

**Untersuchungen zur Regulation der Antibiotika-  
produktion in Fermentationskulturen von  
*Streptomyces tendae* und *Amycolatopsis mediterranei***

**D i s s e r t a t i o n**

zur Erlangung des Grades eines Doktors  
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie  
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von  
Hartmut Grammel  
aus Reutlingen

2000

Tag der mündlichen Prüfung: 19.11.1999

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. W. Wohlleben

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Ing. Dr. h.c. mult. E.D. Gilles

Prof. Dr. rer. nat. H. Wolf

2. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. W. Wohlleben

Forschungsberichte aus dem Max-Planck-Institut  
für Dynamik komplexer technischer Systeme

Band 3

**Hartmut Grammel**

**Untersuchungen zur Regulation der Antibiotika-  
produktion in Fermentationskulturen von  
*Streptomyces tendae* und *Amycolatopsis mediterranei***

D 21 (Diss. Universität Tübingen)

Shaker Verlag  
Aachen 2000

Die Deutsche Bibliothek - CIP-Einheitsaufnahme

*Grammel, Hartmut:*

Untersuchungen zur Regulation der Antibiotikaproduktion in Fermentationskulturen von *Streptomyces tendae* und *Amycolatopsis mediterranei*/ Hartmut Grammel. - Als Ms. gedr. -

Aachen: Shaker, 2000

(Forschungsberichte aus dem Max-Planck-Institut für Dynamik komplexer technischer Systeme; Bd. 3)

Zugl.: Tübingen, Univ., Diss., 1999

ISBN3-8265-6884-2

Copyright Shaker Verlag 2000

Alle Rechte, auch das des auszugsweisen Nachdruckes, der auszugsweisen oder vollständigen Wiedergabe, der Speicherung in Datenverarbeitungsanlagen und der Übersetzung, vorbehalten.

Als Manuskript gedruckt. Printed in Germany.

ISBN 3-8265-6884-2

ISSN 1439-4804

Shaker Verlag GmbH • Postfach 1290 • 52013 Aachen

Telefon: 02407 / 95 96 - 0 • Telefax: 02407 / 95 96 - 9

Internet: [www.shaker.de](http://www.shaker.de) • eMail: [info@shaker.de](mailto:info@shaker.de)

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Ing. Dr. h.c. mult. E.D. Gilles und Herrn Prof. Dr. H. Wolf am Institut für Systemdynamik und Regelungstechnik der Universität Stuttgart angefertigt.

Für die Überlassung des Themas, sein Interesse an der Arbeit und seine ständige Diskussionsbereitschaft danke ich Herrn Prof. Dr. Ing. Dr. h.c. mult. E.D. Gilles.

Herrn Prof. Dr. W. Wohleben danke ich für die freundliche Übernahme des Mitberichtes.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. H. Wolf für viele wertvolle Anregungen und Diskussionen, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Allen Mitarbeitern am Institut für Systemdynamik und Regelungstechnik, insbesondere den Kollegen aus der Biogruppe sei für die ständige Hilfsbereitschaft und das freundschaftliche Arbeitsklima herzlich gedankt.

Abschließend möchte ich dem Bundesministerium für Bildung und Forschung für die Förderung dieser Arbeit im Rahmen des zentralen Schwerpunktprojektes Bioverfahrenstechnik danken.



# Inhaltsverzeichnis

<b>I. Einleitung</b> .....	1
1. Intrazelluläre Effektoren .....	3
2. Interzelluläre Effektoren .....	7
3. Entwicklungsdefekte Mutanten.....	8
4. <i>Streptomyces tendae</i> und <i>Amycolatopsis mediterranei</i> .....	10
<b>II. Material und Methoden</b> .....	15
1. Chemikalien .....	15
2. Nährmedien .....	16
3. Mikroorganismen .....	18
3.1. Antibiotikaproduzenten .....	18
3.2. Testorganismen .....	18
4. Kulturbedingungen.....	18
4.1. Stammhaltung.....	18
4.2. Schüttelkulturen.....	18
4.2.1. Vorkulturen für Fermentationen.....	18
4.2.2. Juglomycinproduktion.....	20
4.2.3. Erfassung des Produktspektrums und Produktion von Carbazolen ...	20
4.3. Fermentationen .....	20
5. Analytik.....	21
5.1. Trockengewichtsbestimmung.....	21
5.2. Bestimmung von Fructose und Glucose.....	21
5.3. Ammoniumbestimmung .....	22
5.4. Phosphatbestimmung.....	22
5.5. Aktivitätsbestimmung von alkalischer Phosphatase .....	22
5.6. RNA-Bestimmung.....	23
5.7. Extraktion und HPLC-Analytik von Nukleotiden.....	23

5.8. HPTLC-Analyse von LL-Diaminopimelinsäure .....	24
5.9. HPLC-Analyse von Nikkomycinen.....	25
5.10. HPLC-Analyse von Juglomycinen und Carbazolen.....	26
5.11. DC-Analyse von Juglomycinen.....	26
5.12. HPLC-Analyse von Balhimycin.....	27
6. Mutagenisierung von <i>S. tendae</i> .....	27
7. Isolierung von Wirkstoffen aus <i>S. tendae</i> .....	28
7.1. Isolierung von Juglomycin .....	28
7.2. Produktion und Isolierung von Carbazolen.....	28
8. Biologische Charakterisierung von Wirkstoffen.....	30
8.1. Bioautographie .....	30
8.2. Ermittlung antibiotischer Wirkungsspektren.....	30
8.3. Ermittlung minimaler Hemmkonzentrationen.....	31
8.3.1. Minimale Hemmkonzentrationen von Juglomycin .....	31
8.3.2. Minimale Hemmkonzentrationen von CS-79B und Carquinostatin A .....	32
8.4. Kreuzstreifentest zur Ermittlung antagonistischer Effekte .....	32
8.5. Hemmung von Enzymaktivitäten durch Juglomycin .....	33
8.5.1. Hemmung von Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase .....	33
8.5.2. Hemmung von Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase.....	34
8.5.3. Hemmung von Lactat-Dehydrogenase .....	35
<b>III. Ergebnisse</b> .....	37
1. HPLC-Nukleotidanalytik .....	37
2. Fermentationen mit <i>S. tendae</i> .....	38
2.1. Phosphatlimitierte Fermentation .....	40
2.2. Ammoniumlimitierte Fermentation.....	41
2.3. Fermentation mit Ammonium-Puls.....	44
2.4. Fermentation ohne Substratlimitation .....	47
3. Fermentationen mit <i>Amycolatopsis mediterranei</i> .....	49
3.1. Vergleich von Phosphatlimitation und Ammoniumlimitation .....	49
4. Bestimmung von Diaminopimelinsäure in Zellhydrolysaten .....	52
5. Untersuchung einer regulationsdefekten Mutante von <i>S. tendae</i> .....	55
5.1. Charakterisierung von <i>S. tendae bld-1</i> .....	55



5.2. Produktspektrum von <i>S. tendae</i> -Wildtyp und <i>bld-1</i> .....	57
5.3. Identifizierung von CS-79B und Carquinostatin A .....	59
5.4. Antibiotische Aktivitäten von CS-79B und Carquinostatin A .....	64
5.5. Fermentation .....	66
6. Untersuchung der autotoxischen Wirkung von Juglomycin .....	67
6.1. Produktion und Isolierung von Juglomycin .....	68
6.2. Wirkungsspektrum .....	71
6.3. Minimale Hemmkonzentrationen .....	71
6.4. Antagonisierung der antibiotischen Wirkung durch L-Cystein .....	73
6.5. Hemmung von Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase .....	75
6.6. Hemmung von Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase und Lactat-Dehydrogenase .....	77
<b>IV. Diskussion</b> .....	<b>81</b>
<b>V. Zusammenfassung</b> .....	<b>97</b>
<b>VI. Literatur</b> .....	<b>99</b>



## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ATCC	American Type Culture Collection, Rockville, USA
AU	Absorption Unit
d	Tage
DAD	Dioden-Array-Detektion
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig
G-6-PDH	Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
Glc	Glucose
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Connectivities
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HPTLC	High Performance Thin Layer Chromatography
L-Cys	L-Cystein
LDH	Lactat-Dehydrogenase
L-Gly	L-Glycin
LL-Dap	LL-Diaminopimelinsäure
MES	2-(N-Morpholino)-ethan-sulfonsäure
MHK	Minimale Hemmkonzentration
MHz	Megahertz
min	Minute
NdK	Nukleosiddiphosphat-Kinase
nm	Nanometer
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
1,4-NQ	1,4-Naphtochinon
P-ase	alkalische Phosphatase
pO <sub>2</sub>	Sauerstoffpartialdruck

RNAP	RNA-Polymerase
sec	Sekunde
Tab.	Tabelle
TG	Trockengewicht
Tü	Institut für Mikrobiologie/Biotechnologie der Universität Tübingen
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV/Vis	Ultraviolett/Visible
WT	Wildtyp

# I. Einleitung

Aufgrund ihrer Fähigkeit, eine Vielzahl unterschiedlicher biologisch aktiver Sekundärmetabolite zu bilden, haben Bakterien aus der Gruppe der Actinomyceten große wissenschaftliche und wirtschaftliche Bedeutung erlangt. Ausgehend von der Isolierung des Streptomycins 1944 durch Waksman aus *Streptomyces griseus* wurden inzwischen über 10.000 mikrobielle Sekundärstoffe isoliert, wobei ungefähr die Hälfte aus Actinomyceten, speziell der Gattung *Streptomyces*, stammt (LAATSCH, 1997). Neben der ursprünglichen antibakteriellen Anwendung werden diese Naturstoffe heute in vielen wichtigen Bereichen der Medizin, etwa zur Bekämpfung von Tumorerkrankungen, als Enzyminhibitoren oder Immunmodulatoren, sowie in der Landwirtschaft als Herbizide, Fungizide und Insektizide eingesetzt.

Ungeachtet ihrer großen Bedeutung ist die biologische Funktion der meisten Sekundärmetabolite für den Produzenten nicht bekannt. Auch die Kenntnis der Biosynthesewege vieler Antibiotika und ihrer Regulation ist nach wie vor sehr lückenhaft. Der aus der Pflanzenphysiologie übernommene Begriff Sekundärstoffwechsel weist zwar darauf hin, daß dieser Stoffwechselbereich im Gegensatz zum Primärstoffwechsel für das vegetative Wachstum des Produzenten nicht essentiell ist, dennoch ist zu vermuten, daß die sekundären Metabolite im natürlichen Ökosystem einen positiven Selektionsfaktor darstellen. So sind zum Beispiel die Biosynthesegene häufig in hochorganisierten Genclustern angeordnet, die außer für die eigentlichen Synthesenzyme auch für Resistenzfaktoren gegen das jeweilige Antibiotikum und für spezifische Regulatorproteine codieren (CHATER & BIBB, 1997).

Neben ihrem enormen Stoffwechselfpotential sind die grampositiven Actinomyceten durch ein pilzähnliches filamentöses Wachstum und einen im Vergleich zu den meisten anderen Prokaryonten außerordentlich komplexen Entwicklungszyklus gekennzeichnet. Die Zellen wachsen zunächst als verzweigtes Substratmyzel, wobei sie sich saprophytisch mit Hilfe extrazellulärer Hydrolasen von organischem Material im Boden ernähren. Bei Nährstoffmangel oder anderen ungünstigen Lebensbedingungen differenzieren die Hyphen zu einem Luftmyzel, das sich von der wässrigen Umgebung der Kolonieoberfläche abhebt. Während dieser Phase beginnt das Substratmyzel zu lysieren, offenbar um zur Nährstoffversorgung des

Luftmyzels beizutragen. Die weiteren Entwicklungsschritte sind bei verschiedenen Actinomyceten unterschiedlich ausgestaltet. Die große Gruppe der Streptomyceten entwickelt durch Septierung der Hyphen Ketten von pigmentierten hydrophoben Exosporen, die eine Vermehrung der Kolonie, die Besiedlung neuer Lebensräume und das Überdauern ungünstiger Lebensbedingungen erlauben. Im Gegensatz zu den Endosporen der Bacillen und Clostridien sind sie nicht hitzeresistent, vertragen aber Trockenheit.

Bei den *Nocardiaceae* weist das Luftmyzel der alternden Kolonie dagegen die Tendenz auf, in stäbchenförmige Einzelzellen zu fragmentieren, aus denen wieder neue Myzelien heranwachsen. Da eine echte Differenzierung mit einem Sporenstadium fehlt, wird hier also nur ein vereinfachter Entwicklungszyklus durchgeführt.

Der Beginn der Antibiotikabildung korreliert typischerweise mit dem Beginn der morphologischen Differenzierung, so daß der Sekundärmetabolismus als physiologische Ausprägung des Differenzierungsgeschehens betrachtet werden kann.

Demgegenüber kann in Submerskultur in der Regel keine normale Differenzierung bzw. Sporulation durchgeführt werden. Unter solchen Bedingungen findet man die Produktbildung üblicherweise nur während reduzierter Wachstumsraten oder während der stationären Phase. Hohe Wachstumsraten unterdrücken den Sekundärstoffwechsel. Für die Beschreibung des Wachstums- und Produktionsverhaltens in einer Batch-Kultur wurden daher die Begriffe Trophophase (= Wachstumsphase) und Idiophase (= Produktionsphase) eingeführt. Die Synchronität von Morphogenese und Sekundärmetabolismus sowie die Isolierung von Mutanten, die Defekte in beiden Prozessen zeigen, führten zu der Vermutung, daß zumindest für einen Teil der Sekundärstoffe eine Funktion bei der Differenzierung bzw. Sporulation der Produzenten besteht (BEPPU, 1992).

Das Verständnis der an der Regulation der morphologischen und physiologischen Differenzierung beteiligten Mechanismen konnte erst in den letzten Jahren deutlich verbessert werden. Dabei hat sich gezeigt, daß eine Vielzahl verschiedener Faktoren an der Regulation der Antibiotikasyntese beteiligt sind. Die Aufgabe, unterschiedliche Signale aus der Umwelt wahrzunehmen, zu integrieren und eine entsprechende Reaktion darauf hervorzurufen, erfordert ein komplexes Regulationsnetzwerk, durch welches schließlich auch die Sekundärstoffbildung induziert wird. Zentrale Bestandteile dieses Netzwerkes bilden global und spezifisch wirkende regulatorische Gene, sowie intrazelluläre und extrazelluläre Effektormoleküle (CHATER & BIBB, 1997).

## 1. Intrazelluläre Effektoren

Da die Produktbildung typischerweise von wachstumslimitierenden Nährstoffkonzentrationen abhängig ist, kommt den Anpassungsmechanismen von Zellen an ungünstige Ernährungsbedingungen auch hinsichtlich der Induktion des Sekundärmetabolismus entscheidende Bedeutung zu. Bei *Escherichia coli* wurde beobachtet, daß bereits bei Fehlen einer Aminosäure ein schneller Stop der RNA-Synthese erfolgt, wobei vor allem die stabilen RNA-Arten rRNA und tRNA betroffen sind. Dieses Verhalten wird als „stringente Kontrolle“ bezeichnet und bewahrt die Organismen davor, unter Bedingungen die kein Wachstum erlauben weiterhin Ressourcen und Energie für die Bereitstellung von Zellbaustoffen zu verbrauchen (CASHEL et al., 1996). Mutanten, die diese Abhängigkeit zwischen der Verfügbarkeit von Aminosäuren und der RNA-Synthese nicht zeigen, werden „relaxed“ (*rel*) genannt und haben wesentlich dazu beigetragen die Auswirkungen der stringenten Kontrolle auf die Physiologie der Zelle bis in die molekularen Details aufzuklären. *Rel*-Mutanten zeigen gegenüber dem Wildtyp deutliche Defekte bei der Wiederaufnahme des Wachstums nach Hungerperioden und werden in Mischpopulationen schnell ausselektiert (HECKER, et al., 1986). Dadurch wird die Bedeutung der stringenten Kontrolle für die Aufrechterhaltung der Zellökonomie deutlich.

Auf molekularer Ebene spielen sich folgende Prozesse ab: Unter Aminosäuremangelbedingungen können keine Aminoacyl-tRNA-Moleküle für die Proteinbiosynthese mehr bereitgestellt werden. Durch die Anlagerung unbeladener tRNA an die Akzeptor-Stelle des Ribosoms wird ein ribosomenassoziiertes Enzym, das *relA*-Genprodukt, aktiviert. Dieses Enzym katalysiert durch die Übertragung eines Pyrophosphatrestes von ATP auf GTP oder GDP die Synthese der Signalkleotide Guanosin-5'-triphosphat-3'-diphosphat (pppGpp) bzw. Guanosin-5'-diphosphat-3'-diphosphat (ppGpp). PppGpp ist ein kurzlebige Produkt und wird durch eine Phosphohydrolase (*gpp*) in ppGpp umgewandelt, so daß dieses als das eigentliche Effektormolekül der stringenten Kontrolle betrachtet wird. An der Signalübertragung am Ribosom ist das durch das *relC* Gen codierte, ribosomale Protein L11 der 50S Untereinheit beteiligt. Neben RelA existiert in *E. coli* ein zweites, ppGpp-synthetisierendes Enzym, das als SpoT bezeichnet wird. SpoT ist im Cytoplasma lokalisiert und stellt eine

(p)ppGpp 3'-Pyrophosphohydrolase dar, die zusätzlich eine 3'-Pyrophosphotransferaseaktivität mit GTP als Akzeptor besitzt. Dieses Enzym wird für die (p)ppGpp-Synthese bei Energiemangelzuständen verantwortlich gemacht. Im Gegensatz dazu sprechen verschiedene experimentelle Befunde und Sequenzdaten dafür, daß bei grampositiven Bakterien nur ein *relA/spoT* homologes Gen existiert, dessen Produkt sowohl für die Synthese wie für den Abbau von ppGpp verantwortlich ist (WENDRICH & MAHARIEL, 1997).

Unter dem Einfluß von ppGpp erfolgt eine weitgehende Umgestaltung des Genexpressionsmusters der Zellen, die als Anpassung des Stoffwechsels an die neuen, ungünstigeren Wachstumsbedingungen zu verstehen ist.

Die Wirkung von ppGpp beruht auf einer Änderung der Initiationsfrequenz der Transkription. Über welchen Mechanismus dieser Effekt hervorgerufen wird, ist noch nicht vollständig geklärt. Nach dem klassischen Modell ändert sich durch Anlagerung von ppGpp an eine spezifische Bindungsstelle auf der RNA-Polymerase (RNAP) die Promotorselektivität des Enzyms. Der Stop der RNA-Synthese kommt durch die verminderte Affinität der RNAP zum Promotor P1 der betreffenden Gene zustande.

Demgegenüber besteht nach dem passiven Modell von JENSEN & PEDERSEN (1990) die unmittelbare Wirkung in der Verminderung der Elongationsrate der Transkription, die dazu führt, daß der Pool an freien RNAP-Molekülen abnimmt. Unter der Annahme, daß stringent kontrollierte Promotoren im Gegensatz zu den meisten mRNA-Promotoren auch bei hohen Enzymkonzentrationen nicht mit RNAP gesättigt sind, kommt es zu einer indirekten, scheinbar selektiven Inhibierung der Initiation der Transkription.

Neben der drastischen Hemmung der Syntheserate von stabiler RNA wird eine Vielzahl weiterer zellulärer Funktionen beeinflusst (Abb. 1). So werden beispielsweise alle Prozesse, die dem Aufbau von Zellmasse dienen, wie DNA-Replikation, Peptidoglycansynthese oder Phospholipidsynthese inhibiert. Bei einer anderen Gruppe von Genen kommt es unter diesen Bedingungen dagegen zu einer verstärkten Expression. Dazu gehören einige Operons der Aminosäurebiosynthese wie das *His*-Operon oder das *rpoS*-Gen, das für einen Sigmafaktor codiert, der die selektive Expression von Genen, die während der stationären Phase aktiv sind, bewirkt (GENTRY et al., 1993). Neuerdings wurden überraschenderweise auch Gene als Bestandteile des stringenten Kontrolle-Netzwerkes identifiziert, die unter bestimmten Bedingungen den Zelltod herbeiführen (NYSTRÖM, 1998).

Ein Zusammenhang zwischen stringenter Kontrolle und der Induktion des Sekundärstoffwechsels bei Streptomyceten wurde bereits 1979 von SIMUTH et al., (1979) vermutet. Insbesondere die Arbeiten von OCHI (1986a, 1986b, 1987a, 1987b, 1988, 1990a) unterstützen



die Hypothese von einer Schlüsselrolle für ppGpp bei der Regulation der Antibiotikasythese. So wurde bei *S. lavendulae* MA406-A-1 ein 8-facher Anstieg der Formycinproduktion nach einer Akkumulation von ppGpp als Folge eines Aminosäuremangels beobachtet (OCHI, 1986b). Bei verschiedenen Streptomyccetenstämmen konnten *relC*-Mutanten selektioniert werden, die reduzierte ppGpp-Spiegel und Defekte in der Produktion der jeweiligen Antibiotika zeigen (OCHI, 1990b). Allerdings ist zu beachten, daß diese Korrelationen nicht unbedingt einen ursächlichen Zusammenhang bedeuten. *RelC*-Mutanten wachsen nur mit stark reduzierten Wachstumsraten und sind in der Proteinsynthese geschädigt, was möglicherweise zu den beobachteten Effekten führt. BASCARAN et al., (1991) finden keinen obligatorischen Zusammenhang zwischen ppGpp-Spiegeln und der Cephalosporinproduktion in *S. clavuligerus*.

