

Untersuchungen methylierter Myxocheline und
neuer Sekundärmetabolitfamilien
aus Myxobakterien

Dissertation
zur Erlangung des Grades
des Doktors der Naturwissenschaften
der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät III
Chemie, Pharmazie, Bio- und Werkstoffwissenschaften
der Universität des Saarlandes

von
Apotheker
Dipl.-Pharm. Thorsten Klefisch

Saarbrücken
2014

Tag des Kolloquiums: 15. Oktober 2014

Dekan: Prof. Dr. Volkhard Helms

Berichterstatter: Prof. Dr. Rolf Müller
Prof. Dr. Uli Kazmaier

Vorsitz: Prof. Dr. Rolf W. Hartmann

Akad. Mitarbeiter: Dr. Josef Zapp

*„Gegenüber der Fähigkeit,
die Arbeit eines einzigen Tages sinnvoll zu ordnen,
ist alles andere im Leben ein Kinderspiel.“*

(Johann Wolfgang von Goethe)

Danksagung

Ich möchte mich besonders bei Prof. Dr. Rolf Müller bedanken für die Überlassung eines interessanten und breit gefächerten Themengebietes und damit der Möglichkeit, eine Vielzahl von modernen Methoden und Techniken in einem hervorragend ausgestatteten Umfeld zu erlernen. Auch bedanke ich mich für die immerwährende Motivation, die hilfreichen Anregungen, ein stets offenes Ohr sowie das Vertrauen und die gestalterischen Freiheiten bei wissenschaftlicher Lehre und organisatorischen Aktivitäten im Rahmen der DPhG.

Mein besonderer Dank gilt auch Prof. Dr. Uli Kazmaier für die Übernahme des Koreferats und Dr. Josef Zapp für den Beisitz in der Prüfungskommission. Herzlich bedanke ich mich bei Dr. Kirsten Harmrolfs und Dr. Peter Meiser für das Korrekturlesen meiner Dissertation. Vielen Dank, Dr. Sabine Wilbrand für die gute Kooperation, den hilfreichen Informationsaustausch und die Bereitstellung von Myxochelinen für die Testung.

Ich bedanke mich bei Dr. Alberto Plaza, Dr. Josef Zapp, Dr. Ole Revermann und Dr. Stephan Hüttel für die NMR-Messungen und die nützlichen Tipps zur Auswertung und Strukturaufklärung. Ausdrücklich möchte ich mich bei Dr. Ole Revermann bedanken für die hervorragenden Ratschläge zur Substanzisolierung und das Rückenstärken während des Zusammenschreibens. Desweiteren gilt mein Dank: Dr. Ronald Garcia für die mikrobiologische Einweisung und die Hilfe bei der Kultivierung neuer Stämme, Dr. Stephan Hüttel für das Erlernen von Fermentationstechniken, Dr. Jennifer Herrmann für die MALDI-Messungen und Aktivitätstestung, Dr. Daniel Krug für die Hilfe bei allen LC-MS-Belangen und IT-Problemen, Thomas Hoffmann und Eva Luxenburger ebenfalls für die Unterstützung bei der LC-MS sowie Dr. Peter Meiser, Dr. Michael Ring, Dr. Dominik Pistorius und Laura Bleicher für die tolle Zusammenarbeit bei den Seminaren zur Klinischen Pharmazie.

Ein großer Dank gilt allen Freunden, die ich innerhalb und außerhalb des Arbeitskreises gefunden habe und die mir stets mit Rat und Tat zur Seite standen, für die wunderbare gemeinsame Zeit und die großartigen Freizeitgestaltungen in Saarbrücken. Ich danke der gesamten Arbeitsgruppe für die fabelhafte Zusammenarbeit und ein harmonisches Miteinander.

Ganz besonders danke ich meiner Familie, meiner Freundin und den Freunden aus der Heimat für die nie endende Unterstützung und Motivation, die zeitlichen Entbehnungen und dafür, dass sie mir es möglich machen, meine Ziele zu erreichen.

Publikationen und Tagungsbeiträge

Teile der vorliegenden Arbeit sind bisher nicht veröffentlicht worden. Ihre Publikation wird zur Zeit vorbereitet.

Klefisch, T.; Plaza, A.; Garcia, R.; Müller, R. Thaxteramides A - D, novel (lipo-)peptides from the myxobacterium *Jahnella thaxteri* SBSr007. *J. Nat. Prod.* (in Erstellung).

Bian, X.; Huang, F.; Wang, H.; **Klefisch, T.;** Müller, R.; Zhang, Y. Heterologous production of glidobactins/luminmycins in *Escherichia coli* Nissle expressing glidobactin biosynthetic gene cluster from *Burkholderia* DSM7029. *ChemBioChem* (eingereicht).

Klefisch, T.; Meiser, P.; Müller, R. Siderophore methylation as method for iron release in myxobacteria? Posterpräsentation, International VAAM Workshop 2008 “*Biology and Chemistry of Antibiotic-Producing Bacteria*”, Technische Universität Berlin, 2008.

Bode, H. B.; Meiser, P.; **Klefisch, T.;** Socorro D.J. Cortina, N.; Krug, D.; Göhring, A.; Schwär, G.; Mahmud, T.; Elnakady, Y. A.; Müller, R. Mutasynthesis-derived myxalamids and origin of the isobutyryl-CoA starter unit of myxalamid B. *ChemBioChem* 2007, 8 (17), 2139-2144.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis	X
Abkürzungsverzeichnis	XII
Zusammenfassung	XV
Abstract	XVI
1. Einleitung	1
1.1. Myxobakterien	1
1.1.1. Eine allgemeine Einführung	1
1.1.2. Myxobakterien als Quelle biologisch aktiver Naturstoffe	5
1.2. Die Biosynthese von Polyketiden und nichtribosomalen Peptiden	9
1.2.1. Nichtribosomale Peptidsynthetasen	11
1.2.2. Polyketidsynthetasen	14
1.2.2.1. Typ I PKS	14
1.2.2.2. Typ II PKS und Typ III PKS	17
1.2.3. Freisetzungsmechanismen	18
1.2.4. Post-PKS/NRPS-Reaktionen	19
1.3. Eisenhomöostase in Bakterien	20
1.3.1. Eisen – Redoxpartner mit zwei Gesichtern	20
1.3.2. Eisenaufnahme	21
1.3.2.1. Siderophore	21
1.3.2.2. Mechanismen des Eisentransports	23
1.3.3. Eisenfreisetzung und -speicherung	25
1.3.4. Regulation der Eisenhomöostase	26
1.4. Zielsetzung	28
1.4.1. Modifizierte Myxocheline und die Eisenfreisetzung in <i>Myxococcus xanthus</i>	28
1.4.2. Identifizierung und Isolierung unbekannter Sekundärmetabolite aus myxobakteriellen Neuisolaten	30
2. Material und Methoden	32
2.1. Chemikalien und Ausgangsstoffe	32
2.2. Enzyme, Kits und Marker	33
2.3. Lösungen und Puffer	34
2.3.1. Lösungen und Puffer für die Molekularbiologie	34

2.3.2. Lösungen und Puffer für die Proteinaufreinigung und -analytik	35
2.3.3. Medienzusätze	36
2.3.4. Antibiotikalösungen	37
2.4. Medien	37
2.5. Geräte und sonstige Materialien	38
2.6. Bakterienstämme, Plasmide, Oligonukleotide	39
2.6.1. Bakterienstämme	39
2.6.2. Vektoren	40
2.6.3. Plasmide	41
2.6.4. Oligonukleotide	41
2.7. Kultivierung und Lagerung von Mikroorganismen	41
2.7.1. Myxobakterien	42
2.7.1.1. <i>Myxococcus xanthus</i> DK1622	42
2.7.1.2. <i>Jahnella thaxteri</i> SBSr007 und <i>Chondromyces</i> sp. SBCm009	42
2.7.2. <i>Escherichia coli</i>	42
2.8. Isolierung von DNA	43
2.8.1. Isolierung von genomischer DNA	43
2.8.2. Isolierung von Plasmid-DNA	43
2.8.2.1. Reinigung über Kieselgelsäulen-Kits	43
2.8.2.2. Alkalische Lyse	43
2.9. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	44
2.10. Enzymatische Manipulation von DNA	45
2.10.1. Hydrolyse mit Restriktionsendonukleasen	45
2.10.2. Ligation	45
2.10.3. TOPO TA-Klonierung	46
2.11. Trennung und Aufreinigung von DNA	46
2.11.1. Agarosegelelektrophorese	46
2.11.2. Extraktion von Agarosegelen	46
2.12. Sequenzierung von DNA	47
2.13. Transformation	47
2.13.1. Transformation von <i>E. coli</i>	47
2.13.1.1. Herstellung elektrokompenter Zellen von <i>E. coli</i> DH10B	47
2.13.1.2. Herstellung elektrokompenter Zellen von <i>E. coli</i> Rosetta 2(DE3)pLysS	47
2.13.1.3. Elektroporation	48
2.13.1.4. Selektion der Transformanten	48
2.13.2. Transformation von <i>Myxococcus xanthus</i> DK1622	49
2.13.2.1. Herstellung elektrokompenter Zellen	49

2.13.2.2. Elektroporation	49
2.13.2.3. Selektion der Transformanten	49
2.14. Heterologe Expression	50
2.14.1. Kultivierung und Gewinnung der Proteinextrakte	50
2.14.2. Proteinaufreinigung	50
2.14.3. Abspaltung des His ₆ -Tags	51
2.15. Proteinanalytik	51
2.15.1. Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	51
2.15.2. SDS-PAGE	52
2.15.3. MALDI-TOF-MS	53
2.16. <i>In silico</i> -Analyse von DNA-Sequenzen und Proteinsequenzen	54
2.17. Identifizierung und Charakterisierung der Myxochelin- <i>O</i> -Methyltransferase	54
2.17.1. Kultivierung und Gewinnung des Rohextraktes	54
2.17.2. Aktivitätsbasierte Aufreinigung des nativen Proteins	54
2.17.2.1. Ammoniumsulfat-Fällung	54
2.17.2.2. Chromatographische Trennung	55
2.17.3. Methyltransferase-Assay mit Myxochelin A	56
2.17.4. Methyltransferase-Assay mit Myxochelin B	57
2.17.5. Enzymkinetik	57
2.18. Produktionsanalysen	58
2.18.1. Bestimmung der Methylmyxochelin A-Produktion von Wildtyp und Mutanten	58
2.18.2. Bestimmung der Methylmyxochelin A / Myxochelin A - Produktionsverhältnisse in Zellen und Medium	58
2.18.3. Bestimmung der Produktion von Myxochelinen und Methylmyxochelinen unter Eisenmangel	58
2.19. Isolierung von Sekundärmetaboliten	59
2.19.1. Isolierungsmethoden	59
2.19.2. <i>Jahmella thaxteri</i> SBSr007	62
2.19.2.1. Fermentation	62
2.19.2.2. Gewinnung des Extraktes und Festlegung von Zielsubstanzen	63
2.19.2.3. Isolierung der Zielsubstanzen	63
2.19.3. <i>Chondromyces</i> sp. SBCm009	64
2.19.3.1. Fermentation	64
2.19.3.2. Gewinnung des Extraktes und Festlegung von Zielsubstanzen	64
2.19.3.3. Isolierung der Zielsubstanzen	64
2.19.3.4. Kultivierung im Erlenmeyer-Kulturkolben	65
2.19.3.5. Gewinnung des Extraktes	65
2.19.3.6. Isolierung der Zielsubstanzen	65

2.20. Analytik von Sekundärmetaboliten	66
2.20.1. Chromatographie	66
2.20.2. Kernresonanzspektroskopie (NMR)	67
2.20.3. Hydrolyse und Konfigurationsbestimmung von Aminosäuren	67
2.20.4. Aktivitätstests	68
2.20.4.1. Testung auf antimikrobielle Aktivität	68
2.20.4.2. Testung auf zytotoxische Aktivität (MTT-Test)	69
3. Die Myxochelin-<i>O</i>-Methyltransferase und die Funktion von Methylmyxochelinen in der Eisenhomöostase von <i>M. xanthus</i> DK1622	70
3.1. Ergebnisse	70
3.1.1. Aktivitätsbasierte Aufreinigung	70
3.1.2. MALDI-TOF-MS- und <i>in silico</i> -Analyse	77
3.1.3. Heterologe Expression und Identifizierung des Enzyms	81
3.1.4. Enzymkinetik	88
3.1.5. Homologievergleich der Myxochelin- <i>O</i> -Methyltransferase mit anderen Catechol- <i>O</i> -Methyltransferasen	89
3.1.6. MXAN_2296-Homologe in Myxobakterien	91
3.1.7. Testung der Methyltransferasen gegenüber Myxochelin B	91
3.1.8. Genetische Modifikation und Analyse von Inaktivierungsmutanten	92
3.1.9. Produktionsanalysen von <i>M. xanthus</i> DK1622	96
3.2. Diskussion	99
3.2.1. Identifizierung und Charakterisierung der Myxochelin- <i>O</i> -Methyltransferase	99
3.2.2. Die Funktion von Methylmyxochelinen bei der Eisenhomöostase in <i>Myxococcus xanthus</i> DK1622	102
3.2.3. Hypothese zur Eisenfreisetzung aus Ferri-(Methyl-)Myxochelinen	105
4. Neue Sekundärmetabolitfamilien aus <i>Jahnella thaxteri</i> SBSr007 und <i>Chondromyces</i> sp. SBCm009	110
4.1. Ergebnisse	110
4.1.1. <i>Jahnella thaxteri</i> SBSr007	110
4.1.1.1. Zielsubstanzen und Ausbeuten	110
4.1.1.2. Strukturaufklärung	114
4.1.1.3. Konfiguration der Aminosäuren	130
4.1.1.4. Fragmentierungsmuster	132
4.1.1.5. Biosynthese von Thaxteramiden	134
4.1.2. <i>Chondromyces</i> sp. SBCm009	144
4.1.2.1. Zielsubstanzen und Ausbeuten	144
4.1.2.2. Strukturaufklärung	148

4.1.2.3. Konfiguration der Aminosäuren	172
4.1.2.4. Fragmentierungsmuster	175
4.1.3. Aktivitätstests	177
4.2. Diskussion	178
4.2.1. LC/MS-Screening und Isolierung neuer Sekundärmetabolite	178
4.2.2. Biosynthesemodelle und Perspektiven	183
5. Anhang	192
6. Referenzen	214

Abbildungsverzeichnis

Kapitel 1

Abbildung 1-1: Gleiten und Schwärmen von <i>M. xanthus</i>	2
Abbildung 1-2: Fruchtkörper von <i>Myxococcus xanthus</i> , <i>Stigmatella erecta</i> und <i>Chondromyces crocatus</i>	3
Abbildung 1-3: Der myxobakterielle Lebenszyklus	4
Abbildung 1-4: Biologisch aktive Sekundärstoffe aus Myxobakterien.	7
Abbildung 1-5: Übertragung des Ppant-Arms aus Coenzym A auf Carrier-Proteine	10
Abbildung 1-6: Peptidbiosynthese durch eine NRPS	12
Abbildung 1-7: Biochemische Modifikation von nichtribosomalen Peptiden	13
Abbildung 1-8: Polyketidbiosynthese durch eine PKS	15
Abbildung 1-9: Reduktive Modifikation eines Polyketids	16
Abbildung 1-10: Typische Vertreter von Typ II- und Typ III-Polyketiden	18
Abbildung 1-11: Produktfreisetzung eines fiktiven Hexapeptids durch eine TE-Domäne	18
Abbildung 1-12: Siderophorklassen und exemplarische Strukturen	22
Abbildung 1-13: Aufnahme von Ferri-Siderophoren in gramnegativen Bakterien	24
Abbildung 1-14: Methylmyxocheline	28
Abbildung 1-15: Verschiebung der Koordination in Ferri-Enterobactin von der Catechol- zur Salicylposition unter Protonierung	29

Kapitel 3

Abbildung 3-1: Methyltransferase-Assay mit dem Proteinrohextrakt	71
Abbildung 3-2: Methyltransferase-Assay mit dem denaturierten Proteinrohextrakt	72
Abbildung 3-3: Zell/XAD-Extrakt von <i>M. xanthus</i> DK1622	73
Abbildung 3-4: Vergleich der MS ² -Spektren von Myxochelin A und Methylmyxochelin A	74
Abbildung 3-5: Aktivitätsvergleich der Fraktionen aus der Ammoniumsulfat-Fällung	75
Abbildung 3-6: FPLC-UV-Chromatogramm (280 nm) einer Trennung über Gelfiltration	75
Abbildung 3-7: FPLC-UV-Chromatogramm (214 nm) einer Trennung auf einer HiTrap ButylHP 1ml - Säule	76
Abbildung 3-8: FPLC-UV-Chromatogramm (280 nm) der Trennung auf einer Adenosin-Agarose-Säule	77
Abbildung 3-9: SDS-PAGE der aktiven Fraktion nach aktivitätsbasierter Aufreinigung	78
Abbildung 3-10: Aminosäuresequenz von MXAN_2293	79
Abbildung 3-11: Aminosäuresequenz von MXAN_2296	79
Abbildung 3-12: Aminosäuresequenz von MXAN_3033	79
Abbildung 3-13: Motive SAM-abhängiger Methyltransferasen nach Kagan	80
Abbildung 3-14: Klonierung der Methyltransferase-Gene in den Expressionsvektor pET 28b(+)	81
Abbildung 3-15: Plasmidkarten von pET2293, pET2296 und pET3033	82
Abbildung 3-16: Agarosegelelektrophorese nach PCR von <i>mxan_2293</i> , <i>mxan_2296</i> und <i>mxan_3033</i>	82
Abbildung 3-17: SDS-PAGE nach heterologer Expression von MXAN_2293 und MXAN_2296	83
Abbildung 3-18: SDS-PAGE nach heterologer Expression von MXAN_3033	84

Abbildung 3-19: Methyltransferase-Assays mit den löslichen Proteinfractionen von R2293, R2296, R3033 und Rosetta 2(DE3)pLysS	85
Abbildung 3-20: MS ² -Spektrum von Methylmyxochelin A aus dem Methyltransferase-Assay mit R2296	86
Abbildung 3-21: SDS-PAGE nach Aufreinigung der Myxochelin-O-Methyltransferase	87
Abbildung 3-22: MALDI-TOF-MS-Analyse der aufgereinigten Myxochelin-O-Methyltransferase	87
Abbildung 3-23: Michaelis-Menten-Kinetik der Myxochelin-O-Methyltransferase	88
Abbildung 3-24: <i>ClustalW</i> -Alignment von MXAN_2296 mit pflanzlichen Catechol-O-Methyltransferasen	90
Abbildung 3-25: <i>ClustalW</i> -Alignment von MXAN_2296 mit myxobakteriellen Methyltransferasen	91
Abbildung 3-26: Methyltransferase-Assays mit Myxochelin B	92
Abbildung 3-27: Genetische Umgebung von <i>mxan_2296</i>	93
Abbildung 3-28: Inaktivierung eines chromosomalen Gens durch Plasmidintegration	94
Abbildung 3-29: Relative Myxochelin A-Produktion von Wildtyp und der <i>M. xanthus</i> DK1622-Mutante TK2296	95
Abbildung 3-30: Plasmidkarte von pTOPO2295	95
Abbildung 3-31: Agarosegelelektrophorese nach PCR von <i>mxan_2295</i> und Verdau von pTOPO2295	96
Abbildung 3-32: Methylmyxochelin A / Myxochelin A-Produktionsverhältnisse in Medium (XAD) und Zellen	97
Abbildung 3-33: Relative Produktion von Myxochelin A, Myxochelin B, Methylmyxochelin A und Methylmyxochelin B in Vollmedium und eisenreduziertem Medium	98
Abbildung 3-34: Produktionsverhältnisse von Methylmyxochelin A / Myxochelin A und Methylmyxochelin B / Myxochelin B in Vollmedium und eisenreduziertem Medium	98
Abbildung 3-35: Koordination von Ferri-Myxochelin A und Ferri-Methylmyxochelin A	103
Abbildung 3-36: <i>ClustalW</i> -Alignment des SIP MXAN_3639 mit bakteriellen ViuB-Homologen	107
Abbildung 3-37: <i>ClustalW</i> -Alignment des SIP MXAN_3639 mit ViuB-Homologen der Gruppe II	108

Kapitel 4

Abbildung 4-1: Basepeak-Chromatogramm des XAD-Extrakts von <i>Jahnella thaxteri</i> SBSr007 und Markierung der Zielkomponenten-Peaks	110
Abbildung 4-2: Basepeak-Chromatogramme und HR-Massenspektren der gereinigten Substanzen TKcpd904, TKcpd782 und TKcpd473	113
Abbildung 4-3: Struktur von Thaxteramid A mit ausgewählten ¹ H- ¹ H-COSY- und HMBC-Korrelationen	114
Abbildung 4-4: Struktur von Thaxteramid C mit ausgewählten ¹ H- ¹ H-COSY- und HMBC-Korrelationen	121
Abbildung 4-5: Struktur von Thaxteramid D mit ausgewählten ¹ H- ¹ H-COSY- und HMBC-Korrelationen	127
Abbildung 4-6: Strukturen der Thaxteramide aus <i>Jahnella thaxteri</i> SBSr007 mit den mittels Marfey's Methode bestimmten stereochemischen Konfigurationen	132
Abbildung 4-7: MS ² -Spektrum von Thaxteramid A und zugeordnete Fragmentationen	132
Abbildung 4-8: MS ² -Spektrum von Thaxteramid C und zugeordnete Fragmentationen	133
Abbildung 4-9: MS ² -Spektrum von Thaxteramid D und zugeordnete Fragmentationen	133
Abbildung 4-10: Mutmaßliches PKS/NRPS-Biosynthesegencluster <i>thxA</i> von Thaxteramid A/B	135
Abbildung 4-11: Mutmaßliches PKS/NRPS-Biosynthesegencluster <i>thxC</i> von Thaxteramid C	139
Abbildung 4-12: Basepeak-Chromatogramm des XAD-Extrakts von <i>Chondromyces</i> sp. SBCm009 und Markierung der Zielkomponenten-Peaks	144

Abbildung 4-13: Basepeak-Chromatogramme und Massenspektren der gereinigten Substanzen TKcpd818 und TKcpd832	147
Abbildung 4-14: Basepeak-Chromatogramme und Massenspektren der gereinigten Substanzen TKcpd831 und TKcpd845	147
Abbildung 4-15: Struktur von Chondrodepsid A mit ausgewählten ^1H - ^1H -COSY- und HMBC-Korrelationen	148
Abbildung 4-16: Struktur von Chondrodepsid B mit ausgewählten ^1H - ^1H -COSY- und HMBC-Korrelationen	155
Abbildung 4-17: Struktur von Chondrosarid B mit ausgewählten ^1H - ^1H -COSY- und HMBC-Korrelationen	160
Abbildung 4-18: Struktur von Chondrosarid A mit ausgewählten ^1H - ^1H -COSY- und HMBC-Korrelationen	167
Abbildung 4-19: Strukturen der Chondrodepside und Chondrosaride aus <i>Chondromyces</i> sp. SBCm009 mit den mittels Marfeys Methode bestimmten stereochemischen Konfigurationen	174
Abbildung 4-20: MS^2 -Spektrum von Chondrodepsid A und zugeordnete Fragmentationen	175
Abbildung 4-21: MS^2 -Spektrum von Chondrodepsid B und zugeordnete Fragmentationen	175
Abbildung 4-22: MS^2 -Spektrum von Chondrosarid A und zugeordnete Fragmentationen	176
Abbildung 4-23: MS^2 -Spektrum von Chondrosarid B und zugeordnete Fragmentationen	176
Abbildung 4-24: Naturstoffe mit Strukturmerkmalen der isolierten Sekundärmetabolite	182
Abbildung 4-25: Hypothetisches Modell zur Biosynthese der Chondrodepside über ein PKS/NRPS-Gencluster	188
Abbildung 4-26: Hypothetisches Modell zur Biosynthese der Chondrosaride über ein PKS/NRPS-Gencluster	189

Kapitel 5

Abbildung 5-1: MALDI-TOF-MS-Analyse von MXAN_2293 nach aktivitätsbasierter Aufreinigung	192
Abbildung 5-2: MALDI-TOF-MS-Analyse von MXAN_2296 nach aktivitätsbasierter Aufreinigung	192
Abbildung 5-3: MALDI-TOF-MS-Analyse von MXAN_3033 nach aktivitätsbasierter Aufreinigung	193
Abbildung 5-4: MALDI-TOF-MS-Analyse von MXAN_2293 nach heterologer Expression	193
Abbildung 5-5: MALDI-TOF-MS-Analyse von MXAN_2296 nach heterologer Expression	194
Abbildung 5-6: MALDI-TOF-MS-Analyse von MXAN_3033 nach heterologer Expression	194
Abbildung 5-7: MALDI-TOF-MS-Analyse von MXAN_2296 nach heterologer Expression und Aufreinigung, oberer Bande	195
Abbildung 5-8: MALDI-TOF-MS-Analyse von MXAN_2296 nach heterologer Expression und Aufreinigung, untere Bande	195
Abbildung 5-9: ^1H -NMR-Spektrum von Thaxteramid A	196
Abbildung 5-10: ^1H , ^1H -COSY-Spektrum von Thaxteramid A	196
Abbildung 5-11: 2D-TOCSY-Spektrum von Thaxteramid A	197
Abbildung 5-12: HSQC-Spektrum von Thaxteramid A	197
Abbildung 5-13: HMBC-Spektrum von Thaxteramid A	198
Abbildung 5-14: ^1H -NMR-Spektrum von Thaxteramid C	198
Abbildung 5-15: ^1H , ^1H -COSY-Spektrum von Thaxteramid C	199
Abbildung 5-16: 2D-TOCSY-Spektrum von Thaxteramid C	199
Abbildung 5-17: HSQC-Spektrum von Thaxteramid C	200

Abbildung 5-18: HMBC-Spektrum von Thaxteramid C	200
Abbildung 5-19: ^1H -NMR-Spektrum von Thaxteramid D	201
Abbildung 5-20: ^1H , ^1H -COSY-Spektrum von Thaxteramid D	201
Abbildung 5-21: 2D-TOCSY-Spektrum von Thaxteramid D	202
Abbildung 5-22: HSQC-Spektrum von Thaxteramid D	202
Abbildung 5-23: HMBC-Spektrum von Thaxteramid D	203
Abbildung 5-24: ^1H -NMR-Spektrum von Chondrodepsid A	203
Abbildung 5-25: ^1H , ^1H -COSY-Spektrum von Chondrodepsid A	204
Abbildung 5-26: 2D-TOCSY-Spektrum von Chondrodepsid A	204
Abbildung 5-27: HSQC-Spektrum von Chondrodepsid A	205
Abbildung 5-28: HMBC-Spektrum von Chondrodepsid A	205
Abbildung 5-29: ^1H -NMR-Spektrum von Chondrodepsid B	206
Abbildung 5-30: ^1H , ^1H -COSY-Spektrum von Chondrodepsid B	206
Abbildung 5-31: 2D-TOCSY-Spektrum von Chondrodepsid B	207
Abbildung 5-32: HSQC-Spektrum von Chondrodepsid B	207
Abbildung 5-33: HMBC-Spektrum von Chondrodepsid B	208
Abbildung 5-34: ^1H -NMR-Spektrum von Chondrosarid B	208
Abbildung 5-35: ^1H , ^1H -COSY-Spektrum von Chondrosarid B	209
Abbildung 5-36: 2D-TOCSY-Spektrum von Chondrosarid B	209
Abbildung 5-37: HSQC-Spektrum von Chondrosarid B	210
Abbildung 5-38: HMBC-Spektrum von Chondrosarid B	210
Abbildung 5-39: ROESY-Spektrum von Chondrosarid B	211
Abbildung 5-40: ^1H -NMR-Spektrum von Chondrosarid A	211
Abbildung 5-41: ^1H , ^1H -COSY-Spektrum von Chondrosarid A	212
Abbildung 5-42: 2D-TOCSY-Spektrum von Chondrosarid A	212
Abbildung 5-43: HSQC-Spektrum von Chondrosarid A	213
Abbildung 5-44: HMBC-Spektrum von Chondrosarid A	213

Tabellenverzeichnis

Kapitel 2

Tabelle 2-1: Chemikalien und Ausgangsstoffe	32
Tabelle 2-2: Enzyme, Kits und Marker	33
Tabelle 2-3: Lösungen und Puffer für die Molekularbiologie	34
Tabelle 2-4: Lösungen und Puffer für die Proteinaufreinigung und -analytik	35
Tabelle 2-5: Medienzusätze	36
Tabelle 2-6: Antibiotikallösungen	37
Tabelle 2-7: Medien	37
Tabelle 2-8: Geräte und Materialien	38
Tabelle 2-9: Myxobakterien-Stämme	39
Tabelle 2-10: <i>Escherichia coli</i> -Stämme	40
Tabelle 2-11: Erzeugte Mutanten	40
Tabelle 2-12: Vektoren	40
Tabelle 2-13: Erzeugte Plasmide	41
Tabelle 2-14: Oligonukleotide/Primer	41
Tabelle 2-15: Reaktionsansatz für die PCR	44
Tabelle 2-16: Temperaturprogramm eines PCR-Zyklus	45
Tabelle 2-17: Gradient für die Proteinaufreinigung	51
Tabelle 2-18: Zusammensetzung von Polyacrylamidgelen	52
Tabelle 2-19: Gradient für die Hydrophobe Interaktionschromatographie	55
Tabelle 2-20: Trennsysteme für die Größenausschlusschromatographie	59
Tabelle 2-21: Gradient I für die Flash-Chromatographie	60
Tabelle 2-22: Gradient II für die Flash-Chromatographie	60
Tabelle 2-23: Methanolische Gradienten für die präparative HPLC	61
Tabelle 2-24: Basische Methanol-Gradienten für die präparative HPLC - Teil 1	61
Tabelle 2-25: Basische Methanol-Gradienten für die präparative HPLC - Teil 2	61
Tabelle 2-26: Isokratische Acetonitril-Gradienten für die präparative HPLC	62
Tabelle 2-27: Acetonitril-Gradienten für die präparative HPLC	62
Tabelle 2-28: Gradienten für die HPLC-UV/ESI-MS	66
Tabelle 2-29: Gradient für die UPLC-UV/NanoESI-HR-MS	67

Kapitel 3

Tabelle 3-1: Sequenzidentität und -homologie von MXAN_2296 mit pflanzlichen Catechol- <i>O</i> -Methyltransferasen	90
Tabelle 3-2: Annotationen zur genetischen Umgebung von <i>mxan_2296</i>	93

Kapitel 4

Tabelle 4-1: Exakte Massen der Zielkomponenten aus <i>Jahnella thaxteri</i> SBSr007, berechnete Summenformeln und zugehörige <i>SciFinder</i> -Datenbankeinträge	111
Tabelle 4-2: NMR-Tabelle zu Thaxteramid A	117
Tabelle 4-3: NMR-Tabelle zu Thaxteramid C	124
Tabelle 4-4: NMR-Tabelle zu Thaxteramid D	128
Tabelle 4-5: Konfigurationsbestimmung der Aminosäuren von Thaxteramid A nach Marfey	131
Tabelle 4-6: Konfigurationsbestimmung der Aminosäuren von Thaxteramid C nach Marfey	131
Tabelle 4-7: Konfigurationsbestimmung der Aminosäuren von Thaxteramid D nach Marfey	131
Tabelle 4-8: Abgeleitete Funktionen der <i>open reading frames</i> (ORFs) aus dem Thaxteramid A/B-Biosynthesegencluster über einer <i>BLASTp</i> -Suche	137
Tabelle 4-9: Bestimmung der Substratspezifitäten der AT-Domänen in ThxA1 und ThxA2	138
Tabelle 4-10: Substratspezifitäten der A-Domänen in ThxA2	138
Tabelle 4-11: Konserviertes Motiv HHXXXDG in NRPS-C-Domänen von ThxA2-C9b	138
Tabelle 4-12: Abgeleitete Funktionen der <i>open reading frames</i> (ORFs) aus dem Thaxteramid C-Biosynthesegencluster über einer <i>BLASTp</i> -Suche	141
Tabelle 4-13: Bestimmung der Substratspezifitäten der AT-Domänen in ThxC1 und ThxC2	142
Tabelle 4-14: Substratspezifitäten der A-Domänen in ThxC2	143
Tabelle 4-15: Exakte Massen der Zielkomponenten aus <i>Chondromyces</i> sp. SBCm009, berechnete Summenformeln und zugehörige <i>SciFinder</i> -Datenbankeinträge	145
Tabelle 4-16: NMR-Tabelle zu Chondrodepsid A	152
Tabelle 4-17: NMR-Tabelle zu Chondrodepsid B	157
Tabelle 4-18: NMR-Tabelle zu Chondrosarid B	164
Tabelle 4-19: NMR-Tabelle zu Chondrosarid A	170
Tabelle 4-20: Konfigurationsbestimmung der Aminosäuren von Chondrodepsid A nach Marfey	173
Tabelle 4-21: Konfigurationsbestimmung der Aminosäuren von Chondrodepsid B nach Marfey	173
Tabelle 4-22: Konfigurationsbestimmung der Aminosäuren von Chondrosarid B nach Marfey	174

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenylierungsdomäne
ABC-Transporter	ATP-Binding Cassette-Transporter
ACP	Acyl-Carrier-Protein
AMT	Aminotransferasedomäne
APS	Ammoniumpersulfat
AT	Acyltransferasedomäne
(d)ATP	(Desoxy-)Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
BPC	Basepeak Chromatogramm
C	Kondensationsdomäne
CAOMT	Caffeoyl-3- <i>O</i> -Methyltransferase
CCoAOMT	Caffeoyl-CoA-3- <i>O</i> -Methyltransferase
CoA	Coenzym A
COMT	Catechol- <i>O</i> -Methyltransferase
COSY	Correlation Spectroscopy
CP	Carrier-Protein
(d)CTP	(Desoxy-)Cytidintriphosphat
DDT	Dithiothreitol
DH	Dehydratasedomäne
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPS	DNA-binding Protein During Stationary Phase
DtxR	Diphtheria Toxin Regulator
E	Epimerisierungsdomäne
ECF-Sigma-Faktor	Extracytoplasmatic Function-Sigma-Faktor
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure
EIC	Extracted Ion Chromatogramm
ER	Enoylreduktasedomäne
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FDLA	1-Fluoro-2,4-dinitrophenyl-5-L/D-leucinamid
FIOMT	Flavonoid- <i>O</i> -Methyltransferase
FMN	Flavinmononukleotid / Riboflavin-5'-phosphat
FNR	Ferredoxin-Reduktase
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
FT-ICR	Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance
FT-MS	Fourier Transform Mass Spectrometry
Fur	Ferric Uptake Regulator
(d)GTP	(Desoxy-)Guanosintriphosphat
HC	Heterozyklisierungsdomäne
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonsäure
HIC	Hydrophobe-Interaktionschromatographie

HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HR-MS	High Resolution Mass Spectrometry
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
IPTG	Isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranosid
IR	Infrarotspektroskopie
kbp	Kilobasenpaar
KR	Ketoreduktasedomäne
KS	Ketosynthasedomäne
LC	Flüssigchromatographie / Liquid Chromatography
MALDI-TOF-MS	Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry
Mbp	Megabasenpaar
MeS	2-(<i>N</i> -Morpholino)ethansulfonsäure
mRNA	Messenger RNA
MS	Massenspektrometrie / Mass Spectrometry
MT	Methyltransferasedomäne
MTT	Dimethylthiazolyl-diphenyl-tetrazoliumbromid
NADPH	Dihydropyridinaminadeninindinukleotidphosphat
NanoESI	Nanoelectrospray Ionization
NHE	Normalwasserstoffelektrode
NMR	Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy
NRPS	Nichtribosomale Peptidsynthetase
oDOMT	<i>ortho</i> -Diphenol- <i>O</i> -Methyltransferase
OM-Rezeptor	Außenmembranrezeptor / Periplasmamembranrezeptor
orf	open reading frame
Ox	Oxidationsdomäne
PAL	Phenylalanin-Ammoniumlyase
PBP	periplasmatisches Bindeprotein
PCP	Peptidyl-Carrier-Protein
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PKS	Polyketidsynthase
PLP	Pyridoxalphosphat
Ppant	4'-Phosphopantetheinylrest
PPTase	Phosphopantetheinyl-Transferase
Red	Reduktasedomäne
RNA	Ribonukleinsäure
ROESY	Rotating Frame Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
SAM	<i>S</i> -(5'-Adenosyl)- <i>L</i> -Methionin
SAP	Shrimp Alkaline Phosphatase
SBP	Siderophore Binding Protein
SDS	Natriumdodecylsulfat / Natriumlaurylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese

SIP	Siderophore-Interacting Protein
SNAC-Ester	<i>N</i> -Acetylcysteamin-Thioester
sRNA	small RNA
TE	Thioesterasedomäne
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethyldiamin
TOCSY	Total Correlation Spectroscopy
(d)TTP	(Desoxy-)Thymidintriphosphat
UPLC	Ultra Performance Liquid Chromatography
UV-Vis	ultravioletter und sichtbarer Wellenlängenbereich des Lichts
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactosid

Zusammenfassung

Naturstoffe aus Myxobakterien verfügen über eine hohe strukturelle Diversität und ein immenses Spektrum biologischer Aktivitäten. Die nähere Betrachtung ihrer physiologischen und biochemischen Hintergründe führt häufig zur Erkennung und Aufklärung außergewöhnlicher Biosynthesewege und metabolischer Zusammenhänge.

Der erste Teil dieser Arbeit befasst sich mit den kürzlich in einem LC-MS-Screening identifizierten methylierten Biscatechol-Siderophoren Methylmyxochelin A und B aus *Myxococcus xanthus* DK1622. Ein biochemisches und aktivitätsbasiertes Screening des Proteinextrakts kombiniert mit einer MALDI-TOF-MS-Analyse und heterologer Expression von Zielproteinen führte zur Entdeckung und Charakterisierung der ersten beschriebenen Siderophor-Catechol-*O*-Methyltransferase, welche eine Spezifität gegenüber Myxochelin A zeigte. Ausgehend von Produktionsanalysen und in Kooperation durchgeführten koordinationschemischen Analysen wurde eine Hypothese zur Funktion von Methylmyxochelinen in der Eisenhomöostase formuliert.

Der zweite Teil beschreibt die LC-MS-basierte Identifizierung und Isolierung der neuen myxobakteriellen Sekundärmetabolitfamilien Thaxteramide aus *Jahnella thaxteri* SBSr007 sowie Chondrodepside und Chondrosaride aus *Chondromyces* sp. SBCm009. Über *in silico*-Analysen konnten zwei PKS/NRPS-Biosynthesegencluster der Thaxteramide gefunden und spezifiziert werden. Für die Chondrodepside und Chondrosaride wurden hypothetische Biosynthesemodelle aufgestellt.

Abstract

Natural products from myxobacteria possess a highly structural diversity and an immense spectrum of biological activities. Closer inspection of their physiological and biochemical background frequently leads to the identification and elucidation of extraordinary biosynthetic pathways and metabolic relationships.

The first part of this work addresses the methylated biscatecholate siderophores Methylmyxochelin A and B from *Myxococcus xanthus* DK1622 recently identified in a LC-MS-screening. A biochemical and activity-based screening of the protein extract combined with MALDI-TOF-MS analysis and heterologous expression of target proteins led to the discovery and characterization of the first described siderophore catechol-*O*-methyltransferase exhibiting high specificity towards Myxochelin A. Based on production analyses and analyses of the coordination chemistry performed in cooperation an inferential hypothesis for the function of Methylmyxochelins in iron homeostasis was postulated.

The second part describes the LC-MS-based identification and isolation of the novel myxobacterial secondary metabolite families Thaxteramides from *Jahnella thaxteri* SBSr007 as well as Chondrodepsides and Chondrosarides from *Chondromyces* sp. SBCm009. Via *in silico*-analyses two PKS/NRPS biosynthetic gene clusters for Thaxteramides were detected and specified. For Chondrodepsides and Chondrosarides hypothetical biosynthetic models were proposed.

1. Einleitung

1.1. Myxobakterien

1.1.1. Eine allgemeine Einführung

Roland Thaxter beschrieb 1892 erstmalig eine Gruppe von Mikroorganismen als Myxobakterien, auf die er während des Sammelns von Pilzen als auf verwesendem Holz wachsende, in einem starken Orange erscheinende Lebensformen aufmerksam wurde. Bereits 1809 wurde das erste Myxobakterium *Polyangium vitellinum* von H.F. Link entdeckt, doch aufgrund des pilzähnlichen Habitus seiner Kolonien als Gastromyzet falsch eingeordnet. So war es Thaxter, der die Einzeller erstmals als Bakterien klassifizierte^{1,2}.

Die gramnegativen, nicht phototrophen, Eubakterien stellen 3 - 15 µm lange Stäbchen mit einem Durchmesser von 0,6 - 1 µm dar. Pathogene Arten sind bislang nicht bekannt^{3,4}. Sie bilden die Ordnung der *Myxococcales* in der Klasse der δ-Proteobakterien, deren Zweig vor ca. 750 - 1100 Millionen Jahren entstand. Heute werden die drei Unterordnungen *Cystobacterineae*, *Sorangiiineae* und *Nannocystineae* unterschieden, die zusammen mehr als 20 Gattungen beinhalten, darunter auch anaerobe (*Pyxidicoccus* spp.) und marine (*Haliangium* spp., *Plesiocystis* spp.) Arten⁵⁻⁹. *Myxococcus xanthus* gehört neben *Sorangium cellulosum*, *Stigmatella aurantiaca* und *Chondromyces* spp. zu den am besten untersuchten Vertretern^{10,11}. Ihren herausragenden Eigenschaften und Fähigkeiten verdanken Myxobakterien weltweit die Aufmerksamkeit von Mikrobiologen, Biotechnologen, Molekularbiologen und Naturstoffforschern aus verschiedenen Disziplinen. Hierzu zählen zunächst ihr „soziales Verhalten“ und ihre morphologische Wandelbarkeit, die letztlich vor mehr als 200 Jahren zu ihrer Entdeckung führten. Als Bodenbakterien gleiten sie auf Oberflächen und kriechen damit zu ihrer Nahrung, da sie keine Flagellen besitzen und nicht schwimmen^{3,4,12} (Abbildung 1-1). Dieser Prozess kann als eine relativ langsame Bewegung entlang der Zellachse verstanden werden, die bei *M. xanthus* zu einer Fortbewegungsgeschwindigkeit von 2 - 4 µm/min führt^{13,14}. Der Vorgang der Gleitbewegung einer einzelnen Zelle wird als *A-motility* bezeichnet. Durch Sekretion von polysaccharidhaltigem Schleim aus ringförmigen Strukturen an den Zellpolen wird die Zelle in Bewegungsrichtung geschoben, indem immer nur ein Pol aktiv Schleim sezerniert^{12,13,15}. Der Name Myxobakterien (*griechisch*: myxo- = Schleim-) leitet sich von dieser Eigenschaft ab¹⁶. Da die reine Schleimsekretion nicht als für die Fortbewegung ausreichende Antriebskraft angesehen wird, wurden weitere Modelle beschrieben und

experimentell bestätigt. Fokale Adhäsionskomplexe sollen mit Motorproteinen des Zytoskellets verbunden sein, extrazellulär am Substrat (Untergrund) haften und so die Zelle nach vorne ziehen. Andererseits sollen sich Motorproteine helikal entlang des Zytoskellets bewegen und zu einer Wellenbewegung der Zelle führen¹³. Für beide Modelle existieren Belege und wahrscheinlich ist das Gleiten der Myxobakterien ein gemeinsamer Prozess mehrerer dieser Faktoren. Insgesamt bedarf es jedoch der Zelle einer gewissen Flexibilität, die durch ein ungewöhnliches Muropeptidprofil der Zellwand zu erklären ist¹⁶. Neben dem Gleiten findet eine kooperative Bewegung von Zellgruppen statt, die als Schwärmen bezeichnet wird³. Typ IV-Pili am vorderen Zellpol, die ein vielfaches länger als die Zelle selbst sein können, binden an Fibrillen (extrazelluläre Polysaccharide und O-Antigen) der vorangehenden und benachbarten Zellen und vernetzen diese miteinander^{15,16}. Durch Zusammenziehen der Pili kommt es zu einer Vorwärtsbewegung von Zellverbänden, der sogenannten *S-motility*, wobei die hinteren Zellen der Schleimspur der vorderen Zellen folgen. Anstatt eines kontinuierlichen Schwärmens wird eine Bewegungsumkehr (bei *M. xanthus* alle 7 - 8 min) erkannt. Durch Umkehr der Zellpolarität (Pili am führenden, Schleimsekretion am hinteren Zellpol) wird eine koordinierte, rhythmische Wellenbewegung des Schwarmes erreicht, die Zellkollisionen verhindert und Richtungskorrekturen ermöglicht¹²⁻¹⁶.

Abbildung aus urheberrechtlichen Gründen entfernt.

Zur Ansicht der Originalabbildungen entsprechend unten angegebener Reihenfolge siehe:

- <http://www.nature.com/nrmicro/journal/v5/n11/full/nrmicro1770.html>
DOI: 10.1038/nrmicro1770 (Referenz-Nr. 14, Figure 3)
- <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0966842X01019485>
DOI: 10.1016/S0966-842X(01)01948-5 (Referenz-Nr. 17, Figure 2)
- <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369527407001373>
DOI: 10.1016/j.mib.2007.09.012 (Referenz-Nr. 18, Figure 1b)

Abbildung 1-1: Gleiten und Schwärmen von *M. xanthus*: Modell der A-motility infolge Schleimsekretion, Adhäsionskomplexen und Pili¹⁴ (links, Erklärung siehe Text); über Fimbrien vernetzte Zellen¹⁷ (rechts oben) bilden einen kooperativ gleitenden Schwarm¹⁸ (rechts unten, S-motility)

Das Schwärmen bildet die Grundlage für einen einzigartigen und komplexen Lebenszyklus, der den Fortbestand der jeweiligen myxobakteriellen Spezies unter kritischen Bedingungen ermöglicht. Bei Nahrungsmangel schwärmen Zellen zu Aggregaten zusammen. Diese Aggregate bilden unter Lyse von 80 - 90 % der Zellen Fruchtkörper, welche einfache und kugelförmige (*M. xanthus*), aber auch sehr komplexe und verzweigte Strukturen (*Stigmatella erecta*, *Chondromyces crocatus*) annehmen können, die mit bloßem Auge wahrnehmbar sind (Abbildungen 1-2 und 1-3). Fruchtkörper bestehen aus bis zu 10^5 - 10^6 Zellen und tragen Sporangien, in denen die ursprünglich vegetativen Zellen zu kürzeren und dickeren Sporen differenzieren^{3-5,19-22}.

Abbildung aus urheberrechtlichen Gründen entfernt.

Zur Ansicht der Originalabbildungen entsprechend unten angegebener Reihenfolge siehe:

- <http://www.nature.com/nature/journal/v441/n7091/full/441291a.html>
DOI: 10.1038/441291a (Referenz-Nr. 22, Figure 1)
- <http://pubs.rsc.org/en/Content/ArticleLanding/2009/NP/b817073h#!divAbstract>
DOI: 10.1039/B817073H (Referenz-Nr. 21, Figure 1b + c)

Abbildung 1-2: Fruchtkörper von *Myxococcus xanthus*²² (links), *Stigmatella erecta*²¹ (Mitte) und *Chondromyces crocatus*²¹ (rechts)

Myxosporen sind von einer dünnen Kapsel umgeben und resistent gegen Hitze, Ultraschall und UV-Licht. So bleiben sie unter Laborbedingungen auf Filterpapier gelagert nach 10 - 25 Jahren keimfähig und überleben sogar eine Hitzebehandlung bei 140 °C über 30 Minuten^{3,8}. Bei ausreichender Nahrungsversorgung werden die Myxosporen aus den Fruchtkörpern freigesetzt und differenzieren wieder zu vegetativen Zellen. Die kooperative Zellbewegung und eine multizelluläre Organisation zur Fruchtkörperentwicklung bedürfen einer interzellulären Kommunikation, die den Myxobakterien ein „soziales Verhalten“ zuspricht¹⁹. Ein Chemosensorsystem, welches der Chemotaxis von *E. coli* ähnelt, kontrolliert den Prozess des Schwärmens und der Zellumkehr und wird reguliert durch die Frz (=frizzy)-Gene^{14,18}. Desweiteren verleiht das sogenannte A-Signal, das im Wesentlichen aus Proteasen, Peptiden und Aminosäuren zusammengesetzt ist, den Zellen die Fähigkeit des *Quorum sensing* (zell-dichteabhängige Regulation der Genexpression). Das C-Signal, ein Oberflächenprotein, bewirkt bei Zellkontakt die Expression verschiedener weiterer Signale (z.B. FruA) und führt letztlich zur Aggregation,

Fruchtkörperentwicklung und Sporulation^{15,16,23}. Außerdem spielen Enzyme der Biosynthese verzweigtkettiger Fettsäuren, das Pheromon Stigmolon und die Gruppe der DKxanthene bei der Morphogenese und Zelldifferenzierung eine Rolle²³⁻²⁶.

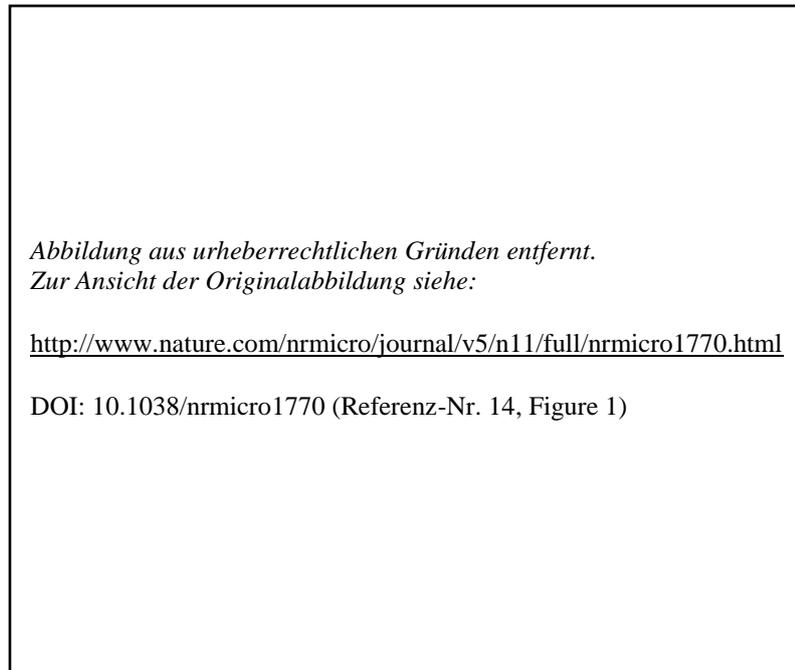


Abbildung 1-3: Der myxobakterielle Lebenszyklus¹⁴

Um sich die Substrate der terrestrischen Umgebung als Nahrungsquelle zu Nutze zu machen, die in der Regel nicht als gelöste niedermolekulare Substanzen vorliegen, sezernieren Myxobakterien Exoenzyme, z.B. Proteasen, Nukleasen, Lipasen und Glukanasen⁸. Damit sind sie in der Lage, Makromoleküle wie Cellulose, Stärke, Chitin, Agar und Pepton abzubauen und deren monomere Einheiten aufzunehmen⁴. Erstaunlicherweise sind die Nahrungspräferenzen oft artspezifisch, was eine Herausforderung an die Kultivierung unter Laborbedingungen darstellt. So bauen *Sorangium cellulosum* Cellulose und *Stigmatella aurantiaca* Chitin ab, während *Myxococcus xanthus* Aminosäuren aus Pepton zur Gluconeogenese nutzt^{8,16}. Diese Fähigkeiten sind nicht nur auf totes Material begrenzt, sogar lebende Zellen von Eubakterien und Hefen werden zersetzt²⁷. Beispielsweise lysiert *M. xanthus* lebende Kolonien von *Azotobacter* spp.³.

Durch diese Art der Nahrungsgewinnung haben sich Myxobakterien zahlreiche Lebensräume erschlossen. Man findet sie in unterschiedlichsten sauren bis hin zu alkalischen Böden, in Mooren, auf Rinden, Blättern, verwesendem Pflanzenmaterial und

sogar im Kot von Pflanzenfressern. Verbreitet sind sie in allen Klimazonen. Zahlreiche Arten aus Regionen der tropischen Regenwälder, der Subtropen, des Mittelmeerraumes, der mitteleuropäischen Wälder und der Alpen aber auch aus klimatisch extremen Gebieten wie Arktis, Antarktis und Wüsten (z.B. Sahara) sind beschrieben worden^{4,8}. Wie bereits zu Beginn erwähnt, konnten in neuerer Zeit ebenfalls marine Formen isoliert werden.

Eine weitere Besonderheit der Myxobakterien sind die Größen ihrer Genome mit einem hohen GC-Anteil (67 - 75 %): 9,1 Mbp bei *M. xanthus* DK1622, 10,2 Mbp bei *S. aurantiaca* DW4/3-1 und 13,0 Mbp bei *S. cellulosum* So ce56. Letzteres stellt das bisher größte bekannte bakterielle Genom dar. Die Chromosome anderer δ -Proteobakterien beinhalten gerade einmal zwischen 3,6 und 5 Mbp²⁸⁻³⁰. Die Ausdehnung der Genome ist unter anderem dadurch begründet, dass ein entscheidender Teil der genetischen Information dem Sekundärmetabolismus und dem komplexen Entwicklungszyklus dieser Einzeller zugesprochen wird. Auch gibt es Hinweise darauf, dass die Biosynthese von Sekundärmetaboliten eine Funktion in der Zelldifferenzierung und -kommunikation besitzt^{11,31-33}.

1.1.2. Myxobakterien als Quelle biologisch aktiver Naturstoffe

Mit der Isolierung des Morphins durch Friedrich Sertürner 1803 als ersten charakterisierten pharmakologisch aktiven Naturstoff erlangten chemisch definierte Substanzen, die aus Organismen gewonnen werden, eine enorme Bedeutung als reichhaltige Quelle für die Entwicklung von Therapeutika³⁴. Von 1981 bis 2006 waren 34 % der eingesetzten Arzneistoffe Naturstoffe oder daraus abgeleitete Strukturderivate³⁵. Spätestens mit der Entdeckung des Penicillins durch Alexander Fleming 1929 eröffneten auch Mikroorganismen neue Möglichkeiten zur Nutzung biologisch aktiver Metabolite in der Pharmakotherapie³⁶. Dabei werden mikrobielle Naturstoffe und deren Abkömmlinge vorwiegend als Antibiotika, Antimykotika, Virostatika, Zytostatika, Immunsuppressiva, bei Diabetes, Hypertonie, Hypercholesterinämie und Malaria eingesetzt^{37,38}. Neben Penicillin zählen zu den prominentesten Vertretern Erythromycin, Vancomycin, Amphotericin B, Cyclosporin A, Doxorubicin, Bleomycin A₂ und Lovastatin³⁹⁻⁴¹. 70 % der bekannten mikrobiellen Naturstoffe stammen aus Actinomyceten, 18 % aus Pilzen und 6,5 % aus *Bacillus* spp.. Mit annähernd 5 % tragen Myxobakterien ihren Anteil hierzu bei und

gehören mit den Cyanobakterien zu den einzigen beiden neuen bedeutsamen Gruppen mikrobieller Naturstoffproduzenten seit den 1950ern^{11,42}. Da jedoch deren Erforschung hinsichtlich aktiver Sekundärmetabolite erst relativ spät begann, besitzen sie ein großes Potenzial, Leitsubstanzen für die Pharmakonentwicklung hervorzubringen. Ambruticin, das erste isolierte myxobakterielle Antimykotikum, wurde erst 1977 beschrieben⁴³. Inzwischen wurden ca. 7500 myxobakterielle Stämme untersucht und mehr als 100 neue Grundstrukturen sowie über 500 Derivate gefunden und charakterisiert⁴⁴.

Abbildung 1-4 gibt eine Auswahl biologisch aktiver Sekundärstoffe wieder, die aus Myxobakterien isoliert und charakterisiert werden konnten. Zu den antibiotisch aktiven Vertretern zählt Etnangien, welches die bakterielle RNA- und DNA-Polymerase hemmt und eine Wirkung gegenüber grampositiven Bakterien, darunter auch Mycobakterien zeigt. Bemerkenswert sind seine antiviralen Eigenschaften gegen HIV-1^{45,46}. Thuggacin greift in den Elektronentransport der bakteriellen Atmungskette ein und könnte ein vielversprechender Kandidat bei der Behandlung von Tuberkulose sein, da es gegenüber deren Erreger *Mycobacterium tuberculosis* aktiv ist^{47,48}. Während Althiomycin den Peptidyltransfer der Translation bei der ribosomalen Proteinbiosynthese hemmt, verhindert Myxovirescin den Einbau von *N*-Acetylglucosamin bei der bakteriellen Zellwandsynthese⁴⁹⁻⁵³. Saframycin Mx1 ist ein Antibiotikum mit einem breiten Wirkspektrum gegenüber zahlreichen grampositiven und einigen gramnegativen Bakterien und beeinflusst deren Zellteilung auf DNA-, RNA- und Proteinbiosynthese-Ebene⁵⁴.

Zur Gruppe der Sekundärmetabolite mit antimykotischer Wirkung gehören Myxalamid, Myxothiazol, Aurachin und Stigmatellin, welche die unterschiedlichen Enzymkomplexe der mitochondrialen Elektronentransports als Angriffspunkte innehaben und allesamt Atmungsketten-Inhibitoren darstellen⁵⁵⁻⁶¹. Leupyrrin hingegen unterbindet die pilzliche DNA-Replikation, Transkription und Translation⁶². Mit über 50 Derivaten stellen die Soraphene die bisher größte Naturstofffamilie aus Myxobakterien dar. Soraphen ist ein Acetyl-CoA-Carboxylase (ACC) - Inhibitor und unterbindet damit die Fettsäurebiosynthese. Interessanterweise hemmt es nur die pilzliche und nicht die pflanzliche oder bakterielle ACC und qualifizierte sich damit für den Einsatz als potenzielles Pflanzenschutzmittel. Toxizitätsuntersuchungen der Firma Ciba-Geigy offenbarten seine Teratogenität, auch allergische und Entzündungsreaktionen wurden erkannt, so dass die Weiterentwicklung Soraphens letztlich gestoppt wurde⁶³⁻⁶⁵.

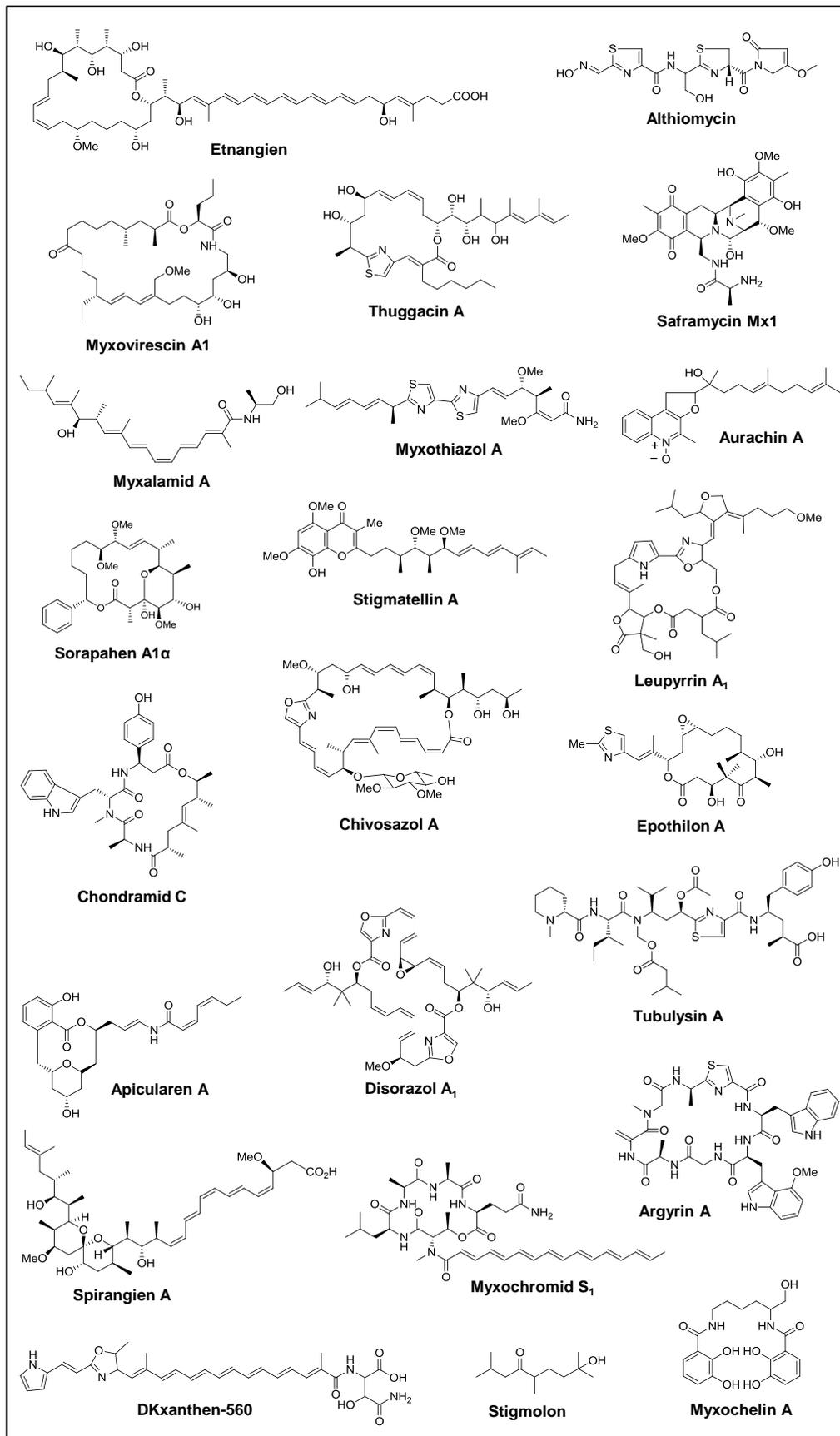


Abbildung 1-4: Biologisch aktive Sekundärstoffe aus Myxobakterien.

Zytotoxische myxobakterielle Naturstoffe stellen chancenreiche Leitstrukturen für die Entwicklung antineoplastischer Verbindungen in der Krebstherapie dar. Taxane und Vincaalkaloide haben ihren Nutzen diesbezüglich durch den Apoptose einleitenden Eingriff in das eukaryotische Zytoskelett bewiesen⁶⁶. Eine biologische Aktivität, die auf das Zytoskelett gerichtet ist, besitzen die Sekundärmetabolite Chondramid, Chivosazol, Disorazol, Tubulysin, Epothilon und Apicularen. Während Chondramid die Polymerisation von Actin induziert und es stabilisiert, depolymerisiert Chivosazol Actin⁶⁷⁻⁷³. Epothilon induziert die Tubulinpolymerisation und beweist auch gegenüber Paclitaxel-sensitiven Tumorzellen zytotoxische Aktivität. Das semisynthetische Derivat Ixabepilone (Ixempra[®]) wurde 2007 durch die U.S. Food and Drug Administration (FDA) zur Behandlung von metastasierendem, Taxan-, Anthrazyklin- oder Nukleotidanaloga-resistentem Brustkrebs zugelassen⁷⁴⁻⁷⁷. Tubulysin, seine biosynthetische Zwischenstufe Prätubulysin (nicht gezeigt) und das hoch zytotoxische Disorazol hemmen die Tubulinpolymerisation und depolymerisieren Mikrotubuli. Desweiteren zeigt Tubulysin antiangiogenetische Eigenschaften. Präklinische Tests mit Tubulysin- und Disorazol-Derivaten scheinen erfolgsversprechend hinsichtlich deren Weiterverfolgung⁷⁸⁻⁸⁵. Apicularen stört bereits früher die Funktionalität der Mikrotubuli, da es die Tubulinbiosynthese herunterreguliert. Außerdem hemmt es V-ATPasen (ATPasen der Vakuolen), essentielle regulatorische Elemente der Kompartimente und damit neue Zielstrukturen in der Krebstherapie⁸⁶⁻⁸⁸. Ein weiterer Angriffspunkt für zytostatische Arzneistoffe ist das Proteasom, welches den Abbau zellulärer Proteine reguliert und bewirkt. Proteasom-Inhibitoren wie Bortezomib (Velcade[®]) sind Apoptose-induzierend. Das zusätzlich immunsuppressive Argyrin hemmt nachweislich das Proteasom durch einem dem Bortezomib ähnlichen Mechanismus und rückte die Substanz in den Fokus klinischer Untersuchungen^{89,90}. Das Antibiotikum Saframycin Mx1 besitzt ebenfalls zytotoxische Eigenschaften, indem es an die DNA bindet⁵⁴. Ein der Zytotoxizität zugrundeliegender Mechanismus konnte für einige Sekundärmetabolite nicht bestimmt werden, so z.B. bei den Myxochromiden und den antimykotisch aktiven Spirangienen. Für letztere könnte eine Hemmung der IL-8-Expression einen kausalen Zusammenhang ergeben⁹¹⁻⁹⁴.

Es wurde bereits erwähnt, dass Sekundärstoffe auch in der Zellkommunikation und Fruchtkörperentwicklung eine Rolle spielen, zu denen die DKxanthene und das Pheromon Stigmolon zählen^{25,26}. Siderophore, wie Myxochelin A, gewährleisten die Regulation der myxobakteriellen Eisenhomöostase und damit einen balancierten Zellstoffwechsel⁹⁵. Auf

diese Prozesse wird im zweiten Teil dieser Arbeit eingegangen werden. Myxocheline sind antibiotisch sowie antiviral aktiv (Cytomegalievirus) und hemmen die Tumordinvasion womöglich durch Hemmung von Matrix-Metalloproteasen⁹⁵⁻⁹⁸.

Die getroffene Auswahl wichtiger Vertreter zeigt eindrucksvoll das Potenzial myxobakterieller Naturstoffe bezüglich deren Funktion bzw. therapeutische Anwendungsmöglichkeiten. Die Zahl neu isolierter Substanzen wächst stetig und damit das Spektrum interagierender Zielstrukturen. Schließlich sei angemerkt, dass Myxobakterien auch zur Biosynthese von Karotinoiden, Steroiden und Terpenoiden befähigt sind^{42,99-101}.

1.2. Die Biosynthese von Polyketiden und nichtribosomalen Peptiden

Der Hauptteil der Sekundärmetabolite aus Myxobakterien, die bereits vorgestellten eingeschlossen, werden durch Polyketidsynthasen (PKS) und nichtribosomale Peptidsynthetasen (NRPS) biosynthetisiert¹⁰². Diese multifunktionellen Enzyme vereinigen mehrere katalytische Aktivitäten in einem Polypeptid und werden aufgrund der enormen Größe von bis zu 2 MDa, die einige Vertreter besitzen, auch als Megasyntasen bezeichnet^{21,103,104}. Grundlegend ist beiden Enzymklassen der Aufbau komplexer Strukturen nach dem Baukastenprinzip durch aufeinanderfolgende Polykondensation von monomeren Einheiten, kurzkettige Carbonsäuren und Aminosäuren aus dem Primärstoffwechsel, zu Polyketiden resp. Peptiden gemein. Dabei wird eine enorme Strukturdiversität nicht nur dadurch realisiert, dass mehrere Hundert bekannte Monomere theoretisch kombinierbar sind, sondern auch indem das Polyketid- bzw. Peptidrückgrat während und nach der Synthese biochemisch modifiziert werden kann^{105,106}. PKS- und NRPS-Multienzyme bestehen aus einem oder mehreren Polypeptiden, die einen modularen Aufbau aufweisen. Jedes dieser Module ist für die Prozessierung einer Starter- oder Verlängerungseinheit zuständig und bewirkt so dessen Einbau in die wachsende Kette. Die einzelnen katalytischen Untereinheiten eines jeden Moduls, die die Aktivierung, Kondensation und Modifizierung des jeweiligen Monomers durchführen, werden Domänen genannt^{21,31}. Die modularen Megasyntasen PKS und NRPS werden aufgrund dieses „Fließbandmechanismus“ auch als *molecular assembly lines* bezeichnet¹⁰².

Die Durchgangsstationen einer solchen Assembly line-Biosynthese sind Carrier-Proteine (CPs). Diese tragen einen 4'-Phosphopantetheinyl-Arm (Ppant-Arm), an dessen Thiolgruppe die Verlängerungseinheiten und Intermediate während der gesamten Biosynthese als (Amino-)Acylthioester gebunden bleiben¹⁰⁷. Phosphopantetheinyl-Transferasen (PPTasen) übertragen posttranslational den Ppant-Arm aus Coenzym A auf ein konserviertes Serin der apo-CPs und überführen diese in holo-CPs¹⁰⁸⁻¹¹⁰ (Abbildung 1-5). Der Ppant-Arm besitzt durch Konformationsänderungen eine gewisse Strukturflexibilität und führt die Reaktanden den einzelnen aktiven Zentren der Domänen zu (*multiple carrier thio-template mechanism*). Dabei sind Transferreaktionen entlang des Multienzyms durch die aktivierte Thioesterbindung begünstigt^{107,111}.

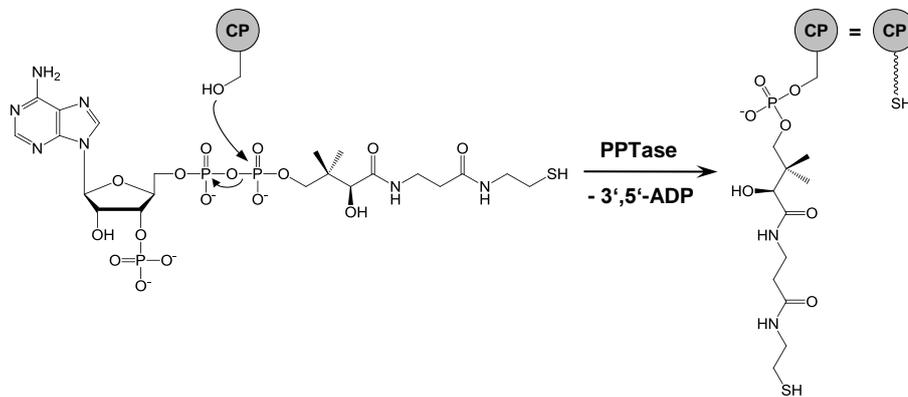


Abbildung 1-5: Übertragung des Ppant-Arms aus Coenzym A auf Carrier-Proteine (CPs) durch Phosphopantetheinyl-Transferasen (PPTasen).

In der Regel sind PKS- und NRPS-Gene in Genclustern angeordnet. Dies erleichtert die Identifizierung der Biosynthesecluster durch konservierte Bereiche, die den einzelnen Domänen zugrundeliegen^{21,104}. Desweiteren besteht eine Kolinearität zwischen der durch die genetische Sequenz vorgegebenen modularen Domänenorganisation und der chemischen Struktur des biosynthetisierten Polyketids / Peptids resultierend aus der vorgegebenen Abfolge enzymatischer Reaktionen. Damit wird es möglich, anhand der Gensequenz eine Strukturvoraussage über das gebildete Produkt zu geben³¹. Diese Eigenschaft kann bei Genomanalysen zur Entdeckung neuer Naturstoffe (*genome mining*) eingesetzt werden^{112,113}. Andererseits können Biosynthesemodelle bei einer vorliegenden Struktur ohne Kenntnis des Genclusters erstellt werden. Bei der Analyse diverser

mykobakterieller PKS-/NRPS-Gencluster zur Aufklärung von Biosynthesewegen hat sich jedoch herausgestellt, dass Ausnahmen der Kolinearitätsregeln häufig sind^{105,114}.

Während Actinomyceten und *Bacillus* spp. hauptsächlich reine Polyketide oder nichtribosomale Peptide bilden, stellen mehr als die Hälfte mykobakterieller Strukturen Mischprodukte der beiden dar³¹. Prinzipiell können Peptide und Polyketide durch separate Multienzyme gebildet werden und anschließend durch eine Ligase verknüpft oder direkt durch PKS/NRPS-Hybride bzw. NRPS/PKS-Hybride biosynthetisiert werden. Bei solchen Hybriden wird beispielsweise ein Peptidyl-Intermediat von der NRPS auf das Carrier-Protein der PKS übertragen und durch diese um den Polyketidteil verlängert. Dabei muss von einer Peptidchemie auf eine Polyketidchemie umgeschaltet werden. Die Nahtstellen zwischen beiden Enzymsystemen sind dabei kritische Stellen. Tatsächlich unterscheiden sich die Aminosäuresequenzen der betreffenden Domänen von denen reiner Systeme¹⁰⁶. Außerdem wurden kurze *linker* (Aminosäuresequenzen zwischen Modulen) sowie speziell dreidimensional gefaltete N- und C-terminale Interpolypeptid-Erkennungssequenzen, sogenannte *docking domains* (PKS) und *communication domains* (NRPS), gefunden, die die korrekte Anordnung der multifunktionellen Proteine organisieren¹¹⁵.

1.2.1. Nichtribosomale Peptidsynthetasen

Obligat zur Peptidsynthese durch eine NRPS sind die Adenylierungsdomäne (A), die Kondensationsdomäne (C) und das Peptidyl-Carrier-Protein (PCP). Diese sind in den Modulen der Megasyntase wie in Abbildung 1-6 angeordnet, mit Ausnahme des ersten Moduls (Lademodul), das notwendigerweise keine C-Domäne beinhalten muss¹¹⁶. A-Domänen haben zwei Funktionen inne: Sie selektieren spezifisch eine Aminosäure und aktivieren sie für die nachfolgende Kondensation. Ein wesentliches Merkmal nichtribosomaler Peptide ist das Vorhandensein nicht-proteinogener Aminosäuren, neben proteinogenen. Auch Arylcarbonsäuren werden eingebaut, welche jedoch von A-Domänen ausgewählt werden, die diskrete Proteine darstellen. Die Aktivierung der Aminosäuren erfolgt als Aminoacyladenylate unter ATP-Verbrauch. Diese sind thermodynamisch stabiler als CoA-Ester^{117,118}. Die auf diese Weise aktivierten Aminosäuren lassen eine Übertragung auf den Ppant-Arm der PCPs zu. Anschließend bewirkt die Kondensationsdomäne einen nukleophilen Angriff der Aminogruppe des Aminoacyl-S-

PCPs des Verlängerungsmoduls auf den Thioester des Aminoacyl-/Peptidyl-S-PCPs des vorangehenden Moduls und deren Kondensation zu einer Peptidbindung^{117,119}. C-Domänen besitzen dabei eine zum Peptidylrest affine Donorseite und eine Akzeptorseite mit einer Affinität zum Aminoacylrest während der Kondensation. Im Vergleich zur Donorseite zeigt die Akzeptorseite eine höhere Selektivität^{120,121}. Das entstandene Peptid kann in gleicher Weise durch nachfolgende Module um weitere PCP-gebundene Aminosäuren verlängert werden.

Prinzip einer NRPS

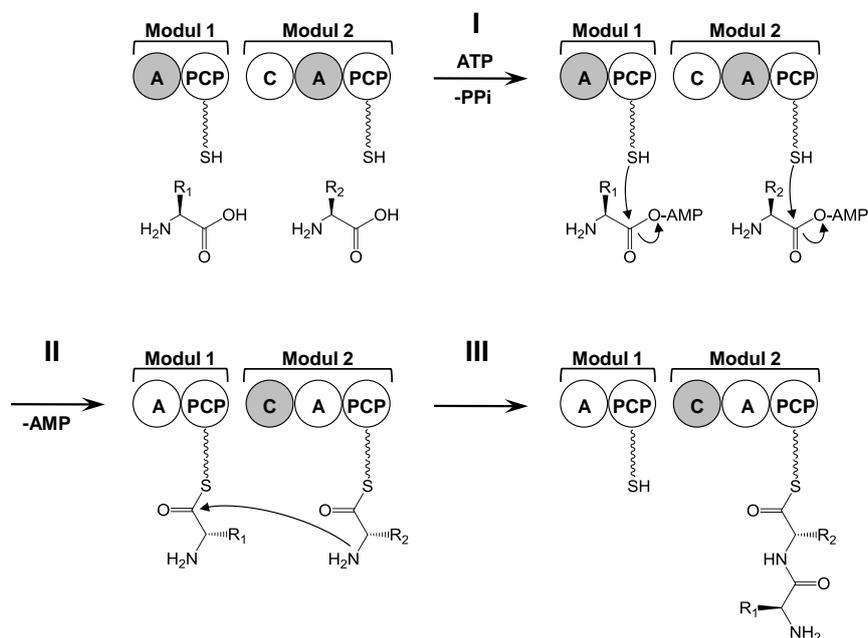


Abbildung 1-6: Peptidbiosynthese durch eine NRPS. A: Adenylierungsdomäne, C: Kondensationsdomäne, PCP: Peptidyl-Carrier-Protein.

Da A-Domänen die potenziellen Selektivitätsdeterminanten darstellen, können deren konservierte Bereiche dazu herangezogen werden, um Vorhersagen über die Selektivität unbekannter A-Domänen zu treffen. Mit Hilfe von Sequenzvergleichen der kristallisierten A-Domänen PheA und DhbE mit anderen bekannten A-Domänen wurden Konsensussequenzen abgeleitet und daraus ein nichtribosomaler Code, in Analogie zum ribosomalen Code, aus bis zu 10 Aminosäuren bestimmt, der die Selektivität der A-Domänen festlegt. Wie sich zeigte, ist auch dieser Code degenerativ, zumal eine Aminosäure durch mehrere A-Domänen verschiedener Kodierung ausgewählt werden

kann. Außerdem sind die darauf zurückgeführten Vorhersagen nicht immer korrekt und in manchen Fällen eine Selektivitätsbestimmung aufgrund einer begrenzten Anzahl vergleichbarer A-Domänen nicht durchführbar¹²²⁻¹²⁴.

Neben den essentiellen Domänen können in NRPS-Modulen optionale Domänen vorhanden sein, die das Peptid während des Aufbaus biochemisch modifizieren. Einige nichtribosomale Peptide sind dadurch gekennzeichnet, dass sie D-Aminosäuren enthalten. Diese können durch A-Domänen selektiert und eingebaut werden oder, wie in den meisten Fällen, aus einer Epimerisierung durch E-Domänen (E) hervorgehen (Abbildung 1-7). Dabei wird zunächst eine L-Aminosäure durch die A-Domäne selektiert und nach Kondensation auf der Peptidyl-S-PCP-Stufe racemisiert. Die C-Domäne des Folgemoduls besitzt dann eine Selektivität gegenüber dem D-Enantiomer^{117,120}.

Optionale NRPS-Domänen

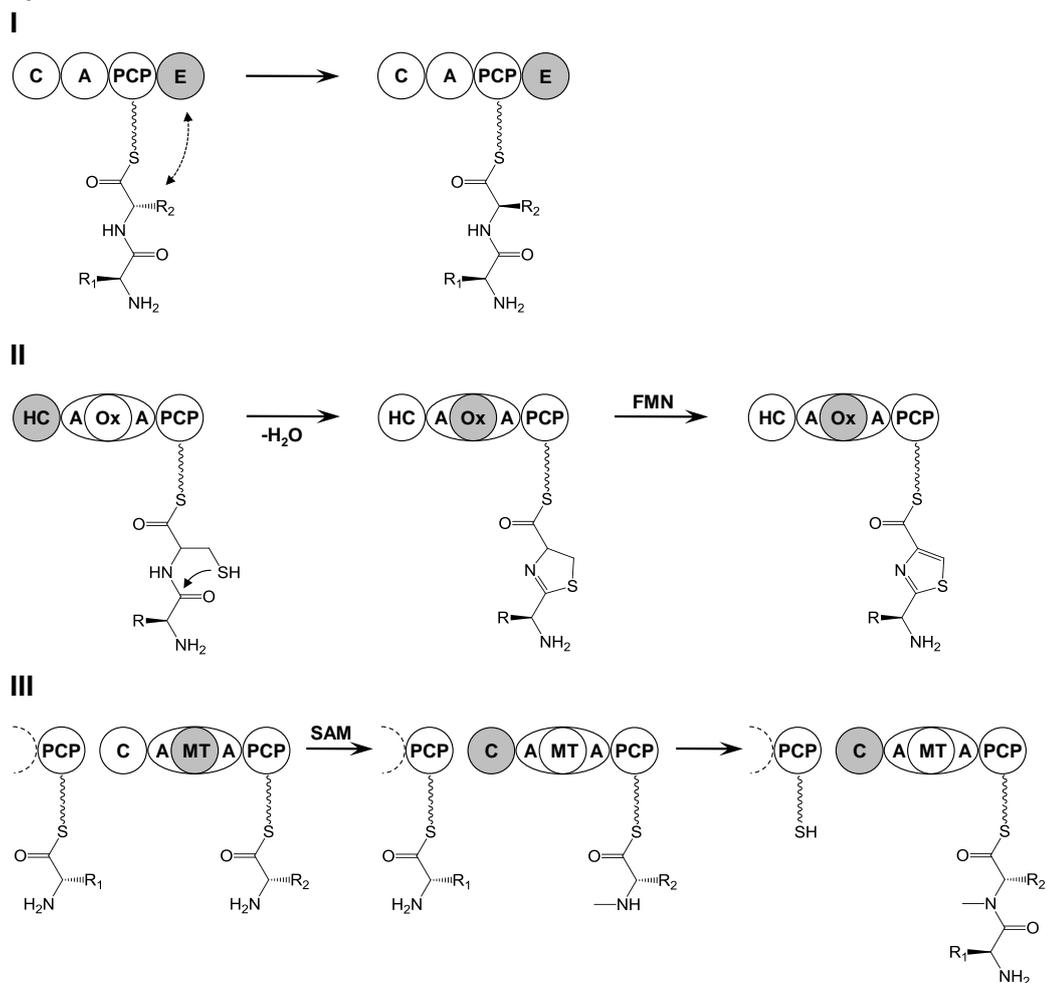


Abbildung 1-7: Biochemische Modifikation von nichtribosomalen Peptiden.
E: Epimerisierungsdomäne, HC: Heterozyklisierungsdomäne, Ox: Oxidationsdomäne

Heterozyklen wie Oxazolin- oder Thiazolinringe gehen aus Zyklisierung von Serin-, Threonin- oder Cysteinresten hervor und werden durch Heterozyklisierungsdomänen (HC) gebildet, die an die Stelle von C-Domänen treten. Oxidationsdomänen (Ox), die entweder in A-Domänen integriert sind oder sich hinter dem PCP des eigenen Moduls befinden, können diese FMN-abhängig zu Oxazolonen und Thiazolonen oxidieren¹¹⁸. Auch Reduktionen zu Oxazolidinen und Thiazolidinen durch NADPH-abhängige Reduktasen sind beschrieben. Diese stellen allerdings diskrete Proteine dar. SAM-abhängige *N*-Methyltransferasedomänen (MT), die in A-Domänen integriert sind, methylieren die Aminogruppe von PCP-gebundenen Aminosäuren vor deren Kondensation. Selten sind *C*-Methylierungen zu finden. Die jeweiligen MT-Domänen sind nicht in A-Domänen integriert und übertragen die Methylgruppe von SAM nach der Peptidknüpfung. β -Hydroxylierungen von Aminosäuren vor deren Einbau werden durch Cytochrom P450-Monooxygenasen katalysiert, die wie Reduktasen nicht Teil des Megaenzym sind¹²⁵.

1.2.2. Polyketidsynthasen

Polyketidsynthasen werden in drei Typen klassifiziert. Diese Klassifizierung fand ursprünglich auf der Basis ihres Ursprungs (bakteriell, pilzlich etc.) und ihrer Produkte statt. Mittlerweile werden PKS anhand ihrer Organisation, der verwendeten enzymatischen Aktivitäten und der damit verbundenen biochemischen Abläufe eingeteilt. Aufgrund von Mischsystemen ist eine eindeutige Abgrenzung nicht generell möglich¹²⁶.

1.2.2.1. Typ I PKS

Typ I Polyketidsynthasen sind wie nichtribosomale Peptidsynthetasen modular aufgebaut. Sie weisen große Homologien zu Fettsäuresynthetasen auf und unterliegen grundsätzlich der gleichen Chemie¹²⁷. Ihre Produkte besitzen jedoch eine größere Strukturdiversität, indem sie beispielsweise Makrolide, Polyene, Polyether oder Endiine darstellen¹²⁸. Die essentiellen Domänen der Typ I PKS sind die Acyltransferasedomäne (AT), die Ketosynthasedomäne (KS) und das Acyl-Carrier-Protein (ACP). Die AT-Domänen selektieren die Startereinheiten, kurzkettige Acyl-CoAs wie z.B. Acetyl-CoA und die Verlängerungseinheiten, üblicherweise Malonyl-CoA oder Methylmalonyl-CoA. Da diese als Coenzym A-Thioester bereits aktiviert sind, können diese direkt auf die Ppant-Arme

der ACPs übertragen werden (Abbildung 1-8). Anschließend wird der Acylrest der zu verlängernden Kette auf den Cysteinrest im aktiven Zentrum der Ketosynthase übertragen. Nach Decarboxylierung der Verlängerungseinheit durch die KS-Domäne und nukleophilen Angriff des entstandenen Carbanions auf Acyl-S-KS wird im Sinne einer Claisen-Thioesterkondensation ein 3-Ketoacyl-S-ACP gebildet. Zusammenfassend wird durch die decarboxylative Kondensation einer C₃-Einheit des Folgemoduls die Kette um eine C₂-Einheit verlängert. Durch Kondensationsreaktionen nachfolgender Module wird schließlich ein Polyketid aufgebaut¹²⁷.

Prinzip einer PKS

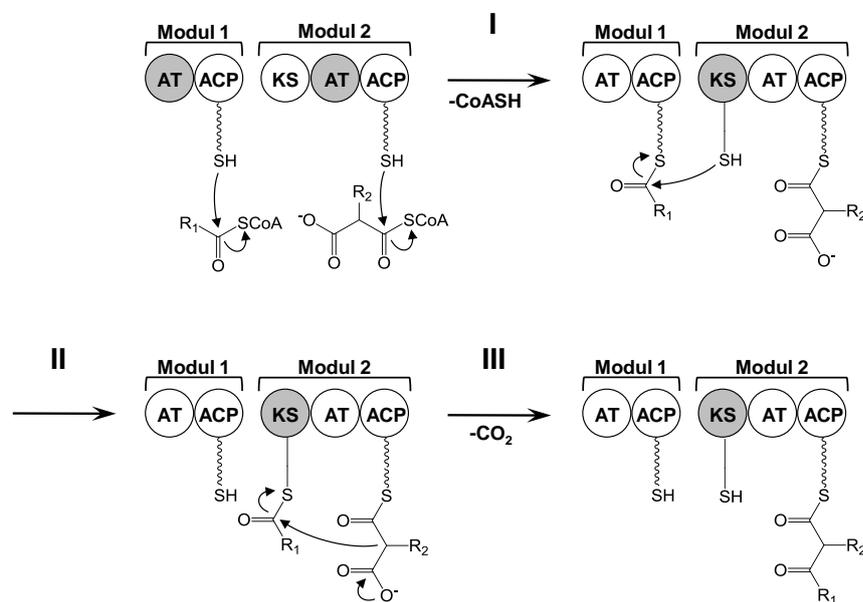


Abbildung 1-8: Polyketidbiosynthese durch eine PKS. AT: Acyltransferase-domäne, KS: Ketosynthasedomäne, ACP: Acyl-Carrier-Protein.

Lademodule können als Didomäne (AT-ACP) oder als als Tridomäne (KS^Q-AT-ACP) aufgebaut sein. Letztere treten in Polyketidsynthesen auf bei denen (Methyl-)Malonyl-CoA-Startereinheiten vor dem ACP-Transfer durch die KS^Q-Domäne zu Acetyl- bzw. Propionylresten decarboxyliert werden. Statt einem Cystein trägt die KS^Q-Domäne ein konserviertes Glutamin im aktiven Zentrum. Neben Acetyl- und Propionylstartern, typischerweise bei PKS von Streptomyzeten zu finden, nutzen myxobakterielle Systeme auch alternative Starter wie Benzoyl-, Isovaleryl- Isobutyryl-CoA oder ungesättigte Fettsäuren. Zur Kondensation werden neben den Verlängerungseinheiten Malonyl-CoA,

Methylmalonyl-CoA auch seltener Alkylmalonyl-CoAs wie Ethylmalonyl-CoA sowie Aminomalonyl-ACP, Hydroxymalonyl-ACP und Methoxymalonyl-ACP (aus ACP-gebundenen Vorstufen gebildet) verwendet^{31,128,129}. Die AT-Spezifität kann anhand konservierter Bereiche bekannter Domänen in vielen Fällen bestimmt werden. Ausnahmen bilden ungewöhnliche Substrate^{130,131}. An dieser Stelle sei angemerkt, dass Spezialfälle von Polyketidsynthasen existieren, sogenannte *trans*-AT-PKS, bei denen AT-Domänen vollständig fehlen. Die ACPs dieser System werden mit CoA-Estern, meist Malonyl-CoA durch diskrete ATs in *trans* beladen¹³².

Optionale PKS-Domänen

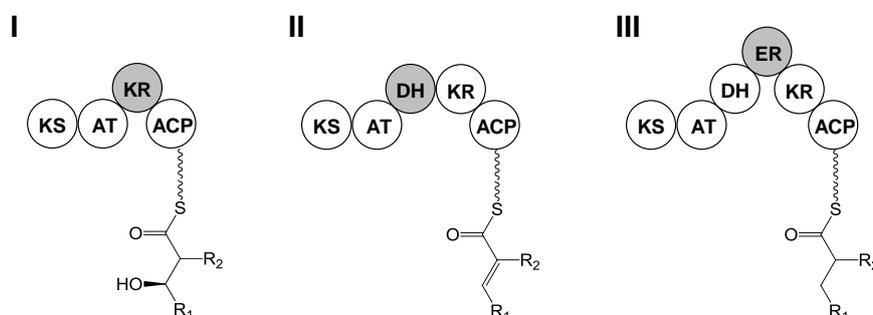


Abbildung 1-9: Reduktive Modifikation eines Polyketids. KR: Ketoreduktase-domäne, DH: Dehydratasedomäne, Enoylreduktasedomäne.

Die Ketofunktion des Polyketids kann während der Biosynthese durch die optionalen Domänen Ketoreduktase (KR), Dehydratase (DH) und Enoylreduktase (ER) reduktiv modifiziert werden (Abbildung 1-9). Die KR-Domäne reduziert den 3-Ketoacyl-ester unter NADPH-Verbrauch zum 3-Hydroxyacyl-ester, der durch die DH-Domäne zum Enoyl-ester dehydratisiert und schließlich durch die NADPH-abhängige ER-Domäne zum gesättigten Acylester reduziert werden kann. Die Vielfalt komplexer Polyketidstrukturen ergibt sich unter anderem daraus, dass die Modulausstattung mit reduktiven Domänen variiert und sich daraus funktionelle Gruppen verschiedener Reduktionsstufen in einem Polyketid befinden können^{133,134}. Mit der Reduktion von Ketogruppen ergeben sich Stereozentren und damit die Frage nach deren Konfiguration. Durch Sequenzvergleich reduktiver Domänen können anhand konservierter Bereiche Voraussagen zur Stereochemie getroffen werden. Motive von KR-Domänen, deren Aminosäuren an der Vororientierung des β -Ketoacylthioesters zum Hydridtransfer aus NADPH beteiligt sind und damit die Seite des

nukleophilen Angriffs bestimmen, lassen die Konfiguration der resultierenden Hydroxylgruppen, eingeteilt in einen A-Typ (L-3-Hydroxyacylgruppen) und einen B-Typ (D-3-Hydroxyacylgruppen), abschätzen. A-Typ-Alkoholfunktionen werden in der Regel durch DH-Domänen zu *cis*-Doppelbindungen dehydratisiert, B-Typ-Alkoholgruppen zu *trans*. Ein konserviertes Tyrosin in der NADPH-Bindestelle von ER-Domänen führt zur 2*S*-Konfiguration gegebenfalls vorhandener Methylgruppen, während eine andere Aminosäure, meist Valin, die entgegengesetzte Konfiguration bewirkt¹³⁵⁻¹³⁷. Allerdings können diese Untersuchungen die Analyse eines isolierten Polyketids nicht ersetzen.

Weitere Modifikationen sind C_α-Methylierungen, die durch SAM-abhängige MT-Domänen in PKS-Modulen katalysiert werden und β-Verzweigungen wie Methylen-, Methoxymethyl-, Ethylgruppen. Letztere werden jedoch in *trans* durch freistehende 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA-Synthasen, ACPs und Ketosynthasen erzeugt^{128,138-140}.

1.2.2.2. Typ II PKS und Typ III PKS

Die nichtmodular aufgebauten Typ II und Typ III Polyketidsynthasen werden in gramnegativen Bakterien selten gefunden¹⁴¹. Typ II PKS sind diskrete, iterativ arbeitende Enzyme, die phenolisch-aromatische Substanzen wie Polyphenole bilden. Die als Minimal-PKS beschriebene grundlegende Einheit bilden ein Heterodimer aus zwei Ketosynthasen, die KS_α, die KS_β (auch als *chain-length-factor* bezeichnet) und ein ACP. Die KS_α trägt ein konserviertes Cystein und bewirkt im klassischen Sinne die wiederholte decarboxylierende Claisen Kondensation ACP-gebundener Monomere, hauptsächlich aus Malonyl-CoA, zu einem linearen Polyketid. Die KS_β besitzt ein Glutamin im aktiven Zentrum und wirkt decarboxylierend auf Startereinheiten (Decarboxylierung von Malonyl-ACP zu Acetyl-ACP). Außerdem kontrolliert das KS_α/KS_β-Heterodimer die Kettenlänge und stabilisiert das Polyketid, um ungewollte Aldolreaktionen zu verhindern. Der Polyketidsynthese folgen nachgeschaltete spontane, aber auch enzymkatalysierte Zyklisierungen und Aromatisierungen sowie Modifizierungen zum Produkt, z.B. Doxorubicin^{127,128,142} (Abbildung 1-10).

Typ III PKS sind Homodimere aus identischen Ketosynthasen, die ohne Verwendung von Acyl-Carrier-Proteinen durch Kondensation von CoA-Estern und Zyklisierung des Polyketids aromatische Verbindungen aufbauen. Zu ihnen gehören unter anderem die

große Gruppe der Chalkon- und Stilbensynthasen sowie die Tetrahydroxynaphthalen-Synthese, die das myxobakterielle Flaviolin bildet^{141,143}.

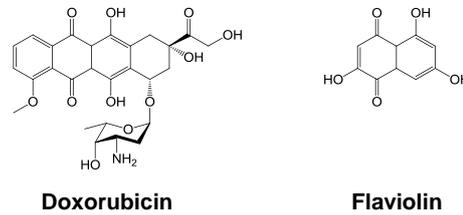


Abbildung 1-10: Typische Vertreter von Typ II- und Typ III-Polyketiden

1.2.3. Freisetzungsmechanismen

Modulare Polyketidsynthasen und nichtribosomale Peptidsynthetasen realisieren die Freisetzung ihrer Produkte in den meisten Fällen durch eine C-terminale Thioesterasedomäne (TE) am Ende des letzten Moduls. Diese gehören zu den α/β -Hydrolasen mit einem konservierten Aspartat, Histidin und Serin im aktiven Zentrum¹⁴⁴. Das lineare Polyketid/Peptid wird vom letzten Carrier-Protein auf das Serin der TE übertragen und der energetisch günstigere Acylester gebildet¹¹⁸. Die Freisetzung erfolgt schließlich durch nukleophilen Angriff von Wasser unter Hydrolyse des linearen Produkts oder von funktionellen Gruppen (Amino-, Alkohol-, Thiolgruppen) unter Makrozyklisierung zu Makrolaktamen, -laktonen oder -thiolaktonen (Abbildung 1-11).

