramide A6	OMe	Cl	P	H	Me	761.2719	NMR
Chondramide A7	OMe	H	P	Cl	Me	761.2719	761.2713
Chondramide A8	OMe	Cl	P	Cl	Me	795.2329	NMR
Chondramide A9	OMe	H	C ₆ H ₆ O ₇	Cl	Me	857.3376	NMR
Chondramide A10	OMe	Cl	C ₆ H ₆ O ₇	Cl	Me	891.2987	NMR
Chondramide C (C1)	H	H	OH	H	Me	617.334	617.3333
Chondramide D (C2)	H	Cl	OH	H	Me	651.295	651.2944
Chondramide C3	H	H	OH	Cl	Me	651.295	651.2944
Chondramide C4	H	Cl	OH	Cl	Me	685.256	685.2554
Chondramide C5	H	H	P	H	Me	697.3003	685.2554
Chondramide C6	H	Cl	P	H	Me	731.2613	731.2607
Chondramide C7	H	H	P	Cl	Me	731.2613	731.2607
Chondramide C8	H	Cl	P	Cl	Me	765.2224	n.d.
Chondramide C9	H	H	C ₆ H ₆ O ₇	Cl	Me	827.3271	827.3265
Chondramide C10	H	Cl	C ₆ H ₆ O ₇	Cl	Me	861.2881	n.d.
Chondramide E1	OH	H	OH	H	Me	633.3289	633.3283
Chondramide E2	OH	Cl	OH	H	Me	667.2899	NMR
Chondramide E3	OH	H	OH	Cl	Me	667.2899	667.2893
Chondramide E4	OH	Cl	OH	Cl	Me	701.2509	701.2503
Chondramide E5	OH	H	P	H	Me	713.2952	713.2946
Chondramide E6	OH	Cl	P	H	Me	747.2562	747.2556
Chondramide E7	OH	H	P	Cl	Me	747.2562	747.2556
Chondramide E8	OH	Cl	P	Cl	Me	781.2173	n.d.
Chondramide E9	OH	H	C ₆ H ₆ O ₇	Cl	Me	843.322	n.d.
Chondramide E10	OH	Cl	C ₆ H ₆ O ₇	Cl	Me	877.283	n.d.
Chondramide A3 (linear)	OMe	H	OH	Cl	Me	699.3161	NMR
Brom-Chondramide A3	OMe	H	OH	Br	Me	725.255	NMR
Chondramide A9 Variant	OMe	H	C ₁₅ H ₂₄ NO ₁₂	Cl	Me	1074.4327	1074.432
Brom-Chondramide A9	OMe	H	C ₆ H ₆ O ₇	Br	Me	901.2871	901.2865
Chondramide A10 Variant	OMe	Cl	C ₁₅ H ₂₄ NO ₁₂	Cl	Me	1108.3937	NMR
Propionyl-Chondramide C1	H	H	OH	H	Et	631.3496	NMR
Brom-Chondramide C3	H	H	OH	Br	Me	695.2445	NMR
Propionyl-Brom-Chondramide C3	H	H	OH	Br	Et	709.2601	NMR
Brom-Chondramide C9	H	H	C ₆ H ₆ O ₇	Br	Me	871.2766	871.2759

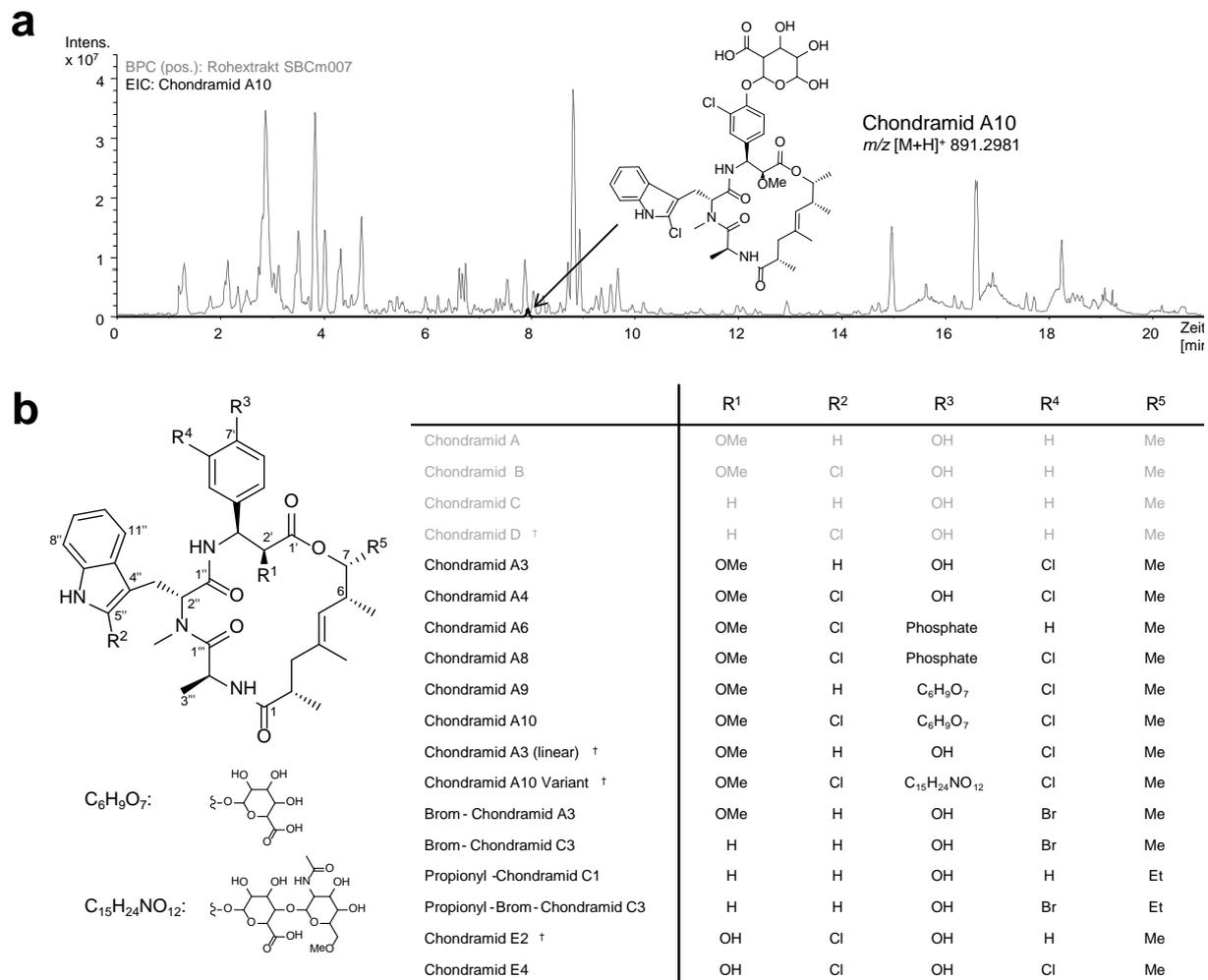


Abbildung 4.4: Charakterisierte neue Chondramid-Derivate aus Extrakten von SBCm007. (a) Überlagerung eines BPC (grau) des Rohextrakts von SBCm007 mit einem EIC (schwarz) der Masse von Chondramid A10. (b) Neue Chondramid-Derivate aus Extrakten von SBCm007. Die aufgelisteten Substanzen wurden chemisch charakterisiert und einem Bioaktivitätsscreening unterzogen (außer die mit einem † markierten), um Rückschlüsse bezüglich Struktur und Aktivität ziehen zu können. Die bereits beschriebenen Chondramide A-C wurden für einen Vergleich und zur Bestimmung der absoluten Konformation ebenfalls isoliert [Abb. aus 7].

Es konnte gezeigt werden, dass eine Halogenierung am Tyrosinrest, bei einer standardmäßigen chromatographischen Auftrennung, eine vergrößerte Retentionszeit im Vergleich zur gleichen Halogenierung am Tryptophan zur Folge hat. Durch diesen Befund ließen sich andere Strukturisomere ebenfalls charakterisieren. Die absolute Konfiguration des Chondramid A1 aus SBCm007 wurde anhand eines Vergleiches der chemischen Verschiebung der ¹H- und ¹³C-Atome, sowie der homonuklearen Kopplungskonstanten der Protonen, mit Daten zur Veröffentlichung der Totalsynthese von Chondramid A (A1) festgelegt [19]. Zusätzlich wurde die Retentionszeit des ursprünglich publizierten Chondramid A's mit der Retentionszeit des Analogs aus SBCm007 verglichen und als identisch bestimmt. Diese Kriterien wurden bei der Totalsynthese des Moleküls zur Identifizierung des korrekten Isomeres angewandt [19]. Die Ergebnisse legen nahe, dass die

Konfiguration der neuentdeckten Derivate, mit der Konfiguration des in der Literatur beschriebenen Chondramid A's, identisch ist. Der Glykosylrest am Tyrosinderivat (siehe Abbildung 4.4) besteht aus einer Glucuronsäure und einer zusätzlichen 2-(Acetylamino)-2-deoxy-6-O-methyl-hexopyranose. Für die Glucuronsäure konnte mittels Gaschromatographie und Derivatisierung mit *N*-Methyl-*N*-(trimethylsilyl)trifluoroacetamid (MSTFA) eine β -D-Konfiguration nachgewiesen werden (siehe Kapitel 8). Zur Konfigurationsbestimmung der Hexopyranose waren die aufgereinigten Mengen für eine Derivatisierung jedoch nicht ausreichend.

Im Gegensatz zur bioaktivitätsgeleiteten und massenspektrometrischen Identifizierung von Zielsubstanzen durch Fraktionierung mittels Flashchromatographie, war für die Aufreinigung der Chondramide eine Vorfraktionierung mittels Größenausschlusschromatographie vorteilhafter. Im Anschluss an diese folgte ein weiterer Aufreinigung durch semipreparative HPLC, was in den meisten Fällen zu Reinheiten über 95% führte.

Bei den neuen Derivaten war vor allem die Halogenierung am C6' der Aryleinheit interessant, welche im Originalproduzenten *Chondromyces crocatus* nicht auftritt. In diesem findet nur eine Halogenierung am C4'' des Tryptophans, durch die Tryptophan-2-Halogenase CmdE statt [22]. Diese Halogenierung der neuen Chondramid Derivate A3, A4, A8, A9, A10 und E4 wird vermutlich durch eine zusätzliche Halogenase verursacht. Diese Vermutung stützt sich auf den Befund, dass sich ein zweites Gen, mit hoher Ähnlichkeit der resultierenden Proteinsequenz zu bekannten Halogenasen, in direkter Nachbarschaft des Biosynthesegenclusters befindet (Daten nicht gezeigt).

Durch Fütterungsexperimente mit Kaliumbromid konnten zudem an C6' bromierte Varianten erzeugt werden, was auf eine erweiterte Spezifität der zweiten Halogenase hinsichtlich ihres Substrates hindeutet. Dies konnte schon für andere Halogenasen bezüglich des Einbaus von Brom in Naturstoffe gezeigt werden [23, 24]. Eine Bromierung trat nur an C6' auf und nicht an C5'' und es konnten keine chlorierten und gleichzeitig bromierten Derivate nachgewiesen werden (Siehe Abbildung 4.4b).

4.2.3 BIOLOGISCHE EVALUIERUNG DER NEUEN CHONDRAMID DERIVATE

Von den insgesamt 14 charakterisierten Chondramid-Derivaten, waren 11 in ausreichender Menge verfügbar, um umfassendere Untersuchungen hinsichtlich ihrer Bioaktivität durchführen zu können. Diese 11 Derivate deckten alle strukturellen Untereinheiten ab, so dass Rückschlüsse, bezüglich des Einflusses des jeweiligen Substituenten auf die Aktivität möglich waren. Zellbasierte Assays zeigten, dass Chondramid E4 eine um den Faktor 10 reduzierte Aktivität gegenüber Chondramid B aufweist. Die glykosylierten Derivate Chondramid A9 und A10 zeigten kaum noch Aktivität. Andere Derivate wiesen eine ähnlich

starke Aktivität wie die bekannten Chondramide auf. Die höchste Aktivität konnte jedoch für die zwei bromierten Analoga Brom-Chondramid C3 und Propionyl-Brom-Chondramid C3 gezeigt werden. Diese war um den Faktor 3,5 und 2 höher, als die der Chondramide A-D. Interessant ist jedoch, dass bei Verwendung von HUVEC (Primärzellen) und MRC5-Zellen (Wildtypzellen) die Toxizität dieser Derivate, gegenüber den bekannten Chondramiden, um den Faktor 2-4 reduziert war (Siehe Abbildung 4.5A).

Um herauszufinden, ob dieses veränderte Aktivitätsmuster und die Aktivitätsverluste eine Folge von verminderter Aufnahme sind oder durch eine veränderte Bindung an Aktin verursacht werden, wurden *in vitro*-Versuche mit Pyrenaktin aus Hasenmuskelzellen durchgeführt [25]. Eine genaue Beschreibung und Durchführung des kommerziellen Assays befindet sich in Kapitel 8 „Material und Methoden“. Abbildung 4.5b zeigt die hierbei gemessene Fluoreszenzzunahme, durch eine mit 20 μ M Chondramid induzierte Aktinpolymerisation, im zeitlichen Verlauf. Hier wird deutlich, dass Chondramid A9 so gut wie keine Polymerisation hervorruft, während das zweite glykosylierte Derivat Chondramid A10 einen leichten Anstieg der Fluoreszenz erzeugt. Den stärksten Effekt auf die Aktinpolymerisation zeigen die Referenzchondramide A und B, welche einen miteinander vergleichbaren zeitlichen Verlauf der Fluoreszenzintensität erzeugen. Die niedrigere Aktivität von Chondramid E4 in zellfreien Assays kann wahrscheinlich teilweise durch die schwächere Polymerisation des Aktins *in vitro* erklärt werden. Die Chondramide A3, A6, A8 und Propionyl-Chondramid C1, zeigen eine signifikant reduzierte Polymerisationsinduktion, obwohl die gemessenen GI_{50} -Werte vergleichbar mit denen von Chondramid A-C sind.

Chondramid A4 erzeugt einen ähnlichen Verlauf der Fluoreszenzintensität wie die Referenzchondramide. Interessanterweise weisen die Chondramidvarianten Brom-Chondramid C3 und Propionyl-Brom-Chondramid C3 hinsichtlich einer Aktinpolymerisation nur relative geringe *in vitro*-Aktivitäten auf, obwohl sie die höchsten Aktivitäten bezüglich einer Krebszellinhibierung zeigten. Brom-Chondramid A3 erreicht *in vitro* ähnliche Werte wie die Referenzsubstanzen und ist in der Lage Aktin sehr schnell zu polymerisieren. Propionyl-Brom-Chondramid C3 weist hingegen die niedrigste Polymerisationsrate der bromierten Varianten auf, trotz der höchsten Aktivität auf Krebszelllinien.

Bindungsstudien mit Jasplakinolid [9] bzw. Chondramid [10] und fluoreszenzmarkiertem Phalloidin zeigten eine kompetitive Verdrängung des Phalloidins vom Aktin nach Zugabe der Cyclodepsipeptide, was auf eine gemeinsame Bindetasche hindeutet. Basierend auf Röntgendiffraktionsdaten eines relativ niedrig aufgelösten Aktinkristalls mit co-kristallisiertem Phalloidin, konnte die ungefähre Position des Phalloidins an der Schnittstelle dreier Aktinuntereinheiten bestimmt werden.

a GI ₅₀ -Werte [nM]	HCT -116	U-2 OS	KB -3.1	KB -V.1	L-929	MRC5	HUVEC
Chondramid A	48.9 " 14.6	27.1 " 4.1	50.5 " 15.4	38.0 " 10.5	90.9 " 11.8	63.8 " 13.0	43.7 " 7.0
Chondramid B	30.1 " 9.5	20.8 " 1.9	40.7 " 9.4	56.4 " 9.1	80.8 " 13.6	20.9 " 3.2	30.7 " 2.9
Chondramid C	33.7 " 3.2	25.6 " 1.2	36.8 " 6.8	85.8 " 14.9	87.3 " 14.9	26.1 " 4.7	34.0 " 3.7
Chondramid A3	28.6 " 3.9	46.7 " 6.5	63.5 " 12.6	85.7 " 1.4	72.8 " 3.6	38.0 " 2.8	50.5 " 5.6
Chondramid A4	44.4 " 1.6	26.4 " 2.2	56.8 " 7.0	83.1 " 1.6	67.6 " 9.8	12.7 " 1.4	52.5 " 7.4
Chondramid A6	60.9 " 3.5	51.6 " 4.6	49.3 " 7.6	23.1 " 1.5	44.6 " 5.5	25.9 " 1.5	67.7 " 10.4
Chondramid A8	49.3 " 7.6	33.2 " 3.4	13.4 " 3.0	58.1 " 4.0	56.2 " 12.5	7.6 " 4.7	24.05 " 7.9
Chondramid A9	n.a.	n.a.	n.a.	s.a.	s.a.	n.a.	n.a.
Chondramid A10	n.a.	n.a.	s.a.	s.a.	n.a.	n.a.	s.a.
Brom - Chondramid A3	42.9 " 3.2	37.7 " 2.8	74.5 " 14.2	11.2 " 0.4	69.4 " 1.5	44.5 " 4.9	32.7 " 2.9
Brom - Chondramid C3	17.7 " 1.3	4.8 " 1.7	46.8 " 6.5	23.8 " 2.1	14.0 " 1.4	57.7 " 3.5	44.4 " 7.0
Propionyl - Chondramid C1	42.1 " 3.2	15.1 " 1.1	56.3 " 9.6	22.7 " 8.3	30.0 " 7.7	71.9 " 4.1	54.6 " 5.5
Propionyl - Brom - Chondramid C3	17.2 " 1.6	9.0 " 0.6	38.0 " 6.5	31.9 " 2.0	23.0 " 2.1	129.8 " 3.7	50.2 " 5.6
Chondramid E4	378.8 " 30.2	351.9 " 30.6	627.2 " 122.5	251.5 " 79.1	554.8 " 81.6	479.7 " 63.6	207.4 " 26.4

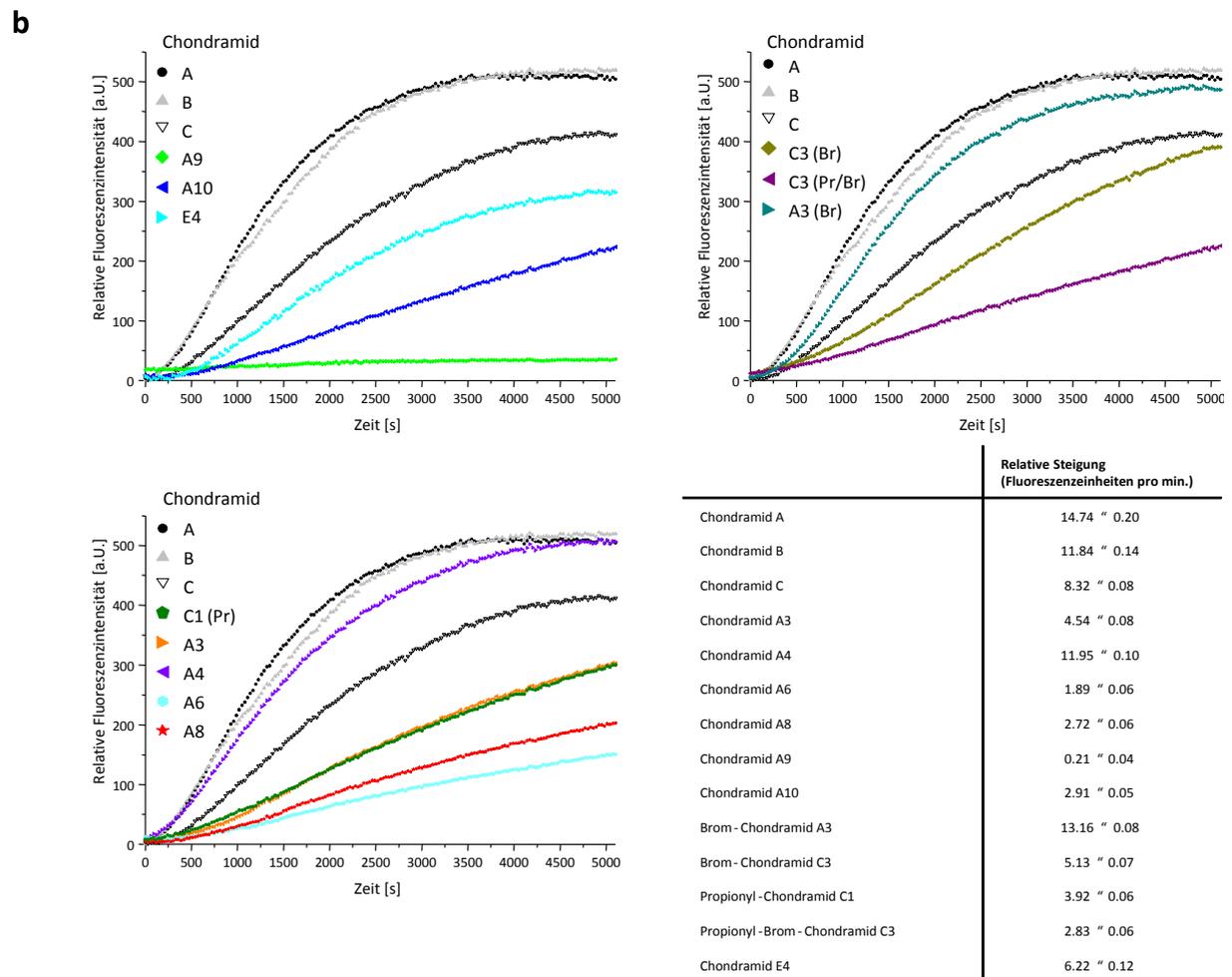


Abbildung 4.5: Biologische Evaluierung der neuen Chondramid Derivate. (a) Übersicht der Resultate aus Wachstumsinhibierungsexperimenten mit HCT-116-, U-2 OS-, KB-3.1-, KB-V.1-, L-929-, MRC5-Zellen und HUVEC (die beiden letzteren sind keine Krebszelllinien). Die GI₅₀-Werte repräsentieren den Mittelwert aus zwei Experimenten. n.a. bedeutet nicht aktiv bis 10 μ M, s. a. schwach aktiv im Bereich 5-10 μ M. (b) Induktion der G-Aktin-Polymerisation durch Chondramide bei „Nichtpolymerisationsbedingungen“. Die Derivate wurden anhand ihrer Aktivität in Wachstumsinhibierungsexperimenten gruppiert. Jedes Derivat wurde in einer Endkonzentration von 20 μ M zu einem Pyrenaktin Ansatz (5 μ M) zugegeben. Die Fluoreszenzintensität wurde alle 30 s für 85 min bei 37°C und 405 nm (Anregung 360 nm) gemessen. Die Kurven repräsentieren zwei unabhängige Experimente, die Steigung wurde dem linearen Teil der Kurven, bevor eine Sättigung erreicht ist, entnommen [Abb. aus 7].

Anhand virtueller Studien wurde, aufgrund der räumlichen Anordnung möglicher Bindungsstellen im Phalloidinmolekül, ein Vorschlag für eine hypothetische Phalloidinbindetasche gemacht. Basierend auf diesem Vorschlag und der Tatsache, dass Chondramide und Phalloidin um diese Bindestelle konkurrieren, wurden virtuelle Ähnlichkeitsstudien mit Chondramid C durchgeführt. Dabei konnte gezeigt werden, dass das Chondramid C-Molekül Konformationen einnehmen kann, die Wechselwirkungen mit denselben Bindestellen erlauben, die Phalloidin für seine vorgeschlagene Bindung an das Aktin benötigt [11, 12, 26].

Eine Überlagerung von Chondramid C in diesem Modell (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. H. D. Arndt) mit zwei bromierten Analoga zeigte, dass das Bromatom an C6' aufgrund sterischer Hinderung nicht gut in diese Bindetasche passt (siehe Abbildung 4.6). Die Methoxygruppe an R¹, die in allen A-Analoga vorhanden ist, scheint kaum mit Aktin in Kontakt zu kommen und der Ethylrest an R⁵ scheint eine Bindung in dieser Tasche ebenfalls nicht zu behindern. Dies bestätigt teilweise die *in vitro*-Versuche, da die Aktinpolymerisation durch die Bromierung herabgesetzt wird, steht aber auch im Gegensatz zu dem Ergebnis, dass die Ethylgruppe an C7 die Polymerisationsaktivität im Vergleich zum Chondramid C1 erheblich vermindert. Der Vergleich von Brom-Chondramid A3 und Brom-Chondramid C3 zeigt einen erheblichen Verlust an Polymerisationsaktivität des letzteren, obwohl lediglich die Methoxygruppe an R¹ dafür verantwortlich sein kann. Dies deutet möglicherweise auf eine zusätzliche Bindungsstelle im Aktinpolymer hin, die durch Modellierung mit Chondramid C (C1) nicht erkannt wurde, da in diesem keine Methoxygruppe an R¹ vorhanden ist.

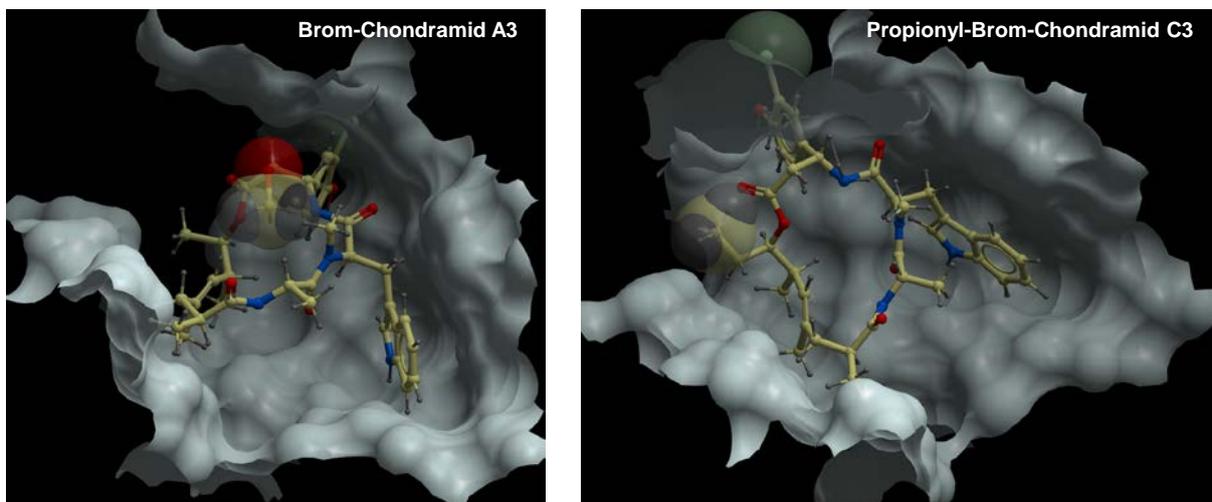


Abbildung 4.6: Austausch von Chondramid C mit zwei bromierten Analoga im Modell der vorgeschlagenen Bindetasche im F-Aktin. Dargestellt ist die vorgeschlagene Phalloidinbindetasche im Aktinkristall (erhalten von Prof. Dr. H. D. Arndt). Das ursprüngliche dargestellte Chondramid C wurde durch die beiden bromierten Analoga ausgetauscht, wobei die Konformation beibehalten wurde [Abb. aus 7].

4.3 DISKUSSION

4.3.1 HCS VERSUS TRADITIONELLES EXTRAKT-SCREENING

Das Potenzial von SBCm007 für die Produktion biologisch aktiver Substanzen wurde mittels eines Routinescreenings entdeckt. Die beobachtete Aktivität (eine außerordentlich hohe Zytotoxizität des Rohextrakts) konnte auf einen zytostatischen Effekt zurückgeführt werden, welcher eine Vergrößerung der Zellen sowie das Auftreten mehrerer Zellkerne hervorrief. Da das verwandte Bakterium *Chondromyces crocatus* Cm c5 bereits als Produzent verschiedener biologisch aktiver Substanzen beschrieben wurde [27], lag es nahe, eine Dereplikation der Metabolitenprofile mittels eines datenbankunterstützten Abgleichs von Massenspektrometriedaten durchzuführen [28]. Dieser Ansatz zeigte, dass die Extrakte die bereits beschriebenen Cyclodepsipetide Chondramid A-D enthielten [4]. Dadurch konnten die starke Zytotoxizität und die spezifischen morphologischen Veränderungen der Zellen, nach Behandlung mit dem Rohextrakt erklärt werden. Da hochtoxische Substanzen jedoch häufig die Identifizierung anderer interessanter Substanzen erschweren [29], wurde das Rohextrakt dieses Stammes mittels verschiedener HC-Assays untersucht, um verschiedene biologische Aktivitäten detektieren zu können. Diese Untersuchungen zeigten, dass zwei dominante Effekte vorhanden waren: zum einen die Polymerisation des Aktins und zum anderen eine Störung der lysosomalen Integrität. Durch verschiedene Fraktionierungen mittels Flashchromatographie und HPLC konnte gezeigt werden, dass der Effekt auf den lysosomalen pH-Wert nicht auf die bekannten Chondramide A-D zurückzuführen war.

Ein direkter Vergleich eines konventionellen Zytotoxizitätsscreenings mit HCS zeigte die Vorteile der bildbasierten Methode, welche wesentlich sensitiver bei gleichzeitig höherem Informationsgehalt war (siehe Abbildung 4.3). So konnte - mittels HCS - eine aktinpolymerisierende Aktivität aller Kieselgelfractionen mit mehr oder weniger starker Ausprägung gefunden werden. Diese wurde auch in Fraktionen detektiert, bei denen eine herkömmliche Tetrazoliumsalzreduktion bereits keine Aktivität mehr angezeigt hatte. Zusätzlich konnten Fraktionen identifiziert werden, die einen erhöhten lysosomalen pH-Wert bei den verwendeten Zellen hervorriefen. Dieser Effekt war reproduzierbar. Allerdings konnten die verursachenden Substanzen aufgrund ihrer geringen Mengen nicht isoliert und charakterisiert werden. Dies ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass Kultivierungsbedingungen gewählt wurden, die für die Produktion dieser Substanzen nicht ideal waren. Es werden derzeit Versuche durchgeführt um die Produktion dieser Substanzen zu verbessern. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass die Zusammensetzung der Gasphase, welche relativ leicht beeinflusst werden kann, einen erheblichen Einfluss auf die

Produktion von Chondramiden hat und für eine verbesserte Produktion verwendet werden kann [30].

Die Anwendung von HCS führte in diesem Fall zur Entdeckung von 30 neuen Naturstoffen. Diese konnten mittels MS und teilweise auch durch NMR charakterisiert werden und stellten sich als hochinteressante strukturelle Varianten von vier bereits beschriebenen Cyclodepsipeptiden heraus. Ein erfolgreiches Beispiel stellt z. B. die Aufreinigung des glykosylierten Chondramid-Derivates A10 dar (siehe Abbildung 4.4a), welches trotz seines geringen Vorkommens und der, im Vergleich zu den Chondramiden A-D, etwa 200-fach reduzierten Aktivität, mittels HCS als Zielsubstanz identifiziert werden konnte. Dies verdeutlicht den Vorteil, den HCS gegenüber einem konventionellen Zellviabilitäts-Screening bieten kann, da hier auch schwache Effekte, die beispielsweise durch MTT-Assays nicht mehr erfasst werden, detektiert und quantifiziert werden können. Eine Kombination dieser Methoden mit Methoden zur Produktionsoptimierung und Produktionsinduktion, sowie gesteigerte Sensitivität bei MS- und NMR-Geräten, werden in Zukunft weitere Hits und mit hoher Wahrscheinlichkeit auch neue chemische Strukturen aus Myxobakterien und anderen Produzenten liefern, die mit herkömmlichen Methoden bislang übersehen wurden.

4.3.2 BIOSYNTHESE UND SAR STUDIEN

Die strukturelle Vielfalt der neu entdeckten Chondramide wird wahrscheinlich durch einen Satz an verschiedenen Enzymen verursacht, die das Grundgerüst durch Phosphorylierung, Glykosylierung und Halogenierung modifizieren. Weiterhin scheint die Auswahl der Startereinheit, die bei der Polyketidbiosynthese verwendet wird, im Originalproduzenten auf Acetyl-CoA beschränkt zu sein [22]. Das analoge Enzym in SBCm007 scheint dagegen auch Propionyl-CoA verwenden zu können, wodurch die Variationen an R⁵ verursacht werden. Die unterschiedlichen Derivatisierungen scheinen unabhängig voneinander, durch die entsprechenden Enzyme, durchgeführt zu werden. Variationen treten jeweils in Kombination mit allen möglichen anderen Derivatisierungen an R¹-R⁴ auf. Die einzige Ausnahme bilden hier die Glykosylierungen an R³, diese werden nur beobachtet, wenn sich an R⁴ ein Halogenatom befindet. Varianten mit Zuckerresten ohne diese Derivatisierung konnten nicht nachgewiesen werden. Diese Tyrosin-Halogenase ist das erste literaturbeschriebene Enzym, das in der Lage ist, diese interessante Substanzgruppe an Position C6' entweder zu chlorieren oder zu bromieren. Dadurch könnte eine heterologe Expression dieses Enzyms im Original-Produzenten *Chondromyces crocatus* Cmc5, die gezielte Produktion einiger weniger, besonders interessanter Varianten ermöglichen, da dieser Stamm nur die vier in der Literatur beschriebenen Derivate produziert. Knockouts der bereits beschriebenen Tryptophanhalogenase in Cmc5 [22] sowie der noch nicht bekannten Oxidase die für die

Variation an R¹ verantwortlich ist, würden diese Zahl noch weiter reduzieren und es wäre möglich, spezifische Derivate die am Tyrosinrest halogeniert sind zu produzieren.

In zellbasierten Assays wiesen die Chondramide A1 und A2 aus SBCm007 Aktivitäten im niedrigen bis mittleren nanomolaren Bereich auf, die mit den Werten, die für die ursprünglichen Chondramide A und B beschrieben sind, übereinstimmen [4, 10]. Die Referenzchondramide A-D zeigten keine Spezifität gegen einzelne Zelllinien und sind im zweistelligen nanomolaren Bereich aktiv, sowohl gegen Krebszelllinien, wie die Multidrug-resistenten (MDR) KB-V.1, als auch gegen immortalisierte Zellen aus gesunden Geweben oder Primärzellen, wie z. B. HUVEC. Dies gilt ebenfalls für die meisten neu gefundenen Derivate. Eine Aktivitätsminderung um ca. den Faktor 10 wird im Falle eines Hydroxylrests an R¹ gemessen, welcher generell die Aktivität negativ zu beeinflussen scheint. Die glykosylierten Derivate waren im mikromolaren Bereich aktiv, wobei der Aktivitätsrückgang wahrscheinlich auf die voluminösen Zuckerreste zurückzuführen ist, die eine Bindung *in vitro* ebenfalls negativ beeinflussen. Die interessantesten Analoga stellten bromierte C3 Derivate dar, da diese deutlich aktiver auf Krebszellen als auf nicht entarteten Zellen waren. Diese bromierten Analoga sind außerdem noch zytotoxischer auf Krebszelllinien als alle anderen getesteten Derivate. Dies spiegelte sich allerdings nicht in den *in vitro* G-Aktin Polymerisationsversuchen wieder. Hier zeigte sich, dass bromierte Chondramid C3 Analoga eine sehr viel schwächere Polymerisation auslösten, was letztendlich zu der Vermutung führt, dass durch diese Derivate unter Umständen ein zweites Target angesprochen wird.