Auch bei dem molekularbiologisch am meisten bearbeiteten Stamm *S. coelicolor* ergeben die vorliegenden Erkenntnisse noch kein klares Bild (BIBB, 1996). Die Transkription von spezifischen Aktivatorproteinen für die Antibiotika Undecylprodigiosin (Red) und Actinorhodin (Act) beginnt nach einer ppGpp-Akkumulation am Ende der exponentiellen Wachstumsphase (STRAUCH et al., 1991; TAKANO et al., 1992). Deletion des größten Teils der codierenden Region des *relA*-Gens führte zwar zum Verlust der Produktion von Red und Act und zu einer veränderten Koloniemorphologie mit verzögerter Luftmyzelbildung, jedoch konnten diese Effekte nur unter N-Mangelbedingungen und abhängig von der Wachstumsphase, in der die Limitation auftrat, beobachtet werden (CHAKRABURTTY & BIBB, 1997). Die Fähigkeit von ppGpp, die Antibiotikabildung auszulösen, ist demzufolge von einer Reihe weiterer physiologischer Faktoren abhängig.

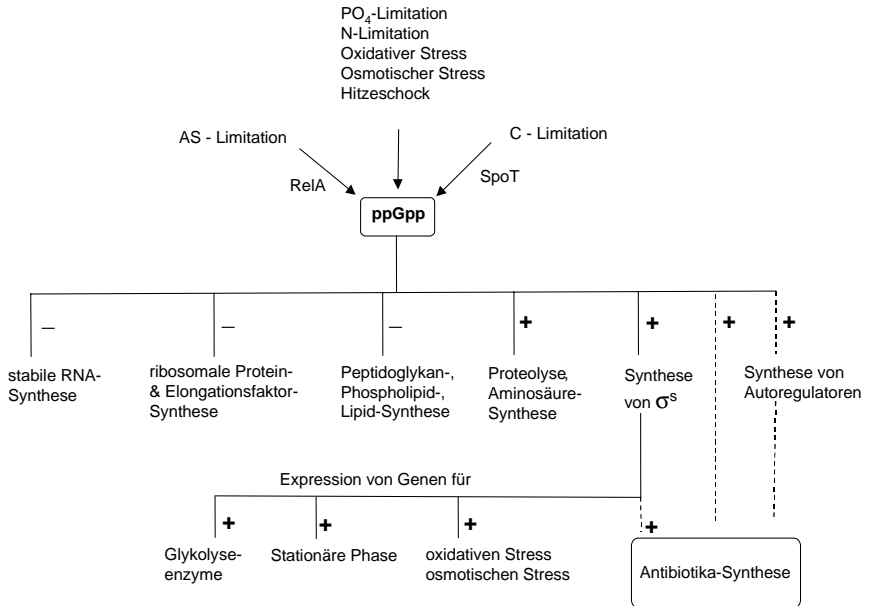


Abb. 1. Schematische Darstellung des stringenten Kontrolle-Modulons (modifiziert nach NYSTRÖM, 1998). Gestrichelte Linien: Zusammenhang ist hypothetisch

-: Hemmung  
+: Aktivierung

Auch für GTP sind regulatorische Funktionen bekannt. Bei Eukaryonten spielt die nicht-kovalente Bindung von GTP an Proteine eine wichtige Rolle bei vielen Signaltransduktionsprozessen wie etwa der Vermittlung von Hormonwirkungen. Dabei gewährleisten GTP-Bindeproteine die Informationsübertragung von membrangebundenen Rezeptoren zu den intrazellulären Signalverarbeitungssystemen. Auch bei Prokaryonten finden sich zunehmend Beispiele für spezifische Interaktionen von Proteinen mit GTP (AHNN, et al., 1986; KOK et al., 1994). GTP-Bindeproteine und guanylierte Proteine konnten auch in *S. coelicolor* und *S. griseus* nachgewiesen werden (OBAYA & GUIJARRO, 1993; ITOH et al., 1996). Das *obg*-Gen aus *S. griseus* codiert für ein Protein, das einen Sensor für den intrazellulären GTP-Gehalt darzustellen scheint. Überexpression von *Obg* führt zum Verlust der Luftmyzelbildung, ohne die Streptomycinsynthese zu beeinflussen (OKAMOTO et al., 1997). Eine Abnahme des GTP-

Spiegels korreliert mit dem Beginn der Sporulation bei Streptomyceten und bei *Bacillus subtilis* (OCHI et al., 1981; OCHI, 1986a).

## 2. Interzelluläre Effektoren

Bei vielen Bakteriengruppen findet bei hohen Zelldichten eine intensive interzelluläre stoffliche Kommunikation zwischen Zellen derselben Spezies statt. In einem Prozess, der Autoinduktion genannt wird, können Bakterien ihre Populationsdichte erkennen und als Reaktion darauf spezielle Gruppen von Genen anschalten.

Autoinduktormoleküle der gramnegativen Bakterien sind N-Acyl-L-Homoserinlactone. Diese Verbindungen können aufgrund ihres amphiphilen Charakters problemlos Zellmembranen passieren und lösen bei Überschreiten eines Schwellenwerts eine spezifische Reaktion aus. Bereits eine Konzentration von 10 nM bewirkt eine halbmaximale Induktion so unterschiedlicher Prozesse wie Biolumineszenz bei *Vibrio fischeri* und *Vibrio harveyi*, Virulenz des Pflanzenpathogens *Erwinia carotovora* und des opportunistisch humanpathogenen Bakteriums *Pseudomonas aeruginosa* oder die konjugative Übertragung des Tumor-induzierenden Plasmids bei *Agrobacterium tumefaciens* (GEIGER, 1994).

$\gamma$ -Butyrolactone, wie der aus *S. griseus* isolierte A-Faktor (2*R*-hydroxymethyl-3-oxocaproyl- $\gamma$ -Butyrolacton), stellen eine wichtige Gruppe von endogenen Regulatoren der Differenzierung bei Streptomyceten dar. Bei *S. griseus* sind die Streptomycinsynthese, die Streptomycin-resistenz und die Bildung von Luftmyzel von A-Faktor-Konzentrationen im Bereich von 1 nM abhängig (HORINOUCHI & BEPPU, 1994).

Die Übertragung des A-Faktor Signals verläuft über das im Cytoplasma lokalisierte A-Faktor-Rezeptorprotein ArpA. Dieses Protein fungiert als Repressor, der durch Bindung des A-Faktors die Expression eines noch nicht identifizierten Regulatorgens freigibt und dadurch über eine Kaskade weiterer regulatorischer Proteine den Beginn des Sekundärstoffwechsels und der Luftmyzelbildung einleitet (HORINOUCHI & BEPPU, 1994).

Die Anwesenheit von  $\gamma$ -Butyrolactonstrukturen und *arpA*-homologer DNA-Sequenzen in einer Vielzahl weiterer Streptomyceten sprechen für eine allgemeine Rolle dieser Substanzen als Signalmoleküle oder mikrobielle Hormone bei der Differenzierung dieser Organismengruppe. Daneben wurden jedoch auch strukturell völlig andersartige Autoregulatoren wie

Hormaoomycin (ANDRES et al., 1989), B-Faktor (KAWAGUCHI et al., 1984) oder Germicidin (PETERSEN et al., 1993) gefunden, um nur einige wenige zu nennen.

### 3. Entwicklungsdefekte Mutanten

Genetische Hinweise auf eine koordinierte Regulation von Morphogenese und Antibiotika-produktion liefert die Isolierung von Mutanten, die in beiden Prozessen blockiert sind. Besonders auffällig sind zwei Typen von Mutanten mit den Phänotypbezeichnungen „bald“ (*bld*) und „white“ (*whi*) (CHATER, 1993). *Bld*-Mutanten haben die Fähigkeit zur Bildung von Luftmyzel und Sporen verloren, wohingegen *whi*-Mutanten in einem späteren Entwicklungsschritt blockiert sind und lediglich in der Sporulation Defekte zeigen, während Luftmyzel normal gebildet wird. Von den unterschiedlichen Klassen von *bld*-Mutanten, die bei *S. coelicolor* beschrieben wurden, konnte bislang nur die Funktion von *bldA* molekulargenetisch genauer charakterisiert werden. Interessanterweise codiert *bldA* für die einzige tRNA in *S. coelicolor*, die das Leu-Codon UUA erkennt (LAWLOR et al., 1987). Dieses Codon tritt in der mRNA von Streptomyceten, die einen hohen G+C-Gehalt von ungefähr 70 % besitzen, nur selten auf und ist auf Gene beschränkt, die gegen Ende der Wachstumsphase exprimiert werden. Beispiele hierfür sind die Gene *actII-ORF2* und *actII-ORF4* aus dem *act* Cluster von *S. coelicolor*, die für ein Actinorhodin-Exportprotein und für einen Transkriptionsaktivator codieren (FERNANDEZ-MORENO et al., 1991) sowie das für die Undecylprodigiosinbildung benötigte Regulatorgen *redZ* (WHITE & BIBB, 1997). In *S. griseus* finden sich TTA-Codons in Genen, die an der Regulation der Streptomycinsynthese, der Streptomycinresistenz und an der Morphogenese beteiligt sind (LESKIW et al., 1991).

Die Expression von *bldA* scheint posttranskriptional reguliert zu sein. Obwohl der *bldA*-Promotor während der gesamten Wachstumsphase aktiv ist, fanden LESKIW et al., (1993), daß das Prozessieren des 5'-Endes des Primärtranskripts zur reifen Leucyl-tRNA mit dem Absinken der Wachstumsrate zunimmt. Das *bldA*-Gen könnte also einen regulatorischen Mechanismus zur Kontrolle von morphologischer und physiologischer Differenzierung auf der Ebene der Translation darstellen.

Die Funktion der *whi*-Gene in *S. coelicolor* konnte ebenfalls teilweise aufgeklärt werden. *WhiE* ist für die Produktion des Sporen-Polyketidpigments zuständig (CHATER, 1993). Das Produkt von *whiG* stellt den Sigmafaktor  $\sigma^{\text{WhiG}}$  dar. Homologe konnten nur bei Aktino-

mycetengattungen gefunden werden die Luftmyzel und Sporen bilden, nicht jedoch bei solchen ohne Sporenbildung (CHATER, 1993).

Selektive Erkennung von Promotoren durch unterschiedliche Sigmafaktoren stellt einen weit verbreiteten Mechanismus zur Regulation der Genexpression insbesondere bei Differenzierungsprozessen dar. Bei *Bacillus subtilis* wird die Endosporenbildung durch das sukzessive Erscheinen von vier verschiedenen Sigmafaktoren kontrolliert (ERRINGTON, 1993). Neben  $\sigma^{\text{WhiG}}$  sind aus *S. coelicolor* weitere Sigmafaktoren bekannt. Zumindest der Faktor  $\sigma^{\text{F}}$  spielt eine Rolle bei der Sporenreifung (POTUCKOVA et al., 1995). Die Heterogenität der Promotorsequenzen in Streptomyceten läßt die Entdeckung zusätzlicher Sigmafaktoren erwarten.

Selbstverständlich können die beschriebenen Regulationssysteme nicht als isoliert wirkende Einheiten betrachtet werden. Vielmehr ist von einem komplexen hierarchisch aufgebauten Stoffwechsel- und Regulationsnetzwerk auszugehen, in dem sich die einzelnen Bestandteile gegenseitig in vielfältiger Weise beeinflussen.

Ein Beispiel hierfür liefert die Synthese des Sigma-Faktors  $\sigma^{\text{s}}$  in *E. coli*. Nach einem von HUISMAN & KOLTER (1994) vorgeschlagenen Modell beginnt die Signalverarbeitungskaskade mit einem durch Nährstoffmangel ausgelösten Anstieg von ppGpp. Durch Stimulation der Aminosäuresynthese häufen sich, durch Endprodukthemmung von Syntheseenzymen, intrazellulär unter anderem Zwischenstufen der Threonin-Synthese wie Homoserin und Homoserinphosphat an. Diese Verbindungen können zu Homoserinlactonen zyklisieren. Bei hohen Zelldichten kommt es zu einer Acylierung der intrazellulären Signalmoleküle, wodurch diese Zellmembranen passieren können und in ein extrazelluläres Signal umgewandelt werden. Homoserinlactone induzieren die Expression von *rpoS*, dessen Genprodukt  $\sigma^{\text{s}}$  wiederum die Expression von mindestens 30 weiteren Genen reguliert.

#### 4. *Streptomyces tendae* und *Amycolatopsis mediterranei*

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Actinomycetenstämme mit unterschiedlichem Differenzierungsverhalten bearbeitet. *Streptomyces tendae* Tü 901/8c produziert eine Reihe strukturell unterschiedlicher biologisch aktiver Verbindungen, darunter Nikkomycine und Juglomycine (Abb. 3). Der Entwicklungszyklus verläuft in Oberflächenkultur über Substratmyzel, Luftmyzel und Sporulation. Demgegenüber treten bei dem Balhimycin-Produzenten *Amycolatopsis mediterranei* DSM 5908 als Vertreter der nocardioformen Actinomyceten nur zwei Zelltypen, Myzel und fragmentierte Einzelzellen auf (Abb. 2).

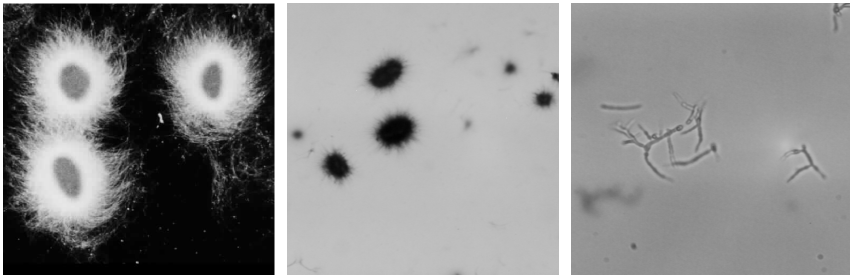


Abb. 2. Links: Pellets von *S. tendae* in Submerskultur (Dunkelfeldaufnahme, Vergr. x 12,5)  
 Mitte: Pellets von *A. mediterranei* in Submerskultur (Vergr. x 25)  
 Rechts: Fragmentiertes Myzel von *A. mediterranei* (Vergr. x 400)

Die am intensivsten bearbeiteten Sekundärmetabolite aus *S. tendae* stellen die zu den Nucleosidpeptid-Antibiotika gehörenden Nikkomycine dar. Aufgrund ihrer Struktur analogie zu UDP-N-Acetylglucosamin wirken sie als kompetitive Hemmstoffe der Chitinsynthasen von Pilzen, Insekten und Milben und kommen daher für den Einsatz als Pflanzenschutzmittel in Betracht (ZOEBELEIN & KNEIHASE, 1985). Seit kurzem wird Nikkomycin Z für eine humanmedizinische Anwendung, der oralen Behandlung systemischer Mykosen, biotechnisch produziert.

Biosynthese und Regulation der Nikkomycine sind bislang erst in Grundzügen verstanden. Die über 20 aus Kulturfiltraten von *S. tendae* Tü 901 isolierten Nikkomycine lassen sich anhand der Struktur der organischen Basen im Nucleosidteil des Moleküls in zwei Gruppen einteilen. Zum Nikkomycin X Typ gehörende Komponenten besitzen eine Imidazolgrup-

pierung, die durch eine Histidin-Aminotransferase übertragen wird, während Verbindungen der Z-Gruppe einen Uracilrest tragen. Die ungewöhnliche Aminosäure Hydroxypyridylhomothreonin, die den Peptidylteil bildet, wird aus Lysin und einem bislang nicht identifiziertem C<sub>4</sub>-Körper gebildet (SOMMER, 1983). Insgesamt werden für die Synthese des vollständigen Moleküls ungefähr 25 enzymatische Schritte postuliert (FIEDLER, 1995).

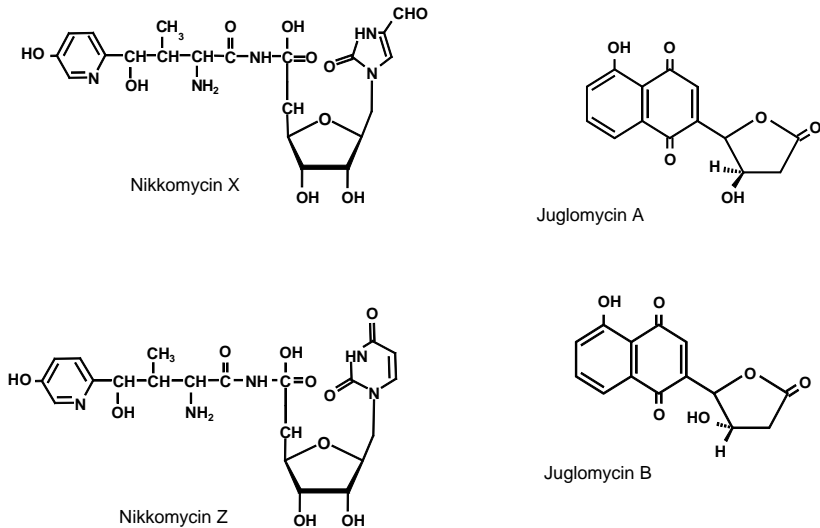


Abb. 3. Nikkomycine und Juglomycine aus *S. tendae* Tü 901/8c

Inzwischen liegt das Nikkomycinsynthese-Gencluster kloniert vor und konnte in *S. lividans* zur Expression gebracht werden (BORMANN et al., 1996).

Untersuchungen zur Regulation der Nikkomycinbildung zeigten eine Abhängigkeit der Produktion von der Wachstumsrate bzw. von der Verfügbarkeit der Substrate Ammonium und Phosphat (HEGE-TRESKATIS et al., 1992). In Submerskultur wächst *S. tendae* in Form sphärischer Pellets, deren Größe und Form von den Kultivierungsbedingungen abhängt (Abb. 2). Zusammenhänge zwischen Morphologie und Produktbildung wurden von TRESKATIS et al., (1997) mit digitalen Bildverarbeitungsmethoden eingehend untersucht und beschrieben.

Juglomycine gehören zu den in der Natur weit verbreiteten Naphtochinonen und sind antibiotisch aktiv gegen Bakterien und Tumorzellen. Im Gegensatz zu den Nikkomycinen

existiert im Produzenten ein für Juglomycine sensibler Wirkort, so daß *S. tendae* durch sein eigenes Produkt im Wachstum gehemmt wird.

Als weitere Inhaltsstoffe aus *S. tendae* Tü 901/8c wurden bisher beschrieben: Die Makrolide Chlorothricin und Bromothricin, die als Acetyl-CoA-Antagonisten antibakterielle Hemmstoffe der Pyruvat-Carboxylase darstellen (FIEDLER, 1993), das als Isoleucin-Antagonist wirkende Ketomycin (LANGHÄRIG, 1978), sowie das Siderophor Desferrioxamin E (FIEDLER, 1993).

*A. mediterranei* produziert das zur Vancomycin-Gruppe gehörende Glykopeptid-Antibiotikum Balhimycin (Abb. 4; NADKARNI et al., 1994). Die Biosynthese des Peptidrückgrats erfolgt nicht-ribosomal durch Peptidsynthetasen an einem Multienzymkomplex. Die aromatischen Aminosäureseitenketten tragen verschiedene Substituenten wie Hydroxylgruppen, den un-gewöhnlichen Zucker Dehydrovancosamin und Chloratome.

Ähnlich wie Vancomycin zeigt Balhimycin biologische Aktivität gegen Methicillin-resistente Staphylokokken und gegen Anaerobier und ist somit für eine Anwendung als Notfall-Antibiotikum von medizinischem Interesse.

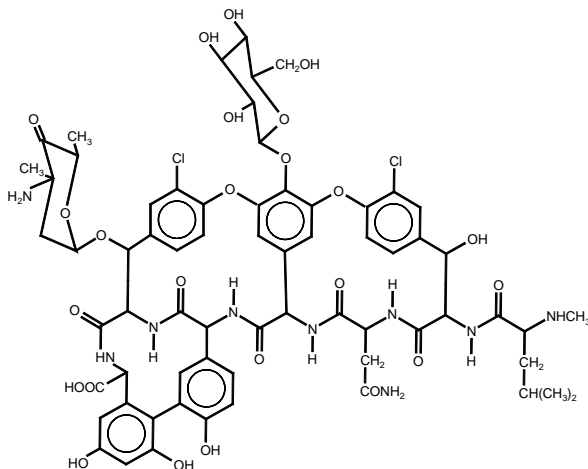


Abb. 4. Struktur von Balhimycin



---

Die Aufgabenstellung der vorliegenden Arbeit bestand darin, physiologische Faktoren zu identifizieren und zu charakterisieren, welche für die Produktion von Nikkomycin und Balhimycin in Fermentationsprozessen wesentlich sind. Dabei sollte durch quantitative Bestimmung der intrazellulären Nukleotidverläufe die Beteiligung der stringenten Kontrolle an der Regulation abgeschätzt werden. Über die Selektion und Fermentation von entwicklungsdefekten Mutanten sollte untersucht werden, inwieweit morphologische Differenzierung und Nikkomycinsynthese durch gemeinsame übergeordnete Regulationen kontrolliert werden.

Da Juglomycine aufgrund ihrer Autotoxizität, Wachstum und Nikkomycinbildung des Produzenten beeinflussen können, wurden minimale Hemmkonzentrationen dieser Antibiotika bestimmt und Untersuchungen zur Wirkungsweise durchgeführt.



## II. Material und Methoden

### 1. Chemikalien

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

Acriflavin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Bacto-Agar	Difco Laboratories, Augsburg
Baylube 150 GL	Rhein Chemie, Mannheim
DL- $\alpha,\epsilon$ -Diaminopimelinsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase	Roche Diagnostics, Mannheim
Hexansulfonsäure	Fluka AG, Buchs, Schweiz
L-Lactat-Dehydrogenase	Roche Diagnostics, Mannheim
Nukleotide	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Sephadex LH-20	Amersham, Pharmacia Biotech, Freiburg
Sojamehl, vollfett	Henselwerk, Magstadt
Sojapepton	Oxoid, Deutschland, Wesel
UV-Test D-Glucose	Roche Diagnostics, Mannheim

Für HPLC wurde Reinstwasser aus einer Milli-Q Anlage (Millipore) verwendet.