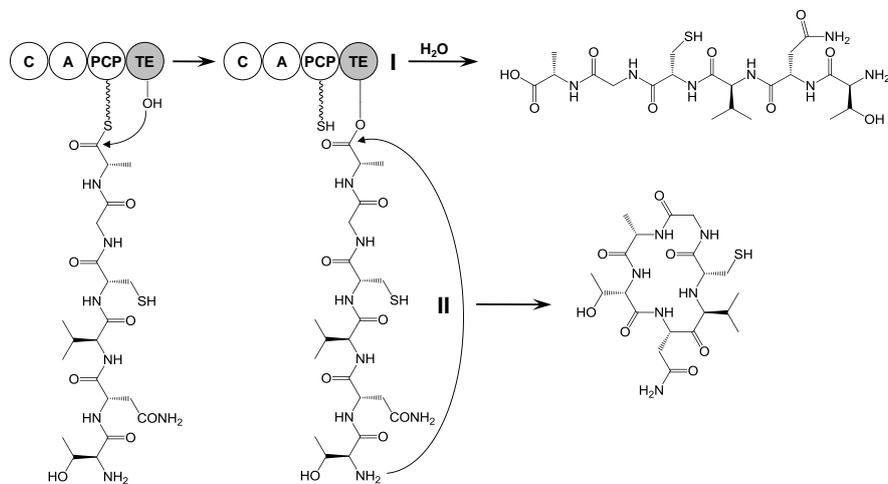


Abbildung 1-11: Produktfreisetzung eines fiktiven Hexapeptids durch eine TE-Domäne. I: Hydrolyse, II: Zyklisierung zum Makrolaktam.

Da die Zyklisierung nicht auf endständige Gruppen begrenzt ist, entstehen entweder rein zyklische oder verzweigt-kettig-zyklische Verbindungen. Beide besitzen eine höhere physikochemische Stabilität, beispielsweise gegenüber Peptidasen. Weiterhin können TEs auch iterativ arbeiten. Dies führt durch Oligomerisierung z.B. zum trimeren Enterobactin¹⁴⁴⁻¹⁴⁶. Eine zweite Klasse von Thioesterasen (TEII) stellen diskrete Enzyme dar, die die Aufgabe haben, missacylierte Carrier-Proteine, die die Biosynthesemaschinerie blockieren würden, zu hydrolysieren^{111,115}. Neben der TE-vermittelten kann die Freisetzung über terminale Reduktasedomänen (Red) erfolgen, die TE-Domänen ersetzen. Die Carboxylfunktion wird dabei NADPH-abhängig durch eine 2-Elektronenübertragung zum Aldehyd oder eine 4-Elektronenübertragung zum Alkohol reduziert und dabei das Substrat von der Megasyntase entfernt¹⁴⁷. Seltene Freisetzungsmechanismen verlaufen über Dieckmann-Kondensation, Pyridoxalphosphat-abhängig, durch Acetyltransferasen, Laktamasen oder Baeyer-Villiger-Monooxygenasen¹⁴⁵.

1.2.4. Post-PKS/NRPS-Reaktionen

Die aus der PKS- und NRPS-Biosynthese resultierenden Produkte können durch nachgeschaltete enzymatische Reaktionen modifiziert werden. Zu den zahlreichen Post-PKS-Reaktionen gehören Glykosylierung, Methylierung, Acylierung, Hydroxylierung, Halogenierung, Transaminierung sowie Umlagerungen. Weniger Modifikationen sind bei nichtribosomalen Peptiden bekannt wie Glykosylierung, Halogenierung und Oxidationen^{117,125,128}. Post-PKS/NRPS-Modifikationen fehlen jedoch häufig bei mykobakteriellen Naturstoffen¹¹⁴. Zu den wenigen Beispielen zählen die Halogenierung von Chondramid, die Glykosylierung von Chivosazol und die Epoxidierung von Epothilon^{132,148,149}.

1.3. Eisenhomöostase in Bakterien

1.3.1. Eisen – Redoxpartner mit zwei Gesichtern

Eisen stellt das vierthäufigste Element der Erde dar und ist neben anderen Metallen wie Zink, Nickel, Kupfer, Mangan, Kobalt und Molybdän in zelluläre Prozesse involviert. Diese erhalten lebenswichtige Stoffwechselreaktionen, z.B. Atmung, Photosynthese, Zitratzyklus, Sauerstofftransport, DNA-Replikation, Transkription und Translation. 30 - 45 % der Enzyme sind Metalloproteine. Dort fungiert Eisen als wichtiger Redoxpartner für Elektronenübertragungen, weil es in den beiden Oxidationstufen Fe(II) und Fe(III) vorliegen kann¹⁵⁰⁻¹⁵². Nur wenige Mikroorganismen, z.B. *Lactobacillus* spp. und Borrelien, sind nicht auf eine Eisenversorgung angewiesen und nutzen stattdessen Mangan oder Kobalt in den essentiellen Redoxprozessen^{153,154}. Fe(II) wird in der Natur aus korrodierenden eisenhaltigen Mineralien der Sedimente, Gesteine und Böden freigesetzt. Da Fe(II) unter Sauerstoffatmosphäre instabil ist, wird es bei pH > 5 schnell zu Fe(III) oxidiert und in der Umgebung als schwer lösliche Hydroxide, Oxide, Phosphate und Sulfate präzipitiert. Aufgrund der geringen Löslichkeiten dieser Verbindungen, Fe(III): 10⁻¹⁸ M (pH 7), im Gegensatz zu Fe(II): 10⁻¹ M (pH 7), ist die freie Fe(III)-Konzentration im natürlichen Medium sehr gering^{150,155}. Das limitierte Substratangebot hat Mikroorganismen provoziert, raffinierte Aufnahmesysteme zu entwickeln, um die Versorgung mit dem Spurenelement Eisen zu gewährleisten. Andererseits muss die Aufnahme und Metabolisierung des Metalls kontrolliert und reguliert werden, da zu hohe intrazelluläre Konzentrationen an Fe(II) und Fe(III) toxisch sind, indem das zelluläre Redoxpotential empfindlich gestört wird. Beide reagieren mit den reaktiven Sauerstoffspezies Wasserstoffperoxid und Superoxidanion im Sinne der Haber-Weiss-Reaktion zum hoch reaktiven Hydroxylradikal, resultierend in oxidativem Stress und der Schädigung von DNA und Enzymen, insbesondere Eisen-Schwefel-Cluster tragender Proteinkomplexe^{150,156}.

1.3.2. Eisenaufnahme

1.3.2.1. Siderophore

Die am weitesten verbreitete Art der Eisenaufnahme verläuft über Siderophore (*griechisch*: „Eisenträger“), Chelatoren < 1,5 kDa, die eine hohe Affinität gegenüber Eisen besitzen ($K_{\text{aff}} > 10^{30}$) und dadurch in der Lage sind, Fe(III) aus schwerlöslichen Verbindungen zu solubilisieren und zu komplexieren. Siderophore werden von Bakterien, Pilzen und Pflanzen sezerniert und als Ferri-Siderophor-Komplexe in die Zellen transportiert¹⁵⁷⁻¹⁵⁹. Donoratome, Sauerstoff, aber auch Stickstoff und Schwefel, koordinieren das zentrale Fe(III) und bilden dabei vorzugsweise einen oktaedrischen Komplex. In der Regel formieren Phenolat-/Catechol-, Hydroxamat- und (Hydroxy-)Carboxylat-Gruppen als zweizählige Liganden in Abhängigkeit ihrer Anzahl sechs-, vier- und zweizählige Siderophore, auch multinukleare Komplexe sind beschrieben¹⁵⁸. Anhand der involvierten Liganden können Siderophore klassifiziert werden. Pyochelin (*Pseudomonas aeruginosa*), Enterobactin (*Escherichia coli*) und die myxobakteriellen Vertreter Myxochelin A und B (u.a. aus *Stigmatella aurantiaca*) gehören zu den Phenolat-/Catechol-Siderophoren^{95,160-162} (Abbildung 1-12). Zum Typ der Hydroxamat-Siderophore zählt Desferrioxamin E (*Streptomyces* spp.), während Staphyloferrin A (*Staphylococcus aureus*) ein Carboxylat-Siderophor darstellt^{163,164}. Häufig existieren Mischformen, so z.B. die Nannocheline A, B und C (Citrat-Hydroxamat-Typ) aus dem Myxobakterium *Nannocystis exedens* und Petrobactin (Citrat-Catechol-Typ) aus *Bacillus anthracis*^{165,166}. Einzelne Siderophore werden nicht artspezifisch gebildet. So werden z.B. Myxocheline auch von den Stämmen *Angiococcus disciformis*, *Myxococcus xanthus*, *Sorangium cellulosum* und *Archangium gephyra* produziert^{95,162,167}. Auch werden oft mehrere Siderophore für die Eisenaufnahme genutzt. Neben primären Siderophoren mit hoher Eisenaffinität stehen sekundäre Siderophore mit geringeren Affinitäten zur Verfügung, die bei vergleichsweise guter Eisenversorgung sezerniert werden, möglicherweise, um Energie zu sparen. Daneben sind im Konkurrenzkampf um das begehrte Spurenelement Importsysteme für Siderophore fremder Spezies, sogenannter *Xenosiderophore*, entwickelt worden¹⁶⁸.

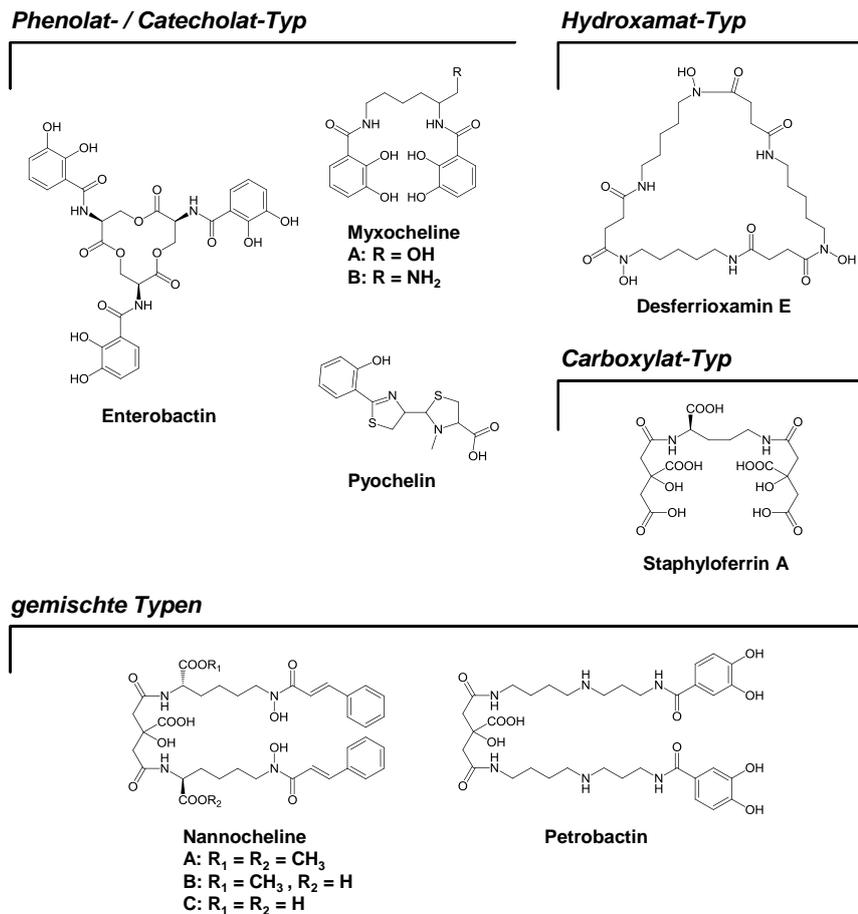


Abbildung 1-12: Siderophorklassen und exemplarische Strukturen.

Die Biosynthese von Siderophoren erfolgt prinzipiell auf zwei Arten. Catecholat-Siderophore werden weitestgehend über nichtribosomale Peptidsynthetasen gebildet¹⁶⁹. Beispielsweise kondensiert die iterative Myxochelin-NRPS zwei 2,3-Dihydroxybenzoesäure-Einheiten mit der α - und ϵ -Aminogruppe von L-Lysin und setzt das Intermediat über einen reduktiven Mechanismus als Alkohol frei (Myxochelin A) oder als Aldehyd, welcher durch eine Aminotransferase in Myxochelin B überführt wird^{147,162,167,170}. Hydroxamat- und Carboxylat-Siderophore entstehen durch NRPS-unabhängige Siderophor-Synthetasen (NIS), die unter Nukleotidverbrauch Dicarboxysäuren (Citrat, Succinat, α -Ketoglutarat) mit Aminen, Aminoalkoholen, Aminosäuren (z.B. Spermidin, Ethanolamin, Serin) zu Estern oder Amiden kondensieren. Zusätzlich sind modifizierende Enzyme wie Monooxygenasen, Aminotransferasen und Decarboxylasen involviert. Auch beide Biosynthesewege können beteiligt sein, so bei Petrobactin^{163,171,172}.

Ergänzend sei angemerkt, dass die chelatisierenden Eigenschaften von Siderophoren auch einen therapeutischen Nutzen finden. Desferrioxaminmesylat, Deferipron und Deferasirox sind Arzneistoffe, die zur Behandlung der transfusionsbedingten Eisenüberladung während der Therapie der β -Thalassämie und Sichelzellanämie eingesetzt werden^{173,174}. Außerdem zeigen Siderophore eine vielsprechende Wirkung bei der Therapie von Morbus Alzheimer und der Antibiose problematischer Pathogene, wenn sie mit Antibiotika chemisch verlinkt (z.B. *Sideromycine*) deren Aufnahme verbessern^{175,176}.

1.3.2.2. Mechanismen des Eisentransports

Siderophore werden durch Effluxpumpen in den Extrazellularraum geschleust. EntS (*E. coli*) ist eines dieser Membranproteine, welches die Sekretion von Enterobactin bewirkt¹⁷⁷. Nach der Komplexierung von Eisen müssen die Ferri-Siderophore zurück in die Zelle transportiert werden. Aufgrund ihrer Größe kann dies nicht über Diffusion durch Porine wie bei einfachen Zuckern oder Aminosäuren erfolgen¹⁷⁸. Gramnegative Bakterien tragen affine Rezeptorproteine in der Außenmembran, OM (*Outer Membrane*)-Rezeptoren, an die Eisenkomplexe binden (Abbildung 1-13). Solche Membranproteine sind Siderophorklassen-spezifisch und zeigen teilweise Spezifitäten gegenüber strukturellen Merkmalen innerhalb dieser Klassen. Die OM-Rezeptoren FepA (Ferri-Enterobactin), FecA (Ferri-Citrat), FhuA (Ferrichrom) aus *E.coli* und FpvA (Ferri-Pyoverdin) sowie FptA (Ferri-Pyochelin) aus *P.aeruginosa* konnten erfolgreich charakterisiert werden¹⁷⁹⁻¹⁸³. Die strukturelle Selektivität kann an IroN, einem OM-Rezeptor aus *Salmonella typhimurium*, illustriert werden, der die Catechol-Siderophore Ferri-Enterobactin, Ferri-Salmochelin und Ferri-Myxochelin A transportiert, jedoch nicht Ferri-Myxochelin B^{184,185}. Die β -Faltblattstruktur der OM-Proteine bildet einen Membrankanal, der durch einen „Stopfen“ (*cork / plug domain*) verschlossen ist. Diese Domäne besitzt eine Bindetasche für das Siderophor.

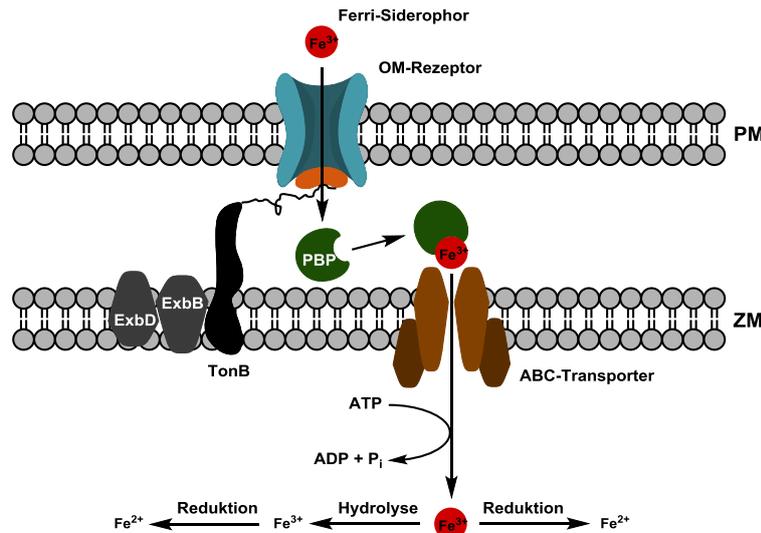


Abbildung 1-13: Aufnahme von Ferri-Siderophoren in gramnegativen Bakterien. PM: Periplasmamembran, ZM: Zytoplasmamembran, orange: cork / plug domain, Erklärung siehe Text.

Der Transport des Eisenkomplexes in den periplasmatischen Raum bedarf Energie, der durch den TonB-ExbB-ExbD-Komplex vermittelt wird. TonB ist ein in der Zytoplasmamembran verankertes Protein mit einer zentralen periplasmatischen Domäne, deren C-terminaler Teil mit einer Bindestelle am OM-Rezeptor (TonB-Box) interagiert. Die beiden Membranproteine ExbB und ExbD koppeln den Protonengradienten der Zytoplasmamembran mit TonB und aktivieren dieses. Über dessen periplasmatischen Teil erfolgt eine Energieübertragung auf den OM-Rezeptor, infolgedessen unter Konformationsänderung und Verschiebung der *cork domain* die Translokation des Ferri-Siderophores erfolgt^{150,186,187}. Die Ferri-Siderophore werden anschließend von periplasmatischen Bindeproteinen (PBPs) gebunden, die als Shuttle für die Eisenaufnahme dienen und weniger spezifisch als OM-Rezeptoren sind. So binden in *E. coli* die PBPs FecB Citrat-, FepB Catechol- und FhuD Hydroxamat-Siderophore. In grampositiven Bakterien sind periplasmatische Bindeproteine in der Zytoplasmamembran wegen des Fehlens der Periplasmamembran verankert^{178,187}. Für den Import des Ferri-Siderophores in das Zytoplasma sind ABC (*ATP-binding cassette*)-Transporter verantwortlich, von denen meist mehrere für verschiedene Siderophorklassen vorliegen. ABC-Transporter sind in der Zytoplasmamembran verankert und bestehen aus Homodimeren von zwei Nukleotidbindedomänen und zwei transmembranen Domänen, die einen Kanal bilden.

Nach Bindung des Ferri-Siderophor-PBPs an den Transporter erfolgt schließlich unter ATP-Hydrolyse die Freisetzung des Eisenkomplexes in das Zytoplasma^{150,151}.

Viele pathogene Bakterien nutzen Häm direkt oder Hämophore als Eisenquelle. Hämophore sind Proteine, die sezerniert werden und Häm aus Hämoglobin, Haptoglobin oder Hämopexin extrahieren und es dem OM-Rezeptor präsentieren. Die Aufnahme des Häm verläuft über zur Siderophoraufnahme analoge Transportsysteme. Beispiele sind das HemR-System aus *Yersinia enterocolitica*, das Häm direkt importiert oder das HasA-System aus *P. aeruginosa* unter Verwendung von Hämophoren^{177,188,189}. Andererseits kann Fe(III) über Metall-ABC-Transporter wie das FbpABC-System und die OM-Proteine TbpA und TbpB aus *Neisseria* spp. von den Wirtsproteinen Lactoferrin / Transferrin entfernt und aufgenommen werden¹⁹⁰. Ebenfalls ist der Import von Fe(II) über das Feo (*Ferrous Iron Transport*)-System weitverbreitet, besonders bei pathogenen Arten, die unter anaeroben oder microaerophilen Bedingungen leben (*E. coli* spp., *Helicobacter pylori*). Dabei gelangt Fe(II) über Porine in das Periplasma und wird durch ATP- bzw. GTP-abhängige Permeasen in das Zytoplasma befördert¹⁹¹. Auch werden extrazelluläre Fe(III)-Reduktasen gefunden, die das Fe(III) der Umgebung zu Fe(II) reduzieren können¹⁹².

1.3.3. Eisenfreisetzung und -speicherung

Die Freisetzung des Fe(III) aus dem Siderophor-Komplex kann über zwei Wege erfolgen. Trilakton-Catechol-Siderophore wie Ferri-Enterobactin oder Ferri-Bacillibactin werden durch die Esterasen Fes bzw. BesA hydrolysiert und letztlich zweizählige Komplexe gebildet, die weniger stabil sind. Aus diesen kann Fe(III) an andere Bindungspartner abgegeben bzw. reduziert werden^{158,159,193,194}. Die Reduktion des Fe(III) zu Fe(II) führt zu thermodynamisch labileren Komplexen, da die höhere Ladungsdichte des Fe(II) nicht mehr durch die negativ geladenen Donoratome (Sauerstoff) kompensiert werden kann¹⁹⁵. Dieser zweite Freisetzungsmechanismus trifft für die meisten Siderophore zu und wird durch Fe(III)-Reduktasen katalysiert. Die löslichen oder membrangebundenen NAD(P)H-abhängigen Oxidoreduktasen reduzieren gebundenes Flavin, FMN, FAD oder Riboflavin, die wiederum Fe(III) reduzieren. Da bakterielle Fe(III)-Reduktasen meist kein gebundenes Flavin, sondern die genannten diffusen Cofaktoren nutzen, die möglicherweise alleine die Reduktion durchführen, besitzen sie eine breite Substratspezifität^{155,196}. So katalysiert eines

dieser Enzyme aus *E. coli* die Reduktion einer Vielzahl von Ferri-Hydroxamat-Siderophoren¹⁹⁷. Weitere Beispiele sind eine Fe(III)-Reduktase aus *Azotobacter vinelandii*, die Ferri-Azotochelin reduziert oder FhuF aus *E. coli*, eine neue Klasse von Ferri-Siderophor-Reduktasen, die keine Flavin-Reduktase darstellt, sondern ein Eisen-Schwefel-Cluster für den Elektronentransfer auf bestimmte Ferri-Hydroxamat-Siderophore nutzt^{198,199}.

Nach der Freisetzung wird Fe(II) direkt als Cofaktor den verschiedenen Stoffwechselreaktionen zugeführt oder in Eisenspeicherproteinen gespeichert. Letztere sind multimere, aus identischen Untereinheiten aufgebaute Proteine, die hunderte Eisenatome als Fe(III) speichern und die Zelle vor seinen toxischen Eigenschaften schützen sowie eine Reserve bilden. Hierzu gehören Ferritin (ca. 2500 Eisenatome), das Hämgruppen tragende Bakterioferritin (ca. 1800 Eisenatome) und DPS (*DNA-binding Protein During Stationary Phase*), ein dodecameres Ferritin (ca. 500 Eisenatome), das unter oxidativem Stress und Nahrungsmangel induziert wird, an DNA bindet und diese vor Oxidasen und Nukleasen schützt. Alle Ferritine besitzen Ferroxidase-Aktivität, die Fe(II) oxidieren, bevor es im Zentrum der globulären Proteine gespeichert wird²⁰⁰.

1.3.4. Regulation der Eisenhomöostase

Das Fur-Protein (*Ferric Uptake Regulator Protein*) gilt als wichtigster Regulator der bakteriellen Eisenhomöostase. In *E. coli* werden durch Fur mehr als 90 Gene kontrolliert. Es bildet ein Homodimer mit einer Bindestelle für Fe(II) und einer nicht konservierten Bindestelle für Zn(II) und ist ein direkter Sensor für hohe intrazelluläre Fe(II)-Konzentrationen. Die Bindung des Corepressors Fe(II) erhöht die Fur-Affinität gegenüber einer palindromischen 19 bp-DNA-Bindestelle zweier, sich gegenläufig wiederholender Motive vor Promotoren Fur-kontrollierter Gene, der Fur-Box. Dadurch unterdrückt es als Repressor die Transkription hauptsächlich von Genen der Siderophor-Biosynthese, von Eisen-Transport-Systemen und des Primärstoffwechsels. Das *fur*-Gen selbst ist autoreguliert durch eine eigene Fur-Box. Häufig werden in Bakterien mehrere *fur*-Gene bzw. Fur-Proteine gefunden. Letztlich gehört der Repressor einer Familie von Fur-ähnlichen Regulatoren an, zu denen Zur (Zink-Aufnahme), Irr (Häm-Biosynthese) oder PerR (Schutz vor oxidativem Stress) zählen^{150,201-203}. Eine zweite Familie von Regulatoren

bilden DtxR-Proteine (*Diphtheria Toxin Regulator*), die zunächst in GC-reichen grampositiven, später auch in GC-armen grampositiven und gramnegativen Bakterien gefunden wurden. Die DNA-Bindestellen dieser Repressoren unterschieden sich zwar von Fur-Boxen, doch werden ähnlich zum Fur-Regulon Gene der Eisenaufnahme reguliert^{177,202}. Durch die Gefahr der mit der Eisenaufnahme verbundenen Entstehung von ROS ist die Eisenregulation eng mit dem Sensorsystem für oxidativen Stress verknüpft. Als Sensoren dienen Eisen-Schwefel-Cluster-Proteine, deren prosthetische Gruppen durch Sauerstoffspezies oxidiert werden, z.B. OxyR des OxyRS-Systems. Die Oxidation von OxyR aktiviert die Transkription von *fur*-Genen über die Induktion des *fur*-Promotors und hemmt andererseits über OxyS die Akkumulation von Wasserstoffperoxid und Superoxidanion¹⁵⁶. Neben Fur gehören sRNAs (*small RNAs*) zu den wichtigsten Eisenregulatoren, die über Basenpaarung mit mRNA die Translation von Zielgenen hemmen, den Abbau der jeweiligen mRNA bewirken oder die Translation stimulieren. Unter Eisenmangel hemmt die sRNA RyhB (*E. coli*) die Biosynthese von Eisen tragenden Enzymen des Citratzyklus (Fumarase, Aconitase), Superoxid-Dismutase, Ferritine und stimuliert die Enterobactin-Biosynthese und -aufnahme. Fur hemmt die Transkription von RyhB und ist damit ein Derepressor RyhB-kontrollierter Gene, eine mechanistische Kopplung über die Fur als positiver Regulator agiert²⁰⁴.

Eine wichtige Rolle spielen Sigma 70 - Faktoren aus der Familie der ECF (*Extracytoplasmatic Function*)-Sigma-Faktoren, die meist membranassoziiert vorliegen. Der periplasmatische Sensor und Anti-Sigma-Faktor FecR erkennt in *E. coli* über den OM-Rezeptor die Bindung von Fe-Citrat, leitet das Signal durch die Zytoplasmamembran und induziert den zytosolischen Sigma-Faktor FecI, der die Transkription der Gene des Fe-Citrat-Aufnahmesystems *fecABCDE* initiiert^{205,206}.

Schließlich sind AraC-like-Regulatoren an der Regulation der Siderophor-Biosynthese und -aufnahme beteiligt. AraC reguliert die Expression von Genen, die an Transport und Metabolisierung von Arabinose verantwortlich sind. In *P. aeruginosa* stimuliert Pyochelin über den AraC-like-Regulator PchR die Pyochelin-Biosynthese und Expression des Ferri-Pyochelin-Rezeptors FptA unter Eisenmangel²⁰⁷.

Die Regulation der myxobakteriellen Eisenhomöostase wurde am Beispiel von *M. xanthus* DK1622 untersucht. Dabei wurden ein Fur-Protein (MXAN_3702) und ein Fur-like Protein (MXAN_6967), das keine Fe(II)-Bindestelle besitzt und wahrscheinlich die Häm-Aufnahme reguliert, gefunden. 40 Fur-kontrollierte Gene wurden über Fur-Boxen

identifiziert. Eine Proteomanalyse ergab, wie erwartet, die Hochregulation der Myxochelin-Biosynthese und des Eisenaufnahme- und Speichersystems in *M. xanthus* unter Eisenmangelbedingungen. Als Transkriptionsregulatoren wurden ECF-Sigma-Faktoren, AraC-like-Regulatoren und interessanterweise DNA-Methyltransferasen erkannt. Weitere regulatorische Elemente sind auf posttranslationaler Ebene Proteinphosphorylierung durch Proteinkinasen und vermutlich Redoxsensoren. Außerdem konnte phenotypisch eine Verlinkung des Eisenstoffwechsels mit dem Sekundärmetabolismus gezeigt werden, indem beispielsweise die Myxochromid A-Biosynthese verstärkt wird²⁰⁸.

1.4. Zielsetzung

1.4.1. Modifizierte Myxocheline und die Eisenfreisetzung in *Myxococcus xanthus*

Neben den bekannten Myxochelinen A und B wurden in *M. xanthus* DK1622 und DK1050 modifizierte, in der *meta*-Hydroxyfunktion des *N*- ϵ -Dihydroxybenzamid methylierte Myxocheline identifiziert, die Methylmyxocheline A und B^{209,210} (Abbildung 1-14). Fütterungsversuche mit L-Methionin-*methyl-d*₃ belegten, dass die Derivate nicht während der Aufreinigung entstehende Artefakte darstellen, sondern aus einer zellkatalysierten Reaktion, wahrscheinlich einer SAM-abhängigen Methyltransferase, hervorgehen. Dies führte zu der Frage nach der Funktion der Methylderivate im Eisenstoffwechsel²¹⁰.

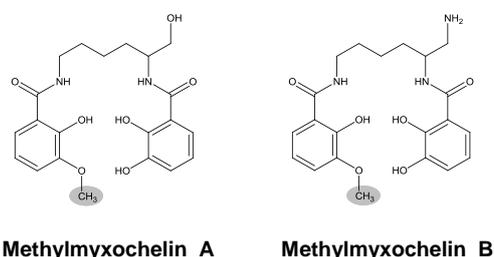


Abbildung 1-14: Methylmyxocheline.

Abergel *et al.* konnten die Eisenkomplexe von Enterobactin und Enterobactin-Derivaten, insbesondere das synthetische Tris-*meta*-methoxy-Derivat SER(3M)SAM, charakterisieren

und zeigen, dass durch Protonierung von Ferri-Enterobactin $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{Ent})]^{3-}$ zu $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{H}_3\text{Ent})]^0$ eine Verschiebung der Eisenkoordination aus der Catechol- in die Salicylposition erfolgt. Letztere liegt bei Ferri-SER(3M)SAM alleinig vor (Abbildung 1-15). Dies drückt sich in den signifikant unterschiedlichen Komplexbildungskonstanten von $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{H}_3\text{Ent})]^0$ und Ferri-SER(3M)SAM ($\log K = 38$) im Vergleich zu deprotoniertem Ferri-Enterobactin ($\log K = 49$) aus. Außerdem ist das Redoxpotential von Ferri-SER(3M)SAM [-89 mV (NHE)] deutlich höher als das von Ferri-Enterobactin [-990 mV (NHE)], was einen alternativen Freisetzungsmechanismus neben der Hydrolyse des Triserinlaktons (siehe oben) nahelegt²¹¹.

Abbildung aus urheberrechtlichen Gründen entfernt.

Zur Ansicht der Originalabbildung siehe:

<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ja062046j>

DOI: 10.1021/ja062046j
(Referenz-Nr. 211, Figure 1)

Abbildung 1-15: Verschiebung der Koordination in Ferri-Enterobactin von der Catechol- zur Salicylposition unter Protonierung²¹¹.

Vergleichbar zu diesen Ergebnissen könnte die Methoxy-Catecholatfunktion der Methylmyxocheline ähnliche Effekte im Ferri-Siderophor bewirken und eine Rolle in der Eisenfreisetzung des Myxobakteriums spielen. Inspiriert durch diese Hypothese wurden Versuche unternommen, die relevante Methyltransferase über Geninaktivierungsexperimente zu identifizieren. Im Rahmen dieser Untersuchungen wurden *knock out*-Mutanten von *M. xanthus* DK1622 bezüglich 7 potenziellen Methyltransferase-Kandidatengen erzeugt, deren benachbarte Genloci im Genom eine mögliche Funktion in der Eisenhomöostase des Myxobakteriums vermuten lies. Phänotypisch erwiesen sich die Mutanten jedoch ausnahmslos als Produzenten der Methylmyxocheline A und B²¹⁰. In Anbetracht von alleine 65 annotierten Methyltransferasen und 16 annotierten SAM-abhängigen Proteinen im Genom von *M. xanthus* DK1622²⁸ erschien die Weiterverfolgung

einer Strategie basierend auf Geninaktivierung als wenig sinnvoll. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich deshalb mit der Identifizierung der Methyltransferase über Verfahren der aktivitätsgeleiteten Proteinaufreinigung und nachfolgenden Charakterisierung des Enzyms. Zeitgleiche Studien zur Totalsynthese und Koordinationschemie von Myxochelin A, Methylmyxochelin A und weiteren modifizierten Liganden wurden durch Sabine Wilbrand am Lehrstuhl für Anorganische Chemie, Universität des Saarlandes durchgeführt²¹². Schlussfolgernd wird aus den Ergebnissen beider Untersuchungen eine Theorie zur Funktion der Methylmyxocheline in der Eisenhomöostase von *M. xanthus* DK1622 formuliert werden.

1.4.2. Identifizierung und Isolierung unbekannter Sekundärmetabolite aus myxobakteriellen Neuisolaten

Die Erkenntnisse über Myxobakterien als Naturstoffproduzenten der letzten Jahrzehnte zeigten, dass die Produktion bestimmter Sekundärmetabolite mehr stammspezifisch als speziesspezifisch ist und ein Großteil dieser aus der Gattung *Sorangium* stammt, die fast die Hälfte der Stammsammlung ausmachte^{11,213}. Gerade deshalb ist die Isolierung und taxonomische Differenzierung neuer Myxobakterienstämme für die zukünftige Suche nach unbekanntem Sekundärmetaboliten wichtig. In jüngster Zeit wurden große Fortschritte auf diesem Gebiet erzielt, Stämme, die als unkultivierbar galten, werden erfolgreich kultiviert, klassifiziert und neue Familien und Spezies entdeckt^{9,214,215}.

Es stehen verschiedene Ansatzpunkte für die Identifizierung unbekannter Naturstoffe aus neuen Isolaten zur Verfügung. Über genetische Methoden wie Inaktiverierung potenzieller Biosynthesegencluster, Screening von Cosmid-Gendatenbanken, heterologe Expression oder *in silico*-Analysen (*genome mining*) konnten diverse Sekundärmetabolite (Flaviolin, Myxochromide, Aurafurone) gefunden werden^{91,216-219}. Hierzu sind jedoch Sequenzinformationen oder ein der genetischen Modifikation zugänglicher Stamm erforderlich. Ein analytischer Ansatzpunkt ist das traditionelle, aktivitätsgeleitete Screening von Kulturextrakten gefolgt von der Substanzaufreinigung durch Fraktionierung basierend auf Bioassays und HPLC/UV-Vis (*UV-Vis Detection Coupled High Performance Liquid Chromatography*). Bis heute wurden die meisten Naturstoffe aus Myxobakterien (z.B. Chivosazole, Myxocheline, Chondramide, Etnangien, Maltepolide) auf der Grundlage dieser Methoden gefunden^{45,67,70,95,220}.

Die Weiterentwicklung in der Massenspektrometrie hin zu FT-MS (*Fourier Transform Mass Spectrometry*) und Plattformen wie FT-ICR (*Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance*)-Massenspektrometer und LTQ-Orbitrap erlauben hohe Messgenauigkeiten < 1 ppm sowie hochauflösende Messungen (HR-MS: *High Resolution Mass Spectrometry*). Gekoppelt mit LC-Systemen hoher Trennleistung, HPLC oder UPLC (*Ultra Performance Liquid Chromatography*), ermöglicht die HR-MS die Identifizierung bekannter Metabolite aus einer Probe über die Parameter exakte Masse, Isotopenmuster und Retentionszeit und den Vergleich mit einer Datenbank²²¹⁻²²³. In der Ära der *metabolomics* sind diese Untersuchungsmethoden unverzichtbar, um das Ziel zu verfolgen, das gesamte Metabolom eines Organismus zu erfassen²²⁴. Die LC/HR-MS lässt nicht nur die Identifizierung bekannter Metabolite zu, sondern kann auch der Erkennung unbekannter Metabolite, insbesondere Sekundärmetabolite, dienen. Über ein LC/MS-Screening können bekannte Sekundärmetabolite ausgeschlossen werden und aus den MS-Daten der nicht identifizierten Spezies theoretische Summenformeln abgeleitet werden, die Auskunft über die mögliche chemische Zusammensetzung geben und mit öffentlichen Datenbanken verglichen werden können. Dabei können myxobakterielle Kulturextrakte auf potenziell unbekannte Naturstoffe hin untersucht werden und diese als Kandidaten für eine Isolierung und Strukturaufklärung ausgewählt werden. Über diese Verfahrensweise unter Einbeziehung statistischer Methoden konnten bereits erfolgreich neue Sekundärmetabolite wie die Myxoprincomide aus *Myxococcus xanthus* identifiziert werden²²⁵⁻²²⁷.

In dieser Arbeit sollen mit Hilfe eines LC/HR-MS-Screenings von zwei neuen, aus Bodenproben isolierten Myxobakterienstämmen, *Jahnella thaxteri* SBSr007 [Olango Island, Philippinen]⁹ und *Chondromyces* sp. SBCm009 [Mabini, Batangas, Philippinen, R. Garcia, unveröffentlicht] unbekannte Naturstoffe identifiziert, isoliert und anschließend auf deren Aktivität hin getestet werden. Dabei sollten die Stämme in einem der Substanzisolierung dienlichen Maßstab kultiviert werden und die Kulturextrakte zunächst über LC/HR-MS-Analysen auf bekannte myxobakterielle Sekundärmetabolite hin untersucht werden. Anschließend werden geeignete, unbekannte Substanzpeaks der Analyse ausgewählt, aus den HR-MS-Daten wie oben beschrieben Summenformeln abgeleitet und diese mit öffentlichen Substanzdatenbanken verglichen. Ziel ist es schließlich, über das beschriebene Verfahren neue, unbekannte Substanzen zu erkennen und zu isolieren, um das Spektrum interessanter und gegebenenfalls biologisch aktiver Naturstoffe aus Myxobakterien zu erweitern.

2. Material und Methoden

2.1. Chemikalien und Ausgangsstoffe

Alle aufgeführten Chemikalien wurden in p.a.-Qualität bezogen.

Substanz	Hersteller
Bacto agar Casitone Tryptone Yeast extract	Becton Dickinson, Heidelberg
Chelex [®] 100	Bio-Rad Laboratories, München
Agarose NEEO Ultra-Qualität 5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactosid (X-Gal) Coomassie Brilliant Blue R250 Dikaliumhydrogenphosphat Dimethylformamid Dithiothreitol (DTT) Ethidiumbromidlösung 1% HEPES Isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranosid (IPTG) Kieselgel 60 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (MeS) Natriumlaurylsulfat (SDS) Phosphorsäure 85% Rotiphorese [®] Gel 30 (Acrylamidmix 30%) Salzsäure 37% TEMED Vitamin B12	Carl Roth, Karlsruhe
Aminosäurestandard D-FDLA / L-FDLA	CDN Isotopes, Quebec, Kanada
Bäckerhefe (frisch)	Dr. August Oetker Nahrungsmittel, Bielefeld
Desoxynukleosidtriphosphate (dNTP Set, 100 mM)	Fermentas, St. Leon-Rot
Ammoniumsulfat Ammoniumhydrogencarbonat Ethyldiamin-tetraessigsäure Dinatriumsalz (Na ₂ -EDTA) Kaliumhydroxid Natriumchlorid Rinderserumalbumin Xylencyanol	Fluka, Neu-Ulm
Sephadex [™] LH20 Superdex [™] 75	GE Healthcare, München
Ameisensäure 98% α -Cyano-4-Hydroxymizsäure Essigsäure Glycerin 87% Kaliumacetat Magnesiumchlorid-Hexahydrat Magnesiumsulfat-Heptahydrat Natriumacetat Natriumhydroxid Trifluoressigsäure 99%	Merck, Darmstadt

Tabelle 2-1: Chemikalien und Ausgangsstoffe.

Substanz	Hersteller
Calciumchlorid-Dihydrat	Riedel-de Haën, Honeywell Specialty Chemicals, Seelze
Amberlite® XAD-16	Rohm & Haas, Frankfurt
Aceton 5'-Adenosinemonophosphat-Agarose Ammoniumpersulfat Bromphenolblau Chloroform Dimethylsulfoxid (DMSO) Dimethylsulfoxid- <i>d</i> ₆ Ethanol Ethylacetat Imidazol Isopropanol Methanol- <i>d</i> ₄ Natriumdihydrogenphosphat S-(5'-Adenosyl)-L-methioninchlorid-Dihydrochlorid (SAM-chlorid-Dihydrochlorid) Tris(hydroxymethyl)-aminomethan / Trizma® base / Tris	Sigma-Adrich, Hamburg, Seelze, München
Acetonitril n-Heptan n-Hexan Methanol	VWR International, Darmstadt
Wasser (Qualitätstyp 1/Reinstwasser)	eigens hergestellt (siehe 2.5 Geräte)

Tabelle 2-1: Chemikalien und Ausgangsstoffe - Fortsetzung.

2.2. Enzyme, Kits und Marker

Die in dieser Arbeit verwendeten Enzyme, Kits und Marker wurden von den in Tabelle 2-2 angegebenen Quellen bezogen und nach Herstellerprotokoll verwendet.

Produkt	Hersteller
Bio-Rad Protein Assay Kit	Bio-Rad Laboratories, München
GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder PageRuler™ Prestained Protein Ladder PageRuler™ Unstained Protein Ladder Restriktionsendonukleasen SAP (shrimp alkaline phosphatase) T4-DNA-Ligase <i>Taq</i> DNA-Polymerase	Fermentas, St. Leon-Rot
TOPO TA Cloning® Kit	Invitrogen, Darmstadt
NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kit NucleoSpin® Plasmid Kit	Macherey & Nagel, Düren
Novagen® Thrombin Cleavage Capture Kit	Merck, Darmstadt
Genra® Puregene Yeast/Bact. Kit	Qiagen, Hilden
Trypsin, sequencing grade	Roche Diagnostics, Mannheim
Phusion® High-Fidelity DNA-Polymerase	Thermo Fisher Scientific, Dreieich

Tabelle 2-2: Enzyme, Kits und Marker.

2.3. Lösungen und Puffer

Die nachfolgend beschriebenen Lösungen und Puffer wurden mit Reinstwasser hergestellt und, falls erforderlich, für 20 min bei 121 °C autoklaviert (Kennzeichnung A) bzw. aus Stabilitätsgründen mit einem sterilen 0,22 µm-Membranfilter sterilfiltriert (Kennzeichnung F). Die Lagerung erfolgte bei Raumtemperatur (RT) oder bei den angegebenen Bedingungen.

2.3.1. Lösungen und Puffer für die Molekularbiologie

Lösung / Puffer	Zusammensetzung	Lagerung / Sterilisation
AL1-Puffer	Tris Ethylendiamin-tetraessigsäure Dinatriumsalz (Na ₂ -EDTA) H ₂ O pH 8,0, mit 1 M NaOH eingestellt	50 mM 10 mM ad 100 ml RT / A
AL2-Puffer	NaOH SDS H ₂ O	20 mM 1g ad 100 ml RT / A
AL3-Puffer	Kaliumacetat H ₂ O pH 5,5, mit Eisessig eingestellt	3 M ad 100 ml RT / A
DNA-Ladepuffer	Glycerin 87 % Bromphenolblau Xylencyanol H ₂ O	3 ml 25 mg 25 mg ad 10 ml RT
10 mM dNTPs	100 mM dATP 100 mM dCTP 100 mM dGTP 100 mM dTTP H ₂ O	100 µl 100 µl 100 µl 100 µl ad 1000 µl -22 °C
0,5 M Na ₂ -EDTA pH 8,0	Ethylendiamin-tetraessigsäure Dinatriumsalz (Na ₂ -EDTA) H ₂ O pH 8,0, mit 10 M NaOH eingestellt	186,1 g ad 1000 ml RT
TAE-Puffer 50-fach	Tris Eisessig 0,5 M Na ₂ -EDTA pH 8,0 H ₂ O	242 g 57,1 ml 100 ml ad 1000 ml RT
TAE-Puffer	TAE-Puffer 50-fach H ₂ O	20 ml ad 1000 ml RT
TE-Puffer	Tris 0,5 M Na ₂ -EDTA pH 8,0 H ₂ O	1,2 g 2 ml ad 1000 ml RT / A
X-Gal-Lösung	X-Gal Dimethylformamid	400 mg ad 10 ml -22 °C / F

Tabelle 2-3: Lösungen und Puffer für die Molekularbiologie.

2.3.2. Lösungen und Puffer für die Proteinaufreinigung und -analytik

Lösung / Puffer	Zusammensetzung	Lagerung / Sterilisation
4 mM Ammoniumhydrogencarbonat	Ammoniumhydrogencarbonat H ₂ O	31,6 mg ad 100 ml RT
10 % APS-Lösung	Ammoniumpersulfat H ₂ O	100 mg ad 1000 µl -22 °C
Bindepuffer	Tris NaCl Imidazol Glycerin pH 7,6, mit 1 M HCl eingestellt	20 mM 200 mM 10 mM 10 % 4 °C
Coomassieblau-Färbelösung (kolloidal)	Methanol Phosphorsäure 85 % Ammoniumsulfat H ₂ O Coomassie Brilliant Blue R250, nach Erwärmen der Lösung auf 50 °C unter Rühren zugegeben	340 ml 30 ml 170 g ad 1000 ml 2,5 g RT
Elutionspuffer	Tris NaCl Imidazol Glycerin pH 7,6, mit 1 M HCl eingestellt	20 mM 200 mM 500 mM 10 % 4 °C
1 M IPTG-Lösung	IPTG H ₂ O	1,19 g ad 5 ml -22 °C / F
4 mM Myxochelin A	Myxochelin A Reaktionspuffer	1,6 mg ad 1000 µl -22 °C
Reaktionspuffer	Tris DTT Magnesiumchlorid-Hexahydrat H ₂ O pH mit 1 M HCl eingestellt	50 mM 1 mM 10 mM ad 100 ml 4 °C
8 mM SAM	SAM-chlorid-Dihydrochlorid Reaktionspuffer	4,1 mg ad 1000 µl -22 °C
10 % SDS-Lösung	SDS H ₂ O	10 g ad 100 ml RT
SDS-PAGE-Laufpuffer	Glycin Tris SDS H ₂ O	14,4 g 3 g 1 g ad 1000 ml RT
SDS-PAGE-Probenpuffer	1 M Tris pH 6,8 Glycerin 87 % Bromphenolblau SDS H ₂ O	5 ml 4 ml 10 mg 1 g ad 10 ml -22 °C

Tabelle 2-4: Lösungen und Puffer für die Proteinaufreinigung und -analytik.

2. Material und Methoden

Lösung / Puffer	Zusammensetzung	Lagerung / Sterilisation
T-Puffer	Tris Ethylendiamin-tetraessigsäure Dinatriumsalz (Na ₂ -EDTA) H ₂ O pH 7,6, mit 1 M HCl eingestellt	606 mg (50 mM) 18,5 mg (0,5 mM) ad 100 ml 4 °C / A
1 M Tris pH 6,8	Tris H ₂ O pH 6,8, mit 1 M HCl eingestellt	12,1 g ad 100 ml RT / A
1,5 M Tris pH 8,8	Tris H ₂ O pH 8,8, mit 1 M HCl eingestellt	18,2 g ad 100 ml RT / A
Zelllyse-Puffer	Natriumchlorid Ethylendiamin-tetraessigsäure Dinatriumsalz (Na ₂ -EDTA) Tris H ₂ O pH 7,6, mit 1 M HCl eingestellt	584 mg (100 mM) 37 mg (1 mM) 606 mg (50 mM) ad 100 ml 4 °C / A

Tabelle 2-4: Lösungen und Puffer für die Proteinaufreinigung und -analytik - Fortsetzung.

2.3.3. Medienzusätze

Lösung / Puffer	Zusammensetzung	Lagerung / Sterilisation
1 M Tris pH 7,6	Tris H ₂ O pH 7,6, mit 1 M HCl eingestellt	12,1 g ad 100 ml RT / A
1 M K ₂ HPO ₄ -Lösung, pH 7,6	K ₂ HPO ₄ H ₂ O pH 7,6, mit 1 M HCl eingestellt	17,4 g ad 100 ml RT / A
0,8 M Magnesiumsulfat- Lösung	Magnesiumsulfat-Heptahydrat H ₂ O	19,7 g ad 100 ml RT / A
Vitamin B12- Stocklösung	Vitamin B12 H ₂ O	50 mg ad 10 ml -22 °C / F

Tabelle 2-5: Medienzusätze.

2.3.4. Antibiotikallösungen

Die in Tabelle 2-6 aufgelisteten Antibiotika-Stocklösungen wurden sterilfiltriert und bei Bedarf zu dem jeweiligen autoklavierten Medium bzw. dem noch flüssigen Agar bis zu der geforderten Endkonzentration zugefügt.

Antibiotikum	Stocklösung	Endkonzentration (Medium)	Lagerung (Stocklösung)
Ampicillin	100 mg/ml gelöst in H ₂ O	100 µg/ml	-22 °C
Chloramphenicol	34 mg/ml gelöst in Ethanol 70% (v/v)	34 µg/ml	-22 °C
Kanamycin	50 mg/ml gelöst in H ₂ O	50 µg/ml	-22 °C

Tabelle 2-6: Antibiotikallösungen.

2.4. Medien

Zur Herstellung von Medien wurde VE-Wasser (vollentsalztes Wasser / demineralisiertes Wasser) verwendet. Die Sterilisation erfolgte durch Autoklavieren (s.o.). Für die Zubereitung von Agarmedien wurden 15 g Agar und von Softagarmedien 8 g Agar vor dem Sterilisationsprozess zu 1 L Flüssigmedium zugesetzt.

Medium	Zusammensetzung	Lagerung	
CTT-Medium	Casiton 1 M Tris-HCl-Lösung, pH 7,6 1 M K ₂ HPO ₄ -Lösung, pH 7,6 0,8 M Magnesiumsulfat-Lösung H ₂ O pH 7,6, mit 1 M HCl eingestellt	10 g 10 ml 1 ml 10 ml ad 1000 ml	RT
LB-Medium	Yeast Extract Trypton NaCl H ₂ O	5 g 10 g 5 g ad 1000 ml	RT
VY/2-Medium	Bäckerhefe Calciumchlorid-Dihydrat HEPES H ₂ O pH 7,0, mit 1 M KOH eingestellt Vitamin B12-Stocklösung, nach dem Autoklavieren zugegeben	7 g 0,5 g 1,19 g ad 1000 ml 100 µl	RT

Tabelle 2-7: Medien.

2.5. Geräte und sonstige Materialien

Gerät / Material	Hersteller
Agarosegelelektrophorese Elektrophoresekammer Sub-Cell® GT Elektrophoresekammer Mini-Sub-Cell® GT Spannungsquelle PowerPac	Bio-Rad Laboratories, München
Autoklav Systec V-150	Systec, Wetttenberg
Bilddokumentation UV-System Version 1.73a digit store duo	Intas, Göttingen
Elektroporator Gene Pulser Xcell™	Bio-Rad Laboratories, München
Fermenter Labfors	Infors HT, Bottmingen, CH
FPLC ÄKTApurifier	GE Healthcare, München
FPLC-Säulen HiTrap™ Butyl HP 1 ml HisTrap™ HP 1 ml	GE Healthcare, München
French Press	SLM Aminco / Thermo Scientific, Bremen
HPLC-Systeme: HPLC-UV/ESI-MS Agilent 1100 series HPLC Bruker HCTplus UPLC-UV/NanoESI-HR-MS Dionex UltiMate® 3000 UPLC TriVersa NanoMate® LTQ-Orbitrap™ Präparative HPLC-MS AutoPurification System	Agilent Technologies, Böblingen Bruker Daltonik, Bremen Thermo Fisher Scientific, Bremen Advion, Ithaca, USA Thermo Fisher Scientific, Bremen Waters, Eschborn
HPLC-Säulen Phenomenex Luna C18 2,5 µm, 100 x 2 mm Waters UPLC BEH C18 1,7 µm, 50 x 2,1 mm Waters XBridge® Prep C18 OBD 5 µm, 19 x 150 mm	Phenomenex, Aschaffenburg Waters, Eschborn
Inkubatoren Inkubationsschränke / Brutschränke Schüttelinkubatoren Multitron	Binder, Tuttlingen Infors HT, Bottmingen, CH
Kryoröhrchen CRYO.S™ 2 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
LAF-Sicherheitswerkbänke Heraeus LaminAir® HeraSafe®	Kendro, Langenselbold Kendro, Langenselbold
MALDI-TOF-MS 4800 MALDI TOF/TOF™ Analyzer	Applied Biosystems, Darmstadt
0,22 µm-Membranfilter	Millipore, Schwalbach/Ts.
NMR-Spektrometer Bruker Ascend™ 700 MHz, CryoProbe	Bruker Biospin, Rheinstetten
pH-Meter pH-Meter 766 Calimatic	Knick, Berlin

Tabelle 2-8: Geräte und Materialien.

Gerät / Material	Hersteller
Photometer BioPhotometer Helios™ Epsilon Spectrophotometer	Eppendorf, Hamburg Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Polypropylen-Leersäulen Chromabond® 30 ml	Machery & Nagel, Düren
SDS-PAGE Elektrophoresekammer Minigel Spannungsquelle PowerPac™	Biometra, Göttingen Bio-Rad Laboratories, München
Thermocycler Mastercycler® Gradient peqSTAR 96	Eppendorf, Hamburg PEQLAB Biotechnologie, Erlangen
Thermomixer Thermomixer® compact / comfort	Eppendorf, Hamburg
Wasseraufbereitung zur Bereitstellung von Wasser Qualitätstyp 1 / Reinstwasser Milli-Q® water purification system PURELAB ultra	Millipore, Schwalbach/Ts. ELGA LabWater, Celle
Zentrifugen Avanti® J-E Centrifuge eppendorf Centrifuge 5810R Tischzentrifuge 5415D	Beckman Coulter, Krefeld Eppendorf, Hamburg Eppendorf, Hamburg
Zentrifugationsfilter Amicon® Ultra-15 3K	Millipore, Schwalbach/Ts.
ZipTip-Pipetten ZipTip® C18	Millipore, Schwalbach/Ts.

Tabelle 2-8: Geräte und Materialien – Fortsetzung.

2.6. Bakterienstämme, Plasmide, Oligonukleotide

2.6.1. Bakterienstämme

Die Tabellen 2-9 bis 2-11 geben die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme sowie erzeugte Mutanten an.

Stamm	Charakteristik	Referenz
<i>Chondromyces</i> sp. SBCm009	Wildtyp	Garcia, R. (unveröffentlicht)
<i>Jahnella thaxteri</i> SBSr007	Wildtyp	Garcia, R. ⁹
<i>Myxococcus xanthus</i> DK1622	Wildtyp	Kaiser, D. ²²⁸

Tabelle 2-9: Myxobakterien-Stämme.

2. Material und Methoden

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>Escherichia coli</i> DH10B	F <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr hsdRMS mcrBC</i>) Δ 80 <i>dlacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74 deoR</i> <i>recA1 endA1 araD139</i> Δ (<i>ara, leu</i>)7697 <i>galU galK rpsL</i> <i>nupG</i>	Grant, S.G. ²²⁹
<i>Escherichia coli</i> Rosetta 2(DE3)pLysS	F ⁻ <i>ompT hsdSB</i> (rB ⁻ mB ⁻) <i>gal dcm</i> (DE3) pLysSpRARE2 (<i>argU</i> <i>argW ileX glyT leuW proL metT</i> <i>thrT tyrU thrU argX cam^R</i>)	Novagen, Darmstadt

Tabelle 2-10: *Escherichia coli*-Stämme.

Mutante	Charakteristik
DH10B2293	Transformation von pET2293 in <i>E. coli</i> DH10B, <i>kan^R</i>
DH10B2295	Transformation von pTOPO2295 in <i>E. coli</i> DH10B, <i>amp^R, kan^R</i>
DH10B2296	Transformation von pET2296 in <i>E. coli</i> DH10B, <i>kan^R</i>
DH10B3033	Transformation von pET3033 in <i>E. coli</i> DH10B, <i>kan^R</i>
R2293	Transformation von pET2293 in <i>E. coli</i> Rosetta 2(DE3)pLysS zur heterologen Expression von MXAN2293, <i>kan^R, cam^R</i>
R2296	Transformation von pET2296 in <i>E. coli</i> Rosetta 2(DE3)pLysS zur heterologen Expression von MXAN2296, <i>kan^R, cam^R</i>
R3033	Transformation von pET3033 in <i>E. coli</i> Rosetta 2(DE3)pLysS zur heterologen Expression von MXAN3033, <i>kan^R, cam^R</i>

Tabelle 2-11: Erzeugte Mutanten.

2.6.2. Vektoren

Vektor	Charakteristik	Referenz
pCR [®] 2.1-TOPO [®]	Klonierungsvektor <i>lacZα</i> , T7 Promotor, f1 origin, pUC origin, <i>amp^R, kan^R</i>	Invitrogen, Darmstadt
pET 28b(+)	Expressionsvektor zur Expression von His ₆ -Tag-Proteinen T7 Promotor, lac Operator, <i>lacI</i> , f1 origin, <i>kan^R</i>	Novagen, Darmstadt

Tabelle 2-12: Vektoren.

2.6.3. Plasmide

Plasmide	Konstruktion und Verwendung
pET2293	Klonierung eines 810 bps PCR-Amplifikats in pET 28b(+) zur Expression von MXAN2293 mit N-terminalem His ₆ -Tag
pET2296	Klonierung eines 1026 bps PCR-Amplifikats in pET 28b(+) zur Expression von MXAN2296 mit N-terminalem His ₆ -Tag
pET3033	Klonierung eines 903 bps PCR-Amplifikats in pET 28b(+) zur Expression von MXAN3033 mit N-terminalem His ₆ -Tag
pTOPO2295	Klonierung eines 603 bps PCR-Amplifikats in pCR [®] 2.1-TOPO [®] zur Inaktivierung von MXAN2295

Tabelle 2-13: Erzeugte Plasmide.

2.6.4. Oligonukleotide

Primer	Sequenz 5'→3'
2293expETfor	TTTTCATATGGATACCGAAGCGCT
2293expETrev	TTTTAAGCTTTCAGCGCTTCTCCAGGA
2296expETfor	TTTTCATATGGACAAGACTCCCGG
2296expETrev	TTTTAAGCTTTCAGCGCTTCACGGCTT
3033expETfor	TTTTCATATGGATGTCGCAACAAG
3033expETrev	TTTTAAGCTTCTACGGCCTGGTGCCTG
2295KOfor	TCGTCCTCACGTGTCTG
2295KOrev	CACGCCTACAACCGGC
T7	TAATACGACTCACTATAGGG
T7term_r	TAGTTATTGCTCAGCGGTGG

Tabelle 2-14: Oligonukleotide/Primer.

2.7. Kultivierung und Lagerung von Mikroorganismen

Alle mikrobiologischen Arbeiten hinsichtlich Anzucht, Überimpfung und Manipulation unter Bewahrung der Reinkultur wurden unter LAF-Sicherheitswerkbänken durch Verwendung steriler Gefäße, Einmalartikel, Medien und anderer Hilfsmittel durchgeführt. Selektionsbedingungen wurden durch Zusatz eines geeigneten Antibiotikums erzeugt. Abweichungen von den unten beschriebenen Kultivierungsmethoden werden an entsprechender Stelle benannt.

2.7.1. Myxobakterien

2.7.1.1. Myxococcus xanthus DK1622

Myxococcus xanthus DK1622 und davon abgeleitete Mutanten wurden in CTT-Medium bzw. auf CTT-Agarplatten kultiviert. Zur Kultivierung in Flüssigmedium wurde eine einzelne Kolonie in 20 ml CTT-Medium überführt und auf Schüttelinkubatoren bei 180 - 200 rpm und 30 °C über mehrere Tage angezogen. Größere Kulturvolumina wurden durch Überimpfen von Flüssigkultur im Verhältnis 1:50 bis 1:100 erhalten. Die Füllmenge betrug ca. 10 - 20 % des Kolbenvolumens.

Zur Kultivierung auf Agarplatten wurde Kryokultur oder Flüssigkultur mittels einer Impföse ausgestrichen und in Brutschränken bei 30 °C inkubiert.

Kryokulturen zur Stammkonservierung wurden durch Mischen von 1 ml Flüssigkultur mit 1 ml sterilem Glycerin 50 % (v/v in H₂O) in einem Kryoröhrchen und Lagerung bei -80 °C erzeugt.

2.7.1.2. Jahnella thaxteri SBSr007 und *Chondromyces* sp. SBCm009

Die Kultivierung der Stämme SBSr007 und SBCm009 erfolgte unter gleichen Bedingungen wie bei *Myxococcus xanthus* DK1622, jedoch in VY/2-Medium. Da die Stämme nicht in Suspension wachsen, sondern Zellaggregate bilden, wurden diese nach Sedimentation am Kolbenboden zur Überimpfung mit einer Pipette abgesaugt, durch Auf- und Abpipettieren zerkleinert und transferiert. Die Überimpfung erfolgte nach Klärung des Mediums. Das Medienvolumen konnte bis zu 50 % des Kolbenvolumens betragen.

Einzelne Zellaggregate wurden auch zur Kultivierung auf Agarplatten verwendet. Kryokulturen wurden mit 1 ml einer dichten Zellaggregatsuspension und 1 ml sterilem Glycerin 50 % (v/v in H₂O) hergestellt und bei -80 °C gelagert.

2.7.2. Escherichia coli

E. coli-Stämme wurden bei 37 °C in LB-Medium (180 - 200 rpm, Schüttelinkubatoren) bzw. auf LB-Agarplatten (Brutschränke) kultiviert. Zur Anzucht einer Flüssigkultur wurde eine einzelne Kolonie in 10 ml LB-Medium überführt und über Nacht geschüttelt. Die

Überimpfung in größere Medienvolumina und die Konservierung in Form von Kryokulturen erfolgte wie für *M. xanthus* beschrieben.

Die Anzucht auf Agarplatten wurde durch Überführung von Kryo- oder Flüssigkultur und Ausstreichen mit einer Impföse erreicht. Zur Vereinzelnung von Kolonien wurde ein Verdünnungsausstrich durchgeführt.

2.8. Isolierung von DNA

2.8.1. Isolierung von genomischer DNA

Für die Amplifikation von DNA-Sequenzabschnitten via PCR wurde genomische DNA aus *Myxococcus xanthus* DK1622 über das Gentra[®] Puregene Yeast/Bact. Kit gereinigt. Zur Isolierung wurden 500 µl einer Flüssigkultur mit einer OD₆₀₀ von 0,8 bis 1,0 eingesetzt und nach dem Herstellerprotokoll verfahren. Die DNA wurde anschließend zum Zwecke der Aufbewahrung bei -20 °C gelagert.

2.8.2. Isolierung von Plasmid-DNA

2.8.2.1. Reinigung über Kieselgelsäulen-Kits

Zur Gewinnung von Plasmid-DNA aus *E. coli*-Kulturen für die anschließende Sequenzierung wurde das NucleoSpin[®] Plasmid Kit verwendet. 1 ml einer Übernachtflüssigkultur wurden hierfür als Ausgangsmaterial verwendet, nach dem Herstellerprotokoll gereinigt und die Plasmid-DNA nach Aufnahme in 25 µl des mitgelieferten Elutionspuffers bei -20 °C gelagert.

2.8.2.2. Alkalische Lyse

Aus einer 3 ml-Übernachtskultur von *E. coli* wurden die Zellen durch Zentrifugation für 1 min bei 13000 rpm gewonnen und in 250 µl AL1-Puffer resuspendiert. 250 µl AL2-Puffer wurden hinzugegeben, invertiert und der Ansatz zur Zelllyse und Denaturierung genomischer DNA bei Raumtemperatur für 1 - 5 min inkubiert. Nach Neutralisation durch Zusatz von 350 µl AL3-Puffer, wurden gefällte Proteinen und Zellfragmente bei 13 000 rpm für 10 min abgetrennt und der Überstand in ein neues 1,5 ml-Eppendorf-Gefäß

überführt. 600 µl Isopropanol 100 % wurden hinzupipettiert und die darüber gefällte Plasmid-DNA für 10 min bei 13 000 rpm abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit 800 µl eiskaltem Ethanol 70 % (v/v in H₂O) gewaschen, erneut zentrifugiert (13 000 rpm für 5 min) und an der Luft getrocknet. Die in 30 - 50 µl Reinstwasser aufgenommene Plasmid-DNA wurde bei -20 °C für die weitere Verwendung gelagert.

2.9. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Amplifikation von DNA-Abschnitten über die Polymerase-Kettenreaktion wurde die Phusion[®] High-Fidelity DNA-Polymerase verwendet und ein Reaktionsansatz in 0,2 ml-Reaktionsgefäßen entsprechend Tabelle 2-15 hergestellt.

Bestandteil	Volumen
5x Phusion HF Puffer	5 µl
dNTPs (10 mM)	0,5 µl
Primer 1 und 2 (12,5 pmol/µl)	0,8 µl
DNA aus 2.8.1.	1 µl
DMSO	1 µl
Phusion Polymerase	0,1 µl
steriles Reinstwasser	ad 25 µl

Tabelle 2-15: Reaktionsansatz für die PCR.

Die temperaturkontrollierte Reaktion wurde in einem Thermocycler nach einer festgelegten Amplifikationssequenz durchgeführt. Gefolgt von einer initialen Denaturierung von 2 min bei 98 °C wurden 30 Zyklen nach Tabelle 2-16 vollzogen. Hiernach schloss zur Komplettierung unvollständiger Amplifikate ein Extensionsschritt von 1 min bei 72 °C an. Für die TOPO-TA-Klonierung wurde nach Abschluss des Programms zur Erzeugung von 3'-Desoxyadenosin-Überhängen zu jedem Reaktionsansatz 0,1 µl *Taq* DNA-Polymerase gegeben und für 10 min bei 72 °C inkubiert. Alle erhaltenen PCR-Produkte wurden durch Agarosegelelektrophorese analysiert und gereinigt.

Polymerase-Kettenreaktion

Denaturierung	98 °C	30 s
Annealing	variabel	30 s
Extension	72 °C	30 s/kbp

Tabelle 2-16: Temperaturprogramm eines PCR-Zyklus. Denaturierung: Trennung der DNA-Doppelhelix, Annealing: Anlagerung der Primer an komplementäre Sequenzen, Extension: Synthese.

Die Annealing-Temperatur der verwendeten Primer wurde berechnet nach:

$$T [^{\circ}\text{C}] = 69,3 + 0,41 \times \% \text{ GC} - 650/n$$

n: Anzahl der Basenpaare des Primers

% GC: Gehalt an den Nukleotiden G und C in Prozent

2.10. Enzymatische Manipulation von DNA

2.10.1. Hydrolyse mit Restriktionsendonukleasen

In einem 1,5 ml-Eppendorf-Gefäß wurden zu 7,5 µl DNA 0,5 - 1 µl (5 - 10 U) der jeweiligen Restriktionsendonuklease Typ II und 1,5 bzw. 3 µl Reaktionspuffer (nach Herstellerprotokoll) zugegeben und mit sterilem Reinstwasser zu 15 µl ergänzt. Nach Inkubation bei 37 °C für 2 Stunden bzw. über Nacht wurden die Enzyme für 5 min bei 95 °C inaktiviert und der Ansatz über Agarosegelelektrophorese gereinigt.

2.10.2. Ligation

Zur Ligation von DNA-Fragmenten in linearisierte Vektoren wurden 3 µl Vektor, 5 µl DNA, 1,5 µl Ligasepuffer mit 1 µl (1 U) T4-DNA-Ligase versetzt und mit sterilem Reinstwasser zu 15 µl ergänzt. Der Ansatz wurde über Nacht bei 16 °C inkubiert und auf 65 °C für 5 min zur Enzyminaktivierung erhitzt.

2.10.3. TOPO TA-Klonierung

Das TOPO TA Cloning[®] Kit ermöglicht die direkte Insertion von über die *Taq* DNA-Polymerase erzeugten PCR-Produkten in den mitgelieferten, linearisierten pCR[®] 2.1-TOPO[®]-Vektor. Die Reaktion wurde nach Herstellerprotokoll durchgeführt und der Klonierungsansatz anschließend in *E. coli* DH10B transformiert.

2.11. Trennung und Aufreinigung von DNA

2.11.1. Agarosegelelektrophorese

Die Methode der Agarosegelelektrophorese wurde zur Trennung von DNA-Fragmenten bis zu einer Fragmentgröße von ca. 10 kbp hinzugezogen. Hierzu wurde ein 0,8 %-Agarosegel durch Aufkochen von Agarose in TAE-Puffer hergestellt (handelsübliche Mikrowelle) und in einen Gelschlitten gegossen. Im noch flüssigen Zustand wurde 1 %ige Ethidiumbromidlösung ergänzt und homogenisiert (Endkonzentration ca. 0,2 µg/ml). Ein Probenkamm wurde aufgesetzt und das Gel erstarren gelassen. Anschließend wurde dieses im Gelschlitten in die Elektrophoreseapparatur eingesetzt, mit TAE-Puffer vollständig bedeckt und der Probenkamm entfernt.

Die DNA-Probe wurde mit DNA-Ladepuffer bis zu einer Konzentration von 1/6 des Endvolumens versetzt und die Probe in die Geltasche hineinpipettiert. Zur Größenbestimmung wurde ein DNA-Größenstandard mit aufgetrennt. Die Elektrophorese wurde bei 5 - 10 V/cm Gellänge durchgeführt. Nach Beendigung erfolgte die Detektion der Gelbanden bei 312 nm mit einem Transilluminator und nachgeschalteter Bilddokumentation.

2.11.2. Extraktion von Agarosegelen

Aus dem entsprechenden Agarose-Gel wurden die gewünschten Banden mit einem Skalpell ausgeschnitten und die DNA mit dem NucleoSpin[®] Gel and PCR Clean-up Kit entsprechend des beiliegenden Herstellerprotokolls aus der Agarosematrix extrahiert. Die Proben wurden jeweils mit 25 µl Elutionspuffer von der Kieselgelelektrophorese eluiert.

2.12. Sequenzierung von DNA

Klonierte Gene, die zur heterologen Expression von Proteinen angedacht waren, wurden durch Sequenzierung auf die korrekte Basenabfolge ihrer amplifizierten DNA-Sequenzen hin untersucht. Diese Sequenzierung wurde extern durch die Firma Seq-IT GmbH & Co.KG, Kaiserslautern durchgeführt. Hierzu wurden 1 µg des klonierten Expressionsvektors und jeweils 20 µl der Sequenzierprimer (12,5 pmol/µl) zur Verfügung gestellt.

2.13. Transformation

Die Überführung von Plasmid-DNA in *E. coli*- bzw. Myxobakterienzellen wurde durch das Verfahren der Elektroporation verwirklicht.

2.13.1. Transformation von *E. coli*

2.13.1.1. Herstellung elektrokompenter Zellen von *E. coli* DH10B

Aus einer Übernachtflüssigkultur von *E. coli* DH10B in LB-Medium wurde eine 250 ml-Kultur (LB-Medium) angeimpft. Bei einer OD₆₀₀ von 0,7 wurden die Zellen durch Zentrifugation (10 min, 6000 rpm, 4 °C) geerntet und mit 200 ml eiskaltem Glycerin 10 % (v/v in H₂O) gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation unter gleichen Bedingungen wurde der Waschschrift mit 20 ml eiskaltem Glycerin 10 % (v/v in H₂O) wiederholt und die Zellen in 2,5 ml eiskaltem Glycerin 10 % (v/v in H₂O) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in auf Eis gekühlte 1,5 ml-Eppendorf-Gefäße zu 50 µl aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

2.13.1.2. Herstellung elektrokompenter Zellen von *E. coli* Rosetta 2(DE3)pLysS

Für einen Elektroporationsansatz wurden 3 ml einer Übernachtflüssigkultur von *E. coli* Rosetta 2(DE3)pLysS in LB-Medium mit Chloramphenicol (34 µg/ml) für 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert und das Zellpellet zweimal mit jeweils 10 ml eiskaltem, sterilem

Reinstwasser gewaschen. Die Zellen wurden anschließend in 50 µl des Reinstwassers resuspendiert und direkt der Elektroporation zugeführt.

2.13.1.3. Elektroporation

Eine 0,1 cm-Elektroporationsküvette wurde mit Ethanol 70 % (v/v in H₂O) sterilisiert, bei 55 °C getrocknet und auf Eis heruntergekühlt. Zu einem Ansatz elektrokompetenter Zellen wurden 5 µl der Plasmidpräparation aus 2.8.2. oder 2.10.2. bzw. der TOPO-TA-Klonierungsansatz aus 2.10.3. zugefügt, gemischt und in die Küvette überführt. Die Elektroporation wurde bei einer Spannung von 0,65 kV, einer Kapazität von 25 µF und einem Widerstand von 400 Ω durchgeführt. Nach der Impulsgabe wurden die Zellen sofort in 1 ml LB-Medium aufgenommen und zur phänotypischen Expression in einem 1,5 ml-Eppendorf-Gefäß bei 37 °C und 1050 rpm für eine Stunde auf einem Thermomixer kultiviert.

2.13.1.4. Selektion der Transformanten

Die Selektion der nach Elektroporation erhaltenen Transformanten erfolgte nach der durch die Plasmidaufnahme erlangten Antibiotikaresistenz durch Expression des entsprechenden Vektor-Resistenzgens.

Im Fall von transformierten TOPO-Vektoren wurde zusätzlich durch Blau-Weiß-Selektion selektiert. Die dafür vorbereiteten Selektionsplatten mit antibiotikahaltigem LB-Agar wurden hierfür vor dem Ausplattieren mit 20 µl X-Gal-Lösung bestrichen und oberflächlich getrocknet.

Die nach Elektroporation erhaltene 1 ml-Kultur wurde für 1 min bei 13 000 rpm zentrifugiert, 900 µl des Überstandes abgenommen und das Zellpellet in den verbleibenden 100 µl resuspendiert. Die Zellsuspension wurde mit Hilfe eines Drigalskispatels auf antibiotikahaltigen LB-Agarplatten ausplattiert und bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Einzelne Kolonien potenzieller Mutanten zur weiteren Anzucht in Flüssigkultur konnten nach 1 - 2 Tagen erkannt werden.

2.13.2. Transformation von *Myxococcus xanthus* DK1622

2.13.2.1. Herstellung elektrokompenter Zellen

Für jeden Elektroporationsansatz wurden $1,5 \times 10^9$ Zellen einer Flüssigkultur von *M. xanthus* DK1622 mit einer OD_{600} von 0,5 bis 1,0 bei 8000 rpm und 4 °C für 10 min abzentrifugiert und mit 20 ml eiskaltem, sterilem Reinstwasser gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Zellpellet in 40 µl des Reinstwassers aufgenommen und unmittelbar für die Elektroporation eingesetzt.

2.13.2.2. Elektroporation

Zu einem Elektroporationsansatz wurden 2 - 10 µl der Plasmidpräparation aus 2.8.2. zugefügt, der Ansatz gemischt und in die wie in Abschnitt 2.13.1.3. vorbereitete Küvette überführt. Der Transformationsschritt erfolgte bei 0,65 kV, 25 µF und 400 Ω. Direkt im Anschluss wurden die Zellen in 1 ml CTT-Medium aufgenommen und zur phänotypischen Expression in einem 1,5 ml-Eppendorf-Gefäß bei 30 °C und 1050 rpm für 5 - 8 Stunden auf einem Thermomixer kultiviert.

2.13.2.3. Selektion der Transformanten

Die Selektion der Transformanten erfolgte durch Antibiotikaresistenz. Die aus dem Elektroporationsschritt resultierende 1 ml-Kultur wurde mit 3 ml antibiotikahaltigem CTT-Softagar gevortext, daraufhin zu gleichen Teilen auf die Oberfläche zweier antibiotikahaltiger CTT-Agarplatten gegossen und durch Schwenken verteilt. Nach Erstarren der Softagarschicht, wurden die Platten bei 30 °C im Brutschrank inkubiert. Einzelne Kolonien potenzieller Mutanten zur weiteren Anzucht in Flüssigkultur waren nach 7 - 14 Tagen zu erwarten.

2.14. Heterologe Expression

Ausgewählte Methyltransferasen aus *M. xanthus* DK1622 wurden in *E. coli* Rosetta 2(DE3)pLysS heterolog mit N-terminalen His₆-Tag exprimiert. Dazu wurden die relevanten Gene jeweils in den Expressionsvektor pET28b(+) kloniert und nach Überprüfung durch Sequenzierung in *E. coli* Rosetta 2(DE3)pLysS transformiert.

2.14.1. Kultivierung und Gewinnung der Proteinextrakte

Eine Übernachtflüssigkultur eines wie oben beschrieben erzeugten Expressionsstammes wurde durch Inokkulation einer einzelnen Kolonie bei 37 °C und 200 rpm in LB-Medium mit Chloramphenicol (34 µg/ml) und Kanamycin (50 µg/ml) erhalten. Die Kultur wurde im Verhältnis 1:50 in ebenfalls antibiotikahaltiges LB-Medium überimpft und bis zu einer OD₆₀₀ = 0,6 - 0,8 bei 30 °C und 200 rpm kultiviert. Die Induktion der Expression des Zielproteins erfolgte durch Zusatz einer 1M IPTG-Lösung bis zu einer 0,05 / 0,2 millimolaren Konzentration und wurde über Nacht bei 16 °C resp. 30 °C und 200 rpm fortgeführt.

Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 6000 rpm und 4 °C geerntet und nach Resuspension in 10 - 15 ml Zellyse-Puffer in einer French Press bei 750 psi lysiert. Mit dem Zeitpunkt der Zellyse wurden alle nachfolgenden Arbeitsschritte auf Eis oder bei 4 °C durchgeführt.

Das gewonnene Lysat wurde für 20 min bei 21 000 rpm und 4 °C zentrifugiert und der Überstand zur Beurteilung des Expressionserfolgs über eine SDS-PAGE mit nachfolgender MALDI-TOF-MS-Analyse sowie zur Aktivitätstestung und gegebenenfalls Aufreinigung des Proteins weiter verwendet.

2.14.2. Proteinaufreinigung

Die Reinigung des heterolog exprimierten Proteins erfolgte auf dem ÄKTApurifier-FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatography*)-System über Nickelionen-Affinitätschromatographie. Der gewonnene Proteinextrakt wurde mit Hilfe eines Amicon[®] Ultra-15 3K-Zentrifugationsfilters auf 5 ml konzentriert, über einem 0,22 µm-Membranfilter filtriert

und auf eine HisTrap[™] HP 1 ml-Säule geladen. Die chromatographische Trennung wurde bei einer Flussrate von 1 ml/min mit einem in Tabelle 2-17 beschriebenen Stufengradienten in 10 ml-Fractionen vollzogen. Anschließend wurden die Fractionen über SDS-PAGE analysiert.

Mobile Phase	
Eluent A	Bindepuffer
Eluent B	Elutionspuffer
Gradient	
0 – 50 min	0 % B
60 – 70 min	10 % B
70 – 80 min	18 % B
80 – 90 min	39 % B
90 – 100 min	59 % B
100 – 110 min	100 % B

Tabelle 2-17: Gradient für die Proteinaufreinigung.

Die das isolierte Protein enthaltende Fraction wurde mit einem Amicon[®] Ultra-15 3K-Zentrifugationsfilter auf 1 ml konzentriert und dabei mit Reaktionspuffer umgepuffert.

2.14.3. Abspaltung des His₆-Tags

Die Abspaltung des His₆-Tags wurde mit Hilfe des Novagen[®] Thrombin Cleavage Capture Kits durchgeführt und nach Herstellerprotokoll verfahren. Anschließend wurde das Protein in Reaktionspuffer/Glycerin 50:50 (v/v) bei -22 °C gelagert.

2.15. Proteinanalytik

2.15.1. Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die Proteinkonzentration gelöster Proben wurde mit Hilfe des Bio-Rad Protein Assay Kits entsprechend des Herstellerprotokolls durchgeführt. Nach Zugabe der fertigen Coomassie Brilliant Blue G250-Lösung zu der jeweiligen Probe erfolgte die Messung unter

Verwendung eines UV-Spektrophotometers bei 595 nm gegen eine Rinderserumalbumin-Standardreihe in einem Konzentrationsbereich von 0,2 - 8 µg/ml.

2.15.2. SDS-PAGE

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde zur Analyse von Proteingemischen eingesetzt. Das Polyacrylamidgel bestand aus zwei zusammenhängenden Gelteilen unterschiedlicher Acrylamidkonzentrationen, dem Sammelgel zur Konzentrierung der Proteinfractionen und dem Trenngel (Tabelle 2-18). Zunächst wurden die Bestandteile des Trenngels gemischt und sofort zwischen zwei mit einer Gummidichtung versehene, eingespannte Glasplatten der Elektrophoreseapparatur gegossen. Hieraus ergab sich ein ca. 10 cm breites und 6 cm hohes Trenngel. Bis zur vollständigen Polymerisation wurde, um Verdunstung vorzubeugen, mit 1 ml Isopropanol überschichtet und dieser anschließend wieder entfernt. Auf das Trenngel wurde die frisch bereitete Mischung des Sammelgels 2 cm hoch geschichtet und ein Probenkamm mit 1 cm Taschenbreite eingesteckt. Nach Aushärtung wurde der Probenkamm wieder entfernt und das fertige Gel mit SDS-PAGE-Laufpuffer überschichtet. Mit dem gleichen Puffer wurden die beiden Elektrodenkammern befüllt.

Sammelgel (5 % Acrylamid)		Trenngel (12 % Acrylamid)	
30 % Acrylamidmix	500 µl	30 % Acrylamidmix	6,0 ml
Reinstwasser	2,1 ml	Reinstwasser	4,9 ml
1 M Tris pH 6,8	380 µl	1,5 M Tris pH 8,8	3,8 ml
10 % SDS	30 µl	10 % SDS	150 µl
10 % APS	30 µl	10 % APS	180 µl
TEMED	3 µl	TEMED	8 µl

Tabelle 2-18: Zusammensetzung von Polyacrylamidgelen.

Zur Denaturierung der Probe wurden 10 - 20 µg gelöstes Protein im einem Verhältnis von 3:1 mit SDS-PAGE-Probenpuffer gemischt und für 5 min auf 95 °C erhitzt. Anschließend wurde die Probe sofort auf Eis gekühlt. In die Geltaschen wurden jeweils die gesamte, denaturierte Probe und 7,5 µl Proteinstandard aufgetragen. Die elektrophoretische

Trennung erfolgte daraufhin bei 90 V im Sammelgel und 140 V im Trenngel. Daraufhin wurde das Sammelgel entfernt und das Trenngel gründlich mit Reinstwasser gewaschen. Zur visuellen Detektion der Proteinbanden wurden diese mit Coomassieblau angefärbt. Dazu wurde das Trenngel in kolloidale Coomassieblau-Färbelösung gegeben, einmalig in einem handelsüblichen Mikrowellengerät auf ca. 50 °C erwärmt und über Nacht im Färbebad geschwenkt. Am nächsten Tag wurde das Gel in Reinstwasser so lange entfärbt bis deutlich sichtbare Proteinbanden zu erkennen waren.

2.15.3. MALDI-TOF-MS

Zur Identifizierung von Proteinen nach SDS-PAGE wurde eine MALDI-TOF-MS-Analyse durchgeführt.

Banden aus den entsprechenden Polyacrylamidgelen wurden ausgeschnitten und mit 1 ml Reinstwasser gewaschen. 100 µl frisch bereitete 40 mM Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung wurden auf das Gelstück gegeben, für ca. 10 min geschüttelt und wieder entfernt. Die Entfärbung erfolgte in 500 µl einer 1:1-Mischung von 40 mM Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung und Acetonitril durch Schütteln bei 37 °C. Die Entfärbelösung wurde dabei mehrmals ausgetauscht. Nach vollständiger Entfärbung wurde das Gelstück für ca. 10 min in 500 µl Acetonitril inkubiert und an der Luft getrocknet.

Zum Proteinverdau wurden 20 µl Trypsin (25 ng/ml in 40 mM Ammoniumhydrogencarbonat) und 20 µl 40 mM Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung zupipettiert und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Trifluoressigsäure wurde bis zu einer Konzentration von 0,1 % (v/v) ergänzt und die Probe über ZipTips® C18 und 50 % Acetonitril mit 0,1 % Trifluoressigsäure (v/v in H₂O) entsalzt und konzentriert. 1 µl der Probelösung wurde mit 0,5 µl α-Cyano-4-hydroxy-zimtsäure-Lösung [5 mg/ml in 50 % Acetonitril mit 0,1 % Trifluoressigsäure (v/v in H₂O)] und auf eine 384-well-MALDI-Probenplatte aufgetragen. Ein 4800 MALDI TOF/TOF™ Analyzer wurde zur Messung verwendet und von jeder Probe im Reflektor- und positiven Ionenmodus der PMF (peptide mass fingerprint) und PFF (peptide fragment fingerprint) ermittelt. Über eine MASCOT-Datenbanksuche gegen ausgewählte Proteinsequenzen erfolgte die Identifizierung der in der betreffenden Probe enthaltenen Proteine.

2.16. *In silico*-Analyse von DNA-Sequenzen und Proteinsequenzen

Sequenzdaten von DNA bzw. Proteinen wurden mit dem Programm *Geneious Pro* (Biomatters Ltd., Auckland, Neuseeland) ausgewertet. Desweiteren wurden folgende über das Internet frei verfügbare Applikationen und Programme eingesetzt:

<i>BLAST</i>	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/
<i>ClustalW</i>	http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/
<i>FramePlot</i>	http://www0.nih.go.jp/~jun/cgi-bin/frameplot.pl
<i>Pfam</i>	http://pfam.sanger.ac.uk/

2.17. Identifizierung und Charakterisierung der Myxochelin-O-Methyltransferase

2.17.1. Kultivierung und Gewinnung des Rohextraktes

Myxococcus xanthus DK1622 wurde in 5 x 1 L CTT-Medium für vier Tage bei 30 °C und 180 rpm im Erlenmeyer-Kulturkolben kultiviert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation für 10 min bei 6000 rpm geerntet und in 300 ml Zellyse-Puffer resuspendiert. Nach einer Ultraschallbehandlung für 3 min unter Eiskühlung und Zentrifugation des Zellaufschlusses für 20 min bei 21 000 rpm wurde der Überstand als Rohextrakt verwendet.

2.17.2. Aktivitätsbasierte Aufreinigung des nativen Proteins

2.17.2.1. Ammoniumsulfat-Fällung

Der Rohextrakt wurde in einem 500 ml Erlenmeyerkolben langsam unter Vermeidung von Schaumbildung bei 4 °C gerührt und fein gemörseretes Ammoniumsulfat schrittweise innerhalb von 30 min bis zu einer Sättigungskonzentration von 35 % hinzugegeben. Die auftretende Fällung wurde durch Zentrifugation bei 21 000 rpm für 10 min abgetrennt und in 20 - 50 ml T-Puffer gelöst.

Mit dem Überstand wurde die Fällung in gleicher Weise bis zu Sättigungskonzentrationen von 45 %, 55 % und 70 % fortgeführt und die Präzipitate entsprechend in T-Puffer gelöst.

2.17.2.2. Chromatographische Trennung

Die chromatographische Auftrennung von Proteinen erfolgte mit dem ÄKTApurifizier-FPLC-System. Alle nachfolgend beschriebenen Arbeitsschritte wurden bei 4 °C durchgeführt.

Gelfiltration

Die aktive Fraktion aus der Ammoniumsulfat-Fällung wurde schrittweise mittels Gelfiltration auf einer Superdex™ 75-Säule (5 cm x 40 cm) isokratisch bei einer Flussrate von 1 ml/min (20 mM Tris, 154 mM NaCl, pH 7,5) in 10 ml-Fractionen getrennt. Diejenigen Fractionen, die Methylierungsaktivität gegenüber Myxochelin A zeigten, wurden vereinigt und über einen Amicon® Ultra-15 3K-Zentrifugationsfilter aufkonzentriert.

Hydrophobe Interaktionschromatographie

Die gewonnene Probe nach Gelfiltration wurde mit Ammoniumsulfat auf eine Konzentration von 1,5 mol/L eingestellt und auf einer HiTrap™ Butyl HP 1 ml-Säule bei 1 ml/min fraktioniert. Es wurde der in Tabelle 2-19 gezeigte Gradient verwendet. Die aktiven Fractionen wurden vereinigt und mit einem Amicon® Ultra-15 3K-Zentrifugationsfilter aufkonzentriert.

Mobile Phase	
Eluent A	1,5 M Ammoniumsulfat, 50 mM Natriumdihydrogenphosphat pH 7,0
Eluent B	50 mM Natriumdihydrogenphosphat pH 7,0
Gradient	
0 min – 12 min	0 % B
12 min – 32 min	0 % - 100 % B
32 min – 44 min	100 % B

Tabelle 2-19: Gradient für die Hydrophobe Interaktionschromatographie.

Affinitätschromatographie

Der hier beschriebene Reinigungsschritt erfolgte auf Basis der Bindung SAM-abhängiger Methyltransferasen an Trennphasen mit fixierten Adenosinen und anschließender Elution mit SAM. Hierzu wurde eine Adenosin-Agarose-Säule leicht abgewandelt zu einem in der Literatur beschriebenen Verfahren hergestellt²³⁰.

5 ml 5'-Adenosinmonophosphat-Agarose wurde in bidestilliertem Wasser für eine Stunde bei Raumtemperatur hydratisiert und in eine 30 ml-Chromabond® Polypropylen-Leersäule mit PE-Filterelement überführt. Das Gelbett wurde mit 10 x 5 ml 0,5 M Natriumchlorid-Lösung und 10 x 5 ml bidestilliertem Wasser gewaschen und anschließend mit 25 ml SAP (*Shrimp Alkaline Phosphatase*)-Reaktionspuffer äquilibriert. Zur Dephosphorylierung der 5'-Adenosin-Monophosphatgruppen wurde nach Zugabe von 1000 U SAP über Nacht bei 30 °C unter leichtem Schütteln inkubiert. Das Agarosegel wurde in eine Kronlab 5 x 250 mm ECOplus-Glassäule und mit 100 ml 0,5 M Natriumchlorid-Lösung und 100 ml bidestilliertem Wasser gewaschen. Die nach Abschluss der Sedimentation erhaltene, gepackte Säule wurde zur Auftrennung der Fraktion nach Hydrophober Interaktionschromatographie eingesetzt.

Zunächst erfolgte eine Äquilibrierung mit 50 ml Puffer A (100 mM Tris, 50 mM MeS, 50 mM Essigsäure, 0,2 M NaCl, pH 7,2). Im Anschluss wurde die Chromatographie mit einem Zweistufengradient aus 25 ml Puffer A und nachfolgend 25 ml Puffer B (Puffer A mit 1 mM SAM) durchgeführt. Alle aktiven Fraktionen wurden zusammengeführt, wie im vorwiegenden Abschnitt beschrieben aufkonzentriert und in einer Analyse über SDS-PAGE und MALDI-TOF-MS weiterverfolgt.

2.17.3. Methyltransferase-Assay mit Myxochelin A

Der Methyltransferase-Assay diente der Überprüfung der bei der Aufreinigung und heterologen Expression anfallenden Proteinfractionen auf Methylierungsaktivität gegenüber Myxochelin A und des damit verbundenen Vorhandenseins der gesuchten Methyltransferase. Für nachfolgende Zwecke ausreichende Mengen Myxochelin A und Methylmyxochelin A wurden von Sabine Wilbrand am Lehrstuhl für Anorganische Chemie, Universität des Saarlandes synthetisiert.

Für die Testung wurden 20 µg Protein jeder Fraktion zu einer Mischung aus 0,5 µl 8 mM SAM, 0,5 µl 4 mM Myxochelin A in 100 µl Reaktionspuffer pH 7,6 gegeben und für 18 Stunden bei 30 °C inkubiert. Die Reaktion wurde mit 50 µl Eisessig gestoppt und die Probe zweimal mit 500 µl Ethylacetat extrahiert und der Extrakt getrocknet. Nach Aufnahme in 250 µl Methanol erfolgte die Analyse über Methode A, Gradient I (vgl. 2.20.1.).

2.17.4. Methyltransferase-Assay mit Myxochelin B

Für den Assay wurde Myxochelin B verwendet, welches während Isolierungsversuchen von Methylmyxochelin B gereinigt erhalten werden konnte und in Reaktionspuffer gelöst wurde²¹⁰.

Zur Testung von Proteinfractionen wurden 100 µl der Fraktion mit 2 µl 8 mM SAM, 4 µl 2 mM Myxochelin B in 400 µl Reaktionspuffer pH 7,6 für 18 Stunden bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurden 50 µl Eisessig hinzugegeben und die Probe mit 500 µl Ethylacetat extrahiert. Der Extrakt wurde getrocknet und nach Aufnahme in 250 µl Methanol über Methode A, Gradient I (vgl. 2.20.1.) analysiert.

Zur Testung des gereinigten, heterolog exprimierten Enzyms wurden 1 µg des Enzyms zusammen mit 1 mM SAM, 200 µM Myxochelin B in 100 µl Reaktionspuffer für 18 Stunden bei 30 °C inkubiert. Die Reaktion wurde mit 5 µl Ameisensäure gestoppt, 95 µl Methanol ergänzt und die Probe nach Zentrifugation über Methode A, Gradient II analysiert.

2.17.5. Enzymkinetik

Zur Bestimmung der kinetischen Parameter der Methyltransferase wurden 1 µg des Enzyms bei 30 °C zusammen mit 25 µM, 50 µM, 100 µM, 300 µM, 500 µM, 1000 µM Myxochelin A und 2 mM SAM in 200 µl Reaktionspuffer pH 7,5 für 10 min und 20 min jeweils in Triplikaten inkubiert. Die Reaktion wurde mit 5 µl Ameisensäure gestoppt, die Proben mit Methanol verdünnt und zentrifugiert. Die Quantifizierung erfolgte gegen eine Methylmyxochelin A-Eichreihe (1 nM, 5 nM, 10 nM, 25 nM, 100 nM) durch Integration der Peakflächen von Methylmyxochelin A im MS²-Modus einer LC-MS-Analyse über

Methode A, Gradient III (vgl. 2.20.1.). Die Parameter wurden mit dem Programm *SigmaPlot 11, Enzyme Kinetics 1.3* (Fa. Systat Software) berechnet.

2.18. Produktionsanalysen

2.18.1. Bestimmung der Methylmyxochelin A-Produktion von Wildtyp und Mutanten

Triplikate von *Myxococcus xanthus* DK1622 und davon abgeleitete Mutanten wurden in 50 ml CTT-Medium (ggf. antibiotikahaltig) mit 1 % XAD-16 (v/v) bei 30 °C auf Schüttelinkubatoren bis zu einer OD₆₀₀ von 1,2 kultiviert. Zellen und XAD-16 wurden mit 5 ml Ethylacetat und zweimal mit 20 ml Methanol extrahiert. Die vereinigten Extrakte wurden im Vakuum getrocknet, in 1000 µl Methanol aufgenommen und über Methode A, Gradient III (vgl. 2.20.1.) analysiert. Zur relativen Quantifizierung von Sekundärmetaboliten wurde die Fragmentionen repräsentierende Peakfläche der betreffenden selektiv fragmentierten Spezies im MS²-Modus integriert und zur Vergleichsanalyse ins Verhältnis gesetzt.