Ein direkter Vergleich der Aktivität mit dem Substitutionsmuster zeigte, dass voluminöse Gruppen, wie ein Glykosyl- oder Phosphatrest an C7' der Tyrosineinheit, generell die Aktivität in zellbasierten Tests herabsetzen. Diese Ergebnisse werden durch Beispiele aus der Literatur bestätigt [20, 21] und lassen sich teilweise auf die verringerte Permeabilität der eukaryotischen Zellmembran für polare Substanzen zurückführen. *In vitro*-Experimente zeigten jedoch, dass die Polymerisation des G-Aktins ebenfalls langsamer abläuft als bei den Referenzchondramiden A und B. Die beiden wichtigsten Derivatisierungen, hinsichtlich der verbesserten Spezifität, scheinen die Substitutionen an R¹ (Halogenierung) und R⁵ (Ethylrest) zu sein (siehe Abbildung 4.7a, grüne Markierung). Abbildung 4.6 zeigt zwei Ansichten der hypothetischen Bindetasche des Chondramid C's, in denen dieses mit Propionyl-Brom-Chondramid C3 bzw. Brom-Chondramid A3 ausgetauscht ist. Die bromierte C3 Variante weist das interessante GI₅₀-Muster, mit verringerter Aktivität gegen Primärzellen und erhöhter Aktivität gegen Krebszelllinien, auf (siehe Abbildung 4.5a). Dies korreliert mit einer niedrigeren Polymerisationsinduktion *in vitro*. Ähnliche Ergebnisse werden erzielt, wenn nur eine der Variationen (Bromierung oder Ethylrest) vorhanden ist. Dies kann durch eine mögliche Abschwächung der Aktinaffinität, einer Vergrößerung der Affinität für ein zweites Target, oder einer Kombination aus beidem hervorgerufen werden.

Die Existenz eines zweiten Targets erscheint ebenfalls plausibel, wenn man das Aktivitätsmuster von Brom-Chondramid A3 untersucht. Die Anwesenheit der Methoxygruppe an Position R¹, die den einzigen Unterschied zu Brom-Chondramid C3 darstellt, hebt die Polymerisationsrate *in vitro* auf das Niveau der Referenzchondramide an (siehe Abbildung 4.5b). Dies zeigt, dass die Aktinpolymerisation durch die Bromierung generell nicht behindert wird. Die Ergebnisse deuten eher darauf hin, dass die Bromierung die Aktinbindung nicht beeinflusst, jedoch für eine Krebszellspezifität ausschlaggebend ist. Interessanterweise zeigt Chondramid A3, der chlorierte Gegenpart zu Brom-Chondramid A3, im *in vitro*-Versuch eine sehr viel schwächere Affinität zum G-Aktin als die bromierte Variante. Leider konnte nicht genug der Chondramid C3 Variante aufgereinigt werden, um zu untersuchen ob das Fehlen der Methoxygruppe diese Affinität noch weiter herabsetzt. Bei den glykosylierten Varianten A9 und A10 konnte gezeigt werden, dass eine Halogenierung an R² die G-Aktin Affinität, im Vergleich zur nicht halogenierten Variante, erheblich steigert. Derselbe Effekt kann für die Chondramide A3 und A4 beobachtet werden, bei der die Chlorierung an R² die Polymerisationsrate noch weitaus drastischer erhöht.

Generell lässt sich sagen, dass die Anwesenheit eines Chloratoms an Position R² die G-Aktin-Polymerisation beschleunigt. Durch eine einfache Oxidation, mittels DMSO und HCl, konnte das Tryptophan im Chondramid A nahezu quantitativ zum Oxinolyalanin oxidiert werden, ohne das Chondramidgerüst zu zerstören [31]. Dadurch wurde ein Carbonylrest an C5“ eingeführt und ein Wasserstoffatom an C4“. Die beiden dabei entstehenden Stereoisomere waren im Vergleich zum Chondramid A 3-fach weniger Aktiv. Weitergehende Untersuchungen werden zeigen ob dieser Aktivitätsverlust durch eine verringerte Aktinaffinität verursacht wird. Da diese Derivate noch nicht *in vitro* getestet wurden, müssen diese Resultate mit Vorsicht betrachtet werden. Die Ergebnisse der Zellbasierten Studien deuten jedoch darauf hin, dass der Tryptophanrest bei der Aktinbindung eine wichtige Rolle spielt. Unterstützt wird diese Annahme durch das hypothetische Bindungsmodell des Chondramid C's in welchem der Tryptophanrest, durch unpolare Wechselwirkungen mit einem Tyrosin- und einem Phenylalanin im Aktin, eine Bindung zu diesem zu verursachen scheint [12, 20].

Unter Berücksichtigung dieser Faktoren, könnte ein Austausch des Tryptophans gegen eine andere Aminosäure sinnvoll sein, um die Aktinaffinität herabzusetzen. Möglicherweise bliebe die Affinität zu einem zweiten Target davon unbeeinträchtigt. Die in Abbildung 4.7a grün markierten Bereiche im Chondramid-Grundgerüst, die anhand der Ergebnisse möglicherweise essentiell für die Erhöhung der Krebszellspezifität sind, liegen zumindest an anderer Stelle im Molekül. Die Anwesenheit der Methoxygruppe an R¹ scheint ebenfalls die Aktinaffinität zu erhöhen. Chondramid C-Varianten, die ein Wasserstoffatom an dieser Stelle besitzen, scheinen eine höhere Affinität zum hypothetischen zweiten Target zu besitzen.

Eine Hydroxygruppe an R¹ scheint die Aktivität generell zu reduzieren. Variationen an R³ scheinen, wenn die Substituenten sterisch anspruchsvoller sind, einen negativen Einfluss auf beiderlei Aktivität zu haben.

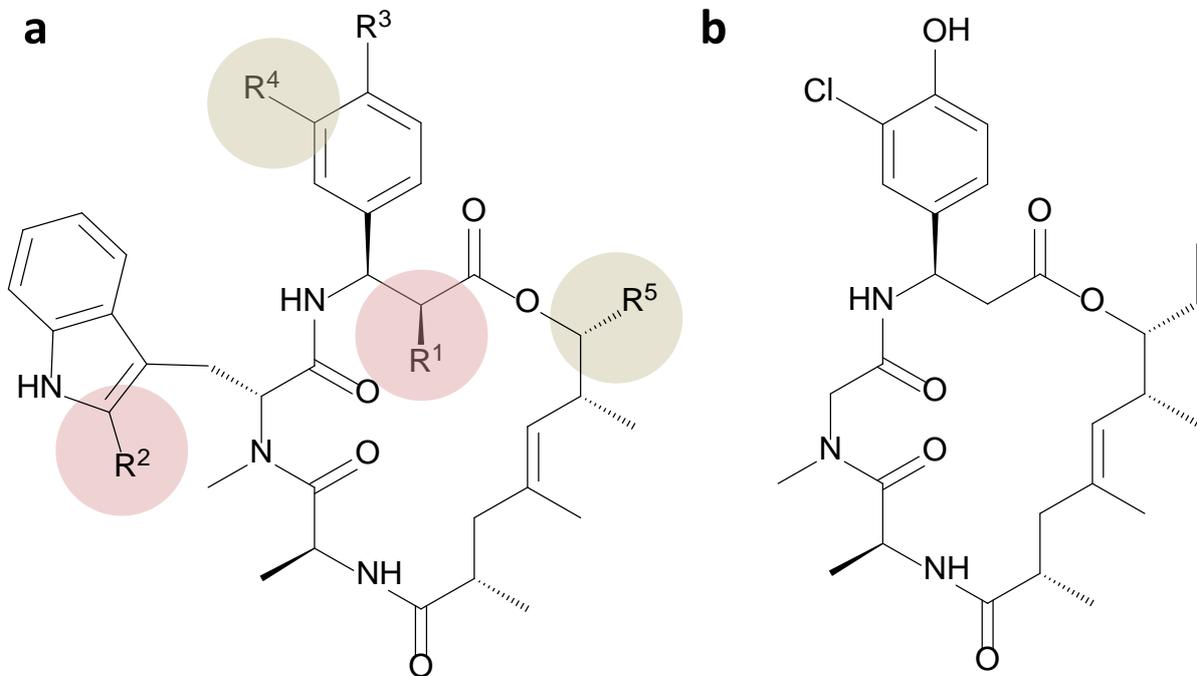


Abbildung 4.7: Chondramid-Gerüst mit markierten Positionen im Molekül, die eine Aktinbindung positiv beeinflussen sowie Positionen, die ausschlaggebend für eine spezifischere Toxizität auf Krebszellen sind. (a) Die roten Markierungen deuten an, welche Positionen für eine Aktinbindung besonders wichtig sind. Die grünen Markierungen zeigen an, welche für eine Bindung an ein potentielles zweites Target wichtig zu sein scheinen. (b) Diese Struktur stellt die Basis für ein möglicherweise spezifischer aktives Grundgerüst dar, welches aufgrund der Resultate verschiedener *in vivo* und *in vitro* Versuche entwickelt wurde (siehe Text).

Variationen an R⁴, wie eine Bromierung, scheinen sich positiv auf die Krebszellspezifität auszuwirken. Dieser Effekt kann allerdings durch die Methoxygruppe an R¹ vollständig aufgehoben werden, wie im Falle des Brom-Chondramid A3's gezeigt wurde. Eine Chlorierung anstelle einer Bromierung an R⁴, kann die *in vitro*-Aktinaffinität von Brom-Chondramid A3 jedoch drastisch reduzieren, wie im Falle des Chondramid A3's gezeigt werden konnte. Dies deutet möglicherweise darauf hin, dass kleinere Halogenatome, wie Chlor oder Fluor, an dieser Position vorteilhaft sein könnten. Die Substitution des Methylrestes an Position R⁵ mit einem Ethylrest scheint die Affinität zum G-Aktin zu erniedrigen, hat allerdings kaum Auswirkungen auf die Zytotoxizität gegenüber Krebszelllinien. Nicht entartete Zellen scheinen hingegen weniger sensitiv auf dieses Derivat zu reagieren. Dies macht R⁵ möglicherweise zu einem Ansatzpunkt für weitere

Derivatisierungen, wie z. B. längere Alkylketten. Der Aufbau des PKS-Teils des Moleküls scheint ebenfalls wichtig zu sein. Aktivitätsstudien mit synthetisch erzeugten Molekülen, die einen nicht-methyliertem PKS-Teil enthielten, zeigten erheblich geringere Bioaktivitäten (Daten nicht gezeigt). Ein erster Vorschlag für ein verbessertes Molekül, hinsichtlich eines möglichen *Off-Targets*, basierend auf diesen Ergebnissen, ist in Abbildung 4.7b dargestellt und könnte als Ansatzpunkt für weitere Versuche und Derivatisierungen bzw. Synthesen dienen.

4.3.3 VORTEILE EINES KOMBINIERTEN OPTIMIERUNGS- UND HCS-ANSATZES

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen deutlich die Vorteile eines HC-Screenings gegenüber einem herkömmlichen zellviabilitäts-basierten Ansatz. Obwohl der Arbeitsaufwand höher ist, können spezifische Effekte quantifiziert werden (beispielsweise anhand einer Antikörperfärbung), selbst wenn diese noch nicht zu einer Reduktion der Zellviabilität führen. Dadurch sind auch Auswirkungen auf Zellen detektierbar, welche mittels Tetrazoliumsalzreduktion übersehen werden (siehe Abbildung 4.3). Mittels HCS können bereits im Rohextrakt unterschiedliche Effekte gezeigt werden. Dies kann u. a. als Entscheidungshilfe für eine weitere Bearbeitung eines Extraktes dienen, wenn mittels massenspektrometrischer- und datenbankunterstützter Dereplikation angezeigt wird, dass zytotoxische- oder andere biologische Effekte möglicherweise durch bekannte Substanzen hervorgerufen werden. Zusätzlich können bei einer Auftrennung eines Extraktes, Effekte spezifischen Massen zugeordnet werden und dadurch die Dereplikation unterstützen. Unter Umständen können so auch Hinweise geliefert werden, ob Derivate bekannter Substanzen in den Extrakten vorhanden sind.

Obwohl diese Studie letztendlich keine neue Substanzklasse lieferte, konnten zwei unterschiedliche toxische Effekte nach Behandlung mit Extrakten von SBCm007 nachgewiesen werden. Da die produzierten Mengen jedoch nicht ausreichend für eine Aufreinigung beider Substanzklassen waren, konnte nur gezeigt werden, dass eine prinzipielle Anwendung möglich ist. Es besteht jedoch die Möglichkeit diese Tests an weiteren Fraktionen durchzuführen, die mittels der in den Kapiteln 2 und 3 beschriebenen Methoden erzeugt wurden. Diese weisen teilweise erhebliche Unterschiede in der Zusammensetzung der einzelnen Metabolite auf, wodurch die Chance besteht, Fraktionen mit größeren Mengen der noch nicht charakterisierten Substanzklasse zu identifizieren. Dahingehende Versuche werden derzeit durchgeführt.

Abgesehen davon konnten jedoch, unterstützt durch HCS, Derivate bereits beschriebener Cyclodepsipeptide in den RBK-Extrakten identifiziert und aufgereinigt werden, welche während eines konventionellen Screenings wahrscheinlich nicht entdeckt worden wären.

Unterstützt durch hochaufgelöste sensitive Massenspektrometrie und kryoprobenunterstützte NMR bei Magnetfeldstärken von 17,6 Tesla (700 Mhz), reichen selbst geringste Substanztiter von unter 1 mg/l, um Aktivitäten in Rohextrakten zu detektieren, Targetmassen zu identifizieren und diese nach einer Aufreinigung zu charakterisieren. Die Charakterisierung weniger Derivate war im vorliegenden Beispiel z. B. ausreichend, um Rückschlüsse auf mögliche Analoga schließen zu können und diese in den aufgezeichneten MS-Daten der RBK zu suchen. Dadurch konnten hypothetische Derivate massenspektrometrisch verifiziert werden. Für einen endgültigen Beweis war es jedoch nötig, von jeder möglichen Variante zumindest einen Vertreter aufzureinigen und chemisch zu charakterisieren.

Durch Variationen in den Kultivierungsbedingungen (siehe Kapitel 2 und 3) konnten Parameter identifiziert werden, welche für die Chondramid-Produktion relevant sind. Dadurch konnten ausreichende Mengen der benötigten Chondramid-Varianten produziert werden, um eine chemische und biologische Charakterisierung zu ermöglichen. Die herausgearbeiteten Struktur-Aktivitätsbeziehungen bieten Ansatzpunkte für weitere Modifikationen des Chondramidgrundgerüsts, welche aufgrund der bereits etablierten Syntheserouten für diese Molekülgruppe realisierbar sein dürften. Weiterführende Arbeiten in dieser Hinsicht sind geplant.

5 KONTINUIERLICHE PRODUKTIONSPROZESSE

5.1 HINTERGRUND

Prinzipiell besteht bei entsprechender Ausstattung eines Bioreaktors die Möglichkeit, diesen nicht nur im *Batch*-Betrieb zu betreiben, sondern Mikroorganismen auch kontinuierlich zu kultivieren. Dafür werden allerdings verschiedene Zusatzgeräte benötigt, die nicht standardmäßig an den Geräten vorhanden sind. Dazu gehören u. a. Pumpen für Fütterung und Überstandsentsorgung, eine Sensorik für die Füllstandshöhe und die Möglichkeit einen sterilen Feed zu realisieren bzw. verschiedene Pumpen um Verdünnung mittels Wasser und Feed getrennt zu realisieren. Vergleicht man *Batch*-, *Fed-Batch*- und kontinuierliche Prozesse so wird deutlich, dass jede dieser Betriebsvarianten Vor- und Nachteile hat [1]. Ein kurzer Überblick ist in Tabelle 5.1 dargestellt.

Tabelle 5.1: Vor- und Nachteile verschiedener Betriebsmodi von Rührkesselreaktoren*

Betriebsart	Vorteile	Nachteile
<i>Batch</i>	Vielfältig: Kann für unterschiedliche Anforderungen verwendet werden	Hohe Kosten, erfahrener Techniker ist nötig (gilt für alle Operationsmodi).
	Sicher: Leicht zu sterilisieren, aufgrund kurzer Betriebszeit relativ sicher gegen Infektionen und Mutationen des Produzenten	Hoher Zeit und Arbeitsverlust durch Befüllungs-, Ernte- und Sterilisationszeiten.
	Eine komplette Substratumsetzung ist möglich	Häufige Neubefüllung bedeutet jedes Mal Kontaminationsrisiko
	Einfache Handhabung	
	Häufig ausreichend für bestimmte Fragestellungen	
Kontinuierlich bei „ <i>steady state</i> “	Unabdingbar, wenn die Produktion durch Katabolismus unterdrückt ist	Spontane Mutation des Produzenten aufgrund langer Kultivierungszeiten
	Automatisierung kann einfach sein	Komplexer Aufbau, erfahrener Techniker nötig
	Konstante Produktqualität	Kontaminationen
	Kann Vorteile der <i>Batch</i> - und kontinuierlichen Operation vereinigen	Kontinuierliches <i>Downstream-Processing</i> ist häufig aufwändig
<i>Fed-Batch</i>	Einfache Kontrolle und Optimierung eines definierten Produktionskriteriums	Wie <i>Batch</i> -Betrieb

* Teilweise aus [1]

Diese Auflistung ist unvollständig und soll lediglich eine grundlegende Einschätzung ermöglichen, wo die jeweiligen Vor- und Nachteile einer Kultivierungsform liegen können. Bezüglich spezieller Aspekte, die ausschließlich von den Ansprüchen des verwendeten Organismus abhängen, wird auf weiterführende Literatur verwiesen [1, 2], eine detaillierte Ausführung würde an dieser Stelle jedoch den Rahmen sprengen. Aufgrund des langsamen Wachstums und der geringen Produkttiter, die mit Myxobakterien assoziiert sind (siehe Kapitel 2 „*Repeated-Batch*-Verfahren für ein Wirkstoffscreening mit Prozessverbesserung“), können hinsichtlich der Ausbeuten jedoch einige der genannten Faktoren ausschlaggebend für die Wahl eines kontinuierlichen Prozesses sein, da unter Umständen nur so die effektive Produktion einer gewünschten Substanz möglich ist.

Durch Anwendung kontinuierlicher Prozesse kann, für konstitutiv produzierte Substanzen, eine konstante Produktion über längere Zeiträume realisiert werden. Dadurch entfallen die Zeiten, die für eine Präparation der Vorkultur und des Bioreaktors benötigt werden. Diese Prozesse können zudem im 10-50 l Maßstab stattfinden, was im Vergleich zu großen 100-1000 l *Batch*-Prozessen einfacher handhabbar ist. Zur Realisierung solcher Projekte müssen jedoch weitere Faktoren bedacht werden. So ist beispielsweise eine kontinuierliche Abreicherung der Metabolite aus dem Überstandes nötig, damit diese später effektiv aufgereinigt werden können. Eine direkte Addition des Adsorberharzes zur Kultur ist nicht sinnvoll, da im laufenden Betrieb eine Separation des Harzes von der Biomasse schwierig zu realisieren ist. Dies hätte zur Folge, dass die Kapazität des Harzes die Kultivierungsdauer bestimmt. Da eine Extraktion von Suspensionen über gepackte XAD16 Säulen, aufgrund von Verstopfung der Säulen, nicht möglich war, mussten andere Lösungen gefunden werden. Eine mögliche Alternative hierzu ist die *Expanded Bed*-Chromatographie (EBC), die dem Verblocken vorbeugt und die suspendierten Zellen und die Medienbestandteile vom Adsorberharz zu trennen vermag [3]. Bei nichtsuspendiert wachsenden Organismen führt eine Klumpengröße ähnlich den XAD16 Partikeln allerdings zu weiteren Problemen. Da die Zellpellets ein ähnliches Sedimentationsverhalten wie das XAD aufweisen, können sie nicht mehr kontinuierlich von diesem getrennt werden. Abhilfe könnte in diesem Fall eine Vorklärung des Überstands durch Zellrückhaltung bieten, eine bei Kultivierungen mit langsam wachsenden Säugerzellen häufiger praktizierte Methode [4].

Für die Etablierung kontinuierlicher Prozesse muss in der Regel jeder Fall einzeln betrachtet, untersucht und an die speziellen Anforderungen des jeweiligen Organismus' angepasst werden. Aus diesem Grund stellte sich die Frage, ob einige generelle Lösungen erarbeitet werden können, die hilfreich bei der Untersuchung der Rentabilität eines Prozesses dieser Art sind. Hierfür wurden einige technische Modifikationen der bestehenden Anlage benötigt, die eine konstante Medienversorgung, Abreicherung von Sekundärstoffen aus dem Überstand, verschiedene Verdünnungsraten, Zellrückhaltung und Zellhomogenisierung

ermöglichten. Zur Untersuchung dieser Faktoren wurden zunächst einige temporäre Lösungen realisiert (siehe Abschnitt 5.2.1). Diese erlauben jedoch eine direkte Umsetzung, durch Herstellung benötigter Bauteile aus entsprechenden haltbaren Materialien. Der Einsatz dieser Konstruktionen ist anhand zweier Testkultivierungen dargestellt. Diese wurden durchgeführt, um exemplarisch zwei Problemstellungen mittels entsprechender Apparaturen zu lösen und dadurch zu untersuchen, in welche Richtung eine Prozessentwicklung gehen könnte. Diese Versuche stellen jeweils Testkultivierungen dar, die zur Evaluierung der entsprechenden Konstruktionen dienen. Hierbei handelt es sich jedoch nicht um optimierte Prozesse.

5.2 ERGEBNISSE

5.2.1 TESTKONSTRUKTIONEN

Eines der wichtigsten Probleme, das gelöst werden musste, war die konstante Versorgung mit Nährstoffen. Dies lässt sich durch autoklavierbare Medienbehälter mit sterilen Steckverbindungen ermöglichen, stellt aber ein Problem dar, wenn das verwendete Medium Schwebeteilchen enthält, die sedimentieren können. Diese sinken teilweise im Steigrohr des verwendeten Medienbehälters ab, da der Behälter zwar gerührt werden kann, dies jedoch nicht zur Durchmischung innerhalb des Steigrohrs führt. Zur Lösung dieses Problems wurde der Medienbehälter mit unsterilem deionisiertem Wasser gefüllt. Dieses wurde während der Zulieferung zum Bioreaktor, mittels doppelter Sterilfiltration, keimfrei gemacht. Diesem Strom wurde nach der Filtration ein steriles, Medienkonzentrat hinzugefügt. Dies hatte den Vorteil, dass Schwebeteilchen im konzentrierten und dadurch viskoserem Medium nicht mehr in den Zuleitungen sedimentierten. Durch die Vermischung mit dem konstant eingeleiteten Wasser wurde das Konzentrat passend verdünnt. Dadurch konnten hohe lokale Nährstoffkonzentrationen innerhalb des Bioreaktors, die bei einer direkten Zuleitung des Konzentrates die Folge wären, vermieden werden. Ein weiterer Vorteil war, dass dadurch keine großen Volumina autoklaviert werden mussten, was Zeit- und Energieeinsparungen bedeutete. Die Verdünnungsrate kann in dieser Konstellation getrennt von der Fütterungsrate eingestellt werden, wodurch unterschiedliche Einstellungen dieser beiden Parameter getestet werden können. Dies spielt speziell bei unbekanntem Prozessen eine Rolle, wenn die betreffenden Parameter noch nicht angepasst wurden.

Ein weiteres Problem stellte die kontinuierliche Abreicherung von Sekundärstoffen aus dem Kulturüberstand dar. Die häufig für Proteinaufkonzentration aus Zellsuspensionen verwendete *Expanded Bed*-Chromatographie hat den Nachteil, dass bedingt durch Säulendurchmesser und Materialeigenschaften des verwendeten Adsorbens nur definierte

Flussraten verwendet werden können. Andernfalls kommt es zu einer Sedimentation oder einem Ausspülen des Materials. Dies bedeutet, dass die Anforderungen an das Säulenmaterial sehr hoch sind, da eine einheitliche Sphärengröße gewährleistet sein muss, um unterschiedliche Sedimentationsgeschwindigkeiten zu vermeiden. Bei den herkömmlichen Adsorberharzen, die für eine Metabolitabreicherung verwendet werden, ist das in der Regel nicht gewährleistet. Diese bestehen meist aus einem Gemisch aus unterschiedlichen Partikelgrößen. Einen Ansatz zur Lösung dieses Problems stellte die Anwendung eines *Cell-Roll-Systems* der Firma Integra Biosciences dar (siehe Abbildung 5.1). In eine liegende, gerollte, vom Überstand durchflossene Flasche wurde das Adsorberharz eingefüllt. Innerhalb der Flasche findet die Sedimentation im rechten Winkel zur Fließrichtung statt und nicht entgegengesetzt zu dieser wie bei der EBC. Dadurch wird das Problem des Ausspülens oder Sedimentierens des Harzes, bei nicht angepassten Flussraten, umgangen. Das XAD wird nur vom Überstand überspült, während die Durchmischung durch die Rollbewegung erzeugt wird (siehe Abbildung 5.1).

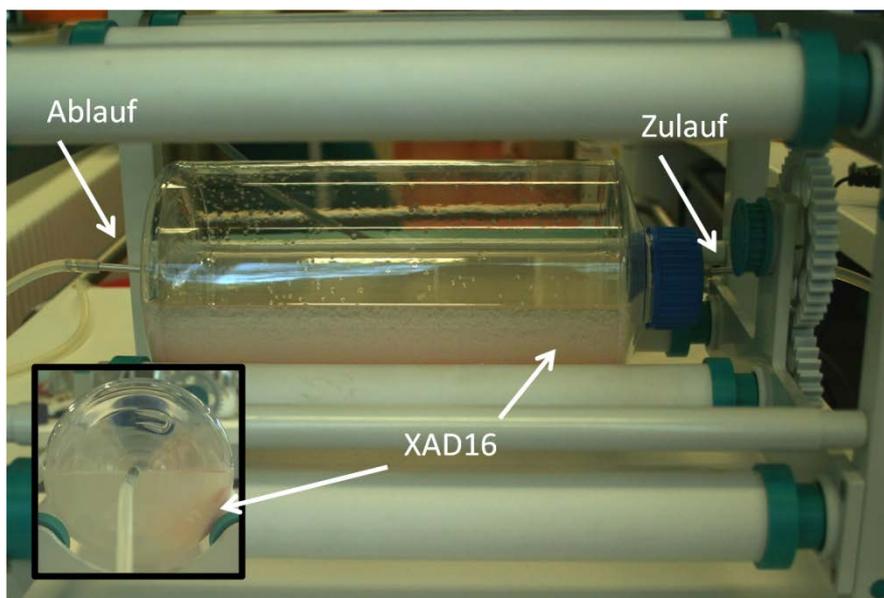


Abbildung 5.1: Cell Roller mit Rollerflasche die XAD16 für Metabolitenabreicherung aus Kulturüberständen enthält. Für Testzwecke wurden Schlauchanschlüsse an der Rollerflasche angebracht. Diese sollten in einer professionellen Version dieses Prototyps aus Sterilschnellanschlüssen bestehen. Durch Variationen des Getriebes am *Cell Roller* können in zwei Stockwerken jeweils gegenläufige Drehrichtungen erreicht werden. Dies ermöglicht einen direkten Anschluss zweier übereinander liegender Flaschen mittels kurzer Schlauchverbindungen.

Der oben beschriebene Ansatz ermöglicht eine große Bandbreite an Fließgeschwindigkeiten, die mittels EBC nicht abgedeckt werden können. Bei dieser wird eine fixe Flussrate benötigt, die von der Partikelgröße und dem Säulendurchmesser abhängig ist. Das *Cell-Roll-System* ist ursprünglich für die Kultivierung von eukaryotischen Zellen in Rollerflaschen gedacht. Es

kann so eingestellt werden, dass die verwendeten Rollerflaschen nach jeweils zwei vollen Umdrehungen die Drehrichtung ändern. Dadurch ist es möglich, Schlauchverbindungen zwischen Bioreaktor und Rollerflasche anzubringen und diese während des Betriebs nicht übermäßig zu verdrillen.

Die Flaschen können bis zu einer gewissen Höhe mit XAD16 befüllt und an den Bioreaktor angeschlossen werden. Durch einige Detailänderungen könnten Flaschen mit Anschlüssen konstruiert werden, die speziell an diese Anforderungen angepasst sind. Als sehr kostengünstig und ebenfalls praktikabel erwies sich die Anwendung von Schottflaschen. Diese wurden mit kommerziell erhältlichen Deckeln die Ein- und Ausgänge enthalten sowie einer in der Flasche liegenden Rohrverlängerung versehen (siehe Abbildung 5.2). Die Schottflaschen wurden mit XAD16 befüllt und zur Sterilisation mit dem Fermenter zusammen autoklaviert. Ein Autoklavieren der *Cell-Roll*-Flaschen war nicht möglich, weshalb diese mit 1M NaOH sterilisiert werden mussten. Hohe Strömungsgeschwindigkeiten in relativ dünnen Schläuchen (1-2 mm Innendurchmesser) verhindern die Rückkontamination des Fermenters, die durch eine Konstruktion wie sie bei der Verabreichung von Infusionen, dem so genannten Tropf, noch weiter reduziert werden kann. Hierbei wird ein bestimmter Bereich im Schlauch „durchtropft“, wodurch ein Rückfluss verhindert wird.

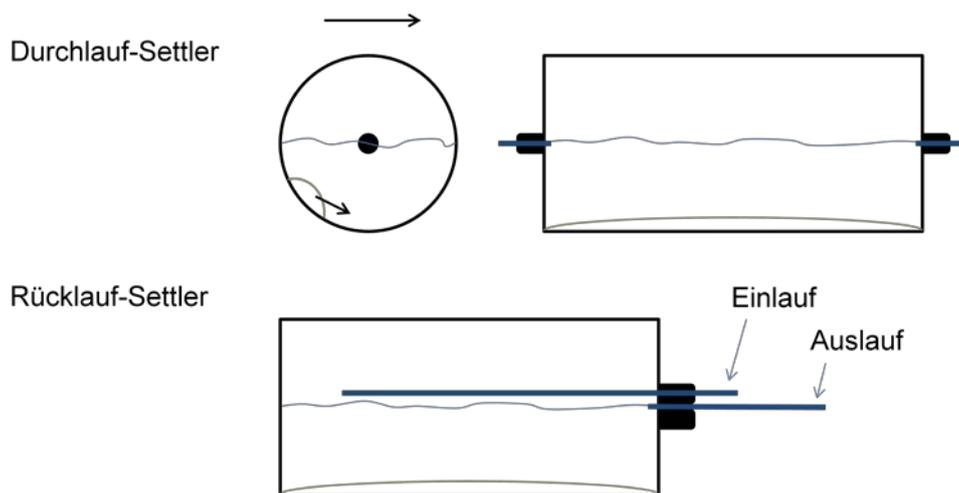


Abbildung 5.2: Aufbau eines Durchlauf- und eines Rücklaufsettlers. Der Flüssigkeitsspiegel ist blau dargestellt, das sedimentierte Adsorberharz braun. Die Pfeile deuten die Drehrichtung und die Sedimentationsrichtung an. Das Schema verdeutlicht den Funktionsaufbau der beiden Settlervarianten. Durch eine in der Flasche liegende Rohrverlängerung (Einlauf) wird der Zufluss am Flaschenboden eingeführt und passiert diese dann in Richtung Auslauf. Beide Varianten weisen die gleiche Funktionalität auf.

Für einen dauerhaften Einsatz in der Praxis müsste der Roller idealerweise, im Gegensatz zum hier verwendeten Gerät, in jedem Stockwerk eine unterschiedliche Drehrichtung aufweisen. Dadurch können kurze Schlauchverbinder von einer Flasche zur

darunterliegenden verwendet werden, ohne im Betrieb zu verdrillen. Dies würde einen unkomplizierten Doppelbetrieb ermöglichen (siehe Kapitel 5.2.3). Beim verwendeten Roller werden zwei nebeneinanderliegende Flaschen durch eine sich drehende Mittelrolle angetrieben. Die Flaschen liegen dabei jeweils auf einer fixierten Außenrolle auf. Durch eine verstellbare Außenrolle könnten unterschiedliche Flaschengrößen in ein einzelnes Gerät eingelegt werden, was die Verwendung von Flaschen mit unterschiedlichen Durchmessern möglich macht (siehe Abbildung 5.3). Die Flaschen sollten Sterilkopplungen aufweisen, die eine einfache und schnelle Ankopplung von Schläuchen an den Sedimentationsroller erlauben und dadurch einen Austausch im laufenden Betrieb ermöglichen. Dieser Austausch wurde bei den verwendeten Schottflaschen durch einen Flaschenwechsel realisiert. Dabei wurde die Deckel/Verlängerungsrohrkonstruktion auf eine frische Flasche aufgeschraubt. Der Austausch der Rollerflaschenfüllung wurde durch Ausgießen der Flasche und Einfüllen einer sterilen XAD-Suspension bewerkstelligt.

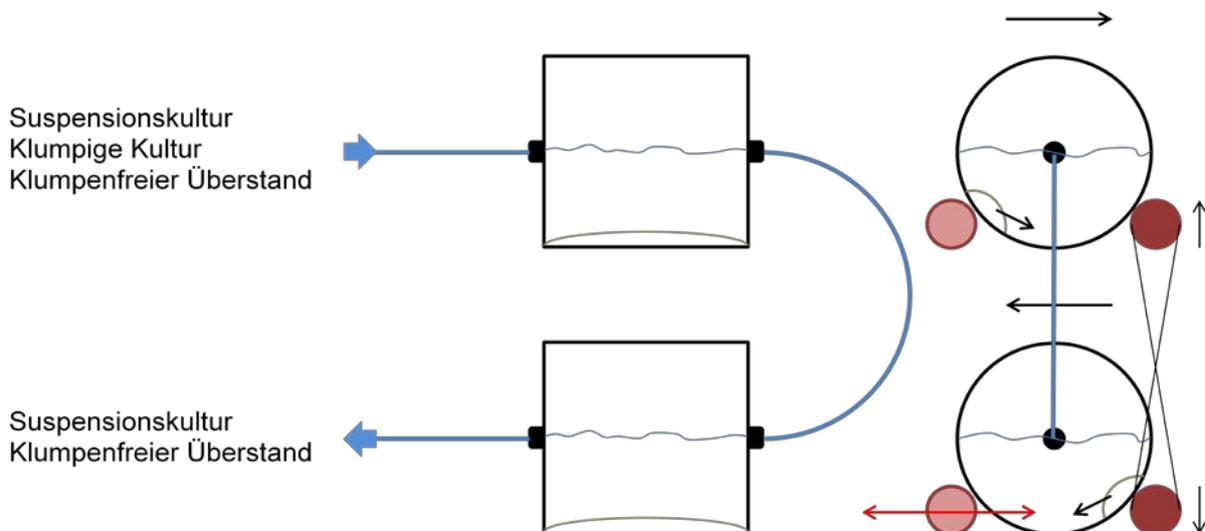


Abbildung 5.3: Anordnung und Funktionalität seriell geschalteter Settler. Die serielle Anordnung ermöglicht beispielsweise bei einem Chemostatprozess die Sedimentation von Biomasse im ersten Settler und verhindert dadurch eine Vermischung von Adsorberharz (welches sich im zweiten Settler befindet) und Biomasse. Bei Vorsedimentation, mittels eines Schwerkraftsettlers (siehe Text) im Bioreaktor, können auch verschiedene Adsorberharze verwendet werden. Die dunkelrote Rolle ist die Antriebsrolle. Über ein Getriebe oder einen Keilriemen kann die Antriebsrichtung der unteren Rolle umgekehrt werden. Dies ermöglicht das Koppeln zweier Flaschen mittels eines flexiblen Schlauchs (blau). Durch verstellbare Auflagerrollen (hellrot) lassen sich unterschiedliche Flaschengrößen verwenden. Am Ein- und Auslauf ist angedeutet, wie die Settler be- bzw. entladen werden können, was eine breite Varianz und dadurch die Möglichkeit zur Anwendung verschiedener Betriebsmodi ermöglicht (siehe Text).