## 2. Nährmedien

Sämtliche Nährmedien wurden 20 Minuten bei 121°C autoklaviert oder sterilfiltriert. Der pH-Wert wurde vor dem Sterilisieren mit NaOH bzw. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> eingestellt. Die Gewichtsangaben beziehen sich auf 1 Liter Wasser, wobei für Komplexmedien Leitungswasser und für definierte Medien entionisiertes Wasser verwendet wurde. Zur Herstellung fester Nährböden wurde den Medien 20 g/l Agar zugesetzt.

### Medium 1

Glucose	4 g
Hefeextrakt	4 g
Malzextrakt	10 g
pH 7,2	

### Medium 2

Glucose	30 g
Hefeextrakt	5 g
Sojamehl	20 g

### Medium 3

Stärke	20 g
Pepton	5 g
Hefeextrakt	2,5 g
pH 7,2	

### Medium 4

Sojamehl	20 g
Mannit	20 g
pH 7,2	

### Medium 5

Bacto antibiotic medium 3	17,5 g
---------------------------	--------

### Medium 6

Caseinhydrolysat	5 g
Hefeextrakt	5 g
Na <sub>3</sub> -Citrat * 2H <sub>2</sub> O	3 g
KCl	2 g
MgSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O	20 g
FeSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O	50 mg
Mn SO <sub>4</sub> * H <sub>2</sub> O	0,2 mg
NaCl	200 g
pH 7,4	

### Medium 7

Glucose	4 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> * 3H <sub>2</sub> O	9,2 g
Na <sub>3</sub> -Citrat * 2H <sub>2</sub> O	0,5 g
MgSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O	0,1 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1 g
pH 7,2	

Nährmedien für Fermentation:

Tab. 1. Fermentationsmedien für *S. tendae*

	<u>Medium 8</u> (Vorkultur 2)	<u>Medium 9</u> phosphat- limitiert	<u>Medium 10</u> ammonium- limitiert	<u>Medium 11</u> Ammonium- Puls	<u>Medium 12</u> unlimitiert
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> * 3H <sub>2</sub> O [mM]	2,5	2,5	4,0	6,0	6,0
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> [mM]	25	100	20	20	50
Glucose [g/l]	30	40	40	40	40
MES [mM]	50	-	-	-	-
NaCl [g/l]	1	1	2	1	1,2
MgSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O [g/l]	1	1	2	1	1,2
FeSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O [mg/l]	20	20	30	20	24
ZnSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O [mg/l]	10	10	15	10	12
MnSO <sub>4</sub> * H <sub>2</sub> O [mg/l]	7	7	11	7	8,4
CaCl <sub>2</sub> * 2H <sub>2</sub> O [mg/l]	100	100	150	100	120
Na <sub>3</sub> -Citrat * 2H <sub>2</sub> O [mg/l]	230	230	345	115	276
pH	7,0	geregelt	geregelt	geregelt	geregelt

Tab. 2. Fermentationsmedien für *A. mediterranei*

	<u>Medium 13</u> (Vorkultur 2)	<u>Medium 14</u> phosphatlimitiert	<u>Medium 15</u> ammoniumlimitiert
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> * 3H <sub>2</sub> O [mM]	1,5	1,5	12,0
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> [mM]	75	75	20
Fructose [g/l]	40	40	40
MES [mM]	50	-	-
NaCl [g/l]	1	1	1
MgSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O [g/l]	1,5	1,5	2
FeSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O [mg/l]	20	20	20
ZnSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O [mg/l]	20	20	20
MnSO <sub>4</sub> * H <sub>2</sub> O [mg/l]	10	10	10
CaCl <sub>2</sub> * 2H <sub>2</sub> O [mg/l]	10	10	10
Na <sub>3</sub> -Citrat * 2H <sub>2</sub> O [mg/l]	230	230	230
pH	7,0	geregelt	geregelt

### 3. Mikroorganismen

#### 3.1. Antibiotikaproduzenten

*Streptomyces tendae* Tü 901/8c

*Amycolatopsis mediterranei* DSM 5908

#### 3.2. Testorganismen

Die in Tab. 3 aufgeführten Mikroorganismen dienten als Testkeime zur Ermittlung antibiotischer Wirkungsspektren von Inhaltsstoffen aus *S. tendae*.

### 4. Kulturbedingungen

#### 4.1. Stammhaltung

*S. tendae* wurde in Form von Sporensuspensionen (ca.  $10^7$  Sporen/ml Wasser) bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Von *A. mediterranei* und den in Tab. 3 aufgeführten Mikroorganismen wurden Glycerinkulturen (50 % Glycerin) hergestellt und ebenfalls bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

#### 4.2. Schüttelkulturen

##### 4.2.1. Vorkulturen für Fermentationen

Zwei 500 ml Erlenmeyerkolben mit je 110 ml Medium 2 wurden mit je 0,5 ml einer Sporensuspension bzw. einer Glycerinkultur beimpft und bei  $27^{\circ}\text{C}$  und 140 Upm auf einer Schüttelmaschine (New Brunswick Scientific, Edison, USA) inkubiert. Zur besseren Durchlüftung waren die Kolben mit Drahtspiralen aus Edelstahl versehen. Nach 48 h wurden 45 ml aus diesen Kulturen in 900 ml Medium 8 bzw. Medium 13 in 2 l Erlenmeyerkolben

überimpft und erneut 48 Stunden geschüttelt. Diese Vorkulturen dienen anschließend als Inokulum der Fermenter.

Tab. 3. Verwendete Testorganismen und Inkubationstemperatur

<u>Organismus</u>	<u>Inkubationstemp. [°C]</u>
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> DSM 3069	27
<i>Arthrobacter aurescens</i> ATCC 13344	27
<i>Arthrobacter crystallopoites</i> ATCC 15481	27
<i>Arthrobacter globiformis</i> ATCC 8010	27
<i>Arthrobacter oxydans</i> ATCC 14358	27
<i>Arthrobacter pascens</i> ATCC 13346	27
<i>Arthrobacter simplex</i> ATCC 19566	27
<i>Bacillus migulanus</i> ATCC 9999	37
<i>Bacillus subtilis</i> DSM 10	37
<i>Brevibacterium linens</i> ATCC 9172	37
<i>Brevibacterium sterolicum</i> ATCC 21387	37
<i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC 14067	27
<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> ATCC 9682	27
<i>Erwinia amylovora</i> ATCC 15580	27
<i>Escherichia coli</i> A 19	37
<i>Escherichia coli</i> H 560	37
<i>Halobacterium halobium</i> DSM 670	37
<i>Klebsiella planticola</i> DSM 3069	27
<i>Lactobacillus casei</i> DSM 20011	37
<i>Micrococcus luteus</i> DSM 348	27
<i>Micrococcus roseus</i> ATCC 178	27
<i>Myxococcus</i> sp. ATCC 13556	27
<i>Pichia pastoris</i> GS 115	27
<i>Pseudomonas saccharophila</i> ATCC 15946	27
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> DSM 1334	37
<i>Xanthomonas oryzae</i> ATCC 35934	27

#### 4.2.2. Juglomycinproduktion

Um geeignete Bedingungen für die Produktion und Isolierung von Juglomycin zu finden wurde *S. tendae* zunächst in 500 ml Erlenmeyerkolben mit jeweils 100 ml der Medien 1, 2, 3, 4 und 8 bei 27 °C mit 140 Upm geschüttelt. Täglich wurde aus einer steril entnommenen Probe der Juglomycingehalt durch HPLC überprüft. Das Medium mit den höchsten Konzentrationen wurde für die Produktion in vier 2-Liter Erlenmeyerkolben mit je 700 ml Kulturvolumen verwendet.

#### 4.2.3. Erfassung des Produktspektrums und Produktion von Carbazolen

Zum Vergleich des Produktspektrums zwischen *S. tendae* und der entwicklungsdefekten Mutante *S. tendae bld-1* wurden beide Stämme in 500 ml Medium 8 in 2 l Erlenmeyerkolben angezogen (Animpfvolumen 2%) und 7 d bei 27 °C und 140 Upm inkubiert.

Die Produktion der Carbazol-Komponenten erfolgte in Schüttelkulturen (Gesamtvolumen 10 l) in Medium 1.

### 4.3. Fermentationen

Alle Fermentationen wurden in Edelstahl-Rührkesselreaktoren durchgeführt. Die Temperierung und in situ-Sterilisation erfolgte über einen beheizbaren Doppelmantel. Als physikalisch-chemische Prozessparameter wurden Temperatur, Druck, Fermentergewicht, pH und pO<sub>2</sub> on-line erfasst. Die Regelung des pH- und des pO<sub>2</sub>-Wertes erfolgte über ein Prozessleitsystem der Firma AEG durch Zudosierung von 1 N NaOH, bzw. durch Begasung mit steriler Druckluft. Schaumbildung wurde durch Zufuhr von Baylube unterdrückt.

Die Entnahme von Proben erfolgte über ein sterilisierbares Probenahmeventil oder mittels einer Schlauchpumpe über einen Silikonschlauch. Die eingestellten Fermentationsparameter sind in Tab. 4 aufgeführt.



Tab. 4. Fermentationsparameter

Organismus	<i>S. tendae</i>				<i>A. mediterranei</i>	
Betriebsweise	phosphat-limitiert	ammonium-limitiert	Ammonium-Puls	unlimitiert	phosphat-limitiert	ammonium-limitiert
Fermentertyp	MBR				Bioengineering NLF22	
Arbeitsvolumen	50 l				12 l	
Temperatur	27 °C				27 °C	
pH	6,0				6,0	
Rührerdrehzahl	100 Upm	100 Upm	350 Upm	400Upm	variabel*	variabel
pO <sub>2</sub>	60 %	12,5 l/min	12,5 l/min	20 l/min	60 %	60 %
Inokulum	10 %	5 %	5 %	5 %	5 %	5 %

\*: Regelung des pO<sub>2</sub>-Wertes über variable Rührerdrehzahl

## 5. Analytik

### 5.1. Trockengewichtsbestimmung

Zur Bestimmung des Trockengewichts wurden 5-10 ml Probe durch vorgewogenes trockenes Filterpapier unter Vakuum filtriert. Die Filter mit den Myzelien wurden über Nacht bei 100 °C getrocknet, im Exsikkator abgekühlt und schließlich auf einer Analysenwaage gewogen. Das Trockengewicht ergab sich dann aus der Massendifferenz vor und nach der Filtration. Es wurden stets Dreifachbestimmungen durchgeführt.

### 5.2. Bestimmung von Fructose und Glucose

Die als C-Quellen eingesetzten Monosaccharide Glucose und Fructose wurden über einen enzymatischen Test von Roche Diagnostics GmbH, Mannheim erfasst. Das Testprinzip ist aus den drei nachfolgend aufgeführten Reaktionen ersichtlich. Da reduzierte Nikotinamid-nukleotide ein Absorptionsmaximum bei 340 nm besitzen, lässt sich die Zuckerkonzentration aus der optischen Messung des gebildeten NADPH+H<sup>+</sup> bei dieser Wellenlänge bestimmen.

Reaktion 1: Hexokinase:

D-Glucose (D-Fructose) + ATP  $\longrightarrow$  Glucose-6-Phosphat (Fructose-6-Phosphat) + ADP

Reaktion 2: Glucosephosphatisomerase (nur bei Fructosebestimmung)

Fructose-6-Phosphat  $\longrightarrow$  Glucose-6-Phosphat

Reaktion 3: Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase:

Glucose-6-Phosphat + NADP<sup>+</sup>  $\longrightarrow$  6-Phosphogluconat + NADPH + H<sup>+</sup>

### 5.3. Ammoniumbestimmung

Es wurde der Harnstoff-Test der Fa. Merck, Darmstadt verwendet. Dabei werden Ammonium-ionen mit Phenol-Nitroperussid und alkalischer Hypochloridlösung zu einem blauen Indol-farbstoff umgesetzt, welcher photometrisch bei 620 nm gemessen wird. Die Intensität des Farbstoffs ist proportional zur Ammoniumkonzentration.

### 5.4. Phosphatbestimmung

Es kam der Phosphattest der Fa. Merck, Darmstadt zum Einsatz. Anorganisches Phosphat reagiert mit Natriummolybdat zu Phosphomolybdat. Dieses wird mit Methylaminophenolsulfat zu Molybdänblau reduziert. Die Farbintensität ist dem Gehalt an Phosphationen proportional und wird durch Extinktionsmessung bei 750 nm bestimmt.

### 5.5. Aktivitätsbestimmung von alkalischer Phosphatase

Alkalische Phosphatase wurde als extrazelluläres Enzym nachgewiesen wie bei ORZEGOWSKI & MÜLLER (1984) beschrieben. Dazu wurden 0,1 ml Kulturüberstand mit 0,4 ml Nitrophenylphosphat-Lösung versetzt und 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach dem Abstoppen der Enzymreaktion mit 10 % Trichloressigsäure und Neutralisation mit 10 % NaOH erfolgte die Messung der Extinktion bei 405 nm.

## 5.6. RNA-Bestimmung

5-10 ml Kultur wurden 10 min bei 4800 Upm zentrifugiert und das Sediment anschließend mit 5 ml eiskalter 0,25 N Perchlorsäure 30 min im Eisbad inkubiert. Danach wurde die Probe erneut zentrifugiert und das Sediment mit 0,5 N Perchlorsäure 15 min im Wasserbad bei 70 °C dreimal hintereinander extrahiert. Nach Vereinigung der Extrakte erfolgte die Bestimmung des RNA-Gehalts nach der Methode von MEYBAUM (1939). Hierbei nutzt man die Eigenschaft von Pentosen aus, mit Orcinol unter Mitwirkung von  $\text{FeCl}_3$  und HCl einen beständig grünen Farbkomplex zu bilden.

67  $\mu\text{l}$  Probe wurden mit 200  $\mu\text{l}$  Reaktionslösung 18 min bei 90 °C inkubiert. Nach dem Abkühlen im Wasserbad wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 ml n-Butanol gestoppt und die Extinktion bei 672 nm gemessen. Als Standard diente in Perchlorsäure gelöste RNA aus Bäckerhefe.

## 5.7. Extraktion und HPLC-Analytik von Nukleotiden

Für die Extraktion von Nukleotiden wurden 50-100 ml Kultur mit einem Papierfilter (Durchmesser 50 mm) abfiltriert und das Myzel mit dem Filter sofort in ein Zentrifugenglas mit 10 ml eiskalter 1 N Ameisensäure transferiert. Nach 30 min Inkubation bei 4 °C wurden 5 ml des Ameisensäureextraktes lyophilisiert und der Rückstand in 300  $\mu\text{l}$  deionisiertem Wasser aufgenommen. Unlösliche Bestandteile wurden bei 13000 Upm, 5 min abzentrifugiert und der Überstand mittels HPLC in Anlehnung an die Methode von OCHI (1986b) analysiert.

Folgendes HPLC-System kam zum Einsatz:

HPLC-System:	Sykam, München
Pumpe:	Sykam Pumpe S 1000 + Niederdruckgradientenmodul S8110
Detektion:	200-400 nm, Photo-Dioden-Array Detektor, Waters W 991
Autosampler:	Jasco 851
Datensystem:	Sykam Software Axxi-Chrom 747
Trennsäule :	Partisil PXS SAX, 10 $\mu\text{m}$ , 250 x 4 mm (Whatman)
Vorsäule:	Partisil PXS SAX, 10 $\mu\text{m}$ , 20 x 4 mm (Whatman)
Flußrate:	1,6 ml/min
Laufzeit:	60 min

Injektionsvolumen: 100  $\mu$ l  
 Elutionsmittel: A: 7 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 4,0  
 B: 0,5 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  + 1 M NaCl, pH 5,4  
 C: 0,1 N  $\text{H}_2\text{SO}_4$

Elutionsgradient:

<u>Zeit [min]</u>	<u>% A</u>	<u>% B</u>	<u>% C</u>
0	100	0	0
15	80	20	0
35	53	47	0
40	0	100	0
60	0	100	0
61	0	0	100
69	0	0	100
70	100	0	0

Für die Überlassung eines ppGpp-Standards danke ich Herrn Prof. Dr. Rolf Wagner, Institut für Physikalische Biologie, Universität Düsseldorf.

## 5.8. HPTLC-Analyse von LL-Diaminopimelinsäure

Die Analyse des LL-Diaminopimelinsäuregehalts diente der Erfassung der Mureinsynthese während der Fermentation und erfolgte in Anlehnung an die Methode von BECKER et al., (1964). 20 ml Kultur wurde nach der Probenahme gefriergetrocknet. Von dem lyophilisierten Zellmaterial wurden 10 mg abgewogen und in Glasröhrchen (Durchmesser 10 mm) mit 1 ml 6 N HCl transferiert. Nach dem Zuschmelzen der Röhrchen, erfolgte eine Inkubation bei 100 °C für 18 h. Nach dieser Säurehydrolyse wurden die Proben neutralisiert, filtriert (Millipore GV filters, 0,22  $\mu$ m) und lyophilisiert. Der trockene Rückstand wurde in 1 ml deionisiertem Wasser gelöst und 1  $\mu$ l davon mit einem Desaga TLC Applicator AS 30 auf HPTLC-Platten (Cellulose, mikrokristallin, Merck, Darmstadt) aufgetragen. Für die Chromatographie wurde eine horizontale Trennkammer, 50 x 50 mm (Desaga) verwendet. Als Laufmittel diente Methanol-Wasser-10 N HCL-Pyridin (80 : 17,5 : 2,5 : 10). Die Laufstrecke betrug 50 mm. Auf jeder Platte wurden verschiedene Konzentrationen eines Standards (DL- $\alpha$ , $\epsilon$ -

Diaminopimelic acid, Mischung aus LL-, DD- und meso-Isomeren, Sigma, Deisenhofen.) mit-chromatographiert und daraus eine Eichkurve ermittelt. Von allen Proben wurden Doppel-bestimmungen durchgeführt.

Zur Detektion von Aminosäuren wurden die Platten 30 sec in einer Glas-Petrischale mit einer Ninhydrin-Lösung gefärbt, an der Luft getrocknet und anschließend 3 min bei 100 °C entwickelt.

Die quantitative Auswertung erfolgte durch das densitometrische Abtasten der Chromatogramme mit einem Desaga Densitometer CD 60 bei 425 nm. Über die Spektrometerfunktion des Geräts konnte von den einzelnen Substanzflecken UV/Vis-Spektren aufgenommen werden.

## 5.9. HPLC-Analyse von Nikkomycinen

Die Bestimmung der Nikkomycinkonzentration in Kulturüberständen erfolgte durch HPLC nach der bei FIEDLER (1981) beschriebenen Methode. Der Zusatz von Hexansulfonsäure als Ionenpaarreagenz führt dazu, daß sich die polaren Nikkomycine auch durch reversed-phase-Chromatographie auftrennen lassen. Bei der Auswertung wurden die Konzentrationen der Nikkoymcine I, J, X und Z zur Gesamt-Nikkomycinkonzentration zusammengefaßt.

Folgendes HPLC-System kam zum Einsatz:

HPLC-System:	Waters 600 Multisolvent Delivery System
Detektion:	280 nm, Waters Lambda-max Modell 481 UV-Detektor
Autosampler:	Waters 712 Wisp
Integrator:	Waters 740 Data Module
Trennsäule:	Shandon Hypersil ODS, 5 µm, 125 mm x 4,0 mm
Vorsäule:	Shandon Hypersil ODS, 5 µm, 20 mm x 4,0 mm
Flußrate:	1,5 ml/min
Laufzeit:	30 min
Injektionsvolumen:	10 µl
Elutionsmittel:	A: 10 mM Hexansulfonsäure + 2 ml konz. Essigsäure B: 20 mM Hexansulfonsäure + 3,33 ml konz. Essigsäure C: Acetonitril

Elutionsgradient:

<u>Zeit [min]</u>	<u>% A</u>	<u>% B</u>	<u>% C</u>
0,0	85	9	6
5,3	72	17	11
11,3	72	17	11
12,0	56	26	18
21,3	34	40	26
22,7	85	9	6
34,0	85	9	6

Durch Verwendung des aufgeführten Elutionsgradienten ließen sich auch die Juglomycine mit diesem System erfassen.

## 5.10. HPLC-Analyse von Juglomycinen und Carbazolen

Die Bestimmung von Juglomycinen und Carbazolderivaten aus einer entwicklungsdefekten Mutante von *S. tendae* erfolgte durch reversed-phase-HPLC an einer Nucleosil ODS Trennsäule (250 mm x 4 mm) mit folgendem Elutionssystem:

Laufmittel A: 0,1 % Phosphorsäure; Laufmittel B: Acetonitril.

Linearer Gradient von 0-100 % B in 20 min; Flußrate: 1,5 ml/min; Injektionsvolumen 20 µl.

Die Geräteausstattung war ansonsten mit der unter 5.7. beschriebenen identisch.

## 5.11. DC-Analyse von Juglomycinen

Alternativ zum HPLC-Verfahren wurden Juglomycine durch Dünnschichtchromatographie analysiert. Hierbei kamen HPTLC-Kieselgelplatten 60 F 254 (Merck) zum Einsatz. Als Laufmittel diente Dichlormethan-Methanol-Essigsäure (950 : 50 : 1). Für die Aufnahme von UV/Vis-Spektren (200-600 nm) von einzelnen Substanzflecken wurde ein Desaga CD 60 Spektrometer verwendet.