2.18.2. Bestimmung der Methylmyxochelin A / Myxochelin A - Produktionsverhältnisse in Zellen und Medium

Triplikate von *Myxococcus xanthus* DK1622 wurden in 50 ml CTT-Medium mit 1 % XAD-16 (v/v) bei 30 °C auf Schüttelinkubatoren bis zu einer OD₆₀₀ von 1,4 kultiviert. Zellen und XAD-16 wurden durch Sieben getrennt und mit 5 ml Aceton und zweimal mit 25 ml Methanol extrahiert. Die Extrakte wurden im Vakuum getrocknet, in 1000 µl Methanol aufgenommen und über LC-MS wie in 2.18.1. beschrieben analysiert und quantifiziert.

2.18.3. Bestimmung der Produktion von Myxochelinen und Methylmyxochelinen unter Eisenmangel

Triplikate von *Myxococcus xanthus* DK1622 wurden jeweils in 25 ml CTT-Medium und 25 ml CTT Fe low-Medium zusammen mit 1 % XAD-16 (v/v) bei 30 °C auf Schüttelinkubatoren bis zu einer OD₆₀₀ von 1,6 - 1,9 kultiviert. Zur Herstellung des

Eisenmangelmediums CTT Fe low wurde CTT-Medium mit Chelex[®] 100 (5 g/L) über Nacht geschüttelt und das Adsorberharz anschließend abfiltriert. Zellen und XAD-16 wurden mit 10 ml Aceton und zweimal mit 20 ml Methanol extrahiert. Die Extrakte wurden im Vakuum getrocknet, in 1000 µl Methanol aufgenommen und über Methode A, Gradient II analysiert und entsprechend 2.18.1. quantifiziert.

2.19. Isolierung von Sekundärmetaboliten

2.19.1. Isolierungsmethoden

Für die Isolierung von Sekundärmetaboliten wurden destilliertes Methanol und Acetonitril (hergestellt aus Lösungsmitteln in p.a.-Qualität) sowie bidestilliertes Wasser (hergestellt aus Reinstwasser) verwendet. Das Fortschreiten der Reinigungsprozesse wurde durch Probenzug nach einzelnen Isolierungsstufen und Analyse über Methode A, Gradient I und Methode B (vgl. 2.20.1.) kontrolliert.

Methode I: Größenausschlusschromatographie

Stationäre Phasen zur Größenausschlusschromatographie wurden hergestellt durch Quellen von Sephadex[™] LH20 im betreffenden Eluenten, Überführen in Glas-Chromatographiesäulen mit Fritte und Sedimentation der Phase über Nacht. Die Trennung erfolgte isokratisch mit den in Tabelle 2-20 angegebenen Trennsystemen bei einer Flussrate von 0,5 ml/min.

	<i>Trennsystem I</i>	<i>Trennsystem II</i>
Säule	Sephadex LH20, 200 x 2,5 cm	Sephadex LH20, 50 x 1,5 cm
Eluent	Methanol 50 % (v/v in Wasser)	Methanol

Tabelle 2-20: Trennsysteme für die Größenausschlusschromatographie.

Methode II: Flash-Chromatographie

Zur Flash-Chromatographie wurde eine Kieselgelsäule (60 x 4 cm) mit Kieselgel 60 in n-Hexan gepackt und mit den aufgeführten Gradienten verwendet (Tabellen 2-21 und 2-22).

Gradient I

Fraktionsnummer	Eluent	Volumen
1-2	<i>Hexan</i>	
3-4	<i>Chloroform</i>	
5	<i>Chloroform / Methanol 9 : 1</i>	
6	<i>Chloroform / Methanol 8 : 2</i>	
7	<i>Chloroform / Methanol 7 : 3</i>	
8	<i>Chloroform / Methanol 6 : 4</i>	je 200 ml
9	<i>Chloroform / Methanol 1 : 1</i>	
10	<i>Chloroform / Methanol 4 : 6</i>	
11	<i>Chloroform / Methanol 3 : 7</i>	
12	<i>Chloroform / Methanol 2 : 8</i>	
13-22	<i>Methanol</i>	
23	<i>Methanol</i>	je 400 ml
24-25	<i>Methanol / Wasser 1 : 1</i>	

Tabelle 2-21: Gradient I für die Flash-Chromatographie.

Gradient II

Fraktionsnummer	Eluent	Volumen
1	<i>Hexan</i>	
2	<i>Hexan /Chloroform 1:1</i>	
3	<i>Chloroform</i>	
4	<i>Chloroform /Methanol 9 : 1</i>	
5	<i>Chloroform / Methanol 8 : 2</i>	
6	<i>Chloroform / Methanol 7 : 3</i>	
7	<i>Chloroform / Methanol 6 : 4</i>	je 400 ml
8	<i>Chloroform / Methanol 1 : 1</i>	
9	<i>Chloroform / Methanol 4 : 6</i>	
10	<i>Chloroform / Methanol 3 : 7</i>	
11	<i>Chloroform / Methanol 2 : 8</i>	
12	<i>Chloroform/ Methanol 1 : 9</i>	
13-21	<i>Methanol</i>	

Tabelle 2-22: Gradient II für die Flash-Chromatographie.

Methode III: Präparative HPLC-MS

Die Isolierung von Sekundärmetaboliten via präparativer HPLC-MS wurde mit einer Waters XBridge® Prep C18 OBD 5 µm, 19 x 150 mm-Säule bei einer Flussrate von 25 ml/min auf dem Waters AutoPurification System realisiert. Hierzu wurden die in den Tabellen 2-23 bis 2-27 aufgeführten Gradienten eingesetzt.

Mobile Phase		Eluent A : Wasser mit 0,1 % Ameisensäure				Eluent B : Methanol mit 0,1 % Ameisensäure	
Gradient I		Gradient II		Gradient III			
min	% B	min	% B	min	% B		
0 - 4	15	0 - 4	50	0 - 4	40		
4 - 19	15 - 95	4 - 14	50 - 95	4 - 18	40 - 95		
19 - 23	95	14 - 17	95	18 - 21	95		

Tabelle 2-23: Methanolische Gradienten für die präparative HPLC.

Mobile Phase		Eluent A : 5 mM Ammoniumhydrogencarbonat pH 9,4				Eluent B : 95 % Methanol / 5 % 5 mM Ammoniumhydrogencarbonat pH 9,4	
Gradient IV		Gradient V		Gradient VI			
min	% B	min	% B	min	% B		
0 - 3	25	0 - 3	65	0 - 4	40		
3 - 10	25 - 50	3 - 15	65 - 70	4 - 18	40 - 95		
10 - 10,5	50 - 95	15 - 15,5	70 - 95	18 - 21	95		
10,5 - 12	95	15,5 - 17	95				

Tabelle 2-24: Basische Methanol-Gradienten für die präparative HPLC - Teil 1.

Mobile Phase		Eluent A : 5 mM Ammoniumhydrogencarbonat pH 9,4				Eluent B : 95 % Methanol / 5 % 5 mM Ammoniumhydrogencarbonat pH 9,4	
Gradient VII		Gradient VIII		Gradient IX		Gradient X	
min	% B	min	% B	min	% B	min	% B
0 - 4	40	0 - 3	10 - 55	0 - 3	10 - 62	0 - 3	10 - 55
4 - 16	40 - 95	3 - 18	55 - 80	3 - 18	62 - 82	3 - 18	55 - 70
16 - 19	95	18 - 20	95	18 - 20	95	18 - 20	95

Tabelle 2-25: Basische Methanol-Gradienten für die präparative HPLC - Teil 2.

Mobile Phase	Eluent A : Wasser mit 0,1 % Ameisensäure				
	Eluent B : Acetonitril mit 0,1 % Ameisensäure				
Gradient XI		Gradient XII		Gradient XIII	
min	% B	min	% B	min	% B
0 - 16	10	0 - 20	22	0 - 40	23

Tabelle 2-26: Isokratische Acetonitril-Gradienten für die präparative HPLC.

Mobile Phase	Eluent A : Wasser mit 0,1 % Ameisensäure		
	Eluent B : Acetonitril mit 0,1 % Ameisensäure		
Gradient XIV		Gradient XV	
min	% B	min	% B
0 - 4	10	0 - 3	10 - 40
4 - 18	10 - 95	3 - 13	40 - 45
18 - 21	95	13 - 16	45 - 95

Tabelle 2-27: Acetonitril-Gradienten für die präparative HPLC.

2.19.2. *Jahnella thaxteri* SBSr007

2.19.2.1. Fermentation

Der Stamm *Jahnella thaxteri* SBSr007 wurde in einem 100 L-Fermenter in VY/2-Medium bei 30 °C, pH 6,9 bis 7,15 und 21 % Sauerstoff kultiviert. Die Fermentation erfolgte im Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung Braunschweig [Arbeitsgruppe Mikrobielle Wirkstoffe, Wolfgang Kessler]. Dabei wurde die OD₆₀₀ des trüben Kulturüberstands verfolgt. Diese Trübung wird hauptsächlich durch die suspendierte Hefe des VY/2-Mediums verursacht und verringert sich mit dem Wachstum der Bakterienpopulation. Die Hefezellen werden durch *Jahnella thaxteri* SBSr007 lysiert und dienen als Nährstoffquelle. Erfahrungsgemäß werden nach vollständiger Lyse der Hefezellen klare Kulturüberstände erhalten, während die Zellaggregate des Myxobakteriums in ruhender Kultur ein Sediment ausbilden.

Nach einer anfänglichen OD₆₀₀ von 3,20 wurde die Fermentation nach 186 Stunden bei einer OD₆₀₀ von 0,04 beendet und XAD-16 bis zu einer Konzentration von 2 % (v/v) zugefügt. Um die Adsorption von Medienbestandteilen, insbesondere der Hefe und deren Lyseprodukte zu vermeiden und damit die darauffolgende Isolierung nicht zu erschweren,

wurde das Harz am Ende der Kultivierung bzw. Klärung des Überstandes zugegeben und nach weiterem Rühren für 4 Stunden Zellen und XAD-16 geerntet.

2.19.2.2. Gewinnung des Extraktes und Festlegung von Zielsubstanzen

Zum Abtrennen des Adsorberharzes von den Zellaggregaten, die SBSr007 während der Kultivierung in Flüssigmedium ausbildet, wurde das Gemisch in 500 ml Reinstwasser resuspendiert und 100 g Natriumchlorid darin gelöst. Aufgrund der Dichtezunahme der Suspension schwimmt XAD-16 auf der Flüssigkeitsoberfläche auf und kann dekantiert werden, während sich die Zellaggregate am Boden des Gefäßes sammeln. Das Harz wurde über Cellulose filtriert und mit 5 L Reinstwasser salzfrei gewaschen.

Das getrocknete XAD-16 wurde anschließend mit 10 x 1 L Methanol unter Schütteln extrahiert. Die methanolischen Extrakte wurden vereinigt, nach Einengen auf ca. 1 L mit 1 L n-Heptan entfettet und im Vakuum getrocknet.

Vor Konzentration wurde ein Probe gezogen und mittels Methode A, Gradient II und Methode B (vgl. 2.20.1.) analysiert, um Zielsubstanzen für die Isolierung festzulegen. Die LC/MS-Daten der HR-MS-Analyse wurden durch Vergleich der Parameter monoisotopische Masse, Sigma-Wert und Retentionszeit mit einer internen Datenbank myxobakterieller Naturstoffe mit dem Programm *TargetAnalysis 1.2* (Bruker Daltonik GmbH, Bremen) untersucht und ausgewertet. Aus den monoisotopischen Massen ausgewählter Peaks wurden Summenformeln abgeleitet (*DataAnalysis 4.0*, Bruker Daltonik GmbH, Bremen) und für eine Suche in der öffentlichen *SciFinder*-Datenbank (*SciFinder*[®], American Chemical Society, <https://scifinder.cas.org>) herangezogen.

2.19.2.3. Isolierung der Zielsubstanzen

Der methanolische Extrakt des Adsorberharzes nach Fermentation von SBSr007 wurde säulenchromatographisch unter Verwendung von Methode I, Trennsystem I in 150 10 ml-Fractionen getrennt. Diejenigen Fractionen, die die Zielsubstanzen enthielten wurden entsprechend vereinigt, im Vakuum konzentriert und mit Methode III, Gradient I in mehreren, aufeinanderfolgenden Trennungsgängen chromatographiert. Dabei wurden jeweils eine Spezies repräsentierende Fractionen gebildet. Ebenfalls über Methode III gelang aus diesen die Isolierung von TKcpd473 mit Gradient IV und XI, von TKcpd782 mit Gradient V und XII und von TKcpd904 mit Gradient V und XIII.

2.19.3. *Chondromyces* sp. SBCm009

2.19.3.1. Fermentation

Eine einzelne Kolonie von *Chondromyces* sp. SBCm009 auf VY/2-Agar wurde in 100 ml VY/2-Medium gegeben und bei 30 °C auf einem Schüttelinkubator bei 200 rpm kultiviert bis zur Klärung des Kulturüberstands. Die sedimentierten Zellaggregate wurden in frisch bereitetes VY/2-Medium gegeben und auf diese Weise unter Erhöhung des Kulturvolumens über sechs Wochen fortgeföhren bis eine 2 L-Kultur mit ca. 200 ml Zellsediment erhalten werden konnte. Letzteres diente als Inokkulum für eine Fermentation in 8 L VY/2 bei 30 °C, pH 7,0 und 21 % Sauerstoffsättigung für insgesamt 290 Stunden. Nach 24 h wurde XAD-16 bis zu einer Konzentration 4% (v/v) zugefügt. Während der folgenden Fermentationszeit wurden tropfenweise 250 g Hefe als autoklavierte Suspension (100 g/L in VE-Wasser) zugeföhrt. Die Fermentation wurde schließlich beendet als der Überstand vollständig geklärt war.

2.19.3.2. Gewinnung des Extraktes und Festlegung von Zielsubstanzen

Das Adsorberharz wurde von den Zellen mit dem in Kapitel 2.19.2.2. beschriebenen Verfahren abgetrennt, gewaschen und getrocknet. Die Extraktion erfolgte mit 4 x 1,5 L und 3 x 1 L Methanol. Analog zu Kapitel 2.19.2.2. wurde eine Probe der vereinigten Extrakte analysiert und Zielsubstanzen für die Isolierung festgelegt. Der Gesamtextrakt wurde eingeeengt, mit 1 L n-Heptan entfettet und zur weiteren Aufarbeitung im Vakuum getrocknet.

2.19.3.3. Isolierung der Zielsubstanzen

Der nach Fermentation von SBCm009 erhaltene methonlische Extrakt des XAD-16 wurde über Methode II, Gradient I fraktioniert. Ausgewählte Fraktionen wurden konzentriert und durch aufeinanderfolgende Injektionen mittels Methode III, Gradient II aufgetrennt und die Fraktionen entsprechend der enthaltenen Zielsubstanzen vereinigt. Die Substanzen TKcpd818, TKcpd831 wurden anschließend mit Gradient VI und TKcpd832, TKcpd845 mit Gradient VII chromatographiert. Die weitere Reinigung von TKcpd832 erfolgte größenausschlusschromatographisch unter Verwendung von Methode I, Trennsystem II.

Im Anschluss daran wurden alle Substanzen in einem letzten Isolierungsschritt über Methode III, Gradient XIV gereinigt.

2.19.3.4. Kultivierung im Erlenmeyer-Kulturkolben

Zur Erhöhung der Substanzausbeuten wurde eine zweite Kultivierung von SBCm009 im Erlenmeyer-Kulturkolben durchgeführt. Hierzu wurden 100 ml VY/2-Medium mit einer einzelnen Kolonie von SBCm009 inokkuliert und bei 30 °C auf einem Schüttelinkubator bei 200 rpm kultiviert. Die Kultivierung wurde zwei Monate fortgesetzt. Nach jeder Klärung des Überstandes wurden die Zellen in frisch vorbereitetes VY/2-Medium überführt und schließlich auf vier 2 L-Erlenmeyer-Kulturkolben mit jeweils 500 ml Kulturvolumen aufgeteilt (Gesamtzellvolumen: 200 ml). Während der folgenden Kultivierung für 19 Tage wurde der geklärte Überstand nach jeder Überführung der Zellen in frisches Medium mit 300 g XAD-16 für 30 min bei 30 °C geschüttelt. Das Harz wurde anschließend mit 1 L Reinstwasser gewaschen und vor der nächsten Extraktion bei 4 °C gelagert. Insgesamt wurden 24 L Überstand extrahiert.

2.19.3.5. Gewinnung des Extraktes

Nach Extraktion des XAD-16 mit 12 x 1 L Methanol wurde der eingeengte Gesamtextrakt mit 1 L n-Heptan entfettet und im Vakuum konzentriert.

2.19.3.6. Isolierung der Zielsubstanzen

Analog zur ersten Aufarbeitung wurde der konzentrierte, methanolische Extrakt des Adsorberharzes säulenchromatographisch über Methode II, Gradient II aufgetrennt. Daraufhin erfolgte die Fraktionierung konzentrierter, die Zielsubstanzen enthaltender Fraktionen in aufeinanderfolgenden Trennungsläufen mit Methode III, Gradient III. Aus den resultierenden, entsprechend der vorhandenen Spezies vereinigten Fraktionen wurde die Isolierung von TKcpd818 mit Gradient VIII, von TKcpd832 mit Gradient IX sowie von TKcpd831 und TKcpd845 mit Gradient X realisiert.

In einem finalen Schritt wurden die isolierten Substanzen aus den Extrakten nach der Fermentation und der Kultivierung im Erlenmeyer-Kulturkolben jeweils vereinigt und über Gradient XV gereinigt.

2.20. Analytik von Sekundärmetaboliten

2.20.1. Chromatographie

Als Lösungsmittel für die Chromatographie kamen bidestilliertes Wasser (hergestellt aus Reinstwasser) und destilliertes Acetonitril (hergestellt aus Acetonitril p.a.) zum Einsatz.

Methode A: HPLC-UV/ESI-MS

Für die Analytik wurde eine Agilent 1100 series HPLC gekoppelt mit einem Bruker HCTplus-Massenspektrometer eingesetzt. Als stationäre Phase wurde eine Phenomenex Luna C18 2,5 µm, 100 x 2 mm-Säule bei einer Flussrate von 0,4 ml/min mit den nachfolgend angegebenen Gradienten verwendet (Tabelle 2-28).

Mobile Phase	Eluent A : Wasser mit 0,1 % Ameisensäure				
	Eluent B : Acetonitril mit 0,1 % Ameisensäure				
Gradient I		Gradient II		Gradient III	
0 min - 18 min	5 % - 95 % B	0 min - 26 min	5 % - 95 % B	0 min - 10 min	5 % - 50 % B
18 min - 22 min	95 % B	26 min - 30 min	95 % B	10 min - 14 min	95 % B

Tabelle 2-28: Gradienten für die HPLC-UV/ESI-MS.

Methode B: UPLC-UV/NanoESI-HR-MS

Analysen über LC-HR-MS wurden auf einer Dionex UltiMate® 3000 UPLC gekoppelt mit einem LTQ-Orbitrap™-Massenspektrometer und einer TriVersa NanoMate®-Ionenquelle durchgeführt. Die Trennung erfolgte auf einer Waters UPLC BEH C18 1,7 µm, 50 x 2,1 mm-Säule bei einer Flussrate von 0,6 ml/min mit dem Gradienten aus Tabelle 2-29.

Mobile Phase	Eluent A : Wasser mit 0,1 % Ameisensäure Eluent B : Acetonitril mit 0,1 % Ameisensäure
Gradient	
0 min - 9 min	5 % - 95 % B

Tabelle 2-29: Gradient für die UPLC-UV/NanoESI-HR-MS.

2.20.2. Kernresonanzspektroskopie (NMR)

Mit den in Methanol- d_4 bzw. Dimethylsulfoxid- d_6 gelösten Substanzen wurden zur Strukturaufklärung NMR-Spektren mit einem 700 MHz Bruker Ascend™ NMR-Spektrometer, ausgestattet mit einer Kryoplattform, aufgezeichnet. Hierbei wurden eindimensionale NMR-Experimente (^1H -NMR-Spektroskopie) und zweidimensionale NMR-Experimente wie ^1H - ^1H -COSY (*Correlation Spectroscopy*), HMBC (*Heteronuclear Multiple Bond Correlation*), HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Coherence*) und 2D-TOCSY (*Total Correlation Spectroscopy*) herangezogen. Für in DMSO- d_6 gelöste Substanzen wurde zusätzlich ein ROESY (*Rotating Frame Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy*)-Experiment durchgeführt. Die NMR-Spektren wurden mit dem Programm *Bruker TopSpin 3.1* (Bruker BioSpin GmbH, Rheinstetten) ausgewertet. Die chemischen Verschiebungen werden in ppm angegeben.

2.20.3. Hydrolyse und Konfigurationsbestimmung von Aminosäuren

Die Konfiguration von Aminosäuren wurde nach Marfey durch saure Hydrolyse des Peptids, Derivatisierung mit 1-Fluoro-2,4-dinitrophenyl-5-L-leucinamid (L-FDLA), 1-Fluoro-2,4-dinitrophenyl-5-D-leucinamid (D-FDLA) und Vergleich der ermittelten HPLC-MS-Daten mit denen eines Aminosäurestandards bestimmt²³¹⁻²³³.

Für die Analyse wurden 100 μg jeder isolierten Substanz in 800 μl 5 M Salzsäure gelöst und bei 100 °C in einem 1,5 ml-Eppendorfgefäß über Nacht hydrolysiert. Nach Vakuumtrocknung wurde das Hydrolysat in 100 μl Reinstwasser gelöst und in zwei Portionen zu je 50 μl aufgeteilt. Zu jeder Portion wurden 20 μl 1 M Natriumhydrogencarbonatlösung zupipettiert und 100 μl 1 % L-FDLA bzw. D-FDLA in Aceton zur Derivatisierung zugegeben. Nach Inkubation bei 40 °C für 1 Stunde und

anschließendem Abkühlen wurde mit 20 µl 2 M Salzsäure die Reaktion gestoppt und die Probe im Vakuum getrocknet²³⁴. Der Rückstand wurde in 810 µl Acetonitril aufgenommen, zentrifugiert und der Überstand über Methode A, Gradient I analysiert.

Ein mit L-FDLA und D-FDLA derivatisierter Standard von L-Aminosäuren wurde ebenfalls unter den angegebenen Bedingungen analysiert und die Molekülionmassen und Retentionszeiten für alle Formen bestimmt.

2.20.4. Aktivitätstests

Alle in gereinigter Form erhaltenen Substanzen wurden hinsichtlich ihrer zytotoxischen und antimikrobiellen Aktivität getestet (Experimente wurden von Jennifer Herrmann Institut für Pharmazeutische Biotechnologie, Universität des Saarlandes durchgeführt). Hierzu wurden diese zunächst in Methanol zu einer Konzentration von 1 µg/µl gelöst. Das Standardprotokoll zur Substanztestung wird im Folgenden wiedergegeben.

2.20.4.1. Testung auf antimikrobielle Aktivität

Mit Hilfe des Agardiffusionstests wurde auf Wachstumshemmung von Bakterien (*Chromobacterium violaceum*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* TolC, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* MRS3, *Mycobacterium diernhoferi*, *Micrococcus luteus*) und Hefen bzw. Pilzen (*Candida albicans*, *Mucor hiemalis*, *Pichia anomala*) geprüft.

Die Bakterienstämme wurden in EBS-Medium (0,5 % Casein-Soja-Pepton, 0,5% Proteose-Pepton, 0,1 % Peptone Meat, 0,1 % Hefeextrakt, pH 7,0) bei 30 °C, *Escherichia coli* TolC und *Bacillus subtilis* bei 37 °C, die Hefe- und Pilzstämme in Myc-Medium (1 % Phytone Peptone, 1 % Glukose, 50 mM HEPES, pH 7,0) bei 30 °C über Nacht auf Schüttelinkubatoren kultiviert. Mit EBS- oder Myc-Agar wurden die Kulturen zu einer OD₆₀₀ von 0,01 für Bakterien und 0,05 für Hefen und Pilze verdünnt. 6 mm-Cellulosefilterplättchen wurden mit jeweils 20 µg einer Substanz beladen, auf die Oberfläche des Agars aufgelegt und letztere bei der entsprechenden Temperatur über Nacht bebrütet. Die Agarplatten wurden daraufhin auf das Auftreten von klaren Hemmhöfen hin untersucht, die sich vom trüben Bewuchs der restlichen Kultur abgrenzen lassen.

2.20.4.2. Testung auf zytotoxische Aktivität (MTT-Test)

Für die Testung auf zytotoxische Aktivität wurden CHO-K1- (*Chinese Hamster Ovary*) und HCT-116- (*Human Colon Carcinoma*) Zelllinien in 96-Well-Mikrotiterplatten (6 x 10³ Zellen / Well) im MTT (Dimethylthiazolyl-diphenyl-tetrazoliumbromid)-Test zur Bestimmung der Zellviabilität eingesetzt^{235,236}. Duplikate einer jeden Substanz wurden mit Vollmedium beginnend mit einer Startkonzentration von 111 µg / (ml und Well) in 1:3-Schritten verdünnt. Nach einer Inkubationszeit von fünf Tagen wurden 20 µl einer MTT-Lösung (5 mg/ml in PBS-Medium, Sigma-Aldrich) zugegeben und für weitere zwei Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen, die Zellen mit 100 µl PBS-Medium gewaschen und 100 µl Isopropanol/10 M Salzsäure (250:1) hinzu pipettiert. Die Auswertung erfolgte photometrisch durch Messung der relativen Absorption bei 570 nm gegenüber einer Methanolkontrolle mit einem Mikrotiterplatten-Leser.

3. Die Myxochelin-*O*-Methyltransferase und die Funktion von Methylmyxochelinen in der Eisenhomöostase von *M. xanthus* DK1622

3.1. Ergebnisse

3.1.1. Aktivitätsbasierte Aufreinigung

Zur Identifizierung der Myxochelin-*O*-Methyltransferase auf der Grundlage einer aktivitätsbasierten Reinigung und nachfolgender Analysen der gewonnenen Fraktionen ist es notwendig, eine ausreichende Menge eines Proteinrohextraktes zu gewinnen, der das native Enzym beinhaltet und dessen Methylierungsaktivität gegenüber Myxochelin A anhand eines *in vitro*-Tests erkannt werden kann.

Aus den Zellen einer 5 L-Flüssigkultur von *Myxococcus xanthus* DK1622 konnten 300 ml zellfreier Proteinextrakt gewonnen werden. Die Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford ergab eine Konzentration von 14 mg/ml, so dass mit 4,2 g Gesamtprotein eine ausreichende Menge für die Fraktionierung zur Verfügung stand.

Zur Detektion von Enzymaktivität wurde ein Methyltransferase-Assay entwickelt. Hierbei wurde synthetisiertes Myxochelin A in Gegenwart des Proteinrohextrakts bzw. der jeweiligen Fraktion über Nacht zusammen mit SAM inkubiert. Die Konzentrationen von Substrat und Cosubstrat wurden in der Weise ausgewählt, dass Myxochelin A und Methylmyxochelin A noch deutlich in der nachfolgenden HPLC-MS-Analyse zu detektieren waren und SAM im doppelten molaren Überschuss vorlag, um Sättigungsbedingungen zu erreichen. Als Reaktionspuffer wurde ein Tris-Puffer ausgewählt, der zusätzlich Magnesiumionen als Cofaktor zur Verfügung stellte. Der pH-Wert des Puffers von 7,6 und die Inkubationstemperatur von 30 °C sollte physiologische Bedingungen simulieren, die auch bei der Kultivierung von *M. xanthus* die erforderlichen enzymatischen Prozesse gewährleisten.

Zunächst wurde der gewonnene Proteinrohextrakt im Methyltransferase-Assay getestet. Wie die *Extracted Ion Chromatogramme* (EICs) der HPLC-MS-Analyse zeigen, sind sowohl Myxochelin A mit m/z $[M+H]^+ = 405,1$ als auch Methylmyxochelin A mit m/z $[M+H]^+ = 419,1$, das Produkt der Enzymreaktion mit ausreichenden Intensitäten und deutlich chromatographisch getrennt zu detektieren (Abbildung 3-1).

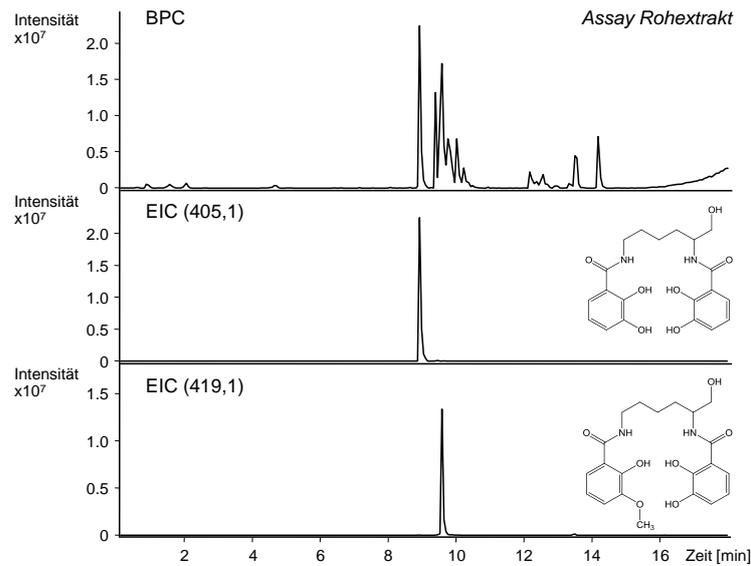


Abbildung 3-1: Methyltransferase-Assay mit dem Proteinrohextrakt.
 BPC: Basepeak Chromatogramm positiver Modus, $m/z = 100 - 1100$;
 EIC: Extracted Ion Chromatogramm $m/z [M+H]^+ = 405,1$ von
 Myxochelin A und $m/z [M+H]^+ = 419,1$ von Methylmyxochelin A.

Eine vergleichbare Menge des Proteinrohextrakts wurde zusätzlich für 1 h bei 95 °C hitzedenaturiert und ebenfalls in dem beschriebenen Methyltransferase-Assay untersucht. In der nachgeschalteten HPLC-MS-Analyse, wie in Abbildung 3-2 dargestellt, konnte kein Methylmyxochelin A detektiert werden.

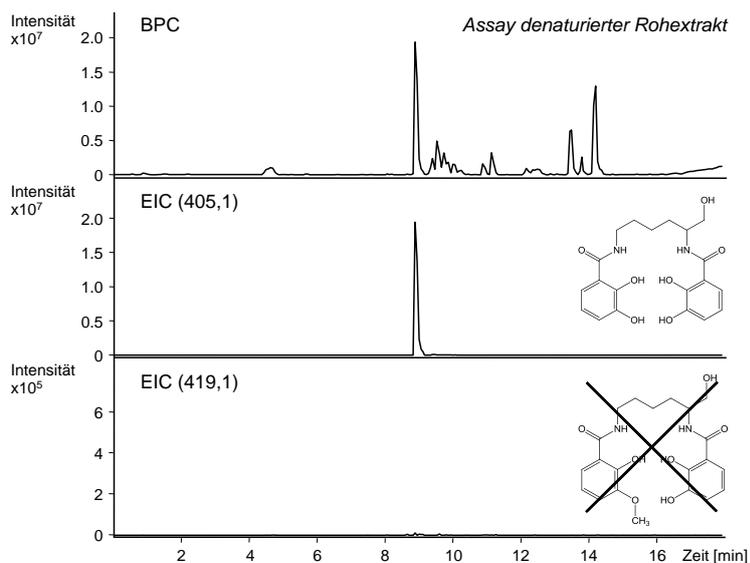


Abbildung 3-2: Methyltransferase-Assay mit dem denaturierten Proteinrohextrakt. BPC: Basepeak Chromatogramm positiver Modus, $m/z = 100 - 1100$; EIC: Extracted Ion Chromatogramm $m/z [M+H]^+ = 405,1$ von Myxochelin A und $m/z [M+H]^+ = 419,1$ von Methylmyxochelin A.

Dies belegt, dass die Methylierung von Myxochelin A in Gegenwart des natürlichen Proteinrohextrakts im oben gezeigten Assay durch einen enzymatischen Prozess erfolgt und Methylmyxochelin A nicht bereits im Proteinrohextrakt vorhanden ist bzw. spontan entsteht oder es sich dabei um ein zufällig gebildetes Artefakt handelt.

Ein Vergleich mit einem methanolischem Zell/XAD-Extrakt einer Flüssigkultur von *M. xanthus* DK1622 zeigt, dass sich biogenes Myxochelin A und Methylmyxochelin A gegenüber synthetisiertem Myxochelin A und dessen Methylderivat hinsichtlich ihrer Retentionszeiten von 8,9 min resp. 9,4 min nicht unterscheiden (Abbildung 3-3).

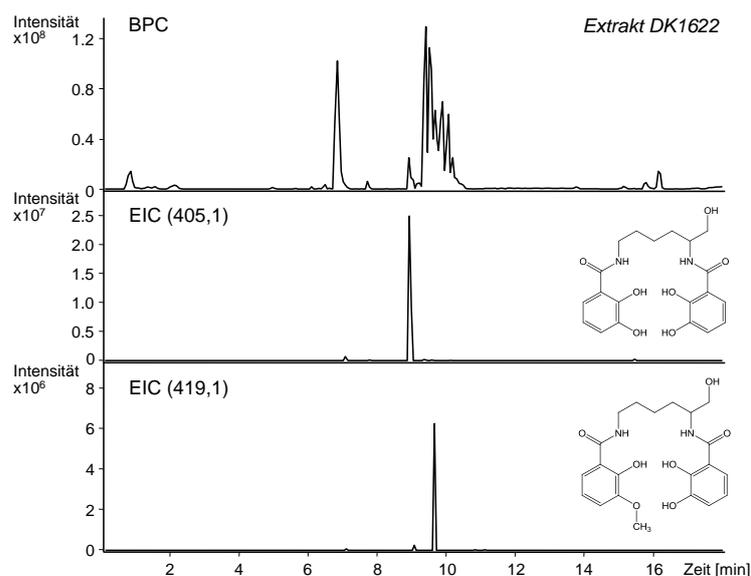


Abbildung 3-3: Zell/XAD-Extrakt von *M. xanthus* DK1622.
 BPC: Basepeak Chromatogramm positiver Modus, $m/z = 100 - 1100$;
 EIC: Extracted Ion Chromatogramm $m/z [M+H]^+ = 405,1$ von Myxochelin A und $m/z [M+H]^+ = 419,1$ von Methylmyxochelin A.

Im MS/MS-Modus (siehe Abbildung 3-4) stellt sich das Fragmentierungsmuster der beiden Analytenpaare aus Assay und Extrakt als Spektrum jeweils dreier identischer Fragmente vergleichbarer Ionenhäufigkeiten dar.

Der Einbau einer Methylfunktion von Methylmyxochelin A kann hier durch zwei um 14 Masseneinheiten höhere Fragmentmassen von $m/z [M+H]^+ = 401$ und $m/z [M+H]^+ = 283$ gegenüber den Fragmenten $m/z [M+H]^+ = 387$ und $m/z [M+H]^+ = 269$ von Myxochelin A untermauert werden. Die Ergebnisse dieser Untersuchung belegen somit, dass es sich bei dem im Methyltransferase-Assay umgesetzten Myxochelin A um das erwartete Methylmyxochelin A handelte.

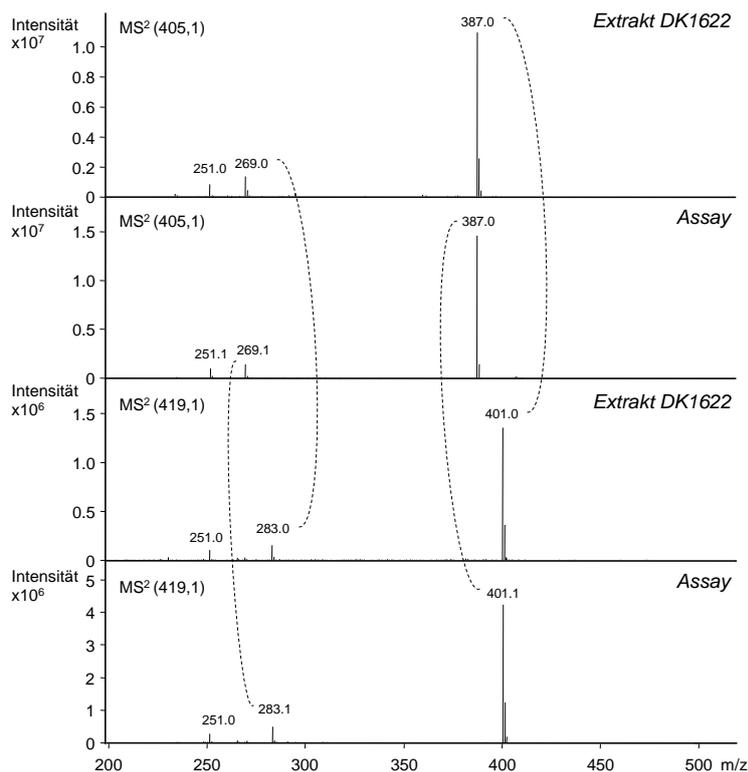


Abbildung 3-4: Vergleich der MS²-Spektren von Myxochelin A ($m/z [M+H]^+ = 405,1$) und Methylmyxochelin A ($m/z [M+H]^+ = 419,1$) aus dem Extrakt von *M. xanthus* DK1622 und dem Methyltransferase-Assay mit dem Proteinrohextrakt. Gestrichelte Linien zeigen die Fragmentmassendifferenzen, verursacht durch die Methylgruppe von Methylmyxochelin A.

Mit dem etablierten Assay stand damit eine Analysemethode zur Verfügung, um die aktivitätsbasierte Aufreinigung der gesuchten Methyltransferase zu verfolgen und die dabei erhaltenen Fraktionen anhand einer schnell durchzuführenden Testung zu untersuchen.

In einem ersten Schritt wurde der Proteinrohextrakt durch eine Ammoniumsulfat-Fällung vorfraktioniert. Dabei wurde Ammoniumsulfat schrittweise von 35 %, 45 % und 55 % bis zu seiner Sättigungskonzentration von 70 % im Rohextrakt gelöst und nach jeder erreichten Konzentrationsstufe das Präzipitat entfernt und separat wieder in T-Puffer aufgenommen. So wurden vier Fällungsfractionen und der verbleibende Überstand erhalten und diese im Methyltransferase-Assay untersucht. Dabei zeigten mit Ausnahme des Überstandes alle Fraktionen Methylierungsaktivität, jedoch unterschiedlichen Ausmaßes. Zum Vergleich wurden die Peakflächen von Methylmyxochelin A der jeweiligen EICs aus der HPLC-MS-Analyse jeder Fraktion gegeneinander aufgetragen und die größte Peakfläche gleich 100 % gesetzt. Abbildung 3-5 zeigt die graphische Darstellung dieses Vergleichs, bei der Fraktion 3 (55 % Sättigung) eine deutlich höhere

Aktivität besitzt als die Fraktionen 1, 2 und 4 (35 %, 45 %, 70 % Ammoniumsulfat-Sättigung).

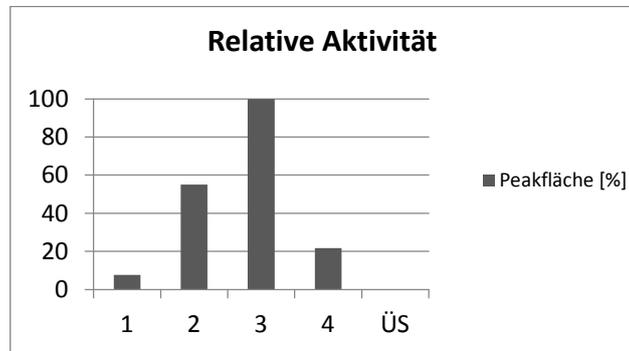


Abbildung 3-5: Aktivitätsvergleich der Fraktionen aus der Ammoniumsulfat-Fällung bezogen auf die Peakfläche von Methylmyxochelin A aus der HPLC-MS-Analyse des Methyltransferase-Assays, ÜS: Überstand.

Fraktion 3 wurde für die weitere Auftrennung ausgewählt und repräsentierte eine Gesamtproteinmenge von 740 mg. Diese wurde über Gelfiltration auf einer Superdex™ 75 - Säule in mehreren aufeinanderfolgenden Trennungsgängen in jeweils einhundert 10 ml-Fractionen fraktioniert und nachfolgend auf ihre Methylierungsaktivität hin getestet. In Abbildung 3-6 wird beispielhaft einer dieser Gelfiltrationstrennungsläufe dargestellt und die aktiven Fraktionen markiert.

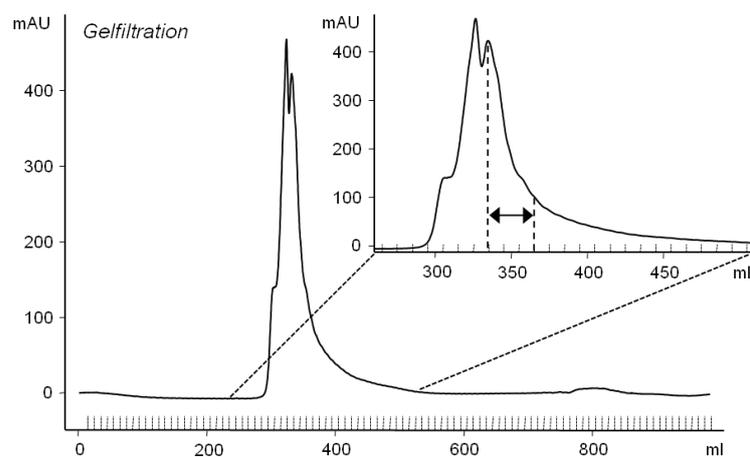


Abbildung 3-6: FPLC-UV-Chromatogramm (280 nm) einer Trennung über Gelfiltration. Aktive Fraktionen innerhalb des durch die gestrichelte Linie angedeuteten Bereichs.

Die aktiven Fraktionen wurden vereinigt und aufkonzentriert. Es wurden dabei 48,5 mg Protein erhalten, die aufeinanderfolgend in drei chromatographischen Läufen auf einer HiTrap™ Butyl HP 1ml-Säule nach dem Prinzip der Hydrophoben Interaktionschromatographie in 2,5 ml-Fractionen weiter aufgetrennt wurden. Abbildung 3-7 zeigt ein Chromatogramm dieses Reinigungsschrittes und die im Methyltransferase-Assay detektierten Fraktionen.

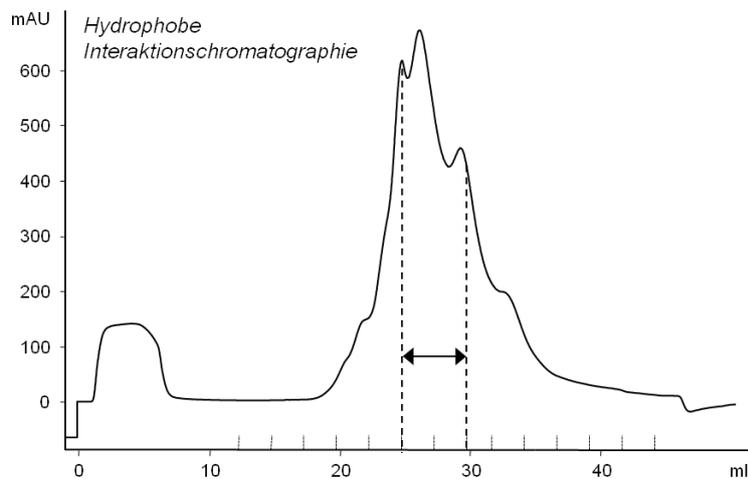


Abbildung 3-7: FPLC-UV-Chromatogramm (214 nm) einer Trennung auf einer HiTrap ButylHP 1ml - Säule. Aktive Fraktionen innerhalb des durch die gestrichelte Linie angedeuteten Bereichs.

7,3 mg Gesamtprotein konnten nach Konzentrierung der gesammelten aktiven Fraktionen gewonnen werden. In einem letzten Reinigungsschritt wurde diese Probe auf einer Adenosin-Agarose-Säule in 1 ml-Fractionen separiert. Wie in Abbildung 3-8 zu bemerken ist, sind im Chromatogramm keine deutlichen Peaks chromatographierter Komponenten des Gemisches im Elutionsbereich zwischen 25 ml und 50 ml erkennbar.

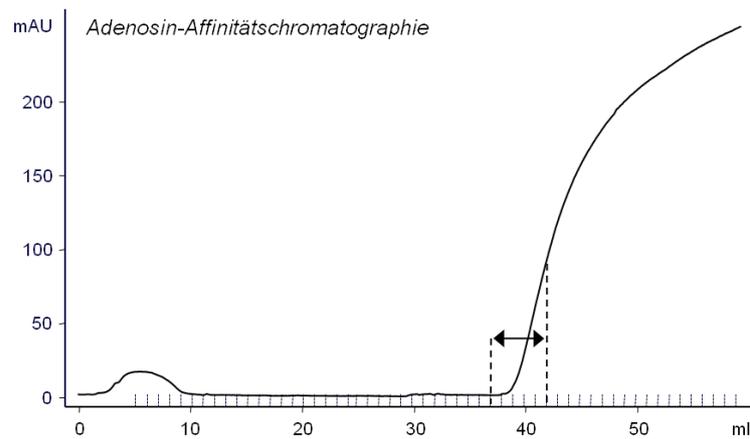


Abbildung 3-8: FPLC-UV-Chromatogramm (280 nm) der Trennung auf einer Adenosin-Agarose-Säule. Aktive Fraktionen innerhalb des durch die gestrichelte Linie angedeuteten Bereichs.

Ursache hierfür ist zum einen die geringe Konzentration der Probe einhergehend mit einem größeren nichtbindenden Probenanteil im vorderen Bereich des Chromatogramms, zum anderen die Eigenabsorption von SAM im Eluenten bei 280 nm, so dass kleinere Peaks überdeckt werden. Dennoch konnte der aktive Anteil der Fraktion auf der Säule gebunden werden, was der anschließende Assay (markierte Fraktionen) offenlegte. Erst die Vereinigung der zu betrachtenden Fraktionen und deren Aufkonzentrierung machte eine Proteinbestimmung von nur ca. 100 µg möglich.

3.1.2. MALDI-TOF-MS- und *in silico*-Analyse

Von der aus den oben beschriebenen Reinigungsschritten gewonnenen aktiven Fraktion wurden 20 µg durch eine SDS-PAGE aufgetrennt. Die Abbildung 3-9 zeigt das resultierende, gefärbte Polyacrylamidgel. Darin sind im Bereich von 55 - 25 kDa (Markierung) eine überschaubare Anzahl teilweise stärker heraustretender Proteinbanden zu erkennen. Aufgrund der geringen vorliegenden Proteinmenge erschien ein weiterer Reinigungsschritt als nicht sinnvoll, so dass die Probe in einer MALDI-TOF-MS-Analyse weiter untersucht wurde.

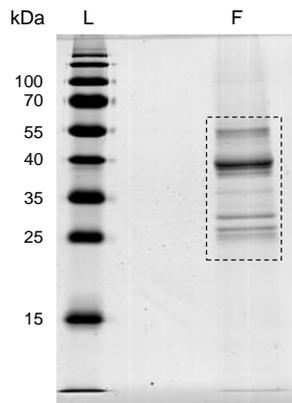


Abbildung 3-9: SDS-PAGE der aktiven Fraktion nach aktivitätsbasierter Aufreinigung. L: PageRuler Prestained Protein Ladder, F: Fraktion, Markierung: ausgewählte Banden für die MALDI-TOF-MS-Analyse.

Hierzu wurden alle detektierten Proteinbanden des in der Abbildung markierten Bereiches ausgeschnitten und die im MS- und MS/MS-Modus auftretenden Fragmentmassen gegen eine eigens erstellte *MASCOT*-Datenbank durchsucht. Diese Datenbank enthielt die durch *in silico*-Translation aller hypothetischen *orfs* (*open reading frames*) des Genoms von *M. xanthus* DK1622 ermittelten Aminosäuresequenzen von Peptiden und Proteinen. Zusätzlich wurde eine Suche gegen eine Datenbank aller bereits annotierten Proteine aus *M. xanthus* DK1622 durchgeführt. Die dabei gefundenen Peptide wurden anschließend einer *BLASTp*-Suche unterzogen, um durch Homologievergleiche die zu Grunde liegenden Proteine und ggf. SAM-abhängige Methyltransferase-Domänen zu identifizieren.

Aus der untersuchten Probe konnten drei Methyltransferasen identifiziert werden. Es handelte sich um MXAN_2293: hypothetical protein mit SAM-Methyltransferase-Domäne (NCBI Reference Sequence: YP_630514.1), MXAN_2296: O-methyltransferase (NCBI Reference Sequence: YP_630517.1) und MXAN_3033: UbiE/COQ5 family methyltransferase (NCBI Reference Sequence: YP_631242.1). MXAN_2293 wurde in den Banden bei ca. 25 kDa, MXAN_2296 in der Bande bei ca. 30 kDa und MXAN_3033 in der Bande bei ca. 35 kDa identifiziert. Im Anhang sind die Ergebnisse der MALDI-TOF-MS-Analyse wiedergegeben. Aus den Abbildungen 3-10 bis 3-12 kann die Sequenzabdeckung durch die detektierten Peptidfragmentationen in der MALDI-TOF-MS-Analyse der potenziellen Methyltransferasen entnommen werden.

```

1 MDTEALARIPGVNPNVNAARIYDYTLGGTHHFEADRQAAEYLFSLVPS TRKWVP
      10      20      30      40      50
80 MLRACLRTAAQRLAADGFHHWVDFASGLPTGDHVAVLDPARVLYSDVNPLTIT
      60      70      80      90      100      110
120 AHLLGDTFRVRYMECDIRQAGAFLLRRPDVNAFLGGERRVAFGANGITVFLSAEE
      120      130      140      150      160
170 NRQFFRDLYDWAAPGSKLFTTFETKSPDLSTPKWEQFVGMFRQMGESFQLYSLPE
      170      180      190      200      210      220
230 YLDLCGPWARDATGVLPVREFLGLPPEHI TDEDEREGVGI EEFYAVVLEKR
      230      240      250      260      270      280      290

```

Abbildung 3-10: Aminosäuresequenz von MXAN_2293.
Grau: Peptidfragmentationen aus der MALDI-TOF-MS-Analyse.

```

1 MDKTPGGTFPPTQLLYERIGGYWLTQVIGTAARLGIADLLSKGPRSSDALADELG
      10      20      30      40      50
60 ISADGLYRLLRGGISAGVFQEVGERTFALTPMGEGLRSDIPGSLRDVAIAQSDRA
      60      70      80      90      100      110
120 HWLPWGQLIEAVRTGKSTVRREALGTDIWEHFAKHPEEATHFARAMGNLSALVAHE
      120      130      140      150      160
170 LTQQVDFSEFAHVADIGGSQGALLARVLRANPSCRILFDLPHVLEGAKAPMEAQ
      170      180      190      200      210      220
230 GLHGRVELVGGSEFEPGLPSAEAYLLKHI LHDWDEESATAILRNIAAAPAGARL
      230      240      250      260      270
280 FVMELVMPDNQTPSEVPLMDLNMMLADGRERTANEFQTL LTRTSWELVGIRPTQ
      280      290      300      310      320      330
341 AGTCIIEAVKR

```

Abbildung 3-11: Aminosäuresequenz von MXAN_2296.
Grau: Peptidfragmentationen aus der MALDI-TOF-MS-Analyse.

```

1 MSAVSPLAQPEAWNVAPEYVRELMPTFETFSREALRAGVAQGTRVVDVATGPG
      10      20      30      40      50
60 TLALLAARDGARVTAVDFSEPMIAALRGR TAEAKLDVDILEGDMALPFEANAFD
      60      70      80      90      100      110
120 AAFSMFGLMFPPDRARGFQELHRVLPKPGGRAVSSWTFEERSKELRAVYTRLWEQ
      120      130      140      150      160
170 MGAKPSQPGAIPLSDDPTCQREMS SAGFTHVTVNEVEGSIDYPS TAAMVDATTRS
      170      180      190      200      210      220
230 SAPVVLARRALGPQWEPLLSMHEYAQAELGPGPQRVTLTAYLTTGTRP
      230      240      250      260      270      280      290

```

Abbildung 3-12: Aminosäuresequenz von MXAN_3033.
Grau: Peptidfragmentationen aus der MALDI-TOF-MS-Analyse.

Für MXAN_2296 und MXAN_3033 konnten die konservierten Motive der SAM-Bindestellen SAM-abhängiger Methyltransferasen nach Kagan gefunden werden²³⁷ (Abbildung 3-13). Motiv I ist ein glycinreicher Sequenzabschnitt mit einem N-terminal hohen Anteil hydrophober Aminosäuren und einer konservierten Asparaginsäure oder Glutaminsäure. 17 - 19 Aminosäuren nach Motiv I liegt eine konservierte Asparaginsäure oder Glutaminsäure vor, die auf einen hydrophoben Bereich folgt. 36 - 90 Aminosäuren nach Motiv I wird Motiv II beschrieben, dessen zentrale Asparaginsäure hoch konserviert ist. An dieser Position befindet sich in MXAN_2296 die hierzu sehr ähnliche

Glutaminsäure. Dieses Motiv ist gekennzeichnet durch aromatische und andere hydrophobe Einheiten. Motiv III, das in SAM-abhängigen Methyltransferasen nicht immer vorhanden ist, liegt 12 - 38 Aminosäuren hinter Motiv II mit einem hoch konservierten zentralen glycinreichen Teil, N- und C-terminal umgeben von hydrophoben Aminosäuren. Während bei MXAN_3033 hier beide Glycine vorhanden sind, wird bei MXAN_2296 ein Glycin und ein benachbartes Alanin gefunden. Grundsätzlich stimmen die homologen Bereiche der beiden Methyltransferasen hinsichtlich identischer oder ähnlicher Aminosäuren mit den beschriebenen Motiven überein.

	Motiv I	AA	Postmotiv I	AA	Motiv II	AA	Motiv III
Konsensus	L I V E V C P V L D I G G G T G		h h X h E	D	A Y L G T Y V I V P Q F D A I F C		K L I I F L L L R P G G R L L I
MXAN_2296	178 V A D I G G S Q G	14	G I L F D	52	P S A E A Y L L	21	A A P A G A R L F V 277
MXAN_3033	47 V V D V A T G P G	12	V T A V D	51	N A F D A A F S	19	V L K P G G R A V V 143

Abbildung 3-13: Motive SAM-abhängiger Methyltransferasen nach Kagan²³⁷. Fett: identische Aminosäuren, kursiv: ähnliche Aminosäuren, AA: Aminosäureanzahl zwischen den Motiven, kursive Zahlen: Position der ersten bzw. letzten Aminosäure der Motive in MXAN_2296 und MXAN_3033.

Die drei konservierten Methyltransferase-Motive konnten in MXAN_2293 nicht bestimmt werden. Eine *BLASTp*-Suche ergab eine S-Adenosyl Methyltransferase-Domäne und die Zuordnung zu pfam04672 (Methyltransf_19). Zu dieser Proteinfamilie existieren keine experimentellen Daten zu möglichen Substraten oder der Funktion des Proteins. Die Annotation der Domäne erfolgte auf der Grundlage einer Kristallstruktur von Sav_2177 aus *Streptomyces avermitilis* MA-4680 mit SAM. Eine SAM-Bindestelle wurde nicht definiert²³⁸.

Zur Identifikation der Myxochelin-*O*-Methyltransferase sollten die Proteine MXAN_2293, MXAN_2296 und MXAN_3033 heterolog in *E. coli* exprimiert und im Methyltransferase-Assay getestet werden. MXAN_2293 konnte *in silico* nicht eindeutig als SAM-abhängige Methyltransferase klassifiziert werden. MXAN_3033 wird eine Funktion im Ubichinon E / Coenzym Q5-Stoffwechsel zugesprochen. Beide Annotationen basieren auf Homologievergleichen der Proteinsequenzen und wurden nicht experimentell bestätigt (*Pubmed*-Datenbank). Deshalb wurden MXAN_2296 und MXAN_3033 für die heterologe Expression und Testung eingeschlossen.

3.1.3. Heterologe Expression und Identifizierung des Enzyms

Für die heterologe Expression der drei gefundenen Methyltransferasen wurde *Escherichia coli* Rosetta 2(DE3)pLysS, im folgenden Rosetta 2(DE3)pLysS genannt, als Expressionsstamm und pET 28b(+) als Expressionsvektor verwendet. Zunächst wurden Primer mit jeweils einem Oligonukleotidüberhang designt, der Restriktionsenzym-schnittstellen für den nachfolgenden Klonierungsschritt enthielt. So wurde in die Forward-Primer eine *NdeI*-Schnittstelle und in die Reverse-Primer eine *HindIII*-Schnittstelle integriert. Die Primer wurden mit der MXAN-Nummer und dem nachfolgenden Kürzel expPETfor bzw. expPETrev benannt, z.B. 2293expPETfor (siehe Tabelle 2-14). Bei der Amplifikation durch PCR wird ein DNA-Fragment erhalten, welches das gewünschte Methyltransferase-Gen und einen beidseitigen Überhang enthält. Nach Verdau dieses Fragments mit den Restriktionsendonukleasen *NdeI* und *HindIII* kann der für die Methyltransferase kodierende Sequenzabschnitt in den mit den genannten Restriktionsenzymen geschnittenen Expressionsvektor ligiert werden. Abbildung 3-14 gibt die Klonierungsstrategie schematisch wieder.

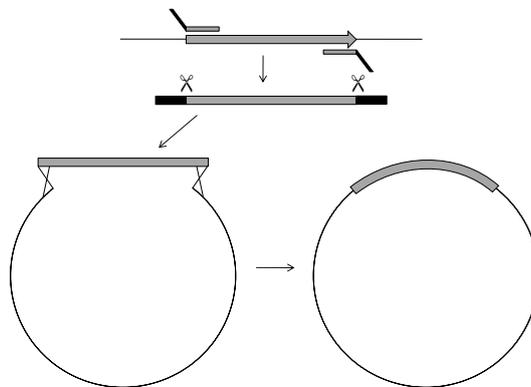


Abbildung 3-14: Klonierung der Methyltransferase-Gene in den Expressionsvektor pET 28b(+). Amplifikation des Gens (grau) und Einführung von Restriktionsschnittstellen durch PCR (oben). Verdau des Amplifikats und Ligation mit dem geschnittenen Vektor (unten). Schwarz: Oligonukleotidüberhang.

Nach erfolgreicher Klonierung werden die Plasmide pET2293, pET 2296 und pET3033 erhalten. Die Konstrukte erlauben die heterologe Expression der Methyltransferasegene als Proteine mit N-terminalem His₆-Tag unter Kontrolle des T7-Promotors und Induzierbarkeit der Expression mittels IPTG (Abbildung 3-15).

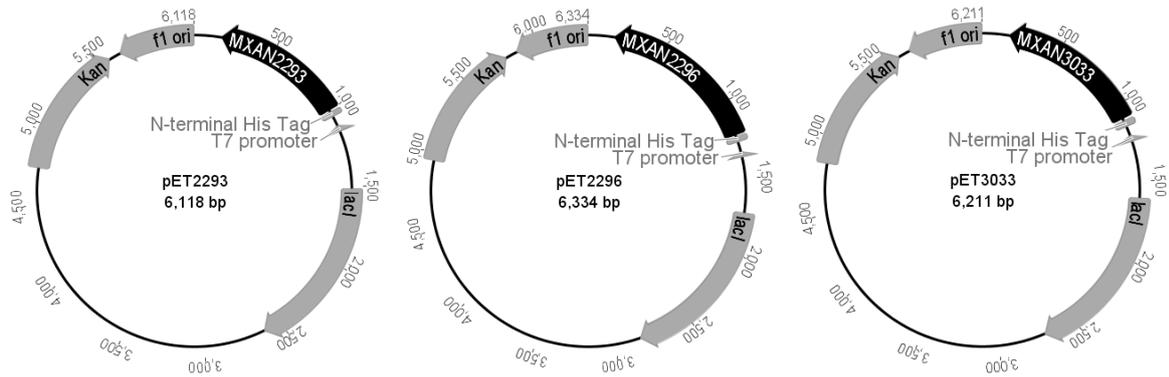


Abbildung 3-15: Plasmidkarten von pET2293, pET2296 und pET3033. f1 ori: origin of replication, Kan: Kanamycin-Resistenzgen, lacI: lac-Repressor, schwarz: Methyltransferase-Gen.

Bei der durchgeführten PCR mit genomischer DNA aus *M. xanthus* DK1622 in jeweils dreifachen Ansätzen konnten Amplifikate der erwarteten Größen erhalten werden: *mxan_2293*: 810 bp, *mxan_2296*: 1026 bp und *mxan_3033*: 903 bp (Abbildung 3-16). Die entsprechenden Banden wurden ausgeschnitten, aufgereinigt und mit den Restriktionsendonukleasen *NdeI* und *HindIII* verdaut. Nach Ligation mit dem geschnittenen Vektor pET 28b(+) wurde der Ligationsansatz in *E. coli* DH10B transformiert. Aus den über Kanamycinresistenz selektierten Mutanten DH10B2293, DH10B2296 und DH10B3033 konnten anschließend die Plasmide pET2293, pET 2296 und pET3033 isoliert werden. Die korrekte Integration und Sequenz der klonierten Gene wurde durch Sequenzierung mit den Primern T7 und T7term_r bestätigt.

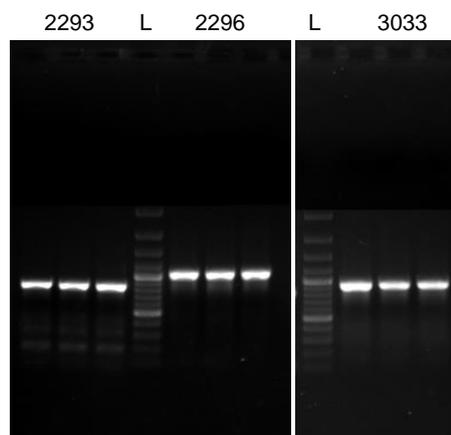


Abbildung 3-16: Agarosegelelektrophorese nach PCR von *mxan_2293*, *mxan_2296* und *mxan_3033*. L: GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder.

Die fertigen Expressionskonstrukte wurden im nachfolgenden Schritt in Rosetta 2(DE3)pLysS transformiert. Nach Selektion über Chloramphenicol- und Kanamycinresistenz konnten die Mutanten R2293, R2296 und R3033 erhalten werden.

Diese wurden zur Expression der Methyltransferasen in 50 ml chloramphenicol- und kanamycinhaltigem LB-Medium bis zu einer OD_{600} von 0,6 kultiviert. Die Expression in R2293 und R2296 wurde mit 0,2 mM IPTG induziert und bei 16 °C über Nacht fortgesetzt, während in R3033 die Induktion mit 0,05 mM IPTG erfolgte und das Protein bei 22 °C über Nacht exprimiert wurde. Unter jeweils entsprechenden Bedingungen wurde Rosetta 2(DE3)pLysS als Negativkontrolle kultiviert.

Da die in diesem Zusammenhang heterolog zu exprimierenden Proteine von Rosetta 2(DE3)pLysS nicht in das Kulturmedium sezerniert werden, sondern intrazellulär verbleiben, mussten die Zellen einer jeden Kultur für die weitere Untersuchung aufgeschlossen werden. Die dabei nach Zentrifugation gewonnenen löslichen Lysatüberstände und unlöslichen Pellets wurden mittels SDS-PAGE analysiert.

Abbildung 3-17 zeigt das Polyacrylamidgel der löslichen Fraktionen (Überstände) und Pellets zweier Expressionskulturen von R2293 und R2296. Es ist zu erkennen (durch die beiden Pfeile in der Grafik angedeutet), dass im Vergleich zu Rosetta 2(DE3)pLysS jeweils eine zusätzliche Proteinbande der erwarteten Größe (MXAN_2293: 32,5 kDa, MXAN_2296: 39 kDa) auftritt. Ein deutlicher Teil der Proteinmenge verbleibt im Pellet.

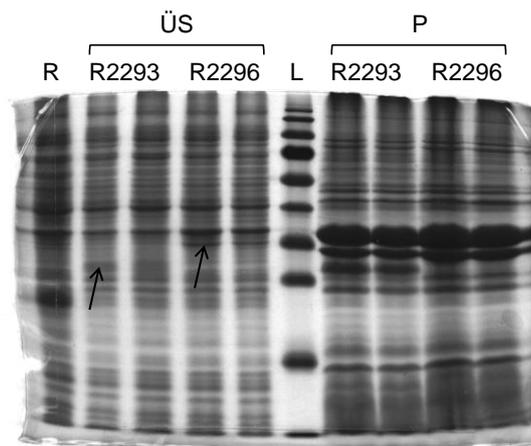


Abbildung 3-17: SDS-PAGE nach heterologer Expression von MXAN_2293 und MXAN_2296. Lösliche Fraktionen (ÜS: Überstände) und Pellets (P) von R2293 und R2296. R: Rosetta 2(DE3)pLysS (Kontrolle), L: PageRuler Prestained Protein Ladder.

Auch MXAN_3033 konnte in löslicher Form exprimiert werden (Abbildung 3-18). Im Gel der SDS-PAGE wird die Bande (34,6 kDa) teilweise von einer natürlicherweise in Rosetta 2(DE3)pLysS auftretenden Bande überlagert.

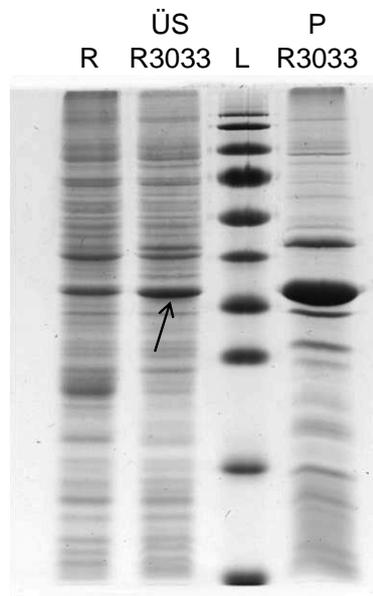


Abbildung 3-18: SDS-PAGE nach heterologer Expression von MXAN_3033. Lösliche Fraktion (ÜS: Überstand) und Pellet (P) von R3033. R: Rosetta 2(DE3)pLysS (Kontrolle), L: PageRuler Prestained Protein Ladder.

Eine MALDI-TOF-MS-Analyse der extrahierten Proteinbanden bestätigte die erfolgreiche Expression der Methyltransferasen in den löslichen Fraktionen. Die Analysendaten sind im Anhang dargestellt.

Die Lysate konnten nun auf die Methylierungsaktivität der darin enthaltenen Methyltransferasen gegenüber Myxochelin A hin getestet werden. Dabei wurde der Methylierungs-Assay in der Form abgeändert, dass 100 µl der löslichen Überstände von R2293, R2296 und R3033 neben Rosetta 2(DE3)pLysS als Kontrolle wie im Methodenteil beschrieben mit SAM und Myxochelin A versetzt wurden, jedoch mit Reaktionspuffer auf 500 µl aufgefüllt wurde. Die Inkubationszeit wurde auf eine Stunde verkürzt und die Probe entsprechend des Protokolls behandelt und via HPLC-UV/ESI-MS analysiert. Hierbei konnte für den Assay mit der löslichen Proteinfraction aus R2296 ein Peak für Methylmyxochelin A (m/z $[M+H]^+ = 419,0$) mit der entsprechenden Retentionszeit von 9,4 min detektiert werden (Abbildung 3-19).

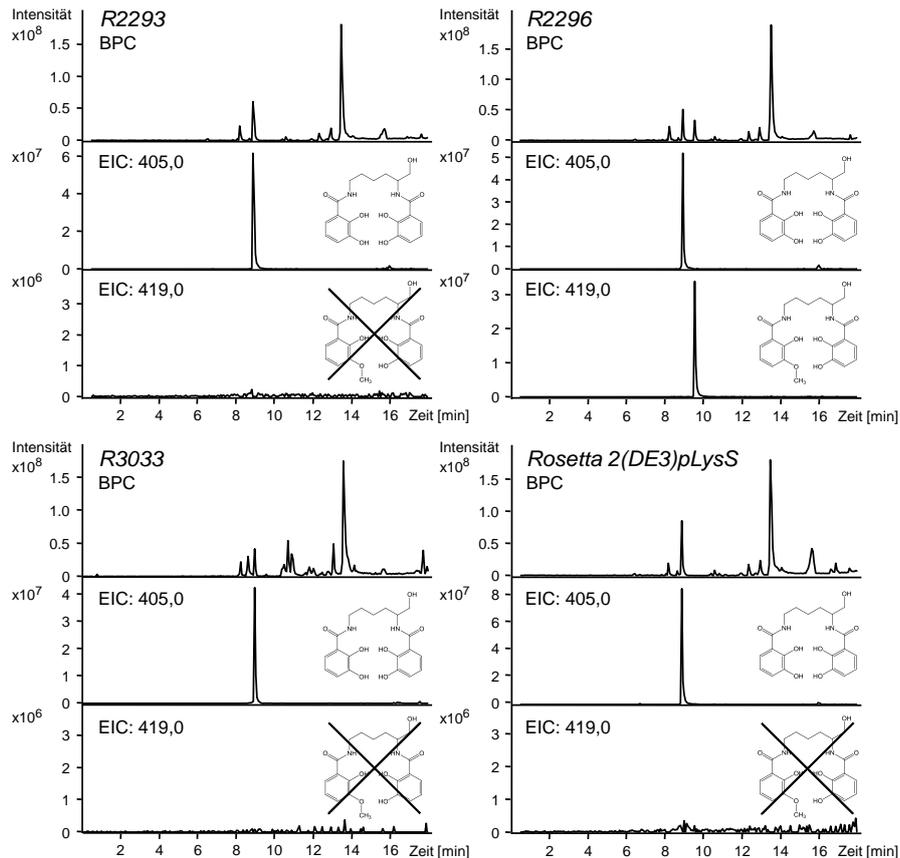


Abbildung 3-19: Methyltransferase-Assays mit den löslichen Proteinfractionen von R2293, R2296, R3033 und Rosetta 2(DE3)pLysS (Kontrolle). BPC: Basepeak Chromatogramm positiver Modus, $m/z = 100 - 1100$; EIC: Extracted Ion Chromatogramm $m/z [M+H]^+ = 405,0$ von Myxochelin A und $m/z [M+H]^+ = 419,0$ von Methylmyxochelin A.

Dieser Peak konnte für R2293 und R3033 nicht nachgewiesen werden. Die Abwesenheit des Methylmyxochelin A-Peaks im Chromatogramm der Kontrolle mit Rosetta 2(DE3)pLysS belegt, dass die offensichtliche Methylierung von Myxochelin A nicht durch Enzyme des Expressionsstammes bewirkt wurde.

Bei näherer Betrachtung des Fragmentierungsmusters des Analyten aus der Probe des Assays mit R2296 werden die zu Beginn aufgezeigten Spezies mit den Fragmentmassen $m/z [M+H]^+ = 401$, $m/z [M+H]^+ = 283$ und $m/z [M+H]^+ = 251$ des natürlichen Methylmyxochelin A aus *M. xanthus* DK1622 erkannt (Abbildung 3-20). Damit war MXAN_2296 als potenzielle Myxochelin-O-Methyltransferase identifiziert.

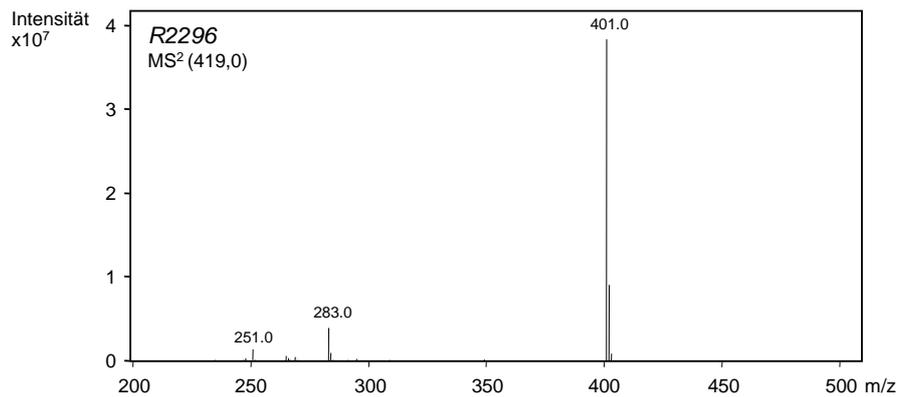


Abbildung 3-20: MS²-Spektrum von Methylmyxochelin A (m/z [M+H]⁺ = 419,0) bei 9,4 min aus dem Methyltransferase-Assay mit R2296 (vgl. Abbildung 3-19).

Im Folgenden galt es, die identifizierte Methyltransferase näher zu charakterisieren. Hierzu musste das Enzym zunächst isoliert werden. Um, zum Zwecke der enzymkinetischen Untersuchungen, größere Proteinmengen zu erhalten, wurde eine chloramphenicol- und kanamycinhaltige 250 ml- Flüssigkultur bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8 kultiviert und mit 0,2 mM IPTG induziert. Die Expression erfolgte über Nacht bei 16 °C. Die Zellen wurden wie beschrieben aufgeschlossen und das His₆-Tag-Protein aus dem löslichen Überstand auf einer HisTrap-Säule aufgereinigt. Die Qualität dieses ersten Reinigungsschrittes war jedoch nicht zufriedenstellend, so dass das Verfahren mit der dabei erhaltenen Fraktion wiederholt wurde. Abbildung 3-21 zeigt die Stufen des Reinigungsprozesses in einer SDS-PAGE mit Proben des Überstandes (I), der ersten (II) und zweiten (III) Aufreinigung im Vergleich zum Überstand von Rosetta 2(DE3)pLysS. Deutlich sind die Banden des löslich exprimierten und des erfolgreich aufgereinigten Enzyms zu erkennen.

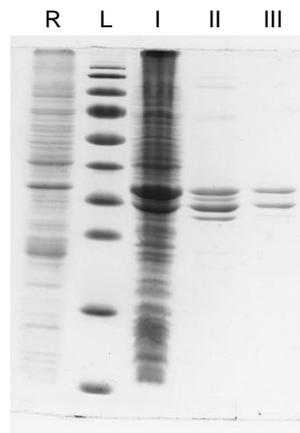


Abbildung 3-21: SDS-PAGE nach Aufreinigung der Myochelin-*O*-Methyltransferase (MXAN_2296). Lösliche Fraktionen von Rosetta 2(DE3)pLysS (R), R2296 (I) und Fraktionen nach zwei Aufreinigungsstufen über Nickelionen-Affinitätschromatographie (II+III), L: PageRuler Prestained Protein Ladder.

Überraschenderweise treten jedoch in allen Fraktionen jeweils zwei Banden des Enzyms auf, selbst nach den genannten Reinigungsschritten. Zur näheren Untersuchung wurden die beiden Banden aus Fraktion III ausgeschnitten und durch MALDI-TOF-MS-Analyse (siehe Anhang) überprüft. In beiden Fällen wurden identische Peptidfragmente des His₆-Tag-Proteins gefunden, die nahezu die gesamte Sequenz abdecken (Abbildung 3-22).



Abbildung 3-22: MALDI-TOF-MS-Analyse der aufgereinigten Myochelin-*O*-Methyltransferase. Identische Peptidfragmentmuster (grau) der oberen (oben) und unteren (unten) Proteinbande aus der SDS-PAGE von Fraktion III (vgl. Abbildung 3-21).

Erklärbar ist das Phänomen von Mehrfachbanden desselben Proteins durch Oxidationsreaktionen während der Probenaufarbeitung zur SDS-PAGE und des Trennprozesses selbst. Dadurch entstehen ungleiche Ladungsmengen und somit unterschiedlich schnell wandernde elektrophoretische Spezies²³⁹.

3.1.4. Enzymkinetik

Mit dem aufgereinigten, vom His₆-Tag befreiten Enzym, wurde eine kinetische Charakterisierung durch Inkubation bei 30 °C und pH 7,5 mit SAM und unterschiedlichen Myxochelin A-Konzentrationen durchgeführt. Das pH-Optimum bei pH 7,5 wurde in Vorversuchen unter den Bedingungen des Methyltransferase-Assays durch Vergleich der Methylmyxochelin A-Produktionslevel ermittelt. Für die Enzymkinetik wurde die Produktionsrate von Methylmyxochelin A über HPLC-MS nach 10 und 20 Minuten bestimmt. Mit Hilfe der *SigmaPlot*-Software konnten die Parameter $K_M = 65,5 \pm 14,1 \mu\text{M}$, $V_{\text{max}} = 527 \pm 29 \text{ nM}/\text{min}$, $k_{\text{cat}} = 0,065 \pm 0,003 \cdot \text{s}^{-1}$ und $k_{\text{cat}} / K_M = 1027 \pm 191 \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ berechnet werden. Abbildung 3-23 zeigt die Kinetik der Myxochelin-*O*-Methyltransferase MXAN_2296 nach Michaelis-Menten.

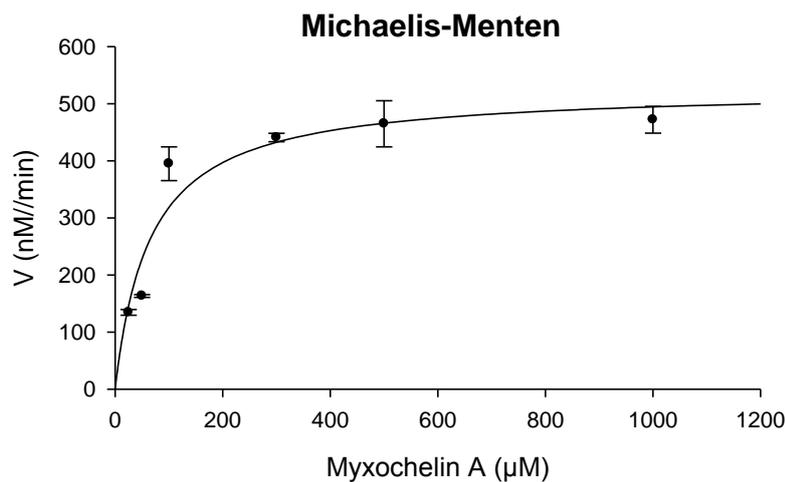


Abbildung 3-23: Michaelis-Menten-Kinetik der Myxochelin-*O*-Methyltransferase MXAN_2296, V = Reaktionsgeschwindigkeit.

3.1.5. Homologievergleich der Myxochelin-*O*-Methyltransferase mit anderen Catechol-*O*-Methyltransferasen

Aufgrund ihrer Eigenschaft als *O*-Methyltransferase gegenüber dem Catechol-Siderophor Myxochelin A wurde MXAN_2296 einem Homologievergleich mit bakteriellen, pflanzlichen und tierischen Catechol-*O*-Methyltransferasen (COMTs) unterzogen. Dazu wurden *ClustalW*-Alignments mit den entsprechenden Gruppen erstellt. Erstaunlicherweise weist MXAN_2296 nur eine geringe Homologie zu bakteriellen COMTs auf. Zur COMT SafC (NCBI RefSeq: AAC44130.1), der Saframycin Mx1-Biosynthese aus *Myxococcus xanthus*, besteht nur 13% Identität und 21% Homologie. Ähnlich verhält es sich mit den charakterisierten COMTs SaOMT5 (*S. avermitilis* MA-4680, NCBI RefSeq: NP_827014.1, 11% Identität, 21% Homologie) und ScOMT1 (*S. coelicolor* A3(2), NCBI RefSeq: NP_626585.1, 12% Identität, 22% Homologie) aus Streptomyceten sowie SynOMT (GenBank: BAA10567.1, 13% Identität, 24% Homologie) aus dem Cyanobakterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. Wie erwartet ist die Ähnlichkeit zur COMT des Menschen (GenBank: AAA68927.1, 11% Identität, 25% Homologie) und der Ratte (GenBank: AAA40882.1, 9% Identität, 19% Homologie) ebenfalls gering.

Die größte Homologie zeigt MXAN_2296 bemerkenswerterweise zu pflanzlichen COMTs (durchschnittlich 24% Identität und 41% Homologie), zu denen Caffeoyl-3-*O*-Methyltransferasen (CAOMTs), Flavonoid-*O*-Methyltransferasen (FIOMTs) und *ortho*-Diphenol-*O*-Methyltransferasen (oDOMTs) gehören (Abbildung 3-24 und Tabelle 3-1).

3. Methylmyxocheline

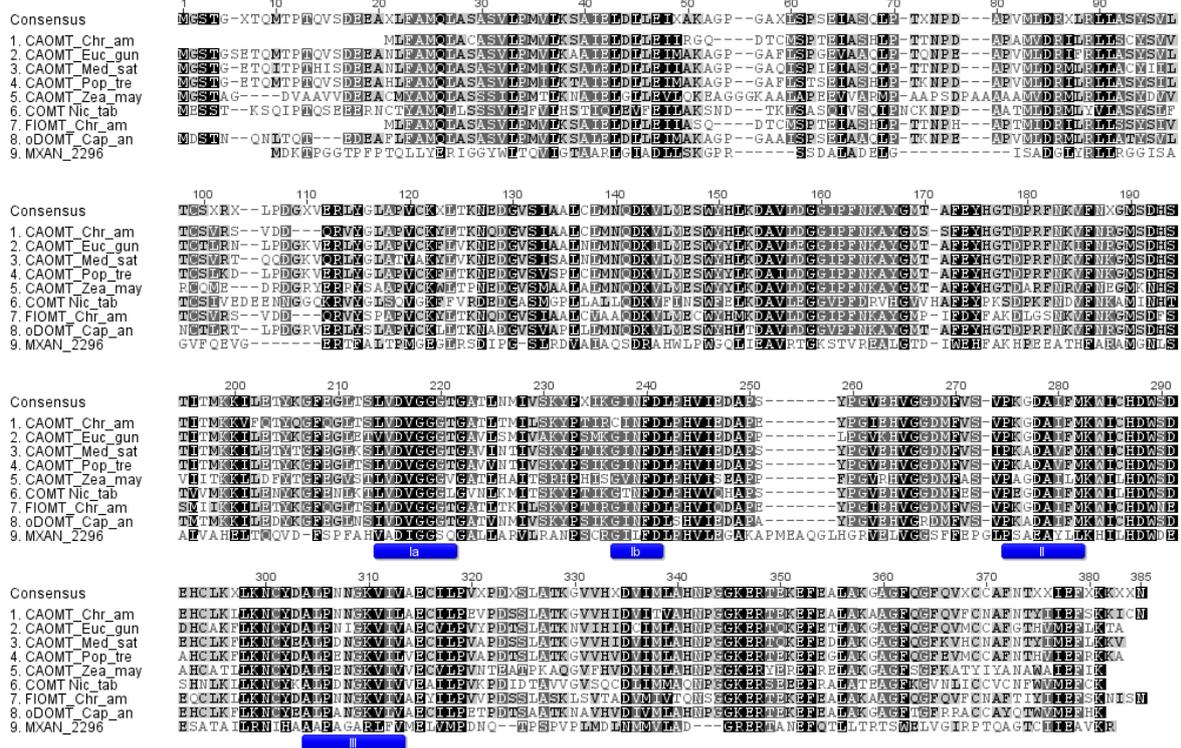


Abbildung 3-24: ClustalW-Alignment von MXAN_2296 mit pflanzlichen Catechol-O-Methyltransferasen. CAOMTs aus *Chrysosplenium americanum* (GenBank: AAA86982.1), *Eucalyptus gunnii* (GenBank: CAA52814.1), *Medicago sativa* (GenBank: AAB46623.1), *Populus tremuloides* (GenBank: AAB61731.1), *Zea mays* (GenBank: AAB03364.1), COMT aus *Nicotiana tabacum* (GenBank: CAA50561.1), FIOMT aus *Chrysosplenium americanum* (GenBank: AAA80579.1), oDOMT aus *Capsicum annum* (GenBank: AAC17455.1). Ia, Ib, II und III (blau): Motive SAM-abhängiger Methyltransferasen nach Kagan²³⁷.

Catechol-O-Methyltransferase	GenBank-Nr.	% Identität	% Homologie
CAOMT_Chr_am	AAA86982.1	23	40
CAOMT_Euc_gun	CAA52814.1	24	42
CAOMT_Med_sat	AAB46623.1	23	41
CAOMT_Pop_tre	AAB61731.1	24	42
CAOMT_Zea_may	AAB03364.1	25	39
COMT_Nic_tab	CAA50561.1	21	41
FIOMT_Chr_am	AAA80579.1	24	42
oDOMT_Cap_an	AAC17455.1	24	41

Tabelle 3-1: Sequenzidentität und -homologie von MXAN_2296 mit pflanzlichen Catechol-O-Methyltransferasen aus Abbildung 3-24.

3. Methylmyxocheline

methyliert. Wie die HPLC-MS-Chromatogramme in Abbildung 3-26 belegen, konnten keine Methylmyxochelin B repräsentierenden Peaks mit m/z $[M+H]^+ = 418,1$ detektiert werden. Die Retentionszeitdifferenzen der Myxochelin B - Peaks zwischen dem unteren Chromatogramm und den beiden oberen Chromatogrammen entstanden durch die Verwendung unterschiedlicher Gradienten.

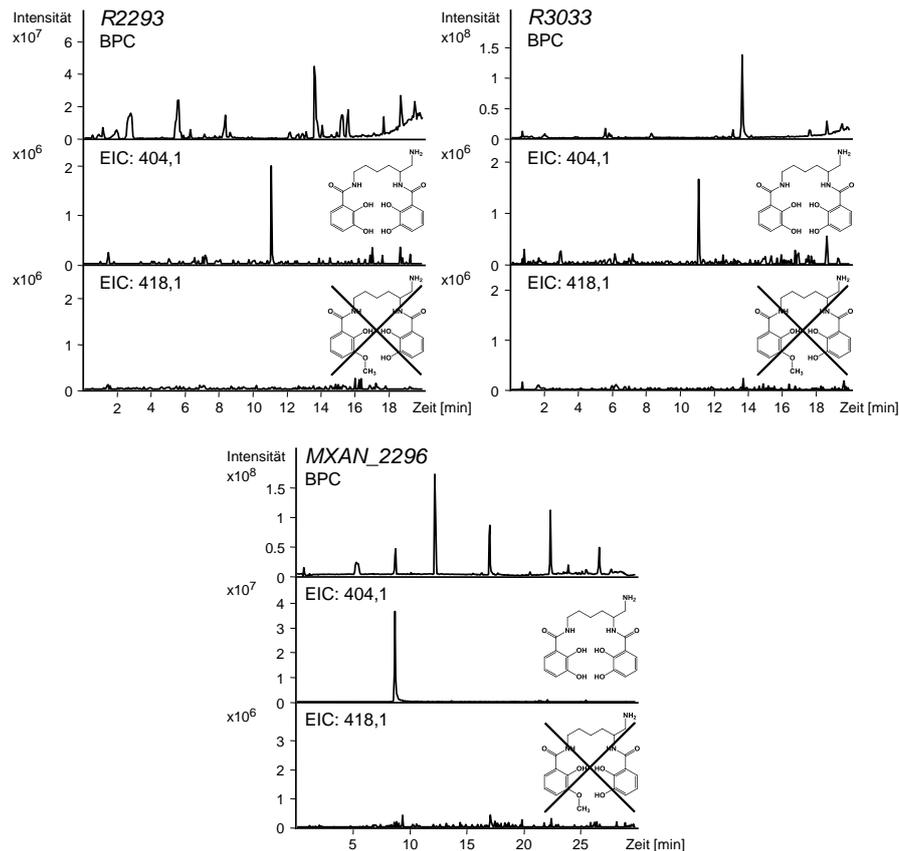


Abbildung 3-26: Methyltransferase-Assays mit den löslichen Proteinfraktionen von R2293, R3033 und der Myxochelin-*O*-Methyltransferase MXAN_2296 gegenüber Myxochelin B. BPC: Basepeak Chromatogramm positiver Modus, $m/z = 100 - 1100$; EIC: Extracted Ion Chromatogramm m/z $[M+H]^+ = 404,1$ von Myxochelin B und m/z $[M+H]^+ = 418,1$ von Methylmyxochelin B.

3.1.8. Genetische Modifikation und Analyse von Inaktivierungsmutanten

Bei Betrachtung der genetischen Umgebung von *mxan_2296* im annotierten Genom von *M. xanthus* DK1622²⁸ wird ein Genlocus erkannt, der eine Funktion im bakteriellen Eisenstoffwechsel besitzen könnte (Abbildung 3-27 und Tabelle 3-2). Dabei wäre es möglich, dass das für ein Membranprotein kodierende Gen *mxan_2295* für den Transport

von Siderophoren oder Eisenionen verantwortlich ist. Desweiteren fällt *mxan_2297* auf, das sich in gleicher Leserichtung vor *mxan_2296* befindet. Das Gen liegt jedoch nicht im selben Leserahmen wie *mxan_2296* und ist somit nicht transkriptionell mit dem Methyltransferase-Gen gekoppelt. Außerdem zeigte eine *BLASTp*-Suche mit *MXAN_2297* lediglich Homologien zu hypothetischen, nicht definierten bakteriellen Proteinen. Eine daraufhin durchgeführte Suche nach konservierten Domänen in *MXAN_2297* in der *NCBI Conserved Domains Database* identifizierte eine *Chromosome Segregation Protein SMC (Structural Maintenance Of Chromosomes)*-Domäne (TIGR02168) DNA-bindender Proteine des Zellzyklus. Einen Bezug zur Eisenhomöostase wurde somit weitestgehend ausgeschlossen und von einer Inaktivierung des Gens abgesehen. Im Folgenden sollten *knock out* - Mutanten beider Gene, *mxan_2295* und *mxan_2296*, untersucht werden.

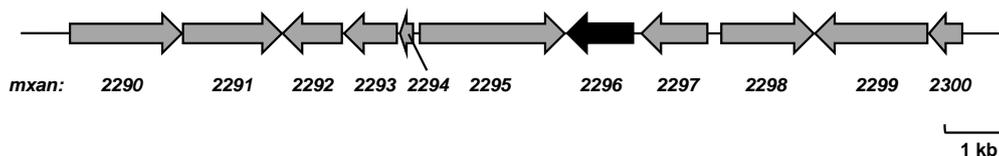


Abbildung 3-27: Genetische Umgebung von *mxan_2296*.

<i>mxan_</i>	Annotation
2290	putative lipoprotein
2291	hypothetical protein
2292	putative lipoprotein
2293	hypothetical protein
2294	hypothetical protein
2295	putative membrane protein
2296	O-methyltransferase
2297	hypothetical protein
2298	asnC asparaginyI-tRNA synthetase
2299	putative lipoprotein
2300	MerR family protein (transcript. reg.)

Tabelle 3-2: Annotationen zur genetischen Umgebung von *mxan_2296*.

Knock out - oder Inaktivierungsmutanten können durch Plasmidintegration hergestellt werden. Dazu wird ein Sequenzteilbereich des zu inaktivierenden Gens über PCR amplifiziert und in einen Selektionsmarker tragenden Vektor kloniert. Nach Transformation des Plasmids in *M. xanthus* DK1622 kreuzt dieses über den amplifizierten Bereich durch homologe Rekombination ein und führt formal zu einer Unterbrechung der kodierenden Sequenz (Abbildung 3-28). Dies führt zu fehlerhafter Transkription des gewünschten Gens bzw. zu nicht- oder teilfunktionellen Nonsense-Proteinen.

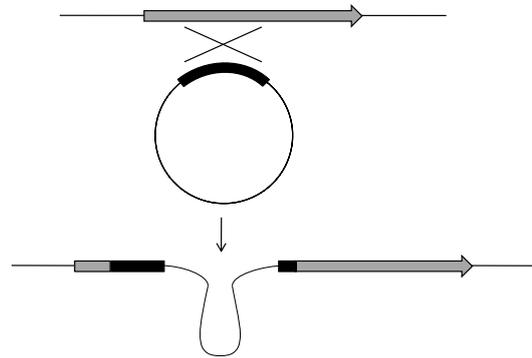


Abbildung 3-28: Inaktivierung eines chromosomalen Gens (grau) durch Plasmidintegration über homologe Rekombination des amplifizierten Bereichs (schwarz) resultierend in zwei inkompletten Genfragmenten.

Eine *Knock out* - Mutante des Methyltransferase-Gens *mxan_2296* wurde auf diese Weise bereits im Zuge von Identifizierungsversuchen im Rahmen der Diplomarbeit erzeugt²¹⁰. Die TK2296 benannte Mutante wurde rekultiviert und zusammen mit *M. xanthus* DK1622 in Triplikaten bezüglich der Methylmyxochelin A - Produktion analysiert. Wie aus Abbildung 3-29 zu entnehmen, ist die Produktion von Methylmyxochelin A in der Mutante im Vergleich zum Wildtyp um fast 95 % reduziert. Eine vollständige Unterbindung der Methylierung wurde über die Inaktivierung jedoch nicht erreicht.

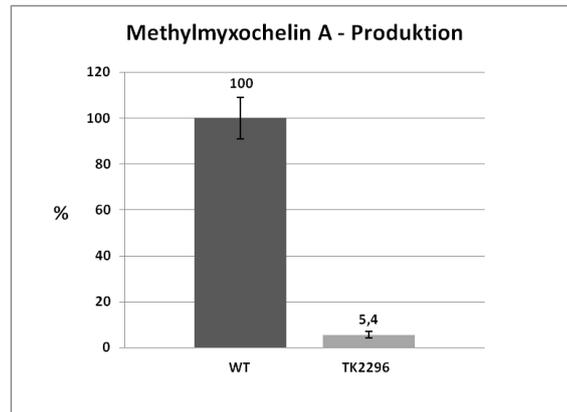


Abbildung 3-29: Relative Myochelin A-Produktion von Wildtyp (WT) und der *M. xanthus* DK1622-Mutante TK2296.

Zur Inaktivierung des 2,2 kbp großen Gens *mxan_2295* wurden Primer designt, die über den *forward*-Primer einen *frameshift* und über den *reverse*-Primer ein Stoppcodon einführen. Mit diesen wurde ein 603 bp-Fragment über PCR mit genomischer DNA aus *M. xanthus* DK1622 amplifiziert, welches anschließend in pCR[®] 2.1-TOPO[®] kloniert und in *E. coli* DH10B transformiert wurde (Abbildung 3-30).

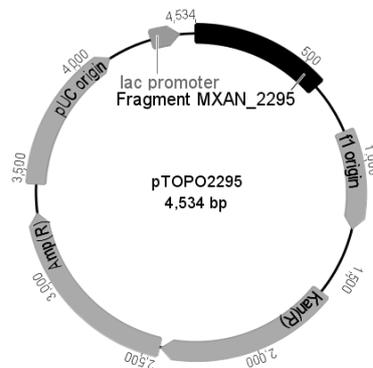


Abbildung 3-30: Plasmidkarte von pTOPO2295.
Kan(R): Kanamycin-Resistenzgen, Amp(R): Ampicillin-Resistenzgen.

Aus der so erhaltenen Mutante DH10B2295 wurde das Plasmid pTOPO2295 aufgereinigt und die korrekte Integration des Amplifikats durch einen Kontrollverdau mit *EcoRI* und *BglII* über die zu erwartenden Fragmentgrößen von 622 bp, 982 bp und 2931 bp verifiziert. Abbildung 3-31 stellt die Agarosegele jeweils doppelter Ansätze von PCR und Kontrollverdau dar.