Durch die Rollbewegung kommt es zu einer gleichmäßigen Bewegung und Durchmischung des XADs ohne dieses aufzuwirbeln. Der Überstand wird ebenfalls kontinuierlich durchmischt und vorhandene Substanzen können während der Verweilzeit im Gefäß an das

Harz binden. Danach kann der Überstand verworfen werden. Durch die Kopplung zweier Flaschen aneinander, kann Biomasse im ersten Roller sedimentieren und Überstand in der zweiten Rollerflasche abgereichert werden. Prinzipiell könnten auch zwei verschiedene Adsorbentmaterialien mit unterschiedlichen Bindeeigenschaften verwendet werden. Durch das veränderte Funktionsprinzip im Vergleich zu einer *Expanded Bed*-Chromatographie, spielt die Strömungsgeschwindigkeit im Sedimentationsroller (in gewissen Grenzen) keine Rolle und es können beliebige Verdünnungsraten gewählt werden. Durch den Drehrichtungswechsel nach zwei Umdrehungen kommt es nicht zur Verdrillung der verwendeten Silikonschläuche. Bedingt durch das pelletartige Wachstum mancher Myxobakterien würde es jedoch, ohne Zellrückhaltung im Bioreaktor, zu einer Ansammlung der Zellklumpen im XAD Roller kommen.

Die Lösung für dieses Problem stellt die oben erwähnte Anwendung einer zweiten Flasche oder eines Schwerkraftsettlers innerhalb des Bioreaktors dar [4]. Aufgrund der relativ großen Durchmesser der Zellpellets, sowie einer Dichtedifferenz gegenüber dem Kulturüberstand, reichen schon kleine Bereiche turbulenzfreien Mediums aus, um eine schnelle Sedimentation zu bewirken. Zu Testzwecken wurde ein 50 ml Falcongefäß, wie in Abbildung 5.4 gezeigt, umgebaut. Diese Konstruktion in doppelter Ausführung ist beispielsweise ausreichend, um den ausgepumpten Überstand einer SBCm007 Kultur, bei mehreren Fermentervolumen pro Tag, annähernd zellfrei zu halten. Die Auslegung des Settlers ist allerdings immer abhängig von der Größe und Dichte der Klumpen der verwendeten Kultur sowie der Viskosität des Mediums. Als vorteilhaft hat sich die Verengung des Settlers am unteren Ende erwiesen, da dadurch Blasen zurückgehalten werden. Ein weiterer Vorteil dieser Verengung ist die drastische Reduktion von Turbulenzen innerhalb des Settlers, die durch den Rushton-Impeller hervorgerufen werden und die Sedimentation beeinträchtigen.

Durch eine trichterartige Form des unteren Settlerendes werden zudem eventuell eindringende Zellklumpen wieder nach außen befördert, sobald sie sich im turbulenzfreien Raum befinden und sedimentieren. Entsprechende Bauteile für den routinemäßigen Einsatz könnten ebenso einfach aufgebaut sein wie dieser Prototyp. Eine einfache Integration in bestehende Bioreaktorsysteme sollte problemlos möglich sein, da für die Ausführung aus dem Bioreaktor nur ein Rohr benötigt wird, wofür in allen bekannten Systemen bereits entsprechende Einbauten - meist in den Deckeln - bestehen. Einen weiteren Vorteil bei langsam wachsenden Kulturen brachte die Verwendung eines externen Homogenisators, der aus einer Reihe Pipettenspitzen aufgebaut war. Der Durchmesser der Spitzen innerhalb dieser Konstruktion verengte sich in Fließrichtung. Dadurch konnten große Klumpen vorzerkleinert werden und führten nicht zur Verstopfung des Schlauchs (siehe Abbildung 5.5).

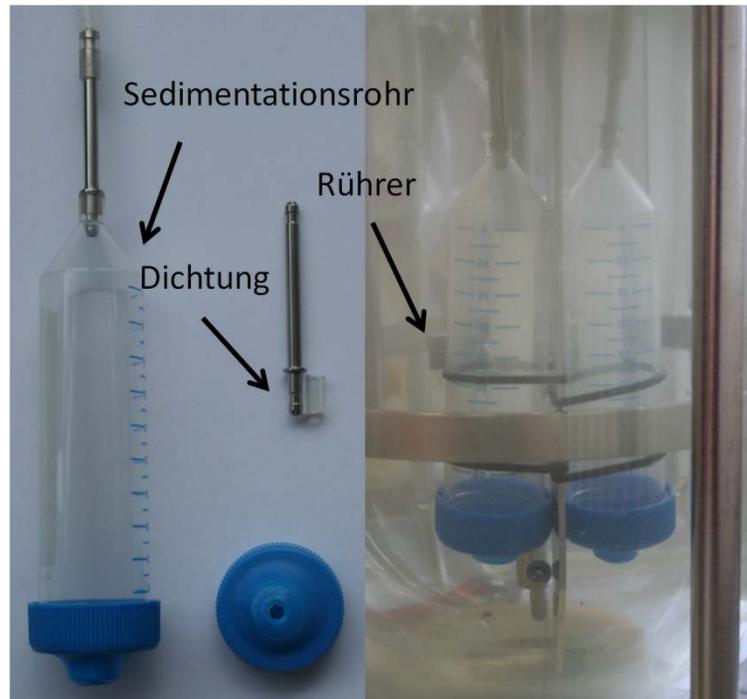


Abbildung 5.4: Aufbau eines Schwerkraftsettlers und Anbringung im Bioreaktor. Der Settler wurde aus einem 50 ml Falcon Gefäß angefertigt, indem der Deckel wie gezeigt verformt wurde. Dadurch kommt es innerhalb des Settlers zu einem undurchmischten Volumen, in dem sich die Zellklumpen absetzen. Die schräg nach unten offene Form des Settlers erlaubt einen Austritt von eingedrungenen Zellklumpen. Als Schlauchanschlüsse wurden kurze Stahlrohre mit einer Nut verwendet, die als Einrastung für eine Bohrung an der Unterseite des Settlers dient. Das Ganze wurde mit einem eng sitzenden Stück Silikonschlauch abgedichtet. Die Unterbringung im Bioreaktor erfolgte etwas unterhalb des Rührers um eine Befüllung mit Luft zu vermeiden.

Durch diese Homogenisierung konnten Kultivierungszeiten erheblich verkürzt werden, da ab einer gewissen Pelletgröße die Biomasse im Fermenter nur noch sehr langsam ansteigt. Zellwachstum scheint nur an kleineren Pellets, die durch zufälliges Ablösen entstehen, stattzufinden. Die Gründe hierfür sind noch nicht vollständig geklärt. Möglicherweise handelt es sich um eine einfache Oberflächenvergrößerung durch die Zerkleinerung der Kugeln und daraus resultierend zu einer verbesserten Nährstoffzufuhr zu einem größeren Teil der Zellen.

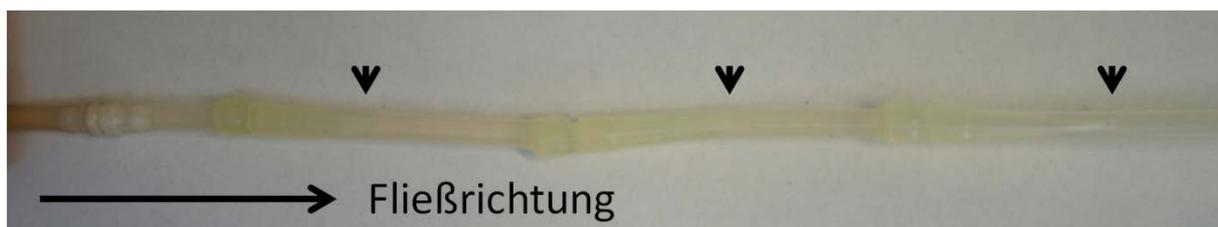


Abbildung 5.5: Homogenisator. Die im Schlauch untergebrachten Pipettenspitzen simulieren das Auf- und Abpipettieren einer Schüttelflaschenkultur zur Homogenisierung. Die Pfeile deuten die Enden der Pipettenspitzen an. Die Durchmesser der Spitzenöffnungen wurden durch Abschneiden der Spitzen vergrößert. Durch eine Anordnung der Spitzen mit abnehmendem Spitzendurchmesser in Flussrichtung, wurde eine Vorzerkleinerung der Klumpen erzielt, die eine Verstopfung verhinderte.

5.2.2 PERFUSIONSPROZESS

Für diese Testkultivierung wurde SBCm007 verwendet. Als Zielsubstanz für die Produktionsverbesserung, wurde das 2,6-Diketopiperazin SH-Cm7-374 ausgewählt. Der Grund für diese Auswahl waren noch nicht verifizierten Varianten dieser Substanzklasse, die aufgereinigt und charakterisiert werden sollten (Siehe Kapitel 2 „*Repeated-Batch*-Verfahren für ein Wirkstoffscreening mit Prozessverbesserung“, Abbildung 2.19). Die Kultivierung wurde im 9 l Maßstab durchgeführt. Der pO_2 wurde bei 60% gehalten und über die Rührerdrehzahl kontrolliert, da eine sauerstoffreiche Umgebung als ideal für eine Produktion dieser Substanzgruppe identifiziert worden war (siehe Kapitel 3 „Methoden zur Prozessverbesserung mittels Abgasanalyse“, Abbildung 3.3, Substanz H). RBK-Experimente hatten zudem gezeigt, dass die Erhöhung der Biomasse im Kultivierungsvolumen die Produktivität einiger Zielsubstanzen verbessern kann, wie beispielsweise im Falle der Chondramide (siehe Abbildung 5.6). Aus diesem Grund wurden hohe Zelldichten durch Zellrückhaltung angestrebt. Das Ziel dieser Kultivierung war die Untersuchung, ob mittels einer kontinuierlichen Kultivierung genügend Substanzmengen für eine Charakterisierung der noch fehlenden Derivate produziert werden können.

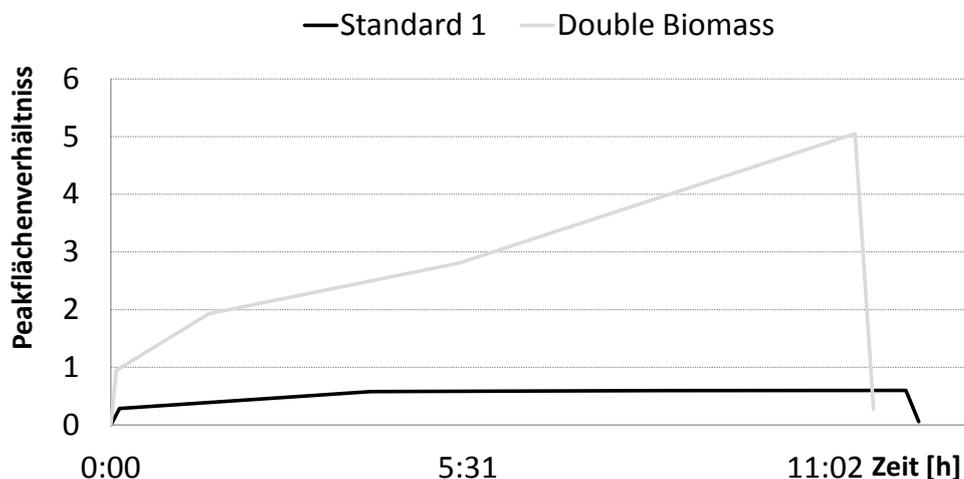


Abbildung 5.6: Vergleich der relativen Konzentration von Chondramid B im Überstand bei einfacher und doppelter Biomasse. Die Verdoppelung der Biomasse wurde durch Halbierung des Medienvolumens erreicht.

Die Testkultivierung wurde mit einer Hefekonzentration von 3 g/l im *Batch* gestartet. Während der Fütterungsphase wurden 100 g Hefe zugefüttert und insgesamt 25 l Wasser zur Verdünnung verwendet. Um Metabolite aus dem Überstand aufzufangen, wurden 7 g XAD verwendet. Die gesamte Testkultivierung dauerte 6 Tage und wurde beendet, nachdem der Feed aufgebraucht war. Dadurch konnte gezeigt werden, dass die Zellrückhaltung im

Bioreaktor, mit dem oben dargestellten Prototypen, möglich ist. Dies ermöglichte die anschließende Inkubation des zellfreien Überstands im *Cell-Roller* mit dem Adsorberharz. Das XAD16 wurde im Anschluss an die Kultivierung mit 800 ml Methanol extrahiert. Ein Drittel des Extrakts wurde durch Größenauschlusschromatographie mittels Sephadex LH20 vorfraktioniert. In Abbildung 5.7 ist ein Vergleich dieses Extrakts, mit dem Screeningextrakt der RBK bei welchem die höchste Produktion dieser Substanzklasse gemessen wurde, dargestellt. Hier wird deutlich, dass sich die Verhältnisse der Zielsubstanzen im Vergleich zu den Chondramiden A(A1) und B(A2), die normalerweise die dominantesten Peaks im BPC darstellen, noch verbessert haben.

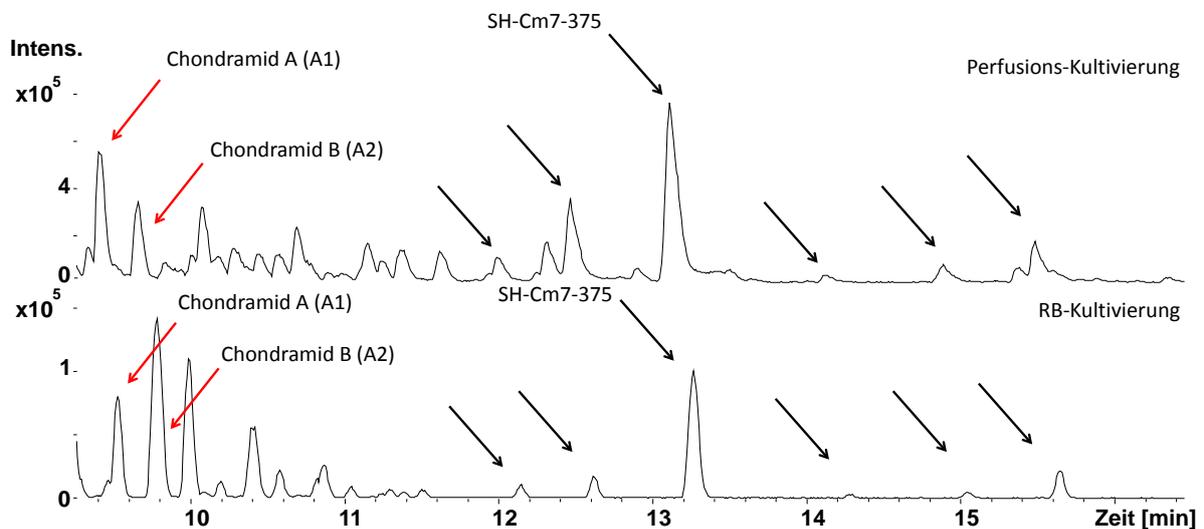


Abbildung 5.7: Vergleich eines *Base-Peak-Chromatogramms* einer *Repeated-Batch-Kultivierung* mit dem einer Umsetzung dieser Bedingungen als *Perfusionskultur* mit anschließender *XAD-Inkubation*. Der Vergleich verdeutlicht, dass die Produktion der 2,6-Diketopiperazine (schwarze Pfeile, siehe Text) zumindest vergleichbar zur Produktion unter den besten Testbedingungen ist. Das Verhältnis der Zielsubstanzen gegenüber den Chondramiden A und B, die normalerweise die dominantesten Peaks im Chromatogramm darstellen (rote Pfeile), scheint sich unter kontinuierlichen Bedingungen sogar noch weiter zugunsten der Zielsubstanzen verschoben zu haben.

Ein Vergleich der Gesamtausbeuten bestätigt dieses Ergebnis. Mittels der *Repeated-Batch-Kultivierung* konnten nur wenige μg der Substanz SH-Cm7-375 mit 5 g Hefe erzeugt werden (entspricht 1 l Medium). Die Gesamtausbeuten der Perfusionskultur im 9 l Maßstab mit anschließender Abreicherung betragen ca. 0,5 mg. Diese Ausbeuten können möglicherweise noch gesteigert werden, wenn diese Substanz kontinuierlich aus dem Überstand abgereichert und die Zelldichte im Bioreaktor weiter erhöht wird. Eine Möglichkeit dies zu realisieren, wäre eine kontinuierliche Extraktion in einer der oben beschriebenen Rollerflaschen, wobei das Medium nach der Extraktion wieder in den Bioreaktor zurückgeführt wird. Nach dem Setzler könnte, mittels eines T-Stücks, abgereichertes Medium

entfernt werden, um dadurch eine konstante Zufuhr frischen Mediums zu ermöglichen. Versuche dahingehend werden derzeit durchgeführt.

Die produzierten Extraktmengen waren außerdem ausreichend, um 80 µg der Substanz SH-Cm7-394 (eine der Zielsubstanzen für diese Prozessoptimierung, siehe Kapitel 2.2.4) aus einem Drittel des Gesamtextrakts aufzureinigen. Mit dieser Substanz wurde ein vollständiger NMR-Spektrensatz aufgenommen, wobei die Menge jedoch nicht ausreichend war um alle quartären Kohlenstoffatome zu bestimmen. Anhand der Daten konnten jedoch Teilstrukturen ermittelt werden, die einen Strukturvorschlag ermöglichten (siehe Abbildung 2.22, Kapitel 2.2.4).

5.2.3 CHEMOSTATPROZESS

Anhand einer Kultivierung von *Aetherobacter rufus* SBSr003 konnte ebenfalls gezeigt werden, dass, mittels der oben beschriebenen Prototypen, eine schnelle Realisierung eines kontinuierlichen Prozesses bereits nach wenigen Vorversuchen möglich ist. Dieses Neuisolat aus unserem Labor stellt einen neuen Genus dar und produziert eine Gruppe interessanter Sekundärmetabolite, die Aetheramide [5]. Die Produktion dieser Substanzen in größeren Mengen wurde für die Aufklärung der Konformation mittels chemischer Derivatisierung benötigt. Die Erzeugung der Substanzen wurde bis dahin in einem Glukose-Casiton Medium im *Batch*-Verfahren durchgeführt. Das Wachstum und die Produktion der Substanzen waren mittels dieses Verfahrens jedoch nicht ausreichend.

Bei Voruntersuchungen im Schüttelkolben wurde kein nennenswerter Glukoseverbrauch nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Aus diesem Grund wurden verschiedene Medien und Medienzusammensetzungen getestet. Unter diesen erwies sich VY/2, ein Ganzzellhefemedium, als das vielversprechendste bezüglich des Zellwachstums und der Aetheramid-Produktion. Weitere Versuche im Schüttelkolben ergaben, dass die Zielsubstanzen zwar an XAD16 adsorbierten, der überwiegende Teil der Substanzen jedoch aus der Biomasse isoliert werden konnte. Erste eigene *Batch*-Fermentationen zeigten, dass der Stamm einen mit anderen Myxobakterien vergleichbaren Sauerstoffbedarf hatte, der jedoch im Verlauf einer Kultivierung sehr stark nachließ. Dieser Effekt kann wahrscheinlich auf eine Selbstinhibierung bzw. Selbstintoxikation zurückgeführt werden. In solchen Fällen kann unter Umständen ein kontinuierlicher Prozess die einzige Möglichkeit für die Produktion einer Substanz darstellen. Der Vorteil besteht darin, dass durch die permanente Verdünnung der Kultur, in Kombination mit der Zufuhr an frischen Nährstoffen, einer Selbstintoxikation entgegengewirkt wird.

Aufgrund der Ergebnisse dieser Vorversuche wurde entschieden, einen kontinuierlichen Prozess ohne Zellrückhaltung im 9 l Maßstab durchzuführen. Es konnte zudem gezeigt

werden, dass die Biomasse und nicht das XAD das eigentliche Zwischenprodukt darstellten. Aus diesem Grund wurden die Zellen kontinuierlich abgeerntet. Durch den Einsatz des oben beschriebenen Homogenisators konnte das Zellwachstum zusätzlich beschleunigt werden. Da nicht vollständig ausgeschlossen werden konnte, dass sich auch Aetheramide gelöst im Überstand befanden, wurde dieser getrennt von den Zellen mit XAD16 extrahiert. Der Aufbau bestand deshalb aus einem ersten Sedimentationsroller, in welchem die Biomasse zurückgehalten und der zur Zellernte manuell entleert wurde. In einem daran angeschlossenen Roller wurde der Überstand mittels XAD extrahiert (siehe Abbildung 5.9)

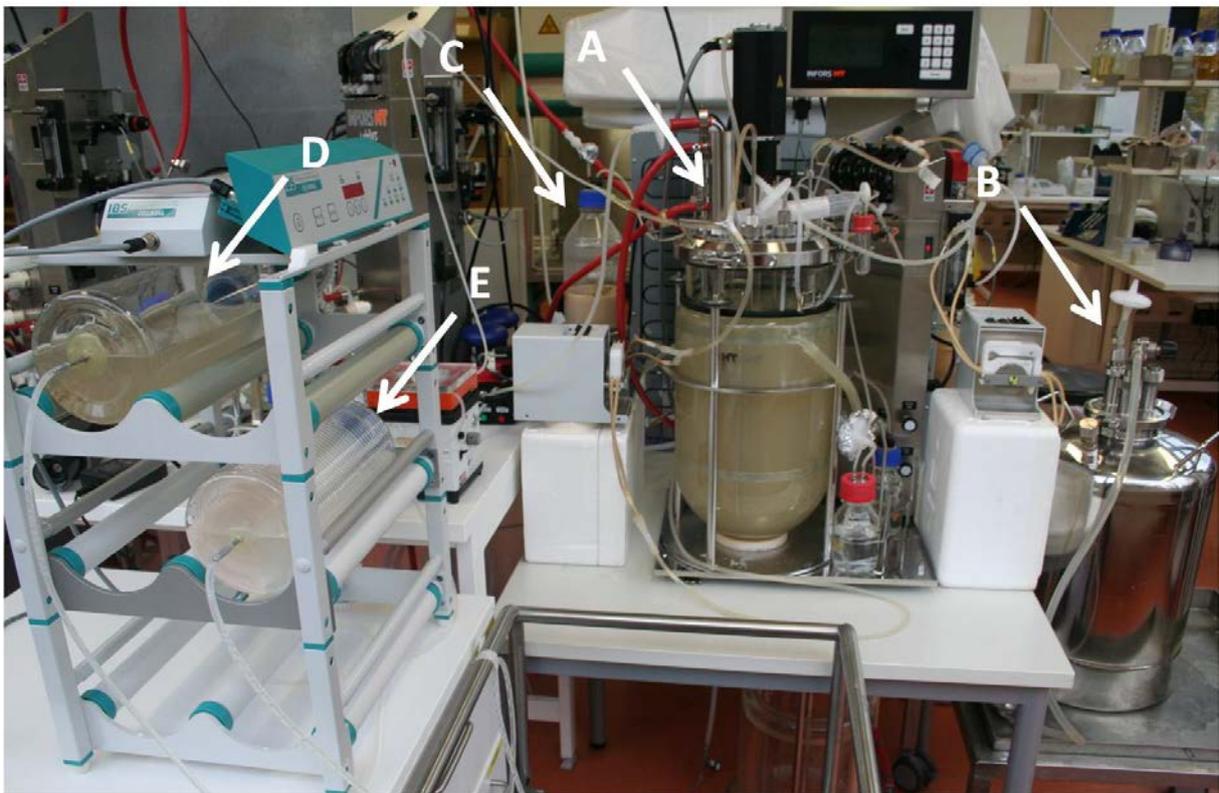


Abbildung 5.8: Aufbau einer Chemostatkultivierung mit Zellsetzler und anschließender Abreicherung des Überstandes mit XAD16. (A) Bioreaktor, (B) Wassertank, (C) Fütterungskonzentrat, (D) Biomasse-sedimentationsroller, (E) XAD-Roller zur Metabolit-Abreicherung.

Nach einer zweitägigen *Batch*-Phase wurde die Chemostatphase gestartet. Die aufgefangenen Zellen wurden täglich geerntet und das Nassgewicht wurde bestimmt. Anschließend wurden die Pellets eingefroren und gefriergetrocknet. Es konnten maximale Zellmengen von 45 g Nassgewicht pro Tag erzeugt werden. Dies ist wesentlich mehr als bisher, mittels herkömmlicher Fermentationen oder durch Schüttelkulturen, produziert werden konnte. Nach der Trocknung beträgt die Trockenmasse ca. 12% des Nassgewichts. Die Gesamttrockenmasse, die innerhalb einer Woche erzeugt wurde, betrug 43 g. 2 g der

Biotrockenmasse wurden mittels Heptan entfettet und anschließend mit Methanol extrahiert. Das methanolische Extrakt wurde auf 1.5 ml reduziert und die Aetheramide wurden daraus, mittels präparativer HPLC, aufgereinigt. Die Gesamtmenge an Aetheramid A und B, die aus 2 g Biotrockenmasse aufgereinigt werden konnte, betrug ~200 µg (Substanzgemisch). Zusätzlich konnte ~1 mg eines Substanzgemisches aufgereinigt werden, welches sich, anhand von NMR- und HRMS-Untersuchungen, als ein Mischung aus phosphoryliertem Aetheramid A und B herausstellte (Daten nicht gezeigt). Durch eine Dephosphorylierung dieser Substanzen, mittels *Shrimp-Alkaline-Phosphatase* (Fermentas) in 25% DMSO/Pufferlösung, konnte anhand von Retentionszeitvergleich und HRMS zusätzlich gezeigt werden, dass es sich um die phosphorylierten Varianten handelt. Diese Dephosphorylierung ermöglicht eine schnelle und quantitative Umsetzung der neuen, phosphorylierten Aetheramide, die mit C und D bezeichnet wurden, in die Analoga A und B. Das XAD16 wurde nach der Kultivierung ebenfalls gefriergetrocknet, methanolisch extrahiert und das Extrakt massenspektrometrisch untersucht. Es konnten jedoch keine signifikanten Mengen der Zielsubstanzen detektiert werden, weshalb keine weitere Aufarbeitung durchgeführt wurde.

Eine Bestimmung der maximal produzierten Mengen an Biomasse pro Tag und pro 9 l Kultivierungsvolumen ergab 45 g Nassgewicht, was einer Trockenmasse von ~5.4 g entspricht. Die daraus erhaltene Gesamtmenge an Aetheramiden entspricht ~3.24 mg. Dies entspricht einer Produktivität von 0.36 mg/l und Tag an Aetheramiden. Diese Kalkulationen ermöglichen die Berechnung der Wirtschaftlichkeit eines Prozesses und erleichtern die Entscheidung für ein Upscaling einer Produktion.

5.2.4 ZUSAMMENFASSUNG

Die beiden oben beschriebenen Versuche zeigen deutlich, dass sowohl Perfusion- als auch Chemostatprozesse mit Myxobakterien außerordentlich produktiv sein können. Ausschlaggebend für die Durchführbarkeit dieser Prozesse war die Entwicklung verschiedener Hilfsmittel. Die Anwendung eines Rollersedimenters ermöglichte beispielweise ein einfaches, kontinuierliches Abreichern von Sekundärmetaboliten aus dem Überstand. Mit zwei dieser Prototypen in Reihe, konnte zudem eine Trennung des Überstands von der Biomasse, mit anschließender Abreicherung von Sekundärstoffen erreicht werden. Durch eine simple Konstruktion konnte außerdem bei pelletartigem Wachstum eine Rückhaltung der Biomasse im Fermenter erreicht werden. Mittels dieser Prototypen ließen sich, durch entsprechende Prozessführung, bereits hohe Produktivitäten im 10 l Maßstab erreichen. Dies macht unter Umständen aufwändige *Batch*-Kultivierungen im 100-200 l Volumen überflüssig und ermöglicht dadurch eine schnelle Nachproduktion von Substanzen, die innerhalb eines Screenings aufgefallen sind.

Die modulare Bauweise der verschiedenen Prototypen ermöglicht verschiedene Kombinationsmöglichkeiten, um diese in eine Kultivierung zu integrieren. So kann z. B. der XAD-Roller in die laufende Kultivierung suspendiert wachsender Organismen eingebaut und für eine Ernte auch ausgetauscht werden. Durch einen Rücklauf der Suspension in den Bioreaktor, wird somit eine kontinuierliche Extraktion während der Kultivierung ermöglicht. Der Vorteil gegenüber einer Addition des Harzes in den Bioreaktor besteht darin, dass bei laufender Kultivierung ein Austausch des Adsorberharzes möglich ist. Da relativ hohe Flussraten verwendet werden können, kann das gesamte Reaktorvolumen mehrfach am Tag über das XAD gepumpt werden. Dies ermöglicht das direkte Abfangen von Sekundärstoffen, ohne die Kultivierung nach einer vollständigen Beladung des Harzes beenden zu müssen. Prinzipiell bestehen noch weitere Anwendungsmöglichkeiten, wie beispielsweise eine kontinuierliche Extraktion mit Suspensionsentfernung oder eine kontinuierliche Extraktion mit Zellsetzler im Bioreaktor und Abzug des Überstands. Aufgrund der Kombinierbarkeit der Prototypen untereinander, können dabei die Funktionalitäten den jeweiligen Erfordernissen angepasst werden. Die Realisierung solcher Projekte wird in Zukunft mit unterschiedlichen Organismen untersucht werden.

Mit diesen Versuchen konnte gezeigt werden, dass mittels Perfusion hohe Zelldichten innerhalb des Bioreaktors erzielt werden können. Dadurch kann die Produktivität, hinsichtlich eines im Überstand befindlichen Produkts, unter Umständen wesentlich erhöht werden. Ist jedoch die Biomasse ausschlaggebend für die Produktgewinnung, dann ist diese Kultivierungsform einem Chemostatprozess unterlegen. Aufgrund von Platzmangel und Nährstofflimitierung kann es nicht zu einem unendlichen Wachstum innerhalb des Bioreaktors kommen. Aus diesem Grund ist eine kontinuierliche Entfernung (und Ernte) der Zellen notwendig, da dadurch ein konstantes Nachwachsen der Biomasse im Reaktor ermöglicht wird. Abbildung 5.10 zeigt zur Verdeutlichung den Vergleich zweier Simulationen. Die Simulation wurde einmal im Chemostat- und einmal im Perfusionsmodus durchgeführt (Dateien für die Simulation mittels Berkeley Madonna befinden sich im Anhang). Als zugrundeliegendes Modell wurde hier wieder das bereits in Kapitel 2.2.1 verwendete Monod-Modell verwendet. Dieses wurde um den Faktor q_{ms} [1/h] erweitert, der den Substratverbrauch für den Erhalt der Biomasse darstellt. Die verwendeten Parameter wurden geschätzt. Für beide Kultivierungssimulationen wurden identische Ausgangsbedingungen angewendet. Auf eine zehnstündige *Batch*-Phase folgte eine Verdünnungsphase mit einer Verdünnungsrate D [1/h] von 0,1 (10% pro Stunde). Die Berechnung der Substratzentralen erfolgte für Perfusion und Chemostat mittels Gleichung 5.1:

$$\frac{dc_s}{dt} = (D \times (c_{se} - c_s)) - (q_{ms} \times c_x) - \left(\frac{\mu}{Y_{x/s}} \times c_x\right) \quad (5.1)$$

Wobei c_{se} [g/l] die Konzentration des limitierenden Substrates im Einlauf darstellt. Die anderen Größen verhalten sich analog zu den im Kapitel 2.2.1 beschriebenen. Die Biomassekonzentration wird für den Chemostaten mittels folgender Gleichung simuliert:

$$\frac{dc_x}{dt} = -(D \times c_x) + (\mu \times c_x) - (k_d \times c_x) \quad (5.2)$$

Für die Perfusions-Simulation mittels folgender Gleichung:

$$\frac{dc_x}{dt} = (\mu \times c_x) - (k_d \times c_x) \quad (5.3)$$

bei welcher der Verdünnungstherm für die Biomasse aufgrund der Zellrückhaltung entfällt.

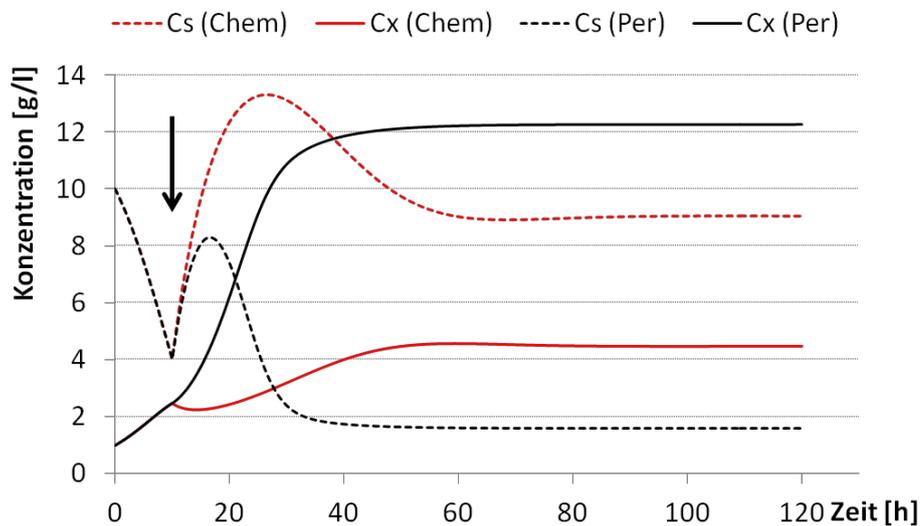


Abbildung 5.9: Vergleich der Biomasse (C_x) und Substratkonzentration (C_s) einer Chemostat- (Chem) und einer Perfusionsimulation (Per). Der Pfeil deutet das Ende der *Batch*-Phase und den Beginn der Verdünnung an. Bis zu diesem Zeitpunkt ist der Kurvenverlauf aufgrund identischer Parameterwahl gleich. Anschließend kommt es beim Perfusionsprozess zu einer Rückhaltung der Biomasse im Reaktor und dadurch zu unterschiedlichen Konzentrationsverläufen ($\mu_{max}=0.3$, $K_s=8$, $k_d=0.05$, $Y_{X/S}=0.55$, $q_{ms}=0.1$, $c_{se}=25$, $c_s=10$, $c_x=1$, initiale Substratkonzentration $c_s=10$, initiale Biomassekonzentration $c_x=1$).

Die Simulation verdeutlicht, dass aufgrund der Zellrückhaltung eine wesentlich höhere Biomasse erreicht wird, was in einer verbesserten Medienausnutzung resultiert. Bei Produkten deren Biosynthese mit der Biomasse zusammenhängt, ist dies die optimale Produktionsform. Beim Chemostaten wird im Gegensatz zum Perfusionsprozess (unter Verwendung der gleichen Parameter) sowohl Biomasse als auch relativ viel Substrat ausgespült. Für eine kontinuierliche Produktion von Biomasse ist jedoch diese Variante zu bevorzugen, da die Zellen aufgrund des Ausspülens ständig nachwachsen können. Es muss dabei allerdings beachtet werden, dass die Verdünnungsrate nicht zu hoch gewählt wird, da ansonsten die Biomasse vollständig ausgespült wird. Auch hier sei nochmals erwähnt, dass

die zugrundeliegenden Modelle extreme Vereinfachungen darstellen, die hier nur der Veranschaulichung dienen und im Realfall angepasst werden müssen.

Abbildung 5.11 zeigt, die Konzentration der Biomasse und des Substrats im Bioreaktor in Abhängigkeit von der Verdünnungsrate als Parameterplot. Die Berechnung dieser Konzentrationen erfolgte auf Grundlage des oben simulierten Chemostatprozesses, unter Verwendung der gleichen Parameter und wurde ebenfalls mit der Simulationssoftware Berkeley Madonna durchgeführt. Die Abbildung verdeutlicht, dass unter Verwendung dieser Parameter ab einer Verdünnungsrate von 0,2 Volumen pro Stunde die Biomasse vollständig ausgespült werden würde.