## 5.12. HPLC-Analyse von Balhimycin

Balhimycin aus Kulturüberständen von *A. mediterranei* wurde durch HPLC bestimmt. Die Konfiguration der Anlage sowie die verwendeten Vor- und Trennsäulen entsprachen der Nikkomycinanalytik (s. 5.9.)

Als Elutionssystem wurde eingesetzt:

Laufmittel A: 0,1% Trifluoressigsäure, Laufmittel B: Acetonitril.

Gradient:

<u>Zeit [min]</u>	<u>% A</u>	<u>% B</u>
0,0	90	10
4,5	85	15
8,0	70	30
8,1	90	10
10,0	90	10

UV-Detektion erfolgte bei 280 nm.

## 6. Mutagenisierung von *S. tendae*

Zur Selektion entwicklungsdefekter Mutanten von *S. tendae* wurden 100 µl Sporen auf HA-Agarplatten (Medium 1) ausplattiert, die mit 5 µg/ml Acriflavin (Mischung aus 3,6-Diamino-10-Methylacridiniumchlorid und 3,6-Diaminoacridin, Sigma, Deisenhofen) supplementiert waren. Nach 7 d Inkubation bei 27 °C wurden Kolonien visuell auf Defekte in der Luftmyzelbildung überprüft. Eine *bld*-Mutante, deren Phänotyp abhängig von der Art der verwendeten Kohlenstoffquelle (Glucose oder Mannit) war, wurde für weitere Untersuchungen ausgewählt.

## 7. Isolierung von Wirkstoffen aus *S. tendae*

### 7.1. Isolierung von Juglomycin

Um die autotoxische Wirkung von Juglomycin auf *S. tendae* zu untersuchen, musste zuerst eine ausreichende Menge Reinsubstanz dieses Antibiotikums hergestellt werden. Dazu wurde *S. tendae* in vier 2 l Erlenmeyerkolben mit je 700 ml Medium 2 angezogen. Nach drei Tagen Inkubation wurden die Myzelien durch Filtration abgetrennt, das Kulturfiltrat mit 3 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> auf pH 3 eingestellt und mit dem gleichen Volumen Ethylacetat extrahiert. Die organische Phase mit den Juglomycinen wurde dann bis zur Trockene eingeengt und der Rückstand in 2,5 ml Methanol gelöst. Die weitere Aufreinigung der organischen Phase erfolgte durch Gel-filtration an Sephadex LH-20 (Korngröße 25-100 µm). Die Glassäule (Säulendurchmesser 2,5 cm, Bettvolumen 90 ml) wurde mit 1 ml Probenlösung beschickt und mit Methanol bei einer Flußrate von 1,5 ml/min eluiert. Das Eluat wurde in Form von 5-10 ml Fraktionen gesammelt und mittels HPLC auf den Juglomycingehalt untersucht.

Während der Lagerung bei -20 °C fielen in einigen der LH-20 Fraktionen goldfarbene Kristalle aus, die UV/Vis-spektroskopisch als Juglomycin identifiziert werden konnten. 10 mg dieser Kristalle wurden in 1 ml Methanol gelöst und dienten als Juglomycin-Standard.

Die verbleibenden Juglomycin-haltigen Fraktionen wurden vereinigt und nach Einengung des Volumens am Rotationsverdampfer auf 15,5 ml, als Juglomycin-Rohextrakt für Untersuchungen zur Autotoxizität verwendet.

### 7.2. Produktion und Isolierung von Carbazolen

*S. tendae bld-1* wurde auf HA-Agar (Medium 1) angezchtet und in demselben Medium in einer Schüttelkultur mit 10 l Gesamtvolumen 52 h bei 27 °C kultiviert. Nach Extraktion der Kultur mit Ethylacetat und dem Entfetten mit Cyclohexan, wurde der Extrakt am Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingeengt und der Rückstand in 50 ml Methanol aufgenommen. Die methanolische Lösung wurde auf eine Sephadex LH-20 Chromatographie-säule (Länge 70 mm, Durchmesser 30 mm) aufgetragen und mit Methanol als mobiler Phase eluiert. Die produkthaltigen Fraktionen wurden vereinigt, einrotiert und der Rückstand durch präparative Dickschichtchromatographie an Kieselgelplatten mit Chloroform-Methanol (19 : 1) als Laufmittel aufgetrennt. Dadurch wurden zwei Produkte erhalten. Die Endreinigung



erfolgte durch präparative HPLC an einer reversed-phase C-18 Säule (Eurosphere 5  $\mu\text{m}$ , 250 mm x 16 mm) durch Elution mit Acetonitril/Wasser (7 : 3) bei einer Flußrate von 12,5 ml/min. Beide Carbazole konnten als Reinsubstanzen gewonnen werden (Retentionszeiten: CS-79B: 3,2 min, Carquinostatin A: 3,0 min). Als Hauptprodukt wurden 23 mg CS-79B erhalten. Die Ausbeute an Carquinostatin A betrug 2,4 mg.

Die Identifizierung der beiden Metabolite als CS-79B und Carquinostatin A gelang durch massenspektrometrische Bestimmung der Molekülmassen und die Ermittlung der chemischen Strukturen durch IR-Spektroskopie,  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie.

Geräteausstattungen:

Präparative HPLC: 2 Pumpen Knauer Typ 64, Knauer Software V2.11, Aufgabe-Ventil Knauer (Rheodyne) mit 500 Mikroliter Probenschleife. Detektion mittels Knauer Spektrophotometer A0293.

IR-Spektroskopie: Perkin-Elmer 1600 Series FTIR, Probe als KBr-Pressling.

Massenspektroskopie: EI-MS mit Varian MAT 95 A (70 eV), Hochauflösung mit Perfluorkerosin als Vergleichssubstanz und ESI-MS mit Finnigan LCQ mit Spritzenpumpe.

$^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -NMR Spektroskopie: Varian XL 200 (200/50,3 MHz), Varian VXR 200 (300/75,5 MHz), Bruker WM 300 (300/75,5 MHz), Varian INOVA 500 (500/125,7 MHz).

Für die Reinigung der Carbazole und die Durchführung der Messungen zur Struktur-  
aufklärung danke ich den Herren Dr. F. Huth und Prof. Dr. H. Laatsch, Institut für Organische  
Chemie, Universität Göttingen.

## 8. Biologische Charakterisierung von Wirkstoffen

### 8.1. Bioautographie

Unter Bioautographie versteht man die Lokalisation antibiotischer Aktivitäten auf einer Dünnschichtchromatographieplatte durch einen biologischen Test. So wurden die Inhaltsstoffe des Juglomycin-Rohextraktes auf antibiotische Wirkungen gegen *B. subtilis* geprüft, indem Proben von Substanzflecken einer Kieselgelplatte mittels eines vorher zugeschnittenen Klebestreifens (Tesa-Film) abgelöst und auf Agarplatten (Medium 5) aufgelegt wurden. Die Testplatten wurden zuvor mit einer Sporensuspension von *B. subtilis* beimpft (2,5 ml Sporensuspension/l) und bis zur Auswertung des Tests 24 h bei 37 °C bebrütet. Substanzen mit antibiotischen Eigenschaften machen sich durch Hemmzonen im Bereich des jeweiligen Klebestreifen bemerkbar.

### 8.2. Ermittlung antibiotischer Wirkungsspektren

Antibiotische Wirkungsspektren von Juglomycin und den Carbazolen CS-79B und Carquinostatin A wurden mit Hilfe des Agardiffusionstests aufgenommen. Dazu wurden 100 µl einer Übernachtskultur von verschiedenen Mikroorganismen (s. Tab. 3) mit 10-15 ml Nähragar vermischt und in Petrischalen ausgegossen. Als Komplexmedium wurde Medium 5, als chemisch definiertes Medium, Medium 7 verwendet. *Halobacterium halobium* wurde in Medium 6 gezüchtet.

10-15 µg des zu testenden Agens wurden auf Filterpapierscheibchen (Durchmesser 6 mm) aufgetragen und nach Trocknung an Luft auf die Testplatten gelegt. Als Kontrollen dienen 10 µg einer Streptomycinlösung bzw. 10 µl Lösungsmittel. Nach 24-48 h Inkubationsdauer bei 27 °C oder 37 °C wurden die Hemmhöfe ausgemessen.

### 8.3. Ermittlung minimaler Hemmkonzentrationen

Die Bestimmung der minimalen Hemmkonzentrationen (MHK) von Juglomycin, CS-79B und Carquinostatin A auf verschiedene Testkeime erfolgte mit einem Verdünnungstest. Dabei wurde das Antibiotikum in abgestuften Konzentrationen (Faktor 0,5), zu der mit dem Testkeim beimpften Nährlösung gegeben. Die niedrigste Konzentration, die das Auswachsen des Inokulums verhinderte, stellte die minimale Hemmkonzentration dar.

Um festzustellen, ob das Antibiotikum eine bakterizide Wirkung besitzt oder ob die Zellen lediglich am Wachstum gehindert werden (bakteriostatische Wirkung), wurde der Ansatz, der die MHK des Antibiotikums enthielt, durch Zugabe von wirkstofffreiem Nährmedium unter die inhibitorische Antibiotikumskonzentration verdünnt und erneut bebrütet. Erfolgte dadurch eine Vermehrung von Zellen, handelte es sich um eine bakteriostatische Wirkung.

#### 8.3.1. Minimale Hemmkonzentrationen von Juglomycin

Vorkulturen mit den Testorganismen *S. tendae* und *B. subtilis* wurden solange mit Minimalmedium (Medium 8 bzw. Medium 7) verdünnt, bis visuell keine Trübung mehr zu erkennen war. Von dieser Verdünnung wurden jeweils 995 µl in sterile Reagenzgläser pipettiert und mit 5 µl einer Juglomycin-Lösung versetzt.

Die Juglomycinkonzentrationen in den Teströhrchen lagen bei *B. subtilis* zwischen 16,25 µg/ml und 0,003 µg/ml. *S. tendae* reagiert im Vergleich dazu weniger empfindlich auf Juglomycin. Hier wurden Konzentrationen zwischen 26 µg/ml und 1,25 µg/ml getestet. Kontrollen bestanden in einem wirkstofffreien Ansatz und in der Verwendung von 5 µl Lösungsmittel. Nach Inkubation der Röhrchen (48 h, 27 °C), erfolgte die Erfassung des Zellwachstums durch visuelle Beurteilung der Trübung.

Gegen weitere Organismen, die sich als sensitiv gegen Juglomycin erwiesen, wurden die MHK-Werte durch einen Verdünnungstest in Mikrotiterplatten ermittelt. Dazu wurden Übernachtskulturen der Testorganismen 1:100 mit Minimalmedium (Medium 7) verdünnt. 1,5 µl einer Juglomycin-Verdünnungsreihe (10 µg/ml, 5 µg/ml, 1 µg/ml, 0,5 µg/ml und 0,1 µg/ml) wurden in die Kammern der Mikrotiterplatte pipettiert und nach Abdampfen des Lösungsmittels mit 150 µl der verdünnten Testkulturen versetzt. Um eine bessere Durchlüftung des Mediums während der Inkubation in der Schüttelmaschine (27°C, 24 h) zu gewährleisten, wurde jeder Kammer eine sterile Glasperle (Durchmesser 2 mm) zugegeben.

Zum Schutz gegen Austrocknung der Mikrokulturen wurden die äußeren Kammern der Platte mit Wasser gefüllt.

Die Unterscheidung zwischen bakterizider und bakteriostatischer Wirkung erfolgte durch Auftropfen von gerade nicht bewachsener Nährlösung auf Agarplatten (Medium 5). Durch Diffusion in den Agar fällt die Konzentration des Antibiotikums unter die MHK, so daß bei bakteriostatischer Wirkung ein Wachstum der Mikroorganismen auf der Platte einsetzt.

### 8.3.2. Minimale Hemmkonzentrationen von CS-79 B und Carquinostatin A

Die Bestimmung der MHK-Werte von CS-79B und Carquinostatin A gegen ausgewählte Testkeime erfolgte in Kulturröhrchen mit Medium 5. Übernachtkulturen der Testorganismen wurden mit Medium verdünnt, bis keine Trübung mehr zu erkennen war und anschließend mit unterschiedlichen Verdünnungsstufen (Faktor 0,5) der Antibiotika versetzt. Nach 48 h Inkubation erfolgte die visuelle Bewertung des Zellwachstums.

## 8.4. Kreuzstreifentest zur Ermittlung antagonistischer Effekte

Zur Beurteilung der Interaktion von Juglomycin mit Aminosäuren wurde der Kreuzstreifentest verwendet. Bei diesem Test werden zwei Filterpapierstreifen mit unterschiedlichen Test-lösungen getränkt und dann kreuzförmig auf eine mit einem Testkeim beimpfte Agarplatte gelegt. Die auf die Filterstreifen aufgebracht Substanzen diffundieren in den Agar und bilden zwei, sich im Bereich der Überkreuzung überlagernde Konzentrationsgradienten aus. Nach Bebrütung kann aus der Form der Hemmzonen auf die Art des Zusammenwirkens beider Substanzen gegen den betreffenden Stamm geschlossen werden. Im allgemeinen sind diese Effekte entweder synergistischer oder antagonistischer Natur.

Die Teststreifen wurden mit der Juglomycin-Rohextraktlösung bzw. mit L-Gly oder L-Cys-Lösungen (10 mg/ml) getränkt, getrocknet und dann auf Agarplatten (Medium 7) aufgebracht, die mit einer Sporensuspension von *Bacillus subtilis* beimpft waren (2,5 ml Sporen/l Nähragar). Inkubiert wurden die Platten 24 h bei 37 °C.

## 8.5. Hemmung von Enzymaktivitäten durch Juglomycin

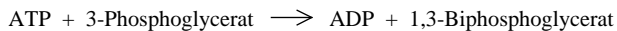
Um die Wirkungsweise von Juglomycin genauer zu charakterisieren, wurde die Inhibition der drei Enzyme Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH, *EC 1.2.1.12*), Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (G6PDH, *EC 1.1.1.49*) und Lactat-Dehydrogenase (LDH, *EC 1.1.1.27*) durch dieses Antibiotikum untersucht. 1,4-Naphtochinon (1,4-NQ) wurde als Vergleichssubstanz eingesetzt.

### 8.5.1. Hemmung von Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase

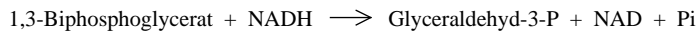
Die Messung der Enzymaktivität von GAPDH erfolgte mit Hilfe eines diagnostischen Kits zur Bestimmung von ATP in Blut (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen).

Dabei werden folgende enzymatische Reaktionen genutzt:

Phosphoglycerat-Kinase (PGK):



GAPDH:



Die NADH-Abnahme wird durch Extinktionsmessung bei 340 nm verfolgt.

Im Testkit enthaltene Reagenzien:

NADH-Einzeltestflaschen:

NADH Dinatriumsalz, 0,3 mg

3-Phosphoglycerat-gepufferte Lösung:

3-Phosphoglycerat, 18 mM

Magnesiumsalze und EDTA

GAPDH/PGK Enzymmischung:

GAPDH (Kaninchenmuskel), 800 U/ml

PGK (Hefe), 450 U/ml

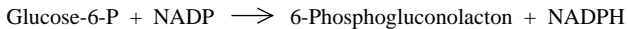
Trichloressigsäure, 12 %

In eine mit 0,3 mg NADH gefüllte Ampulle wurden 1,0 ml 3-Phosphoglycerat und 1,5 ml Wasser pipettiert. Nach Durchmischung wurden je 833  $\mu$ l dieser Lösung in drei Photometer-Küvetten vorgelegt.

Getrennt davon wurden 40  $\mu$ l GAPDH/PGK Enzymmischung mit Tris/HCL-Puffer pH 8,3, 1:10 verdünnt. Davon wurden je 133  $\mu$ l mit 10  $\mu$ l einer 1,4-Naphtochinonlösung (3 mg/ml) bzw. einer Juglomycinlösung (6 mg/ml) versetzt und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Als Kontrolle dienten 10  $\mu$ l Methanol. 13  $\mu$ l dieser Ansätze wurden in die Küvetten pipettiert und die Reaktion durch Zugabe von je 166  $\mu$ l einer ATP-Lösung (0,5 mg/ml) gestartet. Der Reaktionsverlauf wurde 20 min durch Extinktionsmessung bei 340 nm verfolgt.

### 8.5.2. Hemmung von Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase

Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase wurde nach der von DEUTSCH (1983) beschriebenen Methode bestimmt. Diese beruht auf der Umsetzung von Glucose-6-P durch G6PDH nach der folgenden Reaktionsgleichung:



6-Phosphogluconolacton ist instabil und hydrolysiert spontan zu 6-Phosphogluconat.

Reagenzien (Konzentrationen im Test):

Triethanolamin-Puffer, 0,4 M, pH 7,6

NADP-Na, 20 mM

MgCl<sub>2</sub>, 0,5 M

G6PDH aus Hefe, 170 U/mg Protein. Suspension in 3,2 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Lösung

50  $\mu$ l einer 1:10 verdünnten G6PDH-Lösung wurden 30 min bei Raumtemperatur mit je 10  $\mu$ l einer Juglomycinlösung (6 mg/ml), einer Naphtochinonlösung (3 mg/ml) oder mit 10  $\mu$ l Methanol (Kontrolle) vorinkubiert. 10  $\mu$ l dieser Ansätze wurden in Küvetten die je 1000  $\mu$ l Triethanolamin-Puffer, 0,5 M MgCl<sub>2</sub> und 20 mM NADP enthielten, pipettiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 500  $\mu$ l einer Glucose-6-phosphat-Lösung (2 mM) gestartet und über einen Zeitraum von 20 min durch Bestimmung des gebildeten NADPH bei 340 nm verfolgt.

### 8.5.3. Hemmung von Lactat-Dehydrogenase

Die Bestimmung der Lactat-Dehydrogenase-Reaktion erfolgte in Anlehnung an die Methode von VASSAULT (1983). Dabei wird Pyruvat durch LDH zu Lactat reduziert. Die damit verbundene NADH-Abnahme wird bei 340 nm gemessen.

Reaktionsgleichung:



Reagenzien (Konzentrationen im Test):

Triethanolamin-Puffer 0,5 M, pH 7,6

NADH Dinatriumsalz, 6 mM

ADP Dinatriumsalz, 130 mM

MgSO<sub>4</sub>, 0,5 M

KCL, 3,7 M

LDH, 550 U/mg Protein. Suspension in 3,2 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Lösung

Die Reaktionsansätze wurden in gleicher Weise hergestellt, wie für G6PDH (7.5.2.) beschrieben. 15 µl einer 1:10 verdünnten LDH-Lösung und 25 µl NADH-Lösung wurden eingesetzt. Als Substrat dienten 500 µl einer Pyruvat-Lösung (50 µM).





## III. Ergebnisse

### 1. HPLC-Nukleotidanalytik

Die intrazellulären Nukleotide wurden durch HPLC an einer Anionenaustauschersäule getrennt, wie unter II.5.7. beschrieben. Die Trennung erfolgte durch Gradientenelution mit steigender Ionenkonzentration und mit steigendem pH-Wert der mobilen Phase.

In diesem System wurde die Retention der einzelnen Komponenten durch die Anzahl der negativen Ladungen bestimmt, d.h. die Nukleotide eluierten in der Reihenfolge Monophosphate, Diphosphate, Triphosphate. Die Identifikation der Chromatographie-Peaks erfolgte anhand der Retentionszeit und der über Dioden-Array-Detektion aufgenommenen UV/Vis-Spektren (Abb. 5). Wie Abb. 6 zeigt, konnte damit in einer Standardmischung für die Nukleotide ADP, GDP, UTP, CTP, ATP, GTP und ppGpp eine Basislinientrennung erreicht werden. Eine entsprechende Auflösung der Monophosphate war unter diesen Bedingungen nicht möglich. Peakreinheitsanalysen zeigten, daß in der außerordentlich komplexen Matrix, wie sie Säureextrakte ganzer Zellen darstellen, die Nukleosiddiphosphate nicht mehr als UV/Vis-spektroskopisch einheitliche Peaks aufzulösen waren. Wie aus dem in Abb. 6 dargestellten Chromatogramm ersichtlich, wurde aber auch in derartigen Proben für die Nukleosidtriphosphate und insbesondere für ppGpp eine sehr gute Retention erreicht.

## 2. Fermentationen mit *S. tendae*

Um einen regulatorischen Einfluss von Nukleotiden, insbesondere von ppGpp, auf das Wachstums- und Produktbildungsverhalten von *S. tendae* abschätzen zu können, wurden Fed-Batch Fermentationen mit einem chemisch definierten Medium durchgeführt. Durch Zudosierung einzelner Substrate konnten dabei unterschiedliche Nährstofflimitationen eingestellt werden. Zusätzlich wurde die Nukleotid- und Produktbildung nach dem puls-förmigen Zudosieren einzelner Substrate (Ammonium) verfolgt.

Neben den Konzentrationsverläufen der Nukleotide, wurden das Trockengewicht (TG), die Konzentrationen der Substrate Glucose, Ammonium und Phosphat im Medium, die RNA-Konzentration sowie als extrazelluläre Enzymaktivität eine alkalische Phosphatase bestimmt. Als Produkte wurden die Gesamtkonzentrationen der Nikkomycine (Nikkomycine I, J, X, Z) und der Juglomycine (Juglomycine A, B) im Kulturüberstand erfasst.