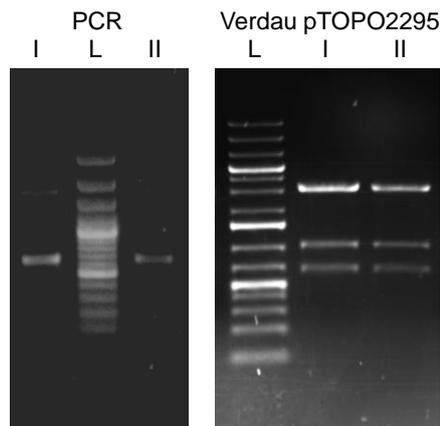


Abbildung 3-31: Agarosegelelektrophorese nach PCR von *mxan_2295* und Verdau von pTOPO2295. L: GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (links) und GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (rechts), I/II: PCR-Ansatz 1 und 2 mit zugehörigem Verdau der resultierenden PCR-Produkte.

Das fertige Inaktivierungsplasmid pTOPO2295 wurde daraufhin in *M. xanthus* DK1622 elektrotransformiert. Trotz intensiver experimenteller Bemühungen zur Transformation unter variierenden Versuchsbedingungen konnten keine positiven Klone ermittelt werden.

3.1.9. Produktionsanalysen von *M. xanthus* DK1622

Einen wichtigen Hinweis auf die Funktion der Methylmyxocheline in der Eisenaufnahme kann die produzierte Menge der Methylderivate innerhalb und außerhalb der Zellen geben. Zu deren Untersuchung wurden Kulturtriplikate des Wildtypes erstellt und die Zellen und das XAD-16 aus dem Kulturmedium getrennt analysiert. Es ist zu erwarten, dass die Methylmyxochelin- und Myxochelinmengen durch deren Bindung an das Adsorberharz im Laufe der Kultivierung kumulieren und aus dem Medium extrahiert werden. Somit repräsentiert die XAD-16-Fraktion den (Methyl-)Myxochelin-Anteil im Medium. Der direkte Vergleich der extrahierbaren Metabolitmengen des XAD-16 mit denen der Zellen ist jedoch aufgrund der Kumulation nicht möglich. Eine Relativierung gelingt aber, wenn die Verhältnisse von Methylmyxochelin- zu Myxochelinmengen verglichen werden, da diese unabhängig von der Gesamtmenge einer jeden Fraktion (Zelle vs. XAD-16) sind. Untersucht wurden die Methylmyxochelin A / Myxochelin A-Peakflächenverhältnisse. Abbildung 3-32 zeigt, dass dieses Verhältnis außerhalb der Zellen deutlich größer ist

(\approx Faktor 7) als in den Zellen. D.h., ein Großteil des Methylmyxochelin A wird ins Medium sezerniert.

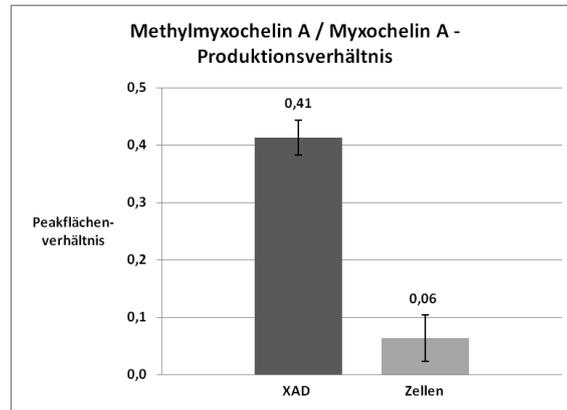


Abbildung 3-32: Methylmyxochelin A / Myxochelin A-Produktionsverhältnisse in Medium (XAD) und Zellen.

Nachfolgend sollte überprüft werden, ob eine Abhängigkeit der Methylmyxochelin-Biosynthese von der Eisenverfügbarkeit im umgebenden Medium existiert. Dazu wurden ebenfalls Triplikate von *M. xanthus* DK1622, diesmal in Vollmedium (CTT-Medium) und mittels Chelex[®] eisenreduziertem Medium (CTT Fe low) kultiviert. Zellen und XAD-16 wurden zusammen extrahiert und zunächst die Peakflächenverhältnisse, korrigiert auf die jeweilige OD₆₀₀, der methylierten und nichtmethylierten Siderophorspezies in CTT-Medium und CTT Fe low-Medium untereinander verglichen (Abbildung 3-33). Dabei steigt erwartungsgemäß die relative Produktion der Myxocheline A und B unter Eisenmangel an, deutlich zu erkennen bei Myxochelin A (\approx Faktor 4), während die Mengen an gebildeten Methylmyxochelin A und B um mehr als die Hälfte reduziert sind. Anhand der Fehlerindikatoren jeder Datenreihe sind jedoch starke Schwankungen der Produktionslevel aller Spezies zwischen einzelnen Kulturen erkennbar, die erfahrungsgemäß stets zu beobachten sind. Diese Schwankungen lassen sich reduzieren, wenn wie in Abbildung 3-32 die gemittelten Methylmyxochelin/Myxochelin-Peakflächenverhältnisse der Triplikate betrachtet werden. Aus Abbildung 3-34 geht hervor, dass die Produktion von Methylmyxochelin A und B unter Eisenmangelbedingungen ebenfalls signifikant reduziert und hin zur Bildung von Myxochelin A / B verschoben ist. Damit scheinen für *M. xanthus* unter Eisenmangel die nichtmethylierten Myxocheline die bevorzugten und geeigneteren Siderophore zur Eisenversorgung darzustellen.

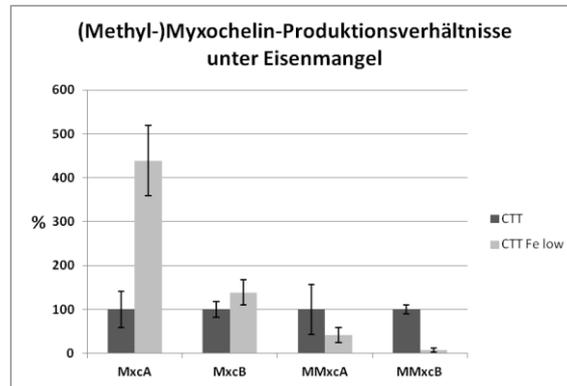


Abbildung 3-33: Relative Produktion von Myxochelin A (MxcA), Myxochelin B (MxcB), Methylmyxochelin A (MMxcA) und Methylmyxochelin B (MMxcB) in Vollmedium (CTT) und eisenreduziertem Medium (CTT Fe low).

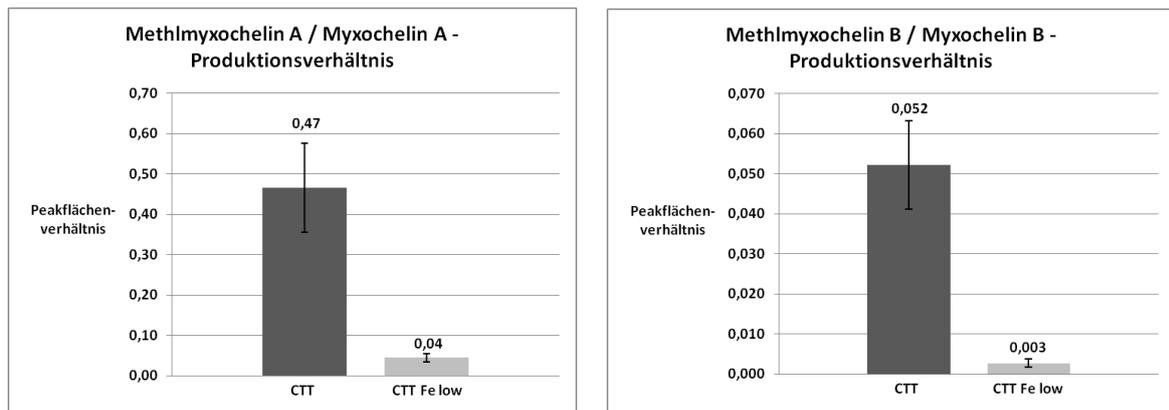


Abbildung 3-34: Produktionsverhältnisse von Methylmyxochelin A / Myxochelin A und Methylmyxochelin B / Myxochelin B in Vollmedium (CTT) und eisenreduziertem Medium (CTT Fe low).

3.2. Diskussion

3.2.1. Identifizierung und Charakterisierung der Myxochelin-*O*-Methyltransferase

Die Übertragung von Methylgruppen aus SAM im Sinne von *O*-, *C*- oder *N*-Methylierungen diverser Substrate ist ein weit verbreiteter Prozess der Natur zum Zwecke der Biosynthese, Signaltransduktion oder Genregulation²⁴⁰. Zur Identifizierung eines SAM-abhängigen Enzyms, das Myxochelin A methyliert, war es zunächst notwendig einen Assay zu entwickeln, der die Umsetzung zu Methylmyxochelin A in Gegenwart von SAM aus einem nativen Proteingemisch oder einer aufgereinigten Fraktion erkennen lässt. Ein solcher Methyltransferase-Assay konnte während der gesamten aktivitätsbasierten Trennung die jeweils relevanten Fraktionen über die HPLC-MS-Detektion des methylierten Produktes aufzeigen. Myxochelin A wurde als Substrat ausgewählt, da Methylmyxochelin A das prominentere Derivat der beiden Methylmyxocheline in Extrakten darstellt (persönliche Beobachtung) und aufgrund der bereits beschriebenen Synthese bereitgestellt werden konnte^{97,212}. Zur Aufreinigung von SAM-abhängigen (Catechol-*O*-)Methyltransferasen aus bakteriellen, pflanzlichen und tierischen Matrices sind diverse Verfahren in der Literatur beschrieben. Zu den Fraktionierungsschritten gehören Ammoniumsulfat-Fällung, Gelfiltration, Ionenaustausch-Chromatographie, Hydrophobe-Interaktionschromatographie (HIC) und Affinitätschromatographie^{230,241-246}. In Vorversuchen wurde bei Verwendung von Kationen- als auch Anionenaustauschern schlechte chromatographische Trennung und Aktivitätsverlust beobachtet. Die verbleibenden Verfahrensschritte wurden so gewählt, dass sie die vorliegenden Proteinmengen trennbar machten. Nach einer klassischen Vorfraktionierung über Ammoniumsulfat-Fällung folgte die Trennung über eine Gelfiltrationssäule, die die Reinigung im 50-100 mg-Maßstab erlaubte. Die Affinitätschromatographie über Adenosin-Agarose wurde als letzter Schritt gewählt, nach Gelfiltration und HIC. Proteinreinigungen auf der Grundlage von SAM-Affinität werden zum einen als erste chromatographische Stufe (*capture step*) aber auch zuletzt (*polishing step*) eingesetzt^{243,244,246}. Ausgehend von der Tatsache, dass im Genom von *M. xanthus* DK1622 alleine 65 annotierte Methyltransferasen und 16 annotierte SAM-abhängige Proteine vorliegen²⁸, erschien die Affinitätschromatographie als *capture step* wenig sinnvoll und eine zuvorige Trennung basierend auf Größe und Polarität plausibler. Gerade dieser letzte Schritt bewies sich als entscheidend. Vollständig konnte die *O*-Methyltransferase nicht aufgereinigt werden.

Aufgrund der geringen erhaltenen Fraktionsmenge war eine weitere Trennung nicht möglich. Die wenig komplexe, aufgereinigte Fraktion erlaubte jedoch ihre Identifizierung über MALDI-TOF-MS, eine der bewährtesten Methoden zur Proteinidentifizierung aus SDS-PAGE-Gelen durch Korrelation der gewonnenen Peptid-MS-Daten mit Sequenzdatenbanken^{247,248}.

Drei Methyltransferasen wurden gefunden, von denen MXAN_2296 und MXAN_3033 die konservierten Motive der SAM-Bindestelle besitzen²³⁷. MXAN_2293, annotiert als *hypothetical protein*, konnte eine Methyltransferase-Domäne (pfam04672) zugeordnet werden. Alle Proteine wurden erfolgreich in *E. coli* exprimiert.

Im Methyltransferase-Assay bewies MXAN_2296 eine deutliche Aktivität gegenüber Myxochelin A, nicht aber gegenüber Myxochelin B. Die beiden übrigen potenziellen Methyltransferasen waren inaktiv. Die offenbar hohe Spezifität von MXAN_2296 für das Lysinol-Siderophor wurde aufgrund der sehr ähnlichen Struktur der beiden Myxocheline nicht erwartet. Eine relative Quantifizierung in Extrakten von TK2296, eine Inaktivierungsmutante des Gens *mxan_2296*, und *M. xanthus* DK1622 zeigte eine Reduktion der Methylmyxochelin A-Produktion um ca. 95% in der Mutante im Vergleich zum Wildtyp. Schlussfolgernd muss mindestens eine zweite Methyltransferase existieren, die weniger spezifisch ist und Myxochelin A als auch B methyliert.

MXAN_2296 kann somit als Myxochelin A-*O*-Methyltransferase bezeichnet werden. In der genetischen Umgebung des für das 36,8 kDa große Protein kodierenden Bereichs werden außer einem für ein Membranprotein kodierenden Genlocus (*mxan_2295*) keine mit der Eisenhomöostase im Zusammenhang stehenden Gene gefunden. Ein Inaktivierungsversuch von *mxan_2295* wurde unternommen, blieb jedoch ergebnislos. Vermutlich ist der *knock out* des Gens für *M. xanthus* letal, zumal die Methode bereits mehrmals erfolgreich in dem Myxobakterium angewendet wurde²¹⁰.

Bakterielle Catechol-*O*-Methyltransferasen sind selten. Zu den wenigen charakterisierten Beispielen gehören SafC aus *Myxococcus xanthus*, SaOMT5 aus *S. avermitilis* MA-4680, ScOMT1 aus *S. coelicolor* A3(2), eine COMT aus *S. griseus* und SynOMT aus *Synechocystis* sp. PCC 6803^{241,249-252}. Die Myxochelin A-*O*-Methyltransferase MXAN_2296 ist jedoch die erste bisher in der Literatur beschriebene Siderophor-Catechol-*O*-Methyltransferase. Das Enzym konnte anhand einer Michaelis-Menten-Kinetik charakterisiert und die Parameter $K_M = 65,5 \pm 14,1 \mu\text{M}$, $V_{\max} = 527 \pm 29 \text{ nM/min}$, $k_{\text{cat}} = 0,065 \pm 0,003 \cdot \text{s}^{-1}$ und $k_{\text{cat}}/K_M = 1027 \pm 191 \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ bestimmt werden. Der K_M -Wert von

MXAN_2296 ist mit den üblichen Werten bakterieller COMTs ($K_M \approx 5 - 140 \mu\text{M}$) vergleichbar. Nur das *S. griseus*-Enzym stellt mit mehr als $500 \mu\text{M}$ die Ausnahme dar. Der k_{cat} -Wert und V_{max} sind deutlich niedriger als die der genannten Methyltransferasen. Ein k_{cat} deutlich kleiner 1 und Maximalgeschwindigkeiten im nanomolaren Bereich sind jedoch nicht ungewöhnlich und beispielsweise bei der menschlichen und bei pflanzlichen COMTs beschrieben^{242,253,254}. Das große k_{cat} / K_M -Verhältnis spricht für eine hohe Spezifität des Enzyms.

Die Sequenz von MXAN_2296 besitzt nur eine geringe Homologie zu bakteriellen und tierischen COMTs, aber eine relative hohe Homologie (41%) zu pflanzlichen COMTs. Dazu gehören *O*-Methyltransferasen, deren Substrate Kaffeesäure und 5-Hydroxyferulasäure, Vorstufen der Ligninbiosynthese und Flavonoide sind²⁵⁴⁻²⁵⁸. Pflanzliche *O*-Methyltransferasen können in zwei Gruppen unterschieden werden. Zur Gruppe I gehören Caffeoyl-CoA-3-*O*-Methyltransferasen (CCoAOMTs), die bevorzugt CoA-Ester methylieren, zur Gruppe II gehören Caffeoyl-3-*O*-Methyltransferasen (CAOMTs) und weitere COMTs, die freie Säuren, deren CoA-Ester und andere Catechole umsetzen^{259,260}. MXAN_2296 ist homolog zu Gruppe I, während SafC, SaOMT5, ScOMT1 und SynOMT zu Gruppe II homolog sind. SafC, SaOMT5 und SynOMT akzeptieren CoA-Ester als Substrate, wobei außer bei SafC die natürlichen Substrate unbekannt sind²⁴⁹⁻²⁵². Womöglich lassen sich auch bakterielle COMTs anhand ihrer Akzeptanz gegenüber Thioester gebundener Substrate unterscheiden.

Homologe der Myxochelin A-*O*-Methyltransferase wurden in den Myxobakterien *Myxococcus fulvus* HW-1 (LILAB_19190), *Stigmatella aurantiaca* DW4/3-1 (STAU_5710) und *Sorangium cellulosum* So ce56 (sce1219) gefunden. Die größte Sequenzübereinstimmung lag bei LILAB_19190 (88% Identität, 95% Homologie) gefolgt von STAU_5710 (52% Identität, 66% Homologie) vor. Dass es sich bei sce1219 um eine potenzielle Myxochelin A-*O*-Methyltransferase ist aufgrund der geringen Homologie unwahrscheinlich (20% Identität, 36% Homologie). Extrakte von *Stigmatella aurantiaca* DW4/3-1, Sg a15, *Sorangium cellulosum* So ce56, So ce90 und *Myxococcus xanthus* DK897 wurden auf Methylmyxocheline untersucht (Daten nicht gezeigt). Der Stamm *M. fulvus* HW-1 war nicht in der Stammsammlung vorhanden. In keinem der Myxobakterien konnten die Methylderivate gefunden werden. Gründe hierfür können sein, dass die Produktmengen unter das Detektionslimit fallen, die Proteine unter Laborbedingungen nicht exprimiert werden oder nicht aktiv sind, obwohl bei allen Homologen die

Methyltransferase-Motive vorhanden sind. Ursache könnte auch ein schneller Abbau der unfunktionellen Myxocheline sein. Unter Umständen sind Methylmyxocheline sogar auf die Stämme *M. xanthus* DK1622 und DK1050 begrenzt, was ein weiteres Kuriosum myxobakterieller Biosynthesevielfalt darstellen würde.

3.2.2. Die Funktion von Methylmyxochelinen bei der Eisenhomöostase in *Myxococcus xanthus* DK1622

Eine wesentliche Grundlage für die Beurteilung der Funktion von Methylmyxochelinen bei der Eisenaufnahme und -freisetzung stellen die koordinationschemischen Eigenschaften der Eisenkomplexe beider Spezies dar. Hierzu wurden von S. Wilbrand potentiometrische und $^1\text{H-NMR}$ -Titrations sowie Eisenauflöseexperimente mit Myxochelin A und Methylmyxochelin A durchgeführt²¹². Diese ergaben für beide Siderophore die vorwiegende Bildung von Eisenkomplexen im Verhältnis Metall zu Ligand von 1 : 1 und damit einkernigen Komplexen. Bei Myxochelin A dominierte im neutralen bis leicht basischen Bereich der MLH_4 -Komplex aus dem an den Catecholgruppen vollständig (4-fach) deprotonierten Myxochelin A (= L) und Fe(III) (= M). Aufgrund der 3'-O-Methylgruppe kann Methylmyxochelin A den MLH_4 -Komplex nicht bilden und verbleibt auf der Stufe des MLH_3 -Komplexes, der bereits ab pH 1,7 gebildet wird. Ab pH = 4,1 wurde eine Instabilität des Ferri-Methylmyxochelins A beobachtet durch die Bildung eines Niederschlags von $\text{Fe}(\text{OH})_3$. Die bevorzugte Koordination vorläuft bei Ferri-Myxochelin A über beide Catechol-Positionen, während bei Ferri-Methylmyxochelin A eine Veränderung der Koordinationsstruktur des vierzähligen Komplexes erfolgt. Die Methylierung führt hier zur Koordination des zentralen Fe(III) über eine Salicyl- und eine Catecholposition und belegt damit die erwartete Verschiebung entsprechend der Ergebnisse mit Enterobactin-Derivaten (Abbildung 3-35)²¹¹.

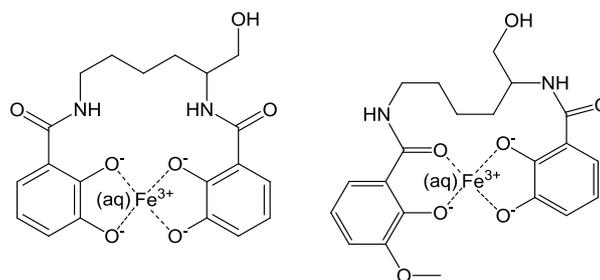


Abbildung 3-35: Koordination von Ferri-Myxochelin A und Ferri-Methylmyxochelin A²¹².

Über diskontinuierliche spektrophotometrische Titrations sowie Eisenauflöseexperimente konnten die Stabilitätskonstanten und pM-Werte der beiden Komplexe berechnet werden. Der pM-Wert beschreibt den negativ dekadischen Logarithmus der Konzentration von nicht komplexiertem Fe(III) bei pH = 7,4, $[\text{Fe(III)}]_{\text{total}} = 1 \mu\text{M}$ und $[\text{L}]_{\text{total}} = 10 \mu\text{M}$ ¹⁵⁸. Dabei ergaben sich für Ferri-Myxochelin A (MLH₄) ein logK = 31,4 und ein pM = 19,6 und für Ferri-Methylmyxochelin A (MLH₃) ein logK = 25,7 und ein pM = 19,2. Methylmyxochelin A löst gegenüber Ferrihydrit bei pH = 5,3 91 % und bei pH = 6,1 83 % des von Myxochelin A gebundenen Fe(III). Die pM-Werte wurden jedoch nur berechnet und nicht durch Titration bei physiologischen pH-Wert ermittelt. Die insgesamt gering unterschiedlichen Werte zeigen, dass die verbleibende koordinierende Catechol-Position in Methylmyxochelin A unter den gewählten Versuchsbedingungen einen deutlichen Anteil zur Stabilität der Eisenkomplexe beiträgt, so dass das Methylderivat nur einen geringfügig schlechteren Eisenchelator im Vergleich zu Myxochelin A darstellt. Die Stabilitätskonstanten und pM-Werte von Myxochelin A und Methylmyxochelin A sind mit denen von anderen Biscatechol-Siderophoren (Amonabactin: logK = 34,5, pM = 25,8) und Hydroxamat-/Carboxylat-Siderophoren (Pyoverdin: logK = 30,8, pM = 27,0; Desferrioxamin B: logK = 30,5, pM = 25,0; Aerobactin: logK = 22,9, pM = 23,3; Rhizoferrin: logK = 25,3, pM = 20,0) vergleichbar^{158,261-264}. Die Instabilität des Ferri-Methylmyxochelin A - Komplexes und das Ausfällen von Fe(OH)₃ bei pH ≥ 4,1 ist sicherlich ein konzentrationsabhängiger Prozess und wird bei den niedrigen Fe(III)- und Siderophor-Konzentrationen in den Zellen und dem natürlichen Habitat von Myxobakterien nicht der limitierende Faktor sein. Somit ist auch das methylierte Myxochelin A ein ausreichend starkes Siderophor zur Komplexierung von Fe(III). Da sich die A-Derivate von Myxochelin B bzw. Methylmyxochelin B nur in einer funktionellen

Gruppe des Siderophor-Rückgrates unterscheiden, sollten ähnliche Stabilitätskonstanten von diesen ermittelt werden können. Unter Umständen könnten leichte Abweichungen aufgrund von Löslichkeitsunterschieden eines Amins gegenüber einem Alkohol auftreten.

Ergänzend sollte an dieser Stelle bedacht werden, dass die stabilitätsrelevanten Parameter der Komplexe im Rahmen von *in vitro*-Experimenten und abgeleiteten Berechnungsmodellen ermittelt wurden, denen definierte Versuchsbedingungen, etwa die Messung in einer einfach zusammengesetzten Matrix, zu Grunde liegen. Die tatsächlichen koordinationschemischen Eigenschaften der Ferri-Myxocheline können sich unter physiologischen Bedingungen im intrazellulären Milieu, z.B. infolge Komplexbildung mit (Membran-)Proteinen anders darstellen.

Basierend auf den hier erhaltenen Ergebnissen kann geschlussfolgert werden, dass die Methylierung von Myxochelinen nicht allein die Freisetzung des Eisens aus dem Komplex bewirkt. Methylmyxocheline könnten modifizierte Siderophore sein, die von der Zelle als Chelatoren zur Eisenaufnahme genutzt werden. Diese Hypothese wird untermauert durch die Beobachtung, dass unter Eisenmangelbedingungen deutlich weniger Methylmyxocheline gebildet werden als unter suffizienter Versorgung. Würde die Eisenfreisetzung aus dem Myxochelin-Eisenkomplex nur durch Methylierung erfolgen, sollte die dadurch gebildete Methylmyxochelinmenge mit der erhöhten Myxochelinproduktion steigen oder diese sogar übertreffen, sie wird jedoch unter diesen Bedingungen kleiner. Außerdem ist der Methylmyxochelin-Anteil außerhalb der Zellen größer als innerhalb. Das Ausschleusen eines vergleichbar starken Komplexbildners, der nach Methylierung zur Eisenfreisetzung in der Zelle keinen Zweck erfüllen würde, bedeutete im extrazellulären Substrat eine Konkurrenzbedingung gegenüber den Myxochelinen selbst. Eine erhöhte extrazelluläre Methylmyxochelin-Konzentration kann jedoch so gedeutet werden, dass Myxochelin und Methylmyxochelin vergleichbar effizient aus der Zelle transportiert werden, wohingegen die Ferri-Myxochelin-Komplexe spezifischer zur Aufnahme erkannt werden. Dies könnte durch Aufnahmeexperimente mit radioaktiv markierten Eisenkomplexen der beiden Derivate belegt werden. Auch würde es gegebenenfalls energetisch keinen Sinn ergeben, ein Siderophor zu biosynthetisieren, nach Komplexbildung zu methylieren und das Methylderivat nicht zu recyceln, sondern aus der Zelle zu schleusen. Methylmyxocheline könnten so vorkoordinierte Zwischenstufen zur Eisenfreisetzung darstellen und durch Demethylierung teilweise wiedergewonnen werden. Hierzu bedarf es jedoch eigener Enzyme und Cofaktoren. Das kleinere Methylmyxochelin-

Produktionslevel unter Eisenmangel könnte damit Folge eines intensivierten Recyclings via Demethylierung sein. Eine eisensensorische Regulation der Methylierung von Myxochelinen ist aufgrund der eisenabhängigen Produktion und der eventuell Bevorzugung der etwas stärkeren und ggf. stabileren unmethylierten Siderophore möglich. Eine Fur-Box vor dem kodierenden Bereich der Myxochelin A-O-Methyltransferase wurde jedoch nicht gefunden²⁰⁸.

3.2.3. Hypothese zur Eisenfreisetzung aus Ferri-(Methyl-)Myxochelinen

Die Reduktion von Fe(III)-Siderophoren zu Fe(II)-Siderophoren ist der häufigste und als am wahrscheinlichsten angenommene Mechanismus zur Eisenfreisetzung, da die resultierenden Fe(II)-Komplexe deutlich instabiler sind als deren oxidierte Varianten¹⁹⁵. Für eine Vielzahl von Hydroxamat- und Carboxylat-Siderophore wie Ferrioxamine, Ferrichrome, Ferri-Coprogen, Ferri-Pyoverdin und Ferri-Aerobactin sind Ferri-Siderophor-Reduktasen beschrieben worden^{197,199,265-267}. Der reduktive Prozess ist thermodynamisch und elektrochemisch zwar nicht bevorzugt, jedoch plausibel, da die Redoxpotentiale dieser Siderophore (-336 mV bis -510 mV NHE) nahe der Redoxpotentiale der biologischen Reduktionsäquivalente NAD(P)H/NAD(P)⁺ (-324 mV NHE) und Flavohydrochinon/Flavosemichinon (-400 mV NHE) liegen^{158,262,263,268,269}. Im Gegensatz hierzu scheinen die extrem negativen Redoxpotentiale von Triscatecholat-Siderophoren wie Ferri-Enterobactin (-990 mV NHE) eine Reduktion im zellulären Milieu unmöglich zu machen, so dass deren Hydrolyse über Esterasen (Fes bzw. BesA) einen alternativen Freisetzungsmechanismus darstellt^{193,194,211}. Die These der alleinigen hydrolytischen Freisetzung galt als valide bis zur Entdeckung von ViuB, einem SIP (*Siderophore-Interacting Protein*) aus *Vibrio cholerae*, welches das nicht hydrolysierbare Triscatecholat-Siderophor Vibriobactin umsetzt²⁷⁰. SIPs gehören zur Superfamilie der NAD(P)H:Flavin-Oxidoreduktasen und besitzen strukturelle Ähnlichkeit zu Ferredoxin-Reduktasen (FNR)^{271,272}. Miethke *et al.* haben in einer exzellenten Untersuchung SIPs auf Basis der Proteinsequenzen klassifiziert und anhand des ViuB-Homologen YqjH aus *E. coli* einen mechanistischen Einblick in den reduktiven Prozess dieser Ferri-Siderophor-Reduktasen gegeben²⁷³. Dabei konnte YqjH die Fe(III)-Komplexe der Hydrolyseprodukte von Enterobactin und Bacillibactin, aber auch Ferri-Enterobactin selbst und Ferri-Vibriobactin

in vitro reduzieren. Die Reduktion erfolgt über einem Zweistufen-Austausch- oder Ping-Pong-Mechanismus: Zunächst reduziert NADPH SIP-gebundenes, oxidiertes FAD⁺ zum FAD-Hydrochinon. Von diesem aus findet der Elektronentransfer zum SIP-gebundenen Fe(III)-Siderophor statt, infolgedessen das FAD-Semichinon entsteht. Das reduzierte Fe(II)-Siderophor diffundiert ab und ein zweites Fe(III)-Siderophor bindet und wird durch das verbleibende FAD-Semichinon reduziert, sodass FAD⁺ gebildet wird und der Zyklus über NADPH-Verbrauch von vorne beginnt. Insgesamt werden pro Zyklus zwei Elektronen an zwei Ferri-Siderophore übertragen.

Aus diesen Erkenntnissen erfolgt schlussfolgernd *in vivo* die Eisenfreisetzung aus hydrolysierbaren Triscatecholat-Siderophoren wahrscheinlich durch Reduktion der resultierenden zwei- und vierzähligen Komplexe. Gleichzeitig ist auch die Reduktion von Komplexen mit stark negativem Redoxpotential enzymatisch möglich und gibt eine Erklärung für die Umsetzung nicht hydrolysierbarer Triscatecholat-Siderophore wie Vibriobactin. Diese These belegend konnte ferner gezeigt werden, dass die Bindung von Ferri-Enterobactin an YqjH eine Potentialverschiebung zu -585 mV NHE bewirkt. Die Bildung ternärer Komplexe und das Abfangen von freigesetztem Fe(II) durch Fe(II)-bindende Proteine in der Zelle ist verantwortlich für die Verschiebung des Redoxpotentials zu positiveren Werten in den Bereich der biologischen Reduktionsäquivalente^{267,273-275}. Desweiteren scheinen SIPs nicht nur verantwortlich für die reduktive Eisenfreisetzung aus Catecholat-Siderophoren, sondern sogar spezifisch für diese Siderophorklasse zu sein^{273,274}. Ferri-Myxocheline als Biscatecholat-Siderophore könnten prinzipiell durch SIPs reduziert werden und dadurch die Freisetzung von Eisen als Fe(II) in der Zelle vollziehen. Dieser Prozess bedeutete zusätzlich einen geringeren Redox-Stress als die Freisetzung von Fe(III) durch Methylierung oder Hydrolyse alleine verursachen würde. Tatsächlich sind in den Myxochelin-Biosynthese-Genclustern von *Myxococcus xanthus* DK1622, *Stigmatella aurantiaca* Sg a15 und *Sorangium cellulosum* So ce56 die ViuB-Homologe MXAN_3639 und MxcB (*S. aurantiaca*, *S. cellulosum*) zu finden^{28,162,167}. Ein Alignment von MXAN_3639 (29,9 kDa) mit 13 bakteriellen ViuB-Homologen zeigt 32% Identität und 46% Homologie zu den Proteinen und ordnet es der Gruppe II nach Miethke zu (Abbildung 3-36). Dieser SIP-Gruppe fehlt die C-terminale α -Helix der Gruppe I, stattdessen tragen die Sequenzen eine N-terminale Erweiterung. Zur Gruppe II gehören Enzymvertreter aus Enterobakterien und Pseudomonaden inklusive dem untersuchten YqjH²⁷³.

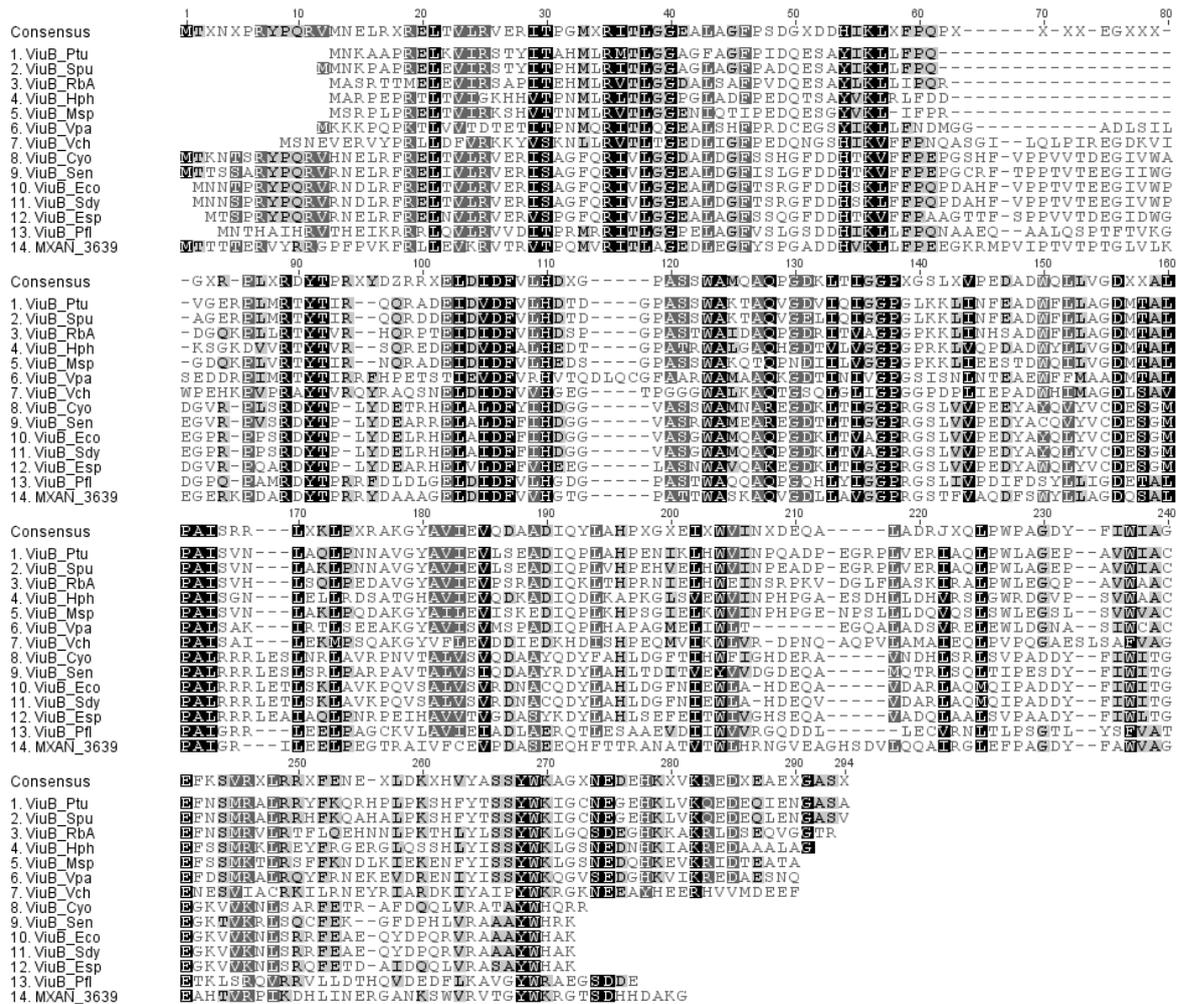


Abbildung 3-36: ClustalW-Alignment des SIP MXAN_3639 mit bakteriellen ViuB-Homologen. ViuB_Ptu (*Pseudoalteromonas tunicata*, NCBI RefSeq: WP_009840407.1), ViuB_Spu (*Shewanella putrefaciens* CN-32, NCBI RefSeq: YP_001181611.1), ViuB_RbA (*Rhodopirellula baltica* SH 1, NCBI RefSeq: NP_870000.1), ViuB_Hph (*Hoeflea phototrophica*, NCBI RefSeq: WP_007197583.1), ViuB_Msp (*Marinomonas* sp. MWYL1, NCBI RefSeq: YP_001341041.1), ViuB_Vpa (*Vibrio parahaemolyticus*, NCBI RefSeq: WP_017447051.1), ViuB_Vch (*Vibrio cholerae* O395, GenBank: AAB86829.1), ViuB_Cyo (*Citrobacter youngae*, NCBI RefSeq: WP_006687976.1), ViuB_Sen (*Salmonella enterica*, NCBI RefSeq: WP_017465430.1), ViuB_Eco (*Escherichia coli* str. K-12, NCBI RefSeq: NP_417541.1), ViuB_Sdy (*Shigella dysenteriae*, NCBI RefSeq: WP_001065897.1), ViuB_Esp (*Enterobacter* sp. 638, NCBI RefSeq: YP_001178233.1), ViuB_Pfl (*Pseudomonas fluorescens*, NCBI RefSeq: WP_017526298.1).

Mutationsanalysen und die Kristallstruktur von YqjH ergaben ein konserviertes Lysin und zwei konservierte Arginine in der Nähe der FAD-Bindestelle, die für die Bindung des Catecholats und vermutlich auch für die Elektronenübertragung essentiell sind^{272,273}. Dies steht im Einklang mit den konservierten Aminosäuren der Bindetasche des SBPs (*Siderophore Binding Protein*, siehe Einleitung) FeuA für Triscatechol-Siderophore²⁷⁶. In einem weiteren Alignment von MXAN_3639 mit SIP-Vertretern der Gruppe II konnten das FAD-Bindemotiv in Analogie zu Ferredoxin-Reduktasen und die konservierten

3. Methylmyxocheline

Aminosäuren Lysin56, Arginin134 und Arginin257 (bezogen auf MXAN_3639) für das myxobakterielle ViuB-Homologe bestimmt werden^{273,277-279} (Abbildung 3-37).

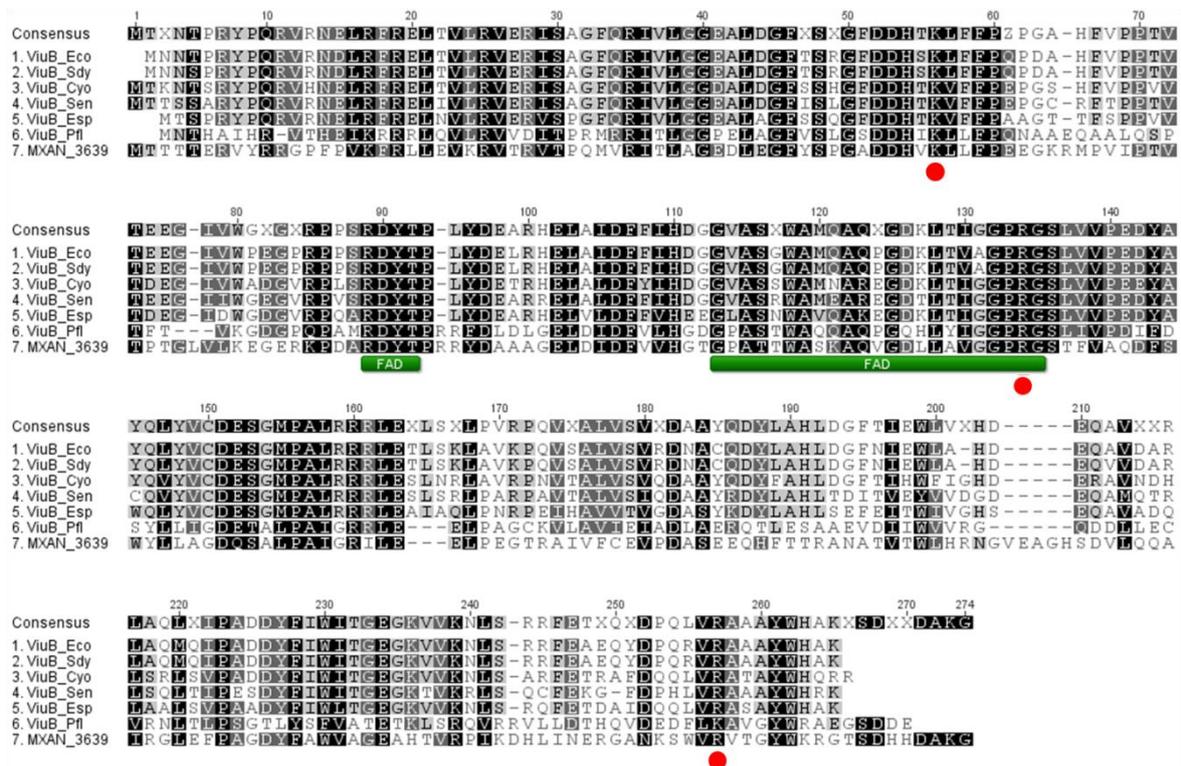


Abbildung 3-37: ClustalW-Alignment des SIP MXAN_3639 mit ViuB-Homologen der Gruppe II (aus Abbildung 3-36). Grün: FAD-Bindemotiv, rot: konservierte basische Aminosäuren zur Bindung von Catechol-Siderophoren.

Damit ist MXAN_3639 ein potenzieller Kandidat für die reduktive Eisenfreisetzung aus Ferri-Myxochelinen. Außerdem wurde vor dessen kodierenden Bereich eine Fur-Box gefunden und ist wie YqjH Fur-reguliert, so dass diesem Protein mit hoher Wahrscheinlichkeit eine bedeutende Rolle in der Eisenhomöostase zukommt^{208,280}. Die Redoxpotentiale von vierzähligen Liganden (Biscatechol-Siderophore wie Myxochelin) sind allgemein höher (positiver) als die von sechszähligen Liganden (wie Triscatechol-Siderophore), so dass eine Reduktion durch MXAN_3639 begünstigt würde²⁷⁵. Cyclovoltammetrische Messungen von Ferri-Myxochelin A konnten nur bei pH 2,2 gegen eine Goldelektrode durchgeführt werden. Lediglich das Reduktionssignal (ca -10 mV) von Ferri-Myxochelin A konnte bestimmt werden. Das Oxidationssignal war nicht erkennbar und zeugt von einem instabilen Fe(II)-Komplex. Um die Werte mit anderen Siderophoren

zu vergleichen, müssen Messungen im neutralen Bereich vorliegen, die jedoch im Rahmen der durchgeführten Untersuchungen zu nicht aussagekräftigen Signalen führten²¹². Da Siderophore mit niedrigen pM-Werten höhere Redoxpotentiale besitzen als jene mit höheren pM-Werten, sollte das Redoxpotential von Myxochelin A (pM = 19,6) deutlich positiver sein als das von Enterobactin (pM = 35,5). Aus einer linearen Beziehung zwischen dem Redoxpotential und den pM-Werten verschiedener Siderophore lässt sich ein grober Erwartungswert von ca. -350 mV bis -400 mV NHE für Myxochelin A ableiten²⁷⁵. Für eine reduktive Eisenfreisetzung aus (Methyl-)Myxochelinen in *M. xanthus* und wahrscheinlich auch in den anderen Myxochelin-Produzenten spricht auch die Entdeckung einer Ferri-Siderophor-Reduktase aus *Azotobacter vinelandii*, die Azotochelin, das Carbonsäure-Analogon (Myxochelinsäure) der Myxocheline, reduziert. Der enzymatischen Reduktion liegt der Ping-Pong-Mechanismus von YqjH zu Grunde¹⁹⁸. Leider ist der kodierende Bereich bzw. die Proteinsequenz der Reduktase unbekannt, so dass keine Homologievergleiche mit SIPs unternommen werden können. Es könnte sich jedoch um einen Vertreter dieser Catechol-Siderophor-Reduktasen handeln. Um die Reduktion von Ferri-Myxochelinen und Ferri-Methylmyxochelinen durch das myxobakterielle SIP letztlich zu belegen, ist die Untersuchung der Umsetzung dieser mit heterolog exprimiertem MXAN_3639 über UV-Vis- und Redox-Titrationen analog zu den durchgeführten Analysen nach Miethke in Aussicht zu stellen²⁷³. Ein Vergleich der Enzymkinetiken zur Reduktion von Fe[III] aus Ferri-Myxochelin und Ferri-Methylmyxochelin-Komplexen sowie der Redoxpotentiale der beiden Komplexe könnte desweiteren Aufschluss darüber geben, ob Methylmyxocheline eine erforderliche Zwischenstufe im Prozess der kontrollierten Eisenfreisetzung darstellen.

4. Neue Sekundärmetabolitfamilien aus *Jahnella thaxteri* SBSr007 und *Chondromyces* sp. SBCm009

4.1. Ergebnisse

4.1.1. *Jahnella thaxteri* SBSr007

4.1.1.1. Zielsubstanzen und Ausbeuten

Der Stamm SBSr007 wurde im 100 L-Maßstab unter Anwesenheit von XAD-16 fermentiert, das Adsorberharz von den Zellen abgetrennt und ein methanolischer Extrakt gebildet. Dieser wurde über UPLC-HR-MS und der *TargetAnalysis*-Software auf bekannte myxobakterielle Naturstoffe hin untersucht. Dabei wurden hinsichtlich übereinstimmender exakter Masse und Retentionszeit mit der Referenzdatenbank keine der darin enthaltenen Substanzen identifiziert. Anschließend wurde der Extrakt mit Hilfe der erhaltenen LC-MS-Daten auf für die Isolierung in Frage kommende Substanzen analysiert. Kriterium hierfür waren eine Molekülionenmasse größer als $m/z = 400$ der monoprotinierten Spezies, um die Isolierung von Primärmetaboliten zu vermeiden, und eine ausreichende Peakgröße, die in der Regel abhängig von den Eigenschaften des Analyten mit einer entsprechenden Substanzmenge im Extrakt korreliert. Drei Komponenten mit den Massen $m/z [M+H]^+ = 473$, $m/z [M+H]^+ = 782$ und $m/z [M+H]^+ = 904$ wurden hierbei für die Aufreinigung festgelegt und zunächst mit TKcpd473, TKcpd782 und TKcpd904 benannt (Abbildung 4-1).

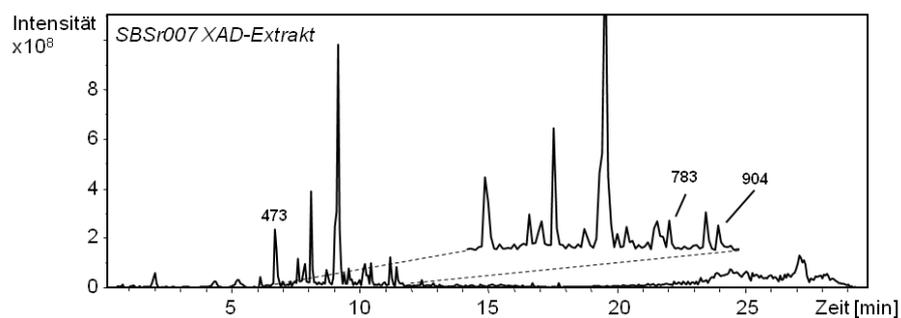


Abbildung 4-1: Basepeak-Chromatogramm positiver Modus, $m/z = 100 - 1100$, des XAD-Extrakts von *Jahnella thaxteri* SBSr007 und Markierung der Zielkomponenten-Peaks.

Für jede Spezies wurde durch HR-MS die exakte Masse bestimmt und daraus mit dem Programm *DataAnalysis* mögliche Summenformeln abgeleitet. Akzeptiert wurde eine maximale Massenabweichung von 5 ppm und ein Sigma-Wert von 25 mSigma (MilliSigma). Der Sigma-Wert beschreibt, in welchem Maße die gemessene Masse und das Isotopenmuster des Moleküliions von theoretischer Masse und Isotopenmuster jenes Moleküliions abweicht, welches der ermittelten Formel zu Grunde liegt²⁸¹. Mit den erzeugten Summenformeln (in unprotonierter Form) wurde eine *SciFinder*-Datenbanksuche nach bereits bekannten Naturstoffen durchgeführt.

TKcpd904: m/z [M+H]⁺ = 904,44568				
Summenformel [M+H]⁺	Masse [Da] [M+H]⁺	 Δppm 	mSigma	<i>SciFinder</i>-Eintrag / CAS-Nr.
C ₄₅ H ₆₆ N ₃ O ₁₆	904,44376	2,1	5,4	
C ₄₂ H ₅₈ N ₁₃ O ₁₀	904,44241	3,6	5,9	Kein Eintrag
C ₄₃ H ₅₄ N ₁₇ O ₆	904,44375	2,1	7,4	
C ₄₆ H ₆₂ N ₇ O ₁₂	904,44510	0,6	8,5	Dolastatin 13 (<i>Dolabella auricularia</i> /Seehase): 125310-66-9
C ₄₀ H ₄₆ N ₂₇	904,44240	3,7	11,8	Kein Eintrag
C ₄₀ H ₅₈ N ₁₇ O ₆ S	904,44712	1,6	14,9	
TKcpd782: m/z [M+H]⁺ = 782,40856				
C ₃₅ H ₅₂ N ₁₃ O ₈	782,40563	3,7	4,5	
C ₃₈ H ₆₀ N ₃ O ₁₄	782,40698	2,0	4,7	Kein Eintrag
C ₃₆ H ₄₈ N ₁₇ O ₄	782,40697	2,0	10,0	
C ₃₉ H ₅₆ N ₇ O ₁₀	782,40832	0,3	10,9	
TKcpd473: m/z [M+H]⁺ = 473,20320				
C ₂₄ H ₂₅ N ₈ O ₃	473,20441	2,6	13,7	Oligopeptide
C ₂₃ H ₂₉ N ₄ O ₇	473,20308	0,3	24,4	Kein Eintrag

Tabelle 4-1: Exakte Massen der Zielkomponenten aus *Jahnella thaxteri* SBSr007, berechnete Summenformeln und zugehörige *SciFinder*-Datenbankeinträge.

Das Depsipeptid Dolastatin 13 aus *Dolabella auricularia* (Seehase) konnte der Formel $C_{46}H_{61}N_7O_{12}$ von TKcpd904 zugeordnet werden. Allerdings schien es unwahrscheinlich, dass der aus einer Nacktschnecke isolierte Naturstoff ebenfalls von einem Mykobakterium produziert wird. Im Fall von TKcpd782 konnten keine Einträge und von TKcpd473 lediglich einige synthetische Oligopeptide gefunden werden (Tabelle 4-1). Alle drei Substanzen wurden daher für die Isolierung ausgewählt.

Nach den in Kapitel 2.19.2.3. beschriebenen Reinigungsschritten konnten die Zielsubstanzen erfolgreich isoliert werden. Die Abbildung 4-2 zeigt die UPLC-HR-MS-Basepeak-Chromatogramme der jeweiligen Fraktionen. Es wurden von TKcpd904 10,3 mg, von TKcpd782 2,7 mg und von TKcpd473 2,6 mg erhalten, von denen in einem nächsten Schritt ihre chemische Struktur aufgeklärt wurde.

Dabei stellte sich heraus, dass es sich bei den Substanzen aus *Jahnella thaxteri* SBSr007 um eine Substanzfamilie mit einem gemeinsamen Tetrapeptidteil handelt. Diese wurden mit dem Namen Thaxteramide benannt und wie im nachfolgenden Kapitel der Strukturaufklärung vorgenommen unterteilt. Die Bezeichnung Thaxteramide wird deshalb mit dem Beginn des nächsten Kapitels verwendet.

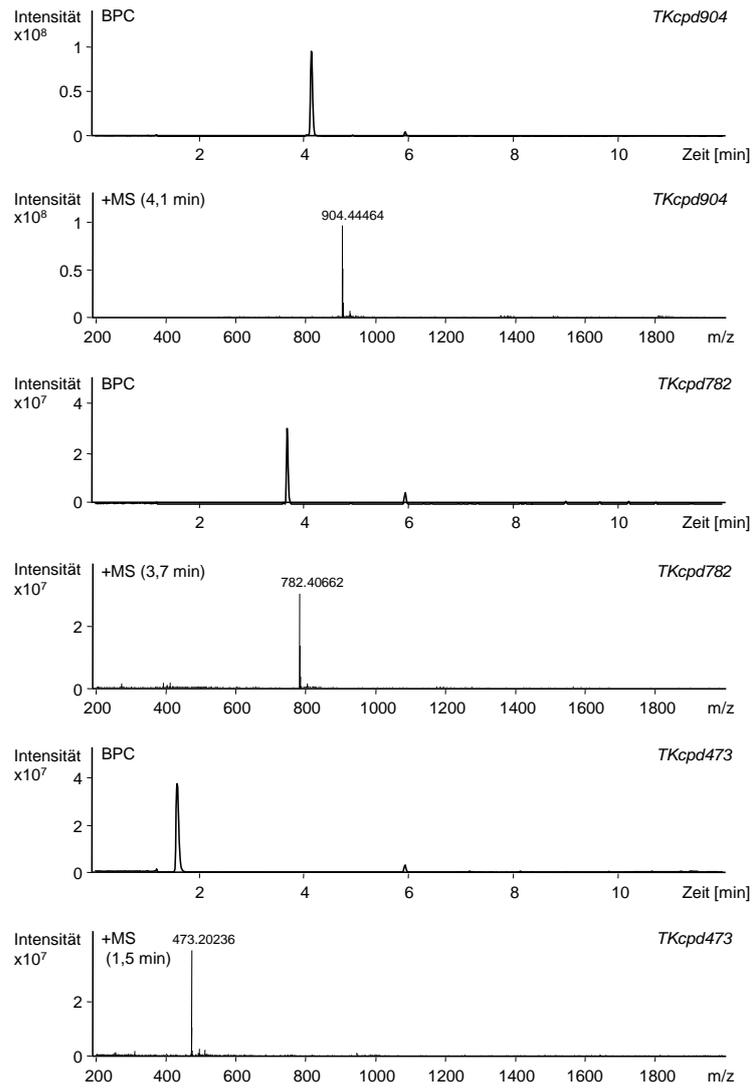


Abbildung 4-2: Basepeak-Chromatogramme positiver Modus, $m/z = 200 - 2000$, und HR-Massenspektren der gereinigten Substanzen TKcpd904, TKcpd782 und TKcpd473.

4.1.1.2. Strukturaufklärung

TKcpd904: Thaxteramid A

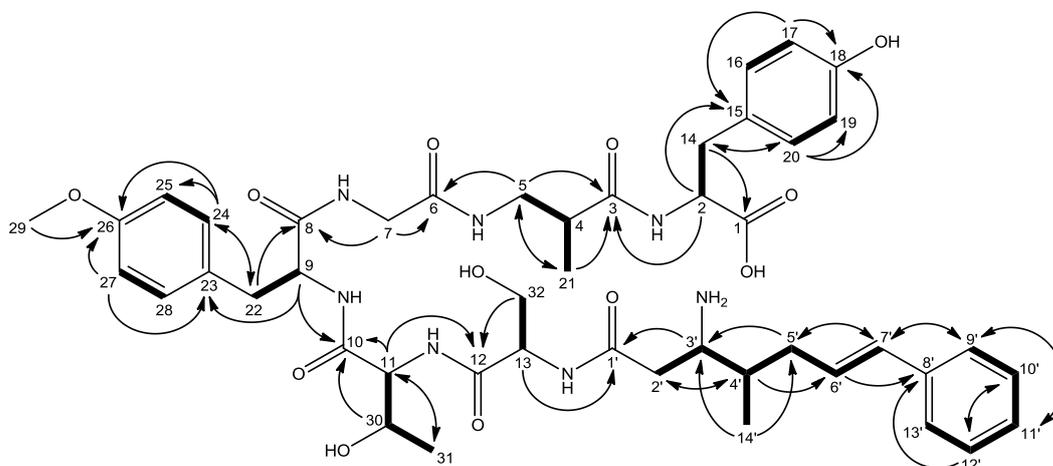


Abbildung 4-3: Struktur von Thaxteramid A mit ausgewählten ^1H - ^1H -COSY- (*fett*) und HMBC-Korrelationen (*Pfeile*).

Die NMR-Messungen von Thaxteramid A wurden mit der in Methanol- d_4 gelösten Substanz durchgeführt. Im Protonenspektrum sind im Bereich von $\delta_{\text{H}} = 0,9 - 4,6$ ppm Signale von aliphatischen Protonen zu erkennen. 2 Signale olefinischer und 7 Signale aromatischer Protonen zeigen eine chemische Verschiebung von $\delta_{\text{H}} = 6,0 - 7,5$ ppm (Tabelle 4-2). Über Korrelationen im HMBC-Spektrum und im 2D-TOCSY-Spektrum ergeben sich 6 Aminosäureeinheiten und eine Seitenkette mit 2 Spinsystemen. Die Struktur des peptidischen Gerüsts wird nachfolgend, beginnend vom C-Terminus, für jede Aminosäure und anschließend die Seitenkette anhand der NMR-Daten beschrieben.

2D-TOCSY-Korrelationen sind für die Protonengruppe bei $\delta_{\text{H}} = 2,83$ ppm, $\delta_{\text{H}} = 3,14$ ppm und $\delta_{\text{H}} = 4,48$ ppm zu finden und belegen ein gemeinsames Spinsystem der C-terminalen Tyrosineinheit. Das Dublett vom Dublett bei $\delta_{\text{H}} = 4,48$ ppm stammt von H-2, dem α -Proton, die beiden anderen Resonanzen von der benachbarten Methylengruppe. HMBC-Korrelationen der Protonen H-14 nach C-1 ($\delta_{\text{C}} = 178,50$ ppm) zeigen eine Carboxylfunktion an dieser Position an. Zwei Protonengruppen, H-16 und H-20 ($\delta_{\text{H}} = 7,05$ ppm) sowie H-17 und H-19 ($\delta_{\text{H}} = 6,67$ ppm) können dem Phenylrest zugeordnet werden. Die Zugehörigkeit zur Tyrosineinheit wird durch die wechselseitigen HMBC-Korrelationen von H-16 / H-20 nach C-14 ($\delta_{\text{C}} = 38,15$ ppm) und von H-14 nach C-16 / C-20 ($\delta_{\text{C}} = 131,31$ ppm) belegt. Die Positionen der aromatischen Kohlenstoffatome C-15 (δ_{C}

= 130,29 ppm), C-17 / C-19 ($\delta_C = 115,89$ ppm) und C-18 ($\delta_C = 156,95$ ppm) können durch Korrelationen der aromatischen Wasserstoffatome im HMBC- und HSQC-Spektrum festgelegt werden. Der Tieffeldverschiebung des Kohlenstoffatoms C-18 und der Beobachtung der Ringprotonensignale als Dubletts ($^3J = 8,4$ Hz) ist eine Hydroxyfunktion in para-Position des Phenylrestes zu entnehmen.

Auf die Tyrosineinheit folgt eine α -Methyl- β -Alanineinheit. Diesem konnten die Signale der miteinander koppelnden Protonen H-4 ($\delta_H = 2,56$ ppm), H-5 ($\delta_H = 3,11$ ppm, $\delta_H = 3,30$ ppm) und H-21 ($\delta_H = 0,96$ ppm) aus dem 2D-TOCSY-Spektrum zugeordnet werden. Die chemischen Verschiebungen der α - und β -Protonen und jeweiligen Kohlenstoffatome C-4 ($\delta_C = 41,37$ ppm) und C-5 ($\delta_C = 44,0$ ppm) sprechen für das Vorliegen einer β -Aminosäure²⁸². Durch COSY- und HMBC-Korrelationen der genannten Protonen kann die Methylierung an der α -Position bewiesen werden. Erwartungsgemäß spaltet das Signal der CH₃-Gruppe in ein Dublett ($^3J = 6,9$ Hz) auf. Die Verknüpfung der α -Methyl- β -Alanin mit der Tyrosineinheit sowie mit einer Glycineinheit konnte durch die HMBC-Korrelationen von H-2 bzw. H-5 mit C-3 ($\delta_C = 176,58$ ppm) und H-5 mit C-6 ($\delta_C = 171,66$ ppm) bestimmt werden.

Die Signale bei $\delta_H = 3,72$ ppm, $\delta_H = 3,88$ ppm und $\delta_C = 43,50$ ppm stammen von der CH₂-Gruppe der Glycineinheit. Die Protonen korrelieren mit zwei Carbonylkohlenstoffatomen, den Kernen C-6 ($\delta_C = 171,66$ ppm) und C-8 ($\delta_C = 174,0$ ppm). Letzter ist Teil einer *O*-Methyl-Tyrosineinheit.

Entsprechend der C-terminalen Tyrosineinheit sind für diese Teilstruktur im ¹H-NMR-Spektrum ein Signal des α -Protons H-9 ($\delta_H = 4,56$ ppm) als Dublett vom Dublett ($^3J = 5,2$ Hz / $9,7$ Hz), zwei Signale der Methylengruppe (H-22, $\delta_H = 2,88$ ppm, $\delta_H = 3,12$ ppm) und zwei Signale der Ringprotonen H-24 / H-28 ($\delta_H = 7,15$ ppm) und H-25 / H-27 ($\delta_H = 6,81$ ppm) zu detektieren. Die Dubletts der aromatischen Protonen ($^3J = 8,5$ Hz) implizieren eine para-Substitution, die komplementär zu der Tyrosinstruktur ist. Die Kohlenstoffatome der Carbonylgruppen C-8 und C-10 ($\delta_C = 172,79$ ppm) des Peptidgrundgerüsts können durch HMBC-Korrelationen der Protonen H-22 und H-9 gezeigt werden. Aus den HMBC-Korrelationen von H-9 und H-25 / H-27 geht das quartäre Kohlenstoffatom C-23 ($\delta_C = 130,46$ ppm) hervor. Außerdem werden heteronukleare Korrelationen der Protonen H-22, H-24 / H-28 und H-25 / H-27 gefunden, die die Abfolge der Phenylkohlenstoffatome C-24 / C-28 ($\delta_C = 131,30$ ppm), C-25 / C-27 ($\delta_C = 114,75$ ppm) und C-26 ($\delta_C = 159,98$ ppm)

erklären. Für die Verschiebung von C-26 in den Tieffeldbereich ist das benachbarte Sauerstoffatom verantwortlich. Desweiteren treten die Resonanzen einer Methylgruppe bei $\delta_{\text{H}} = 3,75$ ppm und $\delta_{\text{C}} = 55,52$ ppm auf. Die Singulettstruktur des Protonensignals, die chemische Verschiebung und die HMBC-Korrelation mit C-26 gehen mit einer Methoxyfunktion in para-Position konform.

N-terminal ist die *O*-Methyl-Tyrosineinheit mit einer Threonineinheit verknüpft. Zu den Protonensignalen gehören ein Dublett bei $\delta_{\text{H}} = 4,22$ ppm (H-11), ein Multipllett bei $\delta_{\text{H}} = 4,20$ ppm (H-30) und ein Dublett bei $\delta_{\text{H}} = 1,06$ ppm (H-31), für die im COSY-Spektrum vicinale Kopplungen gefunden werden. Das Signal von C-30 ($\delta_{\text{C}} = 67,74$ ppm) kann der HSQC-Korrelation von H-30 entnommen werden. Dessen chemische Verschiebung deutet auf eine Hydroxylgruppe an Position 30 hin. Die Methylgruppe kann durch wechselseitige HMBC-Korrelationen von H-11 nach C-31 ($\delta_{\text{C}} = 20,07$ ppm) und H-31 nach C-11 ($\delta_{\text{C}} = 60,38$ ppm) gezeigt werden. Für eine Threoninstruktur sprechen ebenfalls die beiden Dublettaufspaltungen von H-11 ($^3J = 3,6$ Hz) und H-31 ($^3J = 5,3$ Hz), die die Nachbarschaft zu nur einem Proton kennzeichnen. Desweiteren sind im HMBC-Spektrum Korrelationen von H-11 und H-30 zum Carbonylkohlenstoffatom C-10 und von H-11 zu C-12 ($\delta_{\text{C}} = 173,16$ ppm), der Carbonylgruppe der anschließenden Serineinheit, zu beobachten.

Drei Signale der Serinprotonen werden im ^1H -NMR-Spektrum gefunden, die im 2D-TOCSY-Spektrum ein gemeinsames Spinsystem bilden. Dabei handelt sich um ein Signal von H-13 bei $\delta_{\text{H}} = 4,42$ ppm und zwei Signale von H-32 bei $\delta_{\text{H}} = 3,79$ ppm und $\delta_{\text{H}} = 3,89$ ppm. Die Triplett-Signalstruktur des α -Protons ist durch die vicinale Kopplung mit den Methylenprotonen erklärbar. Die chemische Verschiebung von C-32 ($\delta_{\text{C}} = 62,39$ ppm) verweist auf die β -Hydroxylfunktion. HMBC-Korrelationen von H-32 nach C-12 und von H-13 nach C-1' ($\delta_{\text{C}} = 173,53$ ppm) ordnen diesem Strukturteil den N-Terminus des Peptidgerüsts zu.

C-1' stellt das Carbonylkohlenstoffatom eines 3-Amino-4-methyl-7-phenyl-6-heptensäurerestes dar, das ebenfalls durch eine HMBC-Korrelation von H-3' ($\delta_{\text{H}} = 3,63$ ppm) gezeigt werden kann. Das Signal des mit H-3' verbundenen Kohlenstoffatoms C-3' erscheint im HSQC-Spektrum bei $\delta_{\text{C}} = 53,36$ ppm und deutet auf die Aminofunktion in β -Position hin. Die Signale von H-2' ($\delta_{\text{H}} = 2,70$ ppm, $\delta_{\text{H}} = 2,78$ ppm), H-4' ($\delta_{\text{H}} = 2,09$ ppm), H-5' ($\delta_{\text{H}} = 2,19$ ppm, $\delta_{\text{H}} = 2,37$ ppm), H-6' ($\delta_{\text{H}} = 6,22$ ppm) und H-7' ($\delta_{\text{H}} = 6,49$ ppm) bilden

zusammen mit H-3' die Gruppe der Heptensäurekette. Die Sequenz der C-Kette kann mit den zugehörigen COSY- und HMBC-Korrelationen von C-2 nach C-7 bestimmt werden. Dabei sprechen die chemischen Verschiebungen und die Signalstrukturen von H-6' (Dublett vom Triplet, $^3J = 7,2 \text{ Hz} / 15,8 \text{ Hz}$) und H-7' (Dublett, $^3J = 15,8 \text{ Hz}$) als olefinische Protonen für eine Doppelbindung zwischen C-6' und C-7' mit *trans*-Konfiguration. Ein Dublett ($\delta_{\text{H}} = 1,05 \text{ ppm}$ $^3J = 5,7 \text{ Hz}$) stammt von der Methylgruppe an Position 14', dessen Verknüpfung mit C-4' ($\delta_{\text{C}} = 36,91 \text{ ppm}$) durch HMBC-Korrelationen nach C-3' und C-5' ($\delta_{\text{C}} = 37,56 \text{ ppm}$) zu erkennen ist. Das Dublettsignal bei $\delta_{\text{H}} = 7,36 \text{ ppm}$ ($^3J = 7,6 \text{ Hz}$) von H-9' / H-13' und die Triplettsignale bei $\delta_{\text{H}} = 7,26 \text{ ppm}$ ($^3J = 7,6 \text{ Hz}$) von H-10' / H-12' sowie bei $\delta_{\text{H}} = 7,18 \text{ ppm}$ ($^3J = 7,4 \text{ Hz}$) von H-11' repräsentieren die aromatischen Protonen des Phenylringes, der folglich keine Substituenten trägt. Die Abfolge der Ringkohlenstoffatome ergibt sich unter anderem aus HMBC-Korrelationen von H-6' und H-10' / H-12' nach C-8' ($\delta_{\text{C}} = 138,65 \text{ ppm}$), von H-9' / H-13' nach C-11' ($\delta_{\text{C}} = 128,20 \text{ ppm}$), von H-7' nach C-9' ($\delta_{\text{C}} = 127,0 \text{ ppm}$) und von H-10' nach C-12' ($\delta_{\text{C}} = 129,43 \text{ ppm}$).

Gruppe	Position	Funktion	δ_{H}	J [Hz]	COSY	δ_{C}	HMBC
<i>Tyrosin</i>	1	COOH	-			178,50	
	2	CH	4,48 dd	4,7 / 8,8	2,83 3,14	57,29	38,15 130,29 176,58 178,50
	14	CH ₂	2,83 dd	9,0 / 14,0	3,14 4,48	38,15	57,29 130,29 131,31 178,50
			3,14 m		3,14 4,48		57,29 130,29 131,31 178,50
	15	C				130,29	
	16 / 20	CH	7,05 d	8,4	6,67	131,31	38,15 115,89 156,95
	17 / 19	CH	6,67 d	8,4	7,05	115,89	130,29 131,31 156,95
	18	C-OH	-				156,95
	2	NH	-				

Tabelle 4-2: NMR-Tabelle zu Thaxteramid A (gemessen in Methanol-*d*₄). s = Singulett, d = Dublett, dd = Dublett vom Dublett, t = Triplet, dt = Dublett vom Triplet, m = Multiplett.

4. Neue Sekundärmetabolitfamilien

Gruppe	Position	Funktion	δ_H	J [Hz]	COSY	δ_C	HMBC	
<i>α-Methyl-β-Alanin</i>	3	C=O				176,58		
	4	CH	2,56 m		0,96	41,37	15,22	
					3,11		44,0	
					3,30		176,58	
	5	CH ₂	3,11 m		2,56	44,0	15,22	
					3,30		41,37	
							171,66	
							176,58	
					3,30 m		2,56	15,22
		3,11	41,37					
						171,66		
						176,58		
	21	CH ₃	0,96 d	6,9	2,56	15,22	41,37 44,0 176,58	
	5	NH	-					
<i>Glycin</i>	6	C=O				171,66		
	7	CH ₂	3,72 d	16,6	3,88	43,50	171,66 174,0	
					3,72		171,66 174,0	
			NH	-				
<i>O-Methyl-Tyrosin</i>	8	C=O				174,0		
	9	CH	4,56 dd	5,2 / 9,7	2,88	56,63	37,54 130,46 172,79 174,0	
					3,12			
	22	CH ₂	2,88 m		3,12	37,54	56,63 130,46 131,30 174,0	
					4,56			
					3,12 m		2,88	56,63
							4,56	130,46 131,30 174,0
	23	C					130,46	
	24 / 28	CH	7,15 d	8,5	6,81	131,30	37,54 114,75 159,98	
	25 / 27	CH	6,81 d	8,5	7,15	114,75	130,46 159,98	
	26	C-O					159,98	
	29	CH ₃	3,75 s				55,52	159,98
	9	NH	-					
<i>Threonin</i>	10	C=O				172,79		
	11	CH	4,22 d	3,6	4,20	60,38	20,07 67,74 172,79 173,16	

Tabelle 4-2: NMR-Tabelle zu Thaxteramid A - Fortsetzung.

Gruppe	Position	Funktion	δ_H	J [Hz]	COSY	δ_C	HMBC
<i>Threonin</i>	30	CH	4,20 m		1,06	67,74	20,07
					4,22		60,38
							172,79
	31	CH ₃	1,06 d	5,3	4,20	20,07	60,38
	11	NH	-				67,74
<i>Serin</i>	12	C=O				173,16	
	13	CH	4,42 t	5,3	3,79	57,86	62,39
					3,89		173,16
							173,53
	32	CH ₂	3,79 dd	5,3 / 11,0	3,89	62,39	57,86
					4,42		173,16
3,89 m					57,86		
				4,42		173,16	
	13	OH	-				
	13	NH	-				
<i>Seitenkette</i>	1'	C=O				173,53	
	2'	CH ₂	2,70 dd	9,7 / 16,4	2,78	33,84	36,91
					3,63		53,36
							173,53
					2,78 dd		3,2 / 16,4
					3,63		53,36
							173,53
	3'	CH	3,63 m		2,09	53,36	14,56
					2,70		33,84
					2,78		36,91
							173,53
	4'	CH	2,09 m		1,05	36,91	14,56
					2,19		33,84
					2,37		37,56
3,63					53,36		
						128,0	
5'	CH ₂	2,19 m		2,09	37,56	14,56	
				2,37		36,91	
				6,22		53,36	
						128,0	
						133,83	
						133,83	
6'	CH	6,22 dt	7,2 / 15,8	2,19	128,0	37,56	
				2,37		138,65	
				6,49			
7'	CH	6,49 d	15,8	6,22	133,83	37,56	
						127,0	
						138,65	
						128,0	

Tabelle 4-2: NMR-Tabelle zu Thaxteramid A - Fortsetzung.

Gruppe	Position	Funktion	δ_{H}	J [Hz]	COSY	δ_{C}	HMBC
<i>Seitenkette</i>	8'	C				138,65	
	9' / 13'	CH	7,36 d	7,6	7,26	127,0	127,0
							128,20
							133,83
	10' / 12'	CH	7,26 t	7,6	7,18	129,43	129,43
							138,65
	11'	CH	7,18 t	7,4	7,26	128,20	127,0
14'	CH ₃	1,05 d	5,7	2,09	14,56	37,56	
						53,36	
	3'	NH ₂	-				

Tabelle 4-2: NMR-Tabelle zu Thaxteramid A - Fortsetzung.

Während der Erstellung dieser Arbeit konnte durch A. Plaza im Arbeitskreis ein Thaxteramid-Derivat isoliert werden, dass sich von Thaxteramid A durch ein β -Alanin anstelle eines α -Methyl- β -Alanins unterscheidet. Folglich wird dieses Derivat als Thaxteramid B bezeichnet. Der Nomenklatur entsprechend werden die verbleibenden hier isolierten Substanzen als Thaxteramide C und D benannt, deren Stukturaufklärung im Folgenden beschrieben wird.

TKcpd782: Thaxteramid C

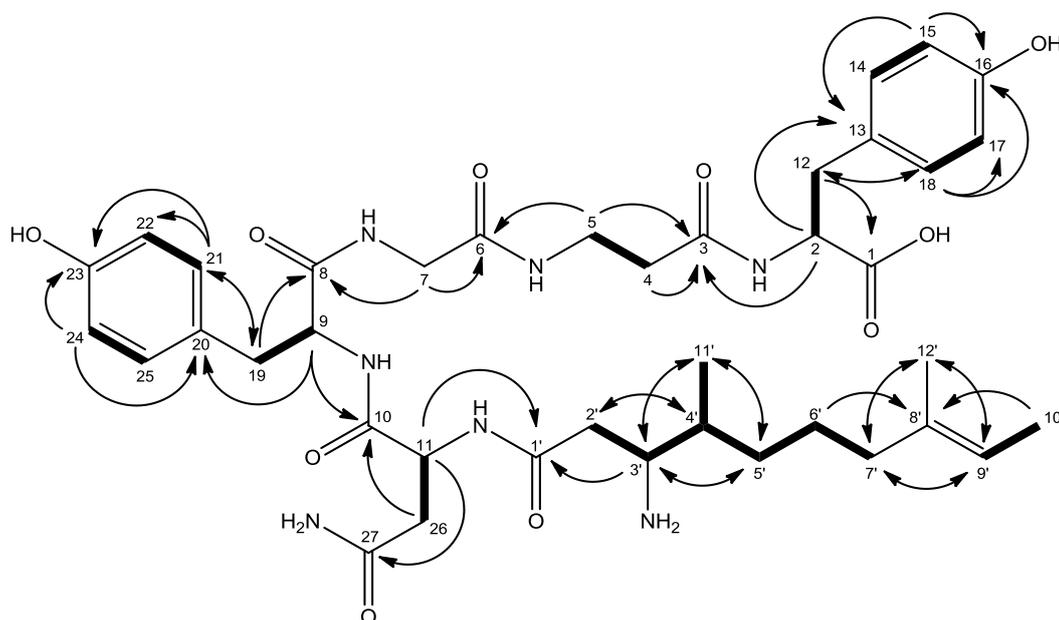


Abbildung 4-4: Struktur von Thaxteramid C mit ausgewählten ^1H - ^1H -COSY- (fett) und HMBC-Korrelationen (Pfeile).

Im ^1H -NMR-Spektrum der in Methanol- d_4 vermessenen Substanz Thaxteramid C werden neben Signalen aliphatischer Protonen im Bereich chemischer Verschiebungen von $\delta_{\text{H}} = 1,0 - 4,7$ ppm, 4 Signale aromatischer Protonen ($\delta_{\text{H}} = 6,67$ ppm, $\delta_{\text{H}} = 6,71$ ppm, $\delta_{\text{H}} = 7,06$ ppm und $\delta_{\text{H}} = 7,07$ ppm) und 1 Signal olefinischer Protonen ($\delta_{\text{H}} = 5,22$ ppm) gefunden (Tabelle 4-3). Chemische Verschiebungen im Bereich von 3,4 - 4,7 ppm deuten auf Protonen in direkter Nachbarschaft zu Heteroatomen, wie sie in Peptiden zu finden sind, hin. Aus HMBC- und 2D-TOCSY-Korrelationen können 5 Aminosäureeinheiten und eine Seitenkette mit 2 Spinsystemen ermittelt werden. Analog zu Thaxteramid A wird die Struktur beginnend mit dem C-Terminus des Peptidgerüsts für jede Aminosäure und endend mit der Seitenkette basierend auf den NMR-Daten beschrieben. Ein Dublett vom Dublett ($^3J = 4,6$ Hz / 8,8 Hz) bei $\delta_{\text{H}} = 4,43$ ppm von H-2 zeigt typische Resonanzen einer α -CH-Gruppe von Aminosäuren und stellt das Signal der C-terminalen Tyrosineinheit des Pentapeptidylrestes dar. Das α -Proton weist Kopplungen mit den Protonen bei $\delta_{\text{H}} = 2,83$ ppm und $\delta_{\text{H}} = 3,13$ ppm im ^1H - ^1H -COSY-Experiment auf. Deren Konnektivität mit C-12 ($\delta_{\text{C}} = 38,10$ ppm) können dem HSQC-Spektrum eindeutig entnommen werden. HMBC-Korrelationen des H-2-Protons mit dem quartären Kohlenstoffatom C-13 ($\delta_{\text{C}} = 130,51$ ppm) deuten auf das Vorhandensein eines aromatischen Systems hin. Hierzu gehören

ebenfalls die Kohlenstoffatome C-14 / C-18 ($\delta_C = 131,22$ ppm), C-15 / C-17 ($\delta_C = 116,0$ ppm) und C-16 ($\delta_C = 156,88$ ppm). Diese können den heteronuklearen Korrelationen der Methylengruppe mit C-14 bzw. C-18, von H-14 / H-18 ($\delta_H = 7,06$ ppm) mit C-15 / C-17 und C-16 sowie von H-15 / H-17 ($\delta_H = 6,67$ ppm) mit C-13 und C-16 entnommen werden. Die chemische Verschiebung des Kohlenstoffatoms an Position 16 impliziert die Existenz einer Hydroxylfunktion. Die para-Substitution des Hydroxyphenylrestes wird durch Dublettaufspaltungen der beiden magnetisch äquivalenten Ringprotonenpaare belegt ($^3J = 8,4$ Hz). Die Tieffeldverschiebung des Signals von C-1 mit $\delta_C = 178,37$ ppm aus der HMBC-Korrelation der Methylengruppe kann dem Kohlenstoffatom einer Carboxylfunktion zugeordnet werden.

Eine weitere Korrelation der α -CH-Gruppe mit C-3 ($\delta_C = 173,55$ ppm) deutet auf eine Carbonylfunktion hin, die Teil der peptidisch verknüpften β -Alanineinheit ist. Signalkorrelationen der vier Methylprotonen dieses Strukturteils H-4 ($\delta_H = 2,31$ ppm, $\delta_H = 2,40$ ppm) und H-5 ($\delta_H = 3,34$ ppm, $\delta_H = 3,53$ ppm) im 2D-TOCSY-Spektrum belegen ein gemeinsames Spinsystem. Die zugehörigen α - und β -Kohlenstoffatome C-4 ($\delta_C = 36,50$ ppm) und C-5 ($\delta_C = 37,10$ ppm) ergeben sich aus dem HSQC-Spektrum. Die HMBC-Korrelationen von H-4 und H-5 mit dem Carbonylkohlenstoffatom C-3 der Amidfunktion stehen im Einklang mit der β -Aminosäurestruktur. Die β -CH₂-Protonen korrelieren ebenfalls mit dem Kohlenstoffatom C-6 ($\delta_C = 171,71$ ppm) der nachfolgenden Glycineinheit. Die Signale der Methylenprotonen H-6 ($\delta_H = 3,62$ ppm, $\delta_H = 3,93$ ppm) spalten durch geminale Kopplungen als Dubletts auf ($^2J = 16,9$ Hz) und sind durch HMBC-Korrelationen zu dem Glycin-Carbonylkohlenstoffatom C-6 und einer weiteren Carbonylfunktion an Position 8 ($\delta_C = 174,30$ ppm) gekennzeichnet, welche einer zweiten Tyrosineinheit angehört.

Das Signal des Tyrosin- α -Protons liegt bei $\delta_H = 4,40$ ppm und erscheint wie auch bei dem ersten Tyrosinrest als Dublett vom Dublett. Für den α -Kohlenstoff ergibt sich aus dem HSQC-Experiment eine typische chemische Verschiebung von $\delta_C = 57,27$ ppm. Die zugehörige α -CH₂-Gruppe kann durch COSY- und 2D-TOCSY-Korrelationen von H-9 und den Protonen H-19 ($\delta_H = 2,87$ ppm, $\delta_H = 3,11$ ppm) gezeigt werden, die wiederum im HSQC-Spektrum mit C-19 ($\delta_C = 36,95$ ppm) korrelieren. Außerdem belegt eine HMBC-Korrelation mit C-8 das Kohlenstoffatom der Carbonylfunktion der Tyrosineinheit. Die vier Ringprotonen des Phenylrestes erscheinen im ¹H-NMR-Spektrum als zwei Dubletts

($^3J = 8,4$ Hz) bei $\delta_{\text{H}} = 7,07$ ppm für H-21 bzw. H-25 und bei $\delta_{\text{H}} = 6,71$ ppm für H-22 bzw. H-24. Dies spricht für eine para-Substitution des Aromaten. Für die aromatischen Kohlenstoffatome sind Signale bei $\delta_{\text{C}} = 131,22$ ppm für C-21 / C-25 und bei $\delta_{\text{C}} = 116,0$ ppm für C-22 / C-24 zu erkennen. Die Kerne C-20 ($\delta_{\text{C}} = 129,01$ ppm) und C-23 ($\delta_{\text{C}} = 157,26$ ppm) werden durch HMBC-Korrelationen von H-9 und H-22 / H-24 zu C-20 sowie von H-21 / H-25 und H-22 / H-24 zu C-23 beobachtet. Die chemische Verschiebung von C-23 lässt den Rückschluss auf eine phenolische Struktur zu. Eine Verknüpfung der Tyrosin- mit einer Asparagineinheit kann durch eine Korrelation von H-9 zum Carbonylkohlenstoffatom C-10 ($\delta_{\text{C}} = 173,56$ ppm) gezeigt werden, mit dem ebenfalls die Methylenprotonen H-26 ($\delta_{\text{H}} = 2,56$ ppm, $\delta_{\text{H}} = 2,67$ ppm) korrelieren. Das Signal des α -Protons H-11 liegt bei $\delta_{\text{H}} = 4,68$ ppm und spaltet durch die ^1H - ^1H -Kopplungen mit H-26 in ein Dublett vom Dublett auf ($^3J = 5,4$ Hz / $8,2$ Hz). Die chemische Verschiebung von C-27 ($\delta_{\text{C}} = 174,86$ ppm) spricht für das Vorhandensein einer Amidfunktion. Für H-11 und H-26 werden Korrelationen zu C-27 detektiert.

Die Asparagineinheit ist peptidisch mit einem 3-Amino-4,8-dimethyl-8-decensäurerest verbunden. Dabei kann eine HMBC-Korrelation von H-11 mit C-1' ($\delta_{\text{C}} = 172,82$ ppm) gefunden werden. Die Signale der Protonen H-2' bis H-7' bilden die Gruppe der aliphatischen Kette, deren Konnektivitäten der Kohlenstoffatome C-2' bis C-7' durch COSY- und HMBC-Korrelationen bestimmt werden können. Die chemischen Verschiebungen der Protonen H-2' ($\delta_{\text{H}} = 2,51$ ppm, $\delta_{\text{H}} = 2,64$ ppm) und H-3' ($\delta_{\text{H}} = 3,45$ ppm) sowie des Kerns C-3' ($\delta_{\text{C}} = 54,45$ ppm) sprechen für die Anwesenheit einer Aminofunktion an C-3'. Ein Dublett im Hochfeldbereich bei $\delta_{\text{H}} = 1,00$ ppm stammt von der Methylgruppe CH₃-11', deren Bindung an C-4' durch HMBC-Korrelationen mit C-3', C-4' und C-5' gezeigt werden kann. Es verbleiben die Resonanzen zweier Methylgruppen bei $\delta_{\text{H}} = 1,56$ ppm, $\delta_{\text{H}} = 1,67$ ppm und eines olefinischen Protons bei $\delta_{\text{H}} = 5,22$ ppm. Dem Singulett von CH₃-12' bei $\delta_{\text{H}} = 1,67$ ppm ist das Fehlen vicinaler Protonen zu entnehmen. HMBC-Korrelationen dieser Methylgruppe und von H-6' ($\delta_{\text{H}} = 1,38$ ppm, $\delta_{\text{H}} = 1,52$ ppm) und H-7' ($\delta_{\text{H}} = 2,07$ ppm) nach C-8' ($\delta_{\text{C}} = 136,80$ ppm) sowie das Fehlen einer HSQC-Korrelation von C-8' ordnen diesem eine quartäre Bindungsstruktur zu. Bestätigt wird die Verknüpfung des quartären Kohlenstoffatoms mit C-12' ($\delta_{\text{C}} = 23,50$ ppm) zusätzlich durch wechselseitige HMBC-Korrelationen der Protonen H-7', H-12' und H-9' ($\delta_{\text{H}} = 5,22$ ppm). Die Tieffeldverschiebung von H-9' verweist auf eine Doppelbindung zwischen C-8' und

C-9', der aufgrund wechselseitiger Fernkopplungen von H-10' und H-12' im COSY-Spektrum eine *trans*-Konfiguration zugeordnet wird. Auch ist eine *trans*-Konfiguration hinsichtlich einer höheren chemischen Stabilität wahrscheinlicher als eine *cis*-Konfiguration. Die Quartettstruktur des olefinischen Protonensignals ($^3J = 6,6$ Hz) resultiert aus der vicinalen Kopplung mit den Methylprotonen H-10' ($\delta_{\text{H}} = 1,56$ ppm), deren Signal dadurch in ein Dublett ($^3J = 6,6$ Hz) aufspaltet. Die Position der Methylgruppe wird auch durch die HMBC-Korrelation von H-10' zu C-8' belegt.

Gruppe	Position	Funktion	δ_{H}	J [Hz]	COSY	δ_{C}	HMBC	
<i>Tyrosin</i>	1	COOH	-			178,37		
	2	CH	4,43 dd	4,6/8,8	2,83 3,13	57,87	38,10 130,51 173,55 178,37	
	12	CH ₂	2,83 m		3,13 4,43	38,10	57,87 130,51 131,22 178,37	
				3,13 dd	4,3/14,0	2,83 4,43	57,87 130,51 131,22 178,37	
	13	C					130,51	
	14 / 18	CH	7,06 d	8,4	6,67	131,22	38,10 116,0 156,88	
	15 / 17	CH	6,67 d	8,4	7,06	116,0	130,51 156,88	
	16	C-OH	-				156,88	
	2	NH	-					
	<i>β-Alanin</i>	3	C=O				173,55	
		4	CH ₂	2,31 m		2,40 3,34 3,53	36,50	37,1 173,55
				2,40 m	2,31 3,34 3,53		37,1 173,55	

Tabelle 4-3: NMR-Tabelle zu Thaxteramid C (gemessen in Methanol-*d*₄). s = Singulett, d = Dublett, dd = Dublett vom Dublett, q = Quartett, m = Multiplett.

Gruppe	Position	Funktion	δ_H	J [Hz]	COSY	δ_C	HMBC	
<i>β-Alanin</i>	5	CH ₂	3,34 m		2,31	37,10	36,5	
					2,40		171,71	
					3,53		173,55	
			3,53 m	2,31	36,5			
				2,40	171,71			
				3,34	173,55			
		NH	-					
<i>Glycin</i>	6	C=O				171,71		
	7	CH ₂	3,62 d	16,9	3,93	43,54	171,71	
							174,30	
				3,93 d	16,9	3,62		171,71
								174,30
		NH	-					
<i>Tyrosin</i>	8	C=O				174,30		
	9	CH	4,40 dd	5,8/9,9	2,87	57,21	36,95	
					3,11		129,01	
							173,56	
							174,30	
	19	CH ₂	2,87 m			3,11	36,95	57,21
						4,40		129,01
								131,22
				3,11 dd	5,7/14,0	2,87		57,21
						4,40		129,01
								131,22
							174,30	
20	C					129,01		
21 / 25	CH	7,07 d	8,4	6,71	131,22	36,95		
						157,26		
						116,0		
22 / 24	CH	6,71 d	8,4	7,06	116,0	129,01		
						157,26		
23	C-OH	-				157,26		
9	NH	-						
<i>Asparagin</i>	10	C=O				173,56		
	11	CH	4,68 dd	5,4/8,2	2,56	51,67	37,63	
					2,67		172,82	
							173,56	
							174,86	
	26	CH ₂	2,56 dd	8,3/15,8	2,67	37,63	51,67	
					4,68		173,56	
							174,86	
			2,67 dd	5,4/15,7	2,56		51,67	
					4,68		173,56	
							174,86	
27	NH ₂ C=O	-				174,86		
<i>Seitenkette</i>	1'	C=O				172,82		
	2'	CH ₂	2,51 dd	9,7/16,2	2,64	35,75	36,55	
					3,45		54,45	
							172,82	

Tabelle 4-3: NMR-Tabelle zu Thaxteramid C - Fortsetzung.

4. Neue Sekundärmetabolitfamilien

Gruppe	Position	Funktion	δ_H	J [Hz]	COSY	δ_C	HMBC	
<i>Seitenkette</i>	2'	CH ₂	2,64 dd	3,9/16,0	2,51	35,75	36,55	
					3,45		54,45	
							172,82	
	3'	CH	3,45 m			1,80	54,45	15,0
						2,51		32,86
						2,64		35,75
								36,55
								172,82
	4'	CH	1,80 m			1,00	36,55	15,0
						1,21		26,20
						1,46		32,86
						3,45		35,75
								54,45
	5'	CH ₂	1,21 m			1,38	32,86	15,0
						1,46		26,20
						1,52		32,15
						1,80		36,55
						54,45		
			1,46 m			1,21		15,0
						1,38		26,20
						1,52		32,15
						1,80		36,55
								54,45
6'	CH ₂	1,38 m			1,21	26,20	32,15	
					1,46		32,86	
					1,52		136,80	
					2,07			
			1,52 m			1,21		32,15
						1,38		32,86
						1,46		136,80
						2,07		
7'	CH ₂	2,07 m			1,38	32,15	23,50	
					1,52		26,20	
							32,86	
8'	C					136,80	120,15	
9'	CH	5,22 q	6,6	6,6	1,56	120,15	13,35	
								23,50
								32,15
10'	CH ₃	1,56 d	6,6	6,6	1,67	13,35	120,15	
							5,22	136,80
11'	CH ₃	1,00 d	1,9	1,9	1,80	15,0	32,86	
								36,55
								54,45
12'	CH ₃	1,67 s			1,56	23,50	32,15	
								120,15
								136,80
3'	NH ₂	-						

Tabelle 4-3: NMR-Tabelle zu Thaxteramid C - Fortsetzung.

TKcpd473: Thaxteramid D

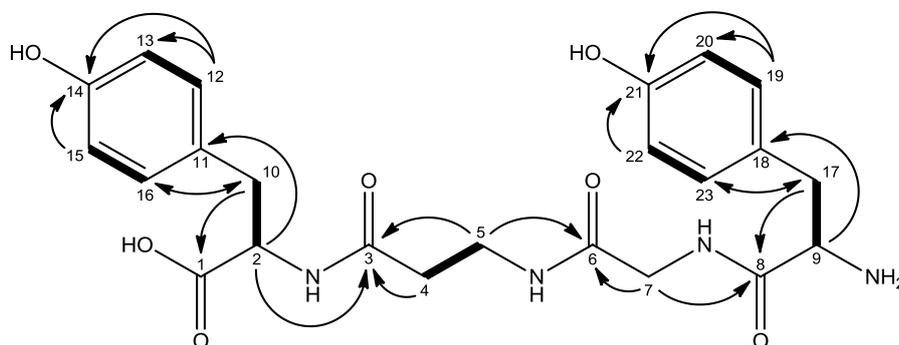


Abbildung 4-5: Struktur von Thaxteramid D mit ausgewählten ^1H - ^1H -COSY- (fett) und HMBC-Korrelationen (Pfeile).

Thaxteramid D stellt ein Tetrapeptid der Aminosäuresequenz Tyrosin- β -Alanin-Glycin-Tyrosin dar und findet sich als Teilstruktur in den Thaxteramiden A bis C wieder. Das Protonenspektrum übersichtlicher Signalanzahl zeigt 12 Resonanzen aliphatischer Protonen und 4 Resonanzen aromatischer Protonen (Tabelle 4-4). Ein Dublett vom Dublett ($J = 4,1 \text{ Hz} / 10,1 \text{ Hz}$) bei $\delta_{\text{H}} = 4,41 \text{ ppm}$ stammt vom α -Proton H-2 der C-terminalen Tyrosineinheit und koppelt im COSY-Spektrum mit den Methylenprotonen H-10 bei $\delta_{\text{H}} = 2,76 \text{ ppm}$ (Dublett vom Dublett, $J = 10,1 \text{ Hz} / 14,2 \text{ Hz}$) und $\delta_{\text{H}} = 3,15 \text{ ppm}$ (Dublett vom Dublett, $J = 4,1 \text{ Hz} / 14,2 \text{ Hz}$). Die Carboxylgruppe wird der Korrelation von H-10 mit C-1 ($\delta_{\text{C}} = 179,03 \text{ ppm}$) entnommen, während Korrelationen von H-2 mit C-3 ($\delta_{\text{C}} = 173,94 \text{ ppm}$) und mit C-11 ($\delta_{\text{C}} = 130,58 \text{ ppm}$) auf die Carbonylgruppe der β -Alanineinheit und das quartäre Ringkohlenstoffatom des Phenylrings verweisen. Die Dublettaufspaltungen ($^3J = 8,5 \text{ Hz}$) der Protonen H-12 / H-16 ($\delta_{\text{H}} = 7,06 \text{ ppm}$) und H-13 / H-15 ($\delta_{\text{H}} = 6,67 \text{ ppm}$) sind konform mit der para-Substitution des Aromaten. Die restlichen Ringkohlenstoffatome C-12 / C-16 ($\delta_{\text{C}} = 131,01 \text{ ppm}$), C-13 / C-15 ($\delta_{\text{C}} = 116,03 \text{ ppm}$) und C-14 ($\delta_{\text{C}} = 156,76 \text{ ppm}$) gehen aus dem HMBC-Spektrum durch Korrelationen von H-10 zu C-12 / C-16, von H-13 zu C-14 sowie von H-12 / H-16 zu C-13 / C-15 und C-14 hervor. Aus der chemischen Verschiebung von C-14 kann eine Hydroxylierung abgeleitet werden. Die β -Alanin-Struktur kann anhand der korrelierenden α - und β -Methylenprotonen H-4 ($\delta_{\text{H}} = 2,18 \text{ ppm}$, $\delta_{\text{H}} = 2,35 \text{ ppm}$) und H-5 ($\delta_{\text{H}} = 3,44 \text{ ppm}$, $\delta_{\text{H}} = 3,53 \text{ ppm}$) im COSY-Spektrum und durch HMBC-Korrelationen von H-4 und H-5 mit C-3 und von H-5 mit C-6 ($\delta_{\text{C}} = 170,98 \text{ ppm}$), dem Glycin-Carbonylkohlenstoffatom, belegt werden. Typischerweise treten im ^1H -NMR-

Spektrum der Glycineinheit nur die Resonanzen einer Methylengruppe auf, als zwei Dubletts ($^2J = 16,9$ Hz) bei $\delta_H = 3,50$ ppm und $\delta_H = 4,04$ ppm. Die große Kopplungskonstante wird durch geminale Kopplungen der Protonen H-7 hervorgerufen, die im HSQC-Spektrum mit dem gemeinsamen Kern C-7 ($\delta_C = 43,54$ ppm) korrelieren. Desweiteren tauchen HMBC-Korrelationen dieser Protonen zu C-6 und dem Carbonylkohlenstoffatom C-8 ($\delta_C = 170,87$ ppm) der N-terminalen Tyrosineinheit auf.