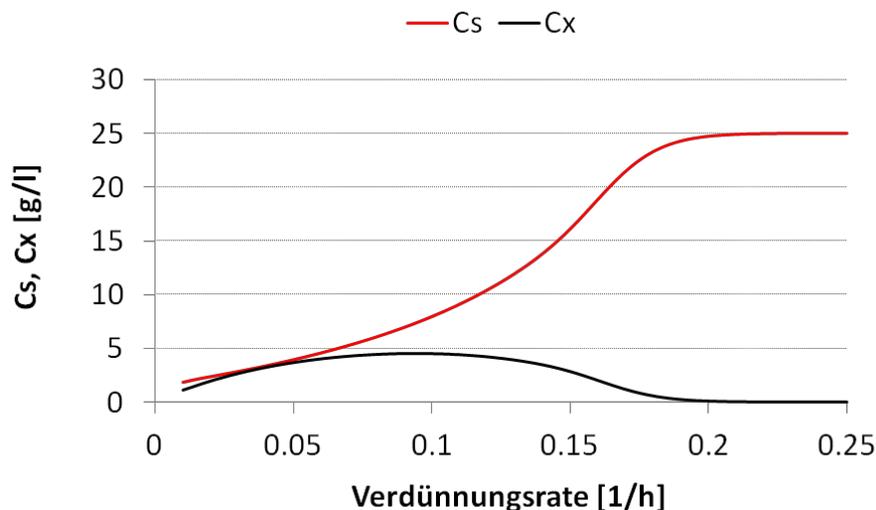


Abbildung 5.10: Parameterplot der in Abb. 5.10 gezeigten Chemostatsimulation. Die Kurvenverläufe zeigen die Substratkonzentration (C_s) und die Biomassenkonzentration (C_x) im Bioreaktor in Abhängigkeit von der Verdünnungsrate.

Diese Simulationen zeigen, dass Prozesse unter Berücksichtigung einer optimalen Raum-/Zeitausnutzung nur durch Zusatzgeräte, wie die oben dargestellten und verwendeten Prototypen, ermöglicht werden. Dadurch werden Kultivierungen im sogenannten stationären Zustand mittels eines Chemostatprozesses möglich. Diese können bei entsprechender Prozessführung jedoch nicht nur für eine Produktion von Sekundärstoffen verwendet werden. Es können zusätzlich wichtige Aussagen über die Substratbedürfnisse eines verwendeten Organismus gemacht werden, beispielsweise durch Zupulsen eines limitierenden Substrats und aufzeichnen der Systemantwort [2]. Diese Informationen sind ansonsten nur sehr schwer und mit hohem experimentellem Aufwand zugänglich, weshalb sich diese Kultivierungsarten auch für die Beantwortung biologischer Fragestellungen gut eignen [2].

Die dargestellten Versuche bieten Ausgangspunkte für Prozesse, die möglicherweise, aufgrund ihrer hohen Produktivität, mit sehr viel geringeren Kultivierungsvolumina als herkömmliche *Batch*-Fermentationen betrieben werden können. Dies ermöglicht wiederum ein effizienteres und kostensparendes Handling aufgrund der Volumenreduktion. Die Ergebnisse dieser Versuche können als Planungshilfen für Prozesse dienen, die von einer kontinuierlichen Kultivierung profitieren. So können beispielsweise toxische Produkte permanent ausgeschleust werden, wie im Fall des Aetheramid-Produzenten. Durch die Zellrückhaltung kann der produzierende Organismus jedoch auch im Bioraktor zurückgehalten werden, sofern er sedimentiert werden kann. Dies kann im Falle einer Ausschleusung von toxischen Substanzen ins Medium vorteilhaft sein, da diese unter Umständen das Produkt darstellen und hohe Zelldichten unter Umständen mehr Produkt bedeuten würden. Versuche mit einem *Polyangium*-Stamm sind derzeit geplant, da einige Vertreter dieses Genus bereits nach sehr kurzer Zeit im Schüttelkolben Symptome wie Schwarzfärbung und Wachstumsinhibierung zeigen. Dies kann auf eine Selbstintoxikation oder -inhibierung hindeuten. Unter Umständen können solche toxischen Substanzen mittels kontinuierlicher Abreicherung produziert und identifiziert werden. Weitere umfassende Arbeiten sind auf diesem, für Myxobakterien noch kaum untersuchten, Gebiet geplant. Die Erfolge dieser ersten Untersuchungen deuten jedoch bereits an, dass bei diesen Ansätzen für die Produktionsoptimierung noch viel Raum für Verbesserungen besteht.

6 STRUKTUREN

Die in den vorhergehenden Kapiteln beschriebenen Methoden lassen sich auch auf andere Organismen anwenden. Mit verschiedenen Chondromyceten wurden entsprechende Versuche durchgeführt, welche eine Reihe neuer Derivate bereits beschriebener Moleküle - wie beispielsweise neue Crocapeptine - lieferten. Da diese jedoch weder aktivitätsbasiert aufgereinigt wurden, noch neue chemische Strukturvarianten darstellen, werden diese hier nicht einzeln aufgeführt. Weitere, bislang aus Myxobakterien nicht bekannte, Substanzen, die charakterisiert werden konnten, stellen Microcystine sowie Anabaenopeptid-Varianten dar. Diese werden hier ebenfalls nicht extra aufgeführt. Die in diesem Kapitel dargestellten Substanzen stellen Vertreter von Substanzgruppen aus anderen Bakterien dar, die aktivitätsbasiert aufgereinigt wurden. Damit soll gezeigt werden, dass die etablierten Methoden auf verschiedene Organismen übertragbar sind. Die für die Strukturaufklärung dieser Substanzen erzeugten Tabellen befinden sich im Anhang E.

Die in Abbildung 6.1 gezeigte Struktur stellt ein Chondrochlorenderivat [1] dar, welches aufgrund seiner antifungalen Aktivität aufgereinigt und charakterisiert wurde. Dies geschah im Rahmen einer Masterarbeit. Die Aufreinigung der Substanz wurde von Simon Frewert durchgeführt. Es wurden mehrere neue Derivate aufgereinigt, beispielhaft wird hier jedoch nur diese glykosylierte Variante dargestellt.

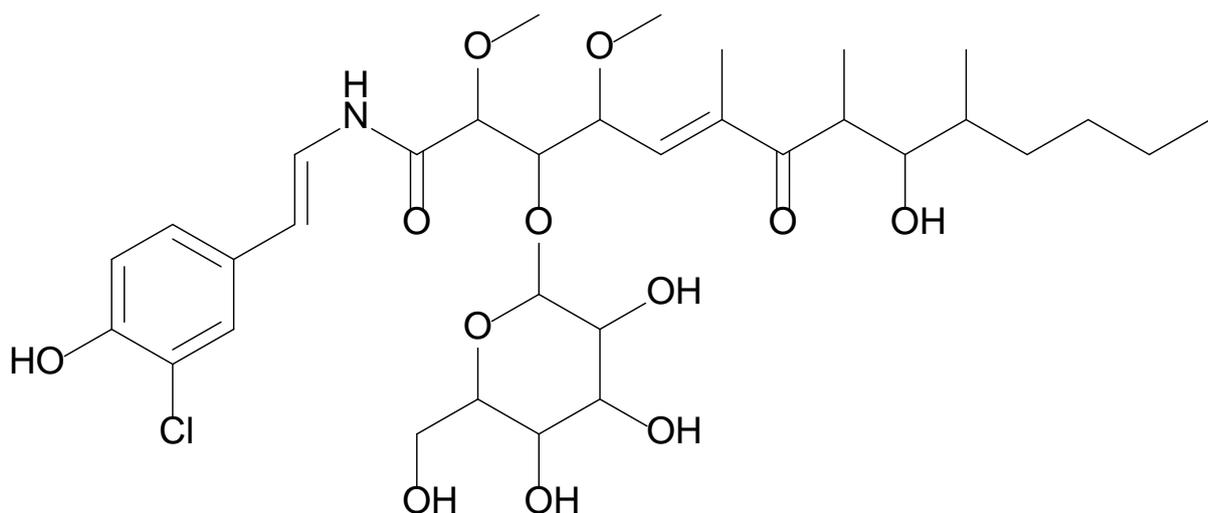


Abbildung 6.1: Glycochondrochloren. Schwache antifungale Aktivität gegen *Candida albicans*.

Die in Abbildung 6.2 und 6.3 gezeigten Substanzen entstammen einem suspendiert wachsenden *Xenorhabdus*-Stamm und wurden aufgrund ihrer Zytotoxizität aufgereinigt, die

in Bioassays aufgefallen war. Die in Abbildung 6.2 gezeigte Substanz stellt einen exemplarischen Vertreter dieser Substanzklasse dar. Die anderen Derivate dieser Gruppe unterscheiden sich in der Anzahl der Valine in der Peptidkette. Die *Xenorhabdus*-Substanzen sind das Resultat einer Kooperation mit Qiang Tu.

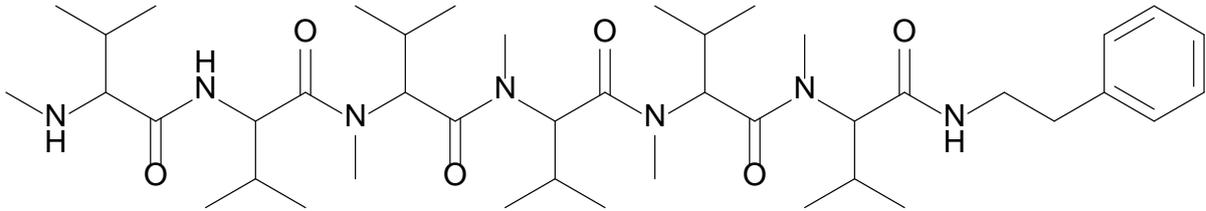


Abbildung 6.2: Peptid mit zytotoxischer Wirkung aus *Xenorhabdus* sp. $IC_{50} = 1.5 \mu\text{g/ml}$ auf K562-Leukämiezellen

Von der in Abbildung 6.3 gezeigten Substanzklasse wurde nur dieser Vertreter, aufgrund einer schwachen zytotoxischen Aktivität, aufgereinigt. Die Stereochemie dieses Moleküls wurde mittels einer Marfey-Derivatisierung bestimmt. Die Anordnung der beiden Phenylalanine wurde anhand einer Analyse des Biosyntheseclusters festgelegt.

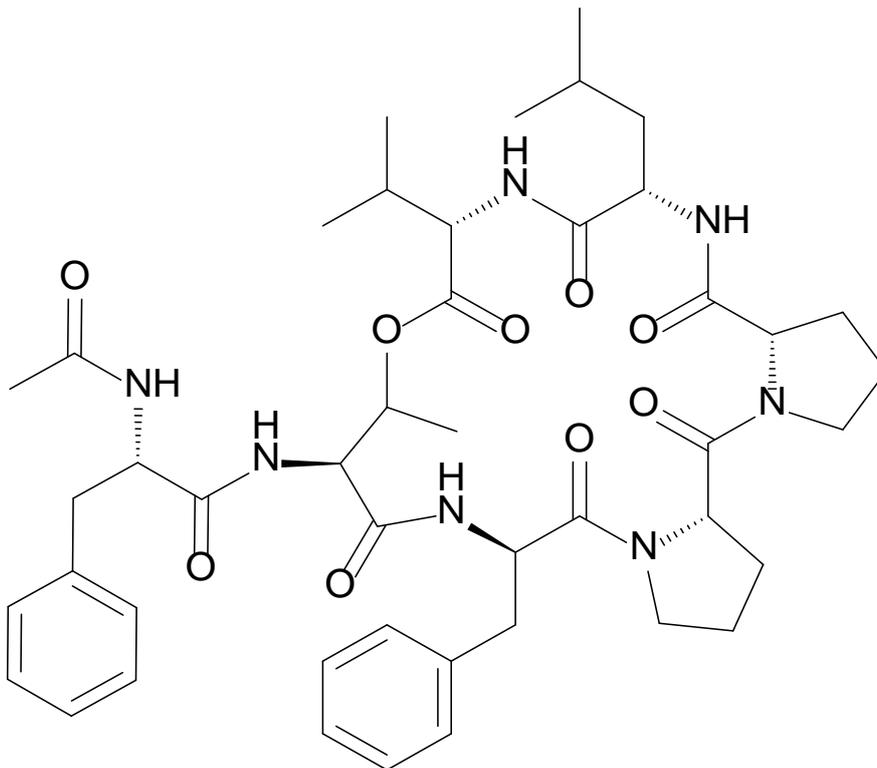


Abbildung 6.3: Peptid mit zytotoxischer Wirkung aus *Xenorhabdus* sp. $IC_{50} = 23.5 \mu\text{g/ml}$ auf K562-Leukämiezellen

Eine Unterscheidung der Position dieser Phenylalanine im Molekül anhand der Derivatisierung wäre nicht möglich, da das Peptid zuvor hydrolysiert wird. Dies ist ein anschauliches Beispiel, wie die Aufklärung der absoluten Konfiguration eines Moleküls von einer vorhandenen Genomsequenz profitieren kann (siehe Kapitel 2.3).

7 ABSCHLIEßENDE DISKUSSION UND AUSBLICK

Wie im ersten Kapitel ausführlich dargestellt, kam es in der pharmazeutischen Naturstoffforschung nach anfänglichen Erfolgen immer häufiger zur Wiederfindung schon charakterisierter Substanzen, insbesondere auf dem Gebiet der antimikrobiellen Wirkstoffe. Dieses und andere mit Naturstoffen assoziierte Probleme waren letztendlich ausschlaggebend dafür, dass sich einige der großen Pharmafirmen von der Naturstoffforschung abwandten. Jedoch besteht weiterhin ein großer Bedarf an Wirkstoffen, beispielsweise aufgrund sich entwickelnder Resistenzen von Pathogenen gegen bekannte Antibiotika [1-6].

Eines der Probleme, mit denen Naturstoffforscher auf der Suche nach neuen, bioaktiven Substanzen konfrontiert werden, ist die Verfügbarkeit ausreichender Substanzmengen, die für eine aktivitätsbasierte Identifizierung mit anschließender Aufreinigung und Charakterisierung benötigt werden [7]. Häufig werden in Primärscreens mit Rohextrakten Aktivitäten detektiert; bei der weiteren Bearbeitung der Extrakte stellt sich jedoch immer wieder heraus, dass diese Hits nicht ohne weiteres verfolgt werden können. Solche Schwierigkeiten sind häufig assoziiert mit niedrigen Produkttitern, instabilen Substanzen, dem Auftreten synergistischer Effekte mehrerer Substanzen und additiver Effekte mehrerer Derivate einer Substanzklasse. Dies macht eine Aufreinigung unter gewissen Umständen unmöglich [1]. In vielen Fällen stellt bereits die Dereplikation und Korrelation von molekularen Massen der Sekundärstoffe mit detektierbaren Bioaktivitäten ein Problem dar [4]. Doch sind es möglicherweise gerade diese Aktivitäten, welche durch neue chemische Grundstrukturen mit bisher unbekanntem Wirkmechanismus verursacht werden [1]. Gleichwohl finden sich auch in neuerer Literatur zahlreiche Beispiele für neuentdeckte Substanzen mit eben diesen Eigenschaften [4, 8]. Die Erforschung neuer Habitats, wie mariner Sedimente, und die Entwicklung spezifischer Kultivierungstechniken für sogenannte „unkultivierbare“ Mikroorganismen, werden als ausschlaggebend für den Zugang zu weiterer struktureller Vielfalt betrachtet [1-11]. Speziell weniger untersuchte Produzenten, wie beispielsweise Myxobakterien, liefern nach wie vor neuartige, chemisch diverse Naturstoffe [8, 9].

Vor diesem Hintergrund stellen die Verfahren, die in den Kapiteln 2, 3, 4 und 5 entwickelt wurden, einen wichtigen Beitrag zur Wirkstofffindung mit Myxobakterien dar. Nicht allein das Primärscreening ist ausschlaggebend für die erfolgreiche Entdeckung eines Wirkstoffes. Die vorausgehenden und nachfolgenden Isolierungs-, Kultivierungs-, Fraktionierungs-, Detektions- und Aufreinigungsschritte sind mindestens ebenso wichtig für den Erfolg eines Screeningprojektes, vor allem dann, wenn die gesuchte Substanz eine der schwach

produzierten ist [4]. Eine *Repeated-Batch*-Kultivierung (RBK) bietet sich hier als erster Schritt bei der Bearbeitung eines Produzentenstammes an, um dessen biosynthetischen Potenzial zu erfassen. Aufgrund der Komplexität, der Vorbereitungszeit sowie der Datenmengen, die mittels dieser Methode erzeugt werden, eignet sich die RBK allerdings nicht für einen Hochdurchsatz. Die erzeugten Extraktmengen und daraus gewonnene Metabolite sind in vielen Fällen ausreichend für eine biologische und chemische Charakterisierung. Im Falle nicht ausreichender Extraktmengen, können die stringent aufgezeichneten Prozessdaten für eine Suche nach besseren Produktionsbedingungen von zuvor definierten Zielsubstanzen verwendet werden.

Da die aufgezeichneten Daten sowohl zeitliche Produktionsverläufe als auch Gesamtausbeuten umfassen, können erwünschte Bedingungen identifiziert und deren Auswirkungen im Vergleich zu Standardbedingungen quantifiziert werden. Dadurch wird eine kalkulierbare Produktionsverbesserung möglich. Die Verwendung eines Bioreaktors mit umfassender Online- sowie bei Bedarf Offlineanalytik erlaubt ein direktes „*Upscaling*“, wenn relevante Parameter für eine verbesserte Produktion identifiziert wurden. Der Vorteil, den diese Vorgehensweise bietet, zeigt sich deutlich im Fall der Chondramide (siehe Kapitel 4, „Entdeckung neuer Chondramide mit verbessertem Wirkspektrum“). Hier konnten anhand der gespeicherten Fermentations- und HRMS-Daten Bedingungen ermittelt werden, die die Produktion verschiedener bis dahin unbekannter Chondramidderivate im 10 l Maßstab ermöglichten. Des Weiteren konnte, anhand der RBK-Extrakte, ein Einbau von Brom anstelle eines Chloratoms in den neuen Chondramiden nachgewiesen werden. Die detektierten, bromierten Derivate konnten - trotz sehr geringer Substanztiter - anhand der identifizierten, verbesserten Kultivierungsbedingungen hergestellt und aufgereinigt werden. Diese wiesen in Aktivitätstests eine Toxizität im niedrigen nanomolaren Bereich auf, die die der bekannten Derivate noch übertrifft, zeigten jedoch eine signifikant reduzierte Aktivität gegenüber nicht entarteten Zelllinien. Durch die Identifizierung verbesserter Produktionsbedingungen konnten somit auch schwach produzierte Derivate aufgereinigt und sowohl biologisch als auch chemisch charakterisiert werden. Dadurch war es möglich Struktur/Aktivitätsbeziehungen herauszuarbeiten, die bei einer zukünftigen chemischen Optimierung dieser Substanzklasse hilfreich sein werden (Novel Chondramide Derivatives. EP 12 007 921.5 zur Anmeldung eingereicht).

Die Entdeckung weiterer Substanzen, die neue chemische Grundstrukturen darstellen, in den RBK-Extrakten des Teststammes SBCm007, zeigt einen weiteren wichtigen Aspekt der entwickelten Screeningmethode (siehe Kapitel 2.2.4). Durch die veränderten Kultivierungsbedingungen wurden Metabolite produziert, die in Standardextrakten nicht ohne weiteres detektiert werden konnten. Die Mengen, die beispielsweise von den neuartigen Pyrolizidinderivaten (siehe Kapitel 2.2.4) mittels RBK produziert wurden, waren ausreichend

für eine Strukturaufklärung und biologische Charakterisierung, obwohl diese Moleküle in Standardextrakten kaum detektierbar waren. Anhand der Struktur dieser Moleküle konnte ein Modell der Biosynthese entwickelt und das bereits sequenzierte Genom des Produzentenstammes nach entsprechenden Genen durchsucht werden. Dies führte zur Identifizierung eines Biosynthesegenclusters, welches mit hoher Wahrscheinlichkeit für die Produktion dieser Substanz benötigt und Gegenstand zukünftiger Arbeiten sein wird.

Dieser „vom Metabolit zum Gen“-Ansatz kann jedoch auch umgekehrt werden. Liegt beispielsweise die Genomsequenz eines Stammes bereits vor, so kann diese mittels bioinformatischer Methoden nach den Biosynthesegenen verschiedener Substanzklassen untersucht werden [12, 13]. Dieses „*Genome Mining*“ liefert in vielen Fällen Hinweise auf Biosynthesegencluster, denen noch kein bekanntes Produkt zugeordnet werden kann [13, 14]. Beispielsweise wurden nach der Sequenzierung von *Myxococcus xanthus* DK1622 die Biosynthesegencluster für 18 hypothetische Substanzen identifiziert [14]. Im Jahr 2009 waren jedoch erst fünf der dazugehörigen Substanzen identifiziert, charakterisiert und diesen Clustern zugeordnet worden [14]. Untersuchungen des Transkriptoms und Proteoms dieses Stammes ergaben jedoch, dass der überwiegende Teil dieser Gene unter Standardbedingungen sowohl transkribiert als auch translatiert wird [14]. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass diese sogenannten „stillen“ Gencluster bzw. deren Proteinprodukte unter Umständen nur den richtigen Stimulus benötigen um mit der Biosynthese der zugehörigen Sekundärstoffe zu beginnen. Dies konnte beispielsweise im Fall der Vancomycin-Biosynthese in *Amycolatopsis orientalis* unter verschiedenen Sauerstoffpartialdrücken gezeigt werden. Die Biosynthesemaschinerie war hier, wie im Fall der *M. xanthus* Proteine, unter allen getesteten Bedingungen vorhanden. Eine signifikante Produktion dieses Antibiotikums fand jedoch nur unter hohen Sauerstoffpartialdrücken statt [15]. Diese Ergebnisse erklären unter Umständen die in Kapitel 3 „Methoden zur Prozessverbesserung mittels Abgasanalyse“ gezeigten Produktionsänderungen von Stamm SBCm007, die durch Veränderungen der Gasphasenzusammensetzung innerhalb des Bioreaktors erzielt wurden.

Ein Vergleich sequenzierter prokaryotischer Sekundärstoffproduzenten zeigt, dass der überwiegende Teil dieser Biosynthese-Gencluster - zumindest unter Laborbedingungen - „stillgelegt“ scheint [14]. In Abbildung 7.1 ist eine exemplarische Auswahl verschiedener bekannter Produzenten dargestellt, bei denen eine Genomanalyse und ein Abgleich mit bekannten Metaboliten aus diesen Organismen diese Tatsache verdeutlicht [14]. Die Kombination von Genomanalysen und den in dieser Arbeit beschriebenen Methoden für quantitative und qualitative Untersuchungen der Einflüsse verschiedener Parameter auf das Metabolitenprofil eines Stammes scheint erfolgversprechend, um zumindest einige dieser Produkte von sogenannten „stillen Genclustern“ identifizieren zu können. Die in Kapitel 2

dargestellten Stoffgruppen der Pyrolizidine und der 2,6-Diketopiperazine stellen Substanzen dar, denen – zumindest im Falle der Pyrolizidine – bereits ein Cluster zugeordnet werden konnte. Unter Standardbedingungen wären diese beiden Stoffgruppen, die jeweils chemisch neue Grundstrukturen repräsentieren, sehr wahrscheinlich nicht entdeckt worden.

In Kombination mit den in Kapitel 2 beschriebenen sensitiven analytischen Methoden und beliebig erweiterbaren Bioassays stellt die RBK deshalb eine leistungsfähige Plattform zum „*In Depth*“ Screening einzelner interessanter Mikroorganismen dar. Die Arbeitsabläufe der RB-Kultivierungen sind zudem so adaptierbar, dass zwölfstündige Mess- und Kultivierungszyklen realisierbar sind. Dadurch werden aufwändige Übernachtmessungen überflüssig, wodurch wiederum der personelle Aufwand reduziert werden kann. Die im Kapitel 3 „Methoden zur Prozessverbesserung mittels Abgasanalyse“ entwickelten Techniken erlauben zudem weitgehende Prozessautomatisierungen, die die Anwesenheit einer Person für viele Arbeitsschritte überflüssig machen.

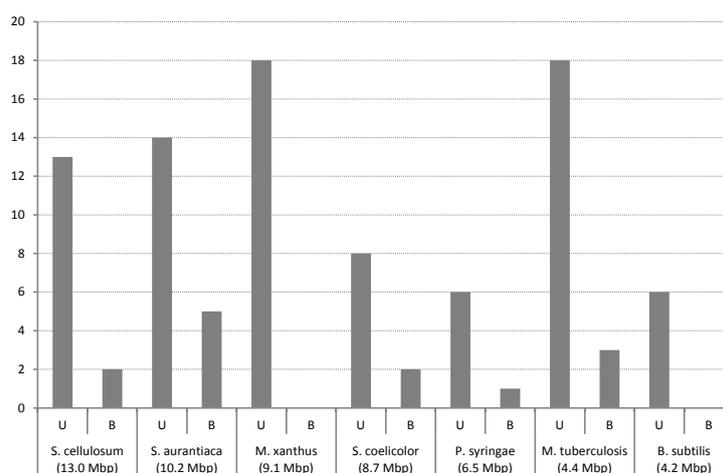


Abbildung 7.1: Biosynthetisches Potenzial einiger vollständig sequenzierter prokaryotischer Sekundärstoffproduzenten. (U) Anzahl identifizierter NRPS-, PKS- und hybrider NRPS/PKS-Cluster. (B) Zum Zeitpunkt des Sequenzierens bekannte Substanzen [13].

Nach erfolgreicher Detektion von Zielsubstanzen in Extrakten bieten sich in der Regel kontinuierliche Kultivierungsformen für Produktionsprozesse an. Diese sind meist effizienter und ökonomischer als die häufig eingesetzten *Batch*-Prozesse [16], wie sie hier beispielsweise für die Nachproduktion der Chondramidderivate eingesetzt wurden (siehe Kapitel 4). Mit kontinuierlichen Prozessen sind jedoch Probleme verbunden, die bei einfachen *Batch*-Kultivierungen nicht auftreten. Dazu zählen beispielsweise Schwierigkeiten bei der kontinuierlichen Abreicherung von Metaboliten aus der wässrigen Phase, der Versorgung mit Nährstoffen und der Entfernung des verbrauchten Überstands [15]. Die in

Kapitel 5 „Verbesserung kontinuierlicher Prozesse mittels RBK“ beschriebenen Prototypen ermöglichen einfache, aber sehr effektive Lösungen dieser Probleme. Durch Einsatz dieser Prototypen besteht die Möglichkeit verschiedene Prozessarten, wie kontinuierliche Verdünnung ohne bzw. mit Zellrückhaltung (im Falle koagulativ wachsender Organismen) zu realisieren. Hier konnten die Ergebnisse der RB-Kultivierungen nutzbringend für eine verbesserte Produktion eingesetzt werden, was durch die Pilotkultivierungen (Kapitel 5, „Verbesserung kontinuierlicher Prozesse mittels RBK“) gezeigt werden konnte. So konnte beispielsweise die Produktion der 2,6-Diketopiperazine verbessert werden, wodurch es möglich war Teilstrukturen eines noch nicht charakterisierten Derivats dieser Substanzklasse zu bestimmen. Diese erhöhte Produktivität geht wiederum mit reduzierten Arbeitsvolumina und somit reduzierten Arbeitsaufwand einher, wodurch flexible und vor allem schnelle Nachproduktionen möglich werden.

Einen entscheidenden Vorteil, den ein Screening dieser Art gegenüber anderen Methoden, wie einer heterologen Expression [17] oder einer Transposonmutagenese [18] bietet, ist die schnelle Durchführbarkeit. Der benötigte Zeitrahmen einer RBK, bevor mit der Testung und Aufreinigung begonnen werden kann, liegt, je nach Umfang der durchgeführten Testreihen, bei 3 bis 6 Wochen. Vergleicht man hier Zeiträume, die zur Erzeugung genetischer Konstrukte und deren Einbringung in die heterologen Wirte benötigt werden [14], so wird deutlich, dass eine verfahrenstechnische Produktionsverbesserung eine wesentlich schnellere Alternative sein kann. Auch Ansätze wie eine zufällige Mutagenese oder ein gezielter Promotoraustausch können sehr zeitaufwändig (oder unmöglich) sein, wenn zuerst eine Mutagenisierungsstrategie entwickelt- oder hunderte von Klonen gescreent werden müssen [14, 19]. Aus diesem Grund empfiehlt sich im Vorfeld eine verfahrenstechnische Produktionsanalyse, um das biosynthetische Potenzial eines Kandidatenstammes zu evaluieren. Vorteilhaft wäre auch der Einsatz bei Experimenten wie denen, die, durch Einsatz molekularbiologischer und analytischer Techniken, zur Entdeckung der Myxoprincomide geführt haben [20]. Der Vorteil einer RBK liegt in der Reproduzierbarkeit von Kultivierungsbedingungen, die in Schüttelbioreaktoren in der Regel nicht gewährleistet werden können. Dadurch wird eine statistische Analyse massenspektrometrischer Daten von Kulturextrakten durch geringere Varianzen vereinfacht.

Ein entscheidender Vorteil, den eine Kultivierung von Mikroorganismen in Bioreaktoren mit einer umfangreichen Online-Analytik bietet, liegt in der meist automatisierten Aufzeichnung prozessrelevanter Daten. Zusätzlich besteht die Möglichkeit eine kontrollierte Umgebung zu erzeugen, die bei Bedarf reproduziert werden kann. Diese Faktoren sind bei geschüttelten Kulturgefäßen nur mit erheblichem Aufwand messbar, weshalb die dargestellten Versuche überwiegend in kleinen Bioreaktoren durchgeführt wurden. Die Vorbereitung der Bioreaktoren und deren Messsensorik haben zwar aufwändige Kalibrierungs- und

Justierungsvorgänge im Vorfeld einer Kultivierung zur Folge, durch Anwendung sich wiederholender Kultivierungszyklen mit einer Einzelkultur (siehe Kapitel 2 „*Repeated-Batch-Verfahren für ein Wirkstoffscreening mit Prozessverbesserung*“) kann die Zahl der Messzyklen pro Kalibrierung jedoch nahezu beliebig gesteigert werden, wodurch sich dieser Aufwand relativiert. Dies ermöglichte die Evaluierung des Einflusses physikalischer und chemischer Parameter auf die Produktion verschiedener Substanzen in relativ kurzer Zeit. Die gewonnenen Erkenntnisse konnten nachfolgend bei der Umsetzung von Kultivierungen in größerem Maßstab angewendet werden.

Da die Art der Produktion direkten Einfluss auf die Zusammensetzung der erzeugten Extrakte und damit auf das *Downstreamprocessing* hat, wurden diese Faktoren während des Screenings ebenfalls berücksichtigt. Betrachtet man den gesamten Prozess von der Kultivierung bis zur Reinsubstanz als eine Reihe direkt voneinander abhängiger Einzelschritte, so wird deutlich, dass Veränderungen in frühen Prozessabschnitten eine wesentliche Vereinfachung späterer Arbeitsschritte bedeuten können. Ein erfolgreiches Beispiel hierfür stellt die verbesserte Produktion von Myxoprincomiden [20] dar. Im ursprünglich verwendeten Casiton-basierten Medium war die Ausbeute gering und die Aufreinigung aufgrund co-eluierender Peptide schwierig. Die Verwendung eines definierten pO_2 über den gesamten Kultivierungszeitraum, in Kombination mit einem Ganzzell-Hefemedium, welches die Aufreinigung nicht störte, konnte in diesem Fall Abhilfe schaffen. Dadurch wurde sowohl die Produktion verbessert als auch die Aufreinigung vereinfacht (Daten nicht gezeigt).

Durch die Identifizierung verbesserter Produktionsbedingungen konnten beispielsweise die Ausbeuten der bromierten Chondramide erhöht und die unerwünschter Substanzen reduziert werden, wodurch eine Aufarbeitung erheblich erleichtert wurde. Durch die Verdoppelung der Biomasse in Kombination mit angepassten Kultivierungsbedingungen konnten die Chondramidausbeuten sogar noch weiter gesteigert werden. Dies zeigt, dass hohe Zelldichten bei günstigen Produktionsbedingungen unter Umständen die besten Resultate bezüglich einer Substanzproduktivität liefern können (siehe Abbildung 7.2). Aus diesem Grund sollte das Ziel eines ökonomischen Prozesses die Erzeugung großer Mengen an produzierender Biomasse sein. Unter Umständen müssen produktionsinhibierende Wirkungen großer Zellmengen durch verfahrenstechnische Mittel wie eine Perfusions- oder Chemostatkultivierung verhindert bzw. umgangen werden [16]. In Kapitel 5 „Kontinuierliche Produktionsprozesse“ konnte beispielsweise gezeigt werden, dass durch die Kombination von verbesserten Kultivierungsbedingungen mit einer an den Organismus angepassten Kultivierungsform, Ausbeuten an Piperazinen dermaßen gesteigert wurden, dass eine Aufreinigung dieser Substanzen überhaupt erst möglich war. Hohe Zelldichten wurden in diesem Fall durch einen Perfusionsprozess realisiert.

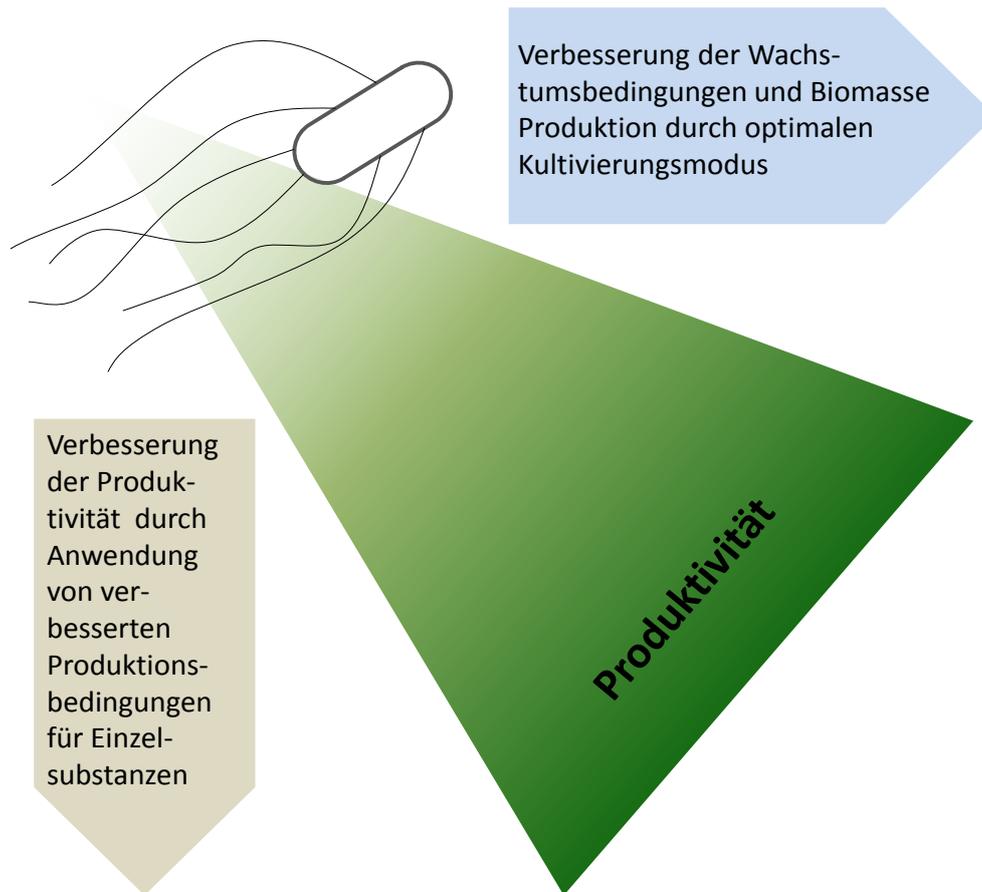


Abbildung 7.2: Zusammenhang der Produktivität mit dem Prozess und den Kultivierungsbedingungen.