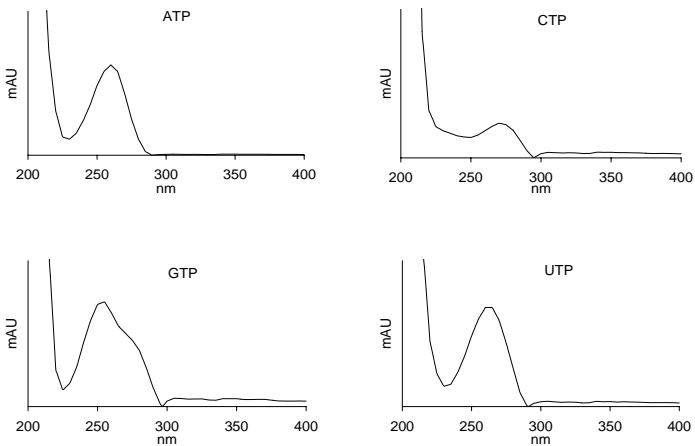


Abb. 5. DAD UV/Vis-Spektren von Nucleosidtriphosphaten

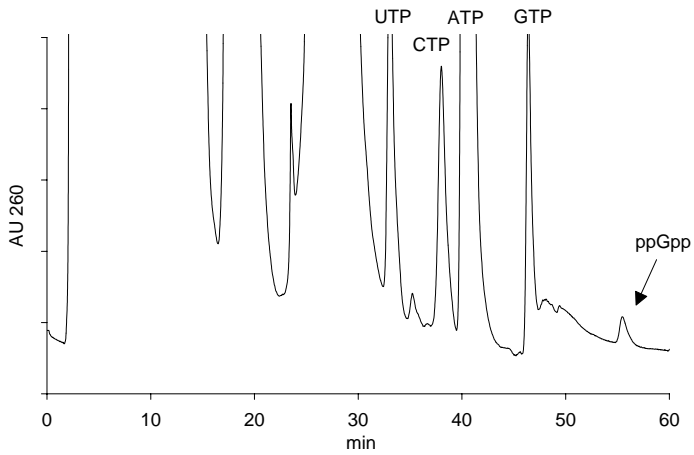
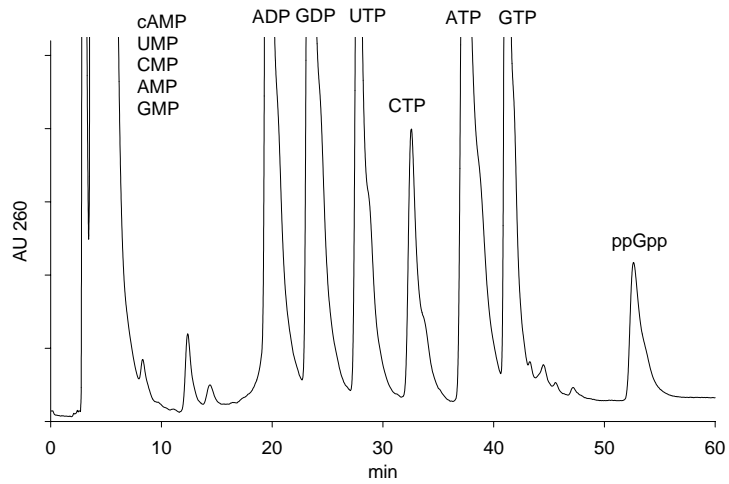


Abb. 6. HPLC-Chromatogramme einer Nucleotid-Standardmischung (oben) und eines Myzelextraktes (unten)

## 2.1. Phosphatlimitierte Fermentation

Frühere Studien zur Nikkomycin- und Juglomycinproduktion wiesen darauf hin, daß die Produktbildung bei *S. tendae* in kontinuierlicher Kultur hauptsächlich durch die Wachstumsrate und die Phosphatkonzentration im Medium kontrolliert wird (HEGE-TRESKATIS et al., 1992). Abb. 7 zeigt den Verlauf einer Fed-Batch Fermentation, bei der die Wachstumsphase durch eine Phosphatlimitation beendet wurde. Da *S. tendae* bei Glucosemangel zu lysieren beginnt, wurde zur Verlängerung der Idiophase ab 72,5 h eine Glucoselösung (250 g/l) zudosiert.

Bei dieser Fermentation konnte nach ungefähr 25 h eine vorübergehende Akkumulation von ppGpp auf über 10 pmol/mg TG beobachtet werden (Abb. 7c). Dadurch wurde eine stringente Kontrolle ausgelöst, wie durch die ausgeprägte Abnahme der intrazellulären RNA-Konzentration von 0,2 g/g TG auf etwa 0,05 g/g TG verdeutlicht wird. Ab dem Maximum der ppGpp-Akkumulation waren Nikkomycine im Kulturüberstand nachweisbar. Die Endkonzentration betrug nach 170 h über 450 mg/l. An Juglomycinen wurde bei dieser Fermentation lediglich 7 mg/l gebildet (Abb. 7a). Als weiteres Merkmal der in dieser Phase stattfindenden Stoffwechsellumstellung wurde eine alkalische Phosphatase exprimiert und ins Medium ausgeschieden (Abb. 7b).

Der erhöhte ppGpp-Spiegel ließ sich nicht mit dem vollständigen Verbrauch eines der drei Hauptsubstrate Glucose, Ammonium und Phosphat in Verbindung bringen; die Phosphatkonzentration war jedoch zu diesem Zeitpunkt bereits von einer Ausgangskonzentration von 2,5 mM auf einen Wert unter 1 mM zurückgegangen.

Auffallenderweise war nach der Induktion der stringenten Kontrolle über einen Zeitraum von 30 h eine weitere Zunahme des Trockengewichts um ca. 7 g/l zu verzeichnen. Dementsprechend wurden während der stationären Phase, die die für Sekundärstoffe typische Produktionsphase darstellte, weiterhin die Substrate Ammonium und Glucose aus dem Medium aufgenommen und verstoffwechselt.

Die gemessenen Nukleosidtriphosphate ATP, GTP, CTP, UTP zeigten einen im Prinzip identischen Verlauf, wobei die ATP-Konzentration ungefähr vier bis fünfmal so hoch war wie die der anderen Nukleotide (Abb. 7d). Als Anfangswerte wurden gemessen (pmol/mg TG): ATP 2878, GTP 559, CTP 498, UTP 362. Während der Wachstumsphase kam es zu einer starken Abnahme der Konzentrationen. Nach 147 h waren etwa 1 % der Ausgangskonzentrationen erreicht. Nach 150 h kam es zu einem leichten Anstieg auf etwa 10 % der

Ausgangswerte. Gleichzeitig damit war das Ammonium im Medium erschöpft und die Nikkomycinproduktionsphase war beendet.

## 2.2. Ammoniumlimitierte Fermentation

Diese Fermentation wurde durch Zufütterung der Hauptsubstrate (Glucose 250 g/l, Ammonium 6 M, Phosphat 0,5 M) zunächst ohne Substratlimitierung geführt. Dadurch war die Wachstumsphase im Vergleich zu der phosphatlimitierten Fermentation entsprechend verlängert. Nach ca. 67 h wurde die Zudosierung von Ammonium gestoppt, wodurch eine N-Limitation eintrat, die das Wachstum der Kultur beendete (Abb. 8b).

Nach ungefähr 20 h Fermentationsdauer wurde die Nikkomycinsynthese induziert. Ab diesem Zeitpunkt konnte auch ppGpp über den gesamten Fermentationsverlauf nachgewiesen werden. Von 29 h bis 70 h blieben sowohl die Nikkomycinkonzentration mit etwa 10 mg/l, wie auch der ppGpp-Gehalt mit 2-4 pmol/mg TG in etwa konstant (Abb. 8a, Abb. 8c).

Mit dem Verbrauch des Ammoniums im Medium nach ungefähr 70 h, war eine schnelle transiente Erhöhung der ppGpp-Konzentration zu verzeichnen, die mit einer Abnahme des intrazellulären RNA-Gehaltes, der Induktion einer alkalischen Phosphatase und einer verstärkten Nikkomycin- und Juglomycinproduktion einherging. Dabei blieb die Nikkomycinaus-beute deutlich unter derjenigen, die bei der phosphatlimitierten Fermentation gemessen wurde (Abb. 7). Jedoch ist zu beachten, daß die Fermentation vor dem Erreichen der End-konzentration abgebrochen wurde. Die Juglomycinkonzentration scheint dagegen mit 7 mg/l einen Endwert erreicht zu haben.

Zeitgleich mit dem Maximum der ppGpp-Konzentration war die Wachstumsphase beendet und der Übergang in die stationäre Phase erfolgte. Die bei Phosphatlimitation beobachtete weitere Zunahme des Trockengewichts unterblieb.

Die intrazellulären Nucleosidtriphosphat-Pools zeigten gleich zu Beginn der Wachstumsphase eine starke Abnahme (Abb. 8d). Beim Einsetzen der Zudosierung waren die Konzentrationen von ATP und GTP auf jeweils 20 % ihres Ausgangswertes zurückgegangen, UTP auf etwa 40 %. Mit dem Beginn der Zufütterung von Glucose nach 47,5 h, fielen die Konzentrationen nochmals um etwa 50 % der Werte vor Beginn des Glucose-Feedings ab.

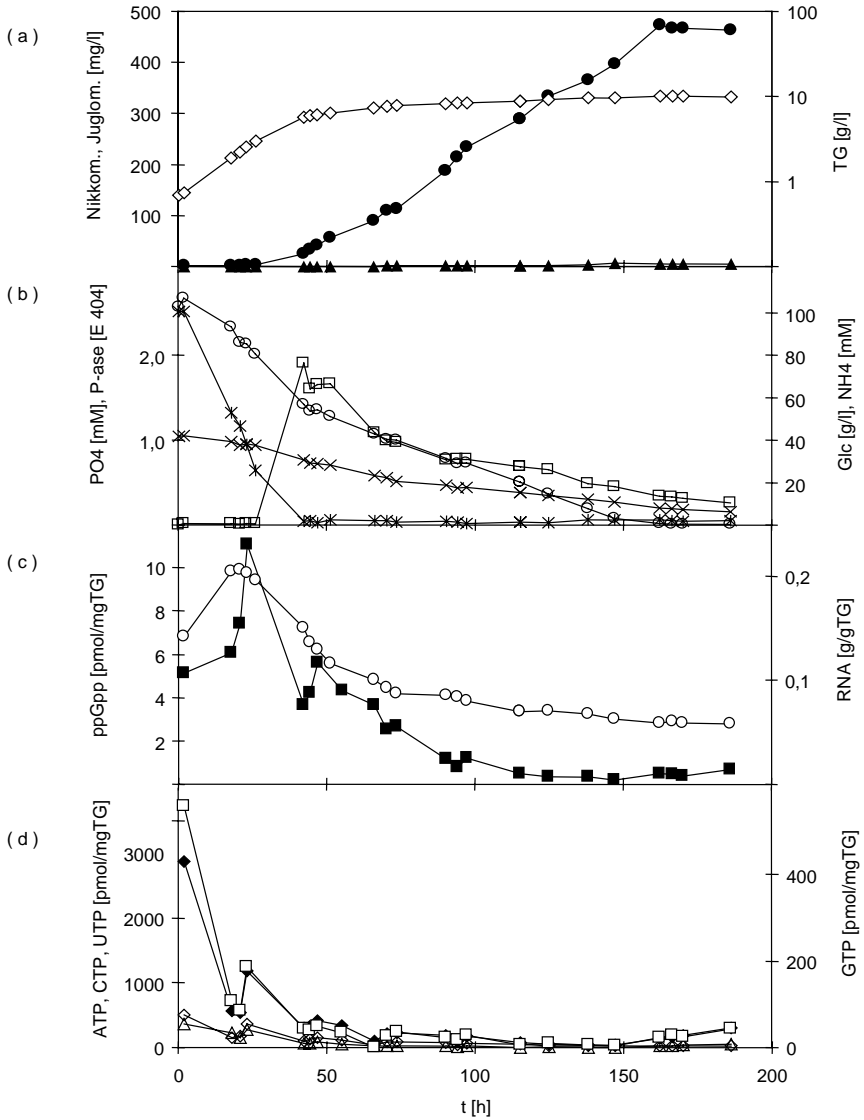


Abb. 7. Phosphatlimitierte Fed-Batch Fermentation mit *S. tendae*. (a):  $\diamond$  Trockengewicht,  $\bullet$  Nikkomycine,  $\blacktriangle$  Juglomycine; (b):  $\circ$  Ammonium,  $\ast$  Phosphat,  $\times$  Glucose,  $\square$  P-ase; (c):  $\blacksquare$  ppGpp,  $\circ$  RNA, (d):  $\blacklozenge$  ATP,  $\diamond$  CTP,  $\square$  GTP,  $\triangle$  UTP

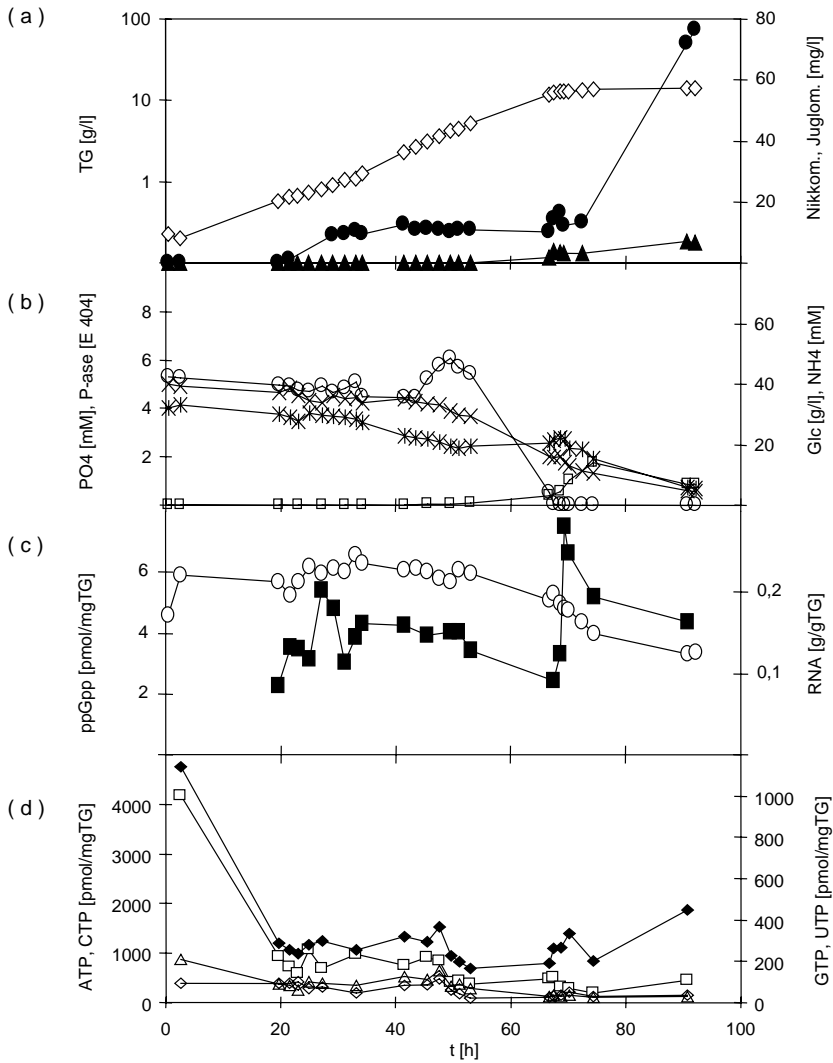


Abb. 8. Ammoniumlimitierte Fed-Batch Fermentation mit *S. tendae*. (a):  $\diamond$ —Trockengewicht,  $\bullet$ —Nикkomycine,  $\blacktriangle$ —Juglomycine; (b):  $\circ$ —Ammonium,  $\ast$ —Phosphat,  $\times$ —Glucose,  $\square$ —P-ase; (c):  $\blacksquare$ —ppGpp,  $\circ$ —RNA, (d):  $\blacklozenge$ —ATP,  $\diamond$ —CTP,  $\square$ —GTP,  $\triangle$ —UTP

### 2.3. Fermentation mit Ammonium-Puls

Bei dieser Fermentation war nach 60 h das Ammonium im Medium verbraucht, worauf eine sprunghafte Erhöhung der ppGpp-Konzentration, die Induktion der Nikkomycinbildung und der Übergang in die stationäre Wachstumsphase erfolgte. Die Juglomycinkonzentration blieb während des gesamten Fermentationsverlaufs unter 4 mg/l (Abb. 9, Abb. 10).

Nach 143 h wurde die Ammoniumkonzentration durch pulsförmiges Zudosieren einer Ammoniumsulfatlösung auf 60 mM erhöht. Dadurch begann eine zweite Wachstumsphase, die innerhalb von 30 h zu einer Verdoppelung des Trockengewichtes führte (Abb. 9).

Die Wiederaufnahme des Wachstums bewirkte ein Umschalten von Sekundärmetabolismus auf Primärmetabolismus, so daß die Nikkomycinsynthese zum Erliegen kam und erst mit dem erneuten Verbrauch des Ammoniums nach 178 h wieder einsetzte. Während dieser zweiten Produktionsphase kam es zu einer Erhöhung der Nikkomycinkonzentration von ca. 300 mg/l auf über 500 mg/l.

Nach 163 h setzte Phosphatlimitation ein, worauf das exponentielle Wachstum beendet war (Abb. 9). Wie bei der phosphatlimitierten Fermentation beobachtet, folgte auch hier eine weitere Zunahme der Biomasse, die mit der vollständigen Aufnahme des Ammoniums einherging.

Die Konzentrationen der Purinnukleotide ATP und GTP fielen während der ersten Wachstumsphase auf unter 10 % ihrer Ausgangswerte ab. Unmittelbar mit dem Ammoniumpuls stieg die GTP-Konzentration jedoch überraschenderweise sprunghaft von 150 pmol/mg TG auf über 900 pmol/mg TG an und fiel danach innerhalb von 5 h wieder auf das Ausgangsniveau zurück (Abb. 10). Im Gegensatz zu diesem kurzfristig auftretenden GTP-Maximum, war bei ATP während der ersten stationären Phase ein Anwachsen der Konzentration von 130 pmol/mg TG auf 2630 pmol/mg TG bis zum Zeitpunkt des Ammoniumpulses zu verzeichnen, d. h. die höchste ATP-Konzentration trat unmittelbar vor der Ammoniumzufuhr auf und korrelierte mit einem niedrigen GTP-Spiegel. Auch bei den Pyrimidinnukleotiden CTP und UTP wurden in der Phase nach dem Substratpuls die Höchstkonzentrationen von 1510 pmol/mg TG bzw. 2203 pmol/mg TG gemessen.

Mit der Wiederaufnahme des Wachstums fielen die Werte aller gemessenen Nukleosidtriphosphate wieder auf die Niveaus vor der Ammonium-Zudosierung ab.



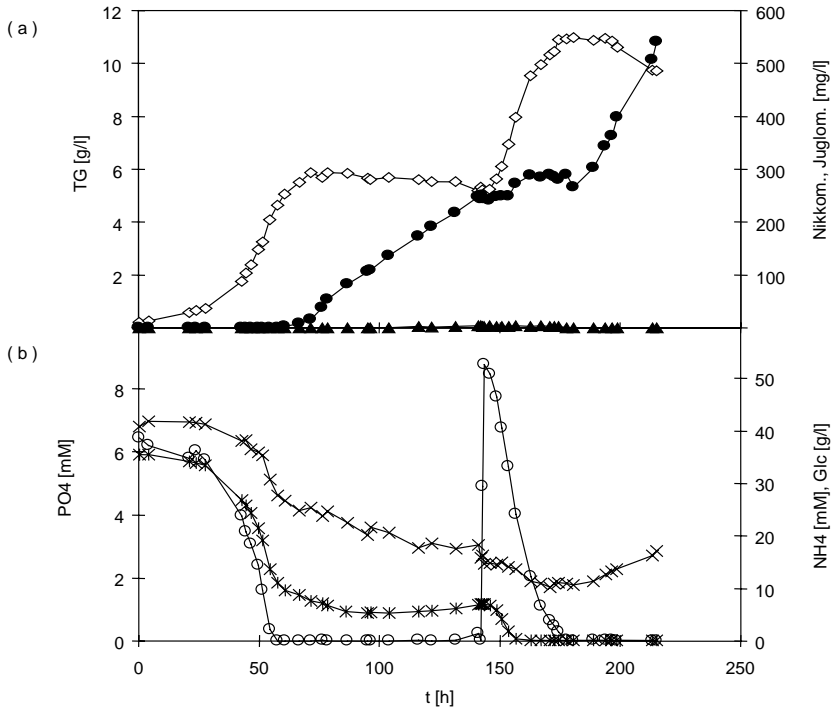


Abb. 9. Ammoniumlimitierte Puls-Fermentation mit *S. tendae*. (a):  $\diamond$  Trockengewicht,  $\bullet$  Nikkomycine,  $\blacktriangle$  Juglomycine; (b):  $\circ$  Ammonium,  $\ast$  Phosphat,  $\times$  Glucose

Besonders auffällig war bei den HPLC-Analysen der Nukleotide dieser Fermentation das Auftreten eines zusätzlichen Peaks nach einer Fermentationsdauer von ungefähr 150 h.

Dieser Peak eluierte zwischen GTP und ppGpp und zeigte ein UV/Vis-Spektrum, das identisch mit demjenigen der Guanosinnukleotide war (Abb. 11). Hinsichtlich der Retentionszeit entspricht dieser Peak Guanosin-5'-diphosphat-3'-monophosphat (ppGp) (JONES et al., 1996).

Da diese Verbindung nicht zweifelsfrei identifiziert werden konnte, wird sie im folgenden als Gx bezeichnet. Wie aus Abb. 10 (d) hervorgeht, erreichte Gx genau zu dem Zeitpunkt ein Maximum, an dem das zugespulste Ammonium wieder vollständig verbraucht war. In der Probe mit der maximalen Gx-Konzentration konnte zudem kein ppGpp gefunden werden.