Das Protonenspektrum der Tyrosineinheit ist durch ein Triplet ($^3J = 7,5$ Hz) von H-9 ($\delta_H = 4,01$ ppm), zwei Dubletts von Dubletts von H-17 bei $\delta_H = 2,95$ ppm ($J = 7,6$ Hz / $13,9$ Hz) und $\delta_H = 3,06$ ppm ($J = 7,5$ Hz / $13,9$ Hz) charakterisiert. Die aromatischen Protonen sind als Dubletts ($^3J = 8,5$ Hz) bei $\delta_H = 7,08$ ppm (H-19 / H-23) und bei $\delta_H = 6,77$ ppm (H-20 / H-22) zu detektieren. Die Struktur der N-terminalen Tyrosineinheit kann analog zum C-Terminus durch heteronukleare Korrelationen dieser Protonen aufgeklärt werden. Darüber können die chemischen Verschiebungen der Kohlenstoffatome C-8, C-18 ($\delta_C = 126,31$ ppm), C-19 / C-23 ($\delta_C = 131,37$ ppm), C-20 / C-22 ($\delta_C = 116,67$ ppm) und C-21 ($\delta_C = 158,10$ ppm) bestimmt werden.

Gruppe	Position	Funktion	δ_H	J [Hz]	COSY	δ_C	HMBC
Tyrosin	1	COOH	-			179,03	
	2	CH	4,41 dd	4,1/10,1	2,76 3,15	57,89	37,90 173,94 179,03 130,58
	10	CH ₂	2,76 dd	10,1/14,2	3,15 4,41	37,90	57,89 131,01 179,03
			3,15 dd	4,1/14,2	2,76 4,41		57,89 131,01 179,03
	11	C				130,58	
	12 / 16	CH	7,06 d	8,5	6,67	131,01	116,03 131,01 156,76
	13 / 15	CH	6,67 d	8,5	7,06	116,03	116,03 130,58 156,76
	14	C-OH	-				156,76
	2	NH	-				

Tabelle 4-4: NMR-Tabelle zu Thaxteramid D (gemessen in Methanol- d_4). d = Dublett, dd = Dublett vom Dublett, t = Triplet, m = Multiplet.

Gruppe	Position	Funktion	δ_H	J [Hz]	COSY	δ_C	HMBC	
<i>β-Alanin</i>	3	C=O				173,94		
	4	CH ₂	2,18 m		2,35	36,96	37,27	
					3,44		173,94	
					3,53			
				2,35 m		2,18	37,27	37,27
						3,44		173,94
						3,53		
	5	CH ₂	3,44 m		2,18	37,27	36,96	
					2,35		170,98	
					3,53		173,94	
			3,53 m		2,18	36,96	36,96	
					2,35		170,98	
					3,44		173,94	
		NH	-					
<i>Glycin</i>	6	C=O				170,98		
	7	CH ₂	4,04 d	16,9	3,50	43,54	170,87	
							170,98	
				3,50 d	16,9	4,04		170,87
								170,98
		NH	-					
<i>Tyrosin</i>	8	C=O				170,87		
	9	CH	4,01 t	7,5	2,95	56,14	37,75	
					3,06		126,31	
								170,87
	17	CH ₂	2,95 dd	7,6/13,9	3,06	37,75	56,14	
					4,01		126,31	
								131,37
				3,06 dd	7,5/13,9	2,95	56,14	56,14
						4,01		126,31
								131,37
18	C					126,31		
19 / 23	CH	7,08 d	8,5	6,77	131,37	37,75		
						116,67		
							131,37	
								158,10
20 / 22	CH	6,77 d	8,5	7,08	116,67	126,31		
							116,67	
								131,37
							158,10	
21	C-OH					158,10		
9	NH ₂							

Tabelle 4-4: NMR-Tabelle zu Thaxteramid D - Fortsetzung.

Die Summenformeln monoprotionierter Molekülonen der aufgeklärten chemischen Strukturen von Thaxteramid A (TKcpd904, C₄₆H₆₂N₇O₁₂), C (TKcpd782, C₃₉H₅₆N₇O₁₀) und D (TKcpd473, C₂₃H₂₉N₄O₇) stimmen mit jeweils einer der abgeleiteten Summenformeln aus den exakten Massen der Spezies (Tabelle 4-1) überein. Eine *SciFinder*-Datenbanksuche mit den ermittelten Strukturen bestätigte alle Substanzen als neue, bisher nicht beschriebene Naturstoffe. Somit konnten über die Methode des HR-MS-Screenings von Kulturextrakten neue, unbekannte Sekundärmetabolite identifiziert und schließlich isoliert werden.

4.1.1.3. Konfiguration der Aminosäuren

Nach saurer Hydrolyse und Derivatisierung der Substanzen mit L-FDLA bzw. D-FDLA ergab die LC-MS-basierte Analyse der Diastereomeren für Thaxteramid A L-Serin, L-Threonin und ein D-Tyrosin, neben dem nicht chiralen Glycin als Bestandteile des Peptids (Tabelle 4-5). *O*-Methyl-Tyrosin wurde mit seiner um 14 Einheiten höheren Masse detektiert. Eine Referenz stand nicht zur Verfügung. Da analog zu D-Tyrosin für das D-Derivat die kürzere und für das L-Derivat die längere Retentionszeit bestimmt wurde und in der Regel FDLA-Derivate mit *trans*-Typ-Anordnung (L-L-/D-D-Form) aufgrund schwächerer Wechselwirkungen mit Umkehrphasen vor denjenigen mit *cis*-Typ-Anordnung (D-L-/L-D-Form) eluieren, wird ein vorliegendes *O*-Methyl-D-Tyrosin angenommen^{231,233}. Für die L- und D-Derivate von α -Methyl- β -Alanin konnten zwei Peaks der entsprechenden Molekülonenmasse zugeordnet werden, auch hier lag kein Standard vor.

Den Thaxteramiden C und D konnten jeweils ein Glycin und ein β -Alanin gefunden werden. Die Retentionszeiten der nicht chiralen β -Alanin-Derivate unterscheiden sich wie bei Glycin nicht. Da für die Tyrosine der zwei Substanzen in jeder Probe immer nur eine Form, entweder das L-Derivat oder das D-Derivat, nachgewiesen wurden und keine Mischung beider, konnte unter Berücksichtigung der Retentionszeiten gefolgert werden, dass in diesen nur L-Tyrosin vorliegt. Bei Thaxteramid C wurde aufgrund der Hydrolyse L-Asparagin als L-Asparaginsäure nachgewiesen (Tabellen 4-6 und 4-7). Abbildung 4-6 gibt die Formelbilder nach Konfigurationsbestimmung wieder.

Thaxteramid A

	Referenz			Probe			
	<i>m/z</i> [M+H] ⁺ FDLA- Derivat	RT [min] L-L-Form	RT [min] D-L-Form	RT [min] / <i>m/z</i> [M+H] ⁺ L-Derivat		RT [min] / <i>m/z</i> [M+H] ⁺ D-Derivat	
L-Alanin	384,2	11,7	12,5	<i>12,1</i>	<i>398,1</i>	<i>12,1</i>	<i>398,1</i>
Glycin	370,2	11,6	11,6	11,6	370,1	11,6	370,1
L-Serin	400,2	10,8	11,0	10,8	400,0	11,0	400,1
L-Threonin	414,2	10,8	11,7	10,7	414,1	11,7	414,1
L-Tyrosin	476,3	11,9	12,4	12,3	476,1	11,9	476,1
				<i>14,1</i>	<i>490,1</i>	<i>13,0</i>	<i>490,1</i>

Tabelle 4-5: Konfigurationsbestimmung der Aminosäuren von Thaxteramid A nach Marfey. Molekülionenmassen und Retentionszeiten (RT) der FDLA-Derivate, kursiv: Abweichung von der Referenz.

Thaxteramid C

	Referenz			Probe			
	<i>m/z</i> [M+H] ⁺ FDLA- Derivat	RT [min] L-L-Form	RT [min] D-L-Form	RT [min] / <i>m/z</i> [M+H] ⁺ L-Derivat		RT [min] / <i>m/z</i> [M+H] ⁺ D-Derivat	
L-Alanin	384,2	11,7	12,5	<i>12,6</i>	<i>384,1</i>	<i>12,6</i>	<i>384,1</i>
L-Asp	428,2	11,1	11,3	11,0	428,1	11,2	428,1
Glycin	370,2	11,6	11,6	11,6	370,1	11,6	370,1
L-Tyrosin	476,3	11,9	12,4	12,0	476,1	12,3	476,1

Tabelle 4-6: Konfigurationsbestimmung der Aminosäuren von Thaxteramid C nach Marfey. Molekülionenmassen und Retentionszeiten (RT) der FDLA-Derivate, kursiv: Abweichung von der Referenz.

Thaxteramid D

	Referenz			Probe			
	<i>m/z</i> [M+H] ⁺ FDLA- Derivat	RT [min] L-L-Form	RT [min] D-L-Form	RT [min] / <i>m/z</i> [M+H] ⁺ L-Derivat		RT [min] / <i>m/z</i> [M+H] ⁺ D-Derivat	
L-Alanin	384,2	11,7	12,5	<i>12,6</i>	<i>384,1</i>	<i>12,6</i>	<i>384,1</i>
Glycin	370,2	11,6	11,6	11,6	370,1	11,6	370,1
L-Tyrosin	476,3	11,9	12,4	11,9	476,1	12,3	476,1

Tabelle 4-7: Konfigurationsbestimmung der Aminosäuren von Thaxteramid D nach Marfey. Molekülionenmassen und Retentionszeiten (RT) der FDLA-Derivate, kursiv: Abweichung von der Referenz.

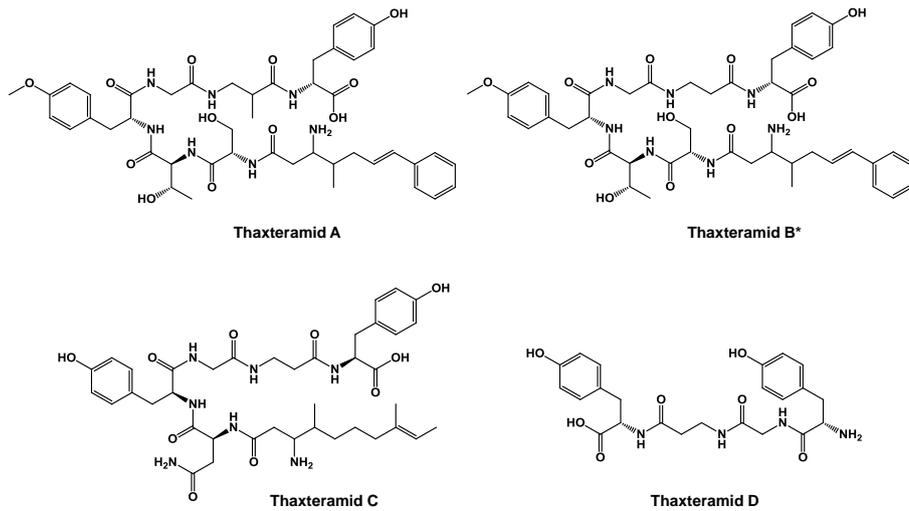


Abbildung 4-6: Strukturen der Thaxteramide aus *Jahnella thaxteri* SBSr007 mit den mittels Marfey's Methode bestimmten stereochemischen Konfigurationen.
 *= übernommen von A. Plaza.

4.1.1.4. Fragmentierungsmuster

Den bei der LC-MS-Analyse erhaltenen Fragmentierungsmustern der Thaxteramide A, C und D konnten Fragmentionen zugeordnet werden, die die durch NMR und Hydrolyse ermittelten Strukturen bestätigen (Abbildungen 4-7 bis 4-9).

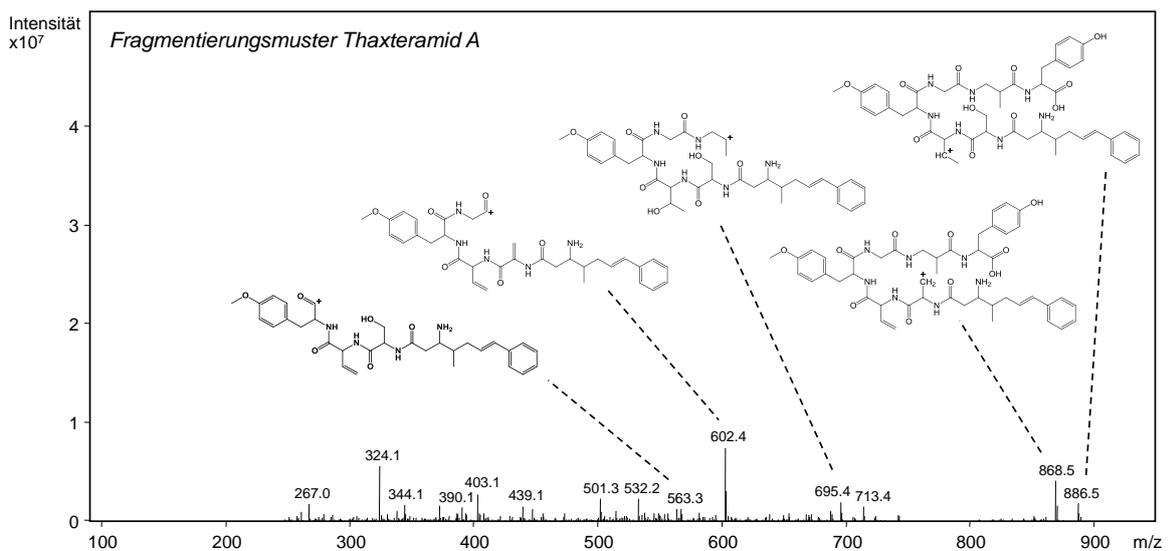


Abbildung 4-7: MS²-Spektrum von Thaxteramid A (positiver Modus) und zugeordnete Fragmentionen.

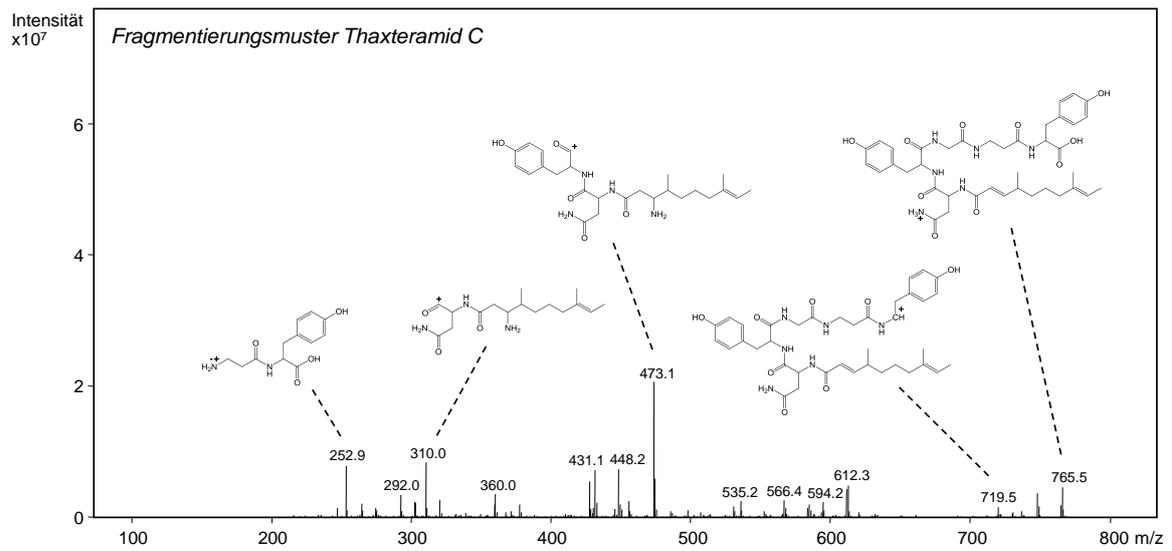


Abbildung 4-8: MS²-Spektrum von Thaxteramid C (positiver Modus) und zugeordnete Fragmentionen.

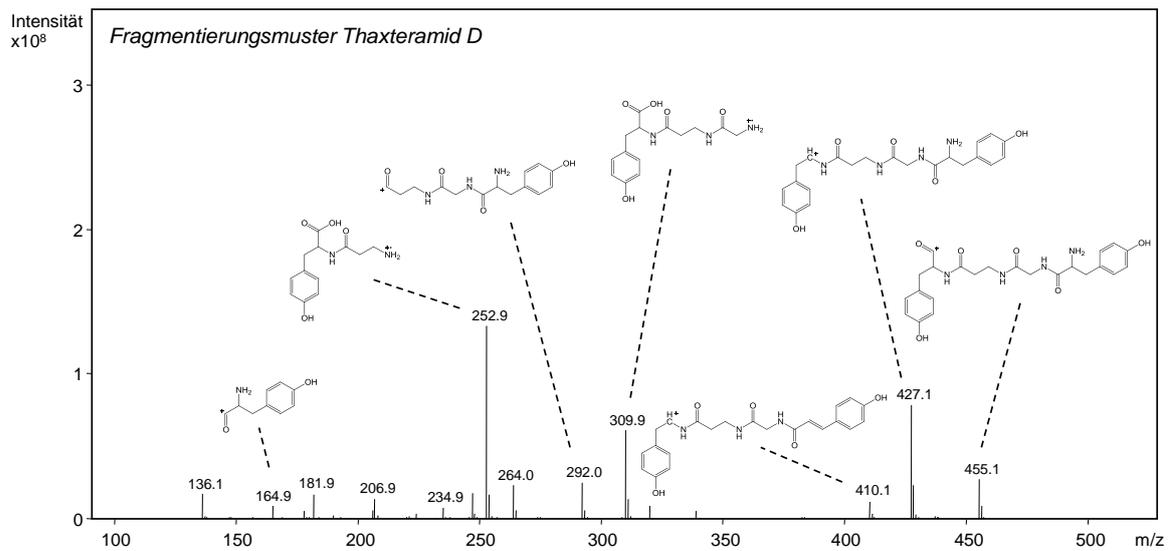


Abbildung 4-9: MS²-Spektrum von Thaxteramid D (positiver Modus) und zugeordnete Fragmentionen.

4.1.1.5. Biosynthese von Thaxteramiden

Die Präsenz von D- und β -Aminosäuren im Peptidgerüst und die Struktur des Lipidsegments sind ein Indiz dafür, dass es sich bei den isolierten Naturstoffen um drei PK/NRP-Hybride und ein nichtribosomales Peptid handelt. Basierend auf den biochemischen Grundprinzipien und dem generellen Aufbau der Polyketidsynthasen und nichtribosomalen Peptidsynthetasen lassen sich Modelle für die Biosynthese ausgehend von einer retrobiosynthetischen Betrachtung formulieren.

Das Genom von *Jahnella thaxteri* SBSr007 konnte kürzlich sequenziert werden [unveröffentlicht]. Durch A. Plaza [Institut für Pharmazeutische Biotechnologie, Universität des Saarlandes] wurde mit Hilfe der Plattform *antiSMASH*^{283,284} [<http://www.secondarymetabolites.org>] das Genom analysiert und die mutmaßlichen Biosyntheseegencluster von Thaxteramid A/B und von Thaxteramid C gefunden. *antiSMASH* identifiziert und annotiert automatisch Biosyntheseegencluster von Sekundärmetaboliten auf der Grundlage von Sequenz- und Homologievergleichen unter Verwendung mehrerer öffentlich zugänglicher *in silico*-Analyse-Programme, z.B. *BLAST*. Die beiden Gencluster wurden in der vorliegenden Arbeit durch weitere *in silico*-Analysen untersucht und u.a. die Substratspezifitäten von AT- und A-Domänen nach Yadav *et al.*¹³¹, Stachelhaus *et al.*¹²² und mit Hilfe der Plattform *NRPSpredictor2*^{285,286} [<http://nrps.informatik.uni-tuebingen.de>] bestimmt. Deren Ergebnisse wurden herangezogen, um die nachfolgend beschriebenen Biosynthesemodelle für die Thaxteramide A - C abzuleiten. Die Begrenzungen der Gencluster konnten experimentell noch nicht bestimmt werden, da SBSr007 einer genetischen Modifikation bisher nicht zugänglich ist. Deshalb werden die Biosyntheseegencluster als Sequenzbereiche betrachtet und gezeigt, die die PKS/NRPS-Gene beinhalten, einen hohen GC-Anteil (> 70 %) besitzen, Biosynthese-relevante Gene aufweisen und durch die bei der Sequenzierung des Genoms erhaltenen Sequenzabschnitte begrenzt sind.

Thaxteramid A/B-Biosynthesegencluster

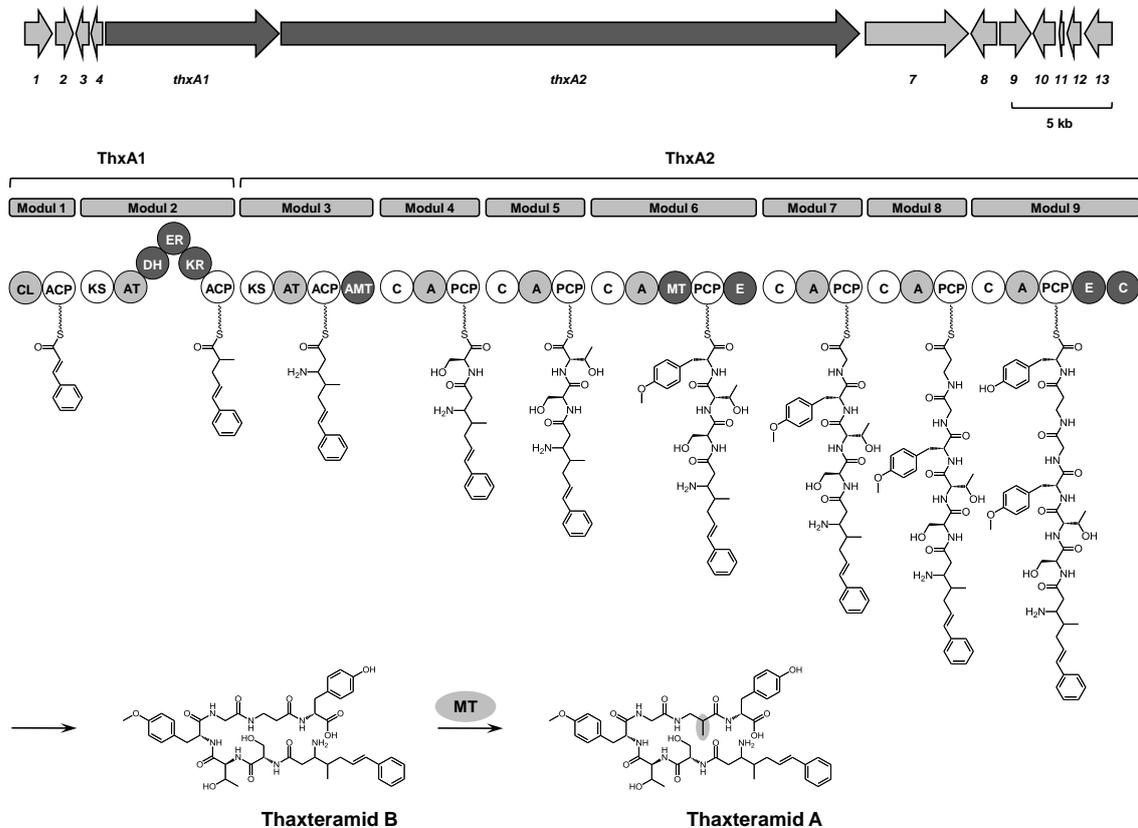


Abbildung 4-10: Mutmaßliches PKS/NRPS-Biosynthesegencluster *thxA* von Thaxteramid A/B. CL: CoA-Ligase, AMT: Aminotransferasedomäne, MT: Methyltransferase(-domäne).

Das Biosynthesegencluster *thxA* besitzt eine Größe von ca. 56 kbp (GC-Anteil: 72,3%) und beinhaltet 13 *open reading frames* (ORFs), darunter das PKS-Gen *thxA1* (ORF 5) und das PKS/NRPS-Gen *thxA2* (ORF 6), wobei ThxA1 eine bimodulare PKS darstellt und die PKS/NRPS ThxA2 sieben Module vereint (vgl. Abbildung 4-10 und Tabelle 4-8). Für die Biosynthese des Polyketidteils 3-Amino-4-methyl-7-phenyl-6-heptensäure stehen drei PKS-Module zur Verfügung. Es wird angenommen, dass die CoA-Ligase in Modul 1 *trans*-Zimtsäure als *trans*-Cinnamoyl-CoA aktiviert und auf das ACP lädt, da für die AT-Domänen der Module 2 und 3 Substratspezifitäten gegenüber Methylmalonat und Malonat bestimmt wurden (Tabelle 4-9). Dies steht mit der vorliegenden Struktur im Einklang, wenn Methylmalonat nach Kondensation mit *trans*-Zimtsäure und vollständiger Reduktion mit Malonat verlängert wird. Der Thioester von 3-Amino-4-methyl-7-phenyl-6-heptensäure geht aus der Transaminierung der β -Ketofunktion durch die C-terminale Aminotransferasedomäne (AMT) in Modul 3 hervor. Darauf folgend wird der Polyketidteil

um ein Hexapeptidfragment durch die NRPS-Module 4 - 9 erweitert. Die Substratspezifitäten der A-Domänen gehen konform mit der Aktivierung von Serin, Threonin, Tyrosin, Glycin, β -Alanin und Tyrosin (Tabelle 4-10). Epimerisierungsdomänen in den Modulen 6 und 9 bestätigen die Konfigurationsanalyse nach Marfey durch den Einbau von D-Tyrosineinheiten. Die *O*-Methylgruppe der ersten Tyrosineinheit wird höchstwahrscheinlich aus der Reaktion einer SAM-abhängigen Methyltransferasedomäne in Modul 6 hervorgehen. Diese konnte durch eine *BLASTx*-Suche des Sequenzbereiches zwischen der A-Domäne und dem PCP des Moduls identifiziert werden. Hervorzuheben ist schließlich eine C-terminale Kondensationsdomäne (ThxA2-C9b) anstatt einer regulären TE-Domäne in Modul 9. Freistehende resp. terminale Kondensationsdomänen können die Produktfreisetzung über Ester- oder Amidbildung ausführen. Beispiele hierfür sind die C-Domäne in FUM14p der Fumonisin- und SgcC5 der Endiin C-1027-Biosynthese^{287,288}. In ThxA2-C9b konnte das hoch konservierte Motiv HHXXXDG in C-Domänen²⁸⁹ durch ClustalW-Alignment mit verschiedenen C-Domänen bestimmt werden, darunter FUM14p und SgcC5 sowie solche, deren Kristallstrukturen analysiert wurden²⁹⁰⁻²⁹² (Tabelle 4-11). Offensichtlich ist ThxA2-C9b eine aktive C-Domäne und es wird vermutet, dass diese das lineare Produkt Thaxteramid B durch Hydrolyse freisetzt, da in dessen Struktur keine zusätzlichen Ester- oder Amidbindungen bzw. Makrozyklisierung beobachtet werden. Thaxteramid A und B unterscheiden sich ausschließlich in der α -Methylgruppe der β -Alanineinheit. Es ist naheliegend, dass Thaxteramid B die Vorstufe von A darstellt und die Methylgruppe aus einer C-Methylierung post-PKS/NRPS resultiert. Im Bereich des *thxA*-Genclusters konnte kein für eine Methyltransferase codierender Genlocus identifiziert werden. Die Funktionen flankierender ORFs korrelieren nicht mit der Thaxteramid A/B-Biosynthese und stehen wahrscheinlich mit dem Primärmetabolismus und Substrattransport im Zusammenhang.

ORF	Funktion	Sequenzhomologes Protein	Organismus	Identität [%]	Referenz
1	anti-anti sigma factor	anti-anti sigma factor protein	<i>Sorangium cellulosum</i> So ce56	62	YP_001613334.1
2	hypothetical protein	hypothetical protein CAP_7708	<i>Chondromyces apiculatus</i> DSM 436	42	EYF07759.1
3	glutamine amidotransferase, histidine biosynthesis	imidazole glycerol phosphate synthase subunit HisH	<i>Sporomusa ovata</i>	50	WP_021171381.1
4	imidazoleglycerol-phosphate dehydratase, histidine biosynthesis	imidazoleglycerol-phosphate dehydratase	<i>Sorangium cellulosum</i> So0157-2	88	YP_008149889.1
5	PKS	polyketide synthase	<i>Sorangium cellulosum</i> So ce38	57	CCE88376.1
6	PKS/NRPS	PlpE (NRPS)	<i>Paenibacillus elgii</i>	39	AFJ14794.1
7	protein kinase	protein kinase	<i>Sorangium cellulosum</i> So ce56	60	YP_001615852.1
8	permease/transporter	MFS transporter	<i>Fibrisoma limi</i>	31	WP_009281731.1
9	periplasmic substrate-binding protein	von Willebrand factor, type A	<i>Roseiflexus castenholzii</i> DSM 13941	24	YP_001432673.1
10	membrane protease	membrane protease subunit stomatin/prohibitin-like protein	<i>Plesiocystis pacifica</i>	50	WP_006972660.1
11	hypothetical protein	hypothetical protein CAP_4543	<i>Chondromyces apiculatus</i> DSM 436	61	EYF04404.1
12	uncharacterized protein/domain associated with GTPases	GTPase domain-containing protein	<i>Oceanibaculum indicum</i>	43	WP_008945420.1
13	ABC transporter	ABC-type siderophore export system, fused ATPase and permease components	<i>Plesiocystis pacifica</i>	52	WP_006972657.1

Tabelle 4-8: Abgeleitete Funktionen der *open reading frames* (ORFs) aus dem Thaxteramid A/B-Biosynthesegencluster über einer *BLASTp*-Suche.

4. Neue Sekundärmetabolitfamilien

				11	63	90	91	92	93	94	117	200	201	231	250	255	15	58	59	60	61	62	70	72	197	198	199
	1MLA			Q	Q	G	H	S	L	G	R	S	H	N	Q	V	T	K	T	W	Q	T	S	A	S	V	P
Locus	Domäne	Spezifität	in THX																								
ThxA1	AT2	MM	MM	Q	Q	G	H	S	M	G	R	S	H	T	N	V	W	E	A	I	V	A	E	A	D	Y	A
ThxA2	AT3	M	M	Q	Q	G	H	S	V	G	R	F	H	T	N	V	R	E	T	A	V	A	E	A	N	Y	A

Tabelle 4-9: Bestimmung der Substratspezifitäten der AT-Domänen in ThxA1 und ThxA2 durch *ClustalW*-Alignment mit der *E. coli* FAS AT-Domäne 1MLA (UniProtKB: P0AAI9.2) und Auszug der 13 Aminosäuren des aktiven Zentrums sowie 11 weiterer konservierter Aminosäuren nach Yadav *et al.* Ein Phenylalanin an Position 200 ist hoch konserviert in Malonat (M)-spezifischen AT-Domänen, Ser200 indiziert den Einbau von Methylmalonat (MM), gezeigt in *fett*. Positionen der Aminosäuren sind relativ zu 1MLA angegeben. THX: Thaxteramid.

Domäne	Motiv	Spezifität	in Thaxteramid B
A4	DVWHFSLIDK	Ser	Ser
A5	DFWNIGMVHK	Thr	Thr
A6	DAASIMAVCK	Phe/Tyr	Tyr
A7	DILQLGVIWK	Gly	Gly
A8	LDWVTSLADK	β Ala/Phe	β Ala
A9	DASTIAAVCK	Tyr	Tyr

Tabelle 4-10: Substratspezifitäten der A-Domänen in ThxA2. Motive: konservierte Aminosäuren des aktiven Zentrums nach Stachelhaus *et al.*

ThxA2-C9b	128 -R T W M L M T Q H H I V I D G W S S P L M L G E L Q A A Y E A L R R - 161
FUM14p	236 -Q N F F V I S L D H T H C D A F S R Y L I D K E I L Q I L K Q P T E - 269
RapP-C2	1218 -D H I L I L M L H H I A G D G W S F D V L V R E L S A L Y A E C R V - 1251
SgcC5	145 -D A V L V L I A H H T A A D A W A M H V I A R D L L N L Y A A R R G - 178
SrfA-C	138 -S F E W V W S Y H H I I L D G W C F G I V V Q D L F K V Y N A L R E - 171
TycC6-C	213 -R Y V L F T D M H H S I S D G V S S G I L L A E W V Q L Y Q G D V L - 246
VibH	117 -E H L I Y T R A H H I V L D G Y G M M L F E Q R L S Q H Y Q S L L S - 150

Tabelle 4-11: Konserviertes Motiv HHXXXDG (*fett*) in NRPS-C-Domänen von ThxA2-C9b bestimmt durch *ClustalW*-Alignment mit der C-Domäne 2 der Rapamycin-Biosynthese (RapP-C2, GenBank: CAA60461.1), der C-Domäne in Modul 6 der Tyrocidin-Synthetase TycC (TycC6-C, PDB: 2JGP_A), der C-Domäne der Surfactin A-Synthetase C (SrfA-C, PDB: 2VSQ_A), der C-Domäne in FUM14p der Fumonisin-Biosynthese (GenBank: AAN74817.2) sowie der freistehenden C-Domänen der Endiin C-1027-Biosynthese (SgcC5, GenBank: AAL06678.1) und Vibriobactin-Biosynthese (VibH, GenBank: AAD48879). Die jeweils erste und letzte Aminosäureposition in der Referenzsequenz ist angegeben.

Thaxteramid C-Biosynthesegencluster

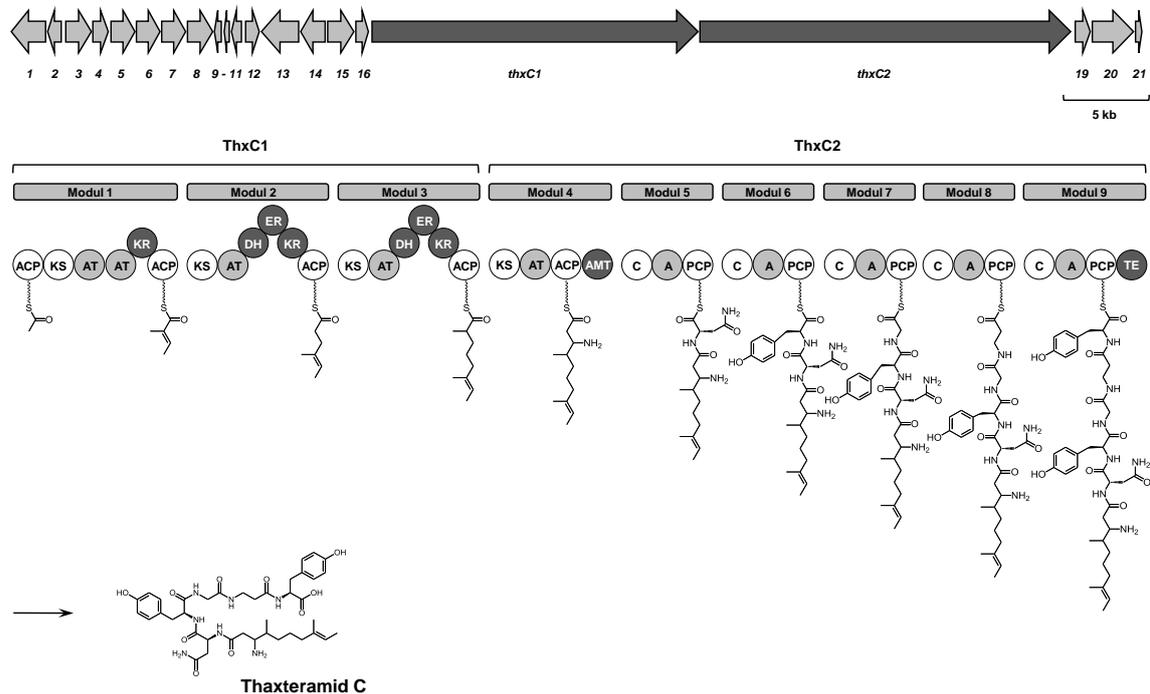


Abbildung 4-11: Mutmaßliches PKS/NRPS-Biosynthesegencluster *thxC* von Thaxteramid C. AMT: Aminotransferasedomäne.

Das Biosynthesegencluster *thxC* besitzt eine Größe von ca. 65 kbp (GC-Anteil: 71,5%) und beinhaltet 21 ORFs einschließlich der Gene *thxC1* (ORF 17) und *thxC2* (ORF 18), die die trimodulare PKS Thx1 und die hexamodulare PKS/NRPS Thx2 codieren (Abbildung 4-11 und Tabelle 4-12). Interessanterweise stellt Modul 1 ein gemischtes Lade- und Verlängerungsmodul dar. Ein solches *mixed module* ist beispielsweise im Chondramid-Biosynthesegencluster vorhanden¹⁴⁸. Entsprechend wird die Startereinheit (Acetyl-CoA) von der ersten AT auf das erste ACP und die Verlängerungseinheit (Methylmalonat) von der zweiten AT auf das zweite ACP beladen. Anstelle eines hoch konservierten Serins oder Phenylalanins an Position 200 ist in der ersten AT-Domäne (AT1a) ein Alanin vorhanden und Arginin-117 durch die unpolare Aminosäure Tryptophan ersetzt. Diese Konstellation verändert die Spezifität von AT-Domänen von Di- zu Monocarbonsäuresubstraten und unterstützt den Einbau von Acetat¹³¹ (Tabelle 4-13). Für die Einführung einer Doppelbindung in die Polyketidstruktureinheit 3-Amino-4,8-dimethyl-8-decensäure ist eine KR- und DH-Domäne in Modul 1 erforderlich. Letztere ist in diesem Modul nicht vorhanden, könnte aber durch eine potenziell iterative DH-Domäne eines der anderen

Module komplementiert werden. Über die Module 2 und 3 wird das Polyketidfragment mit Malonat und Methylmalonat erweitert einschließlich vollständiger Reduktion der Ketogruppen. Für AT2 wurde eine von der vorliegenden chemischen Struktur abweichende Substratspezifität gegenüber Methylmalonat bestimmt. Dies wurde ebenfalls in der Myxalamid-Biosynthese beobachtet, bei der eine AT-Domäne ein für Methylmalonat-Spezifität hoch konserviertes Serin-200 aufweist und Malonat aktiviert²⁹³. Analog zum Aufbau des Polyketids in Thaxteramid A/B erfolgt nach Kondensation mit Malonat eine Transaminierung der β -Ketofunktion durch die C-terminale AMT-Domäne in Modul 4. Die schrittweise Verlängerung der Polyketideinheit durch die NRPS-Module 5 - 9 mit L-Asparagin, L-Tyrosin, Glycin, β -Alanin und L-Tyrosin wird durch die Substratspezifitäten der jeweiligen A-Domänen (Tabelle 4-14) und die Konfigurationsanalyse nach Marfey bestätigt. Das lineare Produkt Thaxteramid C wird durch die TE-Domäne des letzten Moduls infolge Hydrolyse freigesetzt.

Fünf ORFs oberhalb von *thxC1* wurden identifiziert, deren Funktionen mit dem Pyrimidin-Katabolismus korrelieren und in diesem Zusammenhang die Aminosäure β -Alanin für die Thaxteramid-Biosynthese in den Genclustern *thxA* und *thxC* zur Verfügung stellen können. Diese codieren für eine β -Alanin-Synthase (ORF 4), eine Dihydropyrimidinase (ORF 5), die Domäne II einer Dihydropyrimidin-Dehydrogenase (ORF 6), eine Dihydropyrimidin-Dehydrogenase (ORF 7) and ein Cytosin/Uracil/Thiamin/Allantion-Transporter (ORF 8). Die Dihydropyrimidin-Dehydrogenase reduziert Uracil zu Dihydrouracil, welches durch die Dihydropyrimidinase zu *N*-Carbamoyl- β -Alanin hydrolysiert wird. In einem letzten Schritt hydrolysiert die β -Alanin-Synthase *N*-Carbamoyl- β -Alanin zu β -Alanin²⁹⁴. Die eventuell relevante Funktion einer Methylmalonate-Semialdehyd-Dehydrogenase (ORF 3) einer Ketoreduktase/Oxidoreductase (ORF 12) bei der Thaxteramid-Biosynthese in Anbetracht der fehlenden DH-Domäne in Modul 1 bleibt zu klären. Unter den übrigen ORFs wurden neben regulatorischen Funktionen keine offensichtlichen Zusammenhänge mit dem Sekundärmetabolismus erkannt.

ORF	Funktion	Sequenzhomologes Protein	Organismus	Identität [%]	Referenz
1	adenylate/guanylate cyclase	adenylate/guanylate cyclase	<i>Chondromyces apiculatus</i> DSM 436	61	EYF01157.1
2	membrane protein, TerC family, tellurium resistance	integral membrane protein TerC	<i>Chondromyces apiculatus</i> DSM 436	76	EYF01158.1
3	methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase	methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase	<i>Chondromyces apiculatus</i> DSM 436	84	EYF01160.1
4	β -alanine synthase	β -alanine synthase	<i>Stigmatella aurantiaca</i> DW4/3-1	87	YP_003957625.1
5	dihydropyrimidinase	dihydropyrimidinase	<i>Chondromyces apiculatus</i> DSM 436	86	EYF01162.1
6	dihydropyrimidine dehydrogenase domain II	pyridine nucleotide-disulfide oxidoreductase	<i>Chondromyces apiculatus</i> DSM 436	76	EYF01163.1
7	dihydropyrimidine dehydrogenase	dihydropyrimidine dehydrogenase	<i>Chondromyces apiculatus</i> DSM 436	88	EYF01164.1
8	cytosine/uracil/thiamine/allantoin transporter	cytosine/purine/uracil/thiamine/allantoin permease family protein	<i>Chondromyces apiculatus</i> DSM 436	82	EYF01165.1
9	hypothetical protein	hypothetical protein A2cp1_0584	<i>Anaeromyxobacter dehalogenans</i> 2CP-1	38	YP_002491007.1
10	hypothetical protein	hypothetical protein	<i>Cupriavidus taiwanensis</i>	43	WP_018006389.1
11	ECF-family sigma24-factor	ECF subfamily RNA polymerase sigma-24 subunit	<i>Anaeromyxobacter dehalogenans</i> 2CP-1	53	YP_002491009.1
12	ketoreductase/oxidoreductase	3-oxoacyl-[acyl-carrier protein] reductase	<i>Chondromyces apiculatus</i> DSM 436	78	EYF04392.1
13	sensory box histidine kinase	sensory box histidine kinase TodK	<i>Myxococcus xanthus</i> DK1622	40	YP_635070.1
14	hypothetical protein	hypothetical protein CAP_0400	<i>Chondromyces apiculatus</i> DSM 436	39	EYF00647.1
15	sigma-54 dependent transcriptional regulator	sigma-54 dependent transcriptional regulator	<i>Sorangium cellulosum</i> So ce56	49	YP_001617291.1

Tabelle 4-12: Abgeleitete Funktionen der *open reading frames* (ORFs) aus dem Thaxteramid C-Biosynthesegencluster über einer *BLASTp*-Suche.

ORF	Funktion	Sequenzhomologes Protein	Organismus	Identität [%]	Referenz
16	hypothetical protein	hypothetical protein CAP_8592	<i>Chondromyces apiculatus</i> DSM 436	39	EYF01169.1
17	PKS	soraphen polyketide synthase A	<i>Sorangium cellulosum</i> So ce26	56	AAK19883.1
18	PKS/NRPS	non-ribosomal peptide synthetase	<i>Myxococcus xanthus</i> DK1622	42	YP_631823.1
19	hypothetical protein	hypothetical protein sce2837	<i>Sorangium cellulosum</i> So ce56	72	YP_001613476.1
20	Lon protease, ATP-dependend	Lon protease	<i>Sorangium cellulosum</i> So0157-2	92	YP_008149896.1
21	hypothetical protein	hypothetical protein CAP_4336	<i>Chondromyces apiculatus</i> DSM 436	70	EYF04660.1

Tabelle 4-12-Fortsetzung.

				11	63	90	91	92	93	94	117	200	201	231	250	255	15	58	59	60	61	62	70	72	197	198	199		
1MLA				Q	Q	G	H	S	L	G	R	S	H	N	Q	V	T	K	T	W	Q	T	S	A	S	V	P		
Locus	Domäne	Spezifität	in THX																										
ThxC1	AT1a	monoCA	Ac	Q	Q	G	Q	S	I	G	W	A	H	T	N	V	W	D	T	A	W	T	Q	G	D	Y	A		
	AT1b	MM	MM	Q	Q	G	H	S	Q	G	R	S	H	T	N	V	W	R	A	D	V	V	M	S	D	Y	A		
	AT2	MM	M	H	Q	G	H	S	L	G	R	S	H	T	N	V	W	R	V	D	V	V	M	S	D	Y	A		
	AT3	MM	MM	Q	Q	G	H	S	Q	G	R	S	H	T	N	V	W	R	A	D	V	V	M	S	D	Y	A		
ThxC2	AT4	M	M	Q	Q	G	H	S	I	G	R	F	H	N	H	V	H	Q	T	A	W	T	E	A	S	H	A		

Tabelle 4-13: Bestimmung der Substratspezifitäten der AT-Domänen in ThxC1 und ThxC2 durch ClustalW-Alignement mit der *E. coli* FAS AT-Domäne 1MLA (UniProtKB: P0AAI9.2) und Auszug der 13 Aminosäuren des aktiven Zentrums sowie 11 weiterer konservierter Aminosäuren nach Yadav *et al.* Ein Phenylalanin an Position 200 ist hoch konserviert in Malonat (M)-spezifischen AT-Domänen, Ser200 indiziert den Einbau von Methylmalonat (MM), gezeigt in *fett*. Von Ser oder Phe verschiedene Aminosäuren an dieser Position und eine unpolare Aminosäure anstelle von Arg117 verändern die AT-Domänen-Spezifität von Dicarbonsäure- zu Monocarbonsäure-(monoCA)-Substraten. Positionen der Aminosäuren sind relativ zu 1MLA angegeben. Ac: Acetat, THX: Thaxteramid.

Domäne	Motiv	Spezifität	in Thaxteramid C
A5	DLTKVGEVGK	Asn	Asn
A6	DASTIAAVCK	Tyr	Tyr
A7	DILQLGVIWK	Gly	Gly
A8	VDWVTSLADK	β Ala/Phe	β Ala
A9	DASTIAAVCK	Tyr	Tyr

Tabelle 4-14: Substratspezifitäten der A-Domänen in ThxC2. Motive: konservierte Aminosäuren des aktiven Zentrums nach Stachelhaus *et al.*

4.1.2. *Chondromyces* sp. SBCm009

4.1.2.1. Zielsubstanzen und Ausbeuten

SBCm009 wurde im 10 L-Maßstab fermentiert und später zur weiteren Substanzgewinnung im 2 L-Erlenmeyer-Kulturkolben kultiviert. Das XAD-16 wurde zur Herstellung methanolischer Extrakte gewonnen. Wie für den Stamm SBSr007 beschrieben, wurde mit hochauflösenden MS-Daten des Adsorberharz-Extraktes und der Software *TargetAnalysis* eine interne Datenbanksuche nach myxobakteriellen Naturstoffen durchgeführt. Dabei wurden Apicularen A und B²⁹⁵ sowie Crocapeptin A²¹³ über die gemessenen exakten Massen und Retentionszeiten identifiziert. Apicularene und Crocapeptine sind ebenfalls aus einem anderen *Chondromyces*-Neuisolat, SBCm007, bekannt²⁹⁶. Bei dem anschließenden Screening²⁹⁶ nach isolierbaren Zielsubstanzen ist eine Gruppe von Substanzen mit m/z $[M+H]^+ = 831$, m/z $[M+H]^+ = 845$, m/z $[M+H]^+ = 818$ und m/z $[M+H]^+ = 832$ aufgefallen und wurde unter der Hypothese eine Substanzfamilie darzustellen weiter verfolgt (Abbildung 4-12).

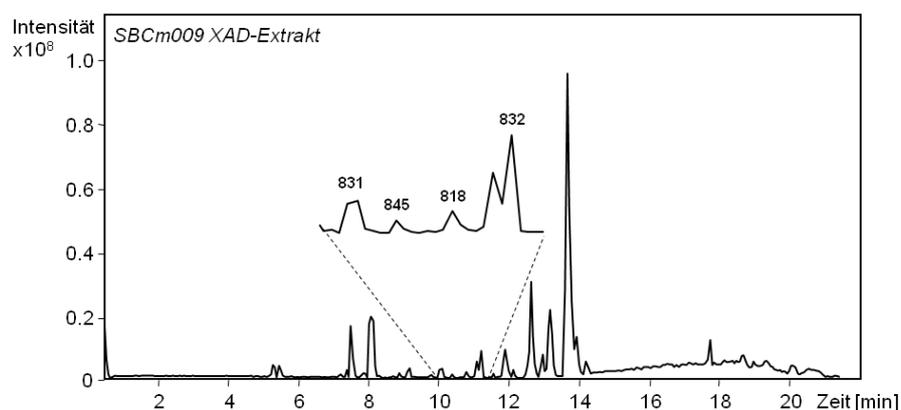


Abbildung 4-12: Basepeak-Chromatogramm positiver Modus, $m/z = 100 - 1100$, des XAD-Extrakts von *Chondromyces* sp. SBCm009 und Markierung der Zielkomponenten-Peaks.

Analog zu Kapitel 4.1.1.1. wurden für TKcpd818, TKcpd831, TKcpd832 und TKcpd845 Summenformeln generiert und eine *SciFinder*-Datenbanksuche nach bekannten Naturstoffen vollzogen. Keine Einträge fanden sich für TKcpd818 und TKcpd832, während für TKcpd831 und TKcpd845 die Nukleosid-Antibiotika Tunicamycin A resp. C aus *Streptomyces* spp. und für TKcpd845 zusätzlich die Glykosidfettsäure Cuscutic acid C aus *Cuscuta chinensis* (Teufelszwirn), einer Seidenart ermittelt wurde (Tabelle 4-15).

TKcpd818: m/z [M+H]⁺ = 818,40802				
Summenformel [M+H]⁺	Masse [Da] [M+H]⁺	 Δppm 	mSigma	SciFinder-Eintrag / CAS-Nr.
C ₃₉ H ₄₈ N ₁₇ O ₄	818,40697	1,3	4,4	Kein Eintrag
C ₄₂ H ₅₆ N ₇ O ₁₀	818,40832	0,4	7,8	
C ₃₈ H ₅₂ N ₁₃ O ₈	818,40563	2,9	8,7	
C ₄₁ H ₆₀ N ₃ O ₁₄	818,40698	1,3	9,2	
TKcpd831: m/z [M+H]⁺ = 831,42432				
C ₃₅ H ₅₅ N ₁₄ O ₁₀	831,42201	2,8	4,5	Kein Eintrag
C ₃₈ H ₆₃ N ₄ O ₁₆	831,42336	1,2	5,5	Tunicamycin A (<i>Streptomyces</i> spp.): 66054-36-2
C ₃₆ H ₅₁ N ₁₈ O ₆	831,42335	1,2	8,2	Kein Eintrag
C ₃₉ H ₅₉ N ₈ O ₁₂	831,42470	0,5	9,3	
TKcpd832: m/z [M+H]⁺ = 832,42310				
C ₄₀ H ₅₀ N ₁₇ O ₄	832,42262	0,6	3,9	Kein Eintrag
C ₄₃ H ₅₈ N ₇ O ₁₀	832,42397	1,0	6,8	
C ₄₂ H ₆₂ N ₃ O ₁₄	832,42263	0,6	9,7	
C ₃₉ H ₅₄ N ₁₃ O ₈	832,42128	2,2	9,9	
TKcpd845: m/z [M+H]⁺ = 845,44006				
C ₃₆ H ₅₇ N ₁₄ O ₁₀	845,43766	2,8	1,8	Kein Eintrag
C ₃₉ H ₆₅ N ₄ O ₁₆	845,43901	1,2	6,3	Tunicamycin C1, C2 (<i>Streptomyces</i> spp.): 66081-36-5, 73942-07-1
C ₃₃ H ₄₉ N ₂₄ O ₄	845,43631	4,4	7,1	Kein Eintrag
C ₃₅ H ₆₁ N ₁₀ O ₁₄	845,43632	4,4	11,0	
C ₃₇ H ₅₃ N ₁₈ O ₆	845,43900	1,3	11,8	
C ₃₈ H ₆₉ O ₂₀	845,43767	2,8	12,7	Cuscutic acid C (<i>Cuscuta chinensis</i> /Teufelszwirn): 212071-47-1
C ₄₀ H ₆₁ N ₈ O ₁₂	845,44035	0,3	14,2	Kein Eintrag

Tabelle 4-15: Exakte Massen der Zielkomponenten aus *Chondromyces* sp. SBCm009, berechnete Summenformeln und zugehörige SciFinder-Datenbankeinträge.

Die pflanzliche Glykosidfettsäure Cuscutic acid C erschien als bakterieller Naturstoff unwahrscheinlich. Aufgrund ihrer polaren Natur sind Nukleosid-Antibiotika wie Tunicamycine bei chromatographischer Trennung auf C18-Säulen vornehmlich im vorderen Elutionsbereich zu erwarten. Außerdem sind diese bisher nicht für Myxobakterien beschrieben worden. Somit wurden die vier Komponenten für die Isolation ausgewählt.

Alle Substanzen wurden in für die Strukturaufklärung und Testung ausreichender Menge isoliert. Eluierende Komponenten im hinteren Bereich der Basepeak-Chromatogramme in den Abbildungen 4-13 und 4-14 sind in den gezeigten Analysen identisch und konnten durch einen Leerprobenlauf (rot) auf Lösungsmittel- und Säulenverunreinigungen zurückgeführt werden. Insgesamt wurden von TKcpd818 1,2 mg, von TKcpd832 3,6 mg, von TKcpd831 5,2 mg und von TKcpd845 0,7 mg erhalten.

Die nachfolgend beschriebene Strukturaufklärung zeigte, dass es sich bei den isolierten Substanzen um zwei Substanzfamilien handelte. Hierfür wurden die Namen Chondrodepside (TKcpd832, TKcpd818) und Chondrosaride (TKcpd845, TKcpd831) gewählt und fortan verwendet.

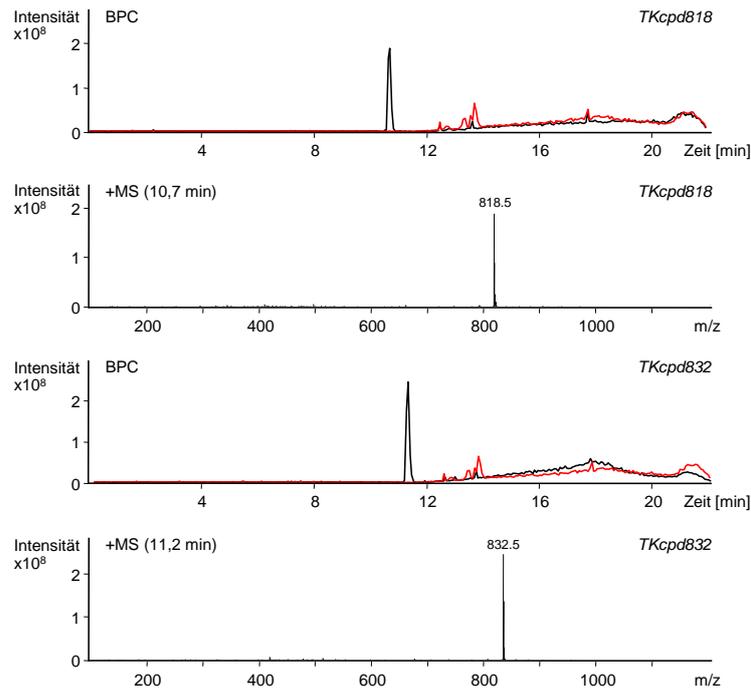


Abbildung 4-13: Basepeak-Chromatogramme positiver Modus, $m/z = 100 - 1100$, und Massenspektren der gereinigten Substanzen TKcpd818 und TKcpd832. Rot: Leerprobenlauf (Kontrolle, überlagert).

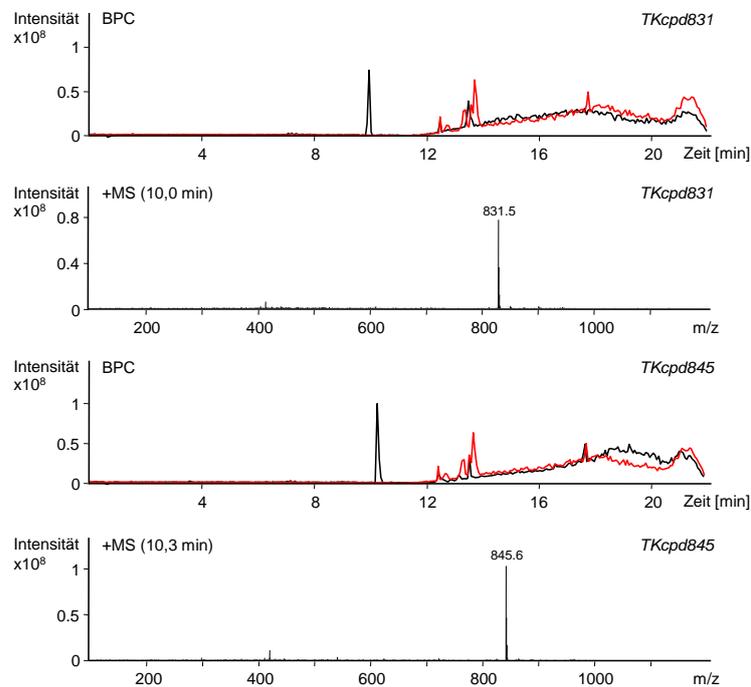


Abbildung 4-14: Basepeak-Chromatogramme positiver Modus, $m/z = 100 - 1100$, und Massenspektren der gereinigten Substanzen TKcpd831 und TKcpd845. Rot: Leerprobenlauf (Kontrolle, überlagert).

4.1.2.2. Strukturaufklärung

TKcpd832: Chondrodepsid A

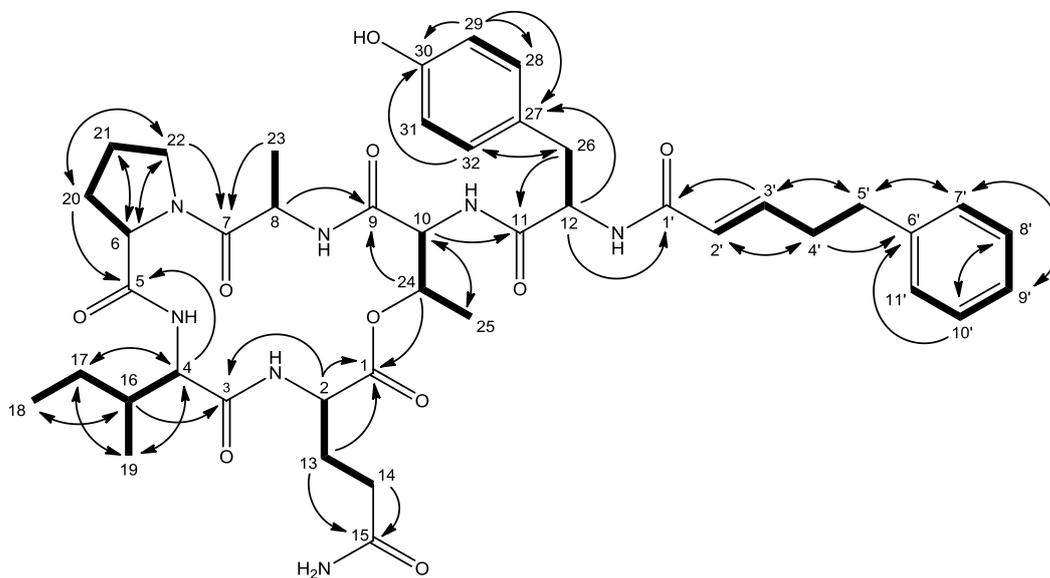


Abbildung 4-15: Struktur von Chondrodepsid A mit ausgewählten ^1H - ^1H -COSY- (*fett*) und HMBC-Korrelationen (*Pfeile*).

Chondrodepsid A wurde in Methanol- d_4 gelöst und über NMR spektroskopisch strukturell aufgeklärt. Das Protonenspektrum zeigt mehrere Signale aliphatischer Protonen (bei $\delta_{\text{H}} = 0,7 - 4,6$ ppm) und 7 Signale olefinischer resp. aromatischer Protonen zwischen $\delta_{\text{H}} = 5,99$ ppm und $\delta_{\text{H}} = 7,25$ ppm (Tabelle 4-16). 6 Protonensignale im Bereich von $\delta_{\text{H}} = 4,2 - 4,6$ ppm deuten auf α -CH-Gruppen eines Peptidgerüsts hin. 6 Aminosäureeinheiten und 2 zusätzliche Spinsysteme können aus HMBC- und 2D-TOCSY-Korrelationen bestimmt werden. Im Folgenden wird die Strukturaufklärung des Depsipeptids von der C-terminalen Aminosäureeinheit bis zur N-terminal verknüpften Seitenkette dargestellt.

Ein Triplet ($^3J = 7,6$ Hz) bei $\delta_{\text{H}} = 4,35$ ppm kann dem α -CH einer Glutamineinheit zugeordnet werden. Die Tripletstruktur spricht für eine benachbarte CH_2 -Gruppe. COSY-Korrelationen mit den Signalen bei $\delta_{\text{H}} = 1,88$ ppm und $\delta_{\text{H}} = 2,01$ ppm weisen die Kerne H-13 dieser Methylengruppe zu. Weitere COSY-Korrelationen von H-13 zu H-14 ($\delta_{\text{H}} = 2,21$ ppm) verweisen auf die γ -ständige Methylengruppe. Für die β -Methylenprotonen werden HMBC-Korrelationen zu zwei Carbonylkohlenstoffatomen, den Kernen C-1 ($\delta_{\text{C}} = 172,25$ ppm) und C-15 ($\delta_{\text{C}} = 177,12$ ppm), gefunden. Zwei Korrelationen von H-2 zu C-1 und H-14 zu C-15 kennzeichnen letzteres als endständiges Carbonylkohlenstoffatom und damit C-

1 als Kohlenstoffatom des Peptidrückgrats. Die Tieffeldverschiebung von C-15 steht im Einklang mit einer Säureamidstruktur.

Die Verknüpfung mit der darauffolgenden Aminosäureeinheit geht aus der Korrelation von H-2 zu C-3 ($\delta_C = 173,62$ ppm) der Carbonylfunktion der Isoleucineinheit hervor. Das Dublett ($^3J = 7,5$ Hz) des α -Protons H-4 bei $\delta_H = 4,29$ ppm deutet auf eine verzweigt-kettige Struktur durch Kopplung mit nur einem benachbarten Wasserstoffatom hin. Es werden neben dem Signal des α -Protons Multipletts bei $\delta_H = 1,83$ ppm (H-16), $\delta_H = 1,19$ ppm und $\delta_H = 1,44$ ppm (H-17) sowie bei $\delta_H = 0,95$ ppm (H-18 und H-19) detektiert. 2D-TOCSY-Korrelationen dieser Signale sprechen für ein gemeinsames Spinsystem. Die Anwesenheit von zwei Methylgruppen bei $\delta_H = 0,95$ ppm ist gekennzeichnet durch HSQC-Korrelationen zu zwei Kohlenstoffatomen, C-18 ($\delta_C = 11,64$ ppm) und C-19 ($\delta_C = 15,0$ ppm). Die chemischen Verschiebungen der beiden aliphatischen Kohlenstoffatome C-16 ($\delta_C = 37,55$ ppm) und C-17 ($\delta_C = 27,27$ ppm) können ebenfalls dem HSQC-Spektrum entnommen werden. Die Unterscheidung zwischen Leucin und Isoleucin gelingt durch Betrachtung der COSY- und HMBC-Korrelationen. Wechselseitige Kopplungen von H-16 und H-19, H-16 und H-17 sowie H-17 und H-18 implizieren das Vorhandensein einer Methylgruppe an β - und γ -Position der Kohlenstoffkette. Dies wird unterstützt durch die Beobachtung von wechselseitigen HMBC-Korrelationen der beiden Signalgruppen H-4, H-17, H-19 sowie H-16 und H-18. Durch die Korrelation von H-16 mit C-3 wird dieses als Carbonylkohlenstoffatom des Isoleucins festgelegt während die Verknüpfung mit der Prolineinheit durch die Korrelation von H-4 mit C-5 ($\delta_C = 173,75$ ppm) erkennbar ist.

Ein Multiplett bei $\delta_H = 4,49$ ppm repräsentiert das Signal des Wasserstoffs H-6 der Prolineinheit. Die Signale bei $\delta_H = 2,02$ ppm und $\delta_H = 2,27$ ppm (H-20), $\delta_H = 1,89$ ppm und $\delta_H = 2,18$ ppm (H-21) sowie $\delta_H = 3,48$ ppm und $\delta_H = 3,66$ ppm (H-22) bilden die Gruppe der Ringprotonen. Die zugehörigen Ringkohlenstoffatome C-6 ($\delta_C = 60,38$ ppm), C-20 ($\delta_C = 32,78$ ppm), C-21 ($\delta_C = 23,51$ ppm) und C-22 ($\delta_C = 48,06$ ppm) können durch das HSQC-Spektrum festgelegt werden. Die Konnektivitäten des Fünfrings werden durch starke COSY- und HMBC-Korrelationen der Prolinprotonen bestimmt. Die Prolinstruktur wird zusätzlich durch das Erscheinen zweier $^1\text{H-NMR}$ -Signale jeder Methylengruppe und HMBC-Korrelationen von H-20 zu C-5 und H-22 zum Carbonylkohlenstoffatom C-7 ($\delta_C = 173,82$ ppm) der nachfolgenden Alanineinheit untermauert.

Letztere ist durch die Signale des α -Protons H-8 bei $\delta_{\text{H}} = 4,20$ ppm und der Methylgruppe bei $\delta_{\text{H}} = 1,39$ ppm (H-23) charakterisiert, dabei korreliert H-8 im HSQC-Spektrum mit dem Kern C-8 ($\delta_{\text{C}} = 49,76$ ppm) und H-23 mit C-23 ($\delta_{\text{C}} = 17,26$ ppm). Die Alaninstruktur wird durch die Signalaufspaltungen von H-8 in ein Quartett (${}^3J = 7,0$ Hz) und H-23 in ein Dublett (${}^3J = 7,0$ Hz), hervorgerufen durch die vicinalen Kopplungen von Methylgruppe und α -CH, belegt. Die HMBC-Korrelationen von H-23 mit C-7 und H-8 mit C-9 ($\delta_{\text{C}} = 169,64$ ppm) stammen von Resonanzen mit dem Peptidgrundgerüst.

Bei dem Signal von C-9 handelt es sich um das Carbonylkohlenstoffatom der Threonineinheit. Diese ist durch die Signale von H-10 ($\delta_{\text{H}} = 4,60$ ppm), H-24 ($\delta_{\text{H}} = 5,36$ ppm) und H-25 ($\delta_{\text{H}} = 0,73$ ppm) gekennzeichnet. Durch die C-O-Bindung an Position 24 sind die Signale von β -Proton und -Kohlenstoffatom ($\delta_{\text{C}} = 72,28$ ppm) entsprechend tieffeldverschoben. Homonukleare Kopplungen zwischen H-10 und H-24 als auch zwischen H-24 und H-25 belegen die Sequenz der Kohlenstoffkette, genauso wie heteronukleare Korrelationen von H-10 mit C-25 ($\delta_{\text{C}} = 16,0$ ppm), von H-25 mit C-10 ($\delta_{\text{C}} = 56,65$ ppm) und von H-24 mit C-9. Die Aufspaltungen der Protonensignale von H-24 in ein Dublett vom Quartett (${}^3J = 6,5$ Hz / $6,5$ Hz / $6,5$ Hz) und von H-25 in ein Dublett (${}^3J = 6,5$ Hz) korrespondieren mit der Threoninstruktur. Im HMBC-Spektrum wird eine zusätzliche Korrelation des Protons H-24 nach C-1 ($\delta_{\text{C}} = 172,25$ ppm) der Carboxylgruppe der C-terminalen Glutamineinheit detektiert. Dessen chemische Verschiebung deutet auf eine Carbonsäuresterfunktion hin. Damit wird der Ringschluss zwischen Threonin und Glutamin über die Hydroxylgruppe zu einem zyklischen Pentapeptid gezeigt.

Peptidisch ist die Threonin- mit einer Tyrosineinheit verbunden, erkennbar durch die HMBC-Korrelation von H-10 mit dem Kohlenstoffatom C-11 ($\delta_{\text{C}} = 174,31$ ppm) der Carbonsäureamidfunktion. Aus dem COSY-Spektrum gehen die Signale der koppelnden α - und β -Protonen H-12 bei $\delta_{\text{H}} = 4,53$ ppm und H-26 bei $\delta_{\text{H}} = 2,97$ ppm hervor. Erwartungsgemäß erscheint das Signal von H-12 durch die Nachbarschaft zu zwei Protonen als Triplett (${}^3J = 8,1$ Hz) und von H-26 durch ein benachbartes Proton als Dublett (${}^3J = 8,1$ Hz). Die Signale der aromatischen Protonen liegen bei $\delta_{\text{H}} = 6,71$ ppm (H-28 / H-32) und $\delta_{\text{H}} = 7,10$ ppm (H-29 / H-31). Aus dem HSQC-Spektrum lassen sich die aromatischen Kohlenstoffatome C-28 / C-32 ($\delta_{\text{C}} = 131,38$ ppm) und C-29 / C-31 ($\delta_{\text{C}} = 116,32$ ppm) ableiten. Die beiden fehlenden Ringkerne werden durch HMBC-Korrelationen von H-28 / H-32 und H-29 / H-31 mit C-30 ($\delta_{\text{C}} = 157,57$ ppm) und von H-

12 und H-29 / H-31 mit C-27 ($\delta_C = 128,47$ ppm) gefunden. Daneben belegen weitere HMBC-Korrelationen die Abfolge der Kohlenstoffatome des Sechsrings. Die chemische Verschiebung von C-30 ins Tieffeld und die Dublettaufspaltungen der beiden Phenylprotonensignale resultieren aus der para-Hydroxysubstitution des Aromaten.

Die Korrelation von H-12 mit C-1' ($\delta_C = 168,36$ ppm) repräsentiert die N-terminale Verknüpfung des Tyrosins mit einer weiteren Struktureinheit, der 5-Phenyl-2-pentensäure-Seitenkette. Von dieser erscheinen sieben Signale im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum. Durch COSY-Korrelationen der Protonen H-2' ($\delta_H = 5,99$ ppm), H-3' ($\delta_H = 6,80$ ppm), H-4' ($\delta_H = 2,51$ ppm) und H-5' ($\delta_H = 2,75$ ppm) kann die Sequenz der Kohlenstoffkette festgelegt werden. Hierzu zählen die Kerne C-2' ($\delta_C = 124,46$ ppm), C-3' ($\delta_C = 145,41$ ppm), C-4' ($\delta_C = 34,77$ ppm) und C-5' ($\delta_C = 35,56$ ppm). Dies steht im Einklang mit Korrelationen der Protonen der Pentensäureteilstruktur im HMBC-Spektrum. Die chemische Verschiebung der Signale von H-2' und H-3' und das Auftreten eines Dubletts von H-2' mit einer Kopplungskonstanten von $^3J = 15,4$ Hz kennzeichnen die Doppelbindung zwischen C-2' und C-3' mit einer *trans*-Konfiguration. Ein Dublett ($^3J = 7,5$ Hz) bei $\delta_H = 7,18$ ppm und zwei Triplets bei $\delta_H = 7,25$ ppm ($^3J = 7,5$ Hz) und $\delta_H = 7,15$ ppm ($^3J = 7,4$ Hz) bildet die Gruppe der Phenylprotonensignale H-7' / H-11', H-8' / H-10', H-9' und belegen das Vorhandensein eines unsubstituierten Aromaten. Die Anordnung der Ringkohlenstoffatome lässt sich durch die Beobachtung der HMBC-Korrelationen von H-4' und H-8' / H-10' mit C-6' ($\delta_C = 142,41$ ppm), von H-5' und H-9' mit C-7' / C-11' ($\delta_C = 129,46$ ppm) und H-8' mit C-10' ($\delta_C = 129,46$ ppm) beschreiben.

4. Neue Sekundärmetabolitfamilien

Gruppe	Position	Funktion	δ_H	J [Hz]	COSY	δ_C	HMBC	
<i>Glutamin</i>	1	C-OOR				172,25		
	2	CH	4,35 t	7,6	1,88 2,01	52,44	27,58 32,10 172,25 173,62	
	13	CH ₂	1,88 m		2,01 2,21 4,35	27,58	32,10 52,44 172,25 177,12	
			2,01 m		1,88 2,21 4,35		32,10 52,44 172,25 177,12	
	14	CH ₂	2,21 m		1,88 2,01	32,10	27,58 52,44 177,12	
	15	NH ₂ C=O	-			177,12		
	2	NH	-					
	<i>Isoleucin</i>	3	C=O				173,62	
		4	CH	4,29 d	7,5	1,83	58,11	15,0 27,27 37,55 173,62 173,75
		16	CH	1,83 m		0,95 1,19 1,44 4,29	37,55	11,64 15,0 27,27 58,11 173,62
17		CH ₂	1,19 m		0,95 1,44 1,83	27,27	11,64 15,0 37,55 58,11	
			1,44 m		0,95 1,19 1,83		11,64 15,0 37,55 58,11	
18		CH ₃	0,95 m		1,19 1,44	11,64	15,0 27,27 37,55	
19		CH ₃	0,95 m		1,83	15,0	27,27 37,55 58,11	
4		NH	-					
<i>Prolin</i>		5	C=O				173,75	
		6	CH	4,49 m		2,02 2,27	60,38	23,51 32,78 48,06 173,75

Tabelle 4-16: NMR-Tabelle zu Chondrodepsid A (gemessen in Methanol-*d*₄). d = Dublett, t = Triplet, q = Quartett, dq = Dublett vom Quartett, m = Multiplett.

Gruppe	Position	Funktion	δ_{H}	J [Hz]	COSY	δ_{C}	HMBC
<i>Prolin</i>	20	CH ₂	2,02 m		1,89	32,78	23,51
					2,18		48,06
					4,49		173,75
			1,89		23,51		
			2,18		48,06		
			4,49		60,38		
	21	CH ₂	1,89 m		2,02	23,51	32,78
					2,27		48,06
					3,48		60,38
			3,66				
			2,18 m		2,02		32,78
			2,27		48,06		
	22	CH ₂	3,48 m		1,89	48,06	23,51
					2,18		32,78
							60,38
6	N-R			1,89		23,51	
				2,18		32,78	
						60,38	
<i>Alanin</i>	7	C=O				173,82	
	8	CH	4,20 q	7	1,39	49,76	17,26
							169,64
							173,82
	23	CH ₃	1,39 d	7	4,20		17,26
							173,82
8	NH	-					
<i>Threonin</i>	9	C=O				169,64	
	10	CH	4,60 m		5,36	56,65	16,0
							72,28
							169,64
							174,31
	24	CH-OR	5,36 dq	6,5/6,5/6,5	0,73		72,28
				4,60			169,64
							172,25
25	CH ₃	0,73 d	6,5		5,36	16,0	56,65
							72,28
							169,64
<i>Tyrosin</i>	10	NH	-				
	11	C=O				174,31	
	12	CH	4,53 t	8,1	2,97		57,77
128,47							
168,36							
174,31							

Tabelle 4-16: NMR-Tabelle zu Chondrodepsid A - Fortsetzung.

Gruppe	Position	Funktion	δ_H	J [Hz]	COSY	δ_C	HMBC
<i>Tyrosin</i>	26	CH ₂	2,97 d	8,1	4,53	37,37	57,77 128,47 131,38 174,31
	27	C				128,47	
	28/32	CH	7,10 d	8,4	6,71	131,38	37,37 116,32 131,38 157,51
	29/31	CH	6,71 d	8,4	7,10	116,32	116,32 128,47 131,38 157,51
	30	C-OH	-				157,51
	12	NH	-				
	<i>Seitenkette</i>	1'	C=O				168,36
2'		CH	5,99 d	15,4	6,80	124,46	34,77 145,41 168,36
3'		CH	6,80 m		2,51 5,99	145,41	34,77 35,56 124,46 168,36
4'		CH ₂	2,51 m		2,75 6,80	34,77	35,56 124,46 142,41 145,41
5'		CH ₂	2,75 m		2,51	35,56	34,77 129,46 142,41 145,41
6'		C				142,41	
7'/11'		CH	7,18 d	7,5	7,25	129,46	35,56 126,95 129,46
8'/10'		CH	7,25 t	7,5	7,15 7,18	129,46	126,95 129,46 142,41
9'		CH	7,15 t	7,4	7,25	126,95	129,46

Tabelle 4-16: NMR-Tabelle zu Chondrodepsid A - Fortsetzung.

TKcpd818: Chondrodepsid B

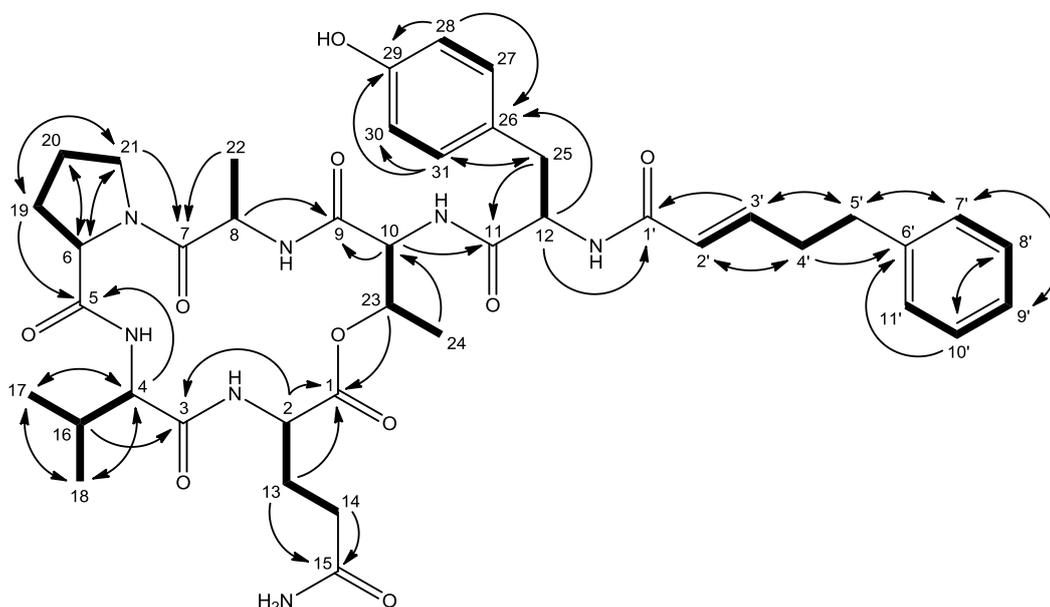


Abbildung 4-16: Struktur von Chondrodepsid B mit ausgewählten ^1H - ^1H -COSY- (fett) und HMBC-Korrelationen (Pfeile).

Bei Auswertung der NMR-Daten von Chondrodepsid B, vermessen in Methanol- d_4 , stellte sich dessen Struktur als Valinderivat von Chondrodepsid A heraus. Die deskriptive Abfolge der nachfolgenden Strukturaufklärung erfolgt daher analog zum A-Derivat.

Das α -Proton H-2 der C-terminalen Glutamineinheit erscheint hier aufgrund der benachbarten CH_2 -Gruppe ebenfalls als Triplet ($^3J = 7,6$ Hz) bei $\delta_{\text{H}} = 4,37$ ppm (Tabelle 4-17). Aus den COSY-Korrelationen können H-13 ($\delta_{\text{H}} = 1,87$ ppm, $\delta_{\text{H}} = 2,02$ ppm) der β -Methylengruppe und H-14 ($\delta_{\text{H}} = 2,21$ ppm) der γ -Methylengruppe zugeordnet werden. Durch HMBC-Korrelationen von H-2 und H-13 mit C-1 ($\delta_{\text{C}} = 171,97$ ppm) sowie H-13 und H-14 mit C-15 ($\delta_{\text{C}} = 177,06$ ppm) werden diese als Carbonylkohlenstoffatome des Peptidgerüsts (C-1) und des Säureamids (C-15) definiert. Die chemischen Verschiebungen der Kerne stehen dazu nicht im Widerspruch.

Über eine weitere HMBC-Korrelation von H-2 zu C-3 ($\delta_{\text{C}} = 173,45$ ppm) wird die Verknüpfung mit der Valineinheit über die Glutamin-Aminofunktion gezeigt. Ein Dublett ($^3J = 8,6$ Hz) bei $\delta_{\text{H}} = 4,08$ ppm von H-4 und die gleichzeitigen COSY-Korrelationen von H-16 ($\delta_{\text{H}} = 2,01$ ppm) mit H-4 und den Methylgruppenprotonen H-17 ($\delta_{\text{H}} = 0,97$ ppm) und H-18 ($\delta_{\text{H}} = 0,98$ ppm) stehen im Einklang mit einer verzweigten Struktur. Außerdem implizieren ein gemeinsames Spinsystem von vier Protonensignalen im 2D-TOCSY-

Spektrum und wechselseitige heteronukleare Korrelationen dieser zu den Kernen C-4 ($\delta_C = 59,97$ ppm), C-17 ($\delta_C = 19,76$ ppm) und C-18 ($\delta_C = 18,84$ ppm) das Vorhandensein einer Valineinheit an dieser Position. HMBC-Korrelationen von H-16 zu C-3 und H-4 zu C-5 ($\delta_C = 173,57$ ppm), dem Prolin-Carbonylkohlenstoffatom ergeben eine Einordnung zwischen diesem und der Glutamineinheit.

Ebenso wie bei Chondrodepsid A bilden ein Signal von H-6 ($\delta_H = 4,47$ ppm) und jeweils zwei Signale von H-19 ($\delta_H = 2,03$ ppm, $\delta_H = 2,27$ ppm), H-20 ($\delta_H = 1,89$ ppm, $\delta_H = 2,18$ ppm) und H-21 ($\delta_H = 3,48$ ppm, $\delta_H = 3,66$ ppm) die Gruppe der Ringprotonen der Prolineinheit. Auch hier können die Konnektivitäten der Ringkerne durch starke COSY- und HMBC-Korrelationen bestimmt werden. Ferner werden Korrelationen von H-19 mit C-5 und H-21 mit C-7 ($\delta_C = 173,66$ ppm) beobachtet, dem Carbonylkohlenstoffatom der Alanineinheit, mit der ebenfalls die Methylgruppenprotonen H-22 ($\delta_H = 1,38$ ppm) korrelieren. Typischerweise sind COSY- und 2D-TOCSY-Korrelationen nur zwischen diesen Protonen und dem α -Proton H-8 ($\delta_H = 4,17$ ppm) zu beobachten. Wie erwartet erscheinen dabei ein Dublett ($^3J = 7,0$ Hz) für H-22 und ein Quartett ($^3J = 7,0$ Hz) für H-8 im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum. Eine HMBC-Korrelation mit C-9 ($\delta_C = 169,58$ ppm) belegt die Verbindung mit der nachfolgenden Threoninteilstruktur.

Die Signale von H-10 ($\delta_H = 4,60$ ppm), H-23 ($\delta_H = 5,36$ ppm) und H-24 ($\delta_H = 0,74$ ppm) repräsentieren die Protonensignale der Threonineinheit. Wechselseitige Korrelationen zwischen H-10 und H-23 sowie H-23 und H-24 legen neben einer Korrelation von H-24 zu C-10 ($\delta_C = 56,63$ ppm) die Abfolge der funktionellen Gruppen fest. Die chemischen Verschiebungen von H-23 und C-23 ($\delta_C = 72,27$ ppm) sind ebenfalls mit einer Threoninstruktur vereinbar. Durch die HMBC-Korrelation von H-23 mit C-1 ($\delta_C = 171,97$ ppm) wird auch hier die Verknüpfung zu einem zyklischen Pentapeptid über einen Carbonsäureester gezeigt. Über die Korrelationen von H-10 mit C-9 und C-11 ($\delta_C = 174,20$ ppm), dem Carbonylkohlenstoffatom der N-terminalen Tyrosineinheit, wird die Verbindung mit dem Peptidgrundgerüst hergestellt.

Für die Tyrosineinheit werden ein Triplet ($^3J = 8,1$ Hz) bei $\delta_H = 4,54$ ppm und ein Dublett ($^3J = 8,1$ Hz) bei $\delta_H = 2,97$ ppm für die vicinal koppelnden aliphatischen Protonen H-12 und H-25 gefunden. Während H-12 mit dem Phenylkohlenstoff C-26 ($\delta_C = 128,43$ ppm) korreliert, kann für H-25 eine Korrelation mit C-11 und C-27 / C-31 ($\delta_C = 131,35$ ppm) im HMBC-Spektrum detektiert werden. Die Signale der aromatischen Protonen liegen bei δ_H

= 7,10 ppm (H-27 / H-31) und bei $\delta_{\text{H}} = 6,71$ ppm (H-28 / H-30) und spalten durch die Phenolstruktur des Tyrosins in Dubletts ($^3J = 8,4$ Hz) auf. Durch die Hydroxyfunktion ist das Signal des Ringkerns C-29 ($\delta_{\text{C}} = 157,35$ ppm) entsprechend tieffeldverschoben. C-29 kann durch die HMBC-Korrelation der Ringprotonen beobachtet werden. Desweiteren beschreiben HMBC-Korrelationen von H-27 / H-31 nach C-28 / C-30 ($\delta_{\text{C}} = 116,35$ ppm) und von H-28 / H-30 nach C-26 den aromatischen Ring.

Die Verknüpfung der Tyrosineinheit mit der Phenylpentensäure-Seitenkette über ein Carbonsäureamid kann der HMBC-Korrelation von H-12 nach C-1' ($\delta_{\text{C}} = 168,15$ ppm) entnommen werden. Die chemischen Verschiebungen der Protonensignale dieser Gruppe sind identisch mit denen des Phenylpentensäurerestes von Chondrodepsid A. Entsprechend werden vergleichbare COSY-, HSQC- und HMBC-Korrelationen gefunden, die die Festlegung der gleichen Konstitution von aliphatischer Kette und aromatischer Ringstruktur zulassen. Die Kopplungskonstante von $^3J = 15,4$ Hz der Protonen H-2' und H-3' verweist gleichermaßen auf eine *trans*-Konfiguration der Doppelbindung.

Gruppe	Position	Funktion	δ_{H}	J [Hz]	COSY	δ_{C}	HMBC	
<i>Glutamin</i>	1	COOR				171,97		
	2	CH	4,37 t	7,6	1,87 2,02	52,27	27,90 32,16 171,97 173,45	
	13	CH ₂	1,87 m		2,02 2,21 4,37	27,90	32,16 52,27 171,97 177,06	
			2,02 m		1,87 2,21 4,37		32,16 52,27 171,97 177,06	
	14	CH ₂	2,21 m		1,87 2,02	32,16	27,90 52,27 177,06	
	15	NH ₂ C=O	-			177,06		
	2	NH	-					
	<i>Valin</i>	3	C=O				173,45	
		4	CH	4,08 d	8,6	2,01	59,97	18,84 19,76 31,01 173,45 173,57

Tabelle 4-17: NMR-Tabelle zu Chondrodepsid B (gemessen in Methanol-*d*₄). d = Dublett, t = Triplett, dt = Dublett vom Triplett, q = Quartett, m = Multiplett.

4. Neue Sekundärmetabolitfamilien

Gruppe	Position	Funktion	δ_H	J [Hz]	COSY	δ_C	HMBC				
<i>Valin</i>	16	CH	2,01 m		0,97	31,01	18,84				
					0,98		19,76				
					4,08		59,97				
							173,45				
	17	CH ₃	0,97 m		2,01	19,76	18,84				
						31,01					
						59,97					
	18	CH ₃	0,98 m		2,01	18,84	19,76				
						31,01					
						59,97					
	4	NH	-								
<i>Prolin</i>	5	C=O				173,57					
	6	CH	4,47 m		2,03	60,40	23,51				
					2,27		32,75				
							48,04				
	19	CH ₂	2,03 m		1,89	32,75	48,04				
					2,18						
					2,27						
					4,47						
					2,27 m			1,89	23,51		
								2,03	60,40		
		2,18	173,57								
			4,47								
	20	CH ₂	1,89 m		2,03	23,51	32,75				
					2,18			60,40			
					2,27						
3,48											
3,66											
2,18 m					1,89				32,75		
	2,03	48,04									
		2,27									
		3,48									
		3,66									
21	CH ₂	3,48 m		1,89	48,04	23,51					
				2,18			32,75				
				3,66				60,40			
									173,66		
				3,66 m						1,89	23,51
										2,18	32,75
	3,48	60,40									
		173,66									
	6	N-R									
<i>Alanin</i>	7	C=O				173,66					
	8	CH	4,17 q	7,0	1,38	49,77	17,25				
							169,58				
							173,66				
	22	CH ₃	1,38 d	7,0	4,17	17,25	49,77				
						173,66					
	8	NH	-								

Tabelle 4-17: NMR-Tabelle zu Chondrodepsid B - Fortsetzung.

Gruppe	Position	Funktion	δ_H	J [Hz]	COSY	δ_C	HMBC	
<i>Threonin</i>	9	C=O				169,58		
	10	CH	4,60 m		5,36	56,63	169,58 174,20	
	23	CH-OR	5,36 m		0,74 4,60	72,27	16,02 171,97	
	24	CH ₃	0,74 d	6,6	5,36	16,02	56,63 72,27	
	10	NH	-					
<i>Tyrosin</i>	11	C=O				174,20		
	12	CH	4,54 t	8,1	2,97	57,71	37,42 128,43 168,15 174,20	
	25	CH ₂	2,97 d	8,1	4,54	37,42	57,71 128,43 131,35 174,20	
	26	C				128,43		
	27 / 31	CH	7,10 d	8,4	6,71	131,35	37,42 116,35 131,35 157,35	
	28 / 30	CH	6,71 d	8,4	7,10	116,35	116,35 128,43 157,35	
	29	C-OH	-			157,35		
	12	NH	-					
	<i>Seitenkette</i>	1'	C=O				168,15	
		2'	CH	5,99 d	15,4	6,80	124,47	34,76 168,15
3'		CH	6,80 dt	7,0 / 15,4	2,51 5,99	145,40	34,76 35,57 124,47 168,15	
4'		CH ₂	2,51 m		2,75 6,80	34,76	35,57 124,47 142,31 145,40	
5'		CH ₂	2,75 m		2,51	35,57	34,76 129,43 142,31 145,40	
6'		C				142,31		
7' / 11'		CH	7,18 d	7,4	7,25	129,43	35,57 126,97 129,43	
8' / 10'		CH	7,25 t	7,6	7,15 7,18	129,43	126,97 129,43 142,31	
9'		CH	7,15 t	7,3	7,25	126,97	129,43	

Tabelle 4-17: NMR-Tabelle zu Chondrodepsid B - Fortsetzung.

TKcpd831: Chondrosarid B

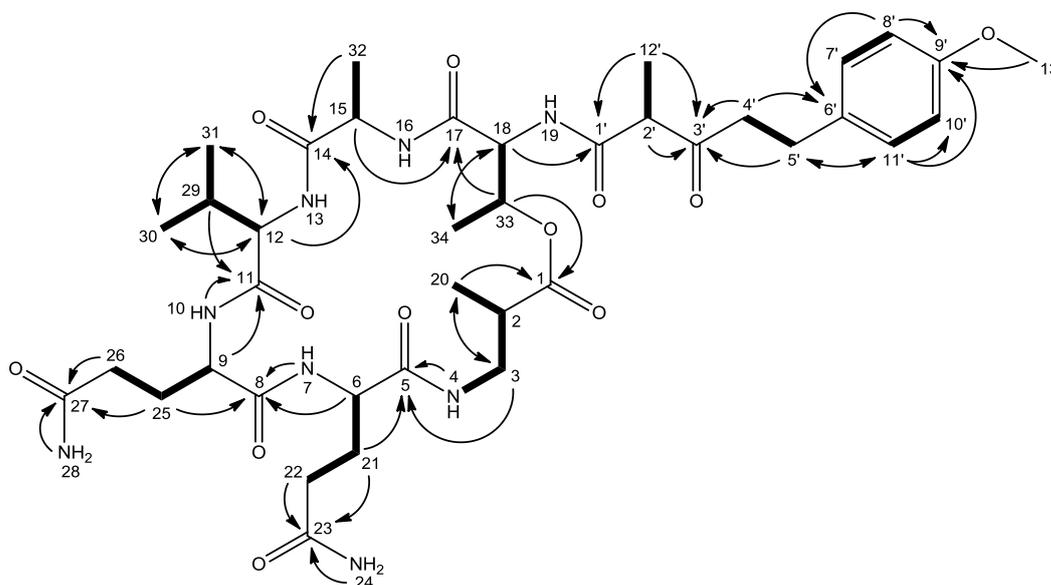


Abbildung 4-17: Struktur von Chondrosarid B mit ausgewählten ^1H - ^1H -COSY- (*fett*) und HMBC-Korrelationen (*Pfeile*).

Chondrosarid B stellt ein zyklisches Hexapeptid dar, an das eine lipophile Seitenkette gebunden ist. Um die Position zweier vorhandener Glutamine zu bestimmen, wurde die Substanz in Dimethylsulfoxid- d_6 gemessen. Aus diesem Grund wird die Strukturaufklärung der Chondrosaride zunächst für das B-Derivat beschrieben. Wahrscheinlich bedingt durch Rotationskonformere treten im Protonenspektrum für jedes Spinsystem zwei Signalgruppen auf. Die Strukturaufklärung gelang durch die Betrachtung einer dieser Signalgruppen und Verfolgung der dazugehörigen Signalkorrelationen. Dadurch konnte nach Auswertung der HMBC- und 2D-TOCSY-Korrelationen die Zahl der Aminosäureeinheiten auf 6 festgelegt und 3 Spinsysteme für die Seitenkette ermittelt werden. Wie auch bei den vorangehenden Kapiteln beginnt die Strukturaufklärung mit dem C-Terminus des Peptidgerüsts und endet mit der Seitenkette.