Die Produktion größerer Substanzmengen ist in der Regel nur mit ausreichend Biomasse realisierbar. Durch geeignete Prozessführung kann dieses Ziel erreicht werden. Die Aufgabe des Prozessingenieurs ist es genügend Biomasse zu erzeugen und diese dann entsprechend der gewünschten Substanz zu einer Produktion zu stimulieren. Diese Stimulation erfolgt in der Regel durch Variationen der Kultivierungsbedingungen. Diese Variationen können die Zufuhr spezifischer Induktoren, Änderungen physikalischer Parameter aber auch beispielsweise eine konstante Detoxifikation sein. Der Prozess kann dementsprechend an die Gegebenheiten, die im Vorfeld ermittelt werden müssen, angepasst werden.

Wenn bei einem Wirkstoffscreening mit Mikroorganismen ausschlaggebende Faktoren, wie beispielsweise verbesserte Produktionsbedingungen, frühzeitig berücksichtigt werden, dann kann der Gesamtprozess der Wirkstofffindung wesentlich beschleunigt werden, wie anhand der Chondramide gezeigt werden konnte (siehe Kapitel 3 und 4). Die mit dem Myxobakterium SBCm007 entwickelten Methoden zeigen Wege und Arbeitsweisen, die in angepasster Form bereits erfolgreich mit anderen Bakterien eingesetzt werden konnten (Beispiele finden sich in Kapitel 6, „Strukturen“). Dies zeigt, dass durch Anwendung dieser Techniken auch die Wirkstoffsuche mit anderen Mikroorganismen profitieren kann und die Produktivität und der „Output“ eines bioaktivitätsbasierten Wirkstoffscreenings wesentlich verbessert werden kann. Abbildung 7.3 stellt noch einmal schematisch den Arbeitsablauf dieses Screeningprozesses dar.

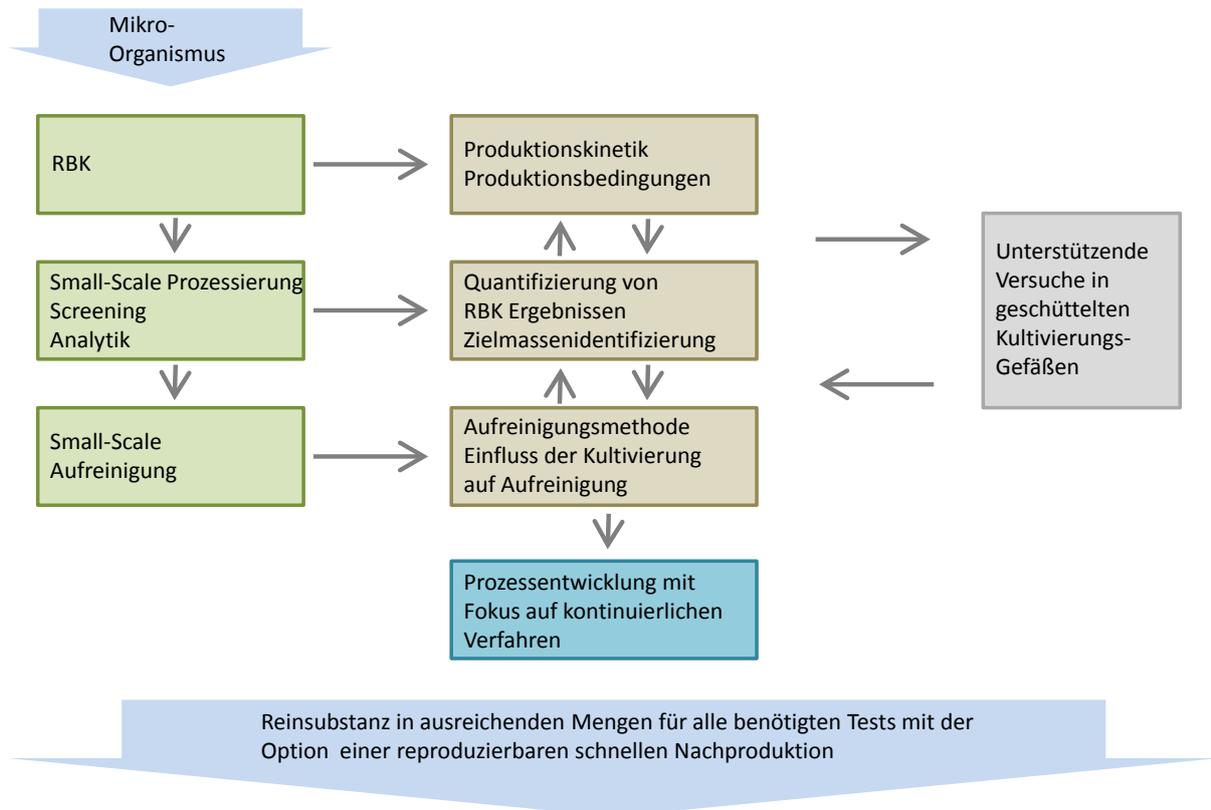


Abbildung 7.3: Schematische Darstellung des RBK-Screeningprozesses. Die grünen Felder stellen die aufeinander folgenden Schritte der Produktion und des Screenings mit bioaktivitätsgeleiteter Aufreinigung aus den RBK-Extrakten dar. In Braun nebenangestellt sind die jeweiligen „outputs“ die für eine verbesserte hochskalierte Anwendung ausschlaggebend sind. In Grau dargestellt ist die Möglichkeit einzelne einfache Fragestellungen mittels geschüttelter Kulturen zu bearbeiten. Das Ziel ist eine reproduzierbare und schnelle Nachproduktion einer biologisch aktiven Substanz, welche unter Berücksichtigung der gesamten Erkenntnisse und deren Anwendung auf einen kontinuierlichen Prozess erreicht werden soll.

Die in Grün dargestellten Felder stellen die zeitlich aufeinanderfolgenden Schritte von der Kultivierung, über die im Kleinmaßstab stattfindende Aufarbeitung und Testung der Extrakte, bis zur Aufreinigung von Substanzen aus den RBK-Extrakten dar. Die braunen Felder stellen Informationen dar, die aus den jeweiligen Schritten gewonnen werden können. Wird beispielsweise festgestellt, dass die Aufreinigung eines biologisch aktiven Peptides durch Einsatz eines Peptonmediums wesentlich erschwert wird, können über RBK quantitative Aussagen über den Erfolg einer Substitution dieses Mediums mit einem anderen getroffen werden. Definierte Zielsubstanzen können aus dem besten RBK-Extrakt aufgereinigt oder unter verbesserten Bedingungen in einem kontinuierlichen Verfahren nachproduziert werden. Unterstützend können, wie in Grau dargestellt, Versuche in Schüttelkolben durchgeführt werden (wie beispielsweise im Fall der in Kapitel 2.2.4 beschriebenen Fütterungsexperimente).

Das endgültige Ziel ist die Entwicklung eines Prozesses der einen zuverlässigen Nachschub eines interessanten Naturstoffes ermöglicht, wenn dieser nicht synthetisch zugänglich ist. Hierfür sind besonders kontinuierliche Prozesse geeignet. Durch erste Versuche, wie die kontinuierliche Aetheramid- und Piperazinproduktion, konnte bereits gezeigt werden, dass kontinuierliche Prozesse neben klassischen *Batch*-Prozessen konkurrenzfähig sind. Da diese Vorversuche bisher nur wenige konkrete Zahlen geliefert haben (aufgrund der Tatsache, dass im Zuge dieser Arbeiten lediglich zwei Organismen verwendet wurden), ist eine zuverlässige Abschätzung der Wirtschaftlichkeit für andere Prozesse und andere Myxobakterien schwierig. Sollten sich aber weitere Versuche als ähnlich erfolgreich erweisen, so steckt offensichtlich enormes Potenzial in einer kontinuierlichen Prozessführung.

Ein Upscaling des Kulturvolumens zu größeren Maßstäben dürfte mit Myxobakterien kaum Probleme bereiten. Die üblicherweise limitierenden Faktoren, wie Mischzeit und Sauerstoffversorgung, die bei einer Maßstabsvergrößerung von Rührkesselreaktoren relevant werden [16], spielen bei den langsam wachsenden Myxobakterien in der Regel keine Rolle. Durch entsprechende einfach realisierbare Konstruktionen könnten auch Reaktoren im Kubikmetermaßstab kontinuierlich betrieben werden. Dies würde die Produktivität im Vergleich zu einer einfachen, mehrfach hintereinander ausgeführten *Batch*-Kultivierung um ein Vielfaches erhöhen. Die Gründe hierfür liegen im immensen Vorbereitungs- und Aufarbeitungsaufwand, der dadurch wesentlich reduziert würde [16]. Auch dürfte die Produktivität, die beim Erreichen der stationären Phase eines kontinuierlichen Prozesses weit höher sein kann als bei einem vergleichbaren *Batch*-Prozess, hier letztendlich ausschlaggebend sein.

Infektionen durch Viren und Mikroorganismen, Krebs und verschiedenste andere Erkrankungen erfordern einen ständigen Nachschub an therapeutisch verwendbaren Molekülen, nicht zuletzt durch Resistenzentwicklung der Mikroorganismen oder der entarteten Zellen gegen bereits vorhandene Pharmazeutika [1-8]. Die Natur stellt uns hierfür ein riesiges Reservoir an bislang unentdeckter chemischer Vielfalt zur Verfügung, welches mittels entsprechender Methoden entdeckt und erforscht werden kann. Die Chancen neue biologisch aktive Moleküle in natürlichen Quellen zu finden sind hoch, da Naturstoffe evolutionär an mögliche Zielstrukturen angepasst wurden [1-8]. Besonders Mikroorganismen sind aufgrund ihres ubiquitären Vorkommens und ihrer Anpassungsfähigkeit an extremste Bedingungen vielversprechende Quellen dieser Substanzen [1-8]. Es bestehen jedoch immer noch technische Schwierigkeiten bei der Identifizierung dieser Moleküle. Ein Ansatz zur Lösung dieser Probleme, besteht in der immer weiteren Verfeinerung der Analytik- und Nachweismethoden um selbst Spuren von Substanzen nachweisen und messen zu können. Dadurch sind für eine Charakterisierung von Metaboliten bereits sehr geringe

Substanzmengen ausreichend. Ein anderer Ansatz besteht darin entsprechende Produzenten zu isolieren und kontrolliert zu kultivieren und die produzierten Substanzmengen durch Änderung der Kultivierungsbedingungen zu erhöhen. Hierfür bietet die Bioverfahrenstechnik interessante und sowohl ökologisch als auch ökonomisch vertretbare Ansatzpunkte. Mit der vorliegenden Arbeit wurde versucht beide Ansätze zu vereinigen, um den größtmöglichen Erkenntnisgewinn und praktischen Nutzen aus allen während des Screenings produzierten Daten zu erzielen. Dies ist vor allem im Hinblick auf eine spätere Nachproduktion von Substanzen von Bedeutung, die zu Beginn eines Screeningprojektes oftmals noch nicht abzuschätzen ist. Aufgrund der hohen Chance in mykobakteriellen Extrakten auf neue Substanzen zu stoßen, lohnt sich jedoch die Durchführung eines Screenings der hier vorgestellten Art. Dadurch können im Folgenden viele Arbeitsschritte, die aus der Entdeckung einer Zielsubstanz resultieren, beschleunigt oder eingespart werden. Dies kann entscheidend bei der Nachproduktion und schnellen pharmazeutischen Evaluierung dieser dringend benötigten Substanzen sein.

8 MATERIAL UND METHODEN

8.1 CHEMIKALIEN UND LÖSEMITTEL

Es wurden Chemikalien verschiedener Hersteller verwendet, wobei darauf geachtet wurde das eine generelle Anwendbarkeit bestand und dass keine spezifische Chargen einzelner Chemikalien benötigt wurden (wenn doch wurde dies im Text gekennzeichnet). Für die analytische Chromatographie wurden vor Ort destillierte Lösemittel und H₂O-bidest verwendet. Für die präparative Chromatographie wurden Lösemittel der Qualität „HPLC-Grade“ verwendet.

8.2 GERÄTE UND EINSTELLUNGEN

8.2.1 BIOREAKTOREN

Für alle Tests wurde ein Labfors 3 Bioreaktor der Firma Infors (Schweiz) ausgestattet als mikrobielle Version verwendet. Die Gefäßgröße betrug 2 bzw. 13 l. Die Prozesskontrolle wurde mittels der Software IRIS 5.2 durchgeführt. Die Gefäße waren jeweils mit polarographischen Sauerstoffelektroden (Mettler Toledo) für die gelöstsauerstoffmessung ausgestattet. Diese wurden vor den Kultivierungen nach einer 6-stündigen Polarisationsphase mittels einer 2-Punkt Kalibration eingestellt (N₂, Raumluft). Die pH Messung erfolgte mit Elektroden des gleichen Herstellers. Vor dem Autoklavieren wurden diese einer 2-Punkt Kalibration bei pH 4,01 und 7,00 unterzogen. Die Abgasanalyse (BlueSens) bestand aus einer Sauerstoffmesszelle (Messprinzip: Zirkonium-Dioxid) und einer CO₂-Messzelle (Messprinzip: Infrarot). Der Massflowcontroller (Voegtlin) der für die RQ, CER und OUR Berechnung eingesetzt wurde hatte einen Arbeitsbereich von 0, 2 l/min bis 5 l/min.

Folgende Reglerparametrierung wurde für die beschriebenen Versuche verwendet (diese muss unter Umständen an das verwendete Gerät zur simultanen CO₂ und O₂ Kontrolle angepasst werden um einem Aufschwingen der Regelkreise vorzubeugen):

Stirrer: min 100, max 800; P 0,2; I 0,2.

Flow: min 0, max 1,5; P 0,7; I 0,2.

Die Bestimmung des k_a -Wertes erfolgte mittels der dynamischen Methode ohne Sauerstoffverbraucher. Hierfür wurde der Bioreaktor auf Kultivierungsniveau mit Wasser

gefüllt, wobei auf eine identische Anordnung der Innenbauteile wie bei einer Kultivierung geachtet wurde, anschließend wurde der Sauerstoff mittels Stickstoffbegasung aus der Lösung entfernt. Um den k_a bei Durchgasung der Flüssigkeit mit verschiedenen Rührerdrehzahlen und Begasungsraten festzustellen wurden Messungen mit allen Kombinationen an Flussraten und Rührerdrehzahlen durchgeführt. Nach jeder Einzelmessung wurde das System wieder mittels Stickstoffgas sauerstofffrei gemacht. Für die Bestimmung des Einflusses des Kopfraums wurde ebenfalls vor der Messung Sauerstoff entfernt und daraufhin bei konstantem Gasaustausch des Kopfraums und verschiedenen Rührerdrehzahlen gemessen. Die einzelnen Werte wurden mittels Matlab als Fläche dargestellt die ebenfalls im gemessenen Bereich für Berechnungen herangezogen werden kann.

Die maximal lösliche Konzentration von Sauerstoff in H_2O bei $30^\circ C$ beträgt $7,083 \text{ mg/l}$, was nach entsprechender Kalibration der polarographischen Elektroden einem gemessenen pO_2 von 100% entspricht. Der Anstieg zwischen $1,0\text{-}2,5 \text{ mg/l}$ war unter allen untersuchten Bedingungen linear und wurde für eine k_a Berechnung mittels folgender Formel verwendet:

$$k_a = \frac{\ln\left(\frac{7,083 \frac{\text{mg}}{\text{l}} - 2,500 \frac{\text{mg}}{\text{l}}}{7,083 \frac{\text{mg}}{\text{l}} - 1,000 \frac{\text{mg}}{\text{l}}}\right)}{t_{2,5} - t_{1,0}} \quad (8.1)$$

Wobei t_1 den Zeitpunkt bei Erreichen von $1,00 \text{ mg/l}$ Sauerstoffsättigung darstellt und $t_{2,5}$ den bei Erreichen von $2,50 \text{ mg/l}$.

Die gesamte Programmierung und Automatisierung von Kultivierungen erfolgte über die Software IRIS, die eine direkte Kontrolle der Bioreaktoren über einen PC ermöglicht. Zusätzlich enthält sie auch ein einfaches Programmiermodul, welches eine sogenannte eventbasierte Steuerung anhand von ausgelesenen Messwerten erlaubt. Möglich sind auch zeitliche Steuerungsevents und die Berechnung sogenannter kalkulierter Parameter, aus Messwerten von Sensoren, wie RQ, CER und OUR. Durch Verwendung globaler Variablen können mehrere miteinander gekoppelte Bioreaktoren gesteuert werden und ermöglichen so beispielsweise die automatisierte Entfernung von Kulturüberstand aus einem Bioreaktor und anschließende Inkubation desselben mit XAD, sowie eine automatische Frischmedien-Befüllung des Kulturreaktors bei RB-Kultivierungen.

8.2.2 NMR

NMR-Spektren wurden entweder auf einem Bruker DRX 500 MHz Spektrometer (1H bei 500 MHz , ^{13}C bei 125 MHz) ausgestattet mit einer 5 mm Probe oder einem Bruker Ascend 700 MHz Spektrometer (1H bei 700 MHz , ^{13}C bei 175 MHz) ausgestattet mit einer 5 mm TXI Cryo-Probe gemessen. Standardmäßig wurden 1H , DQF-COSY, HSQC und HMBC Daten

aufgenommen. Das HSQC Experiment wurde auf $^1J_{C-H} = 145$ Hz optimiert, das HMBC Experiment auf $^{2,3}J_{C-H} = 8$ Hz. Abweichende Werte werden jeweils explizit angegeben.

8.2.3 MASSENSPEKTROMETRIE

8.2.3.1 MS und HPLC/MS (Standardanalytik)

HRMS Daten von Reinsubstanzen wurden per Direktinfusion einer Reinsubstanz in 50:50 H₂O/Acetonitril mit 0,1% Ameisensäure mit einem Thermo Fischer Orbitrap Massenspektrometer, welches mittels einer Advion Nanomate mit integrierter Mikrofluidik beschickt wurde, aufgenommen.

Bei dem verwendeten Chromatographiesystem handelte es sich um eine Dionex Ultimate RSLC Anlage. Die Trennung wurde auf einer Waters BEH C18 Säule (100 x 2,1 mm; mit 1,7 µm Partikeldurchmesser (wenn nicht anders angegeben)) mittels eines linearen Gradienten von (A) H₂O + 0,1% Ameisensäure nach (B) Acetonitril + 0,1% Ameisensäure bei einer Flussrate von 600 µl/min und 45°C durchgeführt. Der Gradient erfolgte nach einem 0,5 min dauernden isokratischen Schritt bei 5% B bis zu einer Konzentration von 95% B innerhalb von 18 min, gefolgt von einem weiteren isokratischen Schritt bei 95% B. UV-Spektren wurden mittels eines Diodenarray-Detektors (DAD) im Wellenlängenbereich 200-600 nm aufgenommen. Für die Aufnahme von Massenspektren wurden zwei verschiedene Geräte verwendet. Für das maXis 4G hr-ToF Massenspektrometer (Bruker Daltonics, Bremen Germany) wurden 75 µl vom Fluss gesplittet und mittels einer Standard ESI-Quelle ionisiert. Die Massenspektren wurden im Bereich zwischen 150-2000 m/z mit 2 Hz aufgenommen. Für das Advion Triversa nano-ESI System, welches an ein Thermo Fisher Orbitrap Massenspektrometer gekoppelt war, wurden die Spektren zwischen 200-2000 m/z bei einer Auflösung von $R = 30000$ aufgenommen. Die Massenspektren wurden ohne Fragmentierung im positiven und im Falle des TOF-Gerätes mittels eines zusätzlichen Laufs im negativen Ionisierungsmodus aufgenommen.

8.2.3.2 GC/MS (Zuckeranalytik)

Jeweils 200 µg Probe und Standard wurden 5 h bei 100°C in 3 N Salzsäure hydrolysiert, anschließend getrocknet und in 10 µl Trifluoressigsäure und 90 µl [N-methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide] (MSTFA) resolvatisiert. Nach 20 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die GC/MS Analyse auf einem Agilent 6890N Gaschromatographen mit einem 5973 *Mass Selective Electron Impact* Detektor und einem 7683B *Injector* (Agilent) durchgeführt. Die Trennung erfolgte auf einer Dimethyl-(5% phenyl)-polysiloxane Kapillarsäule (Agilent DB-5ht, 0.25 mm, 30 m, bei 0.1 µm). Helium wurde bei einer Flussrate von 1 ml/min als Trägergas verwendet. 5 µl der Probe wurden im Split Modus injiziert (Splitverhältnis, 10:1).

Die Säulentemperatur wurde für 5 min bei 70°C gehalten, und dann mit 5°C/min auf 300°C angehoben und dort wieder für 5 min gehalten. Die Inlet-Temperatur betrug 250°C; GC-MS *Transfer-Line*, 280°C; Ionen Quelle, 230°C; Quadrupol, 150°C. Der massenselektive Detektor wurde im Scan-Modus zwischen 40 m/z und 700 m/z betrieben. Die Datenanalyse erfolgte mit AMDIS, Version 2.68 und der NIST Datenbank08.

8.2.3.3 Bestimmung von Unterschieden in der Produktivität mittels MS

Die an Amberlite XAD16 gebundenen Metabolite werden mit Methanol eluiert. Die Extrakte werden gewogen und anschließend mit Methanol, welches einen internen Standard (Sulfadimethoxin 6.75 mg/l) enthält, in einer definierten Konzentration gelöst. Für einen Vergleich der relativen Produktivitätsunterschiede einzelner Extrakte wird die Peakfläche einer Substanz auf den internen Standard normiert. Dadurch können verschiedene Extrakte miteinander verglichen werden. Durch Einbeziehung der Extraktmengen können Einzelkultivierungen direkt miteinander verglichen werden und absolute Produktivitätsunterschiede errechnet werden. Da Substanzen je nach chemischer Beschaffenheit unterschiedlich ionisieren lassen diese Ergebnisse keine Rückschlüsse auf exakte Substanzmengen zu, solange keine Eichgeraden dieser Substanzen erzeugt wurden.

8.3 VERWENDETE MIKROORGANISMEN

8.3.1 MYXOBAKTERIEN

SBCm002 (*Chondromyces sp.*),

SBCm004 (*Chondromyces sp.*),

SBCm007 (*Chondromyces sp.*),

Diese Stämme wurden von Ronald Garcia isoliert und (zumindest vorläufig) der Gattung *Chondromyces* zugeordnet.

8.3.2 ANDERE MIKROORGANISMEN

Xenorhabdus szentirmaii,

Saccharomyces cerevisiae,

Der *Xenorhabdus* Stamm wurde in China von einem Kooperationspartner isoliert und wurde in Zusammenarbeit mit der Firma GeneBridges untersucht.

8.4 KULTIVIERUNG DER MIKROORGANISMEN

8.4.1 MEDIEN UND MEDIENZUSÄTZE

8.4.1.1 VY2 Medium (1l)

5 g Bäckerhefe (Wonnemeyer Feinkost)

1g $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$

1.5 g HEPES

100 μl Vitaminlösung

pH 7.2 mittels KOH einstellen

8.4.1.2 M9-Minimalmedium (1l)

6.87 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$

3 g KH_2PO_4

1 g NH_2Cl

4 g Glukose

2 ml MgSO_4 Lösung (1M)

100 μl CaCl_2 Lösung (1M)

2 ml Spurenelementlösung

pH 7.0 eingestellt mit KOH

8.4.1.3 Vitaminlösung (10 ml)

4 mg Biotin

64 mg Natrium-Pantothenat

64 mg Nicotinamid

64 mg Pyridoxal HCl

14 mg Para-Amino Benzoessäure

14 mg Kobalamin

8.4.1.4 Spurenelementlösung (1l)

40 mg ZnCl_2

200 mg $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$

10 mg $\text{CuCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$

10 mg $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$

10 mg $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \times 10\text{H}_2\text{O}$

10 mg $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \times 4\text{H}_2\text{O}$

8.4.2 KULTIVIERUNG DER MIKROORGANISMEN

Die Kultivierungen wurden wenn nicht anders angegeben in VY2 Medium durchgeführt da dieses sich als kostengünstiges Medium speziell für die *Chondromyces*-Kultivierung erwiesen hatte, welches kaum Schaumbildung im Bioreaktor erzeugte und bei der Aufreinigung von Substanzen nicht störte. Die Kultivierung des *Xenorhabdus*-Stammes und der Bäckerhefe erfolgte in M9-Minimalmedium. Für die benötigten Festmedien wurden jeweils 15 g/l Agarose zu den Flüssigmedien zugefügt. Die Konservierung der Organismen erfolgte in 20% DMSO (Dimethylsulfoxid) und Flüssigmedium durch Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff und anschließender Lagerung bei -80°C . Als Arbeitsstock wurden Bakterien auf entsprechendes Festmedium gebracht und bei 30°C inkubiert. Von dort aus wurde bei Bedarf das Flüssigmedium in Schüttelgefäßen inokuliert.

Inokulation von Bioreaktoren erfolgte mit 10% des Reaktorvolumens aus einer Schüttelkultur. Zur Aufrechterhaltung des pO_2 wurden zwei Methoden verwendet die jeweilige Methode wird im Text angegeben. Bei der Aufrechterhaltung mittels der Rührerdrehzahl wird bei Erreichen eines unteren Grenzwertes die Rührerdrehzahl erhöht. Bei der Variante mit Aufrechterhaltung durch die Begasungsrate erfolgt bei Erreichen des Grenzwertes eine Hochregulierung der Flussrate. Die Aufrechterhaltung des pH-Wertes wurde durch 200 mM KOH bzw. 100 mM H_2SO_4 erreicht.

Die Abreicherung von Kulturüberständen wurde in der Regel mit Amberlite XAD16 durchgeführt. Bei *Batch*-Prozessen erfolgte eine verzögerte Addition (wenn nicht anders angegeben 2% des Kultivierungsvolumens) nach 24-48 Stunden, um eine zu starke Bindung von unverbrauchten Medienbestandteilen an das XAD16 zu verhindern. Bei Fed-Batch Prozessen erfolgte ein analoges Vorgehen. Bei einer nachträglichen Inkubation des XAD16 am Ende des Prozesses mit den Kulturüberständen wurde 0,5-1,0 h inkubiert und der Überstand anschließend verworfen.

8.5 AUFARBEITUNG VON EXTRAKTEN

8.5.1 LÖSEMITTELEXTRAKTION VON XAD16 UND BIOMASSE

Das zu extrahierende Material wurde gefriergetrocknet und anschließend einer Lösemittlextraktion unterzogen. Dabei wurden nacheinander verschiedene Lösemittel verwendet, jeweils beginnend mit unpolaren (Hexan/Heptan) in Richtung polarer (Methanol). In der Regel wurden alle Extraktionsschritte zweimal mit jeweils einem Lösemittel durchgeführt. Gute Vorseparation konnte mit *Chondromyces*-Biomasse und XAD16 bei Verwendung von Heptan, Chloroform, Ethylacetat und Methanol in dieser Reihenfolge erreicht werden.

8.5.2 GRÖßENAUSCHLUSS-CHROMATOGRAPHIE

Die Größenausschluss-Chromatographie erfolgte über Sephadex LH20 Material mit Methanol als mobiler Phase. Maximal ein Prozent des Bettvolumens wurde gelöst aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte mit einer Flussrate von ca. 10 Tropfen pro Minute was mittels einer Schlauchklemme am unteren Ende der Säule eingestellt wurde.

8.5.3 KIESELGELCHROMATOGRAPHIE

Die Fraktionierung erfolgte durch Aufziehen des Extrakts auf einer kleinen Menge Kieselgur. Dieses wurde unter Vakuum eingetrocknet und anschließend oben auf einer mit einer Hexan/Kieselgelschlämme gefüllten Chromatographiesäule aufgebracht. Die Auftrennung erfolgte dann über jeweils das zweifache Säulenvolumen mit jeweils einer Lösemittelfraktion. Als Gradient wurde Hexan, Chloroform, Chloroform/Methanol Gemische mit jeweils 10% höheren Methanolanteilen in nachfolgenden Fraktionen und anschließen mit reinem Methanol verwendet.

8.5.4 PRÄPARATIVE HPLC

Die Aufarbeitung an der HPLC erfolgte unter Verwendung verschiedener Reverse-Phase Säulen mit Lösemittelgradienten die den jeweiligen Bedürfnissen entsprechend angepasst waren. Als Lösemittel wurden Wasser/Acetonitril bzw. Wasser/Methanol Gemische verwendet die entweder mit 0,05- 0,1% Trifluoressigsäure oder Ameisensäure versetzt waren oder um basische Bedingungen zu erzeugen mit 0,1% Ammonium-Formiat, wobei der gewünschte pH mittels Ammoniak eingestellt wurde.

8.6 ZELLKULTUR

Die verwendeten Zelllinien wurden von der American Type Culture Collection (ATCC) oder der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) bezogen. HUVEC Zellen stammten von PromoCell. Die Zelllinien wurden unter Standardkulturbedingungen in einem Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Die gesamten Versuche im Bereich Zellkultur wurden von Jennifer Herrmann durchgeführt.

8.6.1 UNTERSUCHUNGEN ZUR WACHSTUMSHEMMUNG VERSCHIEDENER ZELLINIEN

In 96-Well Platten (Corning CellBind®) wurden 6×10^3 Zellen pro Well in 180 µl des jeweiligen Mediums eingesät. Nach einer kurzen Äquilibrationsphase erfolgte eine direkte Behandlung mit den in Methanol gelösten Substanzen in serieller Verdünnung in Duplikaten. Nach 5 Tagen Inkubation wurden 20 µl einer 5 mg/ml 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) Lösung in PBS (Phosphat-gepufferte Saline, pH 7.4) zugefügt und die Platten wurden weitere 2 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Medium verworfen und die Zellen mit 100 µl PBS gewaschen. Dann wurden 100 µl 2-Propanol/10 N HCl (250:1) zugefügt um entstandenes Formazan zu lösen. Die Absorptionsintensität des violetten Formazans wurde bei 570 nm mittels eines Mikrotiterplattenlesers (EL808, Bio-Tek Instruments Inc.) gemessen. Die Zellviabilität wurde in Prozent relativ zur Methanolkontrolle angegeben. GI₅₀-Werte wurden berechnet indem ein sigmoidaler Fit durch die Messwerte gelegt wurde.

Die Testung von Fraktionen wurde analog durchgeführt jedoch wurden hier 1.2×10^4 Zellen pro Well verwendet und die Inkubation mit MTT erfolgte bereits nach zwei Tagen.

8.6.2 HCS-ASSAY AUF LYSOSOMALE INTEGRITÄT

In 96-Well Platten (96-Well Imaging Plate, BD Falcon) wurden 5×10^3 humane U-2-OS Osteosarkom-Zellen pro Well in 100 µl McCoy's5A Medium (10% FBS) eingesät. Nach über Nacht Equilibrierung wurden die Zellen für 4 h mit den Proben (Konzentrationen wie in Abbildungen angegeben), inkubiert. Für die Lysosomenfärbung wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Dann wurden 10 µg/ml Hoechst33342 (Molecular Probes) und 5 µg/ml Acridin Orange in PBS zugefügt und die Zellen wurden für 15 min inkubiert. Nach erneutem Waschen mit PBS wurden die Zellen bei 200-facher Vergrößerung mit einem automatisierten Mikroskop (BD-Pathway 855) abgebildet.

Acridin Orange zeigt eine grüne Fluoreszenz in pH-neutralen Zellkompartimenten und akkumuliert in sauren Kompartimenten, wobei der so angereicherte Farbstoff eine

Fluoreszenz im roten Bereich zeigt. Die Auswertung erfolgte basierend auf der hohen Fluoreszenzintensität (rot) von Lysosomen mit saurem pH in lebenden Zellen. Ändert sich der lysosomale pH (basischer) verschwindet die rote Fluoreszenz von Acridin Orange.

8.6.3 HCS-ASSAY AUF AKTIN-FILAMENTE

Humane U-2-OS Zellen wurden wie oben beschrieben in 96-Well Platten eingesät und behandelt. Für die Immunfluoreszenz- oder Acti-stain™ 555 (Cytoskeleton Inc.) Färbung wurden die Zellen mit eiskaltem (-20°C) Aceton/Methanol (1:1) für 10 min oder mit 3% Paraformaldehyd in PBS bei Raumtemperatur fixiert. Nach dem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit 0,01% (0,5% bei Acti-stain™ 555) Triton-X 100 in PBS permeabilisiert. Für die Immunfärbung wurden die Zellen mit folgender Antikörperkombination behandelt: β -Aktin mAb (1:2000, Sigma)/Ziege-anti-Maus-Alexa 488 (1:1000, Molecular Probes) verdünnt in PBS/10% fötalem Kälberserum (FBS). Die Zellen wurden 45 min bei 37°C mit dem primären Antikörper inkubiert und anschließend mit dem sekundären Antikörper unter den gleichen Bedingungen. Die Aktinfärbung mit Actistain™ 555 phalloidin (100 nM in PBS) wurde bei Raumtemperatur für 30 min durchgeführt. Für beide Ansätze wurden die Kerne mittels Hoechst33342 (5 μ g/ml, Molecular Probes) gefärbt und eine Ganzzellfärbung mittels HCS CellMask™ Red stain (1 μ g/ml, Invitrogen) wurde ebenfalls nach der Immunfärbung durchgeführt. Die Zellen wurden mit einem automatisierten Mikroskop (BD-Pathway 855) abgebildet.

Die Auswertung erfolgte basierend auf der Standardabweichung (SD) der Aktin-Fluoreszenzintensität innerhalb einzelner Zellen, gemittelt über die jeweilige Probe. Durch Behandlung mit aktin-stabilisierenden Substanzen steigt die SD.

8.6.4 AKTIN-POLYMERISATIONS-ASSAY

Fluoreszenzbasierte Aktin-Polymerisations-Assays wurden mit Pyrene-Muscle-Actin (Cytoskeleton Inc.) entsprechend dem Hersteller-Protokoll durchgeführt. Dafür wurden Chondramide in Nidrigsalz-Puffer (5 M Tris-HCl pH 8,0; 0,2 mM CaCl₂; 0,2 mM ATP; 1 mM Dithiothreitol (DTT); nicht-polymerisierend) gelöst und mit dem Pyren-Aktin welches im selben Puffer verdünnt wurde versetzt. Es wurde eine Endkonzentration von 20 μ M Chondramid und 5 μ M Aktin eingestellt. Die Proben wurden in schwarzen, 384-Well Platten (Corning, NBS™ surface) gemessen. Die Fluoreszenzintensität bei 405 nm (Anregung bei 360 nm) wurde alle 30 s für 85 min mit einem Mikrotiterplatten-Leser (Spectramax M5^e, Molecular Devices) aufgezeichnet. Die Experimente wurden in Duplikaten ausgeführt und die Berechnung des zeitlichen Anstiegs der Fluoreszenz erfolgte im linearen Bereich der Kurven.

9 LITERATUR

9.1 EINLEITUNG

1. J. Chiao, Z. Sun: **History of the acetone-butanol-ethanol fermentation industry in china: Development of continuous production technology.** Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology, **2007** (13), 12-14
2. K. A. Gray, L. Zhao, M. Emptage: **Bioethanol.** Current Opinion in Chemical Biology, **2006** (2), Number 10, 141-146.
3. Y. Chisti: **Biodiesel from microalgae beats bioethanol.** Trends in Biotechnology, **2008** (3), Number 26, 126-131.
4. J. Berdy: **Bioactive microbial metabolites a personal view.** The Journal of Antibiotics, **2005** (1), Number 58, 1-26.
5. R. R. N. Alves, L. L. Rosa: **Why study the use of animal products in traditional medicines?** Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine, **2005** (1), 5.
6. G. Yinfeng, Z. Xueying, C. Yan, W. Di, W. Sun: **Sustainability of wildlife use in traditional Chinese medicine.** Endangered Species Scientific Commission, PRC (<http://www.zd.brim.ac.cn/bwg-cciced/english/bwg-cciced/tech-34.htm>)
7. V. Brower: **Back to nature: Extinction of medicinal plants threatens drug discovery.** Journal of the National Cancer Institute, **2008** (12), Number 100, 838-839.
8. Datenreport 2011 der Stiftung Weltbevölkerung (<http://www.weltbevoelkerung.de/oberes-menue/publikationen-downloads/zu-unseren-themen/datenreport.html>)
9. I. Putzier, S. Frings: **Tiergifte in der biomedizinischen Forschung vom Jagdgift zur neuen Schmerztherapie.** Biologie in unserer Zeit, **2002** (3), Number 32, 148-158.
10. D. Mebs: **Vom Genom zum Venom was steuert die Giftigkeit bei Tieren?** Biologie in unserer Zeit, 2009 (4), Number 39, 250-257.
11. A. T. Dossey: **Insects and their chemical weaponry: New potential for drug discovery.** Natural Products Reports, **2010** (27), 1737-1757.
12. G. R. Hamilton, T. F. Baskett: **In the arms of Morpheus: The development of morphine for postoperative pain relief.** Canadian Journal of Anesthesia, **2000** (47), Number 4, 367-374.
13. H.W. Florey, K. Gilliver, M. A. Jennings, A.G. Sanders: **Mycophenolic acid an antibiotic from *Penicillium brevicompactum* DIERCKX.** The Lancet, **1946** (6385), Number 247, 46-49.
14. A. Flemming: **On the antibacterial action of cultures of a *Penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. influenza*.** The British Journal of Experimental Pathology, **1929** (10), 226-236.
15. D. D. Baker, M. Chu, U. Oza, V. Rajgarhia: **The value of natural products to future pharmaceutical discovery.** Natural Products Reports, **2007** (24), 1225-1244.