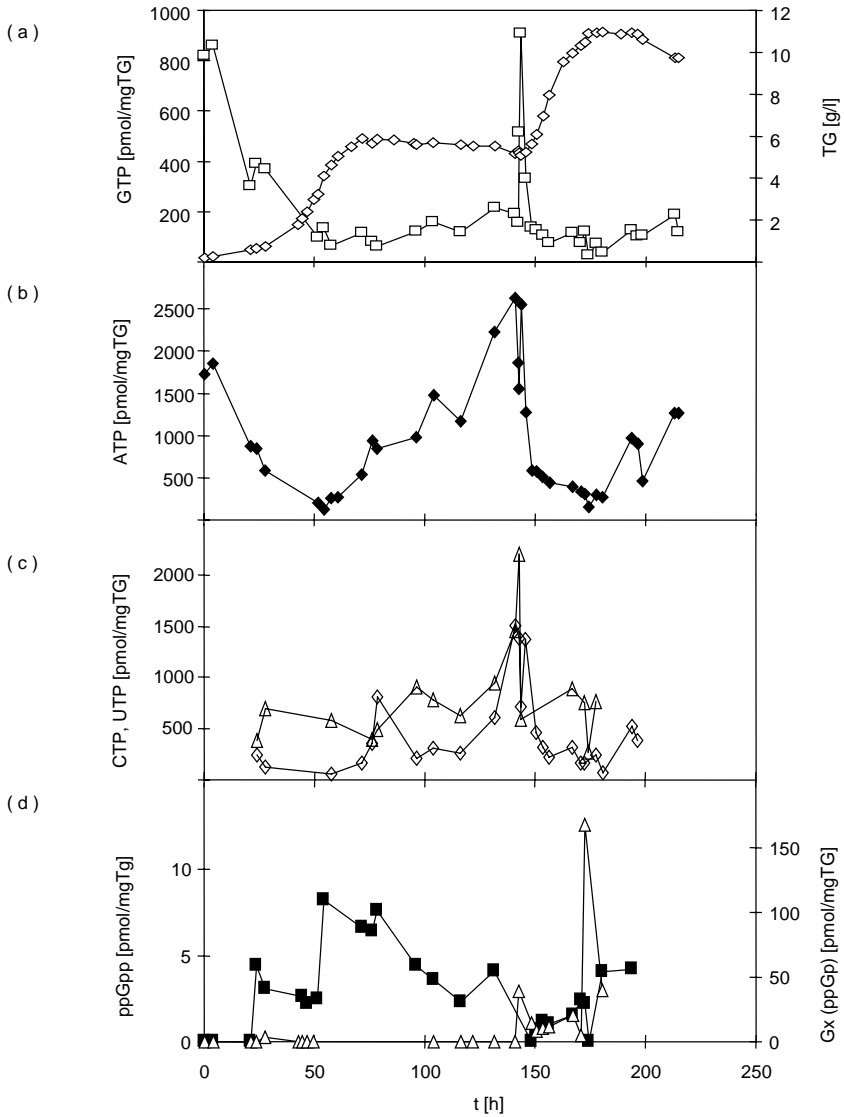


Abb. 10. Nucleotidverlauf der ammoniumlimitierten Puls-Fermentation mit *S. tendae*. Nucleotide. (a) :  $\diamond$  TG,  $\square$  GTP; (b) :  $\blacklozenge$  ATP; (c) :  $\diamond$  CTP,  $\blacktriangle$  UTP; (d) :  $\blacksquare$  ppGpp,  $\blacktriangle$  Gx

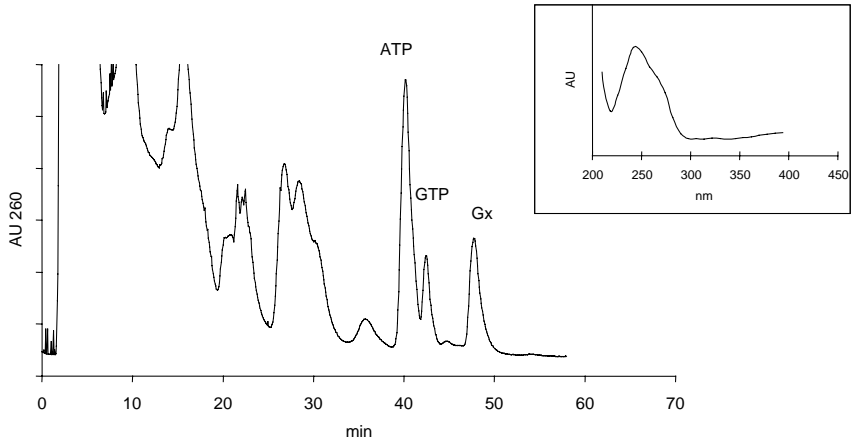


Abb. 11. HPLC-Chromatogramm eines Myzelextraktes aus der Puls-Fermentation und DAD-UV/Vis-Spektrum von Gx

## 2.4. Fermentation ohne Substratlimitation

Bei einem pelletförmig wachsenden Organismus können Zellen im Zentrum der Pellets, bedingt durch Diffusionslimitierungen, nicht mehr ausreichend mit Nährstoffen und Sauerstoff versorgt werden, auch wenn diese Substrate noch im Medium vorhanden sind (BUSCHULTE, 1991). Um festzustellen, ob die bei phosphatlimitierter Fermentation beobachteten ppGpp-Akkumulationen durch Absinken der Phosphatkonzentration unter einen Schwellenwert, der dann bei etwa 1 mM liegen müsste, hervorgerufen wurden, oder ob durch die Pelletmorphologie bedingte lokale Limitationen für die erhöhten ppGpp-Spiegel verantwortlich waren, wurden bei dieser Fermentation Ammonium und Phosphat so zudosiert, daß keine durch die Medienkonzentrationen ausgelösten Limitationen auftraten (Abb 12b). Dementsprechend dauerte die exponentielle Wachstumsphase über einen Zeitraum von über 70 h an (Abb. 12a). Die Nikkomycinbildung blieb unter 4 mg/l und ist damit als vernachlässigbar zu bezeichnen. Juglomycine wurden nicht produziert. Ebenso konnten nur etwa 10 % der bei limitierter Fermentation aufgetretenen alkalischen Phosphataseaktivität gemessen werden.

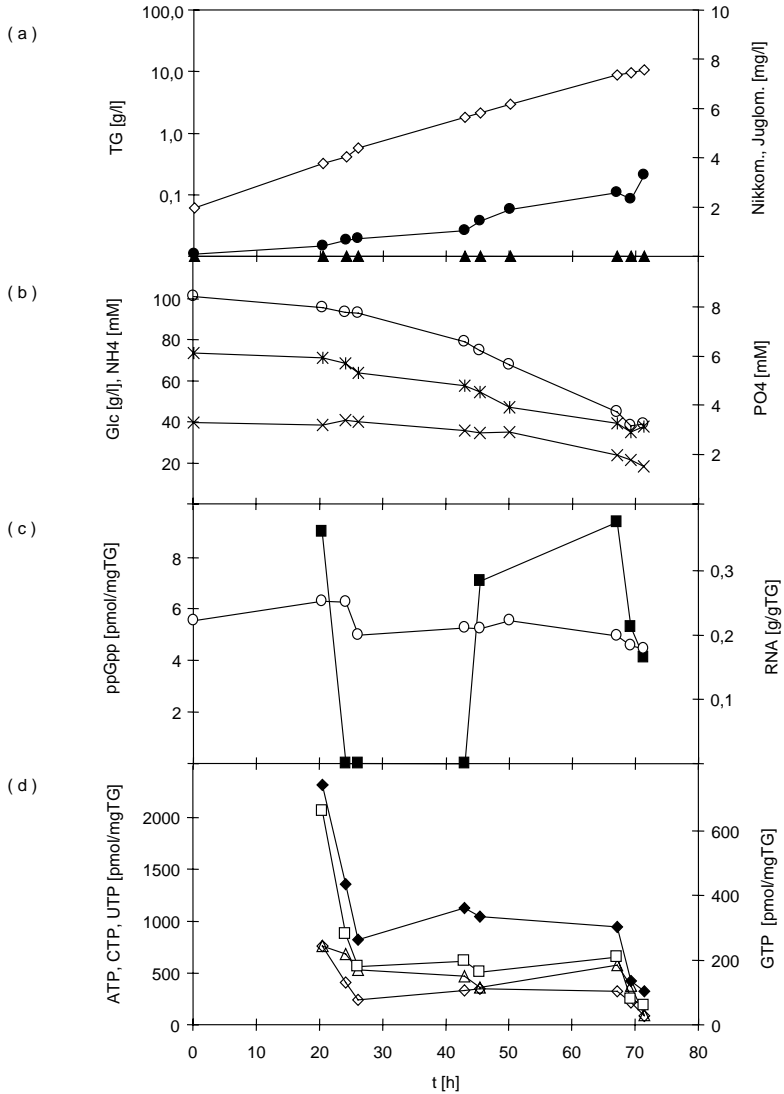


Abb. 12. Fermentation von *S. tendae* ohne Substratlimitation. (a):  $\diamond$  Trockengewicht,  $\bullet$  Nиккомыцине,  $\blacktriangle$  Jugломыцине; (b):  $\circ$  Ammonium,  $\ast$  Phosphat,  $\times$  Glucose; (c):  $\blacksquare$  ppGpp,  $\circ$  RNA (d):  $\square$  GTP,  $\blacklozenge$  ATP,  $\diamond$  CTP,  $\triangle$  UTP

Dennoch war ppGpp zu verschiedenen Zeitpunkten nachweisbar, wobei mit ungefähr 9 pmol/mg TG Höchstkonzentrationen erreicht wurden, die denjenigen aus den limitierten Fermentationen III.2.1. und III.2.2. entsprechen (Abb. 12 c). Die erhöhten ppGpp-Spiegel nach 21 h bzw. nach 45 h und 67 h, lassen sich mit keiner anderen gemessenen Größe korrelieren.

Die intrazellulären Nucleosidtriphosphatkonzentrationen fielen nach 20 h innerhalb von 6 h auf weniger als die Hälfte ihrer Ausgangswerte ab (Abb 12 d). Danach blieben sie über einen Zeitraum von 40 h auf einem in etwa konstanten Niveau, das für ATP bei 1000 pmol/mg TG, für GTP bei 200 pmol/mg TG, für CTP bei 300 pmol/mg TG und für UTP bei 400 pmol/mg TG lag. Nach 67 h erfolgte ein weiterer Abfall auf 10 % der Ausgangswerte.

### 3. Fermentationen mit *Amycolatopsis mediterranei*

Der Balhimycinproduzent *Amycolatopsis mediterranei* gehört zur Gruppe der nocardioformen Actinomyceten (*Nocardiaceae*). Der Entwicklungszyklus verläuft hier nicht, wie bei den Streptomyceten über Luftmyzel- und Exosporenbildung, sondern über ein in Einzelzellen fragmentierendes Myzel aus dem schließlich wieder neue Hyphengeflechte heranwachsen. Da dieses Verhalten auch in Submerskultur auftritt, eignet sich dieser Organismus in besonderer Weise um Zusammenhänge zwischen Antibiotikaproduktion, morphologischer Differenzierung und der Synthese von ppGpp als Signalknüppel zu untersuchen.

Um die Fermentationsverläufe mit denjenigen von *S. tendae* vergleichen zu können, wurden wiederum unterschiedliche Nährstofflimitationen eingestellt und deren Auswirkungen auf die Produktion von Balhimycin und ppGpp analysiert.

#### 3.1. Vergleich von Phosphatlimitation und Ammoniumlimitation

Die in den Abb. 13 und Abb. 14 dargestellten Fermentationsverläufe zeigen deutliche Unterschiede zwischen einer phosphat- und einer ammoniumlimitierten Fermentation.

Bei der phosphatlimitierten Kultur wurde mit dem Verbrauch des Phosphats die Antibiotikasyntese induziert. Wie schon bei *S. tendae* beobachtet, nahm in der Folgezeit die

Trockenmasse noch um etwa 8 g/l zu. Die Höchstkonzentration von ppGpp blieb unter 10 pmol/mg TG und fiel mit einer Phosphatkonzentration von ca. 0,2 mM zusammen. 20 h später war Balhimycin im Kulturüberstand nachweisbar, wobei eine Endkonzentration von ca. 400 mg/l erreicht wurde.

Bei ammoniumlimitierter Fermentation erfolgte dagegen nach dem Verbrauch des Ammoniums innerhalb von 23 h, eine Akkumulierung von ppGpp, die mit 25 pmol/mg deutlich stärker ausfiel als bei Phosphatlimitation. Gleichzeitig kam es zur Bildung des bereits unter III.2.3. beschriebenen Guanosinderivats Gx. Im Vergleich zu den ammoniumlimitierten Fermentationen mit *S. tendae* (III.2.2. und III.2.3.) traten wesentlich höhere Konzentrationen von ppGpp und Gx auf. Sollte es sich bei Gx um ppGp handeln, würde hier sogar ein Wert von 280 pmol/mg TG erreicht. Wie bei *S. tendae* konnte das Pentaphosphat pppGpp auch hier nicht nachgewiesen werden.

Deutlich von der phosphatlimitierten Fermentation und von dem Verhalten von *S. tendae* bei Ammoniumlimitation unterschied sich auch die Produktbildung. Trotz der hohen Konzentrationen von ppGpp und ppGp unterblieb die Balhimycinsynthese völlig. Unter Stickstoffmangelbedingungen ist damit die Bildung dieser Signalkleotide nicht ausreichend, um die Balhimycinproduktion auszulösen.

Das morphologische Erscheinungsbild von *A. mediterranei* wurde mikroskopisch kontrolliert. Bei beiden Fermentationen lies sich keine abgrenzbare Phase des Übergangs von Pelletwachstum zu fragmentierten Myzelien ausmachen. Vielmehr nahm der Fragmentierungsgrad während des Fermentationsverlaufs beständig zu, so daß am Ende der jeweiligen Fermentation fast ausschließlich fragmentiertes Myzel vorlag.

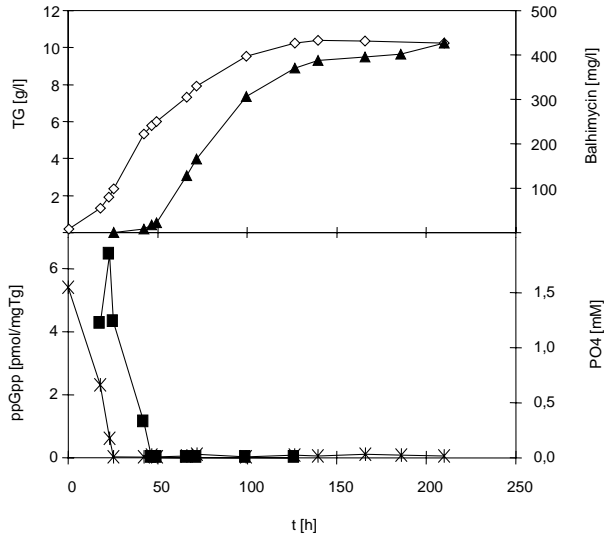


Abb. 13. Phosphatlimitierte Fermentation von *A. mediterranei*.  $\diamond$ — Trockengewicht,  $\blacktriangle$ — Balhimycin,  $\ast$ — Phosphat,  $\blacksquare$ — ppGpp,

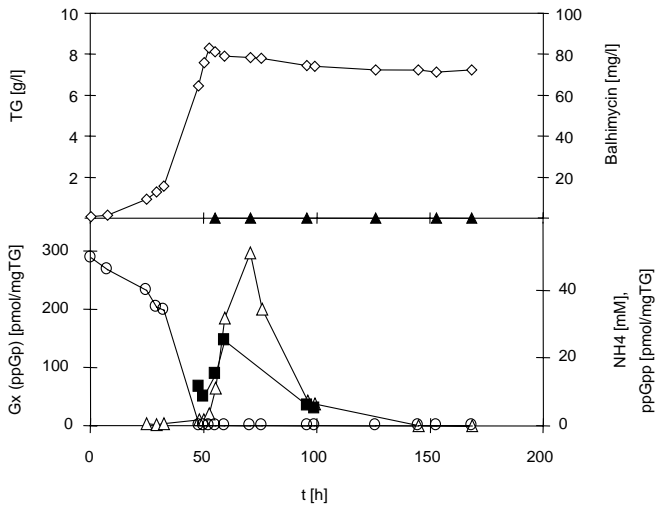


Abb. 14. Ammoniumlimitierte Fermentation von *A. mediterranei*.  $\diamond$ — Trockengewicht,  $\blacktriangle$ — Balhimycin,  $\ominus$ — Ammonium,  $\blacksquare$ — ppGpp,  $\triangle$ — Gx

## 4. Bestimmung von Diaminopimelinsäure in Zellhydrolysaten

Die bei phosphatlimitierter Batch-Fermentation nach Verbrauch des Phosphats zu verzeichnende weitere Zunahme des Trockengewichts ist möglicherweise auf Differenzierungsvorgänge wie etwa Zellwandverdickungen zurückzuführen. Um ein Maß für die Mureinsynthese zu erhalten, wurde eine HPTLC-Methode zur quantitativen Bestimmung von LL-Diaminopimelinsäure (LL-Dap) etabliert.

Das Peptidoglycangerüst von Prokaryoten besteht aus langen, unverzweigten heteropolymeren Ketten, die aus den Vorstufen UDP-N-Acetylmuramyl-Pentapeptid und UDP-N-Acetylglucosamin aufgebaut werden. Wie in Abb. 15 dargestellt erfolgt die Quervernetzung zwischen einzelnen Ketten bei Streptomyceten durch Glycin, das mit einem D-Ala-Rest und einem LL-Diaminopimelinsäurerest einer benachbarten Kette verbunden ist (SCHLEIFER & KANDLER, 1972).

Da Diaminopimelinsäure nicht als Bestandteil von Proteinen auftritt, kann diese Aminosäure spezifisch zur Erfassung der Zellwandsynthese herangezogen werden.

Das in Abb. 16 dargestellte Densitogramm zeigt, daß das verwendete dünnschichtchromatographische System zu einer Trennung von LL-Dap von den übrigen Bestandteilen der Zellhydrolysate führte. Der Rf-Wert von LL-Dap lag bei 0,27. Die Reaktion mit Ninhydrin führte nach Erhitzen zu grünen, später gelb werdenden Flecken. Entsprechend zeigte das, über das Densitometer direkt von der HPTLC-Platte aufgenommene UV/Vis-Spektrum ein Absorptionsmaximum bei 420 nm. Alle anderen Aminosäuren bildeten blauviolette Produkte, so daß bei dieser Wellenlänge eine spezifische Bestimmung von LL-Dap möglich war. Die Quantifizierung erfolgte nach densitometrischer Auswertung über Peakflächen oder Peakhöhen. Beide Parameter zeigten lineare Eichkurven bis zu Konzentrationen von 1 mM (Abb. 17).



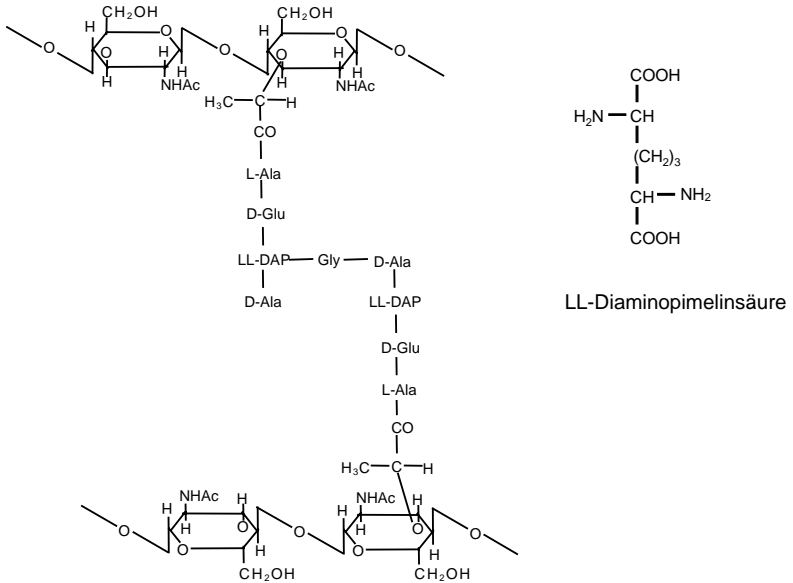


Abb. 15. Aufbau des Peptidoglycangerüsts bei Streptomyceten (modifiziert nach SCHLEIFER & KANDLER, 1972)

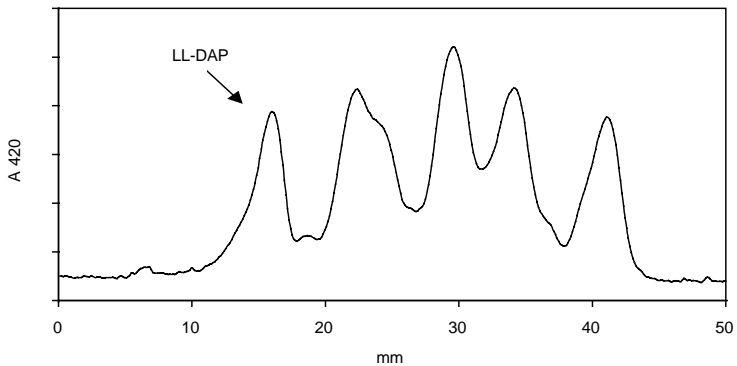


Abb.16. Densitogramm eines Zellhydrolysats nach Ninhydrin-Färbung

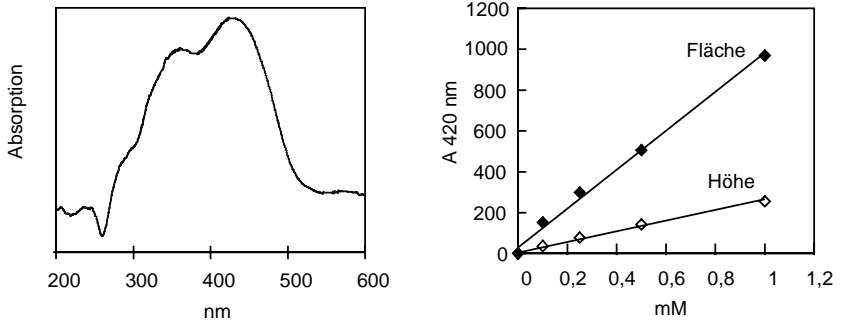


Abb. 17. HPTLC-Analytik von LL-Dap. Links: UV/Vis-Spektrum der LL-Dap-Bande (Hintergrundspektrum subtrahiert). Rechts: Kalibrierungskurven

Durch HPTLC-Analyse von Zellhydrolysaten wurde eine intrazelluläre LL-Dap Konzentration gemessen, die konstant bei einem Wert von etwa  $1 \mu\text{mol/mg TG}$  lag. In Abb. 18 und Abb. 19 sind die Ergebnisse für die phosphatlimitierte Batch-Fermentation (III.2.1.), sowie für eine ammoniumlimitierte Puls-Fermentation (analog zu III.2.3.) gezeigt. Eine Zunahme des Dap-Gehalts, der auf eine verstärkte Zellwandsynthese in bestimmten Fermentationsphasen hindeuten würde, konnte nicht beobachtet werden.