Die Sequenz des Peptidteils beginnt mit einer α -Methyl- β -Alanineinheit. Hierfür werden die Signale von H-2 ($\delta_{\text{H}} = 2,70$ ppm), H-3 ($\delta_{\text{H}} = 2,93$ ppm, $\delta_{\text{H}} = 3,29$ ppm), H-20 ($\delta_{\text{H}} = 1,06$ ppm) und des Amidprotons H-4 ($\delta_{\text{H}} = 7,70$ ppm) gefunden (Tabelle 4-18). Die chemischen Verschiebungen der α - und β -Protonen und -Kohlenstoffatome C-2 ($\delta_{\text{C}} = 38,57$ ppm) und C-3 ($\delta_{\text{C}} = 40,89$ ppm) sind typisch für eine β -Aminosäure (vgl. Thaxteramide). Die α -Position der Methylgruppe kann den COSY-Korrelationen von H-2 mit H-20 und den HMBC-Korrelationen von H-3 mit C-20 ($\delta_{\text{C}} = 14,44$ ppm) und H-20 mit

C-1 ($\delta_C = 173,05$ ppm) entnommen werden. Weitere Korrelationen von H-3 und H-4 zu C-5 ($\delta_C = 171,34$ ppm) verweisen auf die Verknüpfung mit der nachfolgenden Glutamineinheit.

Ein Multiplett bei $\delta_H = 4,05$ ppm stammt von dem α -Proton dieser Glutamineinheit. Dieses weist COSY-Korrelationen zu H-7 ($\delta_H = 8,24$ ppm) und den β -ständigen Protonen H-21 ($\delta_H = 1,69$ ppm, $\delta_H = 2,02$ ppm) auf. Die Kopplung von H-21 und H-22 ($\delta_H = 2,07$ ppm) kennzeichnet die γ -ständige Methylengruppe. Im HMBC-Spektrum sind Korrelationen von H-21 mit C-5 und C-23 ($\delta_C = 173,45$ ppm) zu beobachten. Die Korrelationen von H-22 und H-24 ($\delta_H = 6,75$ ppm, $\delta_H = 7,22$ ppm) nach C-22 und C-23 kennzeichnen letzteres als Carbonylkohlenstoffatom der Säureamidfunktion. Die HMBC-Korrelation von H-6 zu C-8 ($\delta_C = 171,20$ ppm) führt zu einer zweiten Glutamineinheit. Die Verbindung zweier gleicher Struktureinheiten erklärt die nur minimal differente chemische Verschiebung zu der von C-5 und führt zu einem kritischen Punkt in der Strukturaufklärung dieser Verbindung. Zu der zweiten Glutamineinheit gehören die aliphatischen Protonen H-9 ($\delta_H = 3,93$ ppm), H-25 ($\delta_H = 1,84$ ppm), H-26 ($\delta_H = 2,14$ ppm) neben den Amidprotonen H-10 ($\delta_H = 8,40$ ppm) und H-28 ($\delta_H = 6,82$ ppm, $\delta_H = 7,33$ ppm). Durch COSY- und HMBC-Korrelation ergeben sich die gleichen Konnektivitäten, die für die erste Glutamineinheit gefunden werden. Dabei wird der Kern C-27 ($\delta_C = 173,64$ ppm) als Säureamidkohlenstoffatom bestimmt. Die Nachbarschaft zweier Glutamine belegen zum einen das Vorhandensein von insgesamt vier Signalen von Säureamidprotonen und zwei Signalen der zugehörigen Carbonylkohlenstoffatome, zu denen jeweils ein Protonenpaar korreliert. Zum anderen finden sich im 2D-TOCSY-Spektrum für jedes der Glutamineinheiten abgeschlossene Spinsysteme der aliphatischen Ketten. Ferner werden Korrelationen der Amidprotonen des Peptidgrundgerüsts zum benachbarten Carbonylkohlenstoffatom beobachtet und führen von den Struktureinheiten α -Methyl- β -Alanin über Glutamin 1 und 2 zu Valin. Das ROESY-Spektrum unterstützt dieses Erkenntnis, indem Korrelationen räumlich benachbarter Protonen beobachtet werden können. Dabei werden Korrelationen des Amidprotons H-4 der α -Methyl- β -Alanineinheit und dem α -Proton H-6 der ersten Glutamineinheit detektiert. Außerdem tauchen Korrelationen des α -Protons H-9 der Glutamineinheit 2 zu Amidproton H-7 und α -Proton H-6 der Glutamineinheit 1 auf. Das Amidproton H-10 der zweiten Glutamineinheit weist wiederum wechselseitige

Korrelationen mit den α - und β -Protonen H-12 ($\delta_{\text{H}} = 4,07$ ppm) und H-29 ($\delta_{\text{H}} = 1,98$ ppm) der Valineinheit auf.

Neben den Signalen für H-12 und H-29 werden für Valin im Protonenspektrum zwei weitere aliphatische Signale bei $\delta_{\text{H}} = 0,82$ ppm (H-30) und $\delta_{\text{H}} = 0,87$ ppm (H-31) gefunden. Das NH-Signal erscheint bei $\delta_{\text{H}} = 7,61$ ppm. Entsprechend der verzweigten Struktur werden gleichzeitige COSY-Korrelationen von H-29 zu H-12 und den Methylgruppen H-30 und H-31 erkannt. Die Struktur kann desweiteren belegt werden durch HMBC-Korrelationen der Protonen der Seitenkette zu den Kernen C-12 ($\delta_{\text{C}} = 57,63$ ppm), C-29 ($\delta_{\text{C}} = 30,13$ ppm), C-30 ($\delta_{\text{C}} = 17,0$ ppm) und C-31 ($\delta_{\text{C}} = 18,57$ ppm). Eine Korrelation von H-29 mit C-11 ($\delta_{\text{C}} = 171,04$ ppm) verweist auf das Valincarbonylkohlenstoffatom.

Die Verknüpfung der Valin- und Alaninstruktureinheiten ist durch die Korrelationen von H-12 und H-32 ($\delta_{\text{H}} = 1,20$ ppm) zum Kern C-14 ($\delta_{\text{C}} = 171,71$ ppm) zu erkennen. Das 2D-TOCSY-Spektrum der Alanineinheit ist erwartungsgemäß nur durch Korrelationen dreier Protonen, H-23, H-15 ($\delta_{\text{H}} = 4,34$ ppm) und H-16 ($\delta_{\text{H}} = 8,48$ ppm), gekennzeichnet. Das Signal der Methylgruppe spaltet durch die Nachbarschaft zu einem Proton in ein Dublett (${}^3J = 6,9$ Hz) auf.

Die Threoninteilstruktur stellt die letzte Aminosäureeinheit des Hexapeptids dar. Die Verbindung zur Alanineinheit kann der HMBC-Korrelation von H-15 und H-33 ($\delta_{\text{H}} = 4,88$ ppm) nach C-17 ($\delta_{\text{C}} = 168,82$ ppm) entnommen werden. Der Threonineinheit können die Signale des α -Protons H-18 ($\delta_{\text{H}} = 4,61$ ppm), des β -Protons H-33 ($\delta_{\text{H}} = 4,88$ ppm), der Methylgruppenprotonen H-34 ($\delta_{\text{H}} = 1,17$ ppm) und des Amidprotons H-19 ($\delta_{\text{H}} = 8,59$ ppm) aus dem ${}^1\text{H}$ -NMR-Spektrum zugeordnet werden. Die Kopplung der Methylgruppenprotonen mit H-33 bewirkt die Dublettaufspaltung des Signals von H-34 (${}^3J = 6,3$ Hz). Durch die Hydroxyfunktion der Threonineinheit sind die Signale von H-33 und C-33 ($\delta_{\text{C}} = 69,32$ ppm) entsprechend tieffeldverschoben. Im HMBC-Spektrum sind wechselseitige Korrelationen von H-34 zu C-18 ($\delta_{\text{C}} = 55,45$ ppm) und H-18 zu C-34 ($\delta_{\text{C}} = 16,08$ ppm) erkennbar. Die Carbonsäureesterbindung über die Hydroxyfunktion mit der C-terminalen Carboxylgruppe der α -Methyl- β -Alanineinheit zu einem zyklischen Peptid wird repräsentiert durch die Kopplung von H-33 nach C-1 ($\delta_{\text{C}} = 173,05$ ppm).

Das Hexapeptid ist N-terminal amidisch mit einer lipophilen Seitenkette verbunden. Hierbei handelt es sich um 2-Methyl-3-oxo-5-*p*-methoxyphenyl-pentansäure. Dies wird

belegt durch die HMBC-Korrelation von H-18 nach C-1' ($\delta_C = 169,57$ ppm). Die HMBC-Korrelationen der Methylgruppenprotonen H-12' ($\delta_H = 1,09$ ppm) nach C-1' und C-3' ($\delta_C = 205,17$ ppm) sowie die starke Tieffeldverschiebung des Signals der Ketogruppe stehen im Einklang mit der Struktur einer β -Ketosäure. Dies wird bestätigt durch die Signalstrukturen der miteinander koppelnden Protonen H-2' ($\delta_H = 3,65$ ppm) und H-12', die in ein Quartett und ein Dublett aufspalten mit einer Kopplungskonstante von $^3J = 6,8$ Hz und bedeutet, dass H-2' keine weiteren vicinalen Kopplungen aufweist. Die Sequenz der Kohlenstoffkette von C-2' ($\delta_C = 52,19$ ppm) über C-3', C-4' ($\delta_C = 41,67$ ppm) und C-5' ($\delta_C = 27,76$ ppm) kann durch die HSQC- und COSY-Korrelationen der Protonen H-4' ($\delta_H = 2,73$ ppm) und H-5' ($\delta_H = 2,68$ ppm) sowie HMBC-Korrelationen von H-2', H-4' und H-5' nach C-3' bestimmt werden. Das quartäre Ringkohlenstoffatom C-6' ($\delta_C = 132,47$ ppm), zu dem entsprechend keine HSQC-Korrelation gefunden wird, geht aus den HMBC-Korrelationen von H-4' und den Ringprotonen H-8' / H-10' ($\delta_H = 6,80$ ppm) hervor. Letztere koppeln mit den Signalen von H-7' / H-11' ($\delta_H = 7,07$ ppm) im COSY-Spektrum. Die zugehörigen Kerne C-7' / C-11' ($\delta_C = 128,74$ ppm) und C-8' / C-10' ($\delta_C = 113,27$ ppm) können den HSQC-Korrelationen der Ringprotonen entnommen werden. Das Auftreten nur zweier koppelnder aromatischer Protonensignale impliziert eine para-Substitution des Aromaten. Der verbleibende Kern C-9' ($\delta_C = 157,31$ ppm) wird durch die HMBC-Korrelationen von H-7' / H-11' und H-8' / H-10' detektiert, dessen Tieffeldverschiebung für eine Phenolstruktur des Aromaten spricht. Desweiteren können die Konnektivitäten der Ringatome mittels HMBC-Korrelationen von H-5' mit C-7' / C-11' sowie H-7' / H-11' mit C-5' und C-8' / C-10' belegt werden. Ein Singulett bei $\delta_H = 3,70$ ppm (H-13') stammt von der Methoxygruppe, deren Protonen mit C-9' korrelieren.

4. Neue Sekundärmetabolitfamilien

Gruppe	Position	Funktion	δ_H	J [Hz]	COSY	δ_C	HMBC	ROESY	
<i>α-Methyl-β-Alanin</i>	1	C=O				173,05			
	2	CH	2,70 m		1,06	38,57	14,44	1,06	
					2,93		40,89	2,93	
					3,29		173,05	3,29	
	3	CH ₂	2,93 m		2,70	40,89	14,44	3,29	
					3,29		38,57	7,70	
					7,70		171,34		
			3,29 m		2,70		14,44	2,93	
					2,93		38,57		
					7,70		171,34		
4	NH	7,70 m		2,70		40,89	2,70		
				2,93		171,34	2,93		
20	CH ₃	1,06 d	7,2	2,70		14,44	38,57	2,70	
							40,89		
						173,05			
<i>Glutamin 1</i>	5	C=O				171,34			
	6	CH	4,05 m		1,69	52,32	26,53	1,69	
					2,02		31,36	2,07	
					8,24		171,34	7,70	
			8,24 d	8,1	4,05		171,20	171,20	1,69
									2,07
									3,93
	21	CH ₂	1,69 m		2,02	26,53	31,36	2,02	
					2,07		52,32	4,05	
					4,05		171,34	2,07	
			2,02 m		1,69		31,36	1,69	
					2,07		52,32	4,05	
							173,45		
22	CH ₂	2,07 m		1,69	31,36	26,53	1,69		
				2,02		52,32	4,05		
						173,45			
23	C=O					173,45			
24	NH ₂	6,75 s		7,22		31,36	2,07		
						173,45			
		7,22 s		6,75		173,45	2,07		

Tabelle 4-18: NMR-Tabelle zu Chondrosarid B (gemessen in DMSO-*d*₆). s = Singulett, d = Dublett, q = Quartett, m = Multipllett.

Gruppe	Position	Funktion	δ_H	J [Hz]	COSY	δ_C	HMBC	ROESY	
<i>Glutamin 2</i>	8	C=O				171,20			
	9	CH	3,93 m		1,84 8,40	53,77	25,77 31,09 171,04	1,84 2,14 4,05 8,24 8,40	
	10	NH	8,40 m		3,93		25,77 53,77 171,04	0,82 1,84 1,98 2,14 3,93 4,07	
	25	CH ₂	1,84 m		2,14 3,93	25,77	31,09 53,77 171,20 173,64	2,14 3,93 8,40	
	26	CH ₂	2,14 m		1,84	31,09	25,77 53,77 173,64	1,84 3,93 7,33 8,40	
	27	C=O				173,64			
	28	NH ₂	6,82 m		7,33		31,09 173,64		
				7,33 s	6,82		173,64	2,14 6,82	
	<i>Valin</i>	11	C=O				171,04		
		12	CH	4,07 m		1,98 7,61	57,63	17,0 18,57 30,13 171,04 171,71	0,87 1,98 8,40
		13	NH	7,61 m		4,07		171,71	0,82 1,98 4,07 4,34
		29	CH	1,98 m		0,82 0,87 4,07	30,13	17,0 18,57 57,63 171,04	0,82 0,87 4,07 8,40
		30	CH ₃	0,82 d	6,9	1,98	17,0	18,57 30,13 57,63	1,98 4,07 7,61
31		CH ₃	0,87 d	6,9	1,98	18,57	17,0 30,13 57,63	1,98 4,07	
<i>Alanin</i>		14	C=O				171,71		
		15	CH	4,34 m		1,20 8,48	48,58	17,20 168,82 171,71	1,20 7,61 8,48

Tabelle 4-18: NMR-Tabelle zu Chondrosarid B - Fortsetzung.

4. Neue Sekundärmetabolitfamilien

Gruppe	Position	Funktion	δ_H	J [Hz]	COSY	δ_C	HMBC	ROESY
<i>Alanin</i>	16	NH	8,48 m		4,34		17,20 48,58 168,82 171,71	1,20 4,34 4,61
	32	CH ₃	1,20 d	6,9	4,34	17,20	48,58 171,71	4,34 8,48
<i>Threonin</i>	17	C=O					168,82	
	18	CH	4,61 m		4,88 8,59		55,45 16,08 69,32 168,82 169,57	1,17 4,88 8,48 8,59
	19	NH	8,59 d	8,4	4,61		55,45 169,57	1,17 3,65 4,61 4,88
	33	CH-OR	4,88 m		1,17 4,61		69,32 16,08 55,45 168,82 173,05	1,17 4,61 8,59
	34	CH ₃	1,17 d	6,3	4,88		16,08 55,45 69,32	4,61 4,88 8,59
	<i>Seitenkette</i>	1'	C=O					169,57
	2'	CH	3,65 q	6,8	1,09		52,19 12,32 169,57 205,17	1,09 2,73 8,59
	3'	C=O					205,17	
	4'	CH ₂	2,73 m		2,68		41,67 27,76 132,47 205,17	1,09 3,65 7,07
	5'	CH ₂	2,68 m		2,73		27,76 41,67 128,74 132,47 205,17	7,07
	6'	C					132,47	
	7' / 11'	CH	7,07 m		6,80		128,74 27,76 113,27 128,74 157,31	2,68 3,70 6,80
	8' / 10'	CH	6,80 m		7,07		113,27 113,27 128,74 132,47 157,31	3,70 7,07
	9'	C-OR					157,31	
	12'	CH ₃	1,09 d	6,8	3,65		12,32 52,19 169,57 205,17	3,65
	13'	CH ₃	3,70 s				54,51 157,31	6,80

Tabelle 4-18: NMR-Tabelle zu Chondrosarid B - Fortsetzung.

TKcpd845: Chondrosarid A

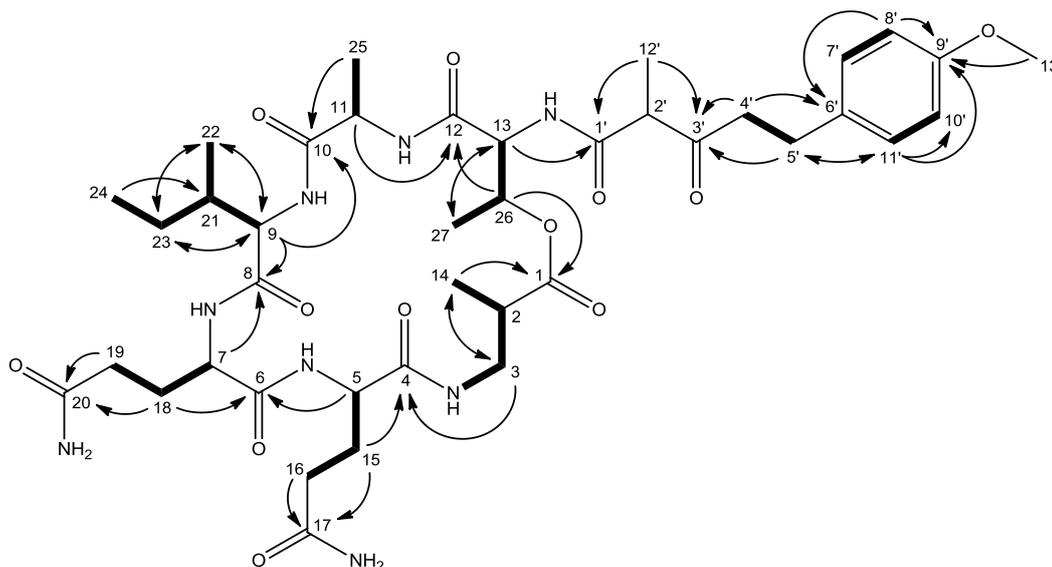


Abbildung 4-18: Struktur von Chondrosarid A mit ausgewählten ^1H - ^1H -COSY- (*fett*) und HMBC-Korrelationen (*Pfeile*).

Die NMR-Messungen von Chondrosarid A wurde in Methanol- d_4 durchgeführt. Es ergab sich bei dessen Strukturaufklärung das Isoleucinderivat von Chondrosarid B. Im Protonenspektrum sind auch hier bedingt durch Rotationskonformere zwei Signalgruppen für jedes Spinsystem zu erkennen. Deshalb musste analog zu Chondrosarid B eine Betrachtung einer Signalgruppe und der dazugehörigen Korrelationen vorgenommen werden.

Der C-terminalen α -Methyl- β -Alanineinheit können die Protonen H-2 ($\delta_{\text{H}} = 2,64$ ppm), H-3 ($\delta_{\text{H}} = 3,38$ ppm, $\delta_{\text{H}} = 3,46$ ppm) und H-14 ($\delta_{\text{H}} = 1,06$ ppm) zugeordnet werden, welche COSY-Korrelationen zueinander aufweisen (Tabelle 4-19). Die chemischen Verschiebungen der α - und β -Protonen und der zugehörigen Kohlenstoffatome C-2 ($\delta_{\text{C}} = 40,69$ ppm) und C-3 ($\delta_{\text{C}} = 42,56$ ppm) stehen wie bei dem Valinderivat im Einklang mit der β -Aminosäurestruktur. Das Dublett von H-14 ($^3J = 7,0$ Hz), die HMBC-Korrelationen von H-14 mit C-3 und dem Carbonylkohlenstoffatom C-1 ($\delta_{\text{C}} = 174,69$ ppm) und von H-3 mit C-14 ($\delta_{\text{C}} = 13,75$ ppm) zeigen die Methylierung an der α -Position an. Die Verknüpfung mit der ersten Glutamineinheit über die β -Aminofunktion wird durch die Korrelationen von H-3 und den β -Methylenprotonen H-15 ($\delta_{\text{H}} = 2,08$ ppm) zu C-4 ($\delta_{\text{C}} = 174,27$ ppm) belegt.

Im COSY-Spektrum der Glutamineinheit sind wechselseitige Korrelationen des α -Protons H-5 ($\delta_{\text{H}} = 4,38$ ppm) und der β - und γ -Methylenprotonen H-15 und H-16 ($\delta_{\text{H}} = 2,24$ ppm, $\delta_{\text{H}} = 2,39$ ppm) zu erkennen. Die HMBC-Korrelationen von H-15 und H-16 mit C-17 ($\delta_{\text{C}} = 177,71$ ppm) und dessen Tieffeldverschiebung legen die Anwesenheit eines Carbonsäureamids nahe.

Die in der Peptidkette nachfolgende zweite Glutamineinheit kann durch die HMBC-Korrelationen der β -Methylenprotonen H-18 ($\delta_{\text{H}} = 2,20$ ppm) und H-5 nach C-6 ($\delta_{\text{C}} = 173,47$ ppm) beobachtet werden. Entsprechend der vorangehenden Glutamineinheit können die Bindungsverhältnisse durch die COSY-Korrelationen der Protonen H-7 ($\delta_{\text{H}} = 4,22$ ppm), H-18 und H-19 ($\delta_{\text{H}} = 2,35$ ppm) sowie durch die HMBC-Korrelationen von H-18 und H-19 zum Säureamidkohlenstoffatom C-20 ($\delta_{\text{C}} = 177,91$ ppm) festgelegt werden.

Aus der HMBC-Korrelation von H-7 zu C-8 ($\delta_{\text{C}} = 174,40$ ppm) geht die Carbonylgruppe des Isoleucins hervor. Dessen verzweigt-kettige Struktur wird durch das Dublettsignal ($^3J = 6,2$ Hz) des α -Protons H-9 bei $\delta_{\text{H}} = 3,96$ ppm impliziert. Desweiteren werden Multipletts von H-21 ($\delta_{\text{H}} = 1,85$ ppm), H-23 ($\delta_{\text{H}} = 1,30$ ppm, $\delta_{\text{H}} = 1,58$ ppm) und H-24 ($\delta_{\text{H}} = 0,90$ ppm) sowie ein Dublett ($^3J = 6,9$ Hz) von H-22 ($\delta_{\text{H}} = 0,97$ ppm) detektiert, die im 2D-TOCSY-Spektrum als ein gemeinsames Spinsystem erscheinen. Aus den HSQC-Korrelationen dieser Protonen können die Kerne C-9 ($\delta_{\text{C}} = 62,26$ ppm), C-21 ($\delta_{\text{C}} = 36,96$ ppm), C-22 ($\delta_{\text{C}} = 16,0$ ppm), C-23 ($\delta_{\text{C}} = 26,95$ ppm) und C-24 ($\delta_{\text{C}} = 11,63$ ppm) entnommen werden. Durch die Hochfeldverschiebungen der Signale von H-22 / C-22 und H-24 / C-24 werden diese den beiden Methylgruppen zugeordnet. COSY-Korrelationen der Protonen H-9 mit H-21, H-21 mit H-22 und H-23 sowie H-23 mit H-24 sprechen für eine Isoleucinstruktur. Bestätigt wird diese durch wechselseitige HMBC-Korrelationen von H-9, H-22 und H-23 neben der Korrelation von H-24 mit C-21. Desweiteren werden Korrelationen von H-9 zu C-8 und dem Carbonylkohlenstoffatom C-10 ($\delta_{\text{C}} = 175,40$ ppm) der nachfolgenden Alanineinheit gefunden.

Dem COSY- und 2D-TOCSY-Spektrum sind die koppelnden Protonen H-11 ($\delta_{\text{H}} = 4,12$ ppm) und H-25 ($\delta_{\text{H}} = 1,33$ ppm) zu entnehmen. Durch die drei benachbarten Methylprotonen spaltet das Signal von H-11 in ein Quartett ($^3J = 6,8$ Hz) auf. HMBC-Korrelationen von H-25 mit C-10 und H-11 mit C-12 ($\delta_{\text{C}} = 171,91$ ppm) gehen mit der Positionierung der Alanin- zwischen der Isoleucin- und Threonineinheit konform.

Die Resonanzen der Threoninprotonen treten im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum bei $\delta_{\text{H}} = 4,36$ ppm (H-13), $\delta_{\text{H}} = 5,26$ ppm (H-26) und $\delta_{\text{H}} = 1,20$ ppm (H-27) auf. Durch COSY-Korrelationen von H-26 zu H-13 und H-27 und wechselseitige HMBC-Korrelationen von H-27 und H-13 zu den Kernen C-13 ($\delta_{\text{C}} = 57,82$ ppm) und C-27 ($\delta_{\text{C}} = 16,78$ ppm) wird der Methylgruppe die β -Position zugewiesen. Aus dem HSQC-Spektrum von H-26 geht das Kohlenstoffatom C-26 ($\delta_{\text{C}} = 70,38$ ppm) hervor. Die chemischen Verschiebungen der Signale deuten auf den benachbarten Sauerstoffkern hin. Neben einer HMBC-Korrelation von H-26 zu C-12 wird eine weitere Korrelation zu C-1 beobachtet und repräsentiert den Ringschluss des Hexapeptids über eine Carbonsäureesterbindung mit der Carboxylfunktion der α -Methyl- β -Alanineinheit.

Die N-terminale Verknüpfung der Threoninteilstruktur mit der 2-Methyl-3-oxo-5-*p*-methoxyphenyl-pentansäure-Seitenkette wird durch die HMBC-Korrelationen von H-13 und den Methylprotonen H-12' ($\delta_{\text{H}} = 1,29$ ppm) nach C-1' ($\delta_{\text{C}} = 172,63$ ppm) gezeigt. Letztere koppeln ebenfalls mit dem stark tieffeldverschobenen Signal der Ketofunktion C-3' ($\delta_{\text{C}} = 209,26$ ppm). COSY-Kopplungen der Methylprotonen werden nicht gefunden, da das CH-acide α -Proton H-2' in Methanol- d_4 austauschbar ist. Der Kern C-2' ($\delta_{\text{C}} = 53,94$ ppm) wurde deshalb über die HMBC-Korrelation von H-12' detektiert. Die Verlängerung der aliphatischen Kette über C-4' ($\delta_{\text{C}} = 43,84$ ppm) und C-5' ($\delta_{\text{C}} = 29,45$ ppm) ist gekennzeichnet durch COSY-Korrelationen der Protonen H-4' ($\delta_{\text{H}} = 2,90$ ppm) und H-5' ($\delta_{\text{H}} = 2,82$ ppm) neben HMBC-Korrelationen von H-4' mit C-3' und dem quartären Ringkohlenstoffatom C-6' ($\delta_{\text{C}} = 134,09$ ppm) sowie von H-5' mit C-3' und den Kernen C-7' / C-11' ($\delta_{\text{C}} = 130,09$ ppm). Die Signale bei $\delta_{\text{H}} = 7,11$ ppm und $\delta_{\text{H}} = 6,81$ ppm bilden die Gruppe der im COSY-Spektrum miteinander korrelierenden Ringprotonen H-7' / H-11' und H-8' / H-10'. Die Positionen der Ringatome ergeben sich aus den HMBC-Korrelationen von H-7' / H-11' mit C-5', C-8' / C-10' ($\delta_{\text{C}} = 114,75$ ppm), C-9' ($\delta_{\text{C}} = 159,45$ ppm) und H-8' / H-10' mit C-6' und C-9'. Das Auftreten von zwei aromatischen Signalen im Protonenspektrum und die chemischen Verschiebungen von C-9' und C-13' ($\delta_{\text{C}} = 55,52$ ppm) deuten auf die *para*-Methoxyfunktion des Phenylringes hin. Dabei bildet die Resonanz der Methylprotonen H-13' bei $\delta_{\text{H}} = 3,75$ ppm charakteristischerweise ein Singulett und zeigt eine heteronukleare Korrelation mit C-9'.

4. Neue Sekundärmetabolitfamilien

Gruppe	Position	Funktion	δ_H	J [Hz]	COSY	δ_C	HMBC
<i>α-Methyl-β-Alanin</i>	1	C=O				174,69	
	2	CH	2,64 m		1,06 3,38 3,46	40,69	174,69
	3	CH ₂	3,38 m		2,64 3,46	42,56	13,75 40,69 174,27
			3,46 m		2,64 3,38		13,75 40,69 174,27
	14	CH ₃	1,06 d	7,0	2,64	13,75	40,69 42,56 174,69
	3	NH	-				
<i>Glutamin 1</i>	4	C=O				174,27	
	5	CH	4,38 m		2,08	54,28	28,67 33,0 173,47 174,27
	15	CH ₂	2,08 m		2,24 2,39 4,38	28,67	33,0 54,28 174,27 177,71
	16	CH ₂	2,24 m		2,08 2,39	33,0	28,67 177,71
			2,39 m		2,08 2,24		28,67 54,28 177,71
	17	NH ₂ C=O	-				177,71
	5	NH	-				
<i>Glutamin 2</i>	6	C=O				173,47	
	7	CH	4,22 m		2,20	55,41	27,35 32,90 173,47 174,40
	18	CH ₂	2,20 m		2,35 4,22	27,35	32,90 55,41 173,47 177,91
	19	CH ₂	2,35 m		2,20	32,90	27,35 55,41 177,91
	20	NH ₂ C=O	-				177,91
	7	NH	-				

Tabelle 4-19: NMR-Tabelle zu Chondrosarid A (gemessen in Methanol-*d*₄). s = Singulett, d = Dublett, q = Quartett, m = Multiplett.

Gruppe	Position	Funktion	δ_H	J [Hz]	COSY	δ_C	HMBC	
<i>Isoleucin</i>	8	C=O				174,40		
	9	CH	3,96 d	6,2	1,85	62,26	16,0 26,95 36,96 174,40 175,40	
	21	CH	1,85 m		0,97 1,30 1,58 3,96	36,96	- - - -	
	22	CH ₃	0,97 d	6,9	1,85	16,0	26,95 36,96 62,26	
	23	CH ₂	1,30 m		0,90 1,58 1,85	26,95	11,63 16,0 36,96	
				1,58 m	0,90 1,30 1,85		11,63 16,0 36,96 62,26	
	24	CH ₃	0,90 m		1,30 1,58	11,63	26,95 36,96	
	9	NH	-					
	<i>Alanin</i>	10	C=O				175,40	
		11	CH	4,12 q	6,8	1,33	51,01	17,01 171,91 175,40
		25	CH ₃	1,33 m		4,12	17,01	51,01 175,40
		11	NH	-				
	<i>Threonin</i>	12	C=O				171,91	
		13	CH	4,36 m		5,26	57,82	16,78 70,38 171,91 172,63
26		CH-OR	5,26 m		1,20 4,36	70,38	57,82 171,91 174,69	
27		CH ₃	1,20 m		5,26	16,78	57,82 70,38	
13		NH	-					

Tabelle 4-19: NMR-Tabelle zu Chondrosarid A - Fortsetzung.

Gruppe	Position	Funktion	δ_H	J [Hz]	COSY	δ_C	HMBC
<i>Seitenkette</i>	1'	C=O				172,63	
	2'	CH	-			53,94	
	3'	C=O				209,26	
	4'	CH ₂	2,90 m		2,82	43,84	29,45 134,09 209,26
	5'	CH ₂	2,82 m		2,90	29,45	43,84 130,09 134,09 209,26
	6'	C				134,09	
	7' / 11'	CH	7,11 m		6,81	130,09	29,45 114,75 130,09 159,45
	8' / 10'	CH	6,81 m		7,11	114,75	114,75 134,09 159,45
	9'	C-OR				159,45	
	12'	CH ₃	1,29 m			13,21	53,94 172,63 209,26
	13'	CH ₃	3,75 s			55,52	159,45

Tabelle 4-19: NMR-Tabelle zu Chondrosarid A - Fortsetzung.

Auch im Fall von SBCm009 stimmen die Summenformeln monoprotionierter Molekülonen der aufgeklärten chemischen Strukturen von Chondrodepsid A (TKcpd832, C₄₃H₅₈N₇O₁₀), Chondrodepsid B (TKcpd818, C₄₂H₅₆N₇O₁₀), Chondrosarid A (TKcpd845, C₄₀H₆₁N₈O₁₂) und Chondrosarid B (TKcpd831, C₃₉H₅₉N₈O₁₂) mit den aus den exakten Massen der LC/HR-MS-Analyse abgeleiteten Summenformeln überein (Tabelle 4-15). Eine *SciFinder*-Datenbanksuche mit den erhaltenen Strukturen zeigte ebenfalls, dass es sich bei den Substanzen um neue, bisher unbekannte Naturstoffe handelt.

4.1.2.3. Konfiguration der Aminosäuren

Während der Konfigurationsbestimmung durch Derivatisierung mit L- bzw. D-FDLA nach Substanzhydrolyse konnten den Chondrodepsiden ein L-Alanin, L-Prolin, L-Threonin und D-Tyrosin zugeordnet werden. L-Glutamin wurde in beiden Fällen aufgrund von Hydrolyse als L-Glutaminsäure detektiert. Desweiteren wurden für das Isoleucin von Chondrodepsid A und das Valin von Chondrodepsid B eine D-Konfiguration bestimmt (Tabelle 4-20 und 4-21).

Für Chondrosarid B wurden D-Alanin, D-Threonin, L-Valin und ein Peak für α -Methyl- β -Alanin gefunden. Für letzteren lag kein Standard zur Konfigurationsbestimmung vor. Auch hier wurden die Glutamine zu Glutaminsäure hydrolysiert und als diese nachgewiesen (Tabelle 4-22). In den Proben wurden jeweils Mischungen aus dem L-Derivat und dem D-Derivat gefunden, so dass in der Struktur sowohl L-Glutamin als auch D-Glutamin vorliegen müssen. Die Reihenfolge der beiden Enantiomere im Molekül lässt sich über die durchgeführte Analyse nicht festlegen.

FDLA-Derivate von Chondrosarid A konnten nicht erhalten werden. Nach deren Hydrolyse und Umsetzung trat ein Bodensatz im Vial auf, der nicht in Lösung gebracht werden konnte. Aus dessen Überstand waren keine Produkte der Reaktion nachweisbar. Da die Aminosäuren der Chondrodepside jeweils identische Konfigurationen aufweisen, wird für Chondrosarid A die Aminosäurekonfiguration des B-Derivates vermutet und unter Vorbehalt angenommen.

<i>Chondrodepsid A</i>							
	Referenz			Probe			
	<i>m/z</i> [M+H] ⁺ FDLA-Derivat	RT [min] L-L-Form	RT [min] D-L-Form	RT [min] / <i>m/z</i> [M+H] ⁺ L-Derivat		RT [min] / <i>m/z</i> [M+H] ⁺ D-Derivat	
L-Alanin	384,2	11,7	12,5	11,7	384,1	12,5	384,1
L-Glu	442,2	11,2	11,5	11,2	442,1	11,5	442,1
L-Isoleucin	426,3	12,9	14,4	14,5	426,1	12,9	426,1
L-Prolin	410,2	11,6	12,2	11,5	410,1	12,2	410,1
L-Threonin	414,2	10,8	11,7	10,8	414,1	11,7	414,1
L-Tyrosin	476,3	11,9	12,4	12,3	476,1	11,9	476,1

Tabelle 4-20: Konfigurationsbestimmung der Aminosäuren von Chondrodepsid A nach Marfey. Molekülionenmassen und Retentionszeiten (RT) der FDLA-Derivate.

<i>Chondrodepsid B</i>							
	Referenz			Probe			
	<i>m/z</i> [M+H] ⁺ FDLA-Derivat	RT [min] L-L-Form	RT [min] D-L-Form	RT [min] / <i>m/z</i> [M+H] ⁺ L-Derivat		RT [min] / <i>m/z</i> [M+H] ⁺ D-Derivat	
L-Alanin	384,2	11,7	12,5	11,7	384,1	12,5	384,1
L-Glu	442,2	11,2	11,5	11,2	442,0	11,5	442,0
L-Prolin	410,2	11,6	12,2	11,6	410,1	12,2	410,1
L-Threonin	414,2	10,8	11,7	10,8	414,0	11,7	414,1
L-Tyrosin	476,3	11,9	12,4	12,3	476,0	11,9	476,1
L-Valin	412,3	12,4	13,7	13,8	412,1	12,3	412,1

Tabelle 4-21: Konfigurationsbestimmung der Aminosäuren von Chondrodepsid B nach Marfey. Molekülionenmassen und Retentionszeiten (RT) der FDLA-Derivate.

Chondrosarid B

	Referenz			Probe			
	<i>m/z</i> [M+H] ⁺ FDLA-Derivat	RT [min] L-L-Form	RT [min] D-L-Form	RT [min] / <i>m/z</i> [M+H] ⁺ L-Derivat		RT [min] / <i>m/z</i> [M+H] ⁺ D-Derivat	
L-Alanin	384,2	11,7	12,5	12,5	384,1	11,8	384,1
				<i>12,1</i>	<i>398,0</i>	<i>12,2</i>	<i>398,1</i>
L-Glu	442,2	11,2	11,5	11,2	442,1	11,5	442,1
				11,5	442,1	11,2	442,1
L-Threonin	414,2	10,8	11,7	11,5	414,1	11,0	414,1
L-Valin	412,3	12,4	13,7	12,4	412,1	13,8	412,1

Tabelle 4-22: Konfigurationsbestimmung der Aminosäuren von Chondrosarid B nach Marfey. Molekülionmassen und Retentionszeiten (RT) der FDLA-Derivate, kursiv: Abweichung von der Referenz.

Abbildung 4-19 gibt die Strukturen der aus SBCm009 isolierten Substanzen unter Einbeziehung der Konfigurationsdaten wieder.

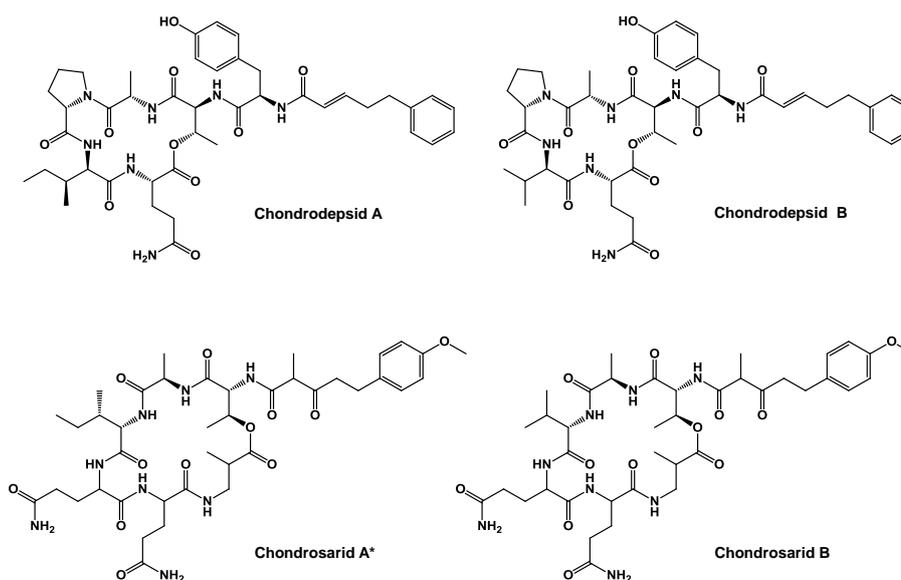


Abbildung 4-19: Strukturen der Chondropepside und Chondrosaride aus *Chondromyces* sp. SBCm009 mit den mittels Marfey's Methode bestimmten stereochemischen Konfigurationen. Chondrosarid B beinhaltet eine L- und eine D-Glutamineinheit (Reihenfolge unbekannt).

*= Konfiguration von Chondrosarid B übertragen.

4.1.2.4. Fragmentierungsmuster

Die zugeordneten Fragmentionen der MS²-Spektren der Chondropeptide und Chondrosaride bestätigen deren aufgeklärte chemische Strukturen (Abbildungen 4-20 bis 4-23).

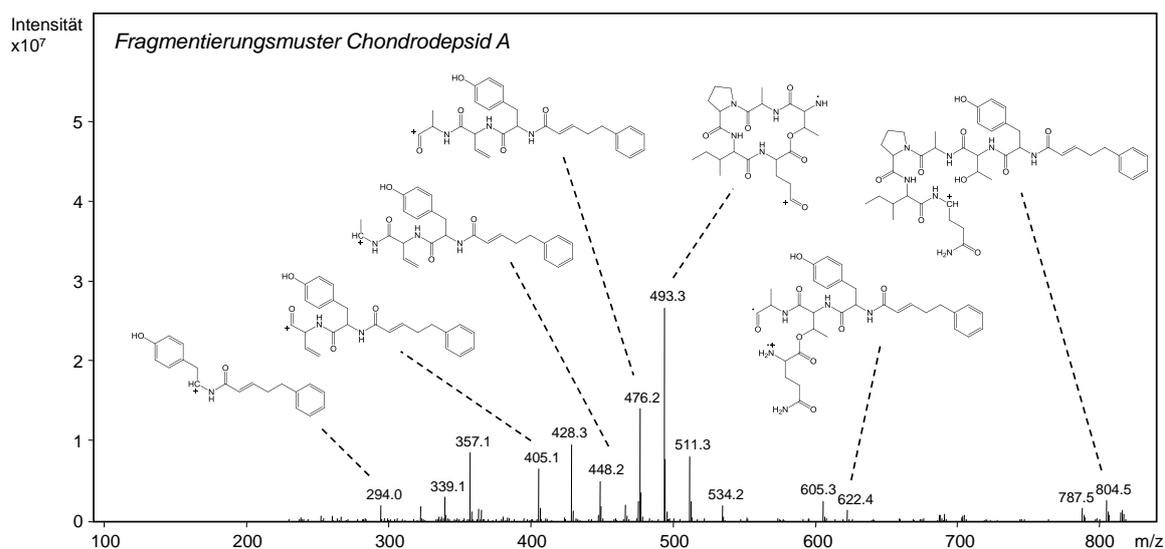


Abbildung 4-20: MS²-Spektrum von Chondropepsid A (positiver Modus) und zugeordnete Fragmentionen.

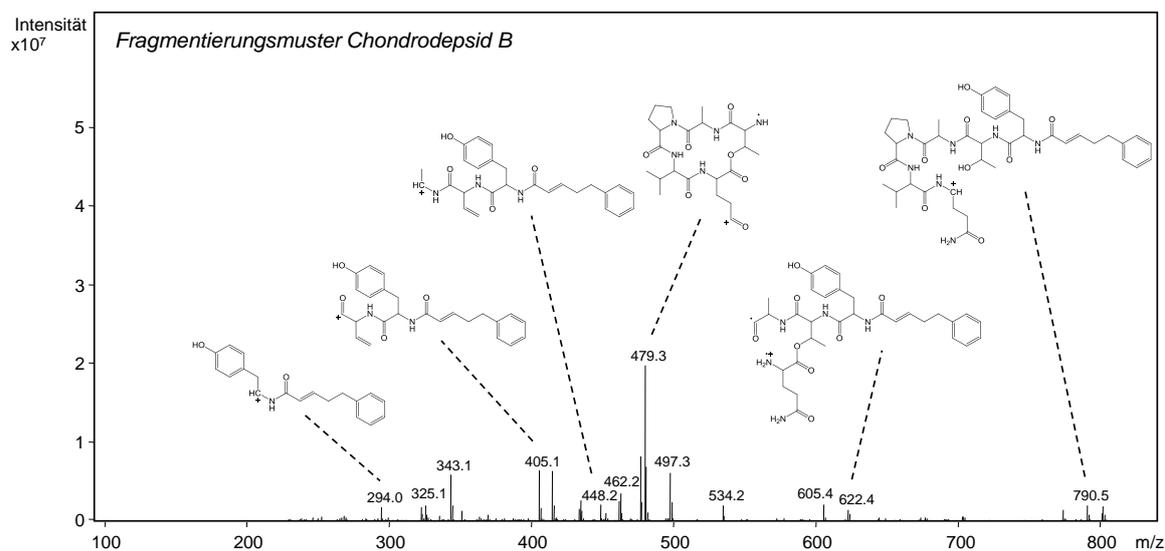


Abbildung 4-21: MS²-Spektrum von Chondropepsid B (positiver Modus) und zugeordnete Fragmentionen.

4. Neue Sekundärmetabolitfamilien

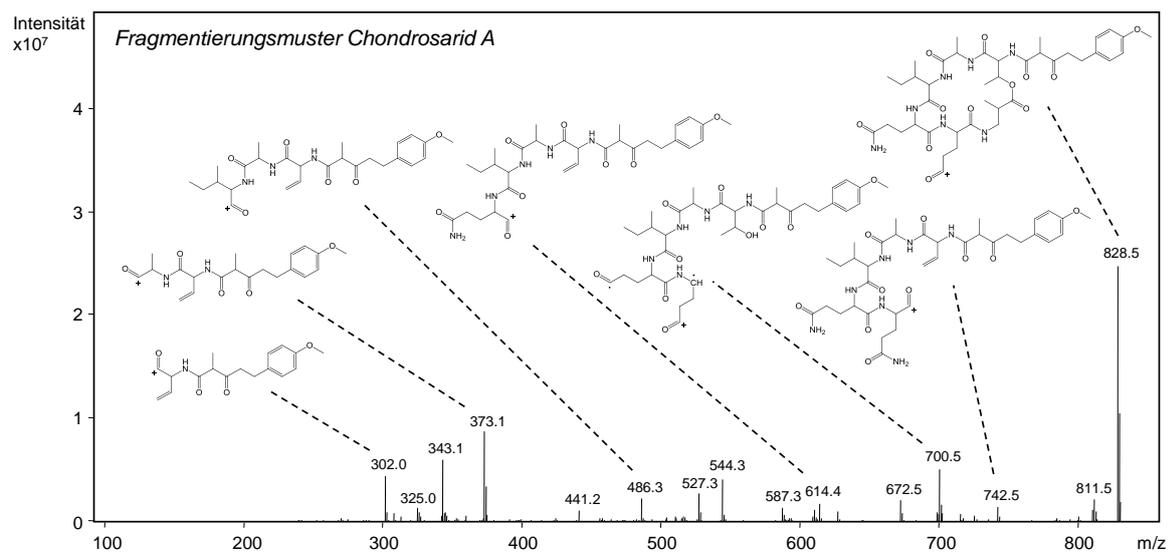


Abbildung 4-22: MS²-Spektrum von Chondrosarid A (positiver Modus) und zugeordnete Fragmentationen.

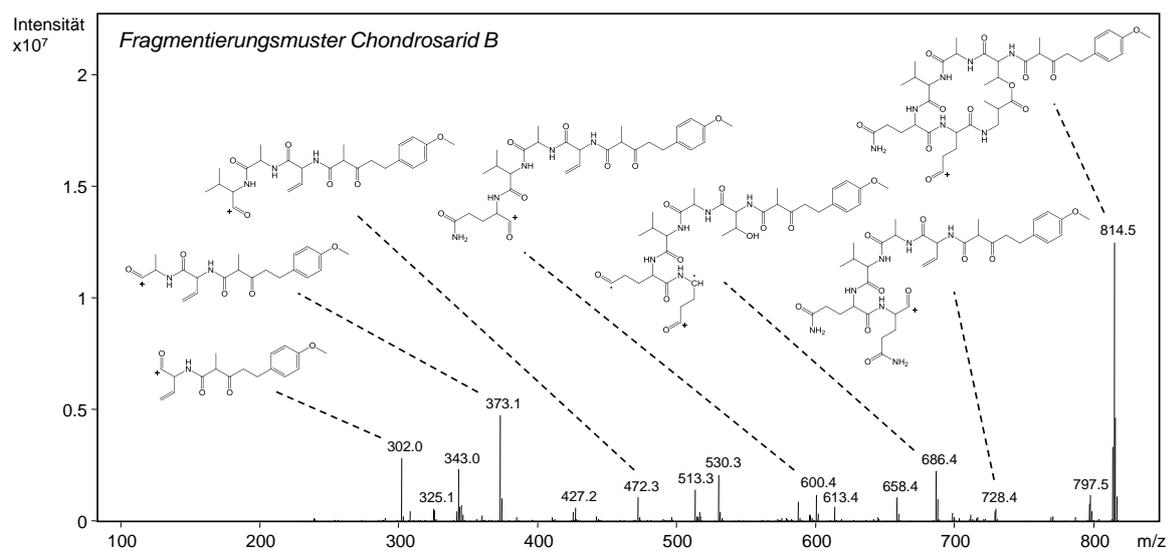


Abbildung 4-23: MS²-Spektrum von Chondrosarid B (positiver Modus) und zugeordnete Fragmentationen.

4.1.3. Aktivitätstests

Die isolierten Thaxteramide, Chondropeptide und Chondrosaride wurden auf antimikrobielle Aktivität gegenüber *Chromobacterium violaceum*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* TolC, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* MRS3, *Mycobacterium diernhoferi*, *Micrococcus luteus*, *Candida albicans*, *Mucor hiemalis*, *Pichia anomala* sowie zytotoxische Aktivität gegenüber CHO-K1- (*Chinese Hamster Ovary*) und HCT-116- (*Human Colon Carcinoma*) Zelllinien getestet. Eine entsprechende Aktivität war jedoch mit keiner der Substanzen feststellbar.

4.2. Diskussion

4.2.1. LC/MS-Screening und Isolierung neuer Sekundärmetabolite

Die neu isolierten Myxobakterien *Jahnella thaxteri* SBSr007 und *Chondromyces* sp. SBCm009 wurden auf die Produktion von unbekanntem Sekundärmetaboliten hin untersucht. Dabei wurden Kulturextrakte einem LC/MS-basierten Screening zugeführt. Mit Hilfe der LC/HR-MS-Daten wurde eine Datenbankanalyse durchgeführt und *Chondromyces* sp. SBCm009 als Produzent der bereits bekannten myxobakteriellen Naturstoffe Apicularen A und B sowie Crocapeptin A identifiziert. In dem Extrakt von *Jahnella thaxteri* SBSr007 führte das verwendete Verfahren zu keiner Identifikation von bekannten Naturstoffen aus Myxobakterien. Aus den hochaufgelösten Massenspektren und der exakten Masse ausgewählter, nicht identifizierter Komponenten beider Spezies wurden Summenformeln abgeleitet und über eine erweiterte Datenbanksuche potenziell unbekannte Sekundärmetabolite erkannt und für die Aufreinigung ausgewählt. Aus SBSr007 konnte die Substanzfamilie der Thaxteramide A bis D, aus SBCm009 zwei Substanzfamilien, die Chondrodepside A und B sowie die Chondrosaride A und B, isoliert und deren Struktur aufgeklärt werden. Thaxteramid B, ein Desmethyl-Thaxteramid A-Derivat wurde erst nachträglich im Arbeitskreis durch A. Plaza isoliert und deshalb entsprechend benannt. Eine *SciFinder*-Datenbanksuche mit den erhaltenen Strukturformeln ergab, dass es sich bei allen Komponenten um neue, bisher unbekannte Naturstoffe handelt. Es konnte gezeigt werden, dass die Analyse von Extrakten neuer myxobakterieller Stämme über LC/HR-MS eine effiziente Methode ist, um neue Substanzkandidaten zu detektieren und dadurch die chemische Diversität der Sekundärmetabolite aus Myxobakterien zu erweitern. Da keine der Substanzen in den durchgeführten Aktivitätstests eine Wirkung offenlegte, wären während einer aktivitätsgeleiteten Isolierung unter Testung der verwendeten Stämme diese neuen und interessanten Naturstoffgruppen nicht identifiziert und strukturell beschrieben worden. Jedoch kann diese Methode im Vergleich zu aktivitätsgeleiteten Screenings und Reinigungsschritten die Isolierung biologisch aktiver Naturstoffe nicht garantieren. Andererseits ist eine auf Aktivität basierende Isolierung immer durch die Auswahl von Zielstruktur- und Organismus (z.B. Festlegung von Teststämmen bei antibiotischen, antimykotischen oder antiviralen Assays) beschränkt²¹⁴. Aufgrund der Vielzahl denkbarer Targets, die für eine Testung eines Naturstoffs zur Verfügung stehen (antiparasitär, antiviral, antidiabetisch,

immunmodulatorisch, etc.), ist die Detektion einer Aktivität nicht direkt abhängig von der ausgewählten analytischen Screeningmethode, sondern vom Spektrum der auswählbaren Targets, dem festgelegten Screeningumfang und betriebenen Aufwand, um dieses Ziel zu verfolgen. Dieser Aufwand ist lohnenswert, indem er dazu führt, dass neue Zielstrukturen und Therapiemöglichkeiten in der Arzneimitteltherapie aufgedeckt werden, die durch ein festgelegtes und relativ eingeschränktes Screening nicht erkannt werden. Ein gutes Beispiel hierfür ist Argyrin, das zunächst nur eine moderate antibiotische Aktivität und Hemmung des Tumorzellwachstums zeigte, daneben eine deutliche immunsuppressive Wirkung offenlegte⁸⁹. Erst Jahre später erwies Argyrin in einem weiteren Screening eine stark hemmende Wirkung gegenüber dem Proteasom, ein vielversprechender neuer Zielstrukturkomplex in der onkologischen Therapie. Dabei wurde eine spezifischere Wirkung und geringere Toxizität als bei dem bereits zugelassenen Proteasom-Inhibitor Bortezomib festgestellt, so dass Argyrin ein bedeutsamer Kandidat für weitere klinische Entwicklungen ist⁹⁰. Bei der Isolierung der Apicularene zeigte sich keine antimikrobielle, jedoch eine zytotoxische Aktivität²⁹⁵. Schließlich stellte sich heraus, dass die Makrolide spezifische und hoch wirksame Inhibitoren von eukaryotischen V-ATPasen darstellen, die für Transportprozesse durch Membranen und die pH-Regulation der Kompartimente verantwortlich sind. V-ATPasen stellen ebenfalls neue Zielstrukturen in der Krebstherapie dar, da durch deren Hemmung das Wachstum von Tumorzelllinien unterbunden werden kann⁸⁷. Das Ziel, eine interessante biologische Aktivität auch bei den hier neu isolierten Substanzen zu finden, wurde weiter verfolgt und so konnte am *Swiss Tropical and Public Health Institute* in Basel [Marcel Kaiser, unveröffentlicht] eine deutliche antibiotische Aktivität von Thaxteramid C gegenüber *Leishmania donovani* ($IC_{50} \approx 2 \mu M$) und eine schwächere gegenüber *Plasmodium falciparum* ($IC_{50} \approx 50 \mu M$) gefunden werden. *L. donovani* ist der Erreger der kutanen und viszeralen Leishmaniose, *P. falciparum* der Erreger der Malaria, Infektionskrankheiten, an den denen jährlich Hunderttausende Patienten sterben, besonders im afrikanischen und südostasiatischen Raum^{297,298}. Dies zeigt, dass die Ausdehnung eines Aktivitätsscreenings sinnvoll ist, um seltene biologische Aktivitäten aufzudecken. Thaxteramid C könnte als Leitstruktur für chemische Modifikationen zur Substanzoptimierung und damit der Entwicklung eines antiparasitären Arzneistoffs dienlich sein. In diesem Fall ist es vorteilhaft, dass bei der hier durchgeführten Testung keine zytotoxische Aktivität festgestellt wurde, was die Gefahr erheblicher Nebenwirkungen vermindert.

Ein Problem von LC/MS-Screenings stellt die Automatisierung dar, insbesondere beim Screening von Neuisolaten auf unbekannte Sekundärmetabolite. Die Identifizierung bekannter Substanzen mit Hilfe der erhaltenen Datensätze aus Retentionszeit, akkurater Masse und Isotopenmuster gelingt durch Vergleich mit eigens erstellten Datenbanken wie hier geschehen. Ein umfassendes automatisiertes Screening gegenüber allen bekannten Naturstoffen in öffentlichen Datenbanken ist derzeit nicht möglich, da öffentliche LC/MS-Datenbanken erst im Aufbau sind^{222,224}. Zusätzlich ist die Vergleichbarkeit und Reproduzierbarkeit von LC/MS-Datensätzen eingeschränkt, da sie unmittelbar abhängig sind vom chromatographischen Trennsystem (stationärer / mobiler Phase, LC-System), der Massenanalyse (Ionisierungsverfahren, Massenanalysator, Fragmentierungsverfahren), der Probenaufarbeitung, den Kultivierungsbedingungen und dem Erntezeitpunkt, der das metabolische Profil bestimmt²²³. Um dies zu verbessern, müssen Standards definiert werden²²⁴. Desweiteren werden durch LC/MS-Analysen enorme Datenmengen erzeugt. Um diese Daten automatisiert zu verarbeiten und neue und bekannte Komponenten in einer Probe zu identifizieren, wurden statistische Methoden wie PCA (*Principal Component Analysis*) bereits erfolgreich angewendet. PCA dient als statistischer Datenfilter und zeigt Substanzen an, die die größten Unterschiede in einem Datensatz ausmachen²²⁶. Dabei wurden LC/MS-Datensätze aus Kulturextrakten verschiedener Stämme einer Gattung oder Spezies bzw. von Wildtyp und Mutanten verglichen und unbekannte Sekundärmetabolite identifiziert²²⁵⁻²²⁷. Es müssen dazu also mehrere, ähnliche Proben vorliegen, um ein automatisiertes Screening nach neuen Substanzen in einem Stamm durchzuführen. Um in einem Neuisolat, von dem weder mehrere verschiedene Stämme noch genetisch modifizierte Varianten vorhanden sind, unbekannte Sekundärmetabolite zu identifizieren, hat sich die hier angewandte Methode als äußerst effektiv erwiesen. Insbesondere den Ausschluss bekannter Substanzen durch Vergleich mit einer bestehenden LC/MS-Datenbank gefolgt von einem manuellen Screening in Form der Durchsicht von LC/MS-Chromatogrammen. Durch Ableiten theoretischer Summenformeln aus akkuraten Massedaten interessanter Peaks, die aufgrund der errechneten chemischen Zusammensetzung einer Sekundärmetabolitklasse wie nichtribosomale Peptide oder Polyketide angehören könnten, werden Kandidaten für eine Suche in öffentlichen Datenbanken ausgewählt. Zur eindeutigen Identifizierung und strukturellen Charakterisierung einer unbekanntes Substanz sind jedoch nach wie vor komplementäre

spektroskopische Methoden wie NMR, UV, IR notwendig. Ein vielversprechender Ansatz stellt hierzu aber die Kombination dieser Methoden, z.B. LC-NMR-MS, dar²²³.

Die Strukturaufklärung der isolierten Substanzen aus SBSr007 zeigte, dass es sich bei den Thaxteramiden A bis C um lineare Lipopeptide und bei Thaxteramid D um ein lineares Tetrapeptid handelt, welches struktureller Bestandteil aller Thaxteramide ist, wenn die unterschiedlichen Konfigurationen der vorhandenen Tyrosine außer Betracht gelassen werden. Chondrodepside und Chondrosaride stellen allesamt verzweigt-zyklische Depsipeptide in Form von Threoninestern dar. Alle Komponenten besitzen besondere strukturelle Merkmale, die auch Teil anderer Naturstoffe sind. Auffällig ist zunächst das Vorkommen der nicht proteinogenen β -Aminosäuren. Ein β -Alanin der Thaxteramide B, C und D ist in den Lipo- bzw. Zylopeptiden Efraeptine (*Tolypocladium geodes*, *Acremonium* sp.), Lipohexin (*Paecilomyces* spp. HKI-005 u. HKI-0096) und Xenematiden (*Xenorhabdus nematophilus*) zu finden²⁹⁹⁻³⁰³ (Abbildung 4-24).

α -Methyl- β -Alanin wie in Thaxteramid A und den Chondrosariden kommt nur in wenigen Sekundärmetaboliten vor, so z.B. in den Cryptophycinen (*Nostoc* sp. GSV 224), Aspergillipeptiden (*Aspergillus* sp. SCSGAF 0076), Vicenistatin (*Streptomyces* sp. HC-34) und Fusaristatinen (*Fusarium* sp. YG-45)^{282,304-307}. Während Chondrodepside wie die Myxochromide Depsipeptide mit einer unverzweigten Fettsäure-Seitenkette sind, tragen die Thaxteramide A bis C ungewöhnliche peptidisch verbundene β -Aminofettsäurereste, die strukturelle Ähnlichkeiten zu den Lipidsegmenten der Microcystine (*Microcystis* spp.) und Mycosubtilin (*Bacillus subtilis*) besitzen³⁰⁸⁻³¹¹. Ferner ist das α -Methyl- β -Ketoacyl-Fragment der Chondrosaride hervorzuheben, das auch im Lipidteil der Majusculamide (*Lyngbya majuscula*), Aetheramide (*Aetherobacter rufus* SBSr003) und von Lipohexin vorhanden ist^{312,313}.

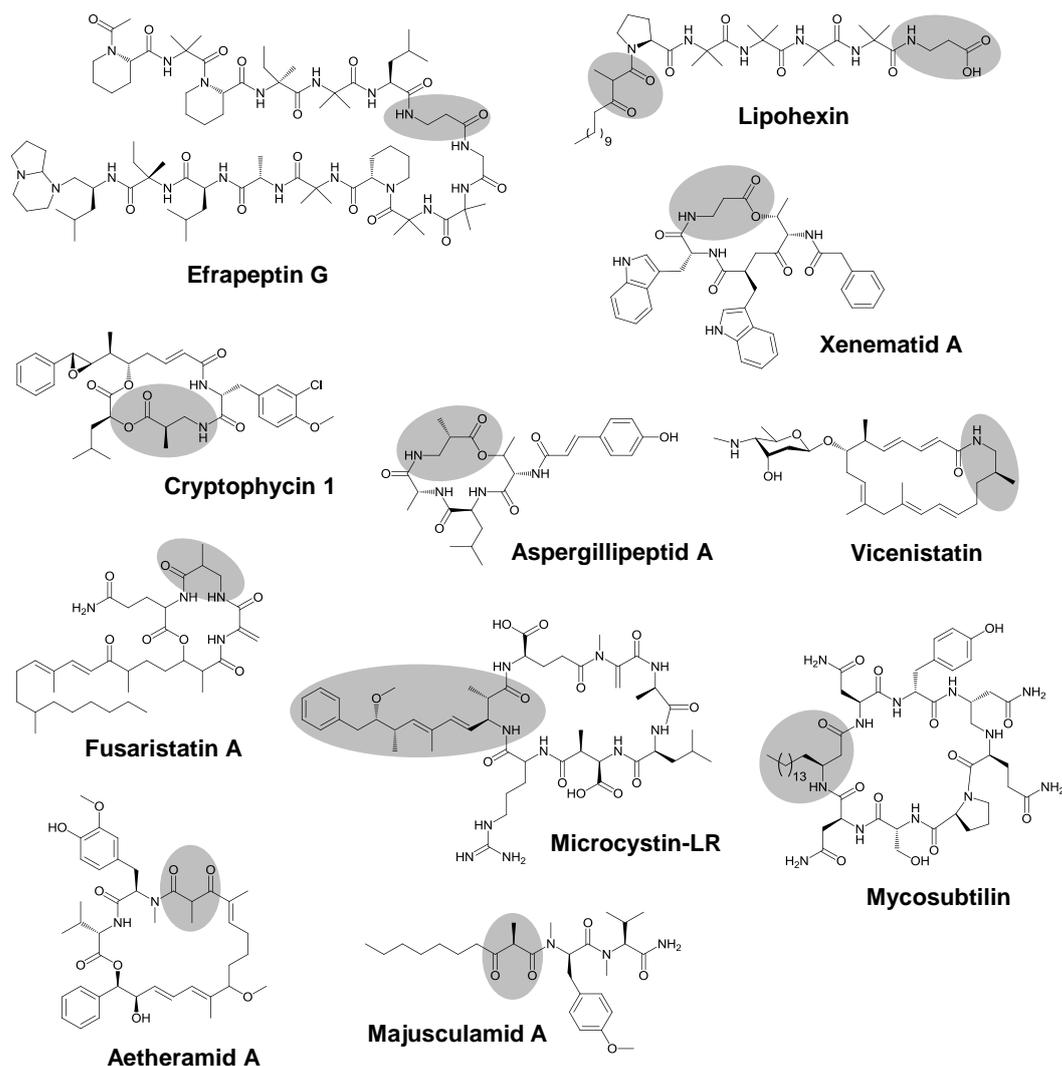


Abbildung 4-24: Naturstoffe mit Strukturmerkmalen der isolierten Sekundärmetabolite.

Mit Ausnahme von Chondrosarid A konnte für alle Substanzen die Konfiguration der proteinogenen Aminosäuren bestimmt werden. Die Konfiguration der Methylgruppe von α -Methyl- β -Alanin nach Marfey gelang aufgrund fast identischer Retentionszeiten der Diastereomere nicht. Wahrscheinlich bleibt die Formation einer *cis*- oder *trans*-Typ-Anordnung der FDLA-Derivate durch die nichtchirale β -Methylengruppe von α -Methyl- β -Alanin aus^{231,233}. Identische Retentionszeiten jener Derivate wurden ebenfalls bei der Strukturaufklärung der Cryptophycine und Aspergillipeptide beobachtet. Eine alternative Möglichkeit zur Konfigurationsbestimmung der β -Aminosäure nach Hydrolyse der Substanz bietet die dort beschriebene Derivatisierung als *N*-(Pentafluoropropionyl)-Isopropylester und GC-MS-Analyse auf einer chiralen Säule oder eine polarimetrische

Bestimmung und Vergleich gegen einen Standard aus (*R*)- α -Methyl- β -Alanin sowie (*S*)- α -Methyl- β -Alanin^{282,304}. Die Festlegung der absoluten Konfiguration der Aminogruppe und der benachbarten Methylgruppe des β -Aminofettsäurerestes von Thaxteramid A und C kann durch NMR-Spinkopplungskonstanten basierte Konfigurationsanalyse nach Matsumori und Murata erfolgen und wird derzeit durch A. Plaza im Arbeitskreis durchgeführt³¹⁴. Diese Methode hat sich für die Bestimmung der Konfiguration der Methylgruppe von α -Methyl- β -Ketoacyl-Struktureinheiten, vorliegend bei den Chondrosariden, als nicht verlässlich erwiesen³¹³. Infolge der CH-Acidität des α -Protons und der damit verbundenen Tendenz zur Tautomerie wird sich in Lösung höchstwahrscheinlich ein Äquilibrium zwischen der (*R*)- und (*S*)-Form bezüglich der α -Position einstellen, das die Bestimmung der absoluten Konfiguration dieser Methylgruppe nicht zulässt.

4.2.2. Biosynthesemodelle und Perspektiven

In dem sequenzierten Genom von *Jahnella thaxteri* SBSr007 konnten über *in silico*-Analysen zwei Biosynthesegencluster identifiziert werden. Anhand ihrer Domänenorganisation und Substratspezifitäten konnten die Cluster den Strukturen Thaxteramid A/B und Thaxteramid C zugeordnet werden und deren Biosynthese plausibel beschrieben werden. Eine experimentelle Verifizierung der Biosynthese über die gefundenen Cluster kann durch Insertionsmutagenese erfolgen, indem die jeweils erste KS-Domäne der Polyketidsynthasegene durch Plasmidintegration inaktiviert wird. Dadurch wird die Biosynthese unterbunden und Produkt-negative Mutanten sind zu erwarten^{132,315}.

Die Thaxteramide A - C werden über zwei unabhängige Hybrid-PKS/NRPS gebildet, die sowohl einige biochemische als auch auf den Modulaufbau bezogene Besonderheiten aufweisen. Solche oder ähnliche, von der klassischen PKS- und NRPS-Biosynthese abweichenden, Merkmale sind für viele myxobakterielle Megasyntasen beschrieben¹¹⁴.

Im Startmodul des Thaxteramid A/B-Biosynthesegenclusters ist eine CoA-Ligase vorhanden, für die angenommen wird, dass sie *trans*-Zimtsäure aktiviert und auf das ACP dieses Moduls lädt. CoA-Ligasen sind zwar in myxobakteriellen Genclustern selten, kommen aber bei der Aktivierung ungewöhnlicher Startereinheiten in Lademodulen anderer Polyketidsynthasen wie bei der Rapamycin-PKS vor³¹⁶. *Trans*-Zimtsäure entsteht

aus Phenylalanin durch die Phenylalanin-Ammoniumlyase (PAL) und ist Bestandteil von Polyketiden, die aus Typ II und Typ III PKS hervorgehen^{317,318}. Dessen Einbau kann damit durch Fütterungsexperimente mit L-Phenylalanin-¹³C₉, ¹⁵N und *trans*-Zimtsäure-*d*₇ und LC-MS-Nachweis der entsprechenden Verschiebung der Thaxteramid-Massenpeaks belegt werden.

In beiden Genclustern befinden sich in den entsprechenden Modulen eine C-terminale, in *cis* arbeitende Aminotransferasedomäne, die für die Transaminierung der β -Ketofunktion der Polyketideinheit verantwortlich ist. Eine solche Modularchitektur liegt ebenfalls in der Microcystin- und Mycosubtilin-PKS zur Biosynthese der β -Aminofettsäure-Teilstruktur vor. Dort überträgt eine AMT-Domäne PLP-abhängig die Aminogruppe wahrscheinlich aus Glutamin^{309,311,319}. Ein Fütterungsexperiment mit L-Glutamin-¹⁵N₂ könnte dies bestätigen.

Die Thaxteramide A und B weisen im Gegensatz zu Thaxteramid C ein *O*-methyliertes Tyrosin auf. Hierzu ist eine MT-Domäne zwischen der A-Domäne und dem PCP in Modul 6 der PKS/NRPS ThxA2 vorhanden. Die Domänenorganisation stimmt überein mit den betreffenden *O*-Methyl-Tyrosin prozessierenden Modulen der Anabaenopeptidid-, Cryptophycin- und Didemnin-Biosynthese³²⁰⁻³²². Die Übertragung der Methyl-*d*₃-Gruppe aus SAM-*methyl-d*₃ könnte die Reaktion einer SAM-abhängigen MT-Domäne nachweisen. Da sich Thaxteramid A von Thaxteramid B nur in der α -Methylgruppe an β -Alanin unterscheidet, wurde vermutet, dass das B-Derivat die Vorstufe von Thaxteramid A darstellt und dieses aus der C-Methylierung durch eine Methyltransferase hervorgeht. Es wird erwartet, dass nach Fütterung von SAM-*methyl-d*₃ eine zusätzliche Verschiebung des Massenpeaks im MS-Spektrum beobachtet werden kann. Es wäre deshalb wünschenswert, die mutmaßliche Methyltransferase zu identifizieren, um diese durch Plasmidintegration zu inaktivieren und in der erzeugten Mutante das Ausbleiben der Thaxteramid A-Produktion zu zeigen. Gleichzeitig könnte in der Mutante ausschließlich die Methylierung des oben genannten Tyrosins über SAM-*methyl-d*₃ überprüft werden.

Der biosynthetische Ursprung von β -Alanin aus dem Pyrimidin-Katabolismus wird durch eine Dihydropyrimidin-Dehydrogenase, eine Dihydropyrimidinase und eine β -Alanin-Synthase im Thaxteramid C-Biosynthese-gencluster nahegelegt. Andererseits könnte β -Alanin auch über die Decarboxylierung von Aspartat durch PanD-homologe Aspartat-Decarboxylasen, wie für die Pantothenat-Biosynthese beschrieben, entstehen³²³. Im Gegensatz zu Thaxteramid A zeigten Untersuchungen der Cryptophycin- und Vicenistatin-

Biosynthese, dass keine Methyltransferase für die Methylverzweigung in α -Methyl- β -Alanin verantwortlich ist, sondern dieses aus der Decarboxylierung von Methylaspartat hervorgeht und über das betreffende NRPS-Modul direkt in die Peptidkette eingebaut wird. Fütterungsexperimente belegten den Ursprung von Methylaspartat aus dem Stoffwechsel verzweigtkettiger Aminosäuren (Cryptophycin) oder aus Glutamat infolge Umlagerung über eine Glutamat-Mutase (Vicenistatin)^{321,324}. α -Methyl- β -Alanin könnte aber auch aus Thymin entstehen, wenn es anstelle von Uracil wie oben beschrieben reduziert und hydrolysiert würde. Fütterungsversuche mit β -Alanin-¹³C₃,¹⁵N, α -Methyl- β -Alanin-¹³C₄,¹⁵N, L-Asparaginsäure-¹³C₄,¹⁵N, β -Methyl-L-Asparaginsäure-¹³C₅,¹⁵N, Uracil-¹³C₄,¹⁵N₂ und Thymin-¹³C₅,¹⁵N₂ könnten die Frage nach der Herkunft der β -Aminosäure und der Spezifität der A-Domäne in Modul 8 beantworten.

Anstelle einer TE-Domäne beinhaltet das Thaxteramid A/B-Biosyntheseegencluster eine C-terminale Kondensationsdomäne, für die das konservierte Motiv von C-Domänen und damit eine potenzielle Aktivität nachgewiesen wurde. Aufgrund der fehlenden TE-Domäne wurde gefolgert, dass diese C-Domäne die Produktfreisetzung von Thaxteramid B durch Hydrolyse des PCP-gebundenen Thioesters bewirkt, da dessen chemische Struktur keine Indizien für weitere Kondensationsreaktionen anhand von Amid- oder Esterbildung zeigt. Hierfür ist ein experimenteller Nachweis nötig, etwa durch heterologe Expression der C-Domäne und Umsetzung mit Thaxteramid B-SNAC (*N*-Acetylcysteamin)-Estern, um PCP-gebundene Substrate zu simulieren³²⁵. Die Detektion von Hydrolyseprodukten kann über LC-MS-Analyse und idealerweise durch NMR erfolgen. Darüberhinaus ließe sich auch feststellen, ob die terminale C-Domäne ggf. eine Makrozyklisierung durchführt und das Makrolakton- bzw. Laktam nach der Freisetzung im Medium spontan hydrolysiert.

Eine Besonderheit des Thaxteramid C-Biosyntheseegenclusters ist Modul 1 mit der Domänenfolge ACP-KS-AT-AT-KR-ACP, ein *mixed module* wie es bereits in vielen myxobakteriellen Genclustern gefunden wurde, z.B. für die Biosynthese von Soraphen, Myxalamid, Stigmatellin, Chondramid, Spirangien und Ajudazol^{148,293,326-330}. Dabei wird die Startereinheit von der ersten AT auf das erste ACP und die Verlängerungseinheit von der zweiten AT auf das zweite ACP beladen. Um den Einbau von Acetat und Methylmalonat durch dieses Modul zu zeigen, können Acetat-¹³C₂ und Propionat-¹³C₃ in getrennten Ansätzen zu Kulturen von SBSr007 gefüttert und Thaxteramid C aufgereinigt werden. Durch die Anreicherung des Kohlenstoffisotops ist eine Erhöhung der ¹³C-Signalintensitäten im ¹³C-NMR der aus Acetat und Propionat stammenden

Kohlenstoffatome zu erwarten. Durch die NMR-Analyse aller Thaxteramide nach den separaten Fütterungsexperimenten könnten außerdem für beide Gencluster die Substratspezifitäten der AT-Domänen durch den Einbau von Malonat (aus Acetat) und Methylmalonat (aus Propionat) bestätigt werden³²⁸. Desweiteren kann über Punktmutationen die Spezifität der AT-Domänen zu anderen Substraten verändert werden, aber auch ein Austausch durch eine AT-Domäne anderer myxobakterieller Gencluster wäre denkbar^{130,131,315,331}. Diese genetischen Modifikationen gelingen durch doppelte homologe Rekombination (*double crossover*) nach Plasmidtransformation in den Wirtstamm und Selektion über Antibiotika- und nachfolgend Levansucrose-Resistenz^{332,333}. Wird eine der AT-Domänen aus Modul 1 erfolgreich modifiziert, sollte sich die chemische Struktur des Polyketidteils von Thaxteramid C durch die Auswahl einer anderen Verlängerungseinheit an entsprechender Stelle verändern. Daraus kann gefolgert werden, welche Substrate durch die erste und die zweite AT-Domäne in der ursprünglichen Biosynthese ausgewählt werden.

Modul 1 zeichnet sich auch dadurch aus, dass eine DH-Domäne fehlt, die zur Dehydratisierung des durch die KR-Domäne gebildeten β -Hydroxythioesters erforderlich ist, um eine Doppelbindung zwischen C-8' und C-9' einzuführen. Deren Funktion könnte durch eine iterative DH-Domäne eines der anderen Module wie bei der Spirangien-, Chivosazol- und Epothilon-Biosynthese komplementiert werden^{132,329,334}. Denkbar ist auch eine spontane, nicht enzymkatalysierte, Dehydratisierung. In der Epothilon-PKS wird der β -Hydroxyacylrest vom ACP des Moduls mit der fehlenden DH-Domäne auf das ACP des Folgemoduls geladen. In diesem Moduls sind, wie in Modul 2 von ThxC1, die Domänen DH-ER-KR vorhanden und die Dehydratisierung durch die DH wird vollzogen, jedoch ohne darauffolgende Enoylreduktion. Der β -Enoylrest wird anschließend auf die KS-Domäne desselben Moduls übertragen und die eigentlich in diesem Modul vorgesehene Verlängerung mit der nächsten Einheit einschließlich vollständiger Reduktion erfolgt. Zur Überprüfung einer eventuell iterativen DH-Domäne im Thaxteramid C-Biosynthesegencluster ist die separate Inaktivierung beider DH-Domänen (in Modul 2 und 3) und der Nachweis von 9'-Hydroxyderivaten von Thaxteramid C durch Aufreinigung und NMR-Analyse erforderlich. Die Inaktivierung von DH-Domänen ist möglich durch Punktmutationen des konservierten Bereichs HxxxGxxxxP in deren aktivem Zentrum über doppelte homologe Rekombination wie oben aufgeführt^{334,335}. Die mögliche Funktion einer Methylmalonat-Semialdehyd-Dehydrogenase und einer Ketoreduktase/

Oxidoreduktase, die die *thxC*-Gene flankieren, bei der Polyketidsynthese von Thaxteramid C sollte durch Inaktivierung und Überprüfung auf Produkte mit fehlenden Reduktionsstufen erfolgen. Dies kann durch Plasmidintegration über einfache homologe Rekombination geschehen. Eventuell sind reduktive Domänen des Clusters inaktiv und werden durch Enzymaktivitäten in *trans* komplementiert.

Das Biosynthesegencluster von Thaxteramid D wurde durch *antiSMASH* nicht identifiziert. Es ist möglich, dass sich es in einem nicht sequenzierten Bereich des Genoms von SBSr007 befindet, da noch Lücken vorhanden sind, oder dass es sich bei der Substanz um ein Hydrolyseprodukt von Thaxteramid C handelt, das während der Reinigung entstanden ist. Die Substanz wurde allerdings auch in frisch hergestellten Extrakten detektiert. Im Falle eines biosynthetisch begründeten Produkts könnte das Gencluster für Thaxteramid D aus einer Genduplikation von Teilen des Thaxteramid C-Genclusters entstanden sein. Auch könnte das D-Derivat durch hydrolytische Spaltung während der Prozessierung von Thaxteramid C durch die NRPS-Domänen des eigenen Clusters gebildet werden. Ein Hinweis auf letzteres würde die fehlende Produktbildung beider Thaxteramide, C und D, in einer wie oben beschrieben zu erzeugenden *knock out*-Mutante des Thaxteramid C-Genclusters geben.

Da das Genom von *Chondromyces* sp. SBCm009 noch nicht sequenziert wurde, ist eine *in silico*-Analyse zur Identifizierung der Chondrosarid- und Chondrodepsid-Biosynthesegencluster nicht möglich. Eine Alternative bietet eine Transposon-Mutagenese über Konjugation mit dem *Mariner*-Transposon tragenden Plasmid pMycoMarHyg^{336,337}. Dadurch wird eine randomisierte Mutantenbibliothek generiert, die über eine LC-MS-Analyse auf Produkt-negative Mutanten überprüft werden kann. In solchen Mutanten ist über die Transposition höchstwahrscheinlich das gesuchte Gencluster inaktiviert worden. Durch eine Plasmidwiedergewinnung mittels enzymatischer Restriktion und Ligation flankierender Bereiche des Transposons werden Teile des Genclusters isoliert, die sequenziert werden können, um schließlich den vollständigen gewünschten Sequenzbereich abzudecken. Zur Identifikation der Biosynthese-Gencluster ist ebenfalls die Amplifikation konservierter Bereiche von KS-Domänen mit degenerierten Primern möglich. Die erhaltenen KS-Fragmente dienen als Hybridisierungsproben mittels Southern-Blot in einem Screening einer Cosmid-Genbank aus genomischer DNA von SBCm009. Identifizierte Cosmide können anschließend sequenziert und die enthaltene

genomische DNA subkloniert und für Inaktivierungsexperimente in SBCm009 genutzt werden^{217,338}.

Ein Biosynthesemodell für die beiden Substanzfamilien Chondrodepside und Chondrosaride kann trotzdem retrobiosynthetisch formuliert werden, ausgehend von einem modularen PKS/NRPS-System.

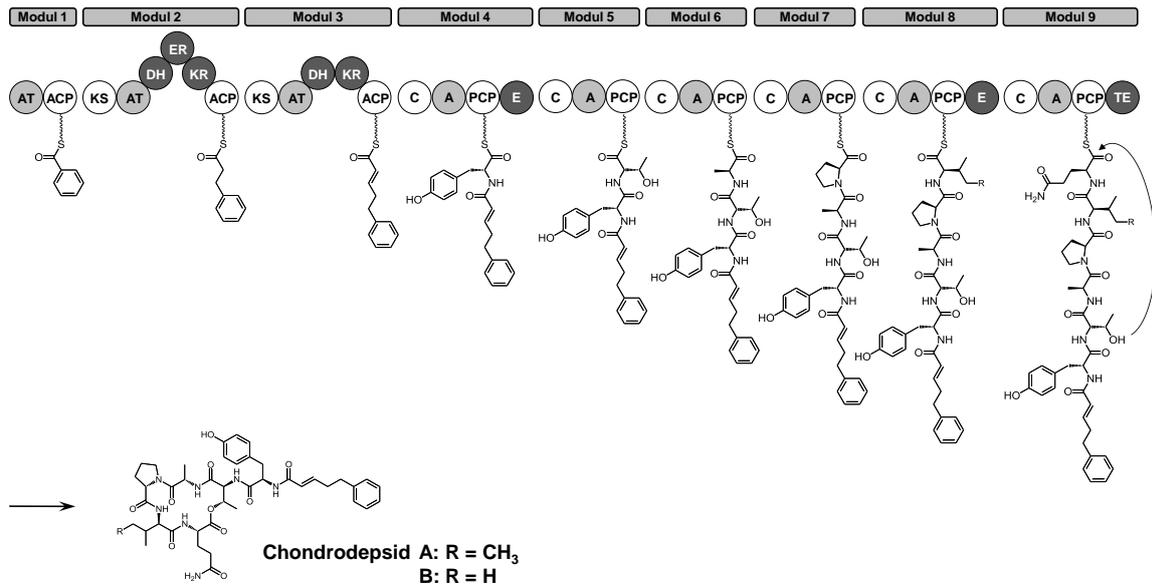


Abbildung 4-25: Hypothetisches Modell zur Biosynthese der Chondrodepside über ein PKS/NRPS-Gencluster.

Chondrodepside könnten durch eine aus 9 Modulen aufgebaute PKS/NRPS biosynthetisiert werden (Abbildung 4-25). Entsprechend der Soraphen-Biosynthese wird der Beginn der Polyketidformierung durch Selektion von Benzoyl-CoA und Beladung des ACPs durch die AT des Lademoduls vermutet^{326,327}. Benzoyl-CoA kann durch oxidativen Abbau aus Phenylalanin über *trans*-Zimtsäure entstehen³³⁹. Dies könnte durch ein Fütterungsexperiment mit L-Phenylalanin-¹³C₉ gezeigt werden. Die Verlängerung der Kette würde durch Kondensation mit zwei Einheiten Malonat durch die Module 2 und 3 erfolgen, einmal unter Reduktion durch einen kompletten Satz reduktiver Domänen und im zweiten Schritt durch Reduktion zum Enoylthioester. Danach erfolgt der Wechsel von der Polyketid- zur Peptidchemie und Einbau der Aminosäuren Tyrosin, Threonin, Alanin, Prolin, Isoleucin/Valin und Glutamin durch die NRPS-Module 4 - 9. Für die D-Konfiguration von Tyrosin und Isoleucin/Valin werden Epimerisierungsdomänen in den Modulen 4 und 8 erwartet. Die Freisetzung der Chondrodepside unter Makrolaktonisierung

infolge Esterbildung zwischen der Threonin-OH-Gruppe und der Glutamin-Carboxylgruppe erfolgt durch die TE in Modul 9. Aufgrund der strukturell sehr ähnlichen und gleichermaßen hydrophoben Seitenketten von Valin und Isoleucin könnte die A-Domäne in Modul 8 neben Valin auch Isoleucin selektieren und aktivieren, wodurch die Bildung der Derivate Chondropepsid A und B zu erklären wäre.

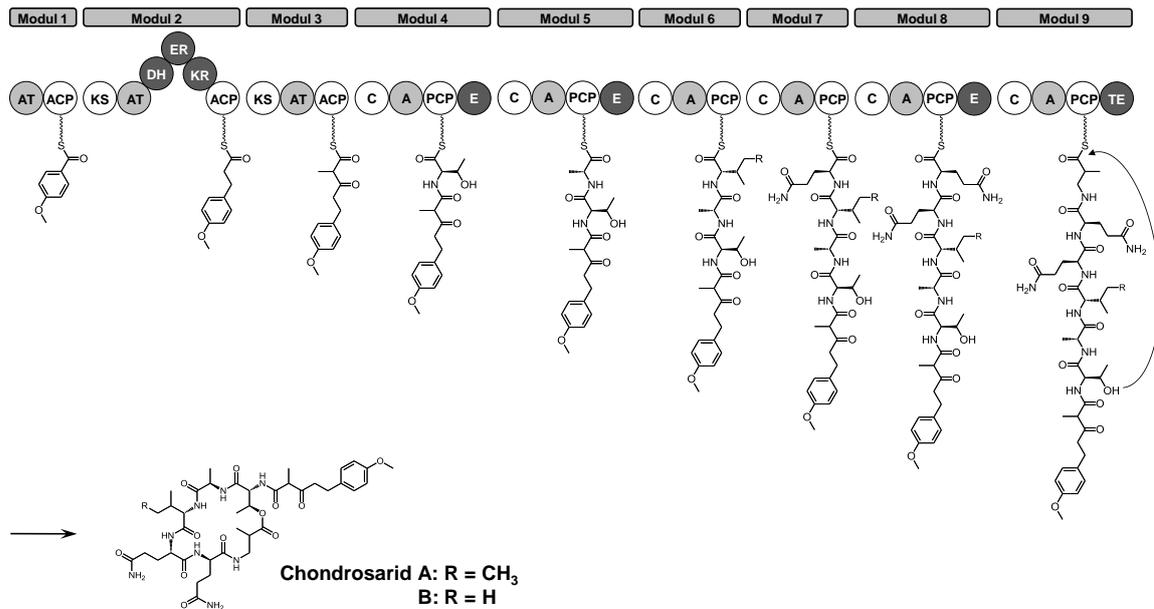


Abbildung 4-26: Hypothetisches Modell zur Biosynthese der Chondrosaride über ein PKS/NRPS-Gencluster.

Es wird angenommen, dass Chondrosaride durch 3 PKS- und 6 NRPS-Module formiert werden (Abbildung 4-26). Das Lademodul könnte als Startereinheit *p*-Methoxybenzoyl-CoA auswählen. Es wäre auch möglich, dass *p*-Hydroxybenzoyl-CoA geladen wird und eine *O*-Methylierung über eine gegebenenfalls vorhandene MT-Domäne in diesem Modul erfolgt. Fütterungsexperimente mit *p*-Hydroxybenzoesäure-¹³C₇ und *p*-Methoxybenzoesäure-¹³C₈ sind denkbar, um den Einbau einer der Startereinheiten oder sogar die Akzeptanz beider zu zeigen. Der β -Ketoacylthioester kann durch Kondensation mit Malonat und Methylmalonat synthetisiert werden, wobei in Modul 2 die entstehende Ketofunktion vollständig reduziert würde. Der Peptidteil entspringt der nichtribosomalen Peptidsynthese aus Threonin, Alanin, Isoleucin bzw. Valin, zweimal Glutamin und α -Methyl- β -Alanin in den Modulen 4 - 9. Möglicherweise wird in Modul 9 β -Alanin eingebaut und durch eine MT-Domäne in diesem Modul oder post-PKS/NRPS durch eine diskrete Methyltransferase *C*-methyliert. Hier können Fütterungsversuche analog zur

Thaxteramid A/B-Biosynthese den Ursprung von β -Alanin resp. α -Methyl- β -Alanin klären. Epimeriserungsdomänen, die D-Aminosäuren einführen, befinden sich in den Modulen 4, 5 und 8. Da die Abfolge von L-Glutamin und D-Glutamin im Peptidgerüst nicht eindeutig festgelegt werden konnten, aber beide vorhanden sind, könnte sich eine E-Domäne anstatt in Modul 8 in Modul 7 befinden und zu einem Wechsel der Konfigurationen führen. Die tatsächliche Konstellation des Biosyntheseegenclusters der Chondrosaride erlaubt die Beantwortung dieser Frage. Auch hier würde eine Produktfreisetzung unter Makrolaktonisierung zum Threonin-Ester durch die terminale TE-Domäne erfolgen.

Um grundsätzlich die vorgeschlagenen Modelle zur Biosynthese der Chondropeptide und Chondrosaride durch den Einbau der angenommenen Substrate der PKS/NRPS-Hybride experimentell zu untermauern, sind Fütterungsexperimente mit Acetat- $^{13}\text{C}_2$, Propionat- $^{13}\text{C}_3$ (siehe Thaxteramid-Biosynthese) und den entsprechenden ^{13}C - und ^{15}N -markierten Aminosäuren möglich.

Letztlich konnten für alle vorgestellten neuen Naturstoffe aus den Stämmen *Jahnella thaxteri* SBSr007 und *Chondromyces* sp. SBCm009 Modellvorschläge statuiert werden, die mit den Prinzipien der Biosynthese-Maschinerien Polyketidsynthasen und nichtribosomale Peptidsynthetasen korrespondieren. Dabei sind Abweichungen von den Regeln der klassischen PKS- und NRPS-Biosynthese und biochemische Besonderheiten aufgezeigt worden, Merkmale, die mittlerweile typisch für myxobakterielle Systeme sind. Hervorzuheben ist zunächst die Biosynthese einer Substanzfamilie, der Thaxteramide, über zwei Biosyntheseegencluster, die dadurch eine gemeinsame Grundstruktur, jedoch mit unterschiedlichen Konfigurationen der Aminosäuren, erhalten. Bemerkenswert ist die Produktfreisetzung durch eine potenziell hydrolysierende C-Domäne, ein Novum in der nichtribosomalen Peptidsynthese, da in der Literatur keine vergleichbaren Erkenntnisse beschrieben werden. Desweiteren sind Veränderungen in der Modulararchitektur, Abweichungen von der biosynthetischen Kolinearität durch mutmaßliche iterative DH-Domänen und die Einführung von Aminofunktionen in die Polyketidchemie durch Aminotransferasedomänen aufgezeigt worden. Auffällig ist außerdem die Verwendung von aromatischen Startereinheiten in der Polyketidbiosynthese aller drei Substanzfamilien und das Vorkommen der β -Aminosäuren β -Alanin bzw. α -Methyl- β -Alanin in zwei Substanzklassen aus unterschiedlichen Stämmen. In *Jahnella thaxteri* SBSr007 konnte die Herkunft von β -Alanin mit dem Pyrimidin-Katabolismus in Zusammenhang gebracht werden.

Ausgehend von der chemischen Struktur der isolierten Substanzen und vorliegender Informationen über die Genclustersequenzen ist die Erzeugung von Strukturvarianten der Sekundärmetabolite denkbar, um biologische Aktivitäten hervorzurufen, zu optimieren oder um die Wechselwirkung mit anderen physiologischen Zielstrukturen als Angriffspunkte zu beabsichtigen. Neben der chemischen Synthese stehen hierzu auch Methoden zur biosynthetischen/biochemischen Modifikation eines Sekundärmetaboliten zur Verfügung. Interessant sind Veränderungen des Polyketid- bzw. Peptidrückgrates, die stärkere Auswirkungen auf die chemische Struktur haben als Modifikationen durch verschiedene post-PKS/NRPS-Enzyme wie beispielsweise Methyltransferasen, Hydroxylasen, Oxidoreduktasen oder Transaminasen. Möglich sind dadurch der Einbau anderer Starter- oder Verlängerungseinheiten, die Veränderung der Reduktionsstufen von Polyketidbausteinen und die Einführung oder biochemische Modifizierung von funktionellen Gruppen. Dies kann zum einen erreicht werden durch Austausch, Deletion oder Insertion von PKS- bzw. NRPS-Domänen und Modulen^{130,340-344}. Desweiteren kann die Substratspezifität einzelner AT- und A-Domänen durch Punktmutationen in den konservierten Sequenzbereichen verändert werden^{122,130,315,331}. Punktmutationen in der NADPH-Binderstelle GxGxxA von KR- und ER-Domänen oder in dem konservierten Motiv HxxxGxxxxP von DH-Domänen erlauben die Inaktivierung von Reduktionsdomänen und haben damit Einfluss auf die Art und Anzahl von Sauerstofffunktionen sowie die Anzahl von Doppelbindungen in einem Polyketid^{315,334,335,345}. Experimentell belegt sind ebenfalls die Fütterung anderer Starter- bzw. Verlängerungseinheiten, z.B. halogener aromatischer Aminosäuren, aber auch die Makrozyklisierung linearer Produkte *in vitro* durch heterolog exprimierte zyklisierende TE-Domänen^{148,346}. Über die genannten Ansätze können eine Vielzahl von Derivaten bis hin zu Substanzbibliotheken für die biologische und pharmakologische Testung erzeugt werden, die die klinische Weiterentwicklung potenzieller Wirkstoffkandidaten ermöglichen.

5. Anhang

Gel Idx/Pos		Instr./Gel Origin		AK045/220610_fremd_samples		Process Status		Analysis Succeeded	
Plate [#] Name		Instrument Sample Name				Spectra		1	
Rank	Protein Name	Accession No.	Protein MW	Protein PI	Pep. Count	Protein Score	Protein Score C. I. %	Total Ion C. I. %	
1	[2668579 - 2668707] (REVERSE SENSE) Myxococcus xanthus DK 1622, complete genome	CP000113.1_2079	32718,5	6,55	12	100	100		
Peptide Information									
Calc. Mass	Obsrv. Mass	\pm da	\pm ppm	Start Seq.	End Sequence Seq.	Modification			
1199,5667	1199,4858	-0,0809	0	221	229 WEQFVGMFR				
1215,5615	1215,4768	-0,0847	0	221	229 WEQFVGMFR	Oxidation (M)[7]			
1318,7227	1318,6333	-0,0894	0	31	43 IPGVNPNVNAAR				
1330,6862	1330,5956	-0,0905	0	159	170 RPDVNAFLGGER				
1552,8257	1552,728	-0,0977	0	277	290 EGVGIEFYAVVLEK				
1581,8271	1581,7318	-0,0953	0	60	73 QAAEYLFSLVPSTR				
1767,8549	1767,7494	-0,1055	0	262	276 EFLGLPPEHITDEDR				
1894,8718	1894,8065	-0,0653	0	44	59 IYDYTLGGTHHFEADR				
2051,0669	2050,9614	-0,1055	-1463	171	189 RVAFGANGITVFLSAEENR				
2206,1396	2205,9956	-0,144	0	23	43 MDTEALARIPGVNPNVNAAR				
2533,3408	2533,2273	-0,1135	0	120	142 VLYSDVNPITTAHLLGDTPR				
3208,571	3208,3965	-0,1755	0	90	119 LAADGFHWWDFASGLPTGDHVA VLPDAR				
3301,6626	3301,4509	-0,2117	0	262	290 EFLGLPPEHITDEDRREGVIEFYAV VLEK				

Abbildung 5-1: MALDI-TOF-MS-Analyse von MXAN_2293 aus SDS-PAGE nach aktivitätsbasierter Aufreinigung.