16. P. Fernandes: **Antibacterial discovery and development – the failure of success?** Nature Biotechnology, **2006** (24) Number 12, 1497-1503.
17. C. L. Cantrell, F. E. Dayan, S. O. Duke: **Natural products as sources for new pesticides.** Journal of Natural Products, **2012**
18. M. S. Butler: **Natural products to drugs: Natural product derived compounds in clinical trials.** Natural Products Reports, **2007** (25), 475-516.
19. J. W. H. Li, J. C. Vederas: **Drug discovery and natural products: end of an era or an endless frontier?** Science, **2009** (325), 161-165.
20. A. L. Harvey: **Natural products in drug discovery.** Drug Discovery Today, **2008** (13), Numbers 19/29, 894-901.
21. K. S. Lam: **New aspects of natural products in drug discovery.** Trends in Microbiology, **2007** (15), Number 6, 279-289.
22. B. E. Kirsop: **The convention on biological diversity: some implications for microbiology and microbial culture collections.** Journal of Industrial Microbiology, **1996** (17), 505-511.
23. F. E. Koehn, G. T. Carter: **The evolving role of natural products in drug discovery.** Nature Reviews Drug Discovery, **2005** (4), 206-220.
24. D. J. Newman, G. M. Cragg: **Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010.** Journal of Natural Products, **2012** (75), 311-335.
25. K. J. Weissman, P. F. Leadlay: **Combinatorial biosynthesis of reduced polyketides.** Nature Reviews Microbiology, **2005** (3), 925-936
26. M. Feher, J. M. Schmidt: **Property distributions: differences between drugs, natural products, and molecules from combinatorial chemistry.** Journal of Chemical Information and Computer Sciences, **2003** (43), 218-227.
27. G. Klebe, H.-J. Böhm: **Energetic and entropic factors determining binding affinity in protein-ligand complexes.** Journal of Receptor and Signal Transduction Research, **1997** (17), issue 1-3, 459-473.
28. <http://www.uniprot.org/>
29. <http://scop.mrc-lmb.cam.ac.uk/scop/>
30. A. G. Murzin, S. E. Brenner, T. Hubbard, C. Chotia: **SCOP: A structural classification of proteins database for the investigation of sequences and structures.** Journal of Molecular Biology, **1995** (247), 536-540.
31. M. Murata, T. Yasumoto: **The structure elucidation and biological activities of high molecular weight algal toxins: maitotoxin, prymnesins and zooxanthellatoxins.** Natural Product Reports, **2000** (17), 293-314.
32. B. E. Evans, K. E. Rittle, M. G. Bock, R. M. DiPardo, R. m: Freidinger, W. L. Whitter, G. F. Lundell, D. F. Veber, P. S. Anderson, R. S. L. Cang, V. J. Lotti, D. J. Cerino, T. B. Chen, P. J. Kling, K. A. Kunkel, J. P. Springer, J. Hirshfield: **Methods for drug discovery: development of potent, selective, orally effective cholecystokinin antagonists.** Journal of Medicinal Chemistry, **1988** (31), 2235-2246.
33. D. C. Remy, Kenneth E. Rittle, Cecilia A. Hunt, Paul S. Anderson, Edward L. Engelhardt: **(+)- and (-)-3-Methoxycyproheptadine. A comparative evaluation of the**

- antiserotonin, antihistaminic, anticholinergic, and orexigenic properties with cyproheptadine.** *Journal of Medicinal Chemistry*, **1977** (20), 1681-1684.
34. K. C. Nicolau, J. S. Chen, S. M. Dalby: **From nature to the laboratory and into the clinic.** *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, **2009** (17), 2290-2303.
 35. O. Exposito, M. Bonfill, E. Moyano, M. Onrubia, M. H. Mirjalili, R. M. Cusido, J. Palazou: **Biotechnological production of Taxol and related Taxoids: Current state and prospects.** *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, **2009** (9), 109-121.
 36. G. Gu, H. Wang, P. Liu, C. Fu, Z. Li, X. Cao, Y. Li, Q. Fang, F. Xu, J. Shen, P. G. Wang: **Discovery and structural insight of a highly selective protein kinase inhibitor hit through click chemistry.** *Chemical Communications*, **2012** (48), 2788-2790.
 37. A. Nören-Müller, I. Reis-Correa, Jr., H. Prinz, C. Rosenbaum, K. Saxena, H. J. Schwalbe, D. Vestweber, G. Cagna, S. Schunk, O. Schwarz, H. Schiewe, H. Waldmann: **Discovery of protein phosphatase inhibitor classes by biology-oriented synthesis.** *Proceedings of the National Academie of Sciences*, **2006** (28), volume 103, 10606-10611.
 38. K. U. Bindseil, J. Jakupovic, D. Wolf, J. Lavayre, J. Leboul, D. van der Pyl: **Pure compound libraries; a new perspective for natural product based drug discovery.** *Drug Discovery Today*, **2001** (6), Issue 16, 840-847.
 39. M. Bhandari, A. Bhandari, A. Bhandari: **Sepbox technique in natural products.** *Journal of Young Pharmacists*, **2011** (3), 226-231.
 40. J. W. Blunt, B. R. Copp, W.-P. Hu, M. H. G. Munro, P. T. Northcote, M. R. Prinsep: **Marine natural products.** *Natural Products Reports*, **2009** (26), 170-244.
 41. F. Lefevre, P. Robe, C. Jarrin, A. Ginolhac, C. Zago, D. Auriol, T. M. Vogel, P. Simonet, R. Nalin: **Drugs from hidden bugs: their discovery via untapped resources.** *Research in Microbiology*, **2008** (159), 153-161.
 42. K. Alain, J. Querellou: **Cultivation of the uncultured: limits, advances and future challenges.** *Extremophiles*, **2009** (13), 583-594.
 43. S. R. Vartoukian, R. M. Palmer, W. G. Wade: **Strategies for culture of 'unculturable' bacteria.** *FEMS Microbiology Letters*, **2010** (309), 1-7.
 44. B. Guo, Y. Wang, X. Sun, K. Tang: **Bioactive natural products from endophytes: A review.** *Applied Biochemistry and Microbiology*, **2008** (44), Number 2, 136-142.
 45. G. Strobel, B. Daisy: **Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products.** *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **2003** (67), Number 4, 491-502.
 46. P. Proksch, A. Putz, S. Orllepp, J. Kjer, M. Bayer: **Bioactive natural products from marine sponges and fungal endophytes.** *Phytochemistry Reviews*, **2010** (9), Number 4, 475-489.
 47. S. C. Wenzel, R. Müller: **The biosynthetic potential of myxobacteria and their impact on drug discovery.** *Current Opinion in Drug Discovery & Development*, **2009** (2), issue 12, 220-230.
 48. H. Reichenbach: **The ecology of the myxobacteria.** *Environmental Microbiology*, **1999** (1), Issue 1, 15-21.
 49. S. Schneiker, O. Perlova, O. Kaiser, K. Gerth, A. Alici, M. O. Altmeyer, D. Bartels, T. Bekel, S. Beyer, E. Bode, H. B. Bode, C. J. Bolten, J. V. Choudhuri, S. Doss, Y. A.

- Elnakady, B. Frank, L. Gaigalat, A. Goesmann, C. Groeger, F. Gross, L. Jelsbak, L. Jelsbak, J. Kalinowski, C. Kegler, T. Knauber, S. Konietzny, M. Kopp, L. Krause, D. Krug, B. Linke, T. Mahmud, R. Martinez-Arias, A. C. McHardy, M. Merai, F. Meyer, S. Mormann, J. Muñoz-Dorado, J. Perez, S. Pradella, S. Rachid, G. Raddatz, F. Rosenau¹, C. Rückert, F. Sasse, M. Scharfe, S. C. Schuster, G. Suen, A. Treuner-Lange, G. J. Velicer, F.-J. Vorhölter, K. J. Weissman, R. D. Welch, S. C. Wenzel, D. E. Whitworth, S. Wilhelm, C. Wittmann, H. Blöcker, A. Pühler, R. Müller: **Complete genome sequence of the myxobacterium *Sorangium cellulosum***. *Nature Biotechnology*, **2007** (25), Number 11, 1281-1289.
50. D. Kaiser: **Coupling cell movement to multicellular development in myxobacteria**. *Nature Reviews*, **2003**, Volume 1, 45-54.
 51. K. J. Weissman, R. Müller: **Myxobacterial secondary metabolites: bioactivities and modes-of-action**. *Natural Products Reports*, **2010** (27), 1276-1295.
 52. C. Hertweck: **The biosynthetic logic of polyketide diversity**. *Angewandte Chemie International Edition*, **2009** (48), 4688-4716.
 53. K. J. Weissman, R. Müller: **Protein-protein interactions in multienzyme megasynthases**. *Chembiochem*, **2008** (9), 826-848.
 54. C. T. Calderone: **Isoprenoid-like alkylations in polyketide biosynthesis**. *Natural Products Reports*, **2008** (25), 845-853.
 55. C. T. Walsh: **Polyketide and nonribosomal peptide antibiotics: Modularity and versatility**. *Science*, **2004** (303), 1805-1810.
 56. H. J. Imker, C. T. Walsh, W. M. Wuest: **SylC catalyzes ureido-bond formation during biosynthesis of the proteasome inhibitor Syringolin A**. *Journal of the American Chemical Society*, **2009** (131), Issue 51, 18263-18265.
 57. D. Schwarzer, R. Finking, M. A. Marahiel: **Nonribosomal peptides: From genes to products**. *Natural Products Reports*, **2003** (20), 275-287.
 58. C. T. Walsh, H. Chen, T. A. Keating, B. K. Hubbard, H. C. Losey, L. Luo, C. G. Marshall, D. A. Miller, H. M. Patel: **Tailoring enzymes that modify nonribosomal peptides during and after chain elongation on NRPS assembly lines**. *Current Opinion in Chemical Biology*, **2001** (5), 525-534.
 59. H. Reichenbach: **Myxobacteria, producers of novel bioactive substances**. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, **2001** (27), 149-156.
 60. H. Chmiel: **Bioprozesstechnik**. Spektrum Akademischer Verlag, **2011**, 3 Auflage.
 61. J. Büchs: **Introduction to advantages and problems of shaken cultures**. *Biochemical Engineering Journal*, **2001** (7), 91-98.
 62. L. E. McDaniel, E. G. Bailey: **Effect of shaking speed and type of closure on shake flask cultures**. *Applied Microbiology*, **1969** (17), Number 2, 268-290.
 63. G. J. Clark, David Langley, Michael, E. Bushell: **Oxygen limitation can induce microbial secondary metabolite formation: investigations with miniature electrodes in shaker and bioreactor culture**. *Microbiology*, **1995** (141), 663-669.
 64. N. Mehmod, E. Olmos, J-L. Goergen, F. Blanchard, D. Ullish, W. Klöckner, J. Büchs, S. Delaunay: **Oxygen supply controls the onset of Pristinamycins production by *Streptomyces pristinaespiralis* in shaking flasks**. *Biotechnology and Bioengineering*, **2011** (108), Number 9, 2151-2161.

65. J. I. Betts, F. Baganz: **Miniature bioreactors: current practices and future opportunities.** *Microbial Cell Factories*, **2006**, 5:21 (Online)
66. W. A. Duetz, L. Rüedi, R. Herman, K. O'Connor, J. Büchs, B. Withold: **Methods for intense aeration, growth, storage, and replication of bacterial strains in microtiter plates.** *Applied and Environmental Microbiology*, **2000** (66), Number 6, 2641-2646.
67. W. Minas, J. E. Bailey, W. Duetz: **Streptomyces in micro-cultures: Growth, production of secondary metabolites, and storage and retrieval in the 96-well format.** *Antonie van Leeuwenhoek*, **2000** (78), Numbers 3-4, 297-305.
68. W. A. Duetz, B. Withold: **Effectiveness of orbital shaking for the aeration of suspended bacterial cultures in square-deepwell microtiter plates.** *Biochemical Engineering Journal*, **2001** (7), 113-115.
69. O. S. Wolfbeis: **Chemical sensing using indicator dyes.** *Optical Fiber Sensors*, Artech House, Boston London, **1997** (4), chapter 8, 53-107.
70. M. Samorski, G. Müller-Newen, J. Büchs: **Quasi-continuous combined scattered light and fluorescence measurements: A novel measurement technique for shaken microtiter plates.** *Biotechnology and Bioengineering*, **2005** (92), Number 1, 61-68.
71. Y. Kostov, P. Harms, L. Randers-Eichhorn, G. Rao: **Low-cost microbioreactor for high-throughput bioprocessing.** *Biotechnology and Bioengineering*, **2001** (72), Number 3, 346-352.
72. <http://www.m2p-labs.com/>
73. M. Funke, A. Buchenauer, U. Schnakenberg, W. Mokwa, S. Diederichs, A. Mertens, C. Müller, F. Kensy, J. Büchs: **Microfluidic Biolector – Microfluidic Bioprocess Control in Microtiter Plates.** *Biotechnology and Bioengineering*, **2010** (107), Number 3, 497-505.
74. J. M. Köhler, T. Henkel, A. Grodrian, T. Kirner, M. Roth, K. Martin, J. Metze: **Digital reaction technology by micro segmented flow-components, concepts and applications.** *Chemical Engineering Journal*, **2004** (101), 201-216.
75. K. Martin, T. Henkel, V. Baier, A. Grodrian, T. Schön, M. Roth, J. M. Köhler, J. Metze: **Generation of larger numbers of separated microbial populations by cultivation in segmented-flow microdevices.** *Lab on a Chip*, **2003** (3), 202-207.
76. A. B. Theberge, F. Courtois, Y. Scharli, M. Fischlechner, C. Abell, F. Hollfelder, W. T. S. Huck: **Microdroplets in Microfluidics: An Evolving Platform for Discoveries in Chemistry and Biology.** *Angewandte Chemie Internationale Edition*, **2010** (49), 5846-5868.
77. Y. Schaerli, F. Hollfelder: **The potential of microfluidic water-in-oil droplets in experimental biology.** *Molecular Biosystems*, **2009** (5), 1392-1404.
78. A. Funfak, J. Cao, O. S. Wolfbeis, K. Martin, J. M. Köhler: **Monitoring cell cultivation in microfluidic segments by optical pH sensing with a micro flow-through fluorometer using dye-doped polymer particles.** *Microchimica Acta*, **2009** (164), 279-286.
79. P. S. Dittrich, A. Manz: **Lab-on-a-chip: microfluidics in drug discovery.** *Nature Reviews Drug Discovery*, **2006** (5), 210-218.

80. A. Zanzotto, N. Szita, P. Boccazzi, P. Lessard, A. J. Sinskey, K. F. Jensen: **Membrane-Aerated Microbioreactor for High-Throughput Bioprocessing.** *Biotechnology and Bioengineering*, **2004** (87), Number 2, 243-254.
81. Z. Zhang, N. Szita, P. Boccazzi, A. J. Sinskey, K. F. Jensen: **A Well-Mixed, Polymer-Based Microbioreactor With Integrated Optical Measurements.** *Biotechnology and Bioengineering*, **2006** (93), Number 2, 286-296.
82. <http://www.dasgip.de/>
83. H. Irschik, R. Jansen, G. Höfle, K. Gerth, H. Reichenbach: **The corrallopyronins, new inhibitors of bacterial RNA synthesis from *Myxobacteria*.** *The Journal of Antibiotics*, **1985** (38), Number 2, 145-152.
84. H. Irschik, R. Janse, K. Gerth, G. Höfle, H. Reichenbach: **Disorazol A, an Efficient Inhibitor of Eukaryotic Organisms Isolated from Myxobacteria.** *The Journal of Antibiotics*, **1995** (48), Number 1, 31-35.
85. K. Gerth, N. Bedorf, H. Irschik, G. Höfle, H. Reichenbach: **The soraphens: A family of novel antifungal compounds from *Sorangium cellulosum* (Myxobacteria).** *The Journal of Antibiotics*, **1994** (47), Number 1, 23-31.
86. S. A. Frykman, H. Tsuruta, P. J. Licari: **Assesment of fed-batch, semicontinuous, and continuous Epothilone D production processes.** *Biotechnology Progress*, **2005** (21), Number 4, 1102-1108.
87. S. A. Frykman, H. Tsuruta, C. M. Starks, R. Regentin, J. R. Carney, P. J. Licari: **Control of secondary metabolite congener distributions via modulation of the dissolved oxygen Tension.** *Biotechnology Progress*, **2002** (18), Number 5, 913-920.
88. Persönliche Mitteilungen J. Wink, L. Toti (Sanofi Aventis, Frankfurt), M. Stadler (Intermed Discovery, Dortmund), W. Kessler (HZI, Braunschweig).
89. M. R. Kunduru, A. L. Pometto III: **Continuous ethanol production by *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces cerevisiae* in biofilm reactors.** *Journal of Industrial Microbiology*, **1996** (16), 249-256.
90. M. Guitierrez-Correa, Y. Ludena, G. Ramage, G. K. Villena: **Recent advances on filamentous fungal biofilms for industrial uses.** *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **2012** (167), 1235-1253.
91. K. Schügerl: **Extraction of primary and secondary metabolites.** *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, **2005** (92), 1-48.
92. M. E. Swartz: **UPLC™: An introduction and review.** *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, **2005** (28), 1253-1263.
93. K. F. Nielsen, M. Mansson, C. Rank, J. C. Frisvad, T. O. Larsen: **Dereplication of microbial natural products by LC-DAD-TOFMS.** *Journal of Natural Products*, **2011** (74), 2338-2348.
94. S. C. Bobzin, S. Yang, T. P. Kasten: **LC-NMR: a new tool to expedite the dereplication and identification of natural products.** *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **2000** (25), 342-345.
95. R. O. Garcia, D. Krug, R. Müller: **Discovering natural products from myxobacteria with emphasis on rare producer strains in combination with improved analytical methods.** *Methods in Enzymology*, **2009**, 59-91.

96. T. Kind, O. Fiehn: **Advances in structure elucidation of small molecules using mass spectrometry.** *Bioanalytical Reviews*, **2010** (2), 23-60.
97. A. Fredenhagen, C. Derrien, E. Gassman: **An MS7MS library on an ion-trap instrument for efficient dereplication of natural products. Different fragmentation patterns for [M+H]⁺ and [M+Na]⁺ ions.** *Journal of Natural Products*, **2005** (68), 385-391.
98. F. Qiu, A. Imai, J. B. McAlpine, D. C. Lankin, I. Burton, T. Karakach, N. R. Farnsworth, S. Chen, G. F. Pauli: **Dereplication, residual complexity, and rational naming: The case of the *Actaea* triterpenes.** *Journal of Natural Products*, **2012** (75), 432-443.
99. J. Bibette: **Gaining confidence in high-throughput screening.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **2012** (109), Number 3, 649-650.
100. W. Shi, J. Qin, N. Ye, B. Lin: **Droplet-based microfluidic system for individual *Caenorhabditis elegans* assa.** *Lab on a Chip*, **2008** (8), Number 9, 1432-1435.
101. O. J. Miller, A. E. Harrak, T. Mangeat, J. Baret, L. Frenz, B. E. Debs, E. Mayot, M. L. Samuels, E. K. Rooney, P. Dieu, M. Galvan, D. R. Link, A. D. Griffiths: **High-resolution dose-response screening using droplet-based microfluidics.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **2012** (109), Number 2, 378-383.
102. P. Brodin, T. Christophe: **High-content screening in infectious diseases.** *Current Opinion in Chemical Biology*, **2011** (15), 534-539.
103. A. Dove: **Screening for content – the evolution of high throughput.** *Nature Biotechnology*, **2003** (21), Number 8, 859-864.
104. S. S. Phatak, C. C. Stephan, C. N. Cavasotto: **High-throughput and *in silico* screenings in drug discovery.** *Expert Opinion in Drug Discovery*, **2009** (4), Number 9, 947-959.
105. P. Rippenhausen, M. Freundlieb, A. Brunschweiger, H. Zimmermann, C. E. Müller, J. Bajorath: **Virtual screening identifies novel sulfonamide inhibitors of *ecto-5'*-nucleotidase.** *Journal of Medicinal Chemistry*, **2012** (55), 6576-6581.
106. T. D. W. Claridge: **High-resolution NMR techniques in organic chemistry.** *Tetrahedron Organic Chemistry*, Volume 27, Second Edition.
107. K. Fujii, Y. Ikai, H. Oka, M. Suzuki, K. Harada: **Anonempirical method using LC/MS for determination of the absolute configuration of constituent amino acids in a peptide: Combination of Marfey's method with mass spectrometrie and its practical application.** *Analytical Chemistry*, **1997** (69), 5146-5151.
108. T. R. Hoye, C. S. Jeffrey, F. Shao: **Mosher ester analysis for the determination of stereogenic (chiral) carbinol carbons.** *Nature Protocols*, **2007** (2), Number 10, 2451-2458.

9.2 REPEATED-BATCH-VERFAHREN FÜR EIN WIRKSTOFFSCREENING MIT PROZESSVERBESSERUNG

1. K. J. Weissman, R. Müller: **Myxobacterial secondary metabolites: bioactivities and modes-of-action.** *Natural Products Reports*, **2010** (27), 1276-1295.

2. W. Zander, H. Irschik, H. Augustiniak, M. Herrmann, R. Jansen, H. Steinmetz, K. Gerth, W. Kessler, M. Kalesse, G. Höfle, R. Müller: **Sulfangolids, macrolide sulfate esters from *Sorangium cellulosum***. Chemistry a European Journal, **2012** (18), 6264-6271.
3. K. Gerth, H. Steinmetz, G. Höfle, R. Jansen: **Chlorotonil A, a macrolide with a unique gem-Dichloro-1,3-dione functionality from *Sorangium cellulosum*, So ce1525**. Angewandte Chemie International Edition, **2008** (47), 600-602.
4. H. Steinmetz, H. Irschik, B. Kunze, H. Reichenbach, G. Höfle, R. Jansen: **Thuggacins, macrolide antibiotics active against *Mycobacterium tuberculosis*: Isolation, from myxobacteria, structure elucidation, conformation analysis and biosynthesis**. Chemistry a European Journal, **2007** (13), 5822, 5832.
5. H. Irschik, D. Schummer, G. Höfle, H. Reichenbach. H. Steinmetz, R. Jansen: **Etnangien, a macrolide-polyene antibiotic from *Sorangium cellulosum* that inhibits nucleic acid polymerases**. Journal of Natural Products, **2007** (70), 1060-1063.
6. A. Plaza, R. Garcia, G. Bifulco, X. P. Martinez, S. Hüttel, F. Sasse, A. Mayerhans, M. Stadler, R. Müller: **Aetheramides A and B, potent HIV-inhibitory depsipetides from a myxobacterium of the new genus "*Aetherobacter*"**. Organic Letters, **2012** (11), 2854-2857.
7. D. Krug, G. Zurek, B. Schneider, R. Garcia, R. Müller: **Efficient mining of myxobacterial metabolite profiles enabled by liquid chromatography-electrospray ionisation-time-of-flight mass spectrometry and compound-based principal component analysis**. Analytica Chimica Acta, **2008** (624), 97-106.
8. A. Dove: **Screening for content – the evolution of high throughput**. Nature Biotechnology, **2003** (21), Number 8, 859-864.
9. W. A. Duetz, B. Withold: **Effectiveness of orbital shakig for the aeration of suspended bacterial cultures in square-deepwell microtiter plates**. Biochemical Engineering Journal, **2001** (7), 113-115
10. J. Büchs: **Introduction to advantages and problems of shaken cultures**. Biochemical Engineering Journal, **2001** (7), 91-98.
11. T. Anderlei, W. Zang, M. Papaspyrou. J. Büchs: **Online respiration activity measurement (OTR, CTR, RQ) in shake flasks**. Biochemical Engineering Journal, **2004** (17), 187-194.
12. A. A. Brakhage, V. Schroekh: **Fungal secondary metabolites – strategies to activate silent gene clusters**. Fungal Genetics and Biology, **2011** (48), 15-22.
13. H. E. Williams, J. C. P. Steele, M. O. Clements, T. Keshavarz: **γ -Heptalactone is an endogenously produced quorum-sensing molecule regulating growth and secondary metabolite production by *Aspergillus nidulans***. Applied Microbiology and Biotechnology, **2012**, Published Online.
14. H. C. Gramajo, E. Takano, M. J. Bibb: **Stationary-phase production of the antibiotic actinorhodin in *Streptomyces coelicolor* A3(2) is transcriptionally regulated**. Molecular Microbiology, **1993** (6), 837-845.
15. H. Chmiel: **Bioprozesstechnik**. Spektrum Akademischer Verlag, **2011**, 3 Auflage.
16. <http://www.berkeleymadonna.com/>

17. S. Hüttel, R. Müller: **Methods to optimize myxobacterial fermentations using off-gas analysis.** *Microbial Cell Factories*, **2012**, 11:59
18. K. Gerth, S. Pradella, O. Perlova, S. Beyer, R. Müller: **Myxobacteria: proficient producers of novel natural products with various biological activities – past and future biotechnological aspects with the focus on the genus *Sorangium*.** *Journal of Biotechnology*, **2003** (106), 233-253.
19. Kunze B, Jansen R, Sasse F, Höfle G, Reichenbach H: **Chondramides A-D, New Antifungal and Cytostatic Depsipeptides from *Chondromyces crocatus* (Myxobacteria).** *The Journal of Antibiotics* 1995, 48 (11), 1262-1266.
20. A. Fredenhagen, C. Derrien, E. Gassman: **An MS7MS library on an ion-trap instrument for efficient dereplication of natural products. Different fragmentation patterns for [M+H]⁺ and [M+Na]⁺ ions.** *Journal of Natural Products*, **2005** (68), 385-391.
21. B. Biester, D. Bischoff, G. J. Nicholson, S. Stockert, J. Wink, C. Brunati, S. Donadio, S. Pelzer, W. Wohlleben, R. D. Süssmuth: **Bromobalhimycin and chlorobalhimycins – illuminating the potential of halogenases in glycopeptides antibiotic biosyntheses.** *ChemBioChem*, **2003** (4), 649-662.
22. R. Jansen, B. Kunze, H. Reichenbach, G. Höfle: **Chondrochloren A and B, new β -amino styrenes from *Chondromyces crocatus* (Myxobacteria).** *European Journal of Organic Chemistry*, **2003** (14), 2684-2689.
23. T. Hartmann: **Chemical ecology of pyrrolizidine alkaloids.** *Planta*, **1999** (207), 483-495.
24. Y. Sakano, M. Shibuya, Y. Yamaguchi, R. Masuma, H. Tomoda, S. Omura, Y. Ebizuka: **Ephelmins A and B, novel lanosterol synthase inhibitors from a fungal strain FKI-0929.** *The Journal of Antibiotics*, **2004** (57), 564-568.
25. B. B. Snyder, X. Gao: **Structure revision and syntheses of Ephelmins A and B.** *Organic Letters*, **2005** (7), 4419-4422.
26. O. Kretsi, N. Aligiannis, A. L. Skaltsounis, I. B. Chinou: **Pyrrolizidine Alkaloids from *Onosma leptantha*.** *Helvetica Chimica Acta*, **2003** (86), 3136-3140.
27. M. C. Wilson, B. S. Moore: **Beyond ethylmalonyl-CoA: The functional role of crotonyl-CoA carboxylase/reductase homologs in expanding polyketide diversity.** *Natural Products Reports*, **2012** (29), 72-86.
28. M. B. Martins, I. Cavalho: **Diketopiperazines: biological activity and synthesis.** *Tetrahedon*, **2007** (63), 9923-9932.
29. E. Perrotta, M. Altamura, T. Barani, S. Bindi, D. Giannotti, N. J. S. Harmat, R. Nannicini, C. A. Maggi: **2,6-Diketopiperazines from amino acids, from solution-phase to solid-phase organic synthesis.** *Journal of Combinatorial Chemistry*, **2001** (3), 453-460.
30. J. Nielsen, J. Villadsen, G. Liden: **Bioreaction Engineering Principles (Second Edition).** Kluwer Academic/Plenum Publishers, **2003**.
31. D. Schwarzer, R. Finking, M. A. Marahiel: **Nonribosomal peptides: from genes to products.** *Natural Products Reports*, **2003** (20), 275-287.
32. T. Stachelhaus, H. D. Mootz, M. A. Marahiel: **The specificity-conferring code of adenylation domains in nonribosomal peptide synthetases.** *Chemistry and Biology*, **1999** (6), 493-505.

33. P. Caffrey: **Conserved aminoacid residues correlating with ketoreductase stereospecificity in modular polyketide synthases.** *ChemBioChem*, **2003** (4), 649-662.
34. S. F. Haydock, J. F. Aparicio, I. Molnar, T. Schwecke, L. E. Khaw, A. König, A. F. A. Marsden, I. S. Galloway, J. Staunton, P. F. Leadlay: **Divergent sequence motifs correlated with the substrate specificity of (methyl)malonyl-CoA:acyl carrier protein transacylase domains in modular polyketide synthases.** *FEBS Letters*, **1995** (374), 246-248.
35. D. H. Kwan, Y. Sun, F. Schulz, H. Hong, B. Popovic, J. C. C. Sim-Stark, S. F. Haydock, P. F. Leadlay: **Prediction and manipulation of the stereochemistry of enoylreduction in modular polyketide synthases.** *Chemistry and Biology*, **2008** (15), 1231-1240.
36. I. E. Holzbaur, R. C. Harris, M. Bycroft, J. Cortes, C. Bisang, J. Staunton, B. A. M. Rudd, P. F. Leadlay: **Molecular basis of Celmer's rules: the role of two ketoreductase domains in the control of chirality by the erythromycin modular polyketide synthase.** *Chemistry and Biology*, **1999** (6), 189-195.
37. A. P. Siskos, A. Baerga-Ortiz, S. Bali, V. Stein, H. Mamdani, D. Spiteller, B. Popovic, J. B. Spencer, J. Staunton, K. J. Weissman, P. F. Leadlay: **Molecular basis of Celmer's rules: Stereochemistry of catalysis by isolated ketoreductase domains from modular polyketide synthases.** *Chemistry and Biology*, **2005** (12), 1145-1153.
38. A. T. Keatinge-Clay, R. M. Stroud: **The structure of a ketoreductase determines the organization of the β -carbon processing enzymes of modular polyketide synthases.** *Structure*, **2006** (14), 737-748.
39. M. H. Medema, K. Blin, P. Cimermancic, V. de Jager, P. Zakrewski, M. A. Fischbach, T. Weber, E. Takano, R. Breitling: **antiSMASH: rapid identification, annotation and analysis of secondary metabolite biosynthesis gene clusters in bacterial and fungal genome sequences.** *Nucleic Acids Research*, **2011** (39), W339-W346.
40. S. C. Wenzel, R. Müller: **The impact of genomics on the exploitation of the myxobacterial secondary metabolome.** *Natural Product Reports*, **2009** (26), 1385-1407.
41. D. Janssen, D. Albert, R. Jansen, R. Müller, M. Kalesse: **Chivosaole A – elucidation of the absolute and relative configuration.** *Angewandte Chemie Int. Ed.*, **2007** (46), 4898-4901.
42. D. Menche, F. Arikan, O. Perlova, N. Horstmann, W. Ahlbrecht, S. C. Wenzel, R. Jansen, H. Irshik, R. Müller: **Stereochemical determination and complex biosynthetic assembly of etnagien, a highly potent RNA polymerase inhibitor from the myxobacterium *Sorangium cellulosum*.** *Journal of the American Chemical Society*, **2008** (130), 14234-14243.
43. M. Bock, K. Buntin, R. Müller, A. Kirschning: **Stereochemical determination of Thuggacins A-C, highly active antibiotics from the myxobacterium *Sorangium cellulosum*.** *Angewandte Chemie Int. Ed.*, **2008** (47), 2308-2311.
44. T. D. W. Claridge: **High-resolution NMR techniques in organic chemistry.** *Tetrahedron Organic Chemistry*, Volume 27, Second Edition.
45. T. F. Havel, I. D. Kuntz, G. M. Crippen: **The theory and practice of distance geometry.** *Bulletin of Mathematical Biology*, **1983** (45), 665-720.

46. P. L. Weber, R. Morrison, D. Hare: **Determining stereo-specific ^1H nuclear magnetic resonance assignments from distance geometry calculations.** Journal of Molecular Biology, **1988** (204), 483-487.
47. M. Köck, J. Junker: **How many NOE derived restraints are necessary for a reliable determination of the relative configuration of an organic compound? Application to a model system.** Journal of Organic Chemistry, **1997** (62), 8614-8615.
48. R. Kaptein, R. Boelens, R. M. Scheek, W. F. van Gusteren: **Protein structures from NMR.** Biochemistry, **1988** (27), 5398-5395.
49. C.D. Schwieters, J.J. Kuszewski, N. Tjandra, G.M. Clore: **The Xplor-NIH NMR Molecular Structure Determination Package.** Journal of Magnetic Resonance, **2003** (160), 66-74.
50. C.D. Schwieters, J.J. Kuszewski, and G.M. Clore: **Using Xplor-NIH for NMR molecular structure determination.** Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, **2006** (48), 47-62.