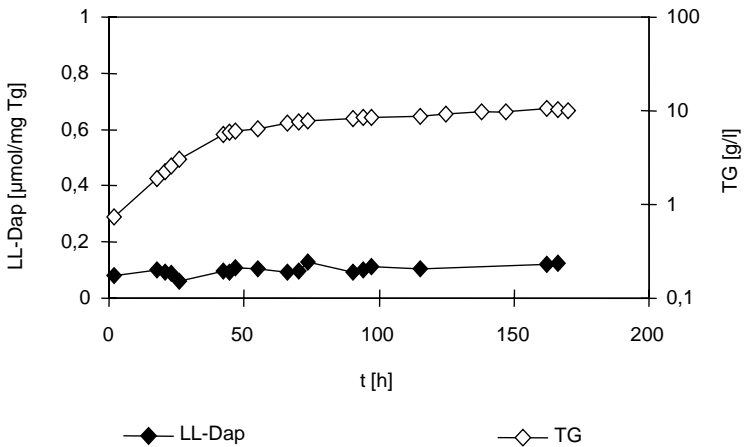


Abb. 18. Konzentrationsverlauf von LL-Dap während phosphatlimitierter Fermentation

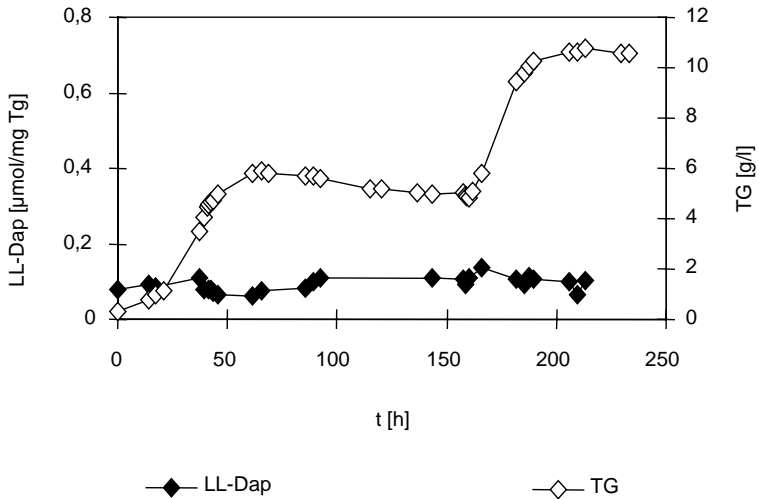


Abb. 19. Konzentrationsverlauf von LL-Dap während ammoniumlimitierter Fermentation mit Ammonimpuls

## 5. Untersuchung einer regulationsdefekten Mutante von *S. tendae*

### 5.1. Charakterisierung von *S. tendae bld-1*

Zur Aufklärung von übergeordneten Regulationsmechanismen können Mutanten herangezogen werden, die Defekte in Luftmyzelbildung oder Sporulation aufweisen. Solche Mutanten zeigen in der Regel einen pleiotropen Phänotyp, von dem neben der morphologischen Entwicklung auch die Antibiotikaproduktion betroffen ist. So weisen z. B. *relA* und *relC* Mutanten Defekte in der morphologischen Differenzierung bzw. veränderte Koloniemorphologien auf (CHAKRABURTTY & BIBB, 1997; OCHI, 1990b).

Vor diesem Hintergrund wurden, wie unter II.6. beschrieben, acriflavinresistente Mutanten von *S. tendae* selektioniert. Eine als *S. tendae bld-1* bezeichnete Mutante wurde aufgrund ihres interessanten morphologischen Erscheinungsbildes zum Vergleich von Nukleotid- und Produktspektrum mit dem *S. tendae*-Wildtypstamm herangezogen. Die Mutante zeigte keine Auxotrophien und der morphologische Phänotyp erwies sich als konditional im Hinblick auf die verwendete Kohlenstoffquelle. Während bei Wachstum auf Komplexmedium (Medium 1) oder Glucose-Minimalmedium (Medium 8) keine Luftmyzelbildung und Sporulation auftrat, war der Stamm in der Lage bei Verwendung von Mannit als C-Quelle zu differenzieren.

Besonders auffällig war in allen getesteten Medien die Produktion eines dunkelbraun-rot gefärbten Pigments, dessen UV/Vis-Spektrum aufgrund seiner Ähnlichkeit mit dem Spektrum von Juglomycin auf eine chinoide Grundstruktur hinwies (Abb. 20). Die gemessenen Absorptionsmaxima bei 280 nm und 435 nm waren gegenüber denjenigen von Juglomycin bei 260 nm und 425 nm etwas in den längerwelligen Bereich verschoben.

Dieses Produkt wurde wie unter II.7.2. beschrieben isoliert. Dabei wurden zwei Verbindungen erhalten, die durch  $^1\text{H-NMR}$  und  $^{13}\text{C-NMR}$  Analysen als die Carbazolderivate CS-79B (SETO & HAYAKAWA, 1994) und Carquinostatin A (SHIN-YA et al., 1993) identifiziert werden konnten.

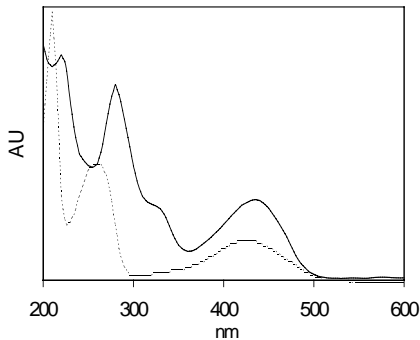


Abb. 20. DAD-UV/Vis-Spektren von Juglomycin (---) und des Carbazolprodukts aus *S. tendae bld-1* (—)

## 5.2. Produktspektrum von *S. tendae* Wildtyp und *bld-1*

In Abb. 21 sind Schüttelkolbenversuche dargestellt, bei denen Wachstumskurven und Antibiotikaproduktion von *S. tendae* WT und *S. tendae bld-1* verglichen wurden.

Bei den eingesetzten Medienkonzentrationen (Medium 8 mit 30 g/l Glucose bzw. 30 g/l Mannit) traten keine C- oder N-Limitierungen während der Kultivierung auf. Die Konzentrationen von Nikkomycinen, Juglomycinen und den Carbazolderivaten wurden durch HPLC bestimmt.

*S. tendae* WT produzierte in Glucose-MM Nikkomycine und Juglomycine, wobei Höchstkonzentrationen von 190 mg/l bzw. 70 mg/l erreicht wurden (Abb. 21a). Bei *S. tendae bld-1* wurden dagegen keine Nikkomycine gebildet (Abb. 21b). Im Gegensatz zur morphologischen Differenzierung konnte die Nikkomycinsynthese auch durch Verwendung von Mannit als C-Quelle nicht wiederhergestellt werden (Abb. 21c). Juglomycine und Carbazole wurden in beiden Medien zeitgleich bis zu Konzentrationen von jeweils 120 mg/l synthetisiert (Verhältnis von Juglomycin A zu B = 1,5 : 1; CS-79B zu Carquinostatin A = 10 : 1). Beide Antibiotika erwiesen sich als im Kulturüberstand nicht stabil, so daß die Konzentrationen während der stationären Phase wieder abnahmen.

Um zu testen, ob die Bildung von Nikkomycinen an die morphologische Differenzierung gekoppelt ist, wurden zusätzlich Agarkulturen von *S. tendae bld-1* mit Wasser extrahiert und durch HPLC analysiert. Auch bei Verwendung von Mannit als C-Quelle auf einem festen Nährboden und damit verbundener Luftmyzelbildung und Sporulation konnten jedoch keine Nikkomycine nachgewiesen werden.

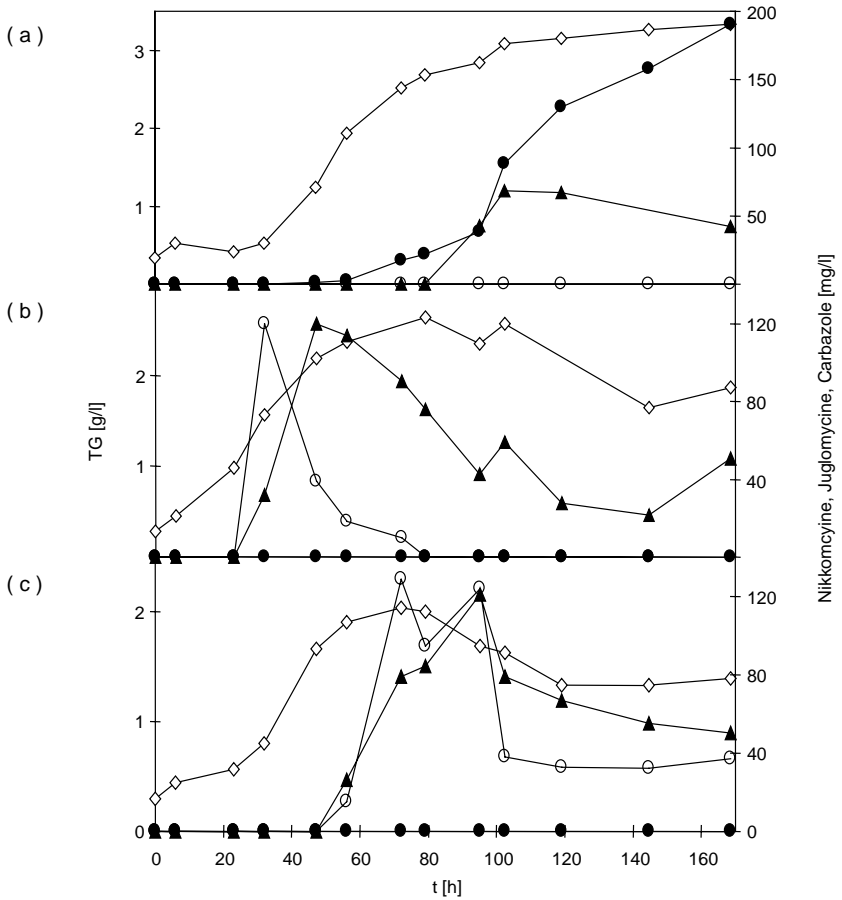


Abb. 21. Antibiotikaproduktion durch *Streptomyces tendae* WT und *bld-1*. (a): Wildtyp in Glucose-Minimalmedium; (b): Mutante *bld-1* in Glucose-Minimalmedium; (c): Mutante *bld-1* in Mannit-Minimalmedium.  $\diamond$ —Trockengewicht,  $\bullet$ —Nikkomycine,  $\blacktriangle$ —Juglomycine,  $\circ$ —Carbazole

### 5.3. Identifizierung von CS-79B und Carquinostatin A

In den  $^1\text{H-NMR}$ -Spektren von CS-79B und Carquinostatin A war eine Signalgruppe zwischen  $\delta = 6,9$  und  $\delta = 7,7$  zu sehen, die mit ihrem Kopplungsmuster auf einen 1,4,5-trisubstituierten Benzolring hindeutete (Abb. 22, Abb. 23, Tab. 5). Das Dublett bei  $\delta = 7,64$  koppelte mit dem doppelten Dublett bei  $\delta = 6,99$ . Die Kopplungskonstante von 2 Hz ließ auf eine *meta*-Position der beiden Protonen zueinander schließen. Das Signal bei  $\delta = 6,99$  koppelte außerdem mit dem Dublett bei  $\delta = 7,50$ . Hier ließ sich mit Hilfe der Kopplungskonstante eine *ortho*-Position der beiden Protonen zueinander zuordnen.

Mit Hilfe eines HMQC-Spektrums (bei 75,43 MHz und 300 MHz) wurde die Protonenkonnektivität der  $^{13}\text{C}$ -Signale bestimmt.

Das Substitutionsmuster am Phenylring sowie die Position von zwei Substituenten ließ sich zusätzlich durch HMBC-Korrelierung (C-H-Fernkopplungen) ermitteln (Abb. 24). Die Protonen an C-5 und C-7 koppelten auf die Methylengruppe bei  $\delta = 33,8/3,37$ . Die Methylengruppe koppelte auf das benachbarte Doppelbindungs-C-Atom. Die beiden endständigen Methylgruppen zeigten sowohl die  $^2\text{J}$ - als auch die  $^3\text{J}$ -Kopplung. Ein zweites Molekülfragment erhielt man mit Hilfe der  $^2\text{J}$ - und  $^3\text{J}$ -Kopplung der aliphatischen Methylgruppe mit zwei einander benachbarten Methingruppen, die beide an Sauerstoff gebunden waren. Das C-Atom 10 koppelte weiterhin in den benachbarten Ring hinein. Dies wurde durch die Kopplung der ebenfalls an den Ring gebundenen Methylgruppe bestätigt.

Eine Suche mit den so gefundenen Fragmenten in der Datenbank AntiBase (LAATSCH, 1997) führte nur zu einer einzigen Struktur CS-79B, einer bereits aus *Streptomyces exfoliatus* 2419-SVT2 isolierten Carbazolverbindung mit antioxidativen Eigenschaften (Abb. 25, SETO & HAYAKAWA, 1994). Die zweite gefundene Verbindung weist ein ähnliches  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum auf, lediglich eine OH-Gruppe an C-10 fehlt. Hier führt die Suche in AntiBase zu Carquinostatin A. Dieser Metabolit wurde erstmals während eines Screenings nach Wirkstoffen die Nervenzellen vor freien Radikalen schützen können, ebenfalls aus *S. exfoliatus* 2419-SVT2 isoliert (SHIN-YA et al., 1993).

Beide Verbindungen waren bislang nicht als Inhaltsstoffe von *S. tendae* bekannt.

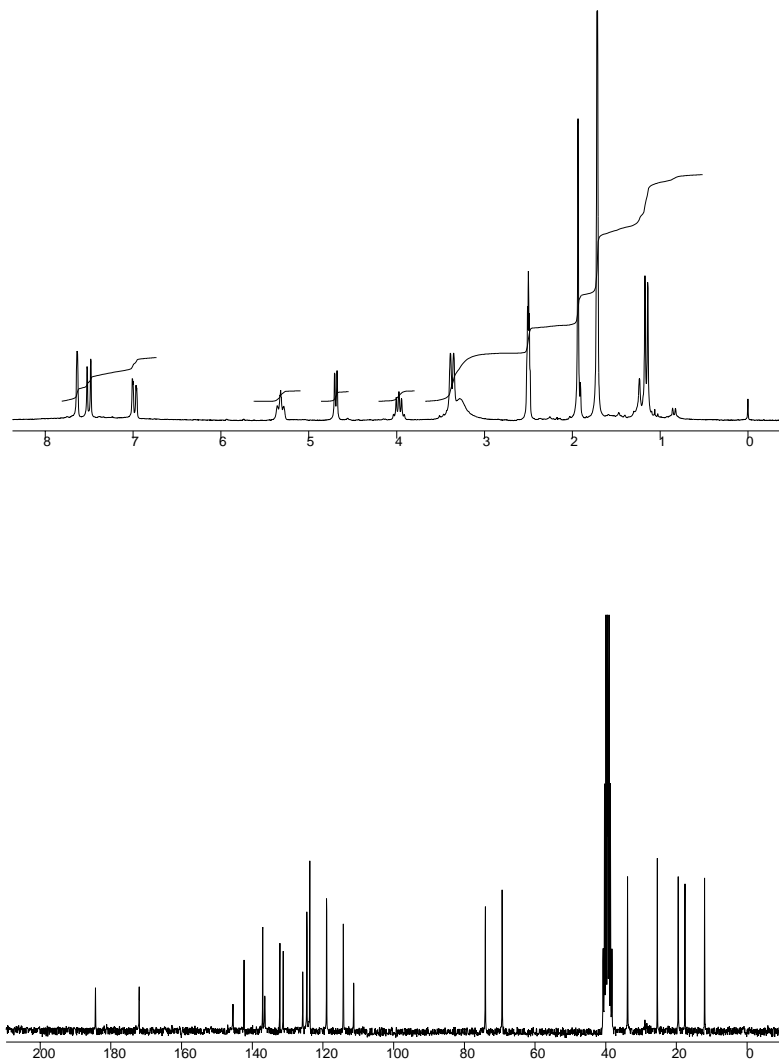


Abb. 22. Oben:  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von CS-79B in  $[\text{D}_6]\text{DMSO}$ ; 200 MHz

Unten:  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von CS-79B in  $[\text{D}_6]\text{DMSO}$ ; 50,3 MHz



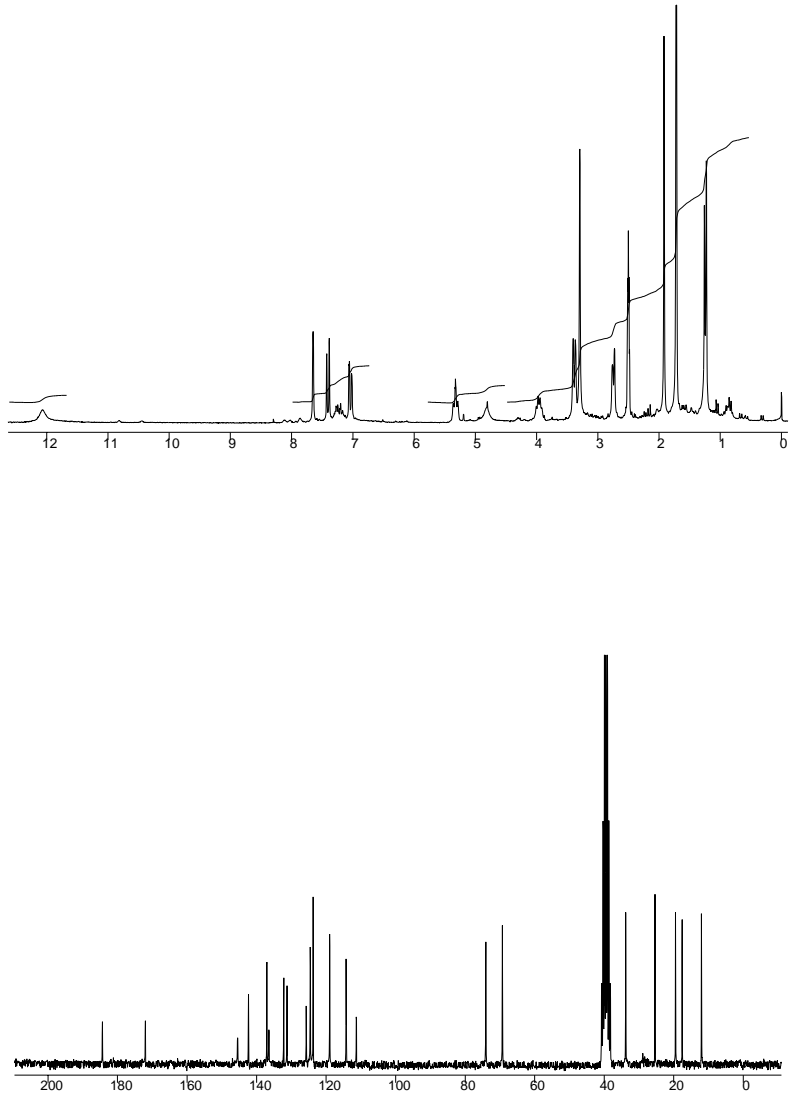


Abb. 23. Oben:  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von Carquinostatin A in  $[\text{D}_6]\text{DMSO}$ ; 200 MHz  
Unten:  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von Carquinostatin A in  $[\text{D}_6]\text{DMSO}$ ; 50,3 MHz

Tab. 5. Chemische Verschiebungen für  $^{13}\text{C}$ - und  $^1\text{H}$ -Kerne von CS-79B und Carquinostatin A

Position	CS-79B		Carquinostatin A	
	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$
1	142,3		139,7	
2	132,2		134,4	
3	184,4		183,6	
4	172,0		172,6	
4a	111,3		110,6	
4b	137,1		137,3	
5	119,0	7,64	119,2	7,65
6	125,7		125,9	
7	124,6	6,99	124,8	7,04
8	114,2	7,50	113,1	7,51
8a	136,5		135,4	
9a	145,5		146,1	
10	74,1	4,69	37,6	2,74
11	69,3	3,98	65,8	3,96
12	19,5	1,16	23,6	1,14
13	12,0	1,94	12,1	1,92
14	33,8	3,37	33,8	3,38
15	123,7	5,32	123,6	5,32
16	131,3		131,4	
17	25,4	1,72	25,4	1,72
18	17,6	1,72	17,6	1,72