Gel Idx/Pos		Instr./Gel Origin		AK045/200610_fremd&own_samples		Process Status		Analysis Succeeded	
Plate [#] Name		Instrument Sample Name				Spectra		1	
Rank	Protein Name	Accession No.	Protein MW	Protein PI	Pep. Count	Protein Score	Protein Score C. I. %	Total Ion C. I. %	
1	[2670087 - 2669056] (REVERSE SENSE) Myxococcus xanthus DK 1622, complete genome	CP000113.1_2078	37111,1	5,57	13	98	100		
Peptide Information									
Calc. Mass	Obsrv. Mass	\pm da	\pm ppm	Start Seq.	End Sequence Seq.	Modification			
1048,5647	1048,5686	0,0039	0	267	277 NIHAAPAGAR				
1166,5735	1166,587	0,0135	0	218	228 APMEAQGLHGR				
1182,5684	1182,5767	0,0083	0	218	228 APMEAQGLHGR	Oxidation (M)[3]			
1194,5651	1194,5776	0,0125	0	147	156 HPEEATHFAR				
1292,6667	1292,6815	0,0148	0	84	95 TFALTPMGEGLR				
1293,6798	1293,6968	0,017	0	311	321 TANEFQTLTR				
1308,6616	1308,6801	0,0185	0	84	95 TFALTPMGEGLR	Oxidation (M)[7]			
1405,707	1405,7321	0,0251	0	70	83 GGISAGVFQEVGER				
1508,8472	1508,8723	0,0251	0	204	217 GILFDLPHVLEGAK				
1516,743	1516,7927	0,0497	0	134	146 EALGTDIWEHFAK				
1605,8748	1605,9005	0,0257	0	22	36 IGGYWLTVQVIGTAAR				
1676,8643	1676,8992	0,0349	0	7	21 TPGGTPFPPTQLLYER				
1852,8923	1852,9373	0,045	0	49	66 SSDALADELGISADGLYR				
1905,9453	1906,001	0,0557	525	251	266 HILHDWDEESATAILR				
2323,2219	2323,2849	0,063	0	229	250 VELVGGSSFFPEGLPSAEAYLLK				

Abbildung 5-2: MALDI-TOF-MS-Analyse von MXAN_2296 aus SDS-PAGE nach aktivitätsbasierter Aufreinigung.

Gel Idx/Pos	47/B20	Instr./Gel Origin	AK045/200610_fremd&own_samples				Process Status	Analysis Succeeded
Plate [#] Name	[1] 9732_F	Instrument Sample Name					Spectra	1
Rank	Protein Name	Accession No.	Protein MW	Protein PI	Pep. Count	Protein Score	Protein Score C. I. %	Total Ion C. I. %
2	methyltransferase, UbiE/COQ5 family [Myxococcus xanthus DK 1622]	gil108467359	29137,7	5,23	7	44	72,763	
Peptide Information								
Calc. Mass	Obsrv. Mass	\pm da	\pm ppm	Start Seq.	End Sequence Seq.	Modification		
886,4529	886,4512	-0,0017	0	127	133 GFOELHR			
1278,6477	1278,6791	0,0314	0	141	151 AVVSSWTFPER			
1357,6456	1357,6794	0,0338	0	23	33 ELMPTEFETFSR			
1373,6406	1373,6664	0,0258	0	23	33 ELMPTEFETFSR	Oxidation (M)[3]		
1393,7686	1393,7891	0,0205	0	257	269 VTLTAYLTTGTRP			
1619,8462	1619,8848	0,0386	0	68	82 VTAVDFSPERIAALR			
1623,9429	1623,9709	0,028	0	47	63 VVDVATGPGTLALLAAR			
1635,8411	1635,8815	0,0404	0	68	82 VTAVDFSPERIAALR	Oxidation (M)[10]		
2297,1924	2297,2515	0,0591	0	2	22 SAVSPLAQPEAWNLVAPERYR			

Abbildung 5-3: MALDI-TOF-MS-Analyse von MXAN_3033 aus SDS-PAGE nach aktivitätsbasierter Aufreinigung.

Gel Idx/Pos	21/A21	Instr./Gel Origin	AK045/200910_fremd_samples_PSD				Process Status	Analysis Succeeded
Plate [#] Name	[1] 15880_31	Instrument Sample Name					Spectra	1
Rank	Protein Name	Accession No.	Protein MW	Protein PI	Pep. Count	Protein Score	Protein Score C. I. %	Total Ion C. I. %
1	TKM93_1-4	TKM93_1-4	32430,2	6,13	14	125	100	
Peptide Information								
Calc. Mass	Obsrv. Mass	\pm da	\pm ppm	Start Seq.	End Sequence Seq.	Modification		
801,444	801,4951	0,0511	0	73	78 WVPMLR			
817,4388	817,4902	0,0514	0	73	78 WVPMLR	Oxidation (M)[4]		
927,5258	927,5826	0,0568	0	251	259 DATGVLVPR			
929,5389	929,5948	0,0559	0	72	78 KWVPMLR			
945,5338	945,582	0,0482	0	72	78 KWVPMLR	Oxidation (M)[5]		
1199,5667	1199,6493	0,0826	0	219	227 WEQFVGMFR			
1215,5615	1215,6343	0,0728	0	219	227 WEQFVGMFR	Oxidation (M)[7]		
1222,5739	1222,6531	0,0792	0	192	202 DLYDWAAPGSK			
1318,7227	1318,8115	0,0888	0	29	41 IPGVNPNVNAAR			
1330,6862	1330,7675	0,0813	0	157	168 RPDVNAFLGGER			
1581,8271	1581,9292	0,1021	0	58	71 QAAEYLFSLVPSTR			
1767,8549	1767,9695	0,1146	0	260	274 EFLGLPPEHITDEDR			
1768,8488	1768,9679	0,1191	0	2	17 GSSHHHHHSSGGLVPR			
1894,9657	1895,0007	0,035	528	170	187 VAFGANGITVFLSAENR			
2533,3408	2533,5012	0,1604	0	118	140 VLYSDVNPLTITTAHLLGDTPR			
3208,571	3208,7964	0,2254	0	88	117 LAADGFHHWVDFASGLPTGDHVHA VLPDAR			
3301,6626	3301,8406	0,178	0	260	288 EFLGLPPEHITDEDEREGVIEFYAV VLEK			

Abbildung 5-4: MALDI-TOF-MS-Analyse von MXAN_2293 aus SDS-PAGE nach heterologer Expression.

5. Anhang

Gel Idx/Pos	42/B15	Instr./Gel Origin	AK045/290910_fremd_samples_PSD		Process Status	Analysis Succeeded		
Plate [#] Name	[1] 15880_31	Instrument Sample Name			Spectra	1		
Rank	Protein Name	Accession No.	Protein MW	Protein PI	Pep. Count	Protein Score	Protein Score C. I. %	Total Ion C. I. %
1	TKM96_3b	TKM96_3b	38987,9	6,04	15	123	100	
Protein Group TKM96_xc		TKM96_xc	38987,9	6,0399	990618	5303		
Peptide Information								
Calc. Mass	Obsrv. Mass	\pm da	\pm ppm	Start Seq.	End Sequence Seq.	Modification		
844,4523	844,4933	0,041	0	113	120 SDIPGSLR			
1048,5647	1048,6191	0,0544	0	284	294 NIHAAPAGAR			
1166,5735	1166,652	0,0785	0	235	245 APMEAQQLHGR			
1194,5651	1194,6323	0,0672	0	164	173 HPEEATHFAR			
1292,6667	1292,7361	0,0694	0	101	112 TFMALPMGEGLR			
1293,6798	1293,7441	0,0643	0	328	338 TANEFQTLTR			
1308,6616	1308,7411	0,0795	0	101	112 TFMALPMGEGLR	Oxidation (M)[7]		
1405,707	1405,7803	0,0733	0	87	100 GGISAGVFQEVGER			
1605,8748	1605,9508	0,076	0	39	53 IGGYWLTVQVIGTAAR			
1675,9067	1675,984	0,0773	0	130	143 AHWLPWQGLIEAVR			
1768,8488	1768,9213	0,0725	0	2	17 GSSHHHHHSSGLVPR			
1852,8923	1852,9775	0,0852	0	66	83 SSDALADELGISADGLYR			
1905,9453	1906,0226	0,0773	525	268	283 HILHDWDEESATAILR			
2332,1392	2332,2458	0,1066	0	18	38 GSHMDKTPGGTFFPTQLLYER			
2372,2642	2372,3574	0,0932	0	339	360 TSWELVGIPTQAGTCIEAVK			
3891,981	3892,1482	0,1672	257	174	211 AMGNLSALVAHELQQVDFSPFAH VADIGGSGQALLAR			

Abbildung 5-5: MALDI-TOF-MS-Analyse von MXAN_2296 aus SDS-PAGE nach heterologer Expression.

Gel Idx/Pos	28/B1	Instr./Gel Origin	AK045/101210_fremd_samples		Process Status	Analysis Succeeded		
Plate [#] Name	[1] 15880_33	Instrument Sample Name			Spectra	1		
Rank	Protein Name	Accession No.	Protein MW	Protein PI	Pep. Count	Protein Score	Protein Score C. I. %	Total Ion C. I. %
1	TKM3033L_1	TKM3033L_1	32425,4	5,52	7	43	50,164	
Peptide Information								
Calc. Mass	Obsrv. Mass	\pm da	\pm ppm	Start Seq.	End Sequence Seq.	Modification		
886,4529	886,4283	-0,0245	0	158	164 GFQELHR			
1278,6477	1278,5995	-0,0482	0	172	182 AVVSSWTFPER			
1357,6456	1357,5991	-0,0465	0	54	64 ELMPYFETFSR			
1619,8462	1619,7921	-0,0541	0	99	113 VTAVDFSPEDIAALR			
1623,9429	1623,8834	-0,0595	0	78	94 VVDVATGPGTLALLAAR			
2782,3286	2782,1821	-0,1465	0	193	217 LWEQMGAKPSQPAIPLSDPDTQ R	Carbamidomethyl (C)[23]		
3061,4988	3061,4172	-0,0816	0	261	287 ALGPQWEPLLWSMHEYAQAELGP GPQR			

Abbildung 5-6: MALDI-TOF-MS-Analyse von MXAN_3033 aus SDS-PAGE nach heterologer Expression.

Gel Idx/Pos	46/B19	Instr./Gel Origin	AK045/290910_fremd_samples_PSD		Process Status	Analysis Succeeded		
Plate [#] Name	[1] 15880_31	Instrument Sample Name			Spectra	1		
Rank	Protein Name	Accession No.	Protein MW	Protein PI	Pep. Count	Protein Score	Protein Score C. I. %	Total Ion C. I. %
1	TKM06_3b	TKM06_3b	38987,9	6,04	17	149	100	
Protein Group								
	TKM06_xc	TKM06_xc	38987,9	6,0399 999018 5303				
Peptide Information								
Calc. Mass	Obsrv. Mass	\pm da	\pm ppm	Start Seq.	End Sequence Seq.	Modification		
844,4523	844,4965	0,0442	0	113	120 SDIPGSLR			
1048,5647	1048,6139	0,0492	0	284	294 NIHAAPAGAR			
1166,5735	1166,6302	0,0567	0	235	245 APMEAQGLHGR			
1182,5684	1182,6155	0,0471	0	235	245 APMEAQGLHGR	Oxidation (M)[3]		
1194,5651	1194,6177	0,0526	0	164	173 HPEEATHFAR			
1292,6667	1292,7272	0,0605	0	101	112 TFALTPMGEGLR			
1293,6798	1293,7378	0,058	0	328	338 TANEFQLLTR			
1308,6616	1308,7146	0,053	0	101	112 TFALTPMGEGLR	Oxidation (M)[7]		
1405,707	1405,7747	0,0677	0	87	100 GGISAGVFQEVGER			
1508,8472	1508,9114	0,0642	0	221	234 GILFDLPHVLEGAK			
1516,743	1516,811	0,068	0	151	163 EALGTDIWEHFAK			
1605,8748	1605,9548	0,09	0	39	53 IGGYWLTVQVIGTAAR			
1675,9067	1676,0037	0,097	597	130	143 AHWLPWGQIEAVR			
1768,8488	1768,9252	0,0764	0	2	17 GSSHHHHHSSGLVPR			
1852,8923	1852,9866	0,0943	0	66	83 SSDALADELGISADGLYR			
1905,9453	1905,0374	0,0921	525	268	283 HILHDWDEESATAILR			
2323,2219	2323,3403	0,1184	0	246	267 VELVGGFFEPGLPSAEAYLLK			
2372,2642	2372,3838	0,1196	0	339	360 TSWELVGIRPTQAGTCIEAVK			
3891,981	3892,1831	0,2021	257	174	211 AMGNLSALVAHELTOQVDFSPFAH VADIGGSQGALLAR			

Abbildung 5-7: MALDI-TOF-MS-Analyse von MXAN_2296 aus SDS-PAGE nach heterologer Expression und Aufreinigung, obere Bande.

Gel Idx/Pos	48/B21	Instr./Gel Origin	AK045/290910_fremd_samples_PSD		Process Status	Analysis Succeeded		
Plate [#] Name	[1] 15880_31	Instrument Sample Name			Spectra	1		
Rank	Protein Name	Accession No.	Protein MW	Protein PI	Pep. Count	Protein Score	Protein Score C. I. %	Total Ion C. I. %
1	TKM06_3b	TKM06_3b	38987,9	6,04	17	149	100	
Protein Group								
	TKM06_xc	TKM06_xc	38987,9	6,0399 999018 5303				
Peptide Information								
Calc. Mass	Obsrv. Mass	\pm da	\pm ppm	Start Seq.	End Sequence Seq.	Modification		
844,4523	844,5069	0,0546	0	113	120 SDIPGSLR			
1048,5647	1048,6272	0,0625	0	284	294 NIHAAPAGAR			
1166,5735	1166,6455	0,072	0	235	245 APMEAQGLHGR			
1182,5684	1182,6317	0,0633	0	235	245 APMEAQGLHGR	Oxidation (M)[3]		
1194,5651	1194,6353	0,0702	0	164	173 HPEEATHFAR			
1292,6667	1292,7462	0,0795	0	101	112 TFALTPMGEGLR			
1293,6798	1293,7543	0,0745	0	328	338 TANEFQLLTR			
1308,6616	1308,734	0,0724	0	101	112 TFALTPMGEGLR	Oxidation (M)[7]		
1405,707	1405,7928	0,0858	0	87	100 GGISAGVFQEVGER			
1508,8472	1508,9366	0,0894	0	221	234 GILFDLPHVLEGAK			
1516,743	1516,8368	0,0938	0	151	163 EALGTDIWEHFAK			
1605,8748	1605,9828	0,108	0	39	53 IGGYWLTVQVIGTAAR			
1675,9067	1676,0139	0,1072	597	130	143 AHWLPWGQIEAVR			
1768,8488	1768,9478	0,099	0	2	17 GSSHHHHHSSGLVPR			
1852,8923	1853,01	0,1177	540	66	83 SSDALADELGISADGLYR			
1905,9453	1905,0621	0,1168	525	268	283 HILHDWDEESATAILR			
2323,2219	2323,3503	0,1284	0	246	267 VELVGGFFEPGLPSAEAYLLK			
2372,2642	2372,4111	0,1469	0	339	360 TSWELVGIRPTQAGTCIEAVK			
3891,981	3892,2058	0,2248	257	174	211 AMGNLSALVAHELTOQVDFSPFAH VADIGGSQGALLAR			

Abbildung 5-8: MALDI-TOF-MS-Analyse von MXAN_2296 aus SDS-PAGE nach heterologer Expression und Aufreinigung, untere Bande.

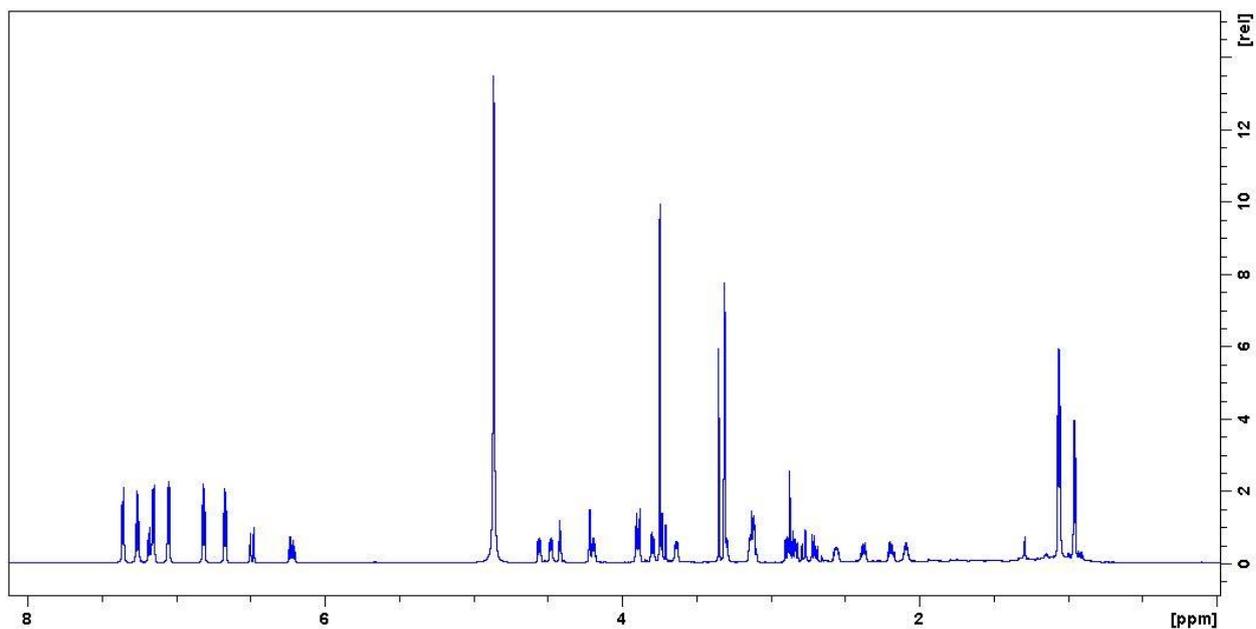


Abbildung 5-9: ^1H -NMR-Spektrum von Thaxteramid A.

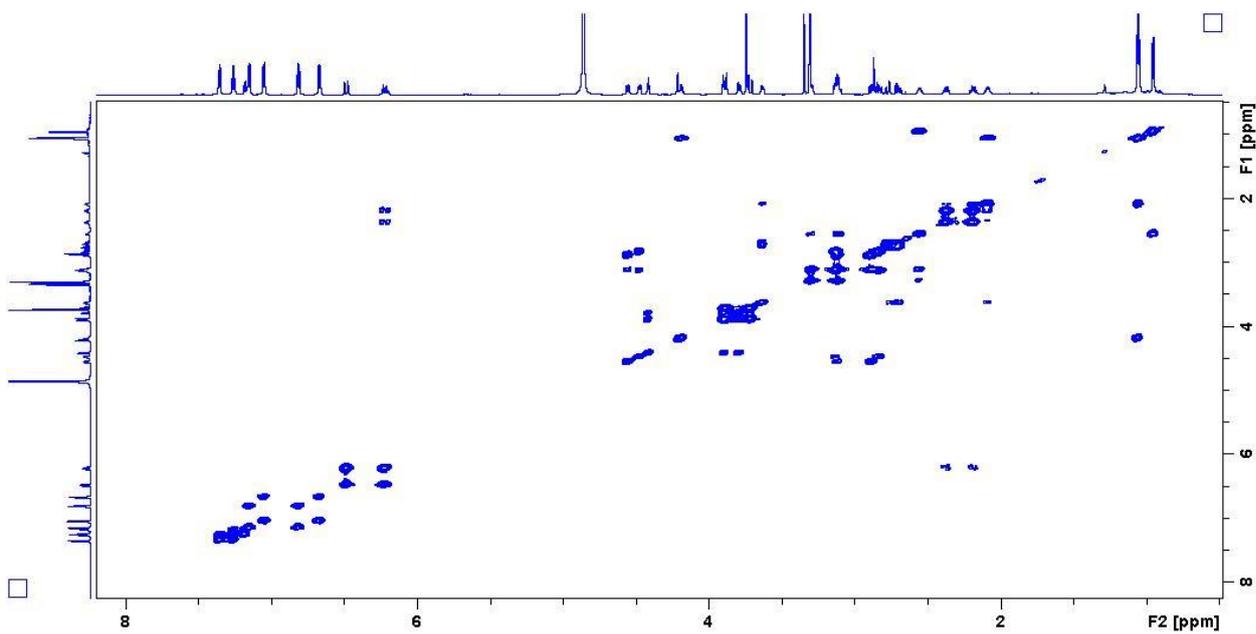


Abbildung 5-10: ^1H , ^1H -COSY-Spektrum von Thaxteramid A.

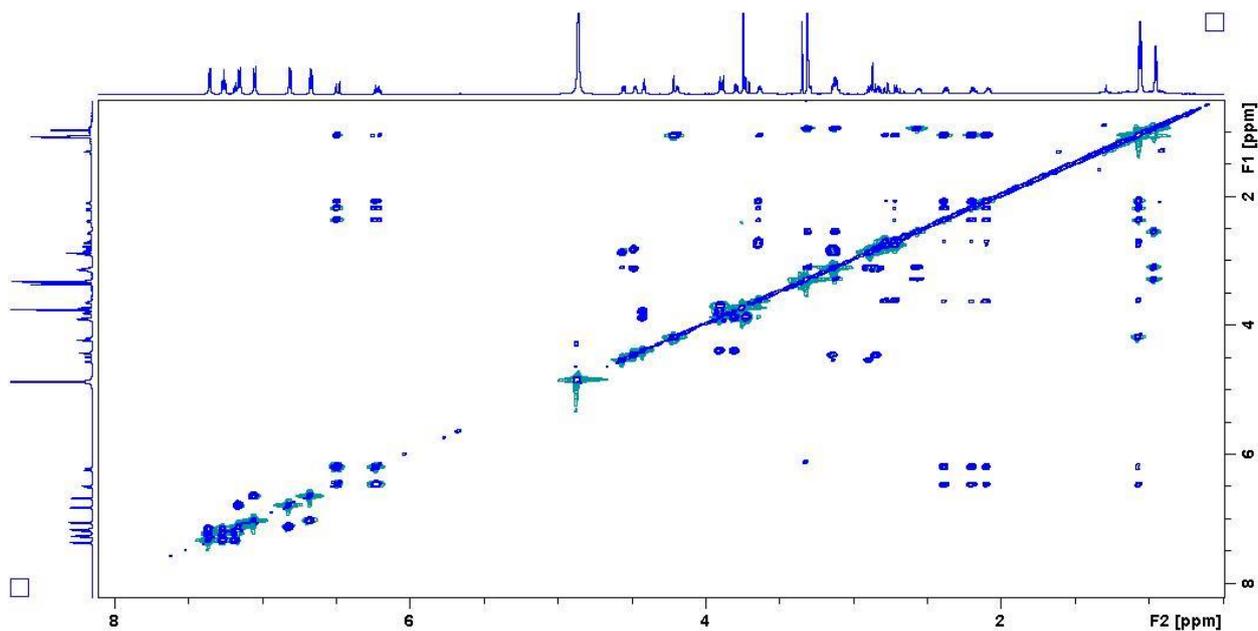


Abbildung 5-11: 2D-TOCSY-Spektrum von Thaxteramid A.

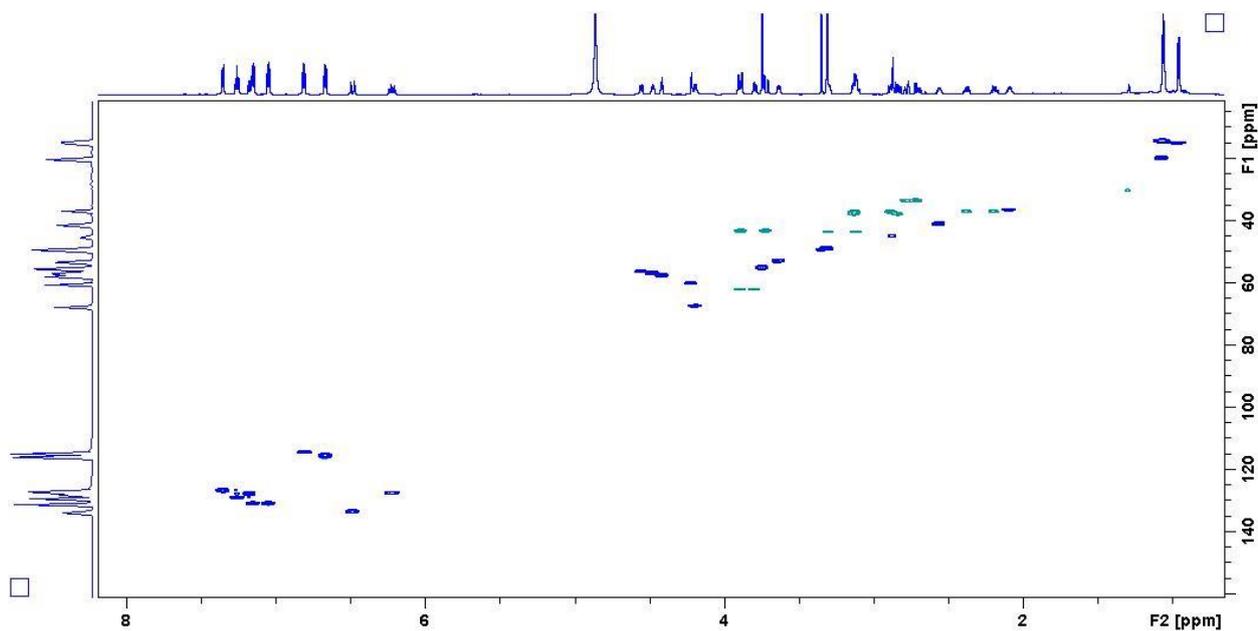


Abbildung 5-12: HSQC-Spektrum von Thaxteramid A.

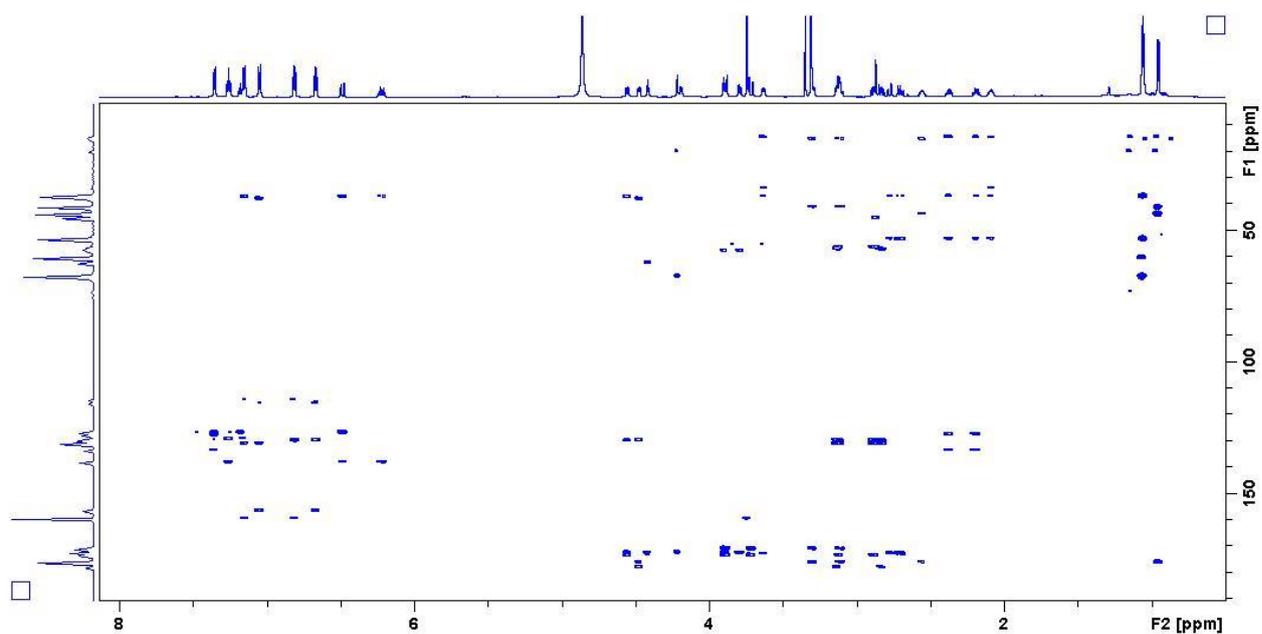


Abbildung 5-13: HMBC-Spektrum von Thaxteramid A.

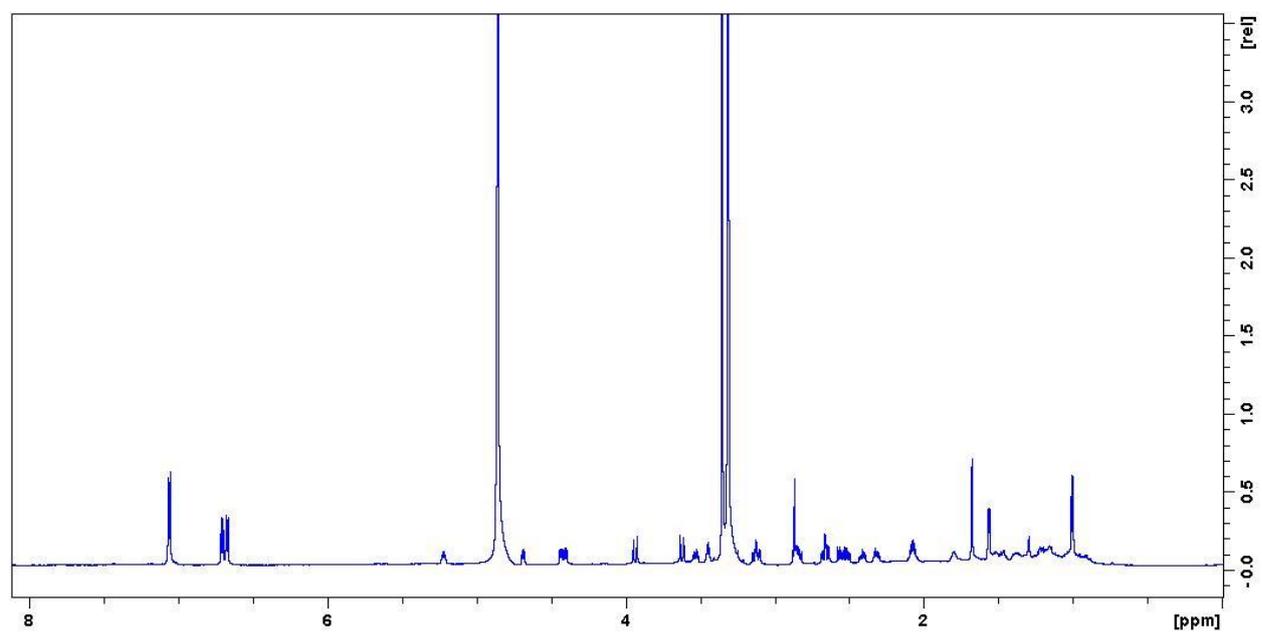


Abbildung 5-14: ^1H -NMR-Spektrum von Thaxteramid C.

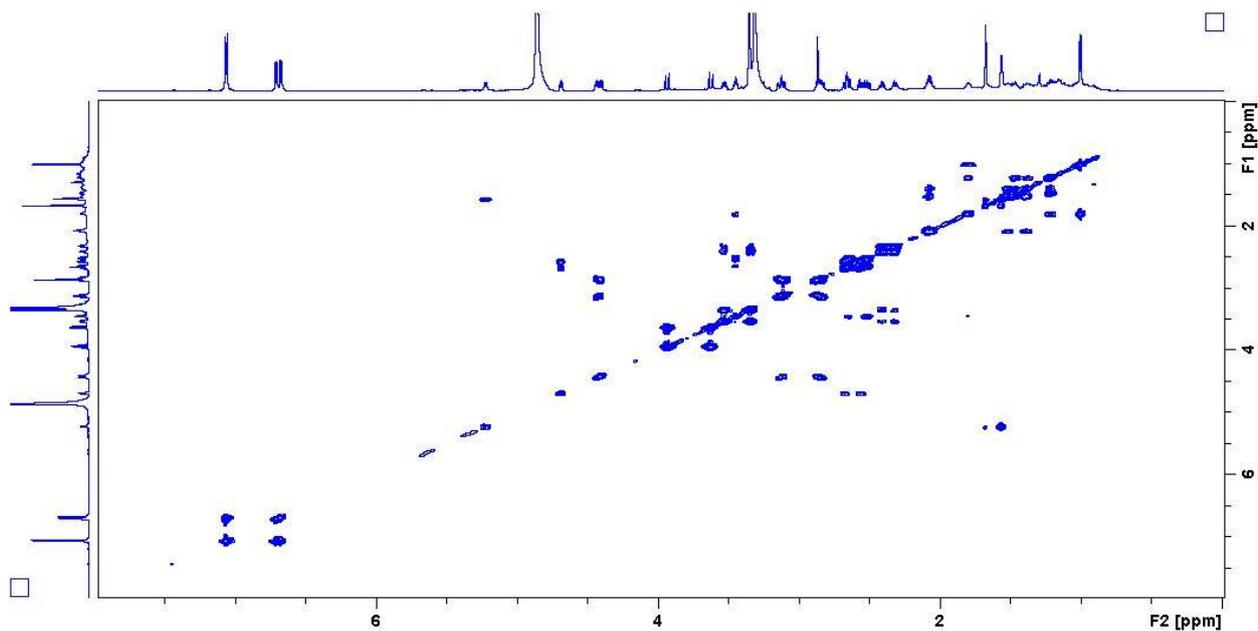


Abbildung 5-15: ^1H , ^1H -COSY-Spektrum von Thaxteramid C.

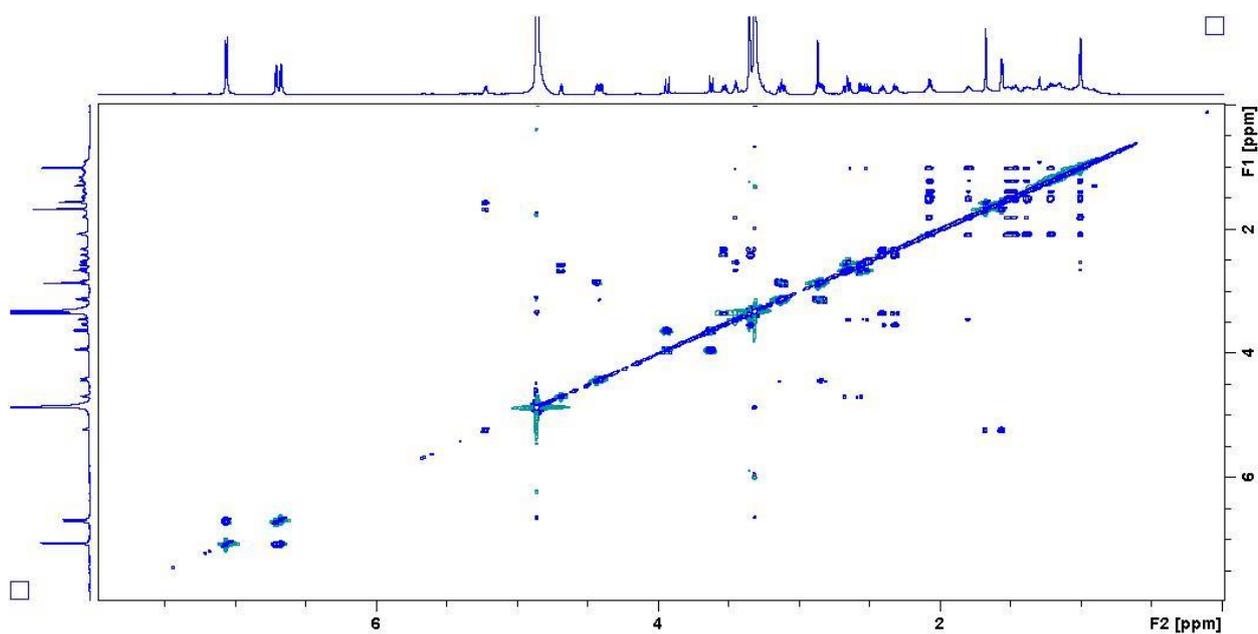


Abbildung 5-16: 2D-TOCSY-Spektrum von Thaxteramid C.

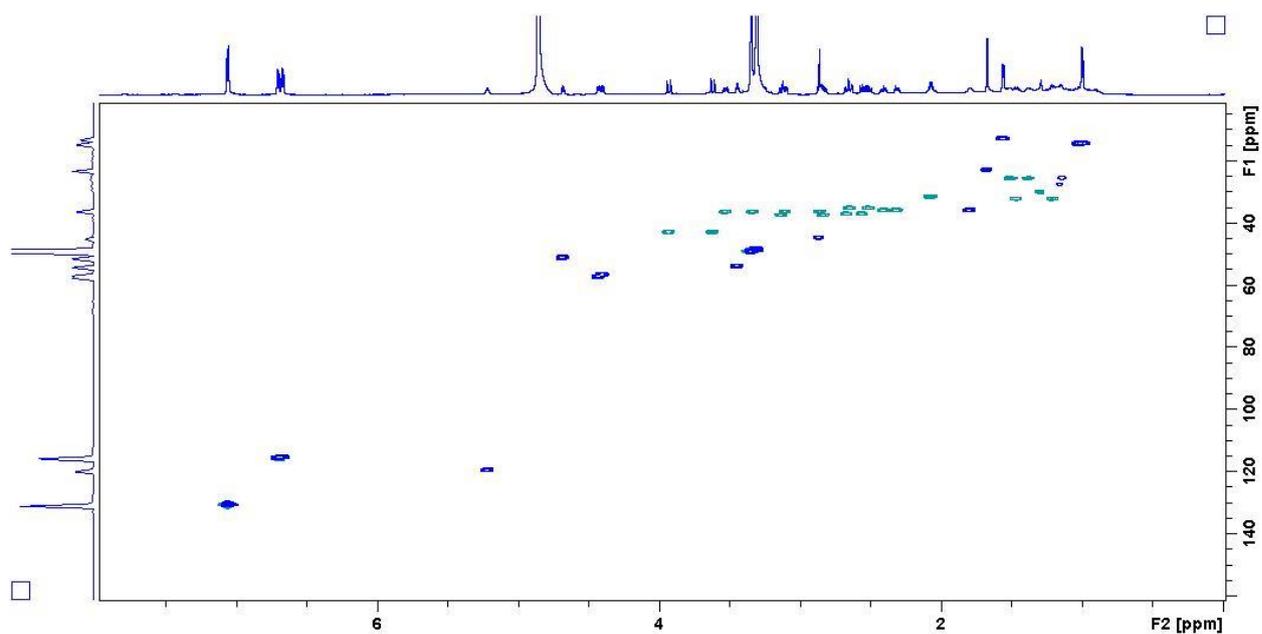


Abbildung 5-17: HSQC-Spektrum von Thaxteramid C.

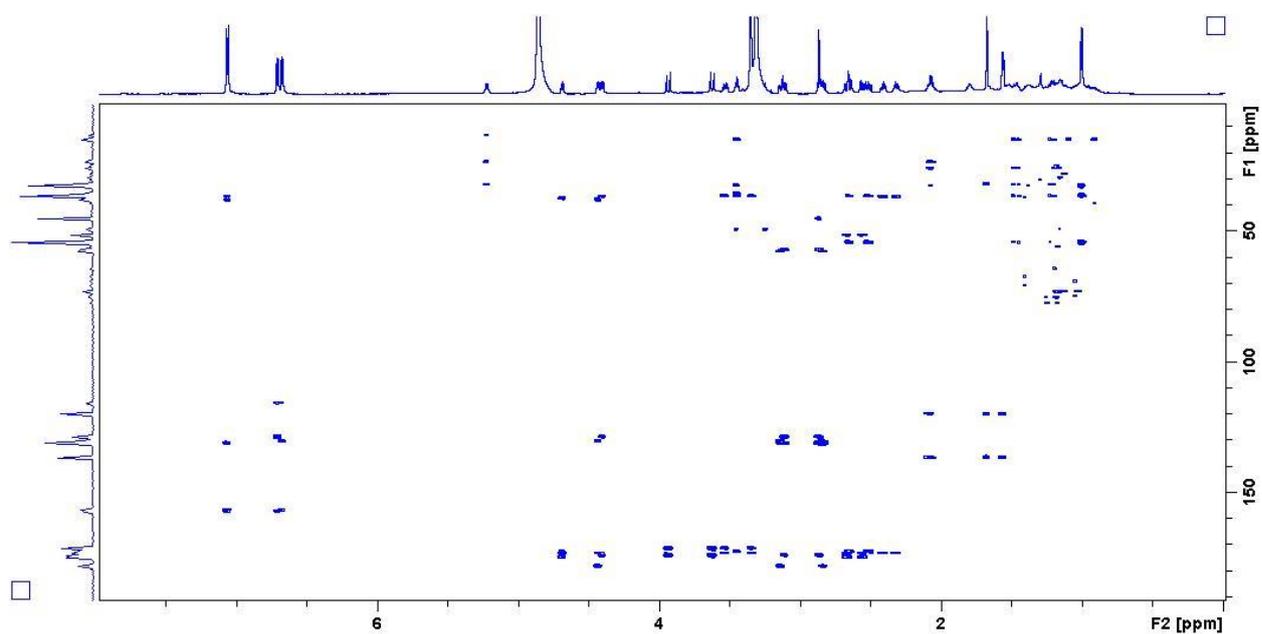


Abbildung 5-18: HMBC-Spektrum von Thaxteramid C.

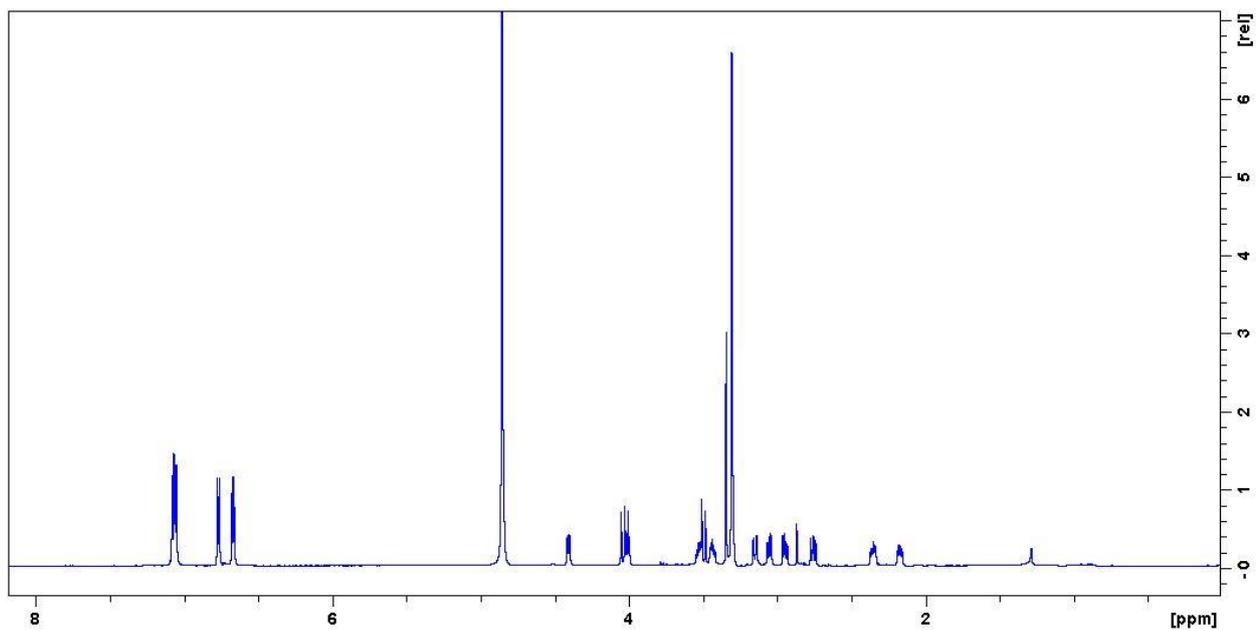


Abbildung 5-19: ^1H -NMR-Spektrum von Thaxteramid D.

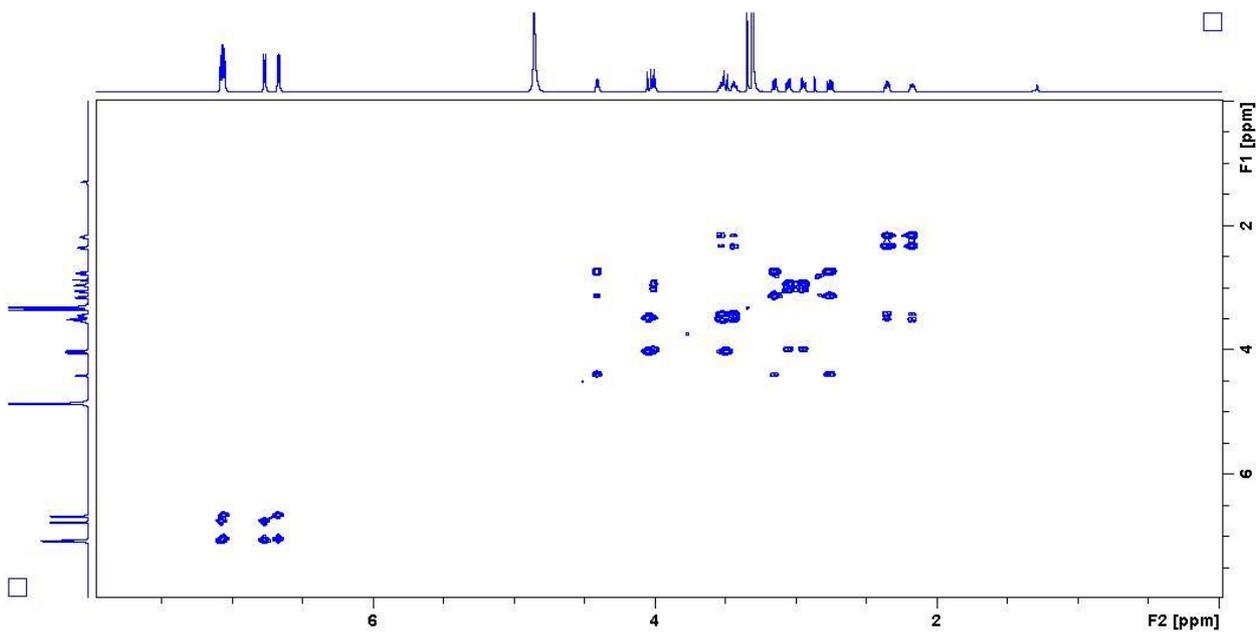


Abbildung 5-20: $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY-Spektrum von Thaxteramid D.

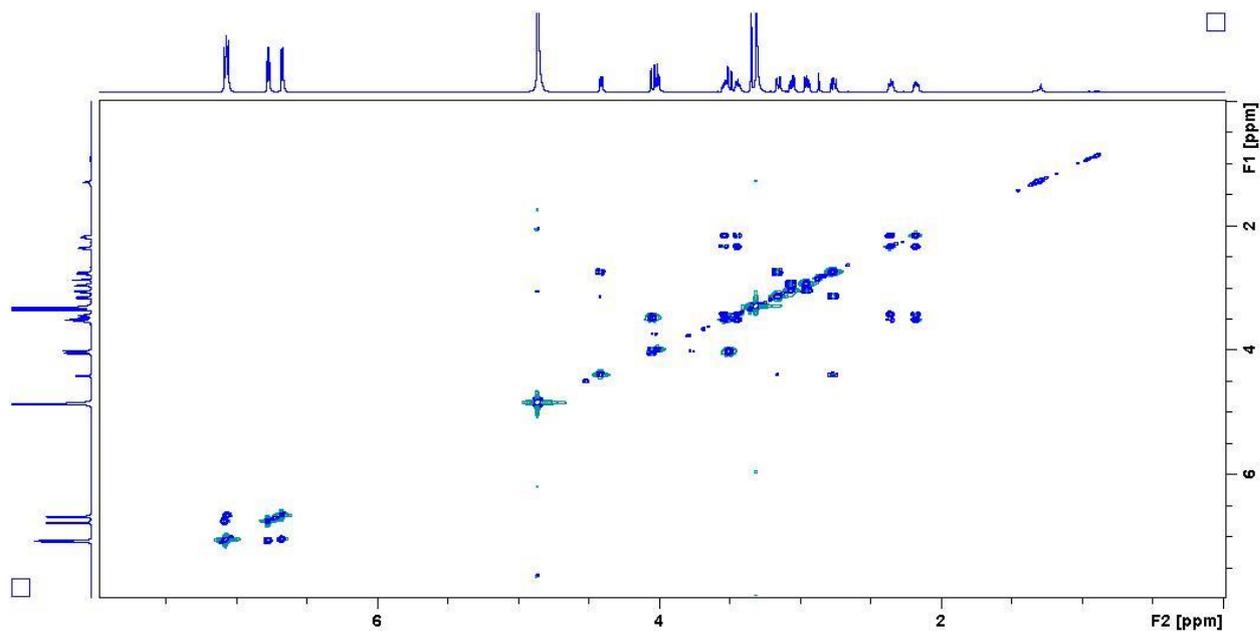


Abbildung 5-21: 2D-TOCSY-Spektrum von Thaxteramid D.

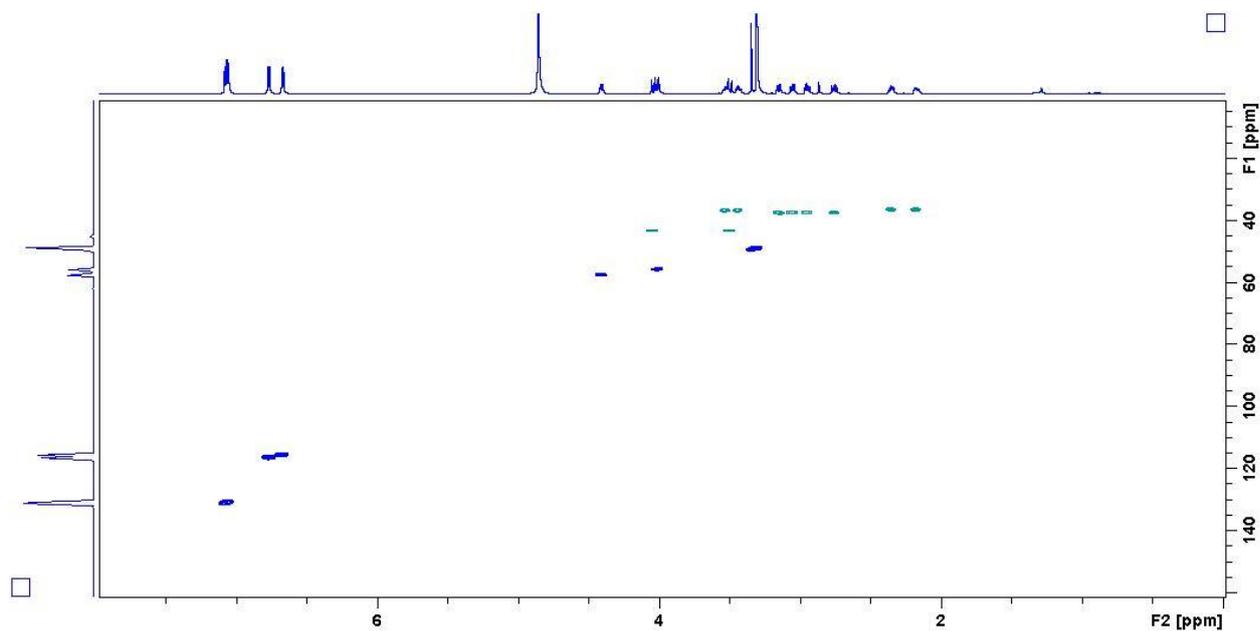


Abbildung 5-22: HSQC-Spektrum von Thaxteramid D.

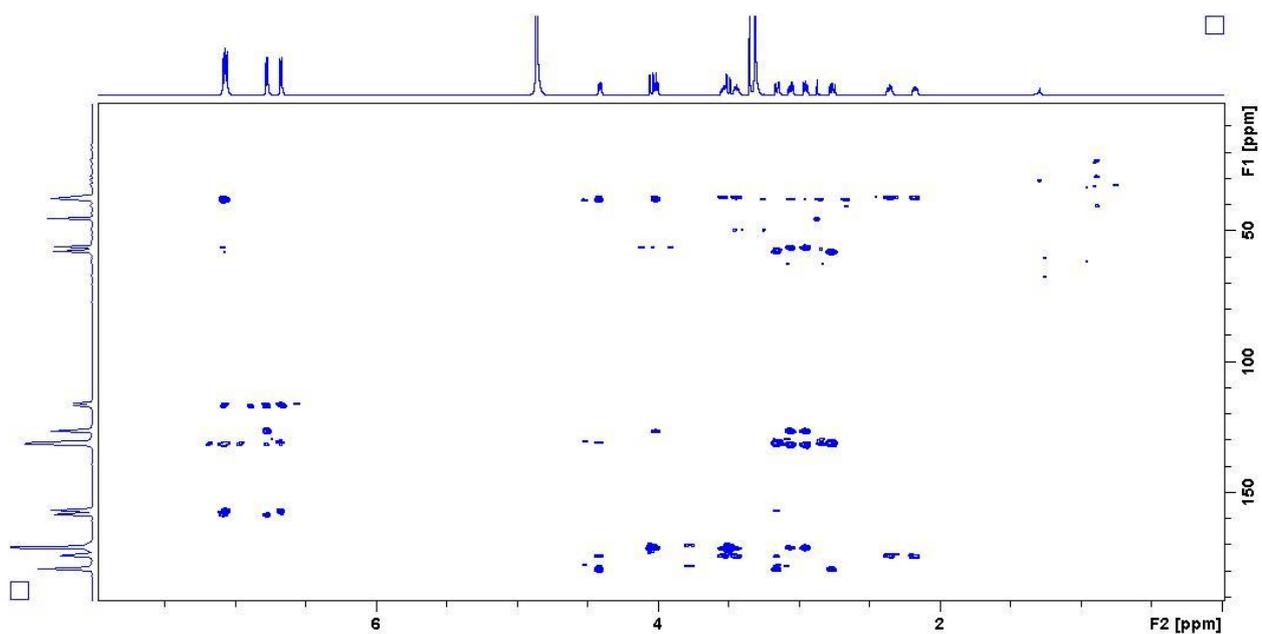


Abbildung 5-23: HMBC-Spektrum von Thaxteramid D.

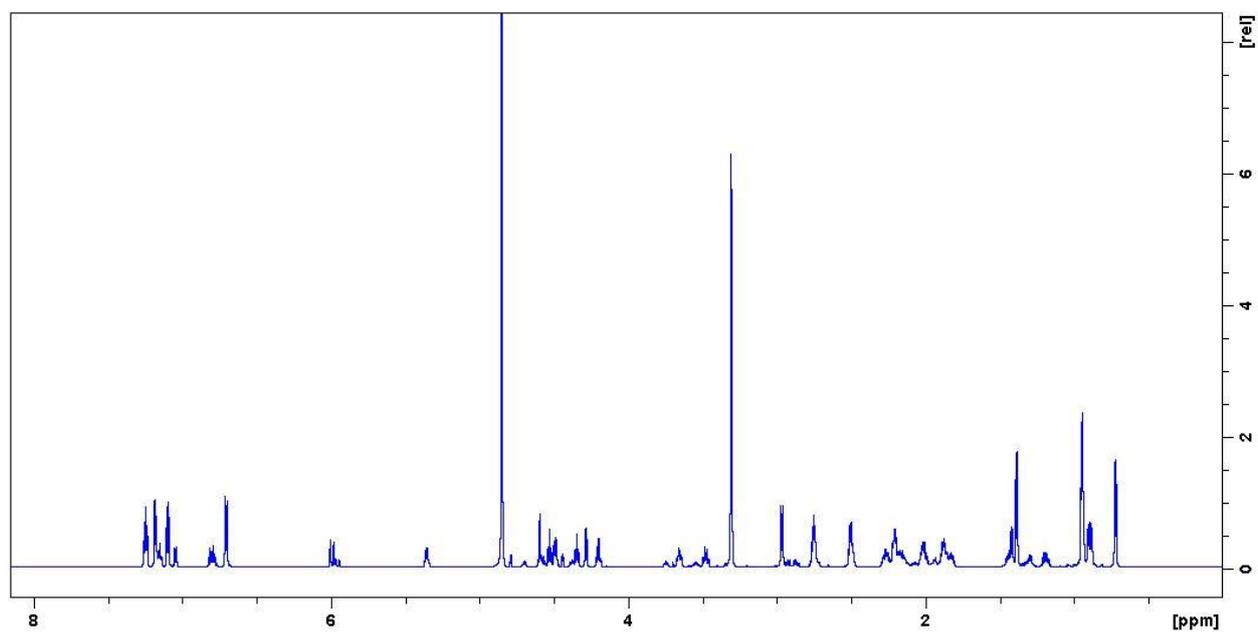


Abbildung 5-24: ^1H -NMR-Spektrum von Chondrodepsid A.

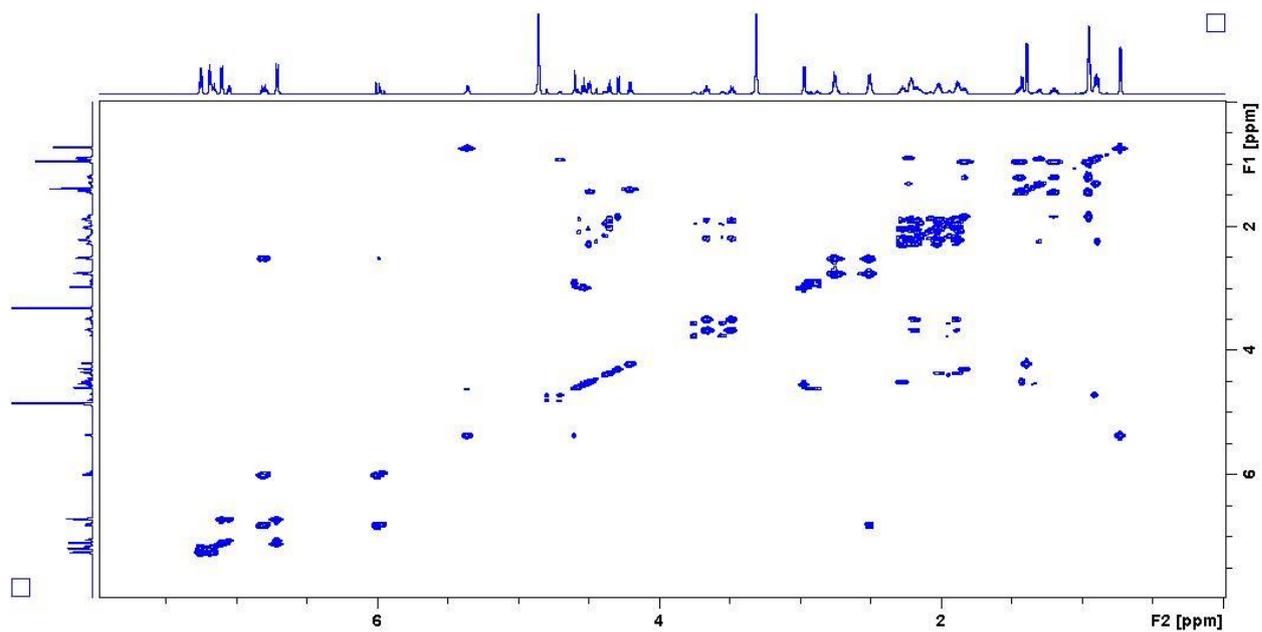


Abbildung 5-25: ^1H , ^1H -COSY-Spektrum von Chondrodepsid A.

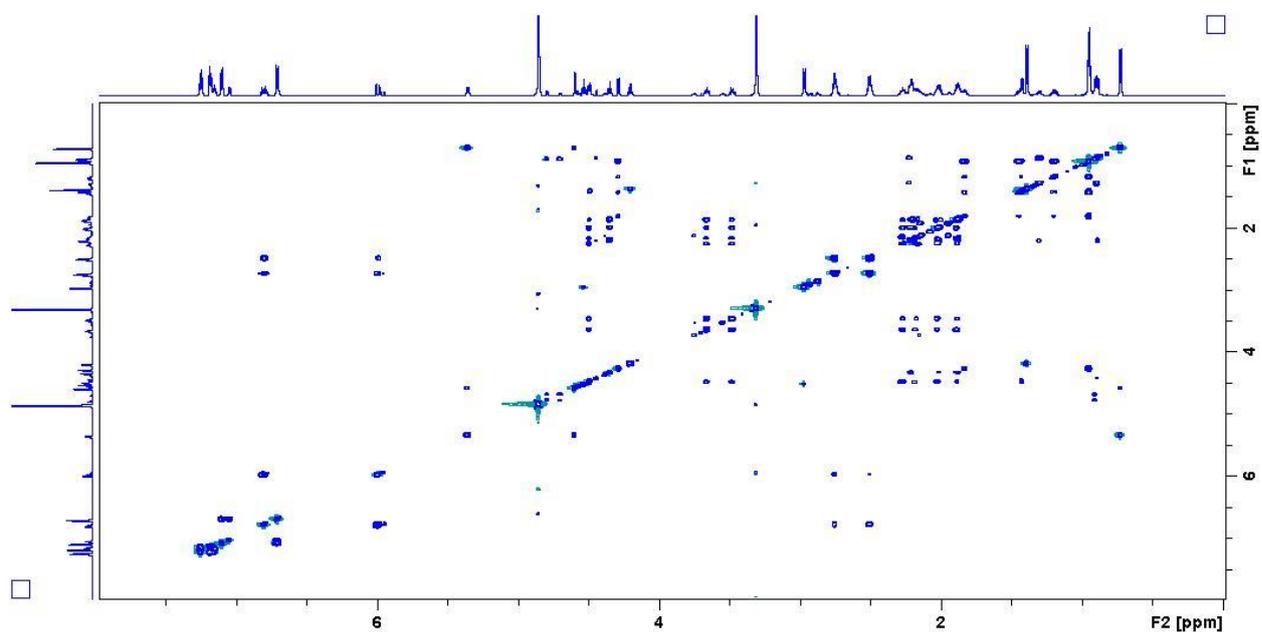


Abbildung 5-26: 2D-TOCSY-Spektrum von Chondrodepsid A.

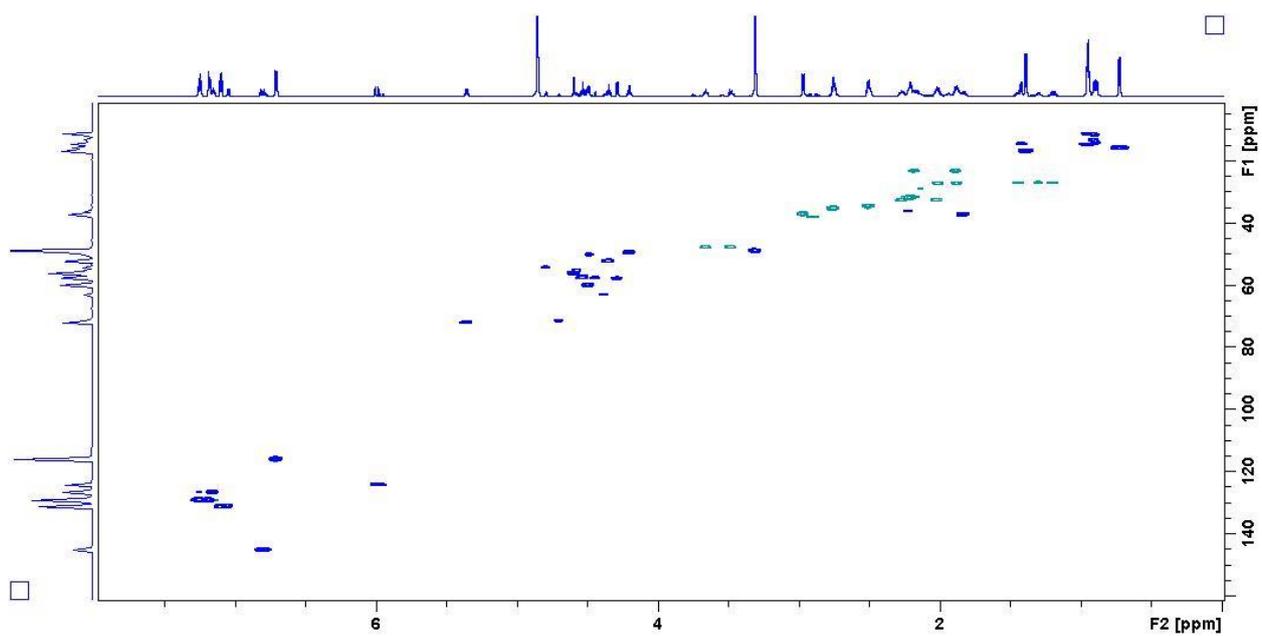


Abbildung 5-27: HSQC-Spektrum von Chondrodepsid A.

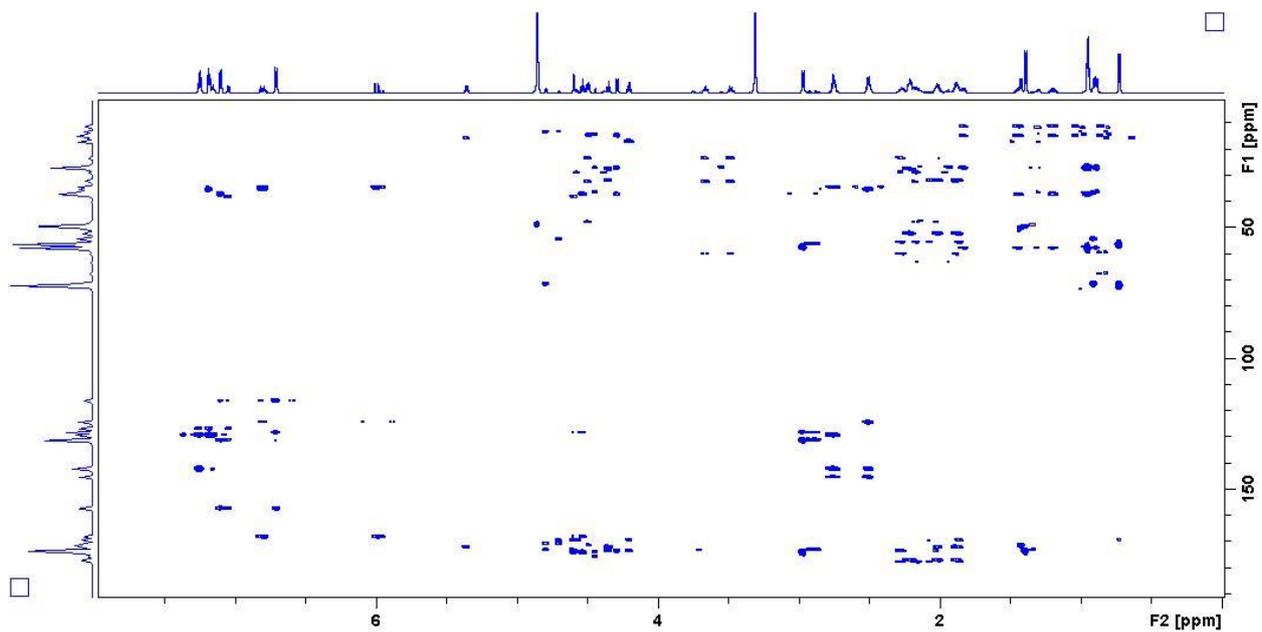


Abbildung 5-28: HMBC-Spektrum von Chondrodepsid A.

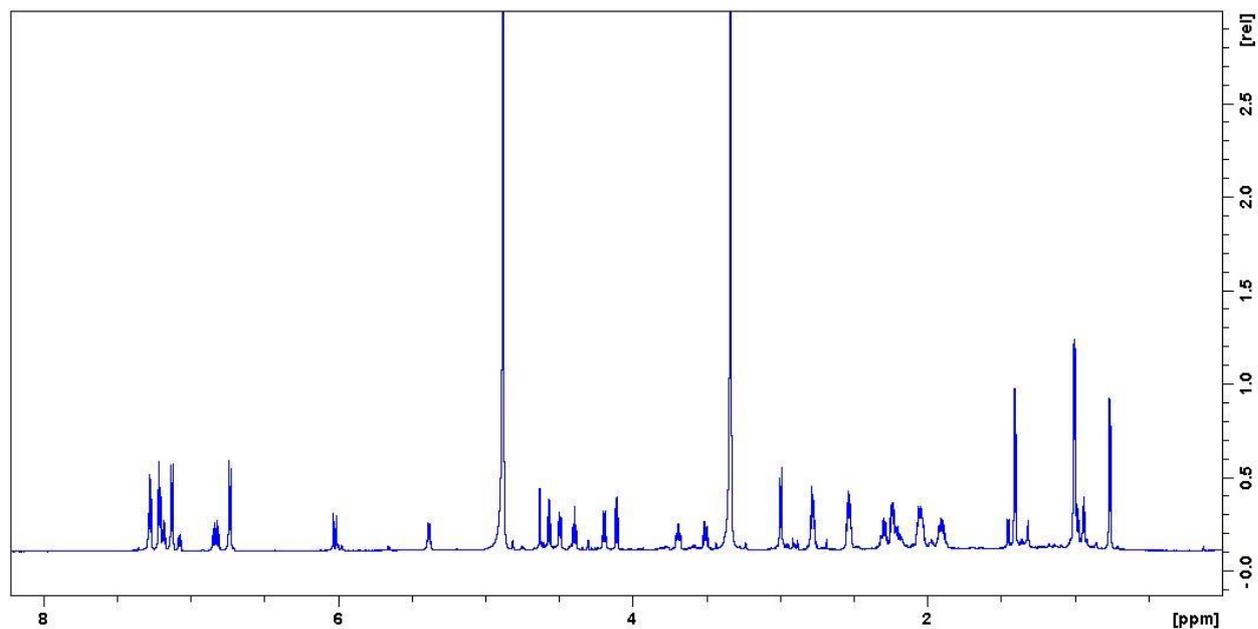


Abbildung 5-29: ^1H -NMR-Spektrum von Chondrodepsid B.

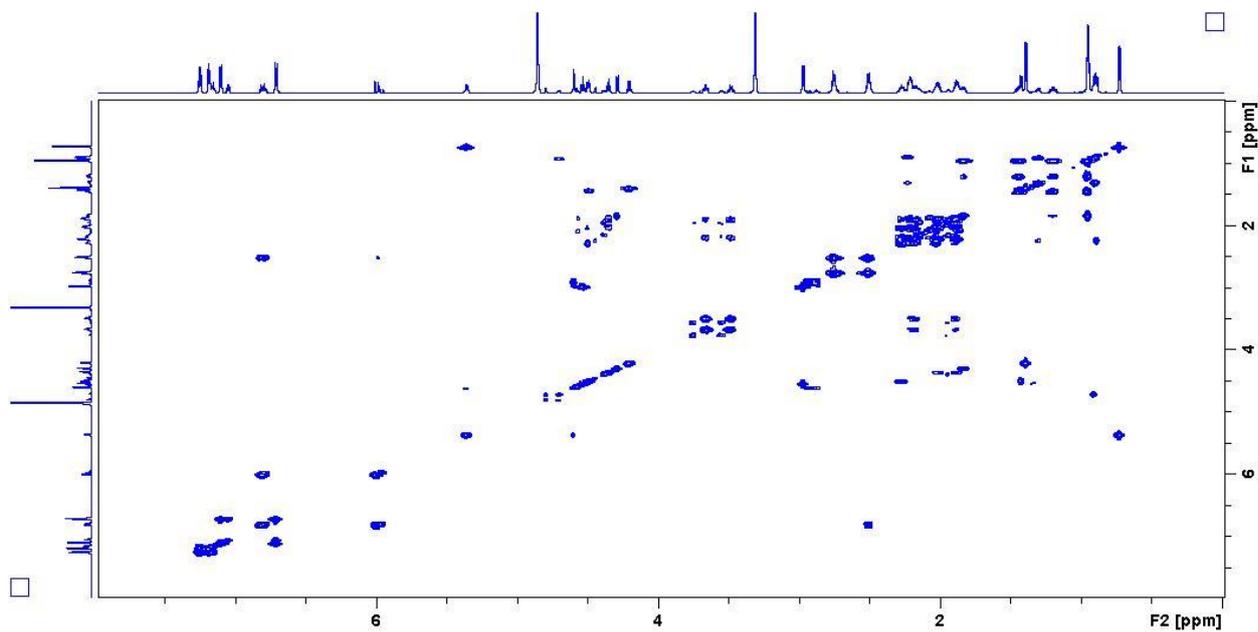


Abbildung 5-30: $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY-Spektrum von Chondrodepsid B.

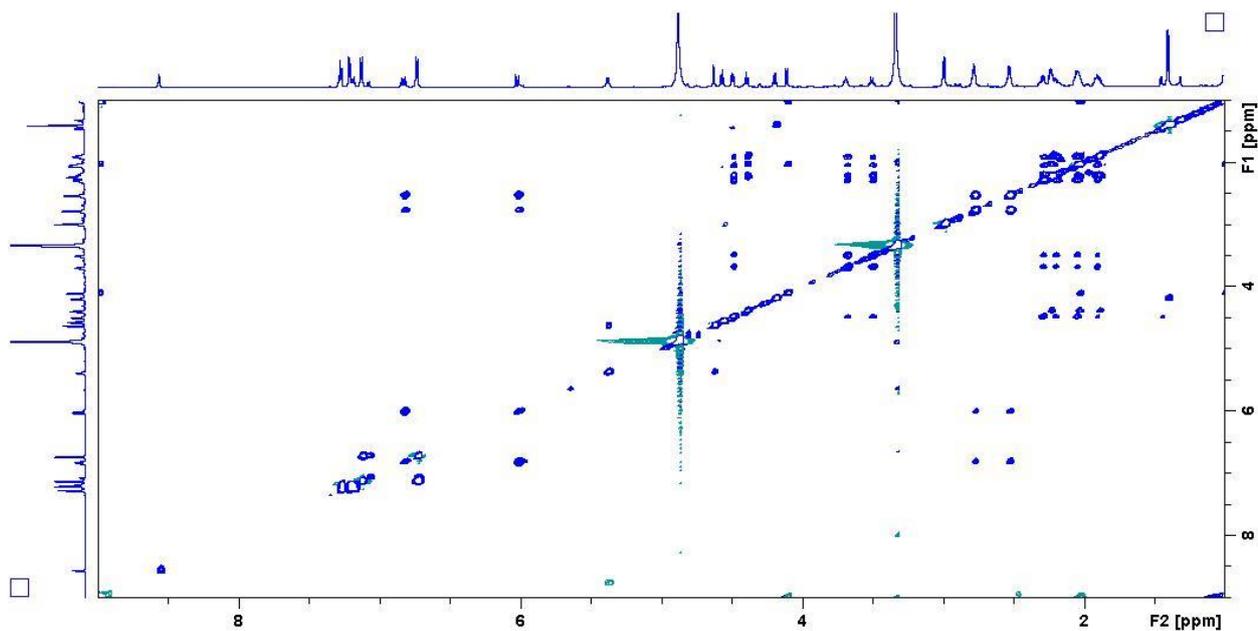


Abbildung 5-31: 2D-TOCSY-Spektrum von Chondrodepsid B.

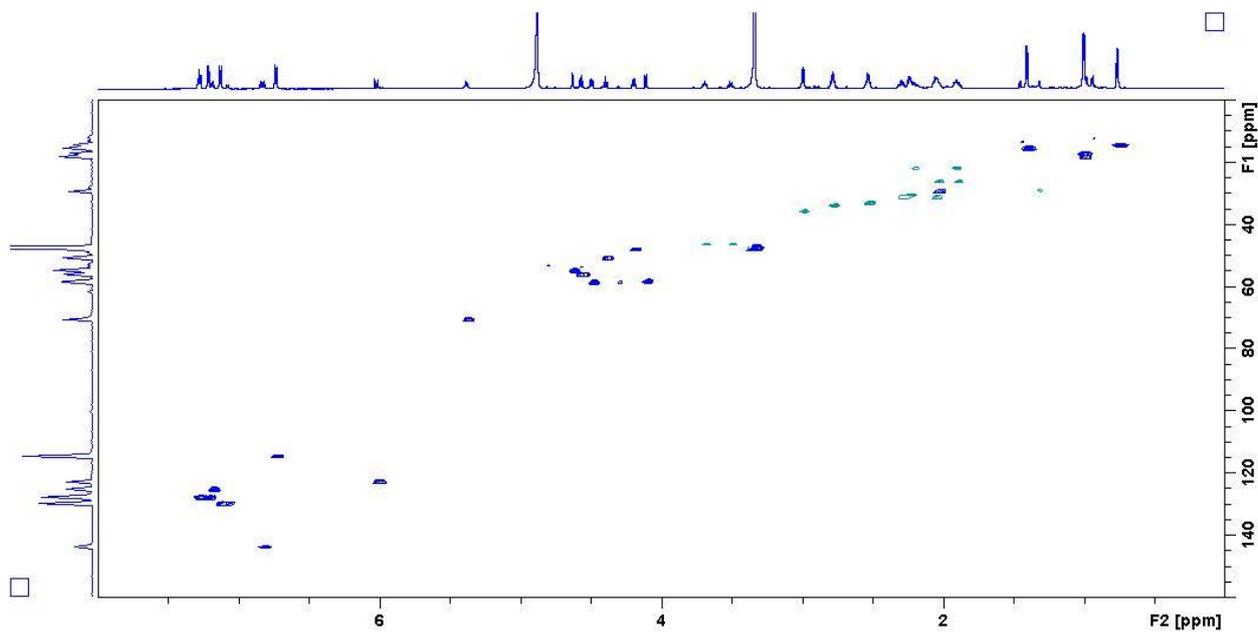


Abbildung 5-32: HSQC-Spektrum von Chondrodepsid B.

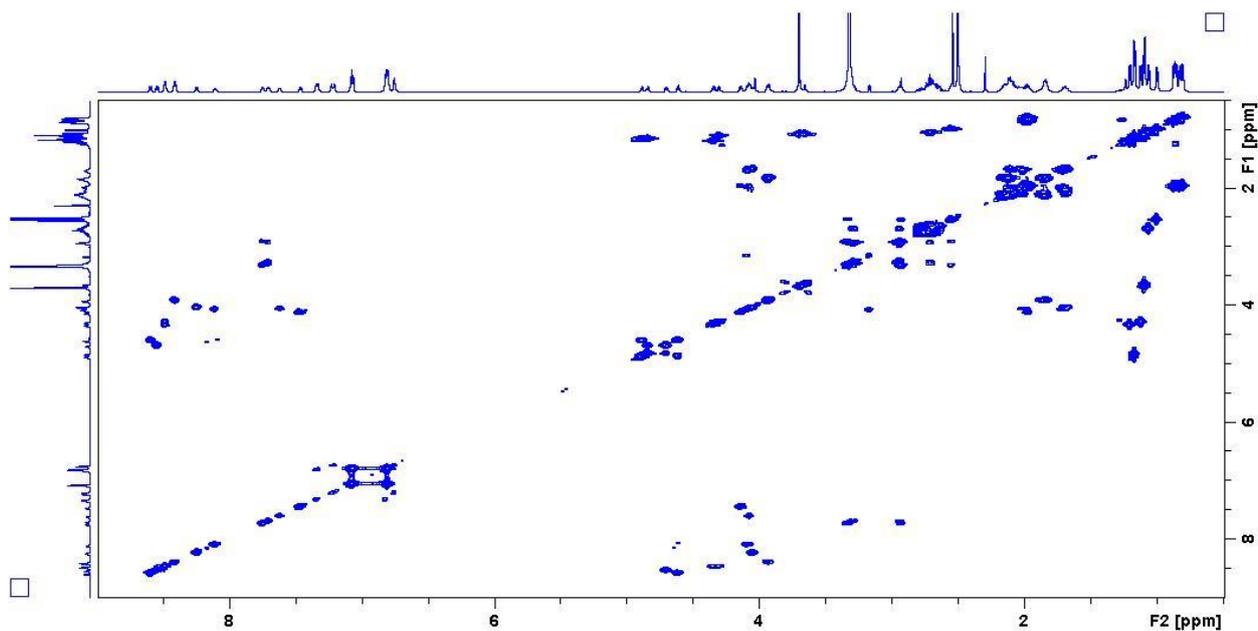


Abbildung 5-35: ^1H , ^1H -COSY-Spektrum von Chondrosarin B.

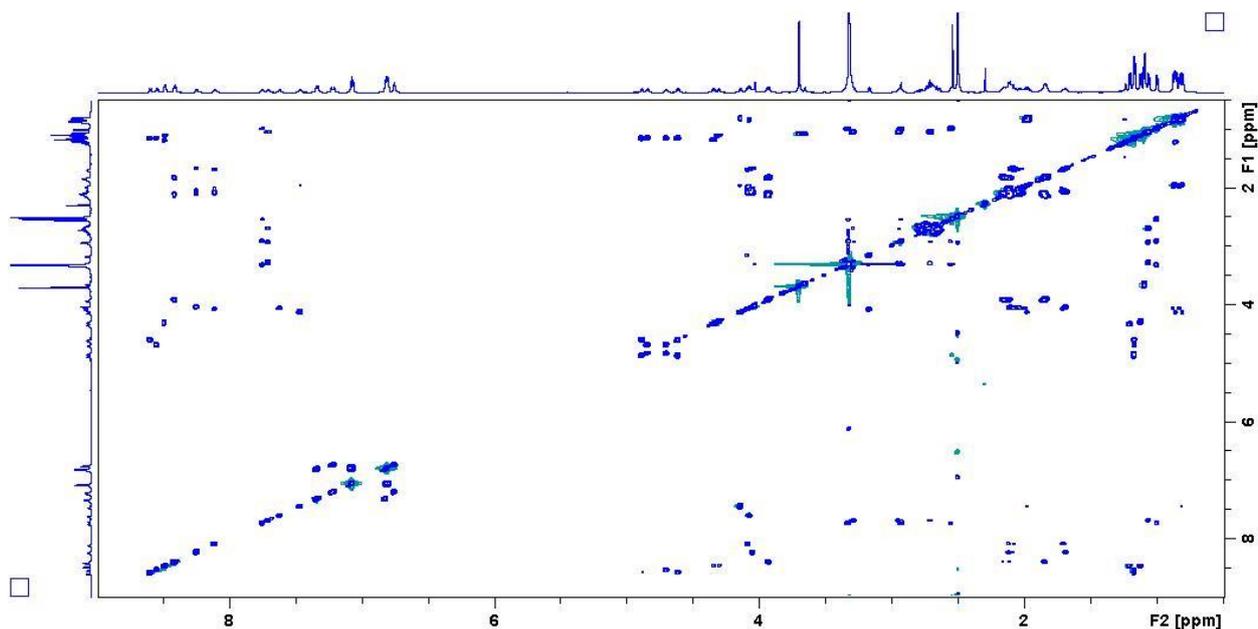


Abbildung 5-36: 2D-TOCSY-Spektrum von Chondrosarin B.

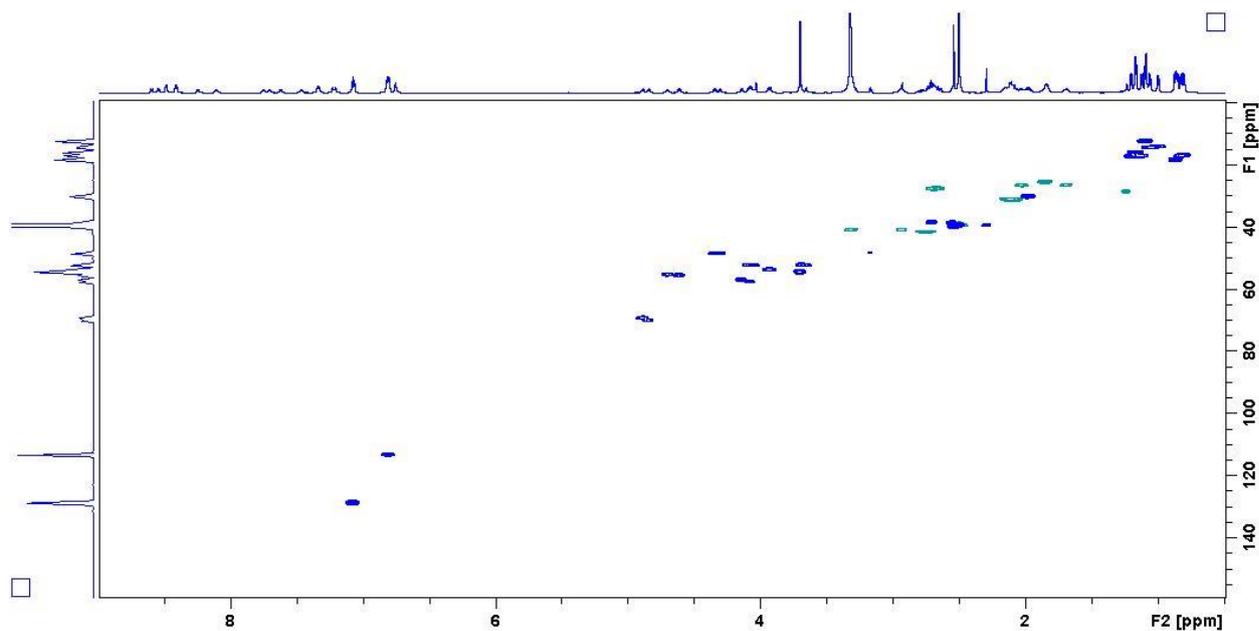


Abbildung 5-37: HSQC-Spektrum von Chondrosarid B.

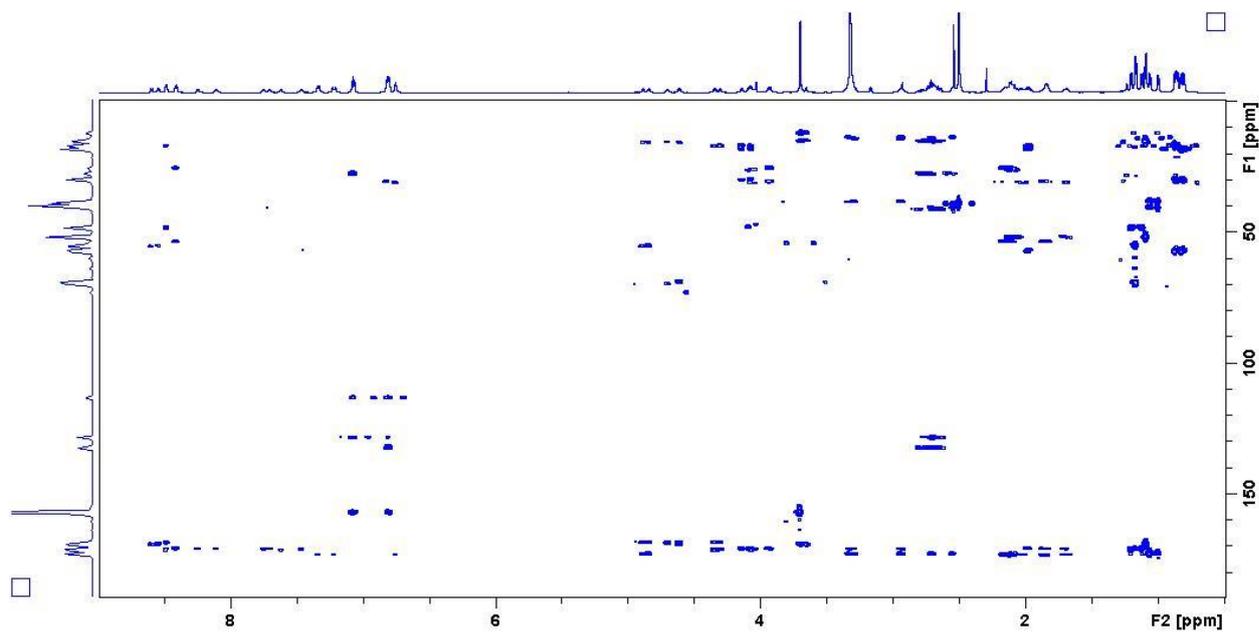


Abbildung 5-38: HMBC-Spektrum von Chondrosarid B.

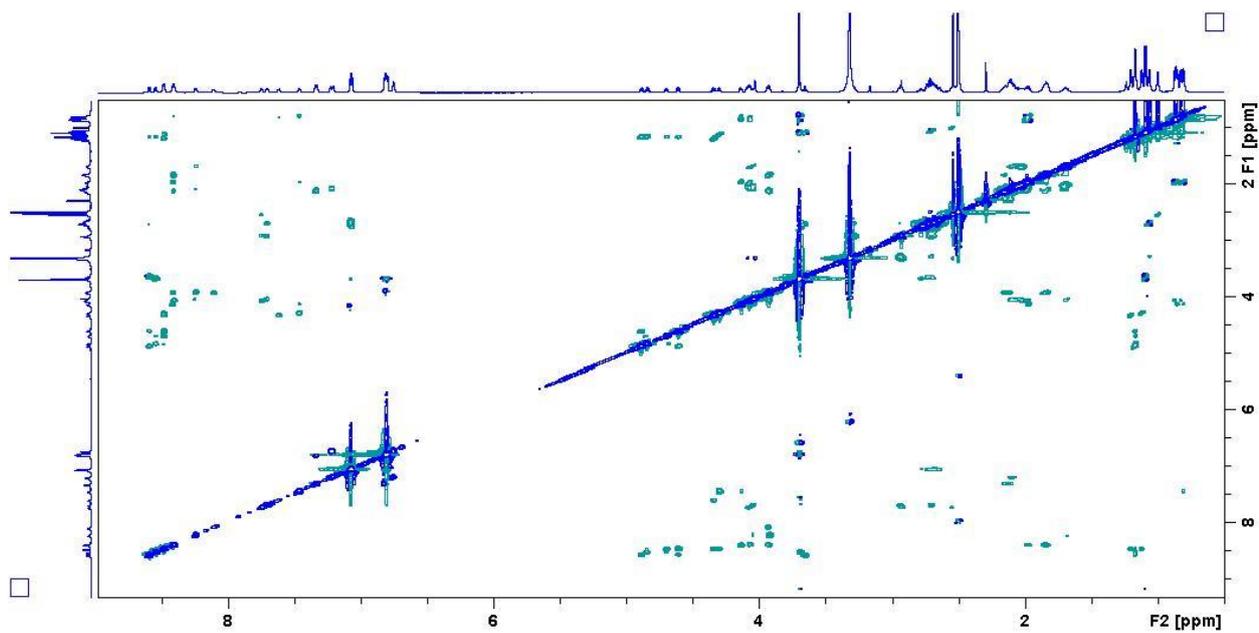


Abbildung 5-39: ROESY-Spektrum von Chondrosarid B.

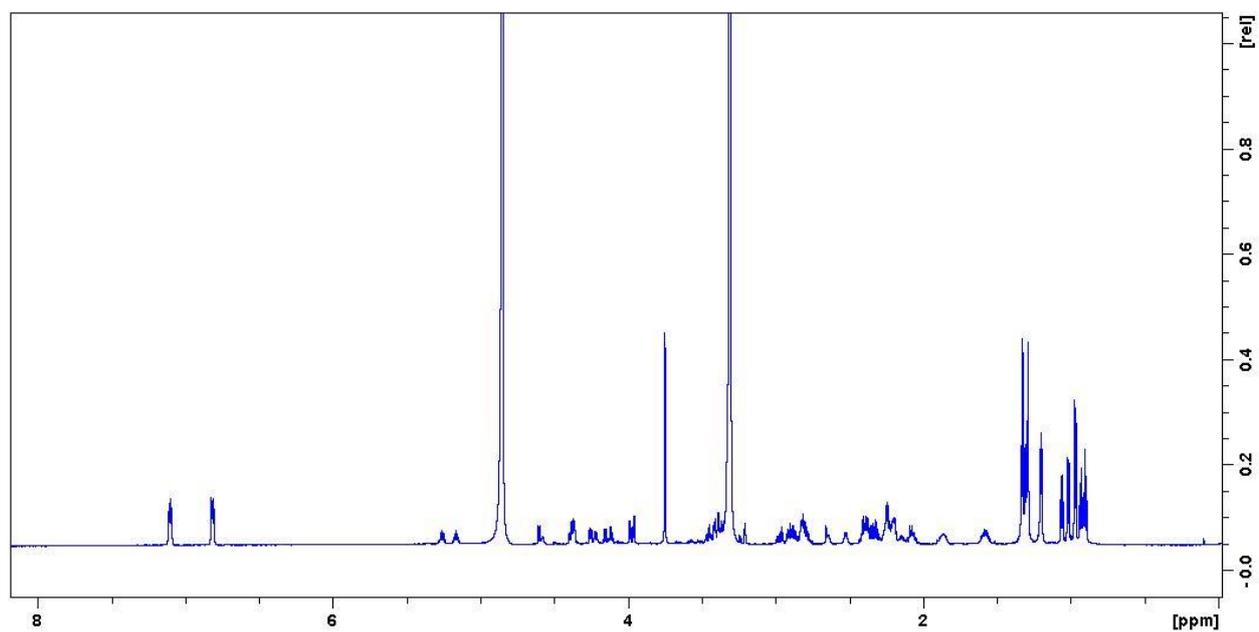


Abbildung 5-40: ¹H-NMR-Spektrum von Chondrosarid A.

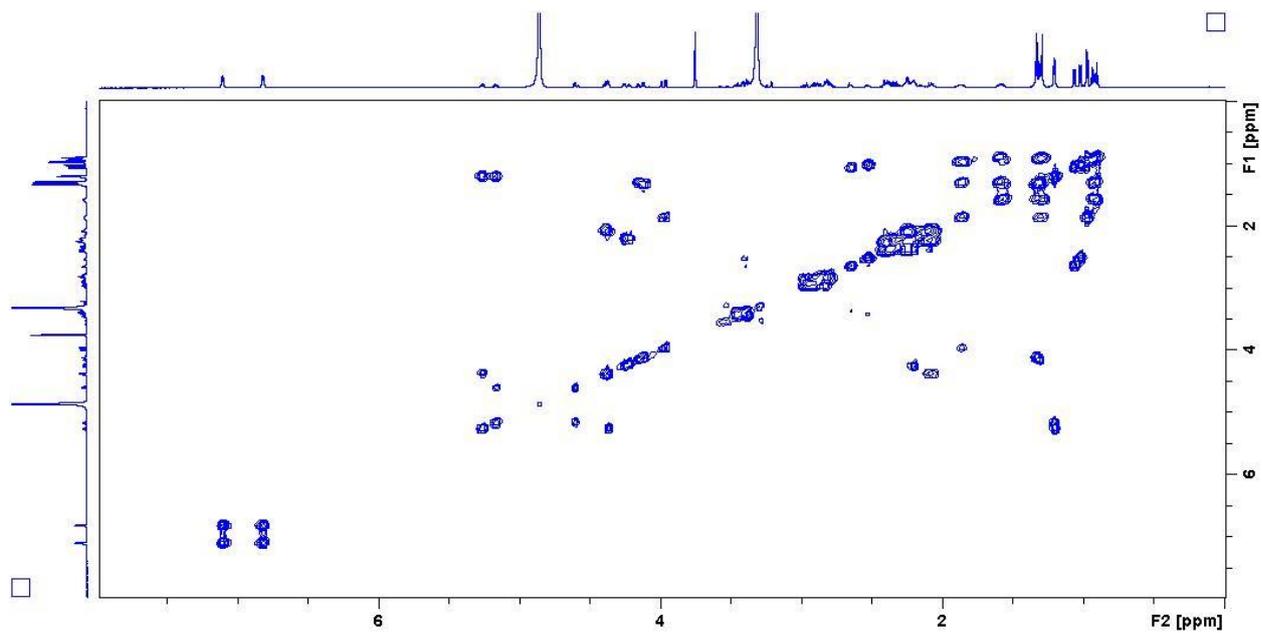


Abbildung 5-41: $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY-Spektrum von Chondrosarid A.