9.3 METHODEN ZUR PROZESSVERBESSERUNG MITTELS ABGASANALYSE

1. Kunze B, Jansen R, Sasse F, Höfle G, Reichenbach H: **Chondramides A-D, New Antifungal and Cytostatic Depsipeptides from *Chondromyces crocatus* (Myxobacteria).** The Journal of Antibiotics 1995, 48 (11), 1262-1266
2. Kunze B, Jansen R, Sasse F; Höfle G, Reichenbach H: **Apicularens A and B, New Cytostatic Macrolides from *Chondromyces* Species (Myxobacteria): Production, Physico-chemical and Biological Properties.** The Journal of Antibiotics, 1998, 51 (12), 1075-1080
3. Gentzsch J, Hinkelmann B, Kaderali L, Irschik H, Jansen R, Sasse F, Frank R, Pietschmann T: **Hepatitis C virus complete life cycle screen for identification of small molecules with pro- or antiviral activity.** Antiviral Research, 2011, **89**, 136-148
4. Yegneswaran P K, Gray M R: **Effect of Dissolved Oxygen Control on Growth and Antibiotic Production in *Streptomyces clavuligerus* Fermentations.** Biotechnology Progress, 1991, **7**, 246-250
5. G. H. Dunston, C. Avignone-Rossa, D. Langley, M. E. Bushell: **The vancomycin biosynthetic pathway is induced in oxygen limited *Amycolatopsis orientalis* (ATCC 19795) cultures that do not produce antibiotic.** Enzyme and Microbial Technology, **2000** (27), 502-510.
6. Liefke E, Kaiser D, Onken U: **Growth and product formation of actinomycetes cultivated at increased total pressure and oxygen partial pressure.** Applied Microbiology and Biotechnology, 1990, **32**, 674-679
7. Frykman S A, Tsuruta H, Starks C M, Regentin R, Carney J R, Licari P: **Control of Secondary Metabolite Congener Distribution via Modulation of the Dissolved Oxygen Tension.** Biotechnology Progress, 2002, **18**, 913-920.
8. S. Hüttel, R. Müller: **Methods to optimize myxobacterial fermentations using off-gas analysis.** Microbial Cell Factories, **2012**, 11:59.
9. Jones P R, Greenfield P F: **Effect of carbon dioxide on yeast growth and fermentation.** Enzyme Microbial Technology, 1982, **4**, 210-223

10. Dixon N M, Kell D B: **The inhibition by CO₂ of the growth and metabolism of micro-organisms.** Journal of Applied Bacteriology, 1989, **67**, 109-136
11. P. Neysens, L. D. Vuyst: **Carbon dioxide stimulates the production of amylovorin L by *Lactobacillus amylovorus* DCE 471, while enhanced aeration causes biphasic kinetics of growth and bacteriocin production.** International Journal of Food Microbiology, **2005** (105), 191-202.
12. J. M. Yarwood, P. M. Schlievert: **Oxygen and carbon dioxide regulation of toxic shock syndrome toxin 1 production by *Staphylococcus aureus* MN8.** Journal of Clinical Microbiology, **200** (38), Number 5, 1797-1803.
13. McIntire M, McNeil B: **Effects of Elevated Dissolved CO₂ Levels on Batch and Continuous Cultures of *Aspergillus niger* A60: an Evaluation of Experimental Methods.** Applied and Environmental Microbiology, 1997, **63** (11), 4171-4177
14. Dahod S K: **Dissolved Carbon Dioxide Measurement and its Correlation with Operating Parameters in Fermentation Processes.** Biotechnology Progress, 1993, **9**, 655-660
15. Shang L, Jiang M, Ryu C H, Chang H N, Cho S H, Lee J W: **Inhibitory Effect of Carbon Dioxide on the Fed-Batch Culture of *Ralstonia eutropha*: Evaluation by CO₂ Pulse Injection and Autogenous CO₂ Methods.** Biotechnology and Bioengineering, 2003, **83** (3), 312-320.

9.4 ENTDECKUNG NEUER CHONDRAMIDE MIT VERBESSERTEM

WIRKUNGSSPEKTRUM

1. S. Fox, S. Farr-Jones, L. Sopchak, A. Boogs, H. W. Nicely, R. Khoury, M. Biro: **High-throughput screening: Update on practices and successes.** Journal of Biomolecular Screening, **2006** (11), 864-869.
2. K. A. Guiliano, J. R. Haskins, D. L. Taylor: **Advances in high-content screening for drug discovery.** Assay and Drug Development Technologys, **2003** (1), 565-577.
3. F. Zanella, J. B. Lorens, W. Link: **High-content screening: seeing is believing.** Trend in Biotechnology, **2010** (28), 237-245.
4. B. Kunze, R. Jansen, F. Sasse, G. Höfle, H. Reichenbach: **Chondramides A-D, new antifungal and cytostatic depsipetides from *Chondromyces crocatus* (Myxobacteria). Production, physico-chemical and biological properties.** Journal of Antibiotics, **1995** (48), 1262-1266.
5. P. Crews, L. V. Manes, M. Boehler: **Jasplakinolide, a cyclodepsipeptide from the marine sponge, *Jaspis* sp.** Tetrahedron Letters, **1986** (27), 2797-2800.
6. T. M. Zabriskie, J. A. Klocke, C. M. Ireland, A. H. Marcus, T. F. Molinski, D. J. Faulkner, C. Xu, J. Clardy: **Jaspamide, a modified peptide from a *Jaspis* sponge, with insecticidal and antifungal activity.** Journal of the American Chemical Society, **1986** (108), 3123-3124.
7. J. Herrman, S. Hüttel, R. Müller: **Discovery of new Chondramide derivatives with improved bioactivity in extracts of *Chondromyces* sp. SBCm007.** In Preparation.
8. S. Rachid, D. Krug, K. J. Weissman, R. Müller: **Biosynthesis of (R)- β -tyrosine and its incorporation into the highly cytotoxic chondramides produces by**

- Chondromyces crocatus***. The Journal of Biological Chemistry, **2007** (282), 21810-21817.
9. M. R. Bubb, A. M. J. Senderowicz, E. A. Sausville, L. K. Duncan, E. D. Korn: **Jasplakinolide, a cytotoxic natural product, induces actin polymerization and competitively inhibits the binding of phalloidin to F-actin**. The Journal of Biological Chemistry, **1994** (269), 14869-14871.
 10. F. Sasse, B. Kunze, T. M. A. Gronewold, H. Reichenbach: **The chondramides: Cytostatic agents from myxobacteria acting on the actin cytoskeleton**. Journal of the National Cancer Institute, **1998** (90), 1559-1563.
 11. T. Oda, K. Namba, Y. Maeda: **Position and orientation of phalloidin in F-actin determined by X-ray fiber diffraction analysis**. Biophysical Journal, **2005** (88), 2727-2736.
 12. H. Waldmann, T. S. Hu, S. Renner, S. Menninger, R. Tannert, T. Oda, H. D. Arndt: **Total synthesis of chondramide C and its binding mode to F-actin**. Angewandte Chemie Internationale Edition, **2008** (47), 6473-6477.
 13. I. Löw, T. Wieland: **The interaction of phalloidin, some of its derivatives and of other cyclic peptides with muscle actin as studied by viscosimetry**. FEBS Letters, **1974** (44), 340-343.
 14. L. G. Milroy, S. Rizzo, A. Calderon, B. Ellinger, S. Erdmann, J. Mondry, P. Verveer, P. Bastiaens, H. Waldmann, L. Dehmelt, H. D. Arndt: **Selective chemical imaging of static actin in live cells**. Journal of the American Chemical Society, **2012** (134), 8480-8486.
 15. M. A. Jordan, L. Wilson: **Microtubules as a target for anticancer drugs**. Nature Reviews Cancer, **2004** (4), 253-265.
 16. M. A. Jordan, L. Wilson: **Microtubules and actin filaments: dynamic targets for cancer chemotherapy**. Current Opinion in Cell Biology, **1998** (10), 123-130.
 17. G. Fenteany, S. Zhu: **Small-molecule inhibitors of actin dynamics and cell motility**. Current Topics in Medicinal Chemistry, **2003** (3), 593-616.
 18. U. Eggert, R. Diestel, F. Sasse, R. Jansen, B. Kunze, M. Kalesse: **Chondramide C: Synthesis, configurational assignment, and structure-activity relationship studies**. Angewandte Chemie Internationale Edition, **2008** (47), 6478-6482.
 19. A. Schmauder, L. D. Sibley, M. E. Maier: **Total synthesis and configurational assignment of chondramide A**. Chemistry a European Journal, **2010** (132), 3063-3077.
 20. R. Tannert, L. G. Milroy, B. Ellinger, T. S. Hu, H. D. Arndt, H. Waldmann: **Synthesis and structure-activity correlation of natural-product inspired cyclodepsipeptides stabilizing F-actin**. Journal of the American Chemical Society, **2010** (132), 3063-3077.
 21. A. Zhdanko, A. Schmauder, C. I. Ma, L. D. Sibley, D. Sept, F. Sasse, M. E. Maier: **Synthesis of chondramide A analogues with modified β -tyrosine and their biological evaluation**. Chemistry a European Journal, **2011** (17), 13349-13357.
 22. S. Rachid, D. Krug, B. Kunze, I. Kochems, M. Scharfe, T. M. Zabriskie, H. Blöcker, R. Müller: **Molecular and biochemical studies of chondramide formation – highly cytotoxic natural products from *Chondromyces crocatus* Cm c5**. Chemistry and Biology, **2006** (14), 667-681.

23. B. Biester, D. Bischoff, G. J. Nicholson, S. Stockert, J. Wink, C. Brunati, S. Donadio, S. Pelzer, W. Wohlleben, R. D. Süssmuth: **Bromobalhimycin and chlorobalhimycins – illuminating the potential of halogenases in glycopeptides antibiotic biosyntheses.** ChemBioChem, **2003** (4), 649-662.
24. S. Peters, P. Spiteller: **Chloro- and bromophenols from cultures of *Mycena alcalina*.** Journal of Natural Products, **2006** (69), 1809-1812.
25. J. A. Cooper, S. B. Walker, T. D. Pollard: **Pyrene aktin: Documentation of the validity of a sensitive assay for actin polymerization.** Journal of Muscle Research and Cell Motility, **1986** (4), 253-262.
26. M. Lorenz, D. Popp, K. C. Holmes: **Refinement of the F-actin model against x-ray fiber diffraction data by use of a directed mutation algorithm.** Journal of Molecular Biology, **1993** (234), 826-836.
27. S. Wenzel, R. Müller: **Naturstoffbiologietechnologie des Myxobakteriums *Chondromyces crocatus*.** Biospektrum, **2011** (5), 580-582.
28. R. O. Garcia, D. Krug, R. Müller: **Discovering natural products from myxobacteria with emphasis on rare producer strains in combination with improved analytical methods.** Methods in Enzymology, **2009** (458), 59-91.
29. B. Wilkinson, J. Micklefield: **Mining and engineering natural-product biosynthetic pathways.** Nature Chemical Biology, **2007** (3), 379-386.
30. S. Hüttel, R. Müller: **Methods to optimize myxobacterial fermentations using off-gas analysis.** Microbial Cell Factories, **2012**, 11;59.
31. W. E. Savige, A. Fontana: **Oxidation of tryptophan to oxindolylalanine by dimethyl sulfoxide-hydrochloric acid.** International Journal of Peptide and Protein Research, **1980** (15), 285-297.

9.5 VERBESSERUNG KONTINUIERLICHER PROZESSE MITTELS RBK

1. J. Nielsen, J. Villadsen, G. Liden: **Bioreaction Engineering Principles (Second Edition).** Kluwer Academic/Plenum Publishers, **2003**.
2. H. Chmiel: **Bioprozesstechnik.** Spektrum Akademischer Verlag, **2011**, 3 Auflage.
3. R. Hjorth: **Expanded-bed adsorption in industrial bioprocessing: recent developments.** Trends in Biotechnology, **1997** (15), 230-235.
4. L. R. Castilho, R. A. Medronho: **Cell retention devices for suspended-cell perfusion cultures.** Advances in Biochemical Engineering, **2002** (74), 129-169.
5. A. Plaza, R. Garcia, G. Bifulco, X. P. Martinez, S. Hüttel, F. Sasse, A. Mayerhans, M. Stadler, R. Müller: **Aetheramides A and B, potent HIV-inhibitory depsipetides from a myxobacterium of the new genus "*Aetherobacter*".** Organic Letters, **2012** (11), 2854-2857.

9.6 DISKUSSION

1. J. Berdy: **Bioactive microbial metabolites a personal view.** The Journal of Antibiotics, **2005** (1), Number 58, 1-26.
2. D. D. Baker, M. Chu, U. Oza, V. Rajgarhia: **The value of natural products to future pharmaceutical discovery.** Natural Products Reports, **2007** (24), 1225-1244.
3. P. Fernandes: **Antibacterial discovery and development – the failure of success?** Nature Biotechnology, **2006** (24) Number 12, 1497-1503.
4. J. W. H. Li, J. C. Vederas: **Drug discovery and natural products: end of an era or an endless frontier?** Science, **2009** (325), 161-165.
5. A. L. Harvey: **Natural products in drug discovery.** Drug Discovery Today, **2008** (13), Numbers 19/29, 894-901.
6. K. S. Lam: **New aspects of natural products in drug discovery.** Trends in Microbiology, **2007** (15), Number 6, 279-289.
7. F. E. Koehn, G. T. Carter: **The evolving role of natural products in drug discovery.** Nature Reviews Drug Discovery, **2005** (4), 206-220.
8. K. J. Weissman, R. Müller: **Myxobacterial secondary metabolites: bioactivities and modes-of-action.** Natural Products Reports, **2010** (27), 1276-1295.
9. S. C. Wenzel, R. Müller: **The biosynthetic potential of myxobacteria and their impact on drug discovery.** Current Opinion in Drug Discovery & Development, **2009** (2), issue 12, 220-230.
10. S. R. Vartoukian, R. M. Palmer, W. G. Wade: **Strategies for culture of ‘unculturable’ bacteria.** FEMS Microbiology Letters, **2010** (309), 1-7.
11. J. W. Blunt, B. R. Copp, W.-P. Hu, M. H. G. Munro, P. T. Northcote, M. R. Prinsep: **Marine natural products.** Natural Products Reports, **2009** (26), 170-244.
12. R. J. Siezen, B. I. Khayatt: **Natural products genomics.** Microbial Biotechnology, **2008** (1), 275-282.
13. J. W. Bok, D. Hoffmeister, L. A. Maggio-Hall, R. Murillo, J. D. Glasner, N. P. Keller: **Genomic mining for *Aspergillus* natural products.** Chemistry & Biology, **2006** (13), 31-37.
14. S. C. Wenzel, R. Müller: **The impact of genomics on the exploitation of the myxobacterial secondary metabolome.** Natural Product Reports, **2009** (26), 1385-1407.
15. G. H. Dunston, C. Avignone-Rossa, D. Langley, M. E. Bushell: **The vancomycin biosynthetic pathway is induced in oxygen limited *Amycolatopsis orientalis* (ATCC 19795) cultures that do not produce antibiotic.** Enzyme and Microbial Technology, **2000** (27), 502-510.
16. J. Nielsen, J. Villadsen, G. Liden: **Bioreaction Engineering Principles (Second Edition).** Kluwer Academic/Plenum Publishers, **2003**.
17. C. Oßwald, G. Zipf, G. Schmidt, J. Maier, H. S. Bernauer, R. Müller, S. C. Wenzel: **Modular construction of a functional artificial epothilone polyketide pathway.** ACS Synthetic Biology, **2012**, Web.

18. A. Sandmann, B. Frank, R. Müller: **A transposon-based strategy to scale up myxothiazol production in myxobacterial cell factories.** Journal of Biotechnology, **2008** (136), 255-261.
19. S. Mukherjee, P. Das, R. Sen: **Towards commercial production of microbial surfactants.** TRENDS in Biotechnology, **2006** (24), 509-515.
20. N. S. Cortina, D. Krug, A. Plaza, O. Revermann, R. Müller: **Myxoprincomide: A natural product from *Myxococcus xanthus* discovered by comprehensive analysis of the secondary metabolome.** Angewandte Chemie Internationale Edition, **2012** (51), 811-816.

10 ANHANG

10.1 ANHANG A – SIMULATIONSPROGRAMM RBK

Programm zur Simulation einer RBK mittels Berkeley Madonna.

```
METHOD RK4  
STARTTIME = 0  
STOPTIME = 300  
DT = 0.01
```

```
mumax=0.2  
Ks=8  
YXS=0.55  
alpha=0.2      (wurde mit 1000 multipliziert um eine Vereinheitlichung der Achsen zu ermöglichen)  
beta = 0  
kd = 0.05
```

```
Limit cs>= 0  
Limit cx>= 0  
Limit cp>= 0
```

```
mu = mumax*cs/(cs+Ks)  
qp = alpha*mu + beta
```

```
d/dt (cs) = -mu/YXS*cx - out + in  
d/dt (cx) = mu*cx - kd*cx  
d/dt (cp) = qp*cx - (out*0.9)
```

```
out = Pulse(10,23.8,24)  
in = Pulse(10,24,24)
```

```
init cs = 10  
init cx = 0.1  
init cp = 0
```

10.2 ANHANG B – NMR TABELLEN KAPITEL RBK

SH-Cm7-487		(500 MHz, 125 MHz, MeOD)	
Cm7			
	¹³ C	¹ H	J(in Hertz)
1	73.1	5.24-5.29 (1H)	m
1'	73.2	4.49-4.55 (1H)	m
1''	25.2	1.95-2.16 (2H)	m
1'''	27.4	2.12-2.34 (2H)	m
1''''	55.9	3.41-3.53 (2H)	m
2	41.4	1.86-1.96, 1.82 (2H)	m, dd 14.42, 5.04
3	69.7	3.18-3.26 (1H)	m
4	31.3	1.52-1.68 (2H)	m
5	36.0	1.62-1.67, 1.22-1.30 (2H)	m, m
6	33.4	2.20-2.40 (1H)	m
6'	21.3	1.1 (3H)	d 6.59
7	134.4	5.05 (1H)	d 10.26
8	141.9		
8'	28.8	1.85-1.95 (2H)	m
8''	25.2	1.52-1.68, 1.30-1.44 (2H)	m, m
8'''	14.7	0.94 (3H)	t 7.45
9	79.4	4.16 (1H)	dd 11.38, 4.37
10	34.7	2.33-2.50 (2H)	m
11	132.5	5.23-5.28 (1H)	m
12	134.3		
12'	12.7	1.70 (3H)	
13	141.6	6.32 (1H)	d 15.59
14	124.3	5.23-5.28 (1H)	m
15	84.5	3.58 (1H)	t 9.50
O-Meth 15	55.7	3.23 (3H)	s
16	54.3	2.55 (1H)	dd 9.71, 3.76
16'	32.8	1.92-2.00, 1.43-1.55 (2H)	m, m
16''	21.7	1.30-1.44 (2H)	m
16'''	13.9	0.95 (3H)	t 7.27
17	172.1		

Nummerierung startend beim C1 des Prolins (ehemaliges Carboxyl-C). Prolin mit ' durchnummeriert. PKS-Kette mit Ziffern durchnummeriert.

SH-Cm7-503		(700 MHz, 175 MHz, DMSO)	
Cm7			
	¹³ C	¹ H	J(in Hertz)
1	74.0	4.77-4.80 (1H)	m
1'	67.7	3.64-3.68 (1H)	m
1''	23.9	1.65-1.73, 1.49-1.58 (2H)	m, m
1'''	26.6	1.78-1.87, 1.69-1.73 (2H)	m, m
1''''	54.6	2.83-2.89, 2.57-2.63 (2H)	m, m
2	41.4	1.49-1.58, 1.37-1.46 (2H)	m, m
3	65.7	2.41-2.47 (1H)	m
4	34.3	1.37-1.46, 1.02-1.09 (2H)	m, m
5	36.4	1.49-1.58, 0.94-1.00 (2H)	mm
6	31.6	2.57-2.63 (1H)	m
6'	21.3	0.94 (3H)	d 6.60
7	135.4	4.89 (1H)	d 10.35
8	140.3		
8'	68.9	4.03-4.07 (1H)	m
8''	30.3	1.49-1.58 (2H)	m
8'''	11.0	0.85 (3H)	t 7.43
9	77.3	4.02 (1H)	dd 11.64, 4.04
10	35.1	2.41-2.47, 2.28-2.33 (2H)	m, m
11	131.5	5.28-5.31 (1H)	m
12	131.9		
12'	12.3	1.61 (3H)	s
13	139.9	6.19 (1H)	d 15.52
14	122.2	5.15 (1H)	dd 15.55, 8.85
15	83.3	3.42 (1H)	dd 9.46, 9.46
O-Meth 15	54.6	3.12 (3H)	s
16	52.6	2.35-2.40 (1H)	m
16'	31.2	1.78-1.87, 1.45-1.51 (2H)	m, m
16''	20.2	1.19-1.25 (2H)	m
16'''	13.6	0.86 (3H)	t 7.37
17	170.6		

Nummerierung startend beim C1 des Prolins (ehemaliges Carboxyl-C). Prolin mit ' durchnummeriert. PKS-Kette mit Ziffern durchnummeriert.

SH-Cm7-374 Piperazin		(700 MHz, 175 MHz, MeOD)		
Cm7				
		13C	1H	J(in Hertz)
Tyrosin				
	1	173.6		
	N-Methyl	34.3	2.48 (3H)	s
	2	66.2	3.95 (1H)	dd 4.60, 4.10
	3	37.6	3.15, 3.06 (2H)	dd 14.26, 4.99; dd 14.26, 3.69
	4	128.9		
	2 x 5	131.9	6.92 (1H)	d 8.40
	2 x 6	115.4	6.62 (1H)	d 8.51
	7	156.3		
Fettsäure				
	1	172.8		
	2	70.2		
	Amid-Methyl	26.6	2.91 (3H)	s
	3	34.5	2.12-2.20 (1H)	m
	4	19.5	0.85 (3H)	d 6.61
	5	19.5	0.76 (3H)	d 6.76
	6	33.6	1.89-1.96, 1.56 (2H)	m, dd 12.33, 5.00
	7	23.1	1.13-1.20, 0.63-0.71 (2H)	m, m
	8	40,9	1.00-1.10 (2H)	m
	9	28.6	1.44-1.50 (1H)	m
	10	22.9	0.84 (3H)	d 6.65
	11	22.3	0.84 (3H)	d 6.64

SH-Cm7-341		(700 MHz, 175 MHz, MeOD)	
Cm7			
	13C	1H	J(in Hertz)
Benzenepropanoic Acid			
1	174.9		
2	35.7	2.52-2.59 (2H)	m
3	31.6	2.74-2.82 (2H)	m
4	141.9		
2 x 5	128.9	7.12-7.17 (1H)	m
2x 6	129.1	7.22-7.26 (1H)	m
7	126.8	7.12-7.17 (1H)	m
Tyrosin Amide			
1	172.5		
O-Methyl	52.3	3.71 (3H)	s
2	61.2	4.95 (1H)	dd 11.05, 5.11
N-Methyl	34.5	2.75 (3H)	s
3	34.3	3.19; 2.95 (2H)	dd 14.42, 4.89; dd14.30, 10.92
4	128.9		
2 x 5	130.7	6.96 (1H)	d 8.44
2 x 6	115.9	6.68 (1H)	d 8.54
7	156.9		

SH-Cm7-340		(700 MHz, 175 MHz, MeOD)	
Cm7			
	13C	1H	J(in Hertz)
Benzenepropanoic Acid			
1	175.4		
2	35.9	2.50-2.61 (2H)	m
3	31.7	2.65-2.79 (2H)	m
4	142.1		
2 x 5	129.1	7.10-7.13 (1H)	m
2x 6	129.1	7.20-7.25 (1H)	m
7	126.8	7.13-7.16 (1H)	m
Tyrosin Amide			
1	172.8		
Amide-Methyl	26.1	2.71 (3H)	s
2	59.7	5.21 (1H)	dd 10.24, 5.98
N-Methyl	32.4	2.87 (3H)	s
3	34.4	3.18; 2.82-2.86 (2H)	dd 14.56, 6.14; m
4	126.8		
2 x 5	130.8	6.97-7.03 (1H)	m
2 x 6	115.9	6.68 (1H)	d 8.47
7	156.9		

SH-Cm7-373_1 Peptide		(500 MHz, 125 MHz, DMSO)		
Cm7				
	¹³C	¹H	J(in Hertz)	
Glutaminsäure				
1	171.4			
2	51.8	3.89-3.94 (1H)		m
3	26.4	1.88-2.05 (2H)		m
4	30.3	2.34-2.42, 2.24- 2.32 (2H)		m, m
5	171.3			
Isoleucin				
1	171.8			
2	56.8	4.15-4.23 (1H)		m
3	36.0	1.67-1.75 (1H)		m
4	15.4	0.84 (3H)		d 6.81
5	24.5	1.37-1.46, 1.02-1.12 (2H)		m, m
6	11.2	0.79 (3H)		t 7.54
Leucin				
1	174.6			
2	50.3	4.15-4.23 (1H)		m
3	39.9	1.45-1.57 (2H)		m
4	24.5	1.58-1.66 (1H)		m
5	32.1	0.84 (3H)		d 6.61
6	21.5	0.82 (3H)		d 6.71

SH-Cm7-373_2 Peptide		(500 MHz, 125 MHz, Methanol)		
Cm7				
		13C	1H	J(in Hertz)
Glutaminsäure				
	1	174.3		
	2	55.6	3.63-3.71 (1H)	m
	3	28.1	2.06-2.17 (2H)	m
	4	33.2	2.43-2.59 (2H)	m
	5	175.5		
Leucin				
	1	174.8		
	2	53.8	4.32-4.43 (1H)	m
	3	41.8	1.54-1.66 (2H)	m
	4	26.1	1.66-1.78 (1H)	m
	5	23.5	0.91-0.97 (3H)	m
	6	21.9	0.91-0.97 (3H)	m
Leucin				
	1	177.4		
	2	43.9	4.32-4.43 (1H)	m
	3	42.3	1.54-1.66 (2H)	m
	4	26.1	1.66-1.78 (1H)	m
	5	23.5	0.91-0.97 (3H)	m
	6	21.9	0.91-0.97 (3H)	m

SH-Cm7-393Peptide		(500 MHz, 125 MHz, MeOD)		
Cm7				
	13C	1H	J(in Hertz)	
Glutaminsäure				
1	171.4			
2	53.4	3.99 (1H)		d 9.23
3	27.0	2.08-2.23 (2H)		m
4	32.1	2.52 (2H)		t 7.21
5	174.0			
Valin				
1'	173.4			
2'	60.0	4.14 (1H)		d 7,24
3'	31.4	1.97-2.07 (1H)		m
4'	19.3	0.92 (3H)		d 6.85
5'	18.2	0.89 (3H)		d 6.08
Phenylalanin				
1''	174.2			
2''	54.6	4.67 (1H)		dd 8.79, 5.21
3''	38.1	3.19, 2.58 (2H)		dd 13.91, 2.98; dd 13.91, 8.81
4''	138.2			
2 x 5''	129.2	7.222-7.29 (1H)		m
2 x 6''	130.1	7.222-7.29 (1H)		m
7''	127.5	7.17-7.22 (1H)		m

SH-Cm7-407Peptide		(500 MHz, 125 MHz, MeOD)		
Cm7				
	13C	1H	J(in Hertz)	
Glutaminsäure				
1	171.3			
2	53.3	4.01 (1H)	dd 6.47, 6.47	
3	26.9	2.06-2.22 (2H)	m	
4	32.0	2.51 (2H)	dd 7.21	
5	173.8			
Isoleucin				
1	173.4			
2	59.1	4.20 (1H)	d 7.60	
3	37.7	1.75-1.81 (1H)	m	
4	15.5	0.89 (3H)	d 6.93	
5	26.4	1.41-1.49; 1.08-1.13 (2H)	m; m	
6	11.1	0.87 (3H)	t 7.46	
Phenylalanin				
1	174.1			
2	54.5	4.68 (1H)	dd 8.88, 5.18	
3	38.1	3.20; 2.98 (2H)	dd 14.07, 5.26; dd 13.96, 8.91	
4	138.1			
2 x 5	130.1	7.22-7.29 (1H)	m	
2 x 6	129.1	7.22-7.29 (1H)	m	
7	127.5	7.17-7.22 (1H)	m	

SH-Cm7-487 Peptide		(500 MHz, 125 MHz, MeOD)		
Cm7				
		13C	1H	J(in Hertz)
Lysin				
	1	176.3		
	2	53.4	4.56 (1H)	dd 9.68, 4.42
	3	31.4	1.92-2.00, 1.74-1.83 (2H)	m, m
	4	23.7	1.50-1.61 (2H)	m
	5	27.7	1.62-1.73 (2H)	m
	6	40.1	2.92 (2H)	t 7.77
Glutaminsäure				
	1	169.6		
	2	52.8	3.62 (1H)	dd 9.97, 5.04
	3	28.5	2.19-2.28, 1.99-2.06 (2H)	m, m
	4	31.2	2.42-2.54 (2H)	m
	5	174.5		
Valin				
	1	174.8		
	2	60.1	4.25 (1H)	d 6.66
	3	31.2	2.09-2.17 (1H)	m
	4	19.5	1.02-1.06 (3H)	m
	5	18.3	0.93-1.00 (3H)	m
Leucin				
	1	175.2		
	2	52.3	4.38 (1H)	dd 9.85, 5.36
	3	41.2	1.62-1.73 (2H)	m
	4	25.4	1.74-1.83 (1H)	m
	5	23.0	0.95-1.00 (3H)	m
	6	21.6	0.92-0.95 (3H)	m

SH-Cm7-501 Peptide		(500 MHz, 125 MHz, MeOD)		
Cm7				
		¹³C	¹H	J(in Hertz)
Lysin				
	1	175.8		
	2	53.1	4.60 (1H)	dd 9.21, 4.21
	3	29.0	1.97-2.07, 1.73-1.83 (2H)	m, m
	4	26.3	1.67-1.81 (2H)	m
	5	26.3	1.67-1.81 (2H)	m
	6	41.5	3.18-3.26 (2H)	m
Glutaminsäure				
	1	169.6		
	2	52.9	3.36 (1H)	dd 9.79, 5.04
	3	28.6	2.19-2.28, 1.97-2.07 (2H)	m, m
	4	31.3	2.46-2.52 (2H)	m
	5	174.4		
Isoleucin				
	1	174.9		
	2	59.4	4.30 (1H)	d 7.03
	3	37.6	1.82-1.95 (1H)	m
	4	15.7	1.02 (3H)	d 6.81
	5	25.6	1.49-1.58, 1.15-1.23 [2H]	m, m
	6	11.2	0.92 (3H)	t 7.50
Leucin				
	1	175.7		
	2	52.3	4.41 (1H)	dd 9.69, 5.49
	3	41.1	1.62-1.71 (2H)	m
	4	25.5	1.73-1.83 (1H)	m
	5	23.0	0.99 (3H)	d 6.60
	6	21.6	0.93 (3H)	d 6.54

10.3 ANHANG C – NMR TABELLEN KAPITEL CHONDRAMIDE

Chondramid A (700 MHz, 175 MHz, MeOD)							
Cmc5/synthesized				SBcm007			
position	¹³ C	¹ H	J(in Hertz)		¹³ C	¹ H	J(in Hertz)
PKS				PKS			
1	176.9 (C)	x		1	176.5 (C)	x	
2	40.2 (CH)	2.59-2.72	m	2	40.2 (CH)	2.63-2.69	m
2-Me	19.1 (CH ₃)	1.08	d 6.80	2-Me	19.1 (CH ₃)	1.09	d 6.78
3	46.0 (CH ₂)	2.23; 2.03	dd 13.0, 12.6; dd 12.6 2.6	3	46.0 (CH ₂)	2.24; 2.04	dd 12.6, 12.6; dd 13.6, 3.31
4	134.7 (C)	x		4	134.3 (C)	x	
4-Me	16.0 (CH ₃)	1.68	s	4-Me	15.9 (CH ₃)	1.69	s
5	129.1 (CH)	4.81-4.87	m	5	129.1 (CH)	4.85	Wasserpeak
6	38.7 (CH)	2.45-2.57	m	6	38.7 (CH)	2.47-2.55	m
6-Me	17.9 (CH ₃)	0.91	d 6.60	6-Me	17.9 (CH ₃)	0.92	d 6.72
7	79.2 (CH)	4.47-4.56	m	7	79.2 (CH)	4.51-4.56	m
7-Me	18.9 (CH ₃)	0.86	d 6.1	7-Me	18.9 (CH ₃)	0.87	d 6.24
Tyr Deriv.				Tyr Deriv.			
1'	173.5 (C)	x		1'	173.0 (C)	x	
2'	83.4 (CH)	3.85	d 10.1	2'	83.5 (CH)	3.86	d 9.89
O-Me'	58.3 (CH ₃)	3.14	s	O-Me'	58.3 (CH ₃)	3.15	s
3'	55.7 (CH)	5.03	d 9.9	3'	55.7 (CH)	5.04	dd 9.82; 9.67
4'	131.3 (C)	x		4'	130.9 (C)	x	
5'	129.5 (CH)	6.99	d 8.6	5'	129.6 (CH)	6.99	d 8.69
6'	116.1 (CH)	6.67	d 8.6	6'	116.1 (CH)	6.68	d 8.60
7'	157.9 (C)	x		7'	157.5 (C)	x	
N-Me-Trp				N-Me-Trp			
1''	171.3 (C)			1''	170.9 (C)	x	
2''	56.9 (CH)	5.52	dd 8.1, 8.1	2''	56.9 (CH)	5.53	dd 8.6, 8.6
3''	26.4 (CH ₂)	3.02	d 8.1	3''	26.5 (CH ₂)	3.03	dd 8.1, 1.9
4''	110.1 (C)	x		4''	109.8 (C)	x	
5''	124.4 (CH)	6.83	s	5''	124.4 (CH)	6.84	s
6''	128.5 (C)	x		6''	128.1 (C)	x	
7''	137.9 (C)	x		7''	137.6 (C)	x	
8''	112.2 (CH)	7.26	d 8.1	8''	112.2 (CH)	7.27	d 8.10
9''	122.3 (CH)	7.02-7.09	m	9''	122.3 (CH)	7.06	dd 7.52
10''	119.6 (CH)	6.95-7.02	m	10''	119.6 (CH)	6.98	dd 7.45
11''	119.4 (CH)	7.57	d 7.8	11''	119.4 (CH)	7.57	d 7.88
N-Me''	30.9 (CH ₃)	3.08	s	N-Me''	30.9 (CH ₃)	3.09	s
Ala				Ala			
1'''	174.9 (C)	x		1'''	174.5 (C)	x	
2'''	45.9 (CH)	4.73-4.81		2'''	46.1 (CH)	4.76-4.81	m
3'''	18.4 (CH ₃)	0.8	d 7.1	3'''	18.4 (CH ₃)	0.81	d 6.97

Chondramid A3		(700 MHz, 175 MHz, MeOD)		
Cm7				
	¹³ C	¹ H	J(in Hertz)	
PKS				
1	176.5 (C)	x		
2	39.9 (CH)	2.64-2.70		m
2-Me	18.8 (CH ₃)	1.09		d 6.74
3	45.8 (CH ₂)	2.24; 2.05		dd 12.90, 12.90; dd 13.33, 3.02
4	134.4 (C)	x		
4-Me	15.7 (CH ₃)	1.7		s
5	128.8 (CH)	4.85		m, waterpeak
6	38.3 (CH)	2.48-2.54		m
6-Me	17.5 (CH ₃)	0.92		d 6.71
7	78.9 (CH)	4.51-4.56		m
7-Me	18.2 (CH ₃)	0.85		d 7.00
Tyr Deriv.				
1'	172.9 (C)	x		
2'	82.9 (CH)	3.82		d 9.93
O-Me'	57.9 (CH ₃)	3.16		s
3'	55.2 (CH)	4.99		dd 9.97, 9.47
4'	132.4 (C)	x		
5'	129.6 (CH)	7.15		d 2.11
6'	121.0 (C)	x		
7'	153.4 (C)	x		
8'	116.9 (CH)	6.77		d 8.38
9'	127.6 (CH)	6.86		dd 8.38, 2.08
N-Me-Trp				
1''	170.9 (C)	x		
2''	56.7 (CH)	5.51		dd 8.37, 7.78
3''	26.2 (CH ₂)	3.07; 3.01		dd 15.67, 7.53; dd 14.54, 8.64
4''	109.8 (C)	x		
5''	123.9 (CH)	6.85		s
6''	128.2 (C)	x		
7''	137.6 (C)	x		
8''	111.9 (CH)	7.26		d 8.09
9''	122.0 (CH)	7.05		dd 7.91, 6.84
10''	119.3 (CH)	6.98		dd 7.92, 7.14
11''	119.0 (CH)	7.57		d 7.84
N-Me''	30.5 (CH ₃)	3.09		s
Ala				
1'''	174.4 (C)	x		
2'''	45.7 (CH)	4.79		m, waterpeak
3'''	18.6 (CH ₃)	0.88		d 6.23

Chondramid A3 linear		(700 MHz, 175 MHz, MeOD)		
Cm7				
	¹³ C	¹ H	J(in Hertz)	
PKS				
1	178.3 (C)	x		
2	39.3 (CH)	2.49-2.55		m
2-Me	16.9 (CH ₃)	1.02		d 6.88
3	44.8 (CH ₃)	2.28-2.33; 1.95		m; dd 13.32, 8.63
4	133.2 (C)	x		
4-Me	16.1 (CH ₃)	1.62		s
5	131.2 (CH)	4.99		d 9.59
6	41.2 (CH)	2.29-2.35		m
6-Me	17.1 (CH ₃)	0.95		d 6.72
7	72.7 (CH)	3.41-3.47		m
7-Me	20.9 (CH ₃)	1.06		d 6.30
Tyr Deriv.				
1'	173.5 (C)	x		
2'	83.1 (CH)	4.13		d 6.28
O-Me'	59.2 (CH ₃)	3.36		s
3'	54.8 (CH)	5.25		d 6.61
4'	130.5 (C)	x		
5'	130.4 (CH)	7.32		d 2.08
6'	120.5 (C)	x		
7'	153.4 (C)	x		
8'	115.8 (CH)	6.8		d 8.37
9'	128.8 (CH)	7.1		dd 8.39, 2.18
N-Me-Trp				
1''	171.8 (C)	x		
2''	58.2 (CH)	5.57		dd 10.73, 5.69
3''	24.8 (CH ₂)	3.36-3.41; 3.18		m; dd 15.02, 10.57
4''	110.2 (C)	x		
5''	123.3 (CH)	7.02		s
6''	127.3 (C)	x		
7''	137.4 (C)	x		
8''	111.8 (CH)	7.29		d 8.12
9''	122.8 (CH)	7.07		dd 8.18, 7.29
10''	119.7 (CH)	6.98		dd 7.95, 7.07
11''	118.9 (CH)	7.57		d 8.00
N-Me''	31.6 (CH ₃)	3.04		s
Ala				
1'''	175.3 (C)	x		
2'''	46.6 (CH)	4.53		q 6.61
3'''	16.1 (CH ₃)	0.8		d 7.00

Chondramid A4		(700 MHz, 175 MHz, MeOD)		
Cm7				
		¹³ C	¹ H	J(in Hertz)
PKS				
	1	176.4 (C)	x	
	2	39.8 (CH)	2.60-2.67	m
	2-Me	18.8 (CH ₃)	1.07	d 6.78
	3	45.8 (CH ₂)	2.22; 2.03	dd 13.08, 12.2; dd 13.4, 3.44
	4	134.4 (C)	x	
	4-Me	15.7 (CH ₃)	1.68	s
	5	128.8 (CH)	4.83	d 9.97
	6	38.4 (CH)	2.48-2.54	m
	6-Me	17.6 (CH ₃)	0.93	d 6.74
	7	79.0 (CH)	4.52	dq 8.09, 6.31
	7-Me	18.8 (CH ₃)	0.84	d 6.23
Tyr Deriv.				
	1'	172.9 (C)	x	
	2'	82.9 (CH)	3.85	d 10.02
	O-Me'	57.9 (CH ₃)	3.16	s
	3'	55.2 (CH)	4.99	d 10.02
	4'	132.5 (C)	x	
	5'	129.7 (CH)	7.16	d 2.15
	6'	121.0 (C)	x	
	7'	153.4 (C)	x	
	8'	117.1 (CH)	6.77	d 8.36
	9'	127.7 (CH)	6.92	dd 8.42, 2.17
N-Me-Trp				
	1''	170.5 (C)	x	
	2''	55.5 (CH)	5.58	dd 8.93, 7.06
	3''	25.0 (CH ₂)	2.96-3.05	m
	4''	106.2 (C)	x	
	5''	122.9 (C)	x	
	6''	128.2 (C)	x	
	7''	135.9 (C)	x	
	8''	111.4 (CH)	7.17	d 8.09
	9''	122.5 (CH)	7.06	ddd 8.19, 7.20, 1.13
	10''	120.2 (CH)	6.99	ddd 8.03, 7.29, 0.97
	11''	118.9 (CH)	7.49	d 7.91
	N-Me''	30.9 (CH ₃)	3.13	s
Ala				
	1'''	174.5 (C)	x	
	2'''	45.5 (CH)	4.76	q 7.07
	3'''	17.9 (CH ₃)	0.75	d 6.98

Chondramid A6		(700 MHz, 175 MHz, MeOD)		
Cm7				
	¹³ C	¹ H	J(in Hertz)	
PKS				
1	176.3 (C)	x		
2	39.8 (CH)	2.65-2.70	m	
2-Me	18.3 (CH ₃)	1.09	d 6.74	
3	46.1 (CH ₂)	2.22; 2.07	dd 13.01, 12.45; dd 13.24, 3.17	
4	134.5 (C)	x		
4-Me	15.5 (CH ₃)	1.7	s	
5	128.8 (CH)	4.83	m, waterpeak	
6	38.5 (CH)	2.48-2.53	m	
6-Me	18.0 (CH ₃)	0.93	d 6.74	
7	79.0 (CH)	4.48-4.51	m	
7-Me	18.8 (CH ₃)	0.83	d 6.29	
Tyr Deriv.				
1'	n. d.	x		
2'	82.8 (CH)	3.83	d 10.29	
O-Me	57.9 (CH ₃)	3.09	s	
3'	55.6 (CH)	5.00	d 10.37	
4'	134.8 (C)	x		
5'	128.9 (CH)	6.97	d 8.06	
6'	121.1 (CH)	7.07-7.10	m	
7'	153.3 (C)	x		
N-Me-Trp				
1''	169.9 (C)	X		
2''	55.3 (CH)	5.54	dd 8.23, 7.73	
3''	25.5 (CH ₂)	3.06; 2.85	dd 14.33, 9.13; dd 14.50, 7.41	
4''	105.3 (C)	x		
5''	123.0 (C)	x		
6''	127.9 (C)	x		
7''	135.8 (C)	x		
8''	111.9 (CH)	7.30	d 8.14	
9''	122.4 (CH)	7.07-7.10	m	
10''	119.9 (CH)	7.02	dd 7.73, 7.20	
11''	118.7 (CH)	7.55	d 7.76	
N-Me''	30.9 (CH ₃)	3.17	s	
Ala				
1'''	174.4 (C)	x		
2'''	45.4 (CH)	4.82	m, waterpeak	
3'''	18.0 (CH ₃)	0.93	d 6.63	

Chondramid A8		(700 MHz, 175 MHz, MeOD)		
Cm7				
		¹³ C	¹ H	J(in Hertz)
PKS				
	1	176.7 (C)	x	
	2	39.8 (CH)	2.66-2.72	m
	2-Me	18.5 (CH)	1.10	d 6.70
	3	46.1 (CH ₂)	2.22;2.08	dd 13.0, 2.6; dd 12.6 2.6
	4	134.4 (C)	x	
	4-Me	15.5 (CH ₃)	1.70	s
	5	128.8 (CH)	4.83	m, Waterpeak
	6	38.4 (CH)	2.48-2.54	m
	6-Me	17.9 (CH ₃)	0.92	d 6.74
	7	79.3 (CH)	4.48-4.53	m
	7-Me	18.9 (CH ₃)	0.84	d 6.23
Tyr Deriv.				
	1'	173.0 (C)	x	
	2'	82.4 (CH)	3.81	d 10.3
	O-Me'	57.8 (CH ₃)	3.11	s
	3'	55.2 (CH)	4.98	dd 9.90, 9.87
	4'	137.7 (C)	x	
	5'	130.4 (CH)	7.19	d 1.55
	6'	126.4 (C)	x	
	7'	148.3 (C)	x	
	8'	122.3 (CH)	7.29	d 8.48
	9'	127.3 (CH)	6.88	dd 8.35, 1.91
	N-H	X	8.47	d 9.53
N-Me-Trp				
	1''	170.4 (C)	x	
	2''	55.4 (CH)	5.52	dd 8.50, 7.85
	3''	25.6 (CH ₂)	3.11, 2.84	m, dd 13.98, 7.10
	4''	105.5 (C)	x	
	5''	122.8 (C)	x	
	6''	128.0 (C)	x	
	7''	136.1 (C)	x	
	8''	111.7 (CH)	7.26	d 8.11
	9''	122.5 (CH)	7.08	ddd 8.86, 8.11, 0.99
	10''	120.1 (CH)	7.01	ddd 8.32, 7.79, 0.90
	11''	118.7 (CH)	7.53	d 7.85
	N-Me''	30.9 (CH ₃)	3.18	s
Ala				
	1'''	174.5 (C)	x	
	2'''	45.6 (CH)	4.83	m, Waterpeak
	3'''	18.2 (CH ₃)	0.96	d 7.02

Chondramid A9		(500 MHz, 125 MHz, MeOD)		
Cm7				
	¹³ C	¹ H	J(in Hertz)	
PKS				
1	176.5 (C)	x		
2	39.9 (CH)	2.67-2.76	m	
2-Me	18.7 (CH ₃)	1.11	d 6.76	
3	45.9 (CH ₂)	2.25;2.08	dd 12.76, 12.76; dd 13.09, 3.36	
4	134.4 (C)	x		
4-Me	15.6 (CH ₃)	1.72	s	
5	128.8 (CH)	4.86	m, Waterpeak	
6	38.4 (CH)	2.47-2.56	m	
6-Me	17.8 (CH ₃)	0.92	d 6.68	
7	79.2 (CH)	4.48-4.54	m	
7-Me	18.8 (CH ₃)	0.87	d 6.18	
Tyr Deriv.				
1'	172.9 (C)	x		
2'	82.7 (CH)	3.75	d 10.19	
O-Me'	57.9 (CH ₃)	3.11	s	
3'	55.2 (CH)	4.93	d 10.22	
4'	135.3 (C)	x		
5'	130.5 (CH)	7.14	d 2.09	
6'	123.5 (C)	x		
7'	153.1 (C)	x		
8'	117.0 (CH)	7.03	d 8.65	
9'	126.9 (CH)	6.73	dd 8.58, 2.02	
N-Me-Trp				
1''	170.7 (C)	x		
2''	55.6 (CH)	5.48	dd 9.23, 6.74	
3''	26.5 (CH ₂)	3.17; 2.85	m 3.09-3.21; dd 13.95, 6.97	
4''	109.4 (C)	x		
5''	123.9 (CH)	6.69	s	
6''	128.0 (C)	x		
7''	137.5 (C)	x		
8''	112.3 (CH)	7.3	d 8.12	
9''	122.1 (CH)	7.07	dd 8.55, 7.23	
10''	119.2 (CH)	6.98	dd 8.37, 7.31	
11''	119.0 (CH)	7.59	d 7.84	
Ala				
1'''	174.4 (C)	x		
2'''	45.7 (CH)	4.86	m, Waterpeak	
3'''	18.3 (CH ₃)	1.04	d 6.95	
β-D-glucuronic acid				
1	101.9 (CH)	5.06	d 7.63	
2	74.3 (CH)	3.62	dd 8.86, 7.63	
3	77.0 (CH)	3.55	dd 9.05, 9.05	
4	72.9 (CH)	3.65	dd 9.19, 9.16	
5	76.2 (CH)	3.99	d 9.72	
6	173.3 (C)	x		

Chondramid A10		(500 MHz, 125 MHz, MeOD)		
Cm7				
	¹³ C	¹ H	J(in Hertz)	
PKS				
1	176.7 (C)	x		
2	39.9 (CH)	2.64-2.72		m
2-Me	18.8 (CH ₃)	1.09		d 6.72
3	46.1 (CH ₂)	2.23;2.06		dd 12.89, 12.44; dd 13.34, 3.34
4	134.5 (C)	x		
4-Me	15.5 (CH ₃)	1.70		s
5	128.7 (CH)	4.83		m, Waterpeak
6	38.4 (CH)	2.48-2.54		m
6-Me	17.9 (CH ₃)	0.93		d 6.68
7	79.2 (CH)	4.47-4.54		m
7-Me	18.8 (CH ₃)	0.85		d 6.22
Tyr Deriv.				
1'	173.1 (C)	x		
2'	82.7 (CH)	3.79		d 10.21
O-Me'	57.9 (CH ₃)	3.11		s
3'	55.2 (CH)	4.96		d 10.22
4'	135.6 (C)	x		
5'	130.3 (CH)	7.14		d 2.13
6'	123.9 (C)	x		
7'	153.3 (C)	x		
8'	117.3 (CH)	7.04		d 8.62
9'	127.2 (CH)	6.85		dd 8.63, 2.13
N-Me-Trp				
1''	170.4 (C)	X		
2''	55.6 (CH)	5.54		dd 7.93, 7.93
3''	25.4 (CH ₂)	3.11; 2.87		m; dd 13.95, 6.97
4''	105.9 (C)	x		
5''	122.9 (C)	x		
6''	128.2 (C)	x		
7''	135.8 (C)	x		
8''	111.6 (CH)	7.51		d 7.96
9''	122.5 (CH)	7.06		dd 7.44, 7.44
10''	120.1 (CH)	6.99		dd 7.70, 7.70
11''	118.6 (CH)	7.51		d 7.96
N-Me''	30.8 (CH ₃)	3.17		s
Ala				
1'''	174.6 (C)	x		
2'''	45.6 (CH)	4.82		m, Waterpeak
3'''	18.1 (CH ₃)	0.93		d 6.94
β-D-glucuronic acid				
1	102.1 (CH)	5.05		d 7.70
2	74.3 (CH)	3.62		dd 9.04, 7.64
3	77.3 (CH)	3.54		dd 9.13, 9.13
4	72.9 (CH)	3.65		dd 9.19, 9.19
5	76.3 (CH)	4.00		d 9.72
6	172.9 (C)	x		

Chondramid E2		(700 MHz, 175 MHz, MeOD)		
SBcm007				
	¹³ C	¹ H	J(in Hertz)	
PKS				
1	n. d.	x		
2	39.9 (CH)	2.59-2.64	m	
2-Me	18.5 (CH ₃)	1.06	d 6.70	
3	46.1 (CH ₂)	2.19; 2.04	dd 12.98, 12.37 dd 13.65, 3.83	
4	n. d.	x		
4-Me	15.5 (CH ₃)	1.67	s	
5	128.8 (CH)	4.83	Wasserpeak	
6	38.5 (CH)	2.48-2.45	m	
6-Me	17.9 (CH ₃)	0.93	d 6.72	
7	78.7 (CH)	4.41-4.49	m	
7-Me	18.6 (CH ₃)	0.84	d 6.24	
Tyr Deriv.				
1'	n. d.	x		
2'	73.4	4.16	d 10.23	
3'	57.0	4.98	dd 10.02, 9.87	
4'	n. d.	x		
5'	129.6 (CH)	7.09	d 8.63	
6'	115.9 (CH)	6.71	d 8.63	
7'	n. d.	x		
N-Me-Trp				
1''	n. d.	x		
2''	55.3 (CH)	5.6	dd 9.82, 6.36	
3''	25.2 (CH ₂)	3.07; 2.90	dd 14.76, 9.78; dd 14.76, 6.36	
4''	n. d.	x		
5''	n. d.	x		
6''	n. d.	x		
7''	n. d.	x		
8''	111.3 (CH)	7.19	d 8.06	
9''	122.5 (CH)	7.07	ddd 8.18, 7.20, 1.07	
10''	120.2 (CH)	7.01	ddd 7.98, 7.24, 0.90	
11''	119.0 (CH)	7.53	d 7.84	
N-Me''	30.9 (CH ₃)	3.12	s	
Ala				
1'''	n. d.	x		
2'''	45.4 (CH)	4.70-4.74	m	
3'''	17.9 (CH ₃)	0.68	d 7.03	

Die grün markierten chemischen Shifts kennzeichnen das 2' und 3' Atom des β -Tyosins welches eine Hydroxygruppe an Position 2' besitzt. Die vorgeschlagenen chemischen Shifts und HRMS-Daten bestätigen diese Variation.

Brom-Chondramid A3		(700 MHz, 175 MHz, MeOD)		
Cm7				
	¹³ C	¹ H	J(in Hertz)	
PKS				
1	176.6 (C)	x		
2	39.9 (CH)	2.64-2.70	m	
2-Me	18.6 (CH ₃)	1.09	d 6.78	
3	45.8 (CH ₂)	2.25; 2.05	dd 13.41, 12.47; dd 13.23, 3.32	
4	134.4 (C)	x		
4-Me	15.7 (CH ₃)	1.7	s	
5	128.8 (CH)	4.84	m, Waterpeak	
6	38.4 (CH)	2.48-2.55	m	
6-Me	17.5 (CH ₃)	0.93	d 6.74	
7	78.0 (CH)	4.51-4.55	m	
7-Me	18.4 (CH ₃)	0.88	d 6.23	
Tyr Deriv.				
1'	172.8 (C)	x		
2'	83.0 (CH)	3.83	d 9.96	
O-Me'	57.8 (CH ₃)	3.16	s	
3'	55.1 (CH)	4.99	dd 9.65, 9.65	
4'	132.9 (C)	x		
5'	132.8 (CH)	7.33	d 2.15	
6'	110.1 (C)	x		
7'	154.3 (C)	x		
8'	116.7 (CH)	6.75	d 8.34	
9'	128.3 (CH)	6.9	dd 8.38, 2.13	
N-Me-Trp				
1''	170.9 (C)	x		
2''	56.8 (CH)	5.51	dd 8.45, 7.63	
3''	26.1 (CH ₂)	2.97-3.08	m	
4''	109.6 (C)	x		
5''	124.7 (CH)	6.85	s	
6''	128.1 (C)	x		
7''	137.7 (C)	x		
8''	111.9 (CH)	7.26	d 8.10	
9''	121.9 (CH)	7.05	dd 8.19, 6.88	
10''	119.3 (CH)	6.98	dd 8.05, 6.96	
11''	119.0 (CH)	7.57	d 7.87	
N-Me''	30.7 (CH ₃)	3.09	s	
Ala				
1'''	174.4 (C)	x		
2'''	45.5 (CH)	4.77-4.82	m	
3'''	18.2 (CH ₃)	0.85	d 6.96	

Propionyl-Chondramid C1 (700 MHz, 175 MHz, MeOD)			
Cm7			
	¹³ C	¹ H	J(in Hertz)
PKS			
1	177.3 (C)	x	
2	39.8 (CH)	2.65-2.70	m
2-Me	19.4 (CH ₃)	1.12	d 6.89
3	44.2 (CH ₂)	2.31; 2.01	dd 14.53, 10.31; dd 14.53, 3.09
4	134.3 (C)	x	
4-Me	16.7 (CH ₃)	1.63	s
5	129.3 (CH)	4.96	d 9.37
6	37.0 (CH)	2.54-2.58	m
6-Me	16.7 (CH ₃)	0.84	d 6.92
7	81.6 (CH)	4.57-4.61	m
7-Eth	26.2 (CH ₂)	1.49-1.55; 1.32-1.39	m; m
7-Eth-Meth	10.7 (CH ₃)	0.79	t 7.45
Tyr Deriv.			
1'	172.5 (C)	x	
2'	42.3 (CH ₂)	2.72	d 6.52
3'	51.2 (CH)	5.18-5.22	m
4'	133.1 (C)	x	
5'	127.9(CH ₂)	6.96	d 7.47
6'	116.0(CH ₂)	6.68	d 8.60
7'	157.4 (C)	x	
N-Me-Trp			
1"	171.9 (C)	x	
2"	57.4 (CH)	5.54	dd 9.30, 7.11
3"	25.0 (CH ₂)	3.23; 3.11	dd 15.03, 7.09; dd 14.96, 9.38
4"	110.3 (C)	x	
5"	123.9 (CH)	6.97	s
6"	128.3 (C)	x	
7"	137.7 (C)	x	
8"	112.0 (CH)	7.33	d 8.14
9"	122.2 (CH)	7.09	dd 8.08, 7.08
10"	119.5 (CH)	7.00	dd 8.01, 7.09
11"	119.0 (CH)	7.58	d 7.91
N-Me"	30.2 (CH ₃)	3.05	s
Ala			
1'''	174.9 (C)	x	
2'''	46.2 (CH)	4.76	q 6.84
3'''	17.9 (CH ₃)	0.92	d 6.88

Brom-Chondramid C3		(700 MHz, 175 MHz, MeOD)		
Cm7				
		13C	1H	J(in Hertz)
PKS				
	1	176.6	x	
	2	40.1	2.65-2.70	m
	2-Me	18.7 (3H)	1.11	d 6.80
	3	46.0 (2H)	2.27; 2.07	dd 13.29, 12.25; dd 13.37, 3.15
	4	134.6	x	
	4-Me	15.9 (3H)	1.69	s
	5	128.9	4.87	m, Waterpeak
	6	38.1	2.50-2.56	m
	6-Me	17.5 (3H)	0.91	d 6.86
	7	78.6	4.46-4.50	m
	7-Me	17.8 (3H)	0.94	d 6.26
Tyr Deriv.				
	1'	172.6	x	
	2'	42.5 (2H)	2.57-2.65	m, Waterpeak
	3'	51.2	5.28	dd 11.53, 3.68
	4'	135.1	x	
	5'	131.4	7.33	d 2.18
	6'	110.5	x	
	7'	154.4	x	
	8'	117.0	6.76	d 8.36
	9'	127.1	6.87	dd 8.04, 2.24
N-Me-Trp				
	1''	170.9		
	2''	57.0	5.53	dd 8.76, 7.51
	3''	25.5 (2H)	3.18; 3.08	dd 14.68, 7.46; dd 14.93, 8.87
	4''	109.9	x	
	5''	123.9	6.94	s
	6''	128.8	x	
	7''	137.7	x	
	8''	112.0	7.3	d 8.00
	9''	122.1	7.07	dd 7.07, 6.07
	10''	119.4	6.99	dd 8.03, 7.07
	11''	119.6	7.59	d 7.93
	N-Me''	30.5 (3H)	3.09	s
Ala				
	1'''	174.4	x	
	2'''	46.0	4.71-4.75	m, Waterpeak
	3'''	17.9 (3H)	0.88	d 6.90

Propionyl-Brom-Chondramid C3			
(700 MHz, 175 MHz, MeOD)			
Cm7			
	¹³ C	¹ H	J(in Hertz)
PKS			
1	177.2 (C)	x	
2	39.9 (CH)	2.64-2.65	m
2-Me	19.6 (CH ₃)	1.13	d 6.94
3	44.2 (CH ₂)	2.32; 2.01	dd 14.49, 10.76; dd 14.63, 2.94
4	134.3 (C)	x	
4-Me	16.6 (CH ₃)	1.62	s
5	129.2 (CH)	4.96	d 9.45
6	36.8 (CH)	2.54-2.58	m
6-Me	16.5 (CH ₃)	0.84	d 6.94
7	81.6 (CH)	4.58-4.62	m
7-Eth	26.3 (CH ₂)	1.49-1.55; 1.35-1.40	m; m
7-Eth-Meth	10.6 (CH ₃)	0.78	t 7.45
Tyr Deriv.			
1'	172.2 (C)	x	
2'	41.8 (CH ₂)	2.74	d 6.36
3'	51.5 (CH)	5.18	t 6.22
4'	134.9 (C)	x	
5'	131.5 (CH)	7.36	d 2.23
6'	110.6 (C)	x	
7'	154.4 (C)	x	
8'	116.5 (CH)	6.78	d 8.38
9'	127.2 (CH)	6.94	dd 8.41, 2.22
N-Me-Trp			
1''	171.3 (C)	x	
2''	57.5 (CH)	5.53	dd 9.47, 6.97
3''	24.8 (CH ₃)	3.15-3.24	m
4''	110.3 (C)	x	
5''	123.8 (CH)	6.98	s
6''	128.2 (C)	x	
7''	137.7 (C)	x	
8''	111.9 (CH)	7.32	d 8.14
9''	122.1 (CH)	7.07	dd 8.23, 7.09
10''	119.4 (CH)	6.99	dd 7.98, 6.96
11''	119.3 (CH)	7.57	d 7.89
N-Me''	31.20.2(CH ₃)	3.04	s
Ala			
1'''	174.8 (C)	x	
2'''	46.2 (CH)	4.71-4.75	m
3'''	18.0 (CH ₃)	0.88	d 6.91

Chondramid A10_disac		(700 MHz, 175 MHz, MeOD)		
Cm7				
		¹³ C	¹ H	J(in Hertz)
PKS				
	1	176.3 (C)	x	
	2	39.9 (CH)	2.65-2.69	m
	2-Me	18.6 (CH ₃)	1.09	d 6.70
	3	45.9 (CH ₂)	2.23;2.06	dd 12.76, 12.76; dd 13.00, 3.13
	4	134.3 (C)	x	
	4-Me	15.5 (CH ₃)	1.69	s
	5	128.7 (CH)	4.83	m, Waterpeak
	6	38.4 (CH)	2.48-2.54	m
	6-Me	17.7 (CH ₃)	0.93	d 6.73
	7	79.1 (CH)	4.49-4.54	m
	7-Me	18.7 (CH ₃)	0.85	d 6.25
Tyr Deriv.				
	1'	172.7 (C)	x	
	2'	82.6 (CH)	3.82	d 10.13
	O-Me'	57.8 (CH ₃)	3.12	s
	3'	55.2 (CH)	4.99	dd 9.88, 9.87
	4'	135.7 (C)	x	
	5'	130.1 (CH)	7.19	d 2.30
	6'	123.9 (C)	x	
	7'	153.0 (C)	x	
	8'	117.4 (CH)	7.02	d 8.61
	9'	127.5 (CH)	6.92	dd 8.57, 2.05
	N-H	X	8.55	d 9.43
N-Me-Trp				
	1''	170.3 (C)	X	
	2''	55.5 (CH)	5.56	dd 8.07, 8.07
	3''	25.4 (CH ₂)	3.07, 2.92	dd 14.44, 7.94
	4''	105.9 (C)	x	
	5''	122.8 (C)	x	
	6''	127.9 (C)	x	
	7''	135.7 (C)	x	
	8''	111.5 (CH)	7.17	d 7.71
	9''	122.6 (CH)	7.07	ddd 8.04, 7.15, 1.01
	10''	120.1 (CH)	6.99	ddd 8.00, 7.21, 0.98
	11''	118.9 (CH)	7.5	d 7.99
	N-Me''	30.9 (CH ₃)	3.15	s
Ala				
	1'''	174.4 (C)	x	
	2'''	45.6 (CH)	4.81	m, Waterpeak
	3'''	18.1 (CH ₃)	0.88	d 6.97
β-D-glucuronic acid				
	1	102.0 (CH)	5.06	d 7.70
	2	74.5 (CH)	3.63	dd 9.15, 7.70
	3	77.1 (CH)	3.76	dd 9.07, 9.07
	4	78.7 (CH)	3.92	m 3.91-3.95
	5	75.8 (CH)	4.15	d 4.15
	6	171.1 (C)	x	
2-(acetylamino)-2-deoxy-6-O-methyl hexopyranose				
	1	99.5 (CH)	5.35	d 3.71
	2	55.1 (CH)	3.93	m 3.91-3.95
	3	72.7 (CH)	3.61	m 3.60-3.64
	4	72.9 (CH)	3.7	m 3.68-3.71
	5	71.4 (CH)	3.49	dd 9.75, 9.75
	6	71.9 (CH ₂)	3.69; 3.60	m 3.67-3.71; m 3.57-3.61
2,N-acetyl				
	2	173.4 (C)	X	
	2	22.5 (CH ₃)	2.02	s
6,O-methyl				
	2	59.4 (CH ₃)	3.39	s

10.4 ANHANG D – SIMULATIONSPROGRAMME CHEMOSTAT UND PERFUSION

Programm zur simulation eines Chemostaten:

METHOD RK4

STARTTIME = 0
STOPTIME = 120
DT = 0.01

mumax = 0.3
Ks = 8
YXS = 0.55
alpha = 0.2
beta = 0
kd = 0.05
qms = 0.1
D1 = 0.1
cse = 25

D = If time >= 10 then D1 else 0

mu = mumax*cs/(cs+Ks)
qp = alpha*mu + beta

$d/dt (cs) = (D*(cse-cs)) - (qms*cx) - (mu/YXS*cx)$
 $d/dt (cx) = - (D*cx) + (mu*cx) - (kd*cx)$
 $d/dt (cp) = - (D*cp) + (qp*cx)$

init cs = 10
init cx = 1
init cp = 0

Programm zur Simulation eines Perfusionsreaktors

METHOD RK4

STARTTIME = 0
STOPTIME = 120
DT = 0.01

mumax = 0.3
Ks = 8
YXS = 0.55
alpha = 0.2
beta = 0
kd = 0.05
qms = 0.1
D1 = 0.1
cse = 25

D = if time >= 10 then D1 else 0

mu = mumax*cs/(cs+Ks)
qp = alpha*mu + beta

$d/dt (cs) = (D*(cse-cs)) - (qms*cx) - (mu/YXS*cx)$
 $d/dt (cx) = (mu*cx) - (kd*cx)$
 $d/dt (cp) = - (D*cp) + (qp*cx)$

init cs = 10
init cx = 1
init cp = 0

10.5 ANHANG E - NMR TABELLEN KAPITEL STRUKTUREN

Glycochondrochloren		(500 MHz, 125 MHz, MeOD)		
Cm4				
	¹³ C	¹ H	J(in Hertz)	
1	170.6			
2	83.4	4.2 (1H)	d 3.68	
O-Meth	60.0	3.55 (3H)	s	
3	82.7	4.24 (1H)	dd 7.06, 3.16	
Sugar				
1''	105.2	4.43 (1H)	7.82	
2''	75.2	3.11 (1H)	dd 8.97, 7.81	
3''	77.9	3.28-3.41 (1H)	m	
4''	71.3	3.14-3.19 (1H)	m	
5''	77.5	3.23-3.29 (1H)	m	
6''	62.5	3.82; 3.52-3.60	dd 11.84, 2.39; m	
4	77.4	4.44 (1H)	dd 9.22, 7.14	
O-Meth	56.9	3.18 (3H)	s	
5	138.8	6.58 (1H)	dd 9.04, 0.83	
6	143.2			
6-Meth	12.6	1.88 (3H)	s	
7	208.3			
8	43.7	3.53-3.60 (1H)	m	
8-Meth	14.9	0.89-0.96 (3H)	m	
9	77.3	3.77 (1H)	dd 9.45, 1.96	
10	35.3	1.60-1.66 (1H)	m	
10-Meth	12.5	0.89-0.96	m	
11	34.9	1.28-1.36 (2H)	m	
12	30.5	1.28-1.36 (2H)	m	
13	23.7	1.28-1.36 (2H)	m	
14	14.4	0.89-0.96	m	
1'	120.3	6.74 (1H)	d 9.45	
2'	112.2	5.78 (1H)	d 9.49	
3'	129.1			
4'	130.0	7.35 (1H)	d 2.10	
5'	121.8			
6'	152.9			
7'	117.6	6.94 (1H)	d 8.36	
8'	128.3	7.14 (1H)	dd 8.39, 2.11	

Nummerierung entsprechend der Originalliteratur.

Xeno-787		(700 MHz, 175 MHz, MeOD)	
Xenorhabdus scentirmaii			
	¹³ C	¹ H	J(in Hertz)
2-Phenylethanamin			
1	41.3	3.43-3.49; 3.37-3.42 (2H)	m; m
2		2.74-2.79 (2H)	m
3	140.0		
2 x 4	129.6	7.18-7.21 (1H)	m
2 x 5	129.4	7.25-7.28 (1H)	m
6	127.2	7.16-7.21 (1H)	
Valin1			
1	171.5		
2	63.4	4.58 (1H)	d 11.07
3	27.4	2.14-2.22 (1H)	m
4	19.6	0.85-0.89 (3H)	m
5	18.4	0.74 (3H)	d 6.67
N-methyl	31.1	3.09 (3H)	s
Valin2			
1	172.4		
2	59.4	5.15 (1H)	d 10.78
3	28.2	2.27-2.36 (1H)	m
4	19.6	0.85-0.89 (3H)	m
5	18.4	0.77 (3H)	d 6.73
N-methyl	31.1	3.05 (3H)	s
Valin3			
1	172.2		
2	54.9	5.20 (1H)	d 10.81
3	28.3	2.27-2.36 (1H)	m
4	19.6	0.85-0.89 (3H)	m
5	18.4	0.78 (3H)	d 6.73
N-methyl	31.1	3.06 (3H)	s
Valin4			
1	171.8		
2	59.5	5.21 (1H)	d 10.78
3	28.3	2.27-2.36 (1H)	m
4	19.6	0.85-0.89 (3H)	m
5	18.5	0.80 (3H)	d 6.86
N-methyl	30.9	3.16 (3H)	s
Valin5			
1	173.7		
2	56.2	4.78 (1H)	d 7.55
3	31.2	2.08-2.11 (1H)	m
4	19.6	0.99 (3H)	d 6.80
5	18.2	1.02 (3H)	d 6.85
Valin6			
1	167.5		
2	67.9	3.65 (1H)	d 5.32
3	31.2	2.14-2.22 (1H)	m
4	18.2	1.05 (3H)	d 7.00
5	18.2	1.02 (3H)	d 6.85
N-methyl	32.9	2.65 (3H)	s

Nummerierung der Valine ab dem 2-Phenylethylamin.

Xeno-843		(700 MHz, 175 MHz, MeOD)		
Xenorhabdus scentirmaii				
	13C	1H	J(in Hertz)	
Acetat				
1	172.6			
2	22.2	1.91 (3H)	s	
L-Phenylalanin				
1	174.1			
2	56.4	4.58 (1H)	dd 11.52, 3.33	
3	36.8	3.34-3.99; 2.99 (2H)	m; dd 14.09, 11.06	
4	139.4			
2 x 5	130.1	7.42 (1H)	d 7.71	
2 x 6	129.2	7.35 (1H)	dd 7.49, 7.49	
7	127.4	7.24-7.31 (1H)	m	
L-Threonin				
1	171.2			
2	55.6	4.73	d 1.13	
3	70.3	5.40-5.45 (1H)	m	
4	16.7	1.12 (3H)	d 6.64	
D-Phenylalanin				
1	172.0			
2	54.1	5.02 (1H)	dd 10.01, 5.94	
3	37.7	3.08; 2.92 (2H)	dd 13.17, 10.11; dd 13.17, 5.89	
4	137.7			
2 x 5	129.9	7.24-7.31 (1H)	m	
2 x 6	129.3	7.24-7.31 (1H)	m	
7	127.7	7.21-7.25 (1H)	m	
L-Prolin				
1	171.9			
2	59.3	4.69 (1H)	dd 7.97, 7.97	
3	28.5	2.32-2.38; 1.62-1.69 (2H)	m; m	
4	25.4	1.79-1.84; 1.57-1.64 (2H)	m; m	
5	48.7	3.34-3.39; 3.10-3.19 (2H)	m; m	
L-Prolin				
1	175.5			
2	61.4	4.37 (1H)	dd 8.22, 5.30	
3	29.5	1.76-1.83; 1.68-1.74 (2H)	m; m	
4	26.0	2.13-2.19; 1.93-1.99 (2H)	m; m	
5	48.1	3.84-3.88; 3.65-3.69 (2H)	m; m	
L-Leucin				
1	173.4			
2	53.2	4.21 (1H)	dd 11.45, 2.75	
3	40.2	1.68-1.74; 1.57-1.64 (2H)	m; m	
4	25.7	1.68-1.74 (1H)	m	
5	23.2	0.99 (3H)	d 6.07	
6	20.8	0.84 (3H)	d 6.00	
L-Valin				
1	169.7			
2	60.6	4.08-4.12 (1H)	m	
3	31.6	1.83-1.89 (1H)	m	
4	20.1	0.78 (3H)	d 6.66	
5	19.2	0.96 (3H)	d 6.77	

DANKSAGUNG

Ich möchte mich Bedanken:

Bei meinen Eltern,

bei Frau Dr. Jennifer Herrmann für die Unterstützung bei dieser Arbeit,

und bei Dr. Daniel Krug der mir ebenfalls beim Erstellen dieses Textes geholfen hat.

Bei Prof. Dr. Rolf Müller und Prof. Dr. Marc Stadler für die Korrektur und Hilfe bei dieser Arbeit.

Bei Prof. Dr. Johann Jauch für die Einführung und Hilfe bei der Strukturaufklärung.

Bei Dr. Josef Zapp für die Hilfe am NMR.

Bei Simon Frewert und Qiang Tu, die zu dieser Arbeit beigetragen haben.

Bei der gesamten Arbeitsgruppe, die mir durch ihre Unterstützung bei dieser Arbeit geholfen hat.