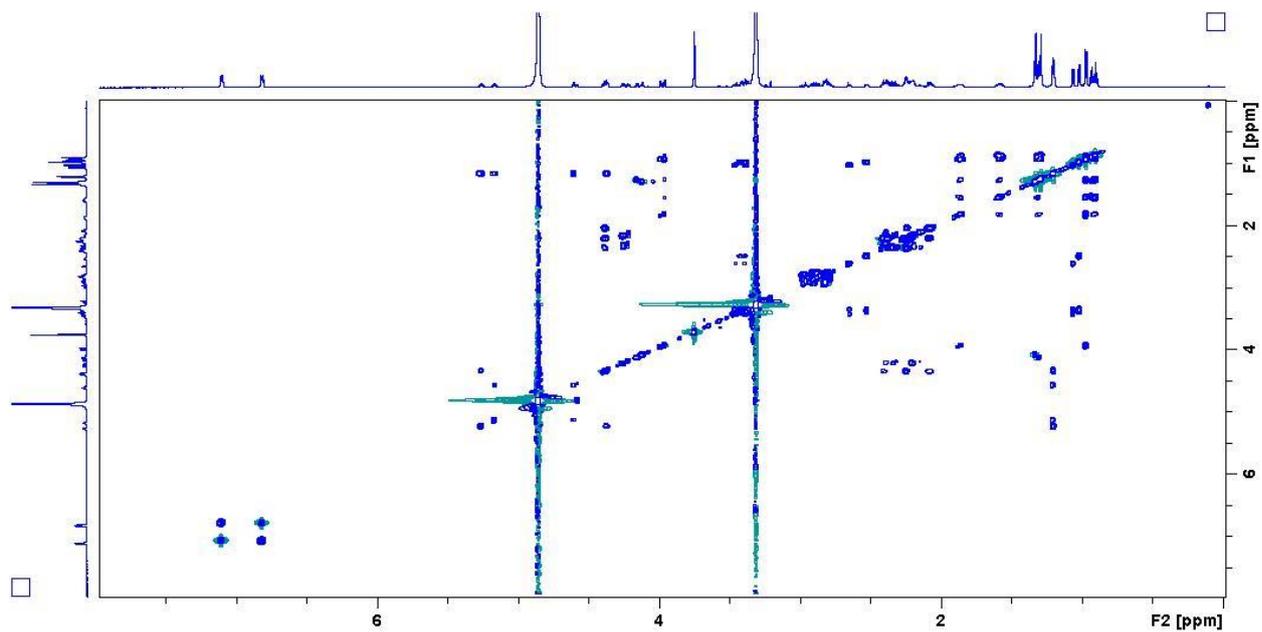


Abbildung 5-42: 2D-TOCSY-Spektrum von Chondrosarid A.

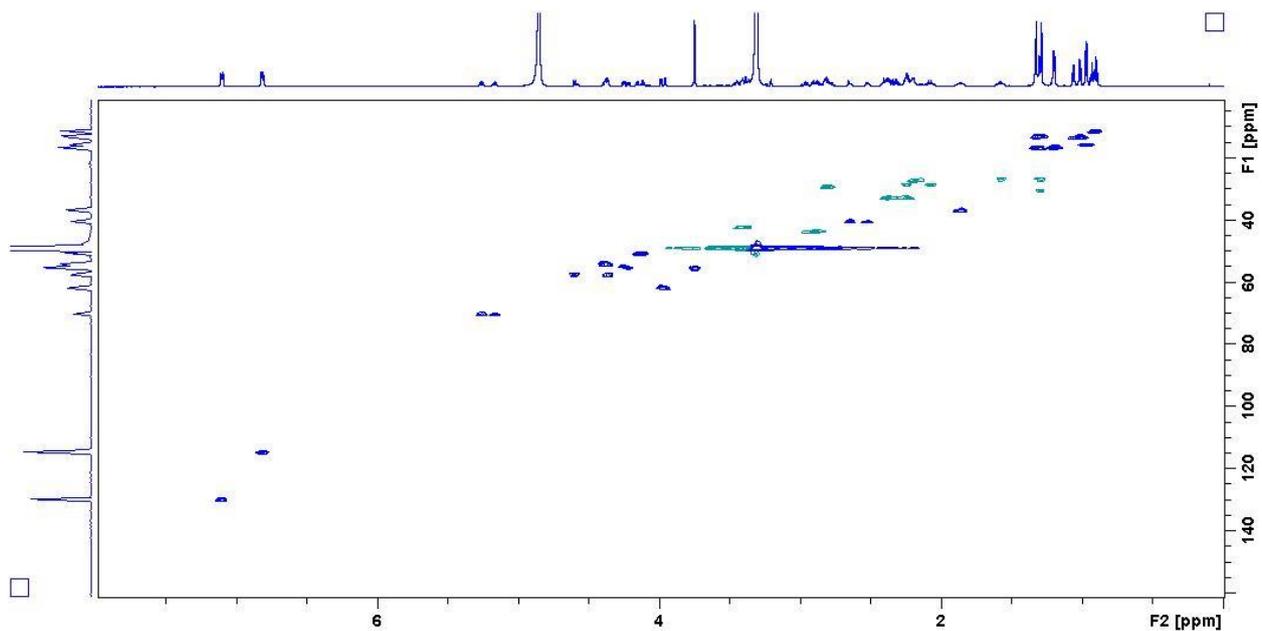


Abbildung 5-43: HSQC-Spektrum von Chondrosarid A.

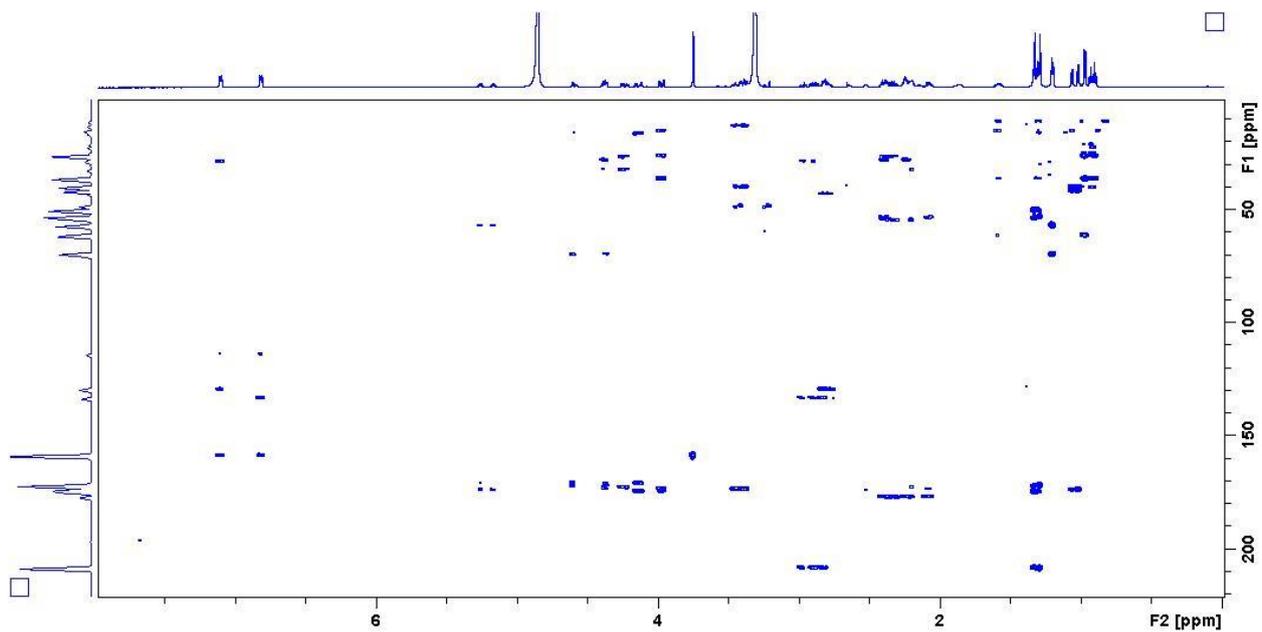


Abbildung 5-44: HMBC-Spektrum von Chondrosarid A.

6. Referenzen

1. Thaxter, R. On a Myxobacteriaceae, a new order of Schizomycetes. *Botanical Gazette* **1892**, *17*, 389-406.
2. Link, H. F. Observationes in ordinibus plantarum naturales. Dissertatio I. *Magazin der Gesellschaft Naturforschender Freunde Berlin* **1809**, *3*, 3-42.
3. Reichenbach, H. The ecology of the myxobacteria. *Environ. Microbiol.* **1999**, *1* (1), 15-21.
4. Dworkin, M. Biology of the myxobacteria. *Annu Rev Microbiol* **1966**, *20*, 75-106.
5. Reichenbach, H.; Dworkin, M. The Myxobacteria. In *The Prokaryotes*, 2nd ed. ed.; Balows, A., Trüper, H. G., Dworkin, M., Harder, W., Schleifer, K. H., Eds.; Springer-Verlag: New York, 1992; pp 3416-3487.
6. Reichenbach, H. Order VIII. Myxococcales. Tchan, Pochon and Pre'vot 1948, 398AL. In *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 2nd, vol. 2, part C ed.; Brenner, D. J., Krieg, N. R., Staley, J. T., Eds.; Springer: 2005; pp 1059-1144.
7. Shimkets, L.; Dworkin, M.; Reichenbach, H. The Myxobacteria. In *The Prokaryotes*, 3 ed.; Dworkin, M., Ed.; Springer: Berlin, 2006; pp 31-115.
8. Dawid, W. Biology and global distribution of myxobacteria in soils. *FEMS Microbiol. Rev.* **2000**, *24*, 403-427.
9. Garcia, R.; Gerth, K.; Stadler, M.; Dogma Jr., I. J.; Müller, R. Expanded phylogeny of myxobacteria and evidence for cultivation of the 'unculturable'. *Mol. Phylogenet. Evol.* **2010**, *57* (2), 878-887.
10. Bode, H. B.; Müller, R. Analysis of myxobacterial secondary metabolism goes molecular. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2006**, *33* (7), 577-588.
11. Gerth, K.; Pradella, S.; Perlova, O.; Beyer, S.; Müller, R. Myxobacteria: proficient producers of novel natural products with various biological activities - past and future biotechnological aspects with the focus on the genus *Sorangium*. *J. Biotechnol.* **2003**, *106*, 233-253.
12. Kaiser, D. Coupling cell movement to multicellular development in myxobacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* **2003**, *1* (1), 45-54.
13. Nan, B.; Zusman, D. R. Uncovering the mystery of gliding motility in the myxobacteria. *Annu Rev Genet* **2011**, *45*, 21-39.
14. Zusman, D. R.; Scott, A. E.; Yang, Z.; Kirby, J. R. Chemosensory pathways, motility and development in *Myxococcus xanthus*. *Nat. Rev. Microbiol.* **2007**, *5* (11), 862-872.
15. Kaiser, D. A microbial genetic journey. *Annu Rev Microbiol* **2006**, *60*, 1-25.
16. Kaiser, D.; Robinson, M.; Kroos, L. Myxobacteria, polarity, and multicellular morphogenesis. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2010**, *2* (8), 1-26.
17. Kearns, D. B.; Shimkets, L. J. Lipid chemotaxis and signal transduction in *Myxococcus xanthus*. *Trends Microbiol* **2001**, *9* (3), 126-129.
18. Mauriello, E. M. F.; Zusman, D. R. Polarity of motility systems in *Myxococcus xanthus*. *Curr. Opin. Microbiol.* **2007**, *10* (6), 624-629.
19. Dworkin, M. Recent advances in the social and developmental biology of the myxobacteria. *Microbiol Rev* **1996**, *60* (1), 70-102.

20. Wireman, J. W.; Dworkin, M. Developmentally induced autolysis during fruiting body formation by *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **1977**, *129* (2), 796-802.
21. Wenzel, S. C.; Müller, R. The impact of genomics on the exploitation of the myxobacterial secondary metabolome. *Nat. Prod. Rep.* **2009**, *26* (11), 1385-1407.
22. Foster, K. R. Sociobiology: the phoenix effect. *Nature* **2006**, *441*, 291-292.
23. Kaiser, D. Signaling in myxobacteria. *Annual Review of Microbiology* **2004**, *58*, 75-98.
24. Stephens, K.; Hegeman, G. D.; White, D. Pheromone produced by the myxobacterium *Stigmatella aurantiaca*. *J. Bacteriol.* **1982**, *149* (2), 739-747.
25. Plaga, W.; Stamm, I.; Schairer, H. U. Intercellular signaling in *Stigmatella aurantiaca*: purification and characterization of stigmolone, a myxobacterial pheromone. *P. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95* (19), 11263-11267.
26. Meiser, P.; Bode, H. B.; Müller, R. The unique DKxanthene secondary metabolite family from the myxobacterium *Myxococcus xanthus* is required for developmental sporulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2006**, *103* (50), 19128-19133.
27. Reichenbach, H. Biology of the myxobacteria: ecology and taxonomy. In *Myxobacteria II*, Dworkin, M., Kaiser, D., Eds.; American Society for Microbiology: Washington DC, 1993; pp 13-62.
28. Goldman, B. S.; Nierman, W. C.; Kaiser, D.; Slater, S. C.; Durkin, A. S.; Eisen, J. A.; Ronning, C. M.; Barbazuk, W. B.; Blanchard, M.; Field, C.; Halling, C.; Hinkle, G.; Iartchuk, O.; Kim, H. S.; Mackenzie, C.; Madupu, R.; Miller, N.; Shvartsbeyn, A.; Sullivan, S. A.; Vaudin, M.; Wiegand, R.; Kaplan, H. B. Evolution of sensory complexity recorded in a myxobacterial genome. *P. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103* (41), 15200-15205.
29. Ronning, C. M.; Nierman, W. C. The genomes of *Myxococcus xanthus* and *Stigmatella aurantiaca*. In *Myxobacteria: Multicellularity and differentiation*, Whitworth, D., Ed.; ASM Press: Chicago, 2007; pp 285-298.
30. Schneiker, S.; Perlova, O.; Kaiser, O.; Gerth, K.; Alici, A.; Altmeyer, M. O.; Bartels, D.; Bekel, T.; Beyer, S.; Bode, E.; Bode, H. B.; Bolten, C. J.; Choudhuri, J. V.; Doss, S.; Elnakady, Y. A.; Frank, B.; Gaigalat, L.; Goesmann, A.; Groeger, C.; Gross, F.; Jelsbak, L.; Jelsbak, L.; Kalinowski, J.; Kegler, C.; Knauber, T.; Konietzny, S.; Kopp, M.; Krause, L.; Krug, D.; Linke, B.; Mahmud, T.; Martinez-Arias, R.; McHardy, A. C.; Merai, M.; Meyer, F.; Mormann, S.; Munoz-Dorado, J.; Perez, J.; Pradella, S.; Rachid, S.; Raddatz, G.; Rosenau, F.; Rückert, C.; Sasse, F.; Scharfe, M.; Schuster, S. C.; Suen, G.; Treuner-Lange, A.; Velicer, G. J.; Vorhölter, F. J.; Weissman, K. J.; Welch, R. D.; Wenzel, S. C.; Whitworth, D. E.; Wilhelm, S.; Wittmann, C.; Blöcker, H.; Pühler, A.; Müller, R. Complete genome sequence of the myxobacterium *Sorangium cellulosum*. *Nat. Biotechnol.* **2007**, *25* (11), 1281-1289.
31. Weissman, K. J.; Müller, R. A brief tour of myxobacterial secondary metabolism. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 2121-2136.
32. Davies, J.; Spiegelman, G. B.; Yim, G. The world of subinhibitory antibiotic concentrations. *Curr. Opin. Microbiol.* **2006**, *9* (5), 445-453.
33. Yim, G.; Wang, H. H.; Davies, J. Antibiotics as signalling molecules. *Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol. Sci.* **2007**, *362* (1483), 1195-1200.
34. Hanzlik, P. J. 125Th anniversary of the discovery of morphine by Sertürner. *J. Am. Pharm. Assoc. (Wash.)* **1929**, *18* (4), 375-384.

35. Zhang, M. Q.; Wilkinson, B. Drug discovery beyond the 'rule-of-five'. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2007**, *18* (6), 478-488.
36. Fleming, A. On the antibacterial action of cultures of a *Penicillium*, with special reference to their use in the Isolation of *B. influenzae*. *Br. J. Exp. Pathol.* **1929**, *10* (3), 226-236.
37. Grabley, S.; Thiericke, R. The impact of natural products on drug discovery. In *Drug discovery from nature*, Grabley, S., Thiericke, R., Eds.; Springer: Berlin, 1999; pp 3-37.
38. Strohl, W. R. *Biotechnology of Antibiotics*; 2 ed.; Marcel Dekker: New York, 1997; Vol. 82.
39. Driggers, E. M.; Hale, S. P.; Lee, J.; Terrett, N. K. The exploration of macrocycles for drug discovery-an underexploited structural class. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2008**, *7* (7), 608-624.
40. Newman, D. J.; Cragg, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *J. Nat. Prod.* **2012**, *75* (3), 311-335.
41. Tobert, J. A. Lovastatin and beyond: the history of the HMG-CoA reductase inhibitors. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2003**, *2* (7), 517-526.
42. Reichenbach, H. Myxobacteria, producers of novel bioactive substances. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2001**, *27* (3), 149-156.
43. Connor, D. T.; Greenough, R. C.; von Strandtmann, M. W-7783, a unique antifungal antibiotic. *J. Org. Chem.* **1977**, *42* (23), 3664-3669.
44. Weissman, K. J.; Müller, R. Myxobacterial secondary metabolites: bioactivities and modes-of-action. *Nat. Prod. Rep.* **2010**, *27* (9), 1276-1295.
45. Irschik, H.; Schummer, D.; Höfle, G.; Reichenbach, H.; Steinmez, H.; Jansen, R. Etnangien, a macrolide-polyene antibiotic from *Sorangium cellulosum* that inhibits nucleic acid polymerases. *J. Nat. Prod.* **2007**, *70* (6), 1060-1063.
46. Menche, D.; Arikan, F.; Perlova, O.; Horstmann, N.; Ahlbrecht, W.; Wenzel, S. C.; Jansen, R.; Irschik, H.; Müller, R. Stereochemical determination and complex biosynthetic assembly of etnangien, a highly potent RNA polymerase inhibitor from the myxobacterium *Sorangium cellulosum*. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (43), 14234-14243.
47. Irschik, H.; Reichenbach, H.; Höfle, G.; Jansen, R. The thuggacins, novel antibacterial macrolides from *Sorangium cellulosum* acting against selected gram-positive bacteria. *J. Antibiot.* **2007**, *60* (12), 733-738.
48. Steinmetz, H.; Irschik, H.; Kunze, B.; Reichenbach, H.; Höfle, G.; Jansen, R. Thuggacins, macrolide antibiotics active against *Mycobacterium tuberculosis*: Isolation from myxobacteria, structure elucidation, conformation analysis and biosynthesis. *Chemistry* **2007**, *13* (20), 5822-5832.
49. Kunze, B.; Reichenbach, H.; Augustiniak, H.; Höfle, G. Isolation and identification of althiomycin from *Cystobacter fuscus* (myxobacterales). *J. Antibiot.* **1982**, *35* (5), 635-636.
50. Fujimoto, H.; Kinoshita, T.; Suzuki, H.; Umezawa, H. Studies on Mode of Action of Althiomycin. *J. Antibiot.* **1970**, *23* (6), 271-275.
51. Gerth, K.; Irschik, H.; Reichenbach, H.; Trowitsch, W. The myxovirescins, a family of antibiotics from *Myxococcus virescens* (Myxobacterales). *J. Antibiot.* **1982**, *35* (11), 1454-1459.
52. Onishi, N.; Izaki, K.; Takahashi, H. A macrocyclic antibiotic M-230B produced by *Myxococcus xanthus*. Isolation and characterization. *J. Antibiot.* **1984**, *37* (1), 13-19.

53. Zafriri, D.; Rosenberg, E.; Mirelman, D. Mode of action of *Myxococcus xanthus* antibiotic TA. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1981**, *19* (2), 349-351.
54. Irschik, H.; Trowitzsch-Kienast, W.; Gerth, K.; Höfle, G.; Reichenbach, H. Saframycin Mx1, a new natural saframycin isolated from a myxobacterium. *J. Antibiot.* **1988**, *41* (8), 993-998.
55. Gerth, K.; Jansen, R.; Reifenstahl, G.; Höfle, G.; Irschik, H.; Kunze, B.; Reichenbach, H.; Thierbach, G. The myxalamids, new antibiotics from *Myxococcus xanthus* (Myxobacteriales). I. Production, physico-chemical and biological properties, and mechanism of action. *J. Antibiot.* **1983**, *36* (9), 1150-1156.
56. Gerth, K.; Irschik, H.; Reichenbach, H.; Trowitzsch, W. Myxothiazol, an antibiotic from *Myxococcus fulvus* (myxobacteriales). I. Cultivation, isolation, physico-chemical and biological properties. *J. Antibiot.* **1980**, *33* (12), 1474-1479.
57. Thierbach, G.; Reichenbach, H. Myxothiazol, a new antibiotic interfering with respiration. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1981**, *19* (4), 504-507.
58. Thierbach, G.; Reichenbach, H. Myxothiazol, a new inhibitor of the cytochrome b-c1 segment of the respiratory chain. *Biochim. Biophys. Acta* **1981**, *638* (2), 282-289.
59. Kunze, B.; Höfle, G.; Reichenbach, H. The aurachins, new quinoline antibiotics from myxobacteria: production, physico-chemical and biological properties. *J. Antibiot.* **1987**, *40* (3), 258-265.
60. Kunze, B.; Kemmer, T.; Höfle, G.; Reichenbach, H. Stigmatellin, a new antibiotic from *Stigmatella aurantiaca* (Myxobacteriales). I. Production, physico-chemical and biological properties. *J. Antibiot.* **1984**, *37* (5), 454-461.
61. Thierbach, G.; Kunze, B.; Reichenbach, H.; Höfle, G. The mode of action of stigmatellin, a new inhibitor of the cytochrome b-c1 segment of the respiratory chain. *Biochim. Biophys. Acta* **1984**, *765*, 227-235.
62. Bode, H. B.; Irschik, H.; Wenzel, S. C.; Reichenbach, H.; Müller, R.; Höfle, G. The leupyrrins: A structurally unique family of secondary metabolites from the myxobacterium *Sorangium cellulosum*. *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 1203-1206.
63. Gerth, K.; Bedorf, N.; Irschik, H.; Höfle, G.; Reichenbach, H. The soraphens: a family of novel antifungal compounds from *Sorangium cellulosum* (Myxobacteria). I. Soraphen A1 alpha: fermentation, isolation, biological properties. *J. Antibiot.* **1994**, *47* (1), 23-31.
64. Vahlensieck, H. F.; Pridzun, L.; Reichenbach, H.; Hinnen, A. Identification of the yeast ACC1 gene product (acetyl-CoA carboxylase) as the target of the polyketide fungicide soraphen A. *Curr. Genet.* **1994**, *25* (2), 95-100.
65. Reichenbach, H.; Höfle, G. Discovery of a new antifungal mechanism of action: soraphen - an almost-success story. In *Scientific Annual Report*, Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH: Braunschweig, 1994; pp 5-22.
66. Yue, Q. X.; Liu, X.; Guo, D. A. Microtubule-binding natural products for cancer therapy. *Planta Med.* **2010**, *76* (11), 1037-1043.
67. Kunze, B.; Jansen, R.; Sasse, F.; Höfle, G.; Reichenbach, H. Chondramides A approximately D, new antifungal and cytostatic depsipeptides from *Chondromyces crocatus* (Myxobacteria). Production, physico-chemical and biological properties. *J. Antibiot.* **1995**, *48* (11), 1262-1266.
68. Sasse, F.; Kunze, B.; Gronewold, T. M.; Reichenbach, H. The chondramides: cytostatic agents from myxobacteria acting on the actin cytoskeleton. *J. Natl. Cancer Inst.* **1998**, *90* (20), 1559-1563.

69. Waldmann, H.; Hu, T. S.; Renner, S.; Menninger, S.; Tannert, R.; Oda, T.; Arndt, H. D. Total synthesis of chondramide C and its binding mode to F-actin. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **2008**, *47* (34), 6473-6477.
70. Irschik, H.; Jansen, R.; Gerth, K.; Höfle, G.; Reichenbach, H. Chivosazol A, a new inhibitor of eukaryotic organisms isolated from myxobacteria. *J. Antibiot.* **1995**, *48* (9), 962-966.
71. Jansen, R.; Irschik, H.; Reichenbach, H.; Höfle, G. Antibiotics from gliding bacteria, LXXX. Chivosazoles A-F: Novel antifungal and cytotoxic macrolides from *Sorangium cellulosum* (Myxobacteria). *Liebigs Ann-Recl Liebigs Ann-Recl* **1997**, (8), 1725-1732.
72. Janssen, D.; Albert, D.; Jansen, R.; Müller, R.; Kalesse, M. Chivosazole A - Elucidation of the absolute and relative configuration. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46* (26), 4898-4901.
73. Diestel, R.; Irschik, H.; Jansen, R.; Khalil, M. W.; Reichenbach, H.; Sasse, F. Chivosazoles A and F, cytostatic macrolides from myxobacteria, interfere with actin. *Chembiochem.* **2009**, *10* (18), 2900-2903.
74. Höfle, G.; Bedorf, N.; Steinmetz, H.; Schomburg, D.; Gerth, K.; Reichenbach, H. Epothilone A and B: Novel 16-membered macrolides with cytotoxic activity: Isolation, crystal structure, and conformation in solution. *Angew Chem Int Ed Engl* **1996**, *35* (13/14), 1567-1569.
75. Bollag, D. M.; McQueney, P. A.; Zhu, J.; Hensens, O.; Koupal, L.; Liesch, J.; Goetz, M.; Lazarides, E.; Woods, M. Epothilones, a new class of microtubule-stabilizing agents with a Taxol-like mechanism of action. *Cancer Res.* **1995**, *55*, 2325-2333.
76. Gerth, K.; Bedorf, N.; Höfle, G.; Irschik, H.; Reichenbach, H. Epothilons A and B: antifungal and cytotoxic compounds from *Sorangium cellulosum* (Myxobacteria). Production, physico-chemical and biological properties. *J. Antibiot.* **1996**, *49* (6), 560-563.
77. Hunt, J. T. Discovery of ixabepilone. *Mol. Cancer Ther.* **2009**, *8* (2), 275-281.
78. Sasse, F.; Steinmetz, H.; Heil, J.; Höfle, G.; Reichenbach, H. Tubulysins, new cytostatic peptides from myxobacteria acting on microtubuli: Production, isolation, physico-chemical and biological properties. *J. Antibiot.* **2000**, *53* (9), 879-885.
79. Steinmetz, H.; Glaser, N.; Herdtweck, E.; Sasse, F.; Reichenbach, H.; Höfle, G. Isolation, crystal and solution structure determination, and biosynthesis of tubulysins-powerful inhibitors of tubulin polymerization from myxobacteria. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43* (37), 4888-4892.
80. Ullrich, A.; Chai, Y.; Pistorius, D.; Elnakady, Y. A.; Herrmann, J. E.; Weissman, K. J.; Kazmaier, U.; Müller, R. Pretubulysin, a potent and chemically-accessible tubulysin precursor from *Angiococcus disciformis*. *Angew. Chem Int. Ed Engl.* **2009**, *48* (24), 4422-4425.
81. Kaur, G.; Hollingshead, M.; Holbeck, S.; Schauer-Vukasinovic, V.; Camalier, R. F.; Domling, A.; Agarwal, S. Biological evaluation of tubulysin A: a potential anticancer and antiangiogenic natural product. *Biochem. J.* **2006**, *396* (2), 235-242.
82. Herrmann, J.; Elnakady, Y. A.; Wiedmann, R. M.; Ullrich, A.; Rohde, M.; Kazmaier, U.; Vollmar, A. M.; Müller, R. Pretubulysin: from hypothetical biosynthetic intermediate to potential lead in tumor therapy. *PLoS ONE* **2012**, *7* (5), e37416.
83. Irschik, H.; Jansen, R.; Gerth, K.; Höfle, G.; Reichenbach, H. Disorazol A, an efficient inhibitor of eukaryotic organisms isolated from myxobacteria. *J. Antibiot.* **1995**, *48* (1), 31-35.
84. Elnakady, Y. A.; Sasse, F.; Lünsdorf, H.; Reichenbach, H. Disorazol A1, a highly effective antimetabolic agent acting on tubulin polymerization and inducing apoptosis in mammalian cells. *Biochem. Pharmacol.* **2004**, *67* (5), 927-935.

85. Hopkins, C. D.; Wipf, P. Isolation, biology and chemistry of the disorazoles: new anti-cancer macrodiolides. *Nat. Prod. Rep.* **2009**, *26* (5), 585-601.
86. Jansen, R.; Kunze, B.; Reichenbach, H.; Höfle, G. Antibiotics from gliding bacteria LXXXVI, Apicularen A and B, cytotoxic 10-membered lactones with a novel mechanism of action from *Chondromyces* species (myxobacteria): Isolation, structure elucidation, and biosynthesis. *Eur. J. Org. Chem.* **2000**, *6*, 913-919.
87. Huss, M.; Sasse, F.; Kunze, B.; Jansen, R.; Steinmetz, H.; Ingenhorst, G.; Zecek, A.; Wieczorek, H. Archazolid and apicularen: novel specific V-ATPase inhibitors. *BMC Biochem.* **2005**, *6*, 13.
88. Kim, J. S.; Lee, Y. C.; Nam, H. T.; Li, G.; Yun, E. J.; Song, K. S.; Seo, K. S.; Park, J. H.; Ahn, J. W.; Zee, O.; Park, J. I.; Yoon, W. H.; Lim, K.; Hwang, B. D. Apicularen A induces cell death through Fas ligand up-regulation and microtubule disruption by tubulin down-regulation in HM7 human colon cancer cells. *Clin. Cancer Res.* **2007**, *13* (21), 6509-6517.
89. Sasse, F.; Steinmetz, H.; Schupp, T.; Petersen, F.; Memmert, K.; Hofmann, H.; Heusser, C.; Brinkmann, V.; von Matt, P.; Höfle, G.; Reichenbach, H. Argyrins, immunosuppressive cyclic peptides from myxobacteria. I. Production, isolation, physico-chemical and biological properties. *J. Antibiot.* **2002**, *55* (6), 543-551.
90. Nickeleit, I.; Zender, S.; Sasse, F.; Geffers, R.; Brandes, G.; Sörensen, I.; Steinmetz, H.; Kubicka, S.; Carlomagno, T.; Menche, D.; Gütgemann, I.; Buer, J.; Gossler, A.; Manns, M. P.; Kalesse, M.; Frank, R.; Malek, N. P. Argyrin A reveals a critical role for the tumor suppressor protein p27^{kip1} in mediating antitumor activities in response to proteasome inhibition. *Cancer Res.* **2008**, *14*, 23-35.
91. Wenzel, S. C.; Kunze, B.; Höfle, G.; Silakowski, B.; Scharfe, M.; Blöcker, H.; Müller, R. Structure and biosynthesis of myxochromides S1-3 in *Stigmatella aurantiaca*: Evidence for an iterative bacterial type I polyketide synthase and for module skipping in nonribosomal peptide biosynthesis. *ChemBioChem* **2005**, *6* (2), 375-385.
92. Ohlendorf, B.; Kehraus, S.; König, G. M. Myxochromide B3, a new member of the myxochromide family of secondary metabolites. *J. Nat. Prod.* **2008**, *71* (10), 1708-1713.
93. Niggemann, J.; Bedorf, N.; Flörke, U.; Steinmetz, H.; Gerth, K.; Reichenbach, H.; Höfle, G. Spirangien A and B, highly cytotoxic and antifungal spiroketals from the myxobacterium *Sorangium cellulosum*: isolation, structure elucidation and chemical modifications. *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, *2005* (23), 5013-5018.
94. Reboll, M. R.; Ritter, B.; Sasse, F.; Niggemann, J.; Frank, R.; Nourbakhsh, M. The myxobacterial compounds spirangien a and spirangien M522 are potent inhibitors of IL-8 expression. *ChemBioChem* **2012**, *13* (3), 409-415.
95. Kunze, B.; Bedorf, N.; Kohl, W.; Höfle, G.; Reichenbach, H. Myxochelin A, a new iron-chelating compound from *Angiococcus disciformis* (Myxobacterales). Production, isolation, physico-chemical and biological properties. *J. Antibiot.* **1989**, *42* (1), 14-17.
96. Ambrosi, H. D.; Hartmann, V.; Pistorius, D.; Reissbrodt, R.; Trowitzsch-Kienast, W. Myxochelins B, C, D, E and F: A new structural principle for powerful siderophores imitating nature. *Eur. J. Org. Chem.* **1998**, *1998* (3), 541-551.
97. Miyanaga, S.; Obata, T.; Onaka, H.; Fujita, T.; Saito, N.; Sakurai, H.; Saiki, I.; Furumai, T.; Igarashi, Y. Absolute configuration and antitumor activity of myxochelin A produced by *Nonomuraea pusilla* TP-A0861. *J. Antibiot.* **2006**, *59* (11), 698-703.
98. Miyanaga, S.; Sakurai, H.; Saiki, I.; Onaka, H.; Igarashi, Y. Synthesis and evaluation of myxochelin analogues as antimetastatic agents. *Bioorg. Med. Chem* **2009**, *17* (7), 2724-2732.

99. Bode, H. B.; Zeggel, B.; Silakowski, B.; Wenzel, S. C.; Reichenbach, H.; Müller, R. Steroid biosynthesis in prokaryotes: Identification of myxobacterial steroids and cloning of the first bacterial 2,3(S)-oxidosqualene cyclase from the myxobacterium *Stigmatella aurantiaca*. *Mol. Microbiol.* **2003**, *47* (2), 471-481.
100. Gawas, D.; Garcia, R.; Huch, V.; Müller, R. A highly conjugated dihydroxylated C28 steroid from a myxobacterium. *J. Nat. Prod.* **2011**, *74* (5), 1281-1283.
101. Trowitsch, W.; Witte, L.; Reichenbach, H. Geosmin from earthly smelling cultures of *Nannocystis exedens* (Myxobacterales). *FEMS Microbiol. Lett.* **1981**, *12*, 257-260.
102. Wenzel, S. C.; Müller, R. Myxobacteria--'microbial factories' for the production of bioactive secondary metabolites. *Mol. Biosyst.* **2009**, *5* (6), 567-574.
103. Cane, D. E.; Walsh, C. T. The parallel and convergent universes of polyketide synthases and nonribosomal peptide synthetases. *Chem. Biol.* **1999**, *6* (12), R319-R325.
104. Wenzel, S. C.; Müller, R. The biosynthetic potential of myxobacteria and their impact on drug discovery. *Curr Opin Drug Discov Devel* **2009**, *12* (2), 220-230.
105. Wenzel, S. C.; Müller, R. Formation of novel secondary metabolites by bacterial multimodular assembly lines: deviations from text book biosynthetic logic. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2005**, *9* (5), 447-458.
106. Du, L. H.; Sanchez, C.; Shen, B. Hybrid peptide-polyketide natural products: biosynthesis and prospects toward engineering novel molecules. *Metab. Eng.* **2001**, *3* (1), 78-95.
107. Schwarzer, D.; Marahiel, M. A. Multimodular biocatalysts for natural product assembly. *Naturwissenschaften* **2001**, *88* (3), 93-101.
108. Lambalot, R. H.; Gehring, A. M.; Flugel, R. S.; Zuber, P.; LaCelle, M.; Marahiel, M. A.; Reid, R.; Khosla, C.; Walsh, C. T. A new enzyme superfamily - the phosphopantetheinyl transferases. *Chem. Biol.* **1996**, *3* (11), 923-936.
109. Gaitatzis, N.; Hans, A.; Müller, R.; Beyer, S. The *mtaA* gene of the myxothiazol biosynthetic gene cluster from *Stigmatella aurantiaca* DW4/3-1 encodes a phosphopantetheinyl transferase that activates polyketide synthases and polypeptide synthetases. *J. Biochem. (Tokyo)* **2001**, *129* (1), 119-124.
110. Meiser, P.; Müller, R. Two functionally redundant Sfp-type 4'-phosphopantetheinyl transferases differentially activate biosynthetic pathways in *Myxococcus xanthus*. *ChemBioChem* **2008**, *9* (10), 1549-1553.
111. Koglin, A.; Walsh, C. T. Structural insights into nonribosomal peptide enzymatic assembly lines. *Nat. Prod. Rep.* **2009**, *26* (8), 987-1000.
112. Bode, H. B.; Müller, R. The impact of bacterial genomics on natural product research. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44* (42), 6828-6846.
113. Challis, G. L. Genome mining for novel natural product discovery. *J. Med. Chem.* **2008**, *51* (9), 2618-2628.
114. Wenzel, S. C.; Müller, R. Myxobacterial natural product assembly lines: fascinating examples of curious biochemistry. *Nat. Prod. Rep.* **2007**, *24* (6), 1211-1224.
115. Weissman, K. J.; Müller, R. Protein-protein interactions in multienzyme megasynthetases. *ChemBioChem* **2008**, *9* (6), 826-848.

116. Sieber, S. A.; Marahiel, M. A. Molecular mechanisms underlying nonribosomal peptide synthesis: approaches to new antibiotics. *Chem Rev* **2005**, *105* (2), 715-738.
117. Schwarzer, D.; Finking, R.; Marahiel, M. A. Nonribosomal peptides: From genes to products. *Nat. Prod. Rep.* **2003**, *20* (3), 275-287.
118. Fischbach, M. A.; Walsh, C. T. Assembly-line enzymology for polyketide and nonribosomal peptide antibiotics: logic, machinery, and mechanisms. *Chem. Rev.* **2006**, *106* (8), 3468-3496.
119. Mootz, H. D.; Schwarzer, D.; Marahiel, M. A. Ways of assembling complex natural products on modular nonribosomal peptide synthetases. *ChemBioChem* **2002**, *3* (6), 490-504.
120. Challis, G. L.; Naismith, J. H. Structural aspects of non-ribosomal peptide biosynthesis. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2004**, *14* (6), 748-756.
121. Lautru, S.; Challis, G. L. Substrate recognition by nonribosomal peptide synthetase multi-enzymes. *Microbiology* **2004**, *150* (Pt 6), 1629-1636.
122. Stachelhaus, T.; Mootz, H. D.; Marahiel, M. A. The specificity-conferring code of adenylation domains in nonribosomal peptide synthetases. *Chem. Biol.* **1999**, *6*, 493-505.
123. Challis, G. L.; Ravel, J.; Townsend, C. A. Predictive, structure-based model of amino acid recognition by nonribosomal peptide synthetase adenylation domains. *Chem. Biol.* **2000**, *7* (3), 211-224.
124. May, J. J.; Kessler, N.; Marahiel, M. A.; Stubbs, M. T. Crystal structure of DhbE, an archetype for aryl acid activating domains of modular nonribosomal peptide synthetases. *P. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99* (19), 12120-12125.
125. Walsh, C. T.; Chen, H. W.; Keating, T. A.; Hubbard, B. K.; Losey, H. C.; Luo, L. S.; Marshall, C. G.; Miller, D. A.; Patel, H. M. Tailoring enzymes that modify nonribosomal peptides during and after chain elongation on NRPS assembly lines. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2001**, *5* (5), 525-534.
126. Müller, R. Don't classify polyketide synthases. *Chem. Biol.* **2004**, *11* (1), 4-6.
127. Staunton, J.; Weissman, K. J. Polyketide biosynthesis: a millennium review. *Nat. Prod. Rep.* **2001**, *18* (4), 380-416.
128. Hertweck, C. The biosynthetic logic of polyketide diversity. *Angew. Chem Int. Ed Engl.* **2009**, *48* (26), 4688-4716.
129. Chan, Y. A.; Boyne, M. T.; Podevels, A. M.; Klimowicz, A. K.; Handelsman, J.; Kelleher, N. L.; Thomas, M. G. Hydroxymalonyl-acyl carrier protein (ACP) and aminomalonyl-ACP are two additional type I polyketide synthase extender units. *P. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103* (39), 14349-14354.
130. Del Vecchio, F.; Petkovic, H.; Kendrew, S. G.; Low, L.; Wilkinson, B.; Lill, R.; Cortes, J.; Rudd, B. A.; Staunton, J.; Leadlay, P. F. Active-site residue, domain and module swaps in modular polyketide synthases. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2003**, *30* (8), 489-494.
131. Yadav, G.; Gokhale, R. S.; Mohanty, D. Computational approach for prediction of domain organization and substrate specificity of modular polyketide synthases. *Journal of Molecular Biology* **2003**, *328* (2), 335-363.
132. Perlova, O.; Gerth, K.; Hans, A.; Kaiser, O.; Müller, R. Identification and analysis of the chivosazol biosynthetic gene cluster from the myxobacterial model strain *Sorangium cellulosum* So ce56. *J. Biotechnol.* **2006**, *121* (2), 174-191.

133. Weissman, K. J. Polyketide biosynthesis: understanding and exploiting modularity. *Philos. Trans. R. Soc. London, A* **2004**, *362*, 2671-2690.
134. Hopwood, D. A. Genetic contributions to understanding polyketide synthases. *Chem Rev* **1997**, *97*, 2465-2497.
135. Reid, R.; Piagentini, M.; Rodriguez, E.; Ashley, G.; Viswanathan, N.; Carney, J.; Santi, D. V.; Hutchinson, C. R.; McDaniel, R. A model of structure and catalysis for ketoreductase domains in modular polyketide synthases. *Biochemistry-US* **2003**, *42* (1), 72-79.
136. Caffrey, P. Conserved amino acid residues correlating with ketoreductase stereospecificity in modular polyketide synthases. *ChemBioChem* **2003**, *4* (7), 654-657.
137. Kwan, D. H.; Sun, Y.; Schulz, F.; Hong, H.; Popovic, B.; Sim-Stark, J. C.; Haydock, S. F.; Leadlay, P. F. Prediction and manipulation of the stereochemistry of enoylreduction in modular polyketide synthases. *Chem. Biol.* **2008**, *15* (11), 1231-1240.
138. Simunovic, V.; Zapp, J.; Rachid, S.; Krug, D.; Meiser, P.; Müller, R. Myxovirescin biosynthesis is directed by hybrid polyketide synthases/ nonribosomal peptide synthetase, 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA synthases and trans-acting acyltransferases. *ChemBioChem* **2006**, *7*, 1206-1220.
139. Simunovic, V.; Müller, R. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA-like synthases direct the formation of methyl and ethyl side groups in the biosynthesis of the antibiotic myxovirescin A. *ChemBioChem* **2007**, *8* (5), 497-500.
140. Simunovic, V.; Müller, R. Mutational analysis of the myxovirescin biosynthetic gene cluster reveals novel insights into the functional elaboration of polyketide backbones. *ChemBioChem* **2007**, *8* (11), 1273-1280.
141. Li, Y.; Müller, R. Non-modular polyketide synthases in myxobacteria. *Phytochemistry* **2009**, *70* (15-16), 1850-1857.
142. Grimm, A.; Madduri, K.; Ali, A.; Hutchinson, C. R. Characterization of the *Streptomyces peucetius* ATCC 29050 genes encoding doxorubicin polyketide synthase. *Gene* **1994**, *151* (1-2), 1-10.
143. Austin, M. B.; Noel, J. P. The chalcone synthase superfamily of type III polyketide synthases. *Nat. Prod. Rep.* **2003**, *20* (1), 79-110.
144. Kopp, F.; Marahiel, M. A. Macrocyclization strategies in polyketide and nonribosomal peptide biosynthesis. *Nat. Prod. Rep.* **2007**, *24* (4), 735-749.
145. Du, L.; Lou, L. PKS and NRPS release mechanisms. *Nat. Prod. Rep.* **2010**, *27* (2), 255-278.
146. Gehring, A. M.; Mori, I.; Walsh, C. T. Reconstitution and characterization of the *Escherichia coli* enterobactin synthetase from EntB, EntE, and EntF. *Biochemistry-US* **1998**, *37* (8), 2648-2659.
147. Li, Y.; Weissman, K. J.; Müller, R. Myxochelin biosynthesis: direct evidence for two- and four-electron reduction of a carrier protein-bound thioester. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (24), 7554-7555.
148. Rachid, S.; Krug, D.; Kochems, I.; Kunze, B.; Scharfe, M.; Blöcker, H.; Zabriski, M.; Müller, R. Molecular and biochemical studies of chondramide formation - highly cytotoxic natural products from *Chondromyces crocatus* Cm c5. *Chem. Biol.* **2006**, *14*, 667-681.
149. Julien, B.; Shah, S.; Ziermann, R.; Goldman, R.; Katz, L.; Khosla, C. Isolation and characterization of the epothilone biosynthetic gene cluster from *Sorangium cellulosum*. *Gene* **2000**, *249* (1-2), 153-160.

150. Andrews, S. C.; Robinson, A. K.; Rodriguez-Quinones, F. Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol. Rev.* **2003**, *27* (2-3), 215-237.
151. Klein, J. S.; Lewinson, O. Bacterial ATP-driven transporters of transition metals: physiological roles, mechanisms of action, and roles in bacterial virulence. *Metallomics* **2011**, *3* (11), 1098-1108.
152. Schalk, I. J.; Hannauer, M.; Braud, A. New roles for bacterial siderophores in metal transport and tolerance. *Environ. Microbiol.* **2011**, *13* (11), 2844-2854.
153. Bruyneel, B.; vande Woestyne, M.; Verstraete, W. Lactic acid bacteria: Micro-organisms able to grow in the absence of available iron and copper. *Biotechnol. Lett.* **1989**, *11* (6), 401-406.
154. Posey, J. E.; Gherardini, F. C. Lack of a role for iron in the Lyme disease pathogen. *Science* **2000**, *288* (5471), 1651-1653.
155. Schröder, I.; Johnson, E.; de Vries, S. Microbial ferric iron reductases. *FEMS Microbiol. Rev.* **2003**, *27* (2-3), 427-447.
156. Benjamin, J. A.; Desnoyers, G.; Morissette, A.; Salvail, H.; Massé, E. Dealing with oxidative stress and iron starvation in microorganisms: an overview. *Can J Physiol Pharmacol* **2010**, *88* (3), 264-272.
157. Neilands, J. B. Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. *J. Biol Chem* **1995**, *270* (45), 26723-26726.
158. Hider, R. C.; Kong, X. Chemistry and biology of siderophores. *Nat Prod Rep* **2010**, *27* (5), 637-657.
159. Miethke, M.; Marahiel, M. A. Siderophore-based iron acquisition and pathogen control. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2007**, *71* (3), 413-451.
160. Cox, C. D.; Rinehart, K. L. J.; Moore, M. L.; Cook, J. C. Jr. Pyochelin: novel structure of an iron-chelating growth promoter for *Pseudomonas aeruginosa*. *P. Natl. Acad. Sci. USA* **1981**, *78* (7), 4256-4260.
161. Raymond, K. N.; Dertz, E. A.; Kim, S. S. Enterobactin: an archetype for microbial iron transport. *P. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100* (7), 3584-3588.
162. Silakowski, B.; Kunze, B.; Nordsiek, G.; Blöcker, H.; Höfle, G.; Müller, R. The myxochelin iron transport regulon of the myxobacterium *Stigmatella aurantiaca* Sg a15. *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267* (21), 6476-6485.
163. Oves-Costales, D.; Kadi, N.; Challis, G. L. The long-overlooked enzymology of a nonribosomal peptide synthetase-independent pathway for virulence-conferring siderophore biosynthesis. *Chem Commun (Camb)* **2009**, (43), 6530-6541.
164. Meiwes, J.; Fiedler, H. P.; Haag, H.; Zähler, H.; Konetschny-Rapp, S.; Jung, G. Isolation and characterization of staphyloferrin A, a compound with siderophore activity from *Staphylococcus hyicus* DSM 20459. *FEMS Microbiol. Lett.* **1990**, *67* (1-2), 201-206.
165. Kunze, B.; Trowitzsch-Kienast, W.; Höfle, G.; Reichenbach, H. Nannochelins A, B and C, new iron-chelating compounds from *Nannocystis exedens* (myxobacteria). Production, isolation, physico-chemical and biological properties. *J. Antibiot.* **1992**, *45* (2), 147-150.
166. Wilson, M. K.; Abergel, R. J.; Raymond, K. N.; Arceneaux, J. E.; Byers, B. R. Siderophores of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2006**, *348* (1), 320-325.

167. Gaitatzis, N.; Kunze, B.; Müller, R. Novel insights into siderophore formation in myxobacteria. *ChemBioChem* **2005**, *6* (2), 365-374.
168. Cornelis, P. Iron uptake and metabolism in pseudomonads. *Appl Microbiol Biotechnol* **2010**, *86* (6), 1637-1645.
169. Crosa, J. H.; Walsh, C. T. Genetics and assembly line enzymology of siderophore biosynthesis in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **2002**, *66* (2), 223-249.
170. Gaitatzis, N.; Kunze, B.; Müller, R. In vitro reconstitution of the myxochelin biosynthetic machinery of *Stigmatella aurantiaca* Sg a15: Biochemical characterization of a reductive release mechanism from nonribosomal peptide synthetases. *P. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98* (20), 11136-11141.
171. Challis, G. L. A widely distributed bacterial pathway for siderophore biosynthesis independent of nonribosomal peptide synthetases. *ChemBioChem* **2005**, *6* (4), 601-611.
172. Barry, S. M.; Challis, G. L. Recent advances in siderophore biosynthesis. *Curr. Opin. Chem Biol* **2009**, *13* (2), 205-215.
173. Cappellini, M. D.; Musallam, K. M.; Taher, A. T. Overview of iron chelation therapy with desferrioxamine and deferiprone. *Hemoglobin* **2009**, *33* (s1), S58-S69.
174. Nick, H. Iron chelation, *quo vadis?* *Curr Opin Chem Biol* **2007**, *11* (4), 419-423.
175. Percy, M. E.; Kruck, T. P.; Pogue, A. I.; Lukiw, W. J. Towards the prevention of potential aluminum toxic effects and an effective treatment for Alzheimer's disease. *J. Inorg. Biochem.* **2011**, *105* (11), 1505-1512.
176. Page, M. G. Siderophore conjugates. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2013**, *1277*, 115-126.
177. Wandersman, C.; Delepelaire, P. Bacterial iron sources: From siderophores to hemophores. *Annual Review of Microbiology* **2004**, *58*, 611-647.
178. Chu, B. C.; Garcia-Herrero, A.; Johanson, T. H.; Krewulak, K. D.; Lau, C. K.; Peacock, R. S.; Slavinskaya, Z.; Vogel, H. J. Siderophore uptake in bacteria and the battle for iron with the host; a bird's eye view. *Biometals* **2010**, *23* (4), 601-611.
179. Buchanan, S. K.; Smith, B. S.; Venkatramani, L.; Xia, D.; Esser, L.; Palnitkar, M.; Chakraborty, R.; van der Helm, D.; Deisenhofer, J. Crystal structure of the outer membrane active transporter FepA from *Escherichia coli*. *Nat. Struct. Biol.* **1999**, *6* (1), 56-63.
180. Ferguson, A. D.; Chakraborty, R.; Smith, B. S.; Esser, L.; van der Helm, D.; Deisenhofer, J. Structural basis of gating by the outer membrane transporter FecA. *Science* **2002**, *295* (5560), 1715-1719.
181. Ferguson, A. D.; Ködding, J.; Walker, G.; Bös, C.; Coulton, J. W.; Diederichs, K.; Braun, V.; Welte, W. Active transport of an antibiotic rifamycin derivative by the outer-membrane protein FhuA. *Structure* **2001**, *9* (8), 707-716.
182. Schalk, I. J.; Lamont, I. L.; Cobessi, D. Structure-function relationships in the bifunctional ferrisiderophore FpvA receptor from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biometals* **2009**, *22* (4), 671-678.
183. Hoegy, F.; Lee, X.; Noel, S.; Rognan, D.; Mislin, G. L.; Reimann, C.; Schalk, I. J. Stereospecificity of the siderophore pyochelin outer membrane transporters in fluorescent pseudomonads. *Journal of Biological Chem* **2009**, *284* (22), 14949-14957.

184. Bäumlér, A. J.; Norris, T. L.; Lasco, T.; Voigt, W.; Reissbrodt, R.; Rabsch, W.; Heffron, F. IroN, a novel outer membrane siderophore receptor characteristic of *Salmonella enterica*. *J. Bacteriol.* **1998**, *180* (6), 1446-1453.
185. Rabsch, W.; Voigt, W.; Reissbrodt, R.; Tsolis, R. M.; Bäumlér, A. J. *Salmonella typhimurium* IroN and FepA proteins mediate uptake of enterobactin but differ in their specificity for other siderophores. *J. Bacteriol.* **1999**, *181* (11), 3610-3612.
186. Faraldo-Gómez, J. D.; Sansom, M. S. Acquisition of siderophores in gram-negative bacteria. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2003**, *4*, 105-116.
187. Krewulak, K. D.; Vogel, H. J. Structural biology of bacterial iron uptake. *Biochim. Biophys. Acta* **2008**, *1778* (9), 1781-1804.
188. Bracken, C. S.; Baer, M. T.; Abdur-Rashid, A.; Helms, W.; Stojiljkovic, I. Use of heme-protein complexes by the *Yersinia enterocolitica* HemR receptor: histidine residues are essential for receptor function. *J. Bacteriol.* **1999**, *181* (19), 6063-6072.
189. Izadi, N.; Henry, Y.; Haladjian, J.; Goldberg, M. E.; Wandersman, C.; Delepierre, M.; Lecroisey, A. Purification and characterization of an extracellular heme-binding protein, HasA, involved in heme iron acquisition. *Biochemistry-US* **1997**, *36* (23), 7050-7057.
190. Schryvers, A. B.; Stojiljkovic, I. Iron acquisition systems in the pathogenic *Neisseria*. *Mol. Microbiol.* **1999**, *32* (6), 1117-1123.
191. Cartron, M. L.; Maddocks, S.; Gillingham, P.; Craven, C. J.; Andrews, S. C. Feo-transport of ferrous iron into bacteria. *Biometals* **2006**, *19* (2), 143-157.
192. Vartivarian, S. E.; Cowart, R. E. Extracellular iron reductases: identification of a new class of enzymes by siderophore-producing microorganisms. *Arch. Biochem. Biophys.* **1999**, *364* (1), 75-82.
193. Lin, H.; Fischbach, M. A.; Liu, D. R.; Walsh, C. T. In vitro characterization of salmochelin and enterobactin trilactone hydrolases IroD, IroE, and Fes. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (31), 11075-11084.
194. Miethke, M.; Klotz, O.; Linne, U.; May, J. J.; Beckering, C. L.; Marahiel, M. A. Ferri-bacillibactin uptake and hydrolysis in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **2006**, *61* (6), 1413-1427.
195. Harrington, J. M.; Crumbliss, A. L. The redox hypothesis in siderophore-mediated iron uptake. *Biometals* **2009**, *22* (4), 679-689.
196. Fontecave, M.; Coves, J.; Pierre, J. L. Ferric reductases or flavin reductases. *Biometals* **1994**, *7* (1), 3-8.
197. Fischer, E.; Strehlow, B.; Hartz, D.; Braun, V. Soluble and membrane-bound ferrisiderophore reductases of *Escherichia coli* K-12. *Arch. Microbiol.* **1990**, *153* (4), 329-336.
198. Huyer, M.; Page, W. J. Ferric reductase activity in *Azotobacter vinelandii* and its inhibition by Zn²⁺. *J. Bacteriol.* **1989**, *171* (7), 4031-4037.
199. Matzanke, B. F.; Anemüller, S.; Schünemann, V.; Trautwein, A. X.; Hantke, K. FhuF, part of a siderophore-reductase system. *Biochemistry-US* **2004**, *43* (5), 1386-1392.
200. Smith, J. L. The physiological role of ferritin-like compounds in bacteria. *Crit. Rev. Microbiol.* **2004**, *30* (3), 173-185.
201. Escolar, L.; Perez-Martin, J.; de Lorenzo, V. Opening the iron box: Transcriptional metalloregulation by the Fur protein. *J. Bacteriol.* **1999**, *181* (20), 6223-6229.

202. Hantke, K. Iron and metal regulation in bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* **2001**, 4 (2), 172-177.
203. Hassett, D. J.; Sokol, P. A.; Howell, M. L.; Ma, J. F.; Schweizer, H. T.; Ochsner, U.; Vasil, M. L. Ferric uptake regulator (Fur) mutants of *Pseudomonas aeruginosa* demonstrate defective siderophore-mediated iron uptake, altered aerobic growth, and decreased superoxide dismutase and catalase activities. *J. Bacteriol.* **1996**, 178 (14), 3996-4003.
204. Richards, G. R.; Vanderpool, C. K. Molecular call and response: The physiology of bacterial small RNAs. *Biochim. Biophys. Acta* **2011**, 1809 (10), 525-531.
205. Braun, V.; Mahren, S.; Ogierman, M. Regulation of the FecI-type ECF sigma factor by transmembrane signalling. *Curr Opin Microbiol* **2003**, 6 (2), 173-180.
206. Ho, T. D.; Ellermeier, C. D. Extra cytoplasmic function sigma factor activation. *Curr Opin Microbiol* **2012**, 15 (2), 182-188.
207. Crosa, J. H. Signal transduction and transcriptional and posttranscriptional control of iron-regulated genes in bacteria. *Microbiol. Mol. Biol Rev.* **1997**, 61 (3), 319-336.
208. Altmeyer, M. O. Iron regulation in the Myxobacterium *Myxococcus xanthus* DK1622. Dissertation, Universität des Saarlandes - Naturwissenschaftlich-Technische Fakultät III, Saarbrücken, 2010.
209. Meiser, P. *Myxococcus xanthus* - a myxobacterial model strain as multiproducer of secondary metabolites. Dissertation, Universität des Saarlandes - Naturwissenschaftlich-Technische Fakultät III, Saarbrücken, 2008.
210. Klefisch, T. Untersuchungen zur Bio- und Mutasythese von Myxalamiden und Myxochelinen aus *Myxococcus xanthus*. Diplomarbeit, Universität des Saarlandes - Naturwissenschaftlich-Technische Fakultät III, Saarbrücken, 2007.
211. Abergel, R. J.; Warner, J. A.; Shuh, D. K.; Raymond, K. N. Enterobactin protonation and iron release: Structural characterization of the salicylate coordination shift in ferric enterobactin. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128 (27), 8920-8931.
212. Wilbrand, S. Koordinationschemische Untersuchungen von Myxochelin A und ausgewählter Derivate. Dissertation, Universität des Saarlandes - Naturwissenschaftlich-Technische Fakultät III, Saarbrücken, 2012.
213. Reichenbach, H.; Höfle, G. Myxobacteria as producers of secondary metabolites. In *Drug Discovery from Nature*, Grabley, S., Thiericke, R., Eds.; Springer: Berlin, 1999; pp 149-179.
214. Garcia, R. O.; Krug, D.; Müller, R. Discovering natural products from myxobacteria with emphasis on rare producer strains in combination with improved analytical methods. *Methods Enzymol.* **2009**, 458 (Chapter 3), 59-91.
215. Garcia, R. O.; Reichenbach, H.; Ring, M. W.; Müller, R. *Phaselicystis flava* gen. nov., sp. nov., an arachidonic acid-containing soil myxobacterium, and the description of *Phaselicystidaceae* fam. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **2009**, 59 (6), 1524-1530.
216. Gross, F.; Luniak, N.; Perlova, O.; Gaitatzis, N.; Jenke-Kodama, H.; Gerth, K.; Gottschalk, D.; Dittmann, E.; Müller, R. Bacterial type III polyketide synthases: Phylogenetic analysis and potential for the production of novel secondary metabolites by heterologous expression in pseudomonads. *Arch. Microbiol.* **2006**, 185 (1), 28-38.
217. Silakowski, B.; Kunze, B.; Müller, R. Multiple hybrid polyketide synthase/non-ribosomal peptide synthetase gene clusters in the myxobacterium *Stigmatella aurantiaca*. *Gene* **2001**, 275 (2), 233-240.

218. Frank, B.; Wenzel, S. C.; Bode, H. B.; Scharfe, M.; Blöcker, H.; Müller, R. From genetic diversity to metabolic unity: studies on the biosynthesis of aurafurones and aurafuron-like structures in myxobacteria and streptomycetes. *Journal of Molecular Biology* **2007**, *374* (1), 24-38.
219. Wenzel, S. C.; Müller, R. Recent developments towards the heterologous expression of complex bacterial natural product biosynthetic pathways. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2005**, *16*, 594-606.
220. Irschik, H.; Washausen, P.; Sasse, F.; Fohrer, J.; Huch, V.; Müller, R.; Prusov, E. V. Isolation, structure elucidation, and biological activity of maltepolides: remarkable macrolides from Myxobacteria. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52* (20), 5402-5405.
221. Makarov, A.; Scigelova, M. Coupling liquid chromatography to Orbitrap mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2010**, *1217* (25), 3938-3945.
222. Dettmer, K.; Aronov, P. A.; Hammock, B. D. Mass spectrometry-based metabolomics. *Mass Spectrom. Rev.* **2007**, *26* (1), 51-78.
223. Dunn, W. B. Current trends and future requirements for the mass spectrometric investigation of microbial, mammalian and plant metabolomes. *Phys. Biol.* **2008**, *5* (1), 011001.
224. Junot, C.; Madalinski, G.; Tabet, J. C.; Ezan, E. Fourier transform mass spectrometry for metabolome analysis. *Analyst* **2010**, *135* (9), 2203-2219.
225. Krug, D.; Zurek, G.; Revermann, O.; Vos, M.; Velicer, G. J.; Müller, R. Discovering the hidden secondary metabolome of *Myxococcus xanthus*: a study of intraspecific diversity. *Appl. Environ. Microbiol.* **2008**, *74* (10), 3058-3068.
226. Krug, D.; Zurek, G.; Schneider, B.; Garcia, R.; Müller, R. Efficient mining of myxobacterial metabolite profiles enabled by liquid chromatography-electrospray ionization-time-of-flight mass spectrometry and compound-based principal component analysis. *Anal. Chim. Acta* **2008**, *624* (1), 97-106.
227. Cortina, N. S.; Krug, D.; Plaza, A.; Revermann, O.; Müller, R. Myxoprincomide: a natural product from *Myxococcus xanthus* discovered by comprehensive analysis of the secondary metabolome. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51* (3), 811-816.
228. Kaiser, D. Social gliding is correlated with the presence of pili in *Myxococcus xanthus*. *P. Natl. Acad. Sci. USA* **1979**, *76* (11), 5952-5956.
229. Grant, S. G.; Jessee, J.; Bloom, F. R.; Hanahan, D. Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *P. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, *87* (12), 4645-4649.
230. James, F.; Nolte, K. D.; Hanson, A. D. Purification and properties of S-adenosyl-L-methionine:L-methionine S-methyltransferase from *Wollastonia biflora* leaves. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270* (38), 22344-22350.
231. Fujii, K.; Ikai, Y.; Oka, H.; Suzuki, M.; Harada, K. A nonempirical method using LC/MS for determination of the absolute configuration of constituent amino acids in a peptide: combination of Marfey's method with mass spectrometry and its practical application. *Anal. Chem.* **1997**, *69* (24), 5146-5151.
232. Bhushan, R.; Brückner, H. Marfey's reagent for chiral amino acid analysis: a review. *Amino Acids* **2004**, *27* (3-4), 231-247.

233. Fujii, K.; Ikai, Y.; Mayumi, T.; Oka, H.; Suzuki, M.; Harada, H. A nonempirical method using LC/MS for determination of the absolute configuration of constituent amino acids in a peptide: elucidation of limitations of Marfey's method and of its separation mechanism. *Anal. Chem.* **1997**, *1997* (69), 16-3346.
234. Plaza, A.; Bewley, C. A. Largamides A-H, unusual cyclic peptides from the marine cyanobacterium *Oscillatoria* sp. *J. Org. Chem.* **2006**, *71* (18), 6898-6907.
235. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* **1983**, *65* (1-2), 55-63.
236. Berridge, M. V.; Tan, A. S. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arch. Biochem. Biophys.* **1993**, *303* (2), 474-482.
237. Kagan, R. M.; Clarke, S. Widespread occurrence of three sequence motifs in diverse S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases suggest a common structure for these enzymes. *Arch. Biochem. Biophys.* **1994**, *310* (2), 417-427.
238. Crystal structure of rossmann-fold protein of unknown function (Duf574) (Np_823353.1) from *Streptomyces avermitilis* MA-4680 at 1.80 Å resolution. [PDB Entry-ID: 3GO4]. 2009. Kristallstruktur-Datenbankeintrag, Joint Center For Structural Genomics (Jcsg). Ref Type: Data File
239. Gallagher, S. R. One-dimensional SDS gel electrophoresis of proteins. *Current Protocols in Molecular Biology* **2006**, Chapter 10 (Unit 10.2A).
240. Schubert, H. L.; Blumenthal, R. M.; Cheng, X. Many paths to methyltransfer: a chronicle of convergence. *Trends Biochem. Sci.* **2003**, *28* (6), 329-335.
241. Dhar, K.; Rosazza, J. P. N. Purification and characterization of *Streptomyces griseus* catechol O-methyltransferase. *Appl. Environ. Microbiol.* **2000**, *66* (11), 4877-4882.
242. Passarinha, L. A.; Bonifácio, M. J.; Soares-da-Silva, P.; Queiroz, J. A. A new approach on the purification of recombinant human soluble catechol-O-methyltransferase from an *Escherichia coli* extract using hydrophobic interaction chromatography. *J. Chromatogr. A* **2008**, *1177* (2), 287-296.
243. Vesper, J.; May, W. A rapid purification procedure for S-adenosyl-L-methionine: Catechol O-methyltransferase by high-performance ion exchange chromatography and subsequent affinity chromatography. *Chromatographia Chromatographia* **1986**, *22* (7-12), 404-406.
244. He, X. Z.; Dixon, R. A. Affinity chromatography, substrate/product specificity, and amino acid sequence analysis of an isoflavone O-methyltransferase from alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Arch. Biochem. Biophys.* **1996**, *336* (1), 121-129.
245. Hashizume, K.; Tozawa, K.; Hiraga, Y.; Aramaki, I. Purification and characterization of a O-methyltransferase capable of methylating 2-hydroxy-3-alkylpyrazine from *Vitis vinifera* L. (cv. Cabernet Sauvignon). *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2001**, *65* (10), 2213-2219.
246. Pimenta, M. J.; Kaneta, T.; Larondelle, Y.; Dohmae, N.; Kamiya, Y. S-adenosyl-L-methionine:L-methionine S-methyltransferase from germinating barley. Purification and localization. *Plant Physiol.* **1998**, *118* (2), 431-438.
247. Yates, J. R., III Mass spectrometry and the age of the proteome. *J. Mass Spectrom.* **1998**, *33* (1), 1-19.

248. Chamrad, D. C.; Körting, G.; Stühler, K.; Meyer, H. E.; Klose, J.; Blüggel, M. Evaluation of algorithms for protein identification from sequence databases using mass spectrometry data. *Proteomics Proteomics* **2004**, *4* (3), 619-628.
249. Nelson, J. T.; Lee, J.; Sims, J. W.; Schmidt, E. W. Characterization of SafC, a catechol 4-*O*-methyltransferase involved in saframycin biosynthesis. *Appl. Environ. Microbiol.* **2007**, *73* (11), 3575-3580.
250. Yoon, Y.; Park, Y.; Yi, Y. S.; Lee, Y.; Jo, G.; Park, J. C.; Ahn, J. H.; Lim, Y. Characterization of an *O*-methyltransferase from *Streptomyces avermitilis* MA-4680. *Journal of Microbiology and Biotechnology* **2010**, *20* (9), 1359-1366.
251. Yoon, Y.; Yi, Y. S.; Lee, Y.; Kim, S.; Kim, B. G.; Ahn, J. H.; Lim, Y. Characterization of *O*-methyltransferase ScOMT1 cloned from *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Biochimica et Biophysica Acta- Gene Structure and Expression* **2005**, *1730* (2), 85-95.
252. Kopycki, J. G.; Stubbs, M. T.; Brandt, W.; Hagemann, M.; Porzel, A.; Schmidt, J.; Schliemann, W.; Zenk, M. H.; Vogt, T. Functional and structural characterization of a cation-dependent *O*-methyltransferase from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283* (30), 20888-20896.
253. Ounaron, A.; Decker, G.; Schmidt, J.; Lottspeich, F.; Kutchan, T. M. (*R,S*)-Reticuline 7-*O*-methyltransferase and (*R,S*)-norcoclaurine 6-*O*-methyltransferase of *Papaver somniferum*- cDNA cloning and characterization of methyl transfer enzymes of alkaloid biosynthesis in opium poppy. *The plant journal* **2003**, *36*, 808-819.
254. Gauthier, A.; Gulick, P. J.; Ibrahim, R. K. Characterization of two cDNA clones which encode *O*-methyltransferases for the methylation of both flavonoid and phenylpropanoid compounds. *Arch. Biochem. Biophys.* **1998**, *351* (2), 243-249.
255. Gowri, G.; Bugos, R. C.; Campbell, W. H.; Maxwell, C. A.; Dixon, R. A. Stress responses in alfalfa (*Medicago sativa* L.): X. molecular cloning and expression of *S*-adenosyl-*L*-methionine:caffeic acid 3-*O*-methyltransferase, a key enzyme of lignin biosynthesis. *Plant Physiol.* **1991**, *97* (1), 7-14.
256. Collazo, P.; Montoliu, L.; Puigdomènech, P.; Rigau, J. Structure and expression of the lignin *O*-methyltransferase gene from *Zea mays* L. *Plant Mol. Biol* **1992**, *20* (5), 857-867.
257. Pellegrini, L.; Geoffroy, P.; Fritig, B.; Legrand, M. Molecular cloning and expression of a new class of ortho-diphenol-*O*-methyltransferases induced in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) leaves by infection or elicitor treatment. *Plant Physiol.* **1993**, *103* (2), 509-517.
258. Gauthier, A.; Gulick, P. J.; Ibrahim, R. K. cDNA cloning and characterization of a 3'/5'-*O*-methyltransferase for partially methylated flavonols from *Chrysosplenium americanum*. *Plant Mol. Biol.* **1996**, *32* (6), 1163-1169.
259. Ye, Z. H.; Zhong, R.; Morrison, W. H., III; Himmelsbach, D. S. Caffeoyl coenzyme A *O*-methyltransferase and lignin biosynthesis. *Phytochemistry Phytochemistry* **2001**, *57* (7), 1177-1185.
260. Joshi, C. P.; Chiang, V. L. Conserved sequence motifs in plant *S*-adenosyl-*L*-methionine-dependent methyltransferases. *Plant Mol. Biol* **1998**, *37*, 663-674.
261. Telford, J. R.; Raymond, K. N. Coordination chemistry of the amonabactins, bis(catecholate) siderophores from *Aeromonas hydrophila*. *Inorg Chem* **1998**, *37* (18), 4578-4583.
262. Albrecht-Gary, A. M.; Blanc, S.; Rochel, N.; Ocaktan, A. Z.; Abdallah, M. A. Bacterial iron transport: Coordination properties of Pyoverdinin PaA, a peptidic siderophore of *Pseudomonas aeruginosa*. *Inorg Chem* **1994**, *33* (26), 6391-6402.

263. Harris, W. R.; Carrano, C. J.; Raymond, K. N. Coordination chemistry of microbial iron transport compounds. 16. Isolation, characterization, and formation constants of ferric aerobactin. *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101* (10), 2722-2727.
264. Carrano, C. J.; Drechsel, H.; Kaiser, D.; Jung, G.; Matzanke, B.; Winkelmann, G.; Rochel, N.; Albrecht-Gary, A. M. Coordination chemistry of the carboxylate type siderophore rhizoferrin: The iron(III) complex and its metal analogs. *Inorg Chem* **1996**, *35* (22), 6429-6436.
265. Hallé, F.; Meyer, J. M. Ferrisiderophore reductases of *Pseudomonas*. Purification, properties and cellular location of the *Pseudomonas aeruginosa* ferripyoverdine reductase. *Eur. J. Biochem.* **1992**, *209* (2), 613-620.
266. Hallé, F.; Meyer, J. M. Iron release from ferrisiderophores. A multi-step mechanism involving a NADH/FMN oxidoreductase and a chemical reduction by FMNH₂. *Eur. J. Biochem.* **1992**, *209* (2), 621-627.
267. Miethke, M.; Pierik, A. J.; Peuckert, F.; Seubert, A.; Marahiel, M. A. Identification and characterization of a novel-type ferric siderophore reductase from a gram-positive extremophile. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286* (3), 2245-2260.
268. Wong, G. B.; Kappel, M. J.; Raymond, K. N.; Matzanke, B.; Winkelmann, G. Coordination chemistry of microbial iron transport compounds. 24. Characterization of coprogen and ferricrocin, two ferric hydroxamate siderophores. *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105* (4), 810-815.
269. Pierre, J. L.; Fontecave, M.; Crichton, R. R. Chemistry for an essential biological process: the reduction of ferric iron. *Biometals* **2002**, *15* (4), 341-346.
270. Butterton, J. R.; Calderwood, S. B. Identification, cloning, and sequencing of a gene required for ferric vibriobactin utilization by *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* **1994**, *176* (18), 5631-5638.
271. Carrillo, N.; Ceccarelli, E. A. Open questions in ferredoxin-NADP⁺ reductase catalytic mechanism. *Eur. J. Biochem.* **2003**, *270* (9), 1900-1915.
272. Bamford, V. A.; Armour, M.; Mitchell, S. A.; Cartron, M.; Andrews, S. C.; Watson, K. A. Preliminary X-ray diffraction analysis of YqjH from *Escherichia coli*: a putative cytoplasmic ferri-siderophore reductase. *Acta Crystallographica Section F-Structural Biology and Crystallization Communications* **2008**, *F64*, 792-796.
273. Miethke, M.; Hou, J.; Marahiel, M. A. The siderophore-interacting protein YqjH acts as a ferric reductase in different iron assimilation pathways of *Escherichia coli*. *Biochemistry-US* **2011**, *50* (50), 10951-10964.
274. Miethke, M. Molecular strategies of microbial iron assimilation: from high-affinity complexes to cofactor assembly systems. *Metallomics* **2013**, *5* (1), 15-28.
275. Boukhalfa, H.; Crumbliss, A. L. Chemical aspects of siderophore mediated iron transport. *Biometals* **2002**, *15* (4), 325-339.
276. Peuckert, F.; Miethke, M.; Albrecht, A. G.; Essen, L. O.; Marahiel, M. A. Structural basis and stereochemistry of triscatecholate siderophore binding by FeuA. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48* (42), 7924-7927.
277. Ingelman, M.; Bianchi, V.; Eklund, H. The three-dimensional structure of flavodoxin reductase from *Escherichia coli* at 1.7 Å resolution. *Journal of Molecular Biology* **1997**, *268* (1), 147-157.
278. Dym, O.; Eisenberg, D. Sequence-structure analysis of FAD-containing proteins. *Protein Sci.* **2001**, *10* (9), 1712-1728.

279. Sridhar Prasad, G.; Kresge, N.; Muhlberg, A. B.; Shaw, A.; Jung, Y. S.; Burgess, B. K.; Stout, C. D. The crystal structure of NADPH:ferredoxin reductase from *Azotobacter vinelandii*. *Protein Sci.* **1998**, *7* (12), 2541-2549.
280. Wang, S.; Wu, Y.; Outten, F. W. Fur and the novel regulator YqjI control transcription of the ferric reductase gene *yqjH* in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **2011**, *193* (2), 563-574.
281. Ojanperä, S.; Pelander, A.; Pelzing, M.; Krebs, I.; Vuori, E.; Ojanperä, I. Isotopic pattern and accurate mass determination in urine drug screening by liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2006**, *20* (7), 1161-1167.
282. Bao, J.; Zhang, X. Y.; Xu, X. Y.; He, F.; Nong, X. H.; Qi, S. H. New cyclic tetrapeptides and asteltoxins from gorgonian-derived fungus *Aspergillus* sp. SCSGAF 0076. *Tetrahedron Tetrahedron* **2013**, *69* (9), 2113-2117.
283. Blin, K.; Medema, M. H.; Kazempour, D.; Fischbach, M. A.; Breitling, R.; Takano, E.; Weber, T. antiSMASH 2.0-a versatile platform for genome mining of secondary metabolite producers. *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41*, W204-W212.
284. Medema, M. H.; Blin, K.; Cimermancic, P.; de Jager, V.; Zakrezewski, P.; Fischbach, M. A.; Weber, T.; Takano, E.; Breitling, R. antiSMASH: rapid identification, annotation and analysis of secondary metabolite biosynthesis gene clusters in bacterial and fungal genome sequences. *Nucleic Acids Res.* **2011**, *39*, W339-W346.
285. Rausch, C.; Weber, T.; Kohlbacher, O.; Wohlleben, W.; Huson, D. H. Specificity prediction of adenylation domains in nonribosomal peptide synthetases (NRPS) using transductive support vector machines (TSVMs). *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33* (18), 5799-5808.
286. Röttig, M.; Medema, M. H.; Blin, K.; Weber, T.; Rausch, C.; Kohlbacher, O. NRPSpredictor2-a web server for predicting NRPS adenylation domain specificity. *Nucleic Acids Res.* **2011**, *39*, W362-W367.
287. Zaleta-Rivera, K.; Xu, C.; Yu, F.; Butchko, R. A.; Proctor, R. H.; Hidalgo-Lara, M. E.; Raza, A.; Dussault, P. H.; Du, L. A bidomain nonribosomal peptide synthetase encoded by *FUM14* catalyzes the formation of tricarballic esters in the biosynthesis of fumonisins. *Biochemistry-US* **2006**, *45* (8), 2561-2569.
288. Lin, S.; Van Lanen, S. G.; Shen, B. A free-standing condensation enzyme catalyzing ester bond formation in C-1027 biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **2009**, *106* (11), 4183-4188.
289. Stachelhaus, T.; Mootz, H. D.; Bergendahl, V.; Marahiel, M. A. Peptide bond formation in nonribosomal peptide biosynthesis. Catalytic role of the condensation domain. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273* (35), 22773-22781.
290. Keating, T. A.; Marshall, C. G.; Walsh, C. T.; Keating, A. E. The structure of VibH represents nonribosomal peptide synthetase condensation, cyclization and epimerization domains. *Nat. Struct. Biol.* **2002**, *9* (7), 522-526.
291. Samel, S. A.; Schoenafinger, G.; Knappe, T. A.; Marahiel, M. A.; Essen, L. O. Structural and functional insights into a Peptide bond-forming bidomain from a nonribosomal Peptide synthetase. *Structure.* **2007**, *15* (7), 781-792.
292. Tanovic, A.; Samel, S. A.; Essen, L. O.; Marahiel, M. A. Crystal Structure of the Termination Module of a Nonribosomal Peptide Synthetase. *Science* **2008**, *321*, 659-663.
293. Silakowski, B.; Nordsiek, G.; Kunze, B.; Blöcker, H.; Müller, R. Novel features in a combined polyketide synthase/non-ribosomal peptide synthetase: The myxalamid biosynthetic gene cluster of the myxobacterium *Stigmatella aurantiaca* Sga15. *Chemistry & Biology* **2001**, *8* (1), 59-69.

294. Lundgren, S.; Andersen, B.; Piskur, J.; Dobritzsch, D. Crystal structures of yeast beta-alanine synthase complexes reveal the mode of substrate binding and large scale domain closure movements. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282* (49), 36037-36047.
295. 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. *J. Antibiot.* **1998**, *51* (12), 1075-1080.
296. Hüttel, S.; Müller, R. Methods to optimize myxobacterial fermentations using off-gas analysis. *Microbial Cell Factories* **2012**, *11* (59), 1-11.
297. Ready, P. D. Epidemiology of visceral leishmaniasis. *Clinical Epidemiology* **2014**, *6*, 147-154.
298. White, N. J.; Pukrittayakamee, S.; Hien, T. T.; Faiz, M. A.; Mokuolo, O. A.; Dondorp, A. M. Malaria. *The Lancet* **2014**, *383* (9918), 723-735.
299. Krasnoff, S. B.; Gupta, S. Identification and directed biosynthesis of efrapeptins in the fungus *Tolypocladium geodes* gams (Deuteromycotina: Hyphomycetes). *J. Chem. Ecol.* **1991**, *17* (10), 1953-1962.
300. Boot, C. M.; Amagata, T.; Tenney, K.; Compton, J. E.; Pietraszkiewicz, H.; Valeriote, F. A.; Crews, P. Four classes of structurally unusual peptides from two marine-derived fungi: structures and bioactivities. *Tetrahedron Tetrahedron* **2007**, *63* (39), 9903-9914.
301. Boot, C. M.; Tenney, K.; Valeriote, F. A.; Crews, P. Highly *N*-methylated linear peptides produced by an atypical sponge-derived *Acremonium* sp. *J. Nat. Prod.* **2006**, *69* (1), 83-92.
302. Heinze, S.; Ritzau, M.; Ihn, W.; Hülsmann, H.; Schlegel, B.; Dornberger, K.; Fleck, W. F.; Zerlin, M.; Christner, C.; Gräfe, U.; Küllertz, G.; Fischer, G. Lipohexin, a new inhibitor of prolyl endopeptidase from *Moeszia lindneri* (HKI-0054) and *Paecilomyces* sp. (HKI-0055; HKI-0096). I. Screening, isolation and structure elucidation. *The Journal of Antibiotics (Tokyo)* **1997**, *50* (5), 379-383.
303. Lang, G.; Kalvelage, T.; Peters, A.; Wiese, J.; Imhoff, J. F. Linear and cyclic peptides from the entomopathogenic bacterium *Xenorhabdus nematophilus*. *J. Nat. Prod.* **2008**, *71* (6), 1074-1077.
304. Trimurtulu, G.; Ohtani, I.; Patterson, G. M. L.; Moore, R. E.; Corbett, T. H.; Valeriote, F. A.; Demchik, L. Total structures of cryptophycins, potent antitumor depsipeptides from the blue-green alga *Nostoc* sp. strain GSV 224. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116* (11), 4729-4737.
305. Chaganty, S.; Trimurtulu, G.; Heltzel, C.; Moore, R. E.; Yoshida, W. Y. Isolation and structure determination of cryptophycins 38, 326, and 327 from the terrestrial cyanobacterium *Nostoc* sp. GSV 224. *J. Nat. Prod.* **2004**, *67* (8), 1403-1406.
306. Arai, H.; Matsushima, Y.; Eguchi, T.; Shindo, K.; Kakinuma, K. Absolute stereochemistry of vicienistatin, a novel 20-membered macrocyclic lactam antitumor antibiotic. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39* (20), 3181-3184.
307. Shiono, Y.; Tsuchinari, M.; Shimanuki, K.; Miyajima, T.; Murayama, T.; Koseki, T.; Laatsch, H.; Funakoshi, T.; Takanami, K.; Suzuki, K. Fusaristatins A and B, two new cyclic lipopeptides from an endophytic *Fusarium* sp. *J. Antibiot.* **2007**, *60* (5), 309-316.
308. Choi, B. W.; Namikoshi, M.; Sun, F.; Rinehart, K. L.; Carmichael, W. W.; Kaup, A. M.; Evans, W. R.; Beasley, V. R. Isolation of linear peptides related to the hepatotoxins nodularin and microcystins. *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34* (49), 7881-7884.

309. Nishizawa, T.; Ueda, A.; Asayama, M.; Fujii, K.; Harada, K.; Ochi, K.; Shirai, M. Polyketide synthase gene coupled to the peptide synthetase module involved in the biosynthesis of the cyclic heptapeptide microcystin. *J. Biochem. (Tokyo)* **2000**, *127* (5), 779-789.
310. Peypoux, F.; Pommier, M. T.; Marion, D.; Ptak, M.; Das, B. C.; Michel, G. Revised structure of mycosubtilin, a peptidolipid antibiotic from *Bacillus subtilis*. *J. Antibiot.* **1986**, *39* (5), 636-641.
311. Aron, Z. D.; Dorrestein, P. C.; Blackhall, J. R.; Kelleher, N. L.; Walsh, C. T. Characterization of a new tailoring domain in polyketide biogenesis: the amine transferase domain of MycA in the mycosubtilin gene cluster. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (43), 14986-14987.
312. Marner, F. J.; Moore, R. E.; Hirotsu, K.; Clardy, J. Majusculamides A and B, two epimeric lipodipeptides from *Lyngbya majuscula* Gomont. *J. Org. Chem.* **1977**, *42* (17), 2815-2819.
313. Plaza, A.; Garcia, R.; Bifulco, G.; Martinez, J. P.; Hüttel, S.; Sasse, F.; Meyerhans, A.; Stadler, M.; Müller, R. Aetheramides A and B, potent HIV-inhibitory depsipeptides from a myxobacterium of the new genus "Aetherobacter". *Org. Lett.* **2012**, *14* (11), 2854-2857.
314. Matsumori, N.; Kaneno, D.; Murata, M.; Nakamura, H.; Tachibana, K. Stereochemical determination of acyclic structures based on carbon-proton spin-coupling constants. A method of configuration analysis for natural products. *J. Org. Chem.* **1999**, *64* (3), 866-876.
315. Meiser, P.; Weissman, K. J.; Bode, H. B.; Krug, D.; Dickschat, J. S.; Sandmann, A.; Müller, R. DKxanthene biosynthesis -- understanding the basis for diversity-oriented synthesis in myxobacterial secondary metabolism. *Chem. Biol.* **2008**, *15* (8), 771-781.
316. Schwecke, T.; Aparicio, J. F.; Molnar, I.; König, A.; Khaw, L. E.; Haydock, S. F.; Oliynyk, M.; Caffrey, P.; Cortes, J.; Lester, J. B.; Böhm, G. A.; Staunton, J.; Leadlay, P. F. The biosynthetic gene cluster for the polyketide immunosuppressant rapamycin. *P. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 7839-7843.
317. Moore, B. S.; Hertweck, C.; Hopke, J. N.; Izumikawa, M.; Kalaitzis, J. A.; Nilsen, G.; O'Hare, T.; Piel, J.; Shipley, P. R.; Xiang, L.; Austin, M. B.; Noel, J. P. Plant-like biosynthetic pathways in bacteria: from benzoic acid to chalcone. *J. Nat. Prod.* **2002**, *65* (12), 1956-1962.
318. Moffitt, M. C.; Louie, G. V.; Bowman, M. E.; Pence, J.; Noel, J. P.; Moore, B. S. Discovery of two cyanobacterial phenylalanine ammonia lyases: Kinetic and structural characterization. *Biochemistry-US* **2007**, *46* (4), 1004-1012.
319. Tillett, D.; Dittmann, E.; Erhard, M.; von Döhren, H.; Börner, T.; Neilan, B. A. Structural organization of microcystin biosynthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806: an integrated peptide-polyketide synthetase system. *Chem. Biol.* **2000**, *7* (10), 753-764.
320. Rouhiainen, L.; Paulin, L.; Suomalainen, S.; Hyytiäinen, H.; Buikema, W.; Haselkorn, R.; Sivonen, K. Genes encoding synthetases of cyclic depsipeptides, anabaenopeptilides, in *Anabaena* strain 90. *Mol. Microbiol.* **2000**, *37* (1), 156-167.
321. Magarvey, N. A.; Beck, Z. Q.; Golakoti, T.; Ding, Y.; Huber, U.; Hemscheidt, T. K.; Abelson, D.; Moore, R. E.; Sherman, D. H. Biosynthetic characterization and chemoenzymatic assembly of the cryptophycins. Potent anticancer agents from *Nostoc* cyanobionts. *Acs Chemical Biology* **2006**, *1* (12), 766-779.
322. Xu, Y.; Kersten, R. D.; Nam, S. J.; Lu, L.; Al-Suwailem, A. M.; Zheng, H.; Fenical, W.; Dorrestein, P. C.; Moore, B. S.; Qian, P. Y. Bacterial biosynthesis and maturation of the didemnin anti-cancer agents. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* (20), 8625-8632.
323. Cronan, J. E., Jr.; Littel, K. J.; Jackowski, S. Genetic and biochemical analyses of pantothenate biosynthesis in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **1982**, *149* (3), 916-922.

324. Ogasawara, Y.; Katayama, K.; Minami, A.; Otsuka, M.; Eguchi, T.; Kakinuma, K. Cloning, sequencing, and functional analysis of the biosynthetic gene cluster of macrolactam antibiotic vicensistatin in *Streptomyces halstedii*. *Chem. Biol.* **2004**, *11* (1), 79-86.
325. Ehmann, D. E.; Trauger, J. W.; Stachelhaus, T.; Walsh, C. T. Aminoacyl-SNACs as small-molecule substrates for the condensation domains of nonribosomal peptide synthetases. *Chem. Biol.* **2000**, *7* (10), 765-772.
326. Schupp, T.; Toupet, C.; Cluzel, B.; Neff, S.; Hill, S.; Beck, J. J.; Ligon, J. M. A *Sorangium cellulosum* (myxobacterium) gene cluster for the biosynthesis of the macrolide antibiotic soraphen A: Cloning, characterization, and homology to polyketide synthase genes from actinomycetes. *J. Bacteriol.* **1995**, *177* (13), 3673-3679.
327. Ligon, J.; Hill, S.; Beck, J.; Zirkle, R.; Molnar, I.; Zawodny, J.; Money, S.; Schupp, T. Characterization of the biosynthetic gene cluster for the antifungal polyketide soraphen A from *Sorangium cellulosum* So ce26. *Gene* **2002**, *285* (1-2), 257-267.
328. Gaitatzis, N.; Silakowski, B.; Kunze, B.; Nordsiek, G.; Blöcker, H.; Höfle, G.; Müller, R. The biosynthesis of the aromatic myxobacterial electron transport inhibitor stigmatellin is directed by a novel type of modular polyketide synthase. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277* (15), 13082-13090.
329. Frank, B.; Knauber, J.; Steinmetz, H.; Scharfe, M.; Blöcker, H.; Beyer, S.; Müller, R. Spiroketal polyketide formation in *Sorangium*: Identification and analysis of the biosynthetic gene cluster for the highly cytotoxic spirangienes. *Chem. Biol.* **2007**, *14*, 221-233.
330. Buntin, K.; Rachid, S.; Scharfe, M.; Blöcker, H.; Weissman, K. J.; Müller, R. Production of the antifungal isochromanone ajudazols A and B in *Chondromyces crocatus* Cm c5: biosynthetic machinery and cytochrome P450 modifications. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47* (24), 4595-4599.
331. Reeves, C. D.; Murli, S.; Ashley, G. W.; Piagentini, M.; Hutchinson, C. R.; McDaniel, R. Alteration of the substrate specificity of a modular polyketide synthase acyltransferase domain through site-specific mutations. *Biochemistry-US* **2001**, *40* (51), 15464-15470.
332. Wu, S. S.; Kaiser, D. Markerless deletions of pil genes in *Myxococcus xanthus* generated by counterselection with the *Bacillus subtilis* sacB gene. *J. Bacteriol.* **1996**, *178* (19), 5817-5821.
333. Weinig, S.; Mahmud, T.; Müller, R. Markerless mutations in the myxothiazol biosynthetic gene cluster: A delicate megasynthetase with a superfluous nonribosomal peptide synthetase domain. *Chemistry & Biology* **2003**, *10* (10), 953-960.
334. Tang, L.; Ward, S.; Chung, L.; Carney, J. R.; Li, Y.; Reid, R.; Katz, L. Elucidating the mechanism of *cis* double bond formation in epothilone biosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (1), 46-47.
335. Donadio, S.; Katz, L. Organization of the enzymatic domains in the multifunctional polyketide synthase involved in erythromycin formation in *Saccharopolyspora erythraea*. *Gene* **1992**, *111* (1), 51-60.
336. Sandmann, A.; Sasse, F.; Müller, R. Identification and analysis of the core biosynthetic machinery of tubulysin, a potent cytotoxin with potential anticancer activity. *Chem. Biol.* **2004**, *11* (8), 1071-1079.
337. Kopp, M.; Irschik, H.; Gross, F.; Perlova, O.; Sandmann, A.; Gerth, K.; Müller, R. Critical variations of conjugational DNA transfer into secondary metabolite multiproducing *Sorangium cellulosum* strains So ce12 and So ce56: development of a mariner-based transposon mutagenesis system. *J. Biotechnol.* **2004**, *107* (1), 29-40.

-
338. Beyer, S.; Kunze, B.; Silakowski, B.; Müller, R. Metabolic diversity in myxobacteria: identification of the myxalamid and the stigmatellin biosynthetic gene cluster of *Stigmatella aurantiaca* Sg a15 and a combined polyketide-(poly)peptide gene cluster from the epothilone producing strain *Sorangium cellulosum* So ce90. *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1445* (2), 185-195.
339. Schneider, S.; Mohamed, M. E.; Fuchs, G. Anaerobic metabolism of L-phenylalanine via benzoyl-CoA in the denitrifying bacterium *Thauera aromatica*. *Arch. Microbiol.* **1997**, *168* (4), 310-320.
340. Marsden, A. F.; Wilkinson, B.; Cortés, J.; Dunster, N. J.; Staunton, J.; Leadlay, P. F. Engineering broader specificity into an antibiotic-producing polyketide synthase. *Science* **1998**, *279* (5348), 199-202.
341. Mootz, H. D.; Schwarzer, D.; Marahiel, M. A. Construction of hybrid peptide synthetases by module and domain fusions. *P. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97* (11), 5848-5853.
342. Mootz, H. D.; Kessler, N.; Linne, U.; Eppelmann, K.; Schwarzer, D.; Marahiel, M. A. Decreasing the ring size of a cyclic nonribosomal peptide antibiotic by in-frame module deletion in the biosynthetic genes. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 10980-10981.
343. Kellenberger, L.; Galloway, I. S.; Sauter, G.; Böhm, G.; Hanefeld, U.; Cortes, J.; Staunton, J.; Leadlay, P. F. A polylinker approach to reductive loop swaps in modular polyketide synthases. *ChemBioChem* **2008**, *9* (16), 2740-2749.
344. Lau, J.; Fu, H.; Cane, D. E.; Khosla, C. Dissecting the role of acyltransferase domains of modular polyketide synthases in the choice and stereochemical fate of extender units. *Biochemistry-US* **1999**, *38* (5), 1643-1651.
345. SCRUTTON, N. S.; Berry, A.; Perham, R. N. Redesign of the coenzyme specificity of a dehydrogenase by protein engineering. *Nature* **1990**, *343* (6253), 38-43.
346. Trauger, J. W.; Kohli, R. M.; Mootz, H. D.; Marahiel, M. A.; Walsh, C. T. Peptide cyclization catalysed by the thioesterase domain of tyrocidine synthetase. *Nature* **2000**, *407* (6801), 215-218.