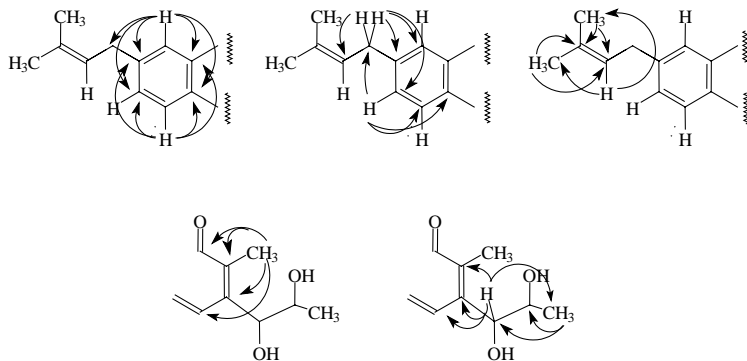


Abb. 24. C-H-Kopplungen aus dem HMBC-Spektrum (bei 75,47 MHz und 300 MHz) von CS-79B in [D<sub>6</sub>]DMSO

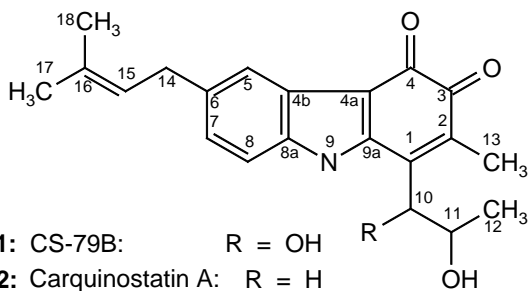


Abb. 25. Strukturen von CS-79B und Carquinostatin A

Physikalisch-chemische Eigenschaften von CS-79B: Schmelzpunkt = 143°C; MS = 352,4; UV  $\lambda_{\text{max}}$  = 223 nm, 248 nm, 428 nm; IR  $\nu_{\text{max}}$  = 3600  $\text{cm}^{-1}$ , 3100  $\text{cm}^{-1}$ , 3020  $\text{cm}^{-1}$ , 2980  $\text{cm}^{-1}$ , 1680  $\text{cm}^{-1}$ , 1650  $\text{cm}^{-1}$ , 1630  $\text{cm}^{-1}$ , 1480  $\text{cm}^{-1}$ ; Rf = 0,15 (Kieselgel, Chloroform - 5% Methanol)

Physikalisch-chemische Eigenschaften von Carquinostatin A: Schmelzpunkt = 197°C; UV  $\lambda_{\text{max}}$  = 231 nm, 271 nm, 423 nm; IR  $\nu_{\text{max}}$  = 3600  $\text{cm}^{-1}$ , 3100  $\text{cm}^{-1}$ , 3020  $\text{cm}^{-1}$ , 2980  $\text{cm}^{-1}$ , 1680  $\text{cm}^{-1}$ , 1650  $\text{cm}^{-1}$ , 1630  $\text{cm}^{-1}$ , 1480  $\text{cm}^{-1}$ ; Rf = 0,30 (Kieselgel, Chloroform - 5% Methanol)

#### 5.4. Antibiotische Aktivitäten von CS-79B und Carquinostatin A

Die beiden isolierten Carbazolverbindungen wurden im Plattendiffusionstest auf das Vorhandensein von antibiotischen Aktivitäten geprüft. Als Testkeime wurden grampositive Bakterien, darunter Kokken (*Micrococcus*), nicht-sporenbildende Stäbchen (*Lactobacillus*), coryneforme Bakterien (*Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Curtobacterium*) und Actinomyceten, Endosporen bildende Stäbchen (*Bacillus*) sowie gramnegative Bakterien (*Agrobacterium*, *Erwinia*, *Escherichia*, *Xanthomonas*) eingesetzt. Als eukaryotische Vertreter wurden zwei Hefen (*Pichia* und *Saccharomyces*) ausgewählt. *Halobacterium halobium* gehört zur Gruppe der Archaeobakterien und unterscheidet sich von den Eubakterien u.a. im Aufbau von Zellwand, Membranlipiden sowie dem Transkriptions- und dem Translationsapparat (WOESE et al., 1978).

Wie aus Tab. 6 ersichtlich, zeigten beide Substanzen sehr ähnliche Wirkspektren, wobei CS-79B etwas weniger aktiv war als Carquinostatin A. Die antibiotische Wirkung beschränkte sich aber auf *Arthrobacter*-Stämme, *Agrobacterium tumefaciens* und *Brevibacterium stercoricum*.

Für die sensitiven Stämme wurden im Reihenverdünnungstest minimale Hemmkonzentrationen ermittelt, die zwischen 1 und 10  $\mu\text{g/ml}$  lagen (Tab. 7).

Ausplattieren von 1  $\mu\text{l}$  Kultur führte durch Diffusion des Wirkstoffs in den Agar zu einer Erniedrigung der Konzentration, worauf die Zellen wieder fähig waren zu wachsen. Damit erwiesen sich die antibiotischen Effekte als bakteriostatisch.

Tab. 6. Antibiotische Wirkungsspektren von CS-79B und Carquinostatin A

Testorganismen	Hemmzone [mm]:	
	CS-79B	Carquinostatin A
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	10	10
<i>Amycolatopsis mediterranei</i>	- <sup>1</sup>	-
<i>Arthrobacter crystallopoites</i>	7	16
<i>Arthrobacter globiformis</i>	+/- <sup>2</sup>	10
<i>Arthrobacter oxydans</i>	8	14
<i>Arthrobacter pascens</i>	7	12
<i>Arthrobacter simplex</i>	+/-	+/-
<i>Bacillus migulanus</i>	-	-
<i>Bacillus subtilis</i>	-	-
<i>Brevibacterium sterolicum</i>	+/-	9
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	-	-
<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	-	-
<i>Escherichia coli</i> A 19	-	-
<i>Escherichia coli</i> H 560	+/-	+/-
<i>Halobacterium halobium</i>	-	-
<i>Klebsiella planticola</i>	-	-
<i>Lactobacillus casei</i>	-	-
<i>Micrococcus luteus</i>	-	-
<i>Pseudomonas saccharophila</i>	-	-
<i>Streptomyces tendae</i> (vegetative Zellen)	-	-
<i>Streptomyces tendae</i> (Sporen)	+/-	+/-
<i>Streptomyces tendae</i> bld-1	-	-
<i>Xanthomonas oryzae</i>	-	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	-

1) keine Hemmwirkung

2) Hemmwirkung undeutlich

Tab. 7. Minimale Hemmkonzentrationen von CS-79B und Carquinostatin A

Testorganismen	MHK [ $\mu\text{g/ml}$ ]:	
	CS-79B	Carquinostatin A
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	1,25	1,25
<i>Arthrobacter crystallopoites</i>	>10	10
<i>Arthrobacter globiformis</i>	10	5
<i>Arthrobacter oxydans</i>	>10	10
<i>Arthrobacter pascens</i>	2,5	2,5
<i>Brevibacterium sterolicum</i>	>10	10

## 5.5. Fermentation

Die Analyse einer phosphatlimitierten Fermentation analog zu III.2.1. zeigte, daß es sich bei *S. tendae bld-1* nicht um eine ppGpp<sup>0</sup>-Mutante handelt (Abb. 26). So war während die Phosphatkonzentration im Medium abfiel, ein ppGpp-Anstieg nachweisbar, der allerdings mit einer Höchstkonzentration von weniger als 5 pmol/mg TG nur äußerst schwach ausfiel und in der Nähe der Nachweisgrenze der Methode lag. Nach Beendigung des Wachstums wurde kein ppGpp mehr in den Myzelextrakten gefunden.

Bemerkenswert war außerdem der Produktionsverlauf der Carbazolderivate. Ähnlich wie bei den Schüttelkolbenkulturen mit Glucose-Minimalmedium traten CS-79B und Carquinostatin A bereits während der Wachstumsphase im Kulturüberstand auf, wobei die maximale Konzentration im Fermenter mit 24 mg/l deutlich geringer ausfiel als in Schüttelkolben (Abb. 21).

Gegen Ende der Wachstumsphase war kein Produkt mehr im Kulturüberstand vorhanden.

Während der stationären Phase nach 80 h und 100 h konnten jedoch beide Antibiotika wieder detektiert werden, wobei noch ungefähr die Hälfte der Konzentrationen aus der ersten Produktionsphase erreicht wurden.

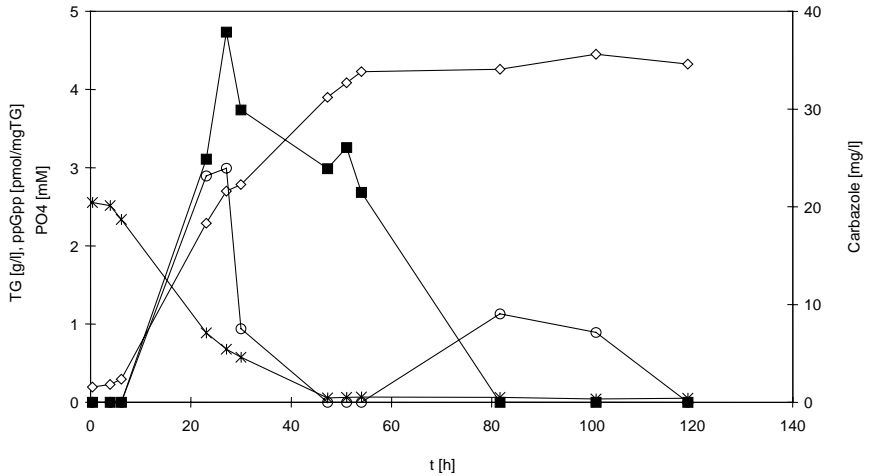


Abb. 26. Phosphatlimitierte Fermentation mit *S. tendae bld-1*. —◇— Trockengewicht, —○— Carbazole, —■— ppGpp, —\*— PO4

## 6. Untersuchung der autotoxischen Wirkung von Juglomycin

Da prokaryotische Zellwände nicht aus Chitin aufgebaut sind, wird *S. tendae* nicht durch die von ihm gebildeten Nikkomycine gehemmt. Im Gegensatz zu dieser xenobiotischen Wirkung der Nikkomycine ist für die Juglomycine ein korrespondierender Wirkort im Produzenten vorhanden, so daß bei einer hinreichenden Konzentration Wachstumshemmung auftritt. Dadurch kann die Juglomycinsynthese auch die Nikkomycinproduktion in Fermentationsprozessen beeinflussen.

Um die Auswirkungen von Juglomycin auf die Nikkomycinbildung beurteilen zu können, ist es notwendig die minimale Hemmkonzentration (MHK) von Juglomycin bei *S. tendae* zu kennen. Da für die Beurteilung der Autotoxifikation Kenntnisse über die Wirkmechanismen dieses Antibiotikums vorteilhaft sind, wurden ferner Untersuchungen zur Charakterisierung der Wirkungsweise durchgeführt.

## 6.1. Produktion und Isolierung von Juglomycin

Die Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration erforderte, daß zuerst eine größere Menge Juglomycin produziert und in ausreichender Reinheit isoliert wurde.

In Vorversuchen wurde deshalb nach einem möglichst günstigen Produktionsmedium gesucht. Verglichen wurde die Juglomycinproduktion in den komplexen Medien 1-4 sowie in Medium 8 als chemisch definiertem Medium.

Die Ergebnisse dieses Medientests sind in Abb. 27 graphisch dargestellt. In den Schüttelkolben mit Medium 8 konnte kein Juglomycin nachgewiesen werden. Geringe Mengen Juglomycin wurden in Medium 1 produziert. Die höchste Konzentration wurde mit 12,5 mg/l nach 48 h gemessen. Wesentlich günstigere Verhältnisse für die Juglomycinbildung lagen in Medium 3 und Medium 4 vor. Die Höchstkonzentrationen betragen hier 46 mg/l bzw. 74 mg/l nach 72 h. Als mit Abstand effektivstes Medium erwies sich jedoch Medium 2. Nach 72 h wurde eine Konzentration von 330 mg/l ermittelt. 24 h später war der Juglomycingehalt bereits deutlich auf unter 150 mg/l gesunken.

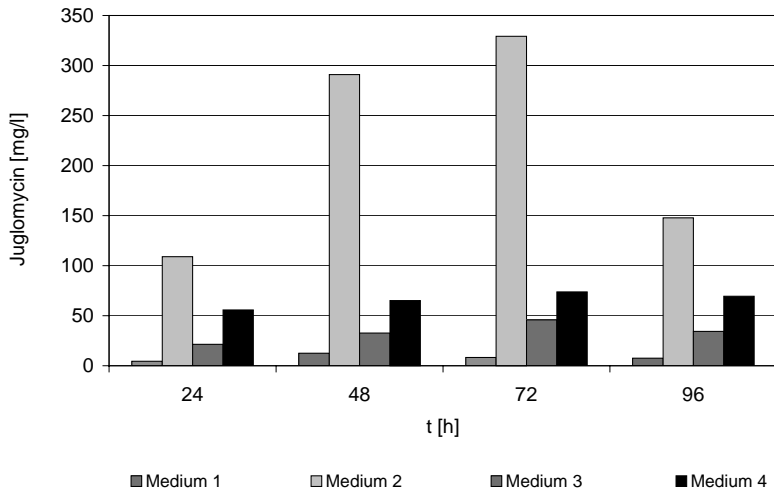


Abb. 27. Medienabhängigkeit der Juglomycinproduktion



Für die Isolierung von Juglomycin wurde *S. tendae* daher in 2,8 l Medium 2 gezüchtet. Nach 72 h Inkubationsdauer wurde das Kulturfiltrat wie unter II.7.1. beschrieben aufgearbeitet. Die Bestimmung des Juglomycingehalts der einzelnen Reinigungsstufen erfolgte durch HPLC und DC an Kieselgel.

Die vereinigten und auf 15,5 ml eingeeengten Juglomycin-haltigen Fraktionen aus der Gelfiltration an Sephadex LH-20 stellten das Juglomycin-Rohprodukt (Juglomycin-RP) dar. Die Juglomycinkonzentration in diesem Rohprodukt betrug 7,4 mg/ml. Da im Kulturfiltrat 160 mg/l vorhanden waren, ergab sich durch die Aufarbeitung ein Verlust von ungefähr 75 %. Für die Aufnahme antibiotischer Wirkspektren und die Bestimmung von minimalen Hemmkonzentrationen wurde die während der Aufarbeitung gewonnene kristalline Reinsubstanz verwendet.

Abb. 28 zeigt die dünnschichtchromatographische Analyse von Rohprodukt und dem kristallinen Standard. Im Rohprodukt waren im sichtbaren Licht mehrere gelb gefärbte Banden zu sehen, die sich in Gegenwart von Sauerstoff und Licht ins Dunkelbraune verfärbten. Alle Banden wurden mit Hilfe des Densitometers UV/Vis-spektroskopisch verglichen. Die lipophilsten Banden ( $R_f = 0,73; 0,60; 0,56$ ) wiesen die für Juglomycine typischen Absorptionsmaxima bei 260 nm und 425 nm auf.

Demgegenüber zeigte der Fleck mit  $R_f$ -Wert = 0,36 bei 425 nm nur ein sehr schwach ausgeprägtes Maximum. Mit dem abweichenden Absorptionsverhalten in Einklang stand, daß sich bei diesem Fleck in der Bioautographie keine biologische Aktivität gegen *Bacillus subtilis* nachweisen lies, wohingegen die Juglomycin-Banden in diesem Test deutliche Wachstumshemmung hervorriefen.

Bei Betrachtung im sichtbaren Licht und unter UV-Licht bei 254 nm und 366 nm erschien die erhaltene Standardlösung als einheitliches Produkt (Spur II,  $R_f = 0,73$ ), das auch in den Überständen der Fraktionen, in denen die Kristallisation auftrat noch vorhanden war (Spur I). Auch im HPLC-Chromatogramm erwies sich die Kristalllösung als chromatographisch rein (Abb. 29).

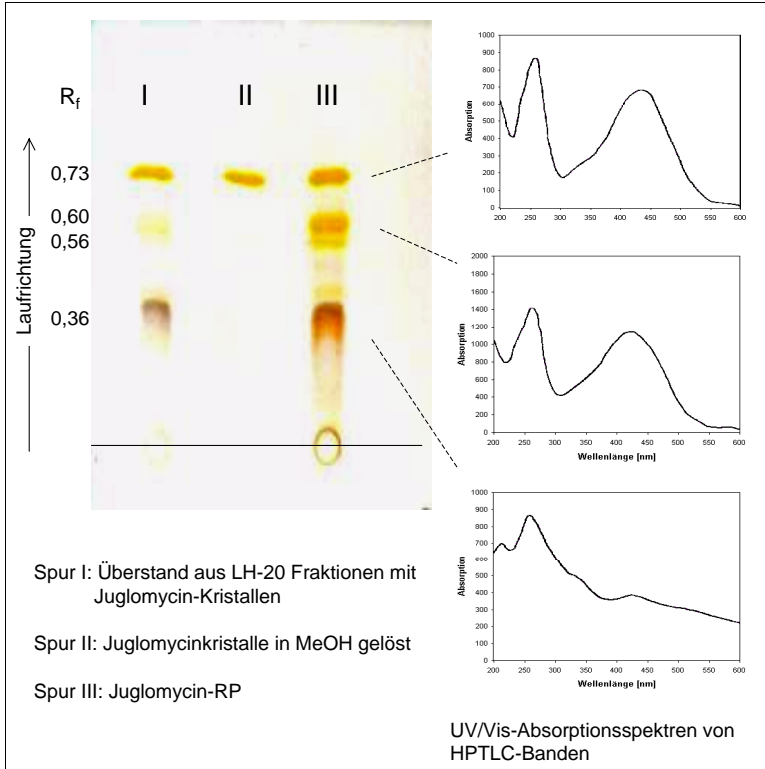


Abb. 28. HPTLC-Analysen zur Isolierung von Juglone

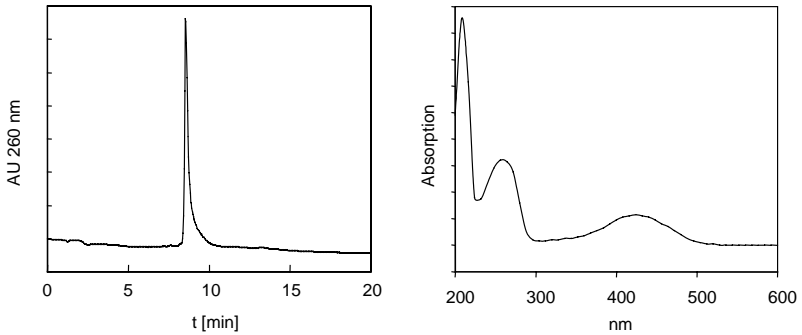


Abb. 29. HPLC-Chromatogramm (links) und DAD-UV/Vis-Spektrum (rechts) von Juglone-Kristallen in Methanol

## 6.2. Wirkungsspektrum

Mit Hilfe des Plattendiffusionstests wurde ein antibiotisches Wirkungsspektrum von Juglomycin aufgenommen. Bei jedem Testkeim wurde das Wachstum auf einem Komplexmedium (Medium 5) und auf einem Minimalmedium (Medium 7, *Halobacterium halobium*: Medium 6) verglichen.

Aus Tab. 8 geht hervor, daß Juglomycin über ein breites Wirkungsspektrum verfügt. Alle getesteten Organismen wurden im Wachstum gehemmt, was auf einen zentralen Wirkort dieses Antibiotikums im Stoffwechsel schließen läßt. Die größten Hemmhofdurchmesser traten bei *Arthrobacter*-Stämmen, *Brevibacterium linens*, *Curtobacterium flaccumfaciens* und *Erwinia amylovora* auf.

## 6.3. Minimale Hemmkonzentrationen

Für ausgewählte Stämme wurde die MHK durch Kultivierung in Mikrotiterplatten (s. II.8.3.1.) bestimmt. Wie aus Tab. 9 ersichtlich, lagen die ermittelten Werte zwischen 0,1 µg/ml und 5,0 µg/ml. Deutlich unterschiedliche Empfindlichkeiten zwischen grampositiven und gram-negativen Keimen wurde nicht beobachtet. Die Wirkung erwies sich in allen Fällen als bakterio­statisch, da durch das Verdünnen des Mediums wieder Zellwachstum einsetzte.

Zur Ermittlung der MHK auf den Produzentenstamm *S. tendae* wurde der Reihenverdünnungstest verwendet. Dabei wurde in Minimalmedium (Medium 8) ein Wert ermittelt, der zwischen 8 und 13 µg/ml lag. *Bacillus subtilis* diente als Vergleichsstamm und reagierte mit einer MHK von 0,65 µg/ml (Medium 7) wesentlich sensitiver. Auch hier war die Wirkung bakterio­statisch.

Tab. 8. Antimikrobielle Aktivitäten von Juglomycin

Testorganismen	Hemmzone [mm]:			
	Juglomycin (15 µg/Rondelle)		Streptomycin (10 µg/Rondelle)	
	KM <sup>1</sup>	MM <sup>2</sup>	KM	MM
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	14	24	22	22
<i>Arthrobacter aurescens</i>	14	22	26	-
<i>Arthrobacter crystallopoites</i>	18	34	31	48
<i>Arthrobacter globiformis</i>	26	28	17	29
<i>Arthrobacter oxydans</i>	16	26	24	16
<i>Arthrobacter pascens</i>	18	26	34	28
<i>Arthrobacter simplex</i>	14	22	19	17
<i>Bacillus migulanus</i>	14	- <sup>3</sup>	22	-
<i>Bacillus subtilis</i>	14	18	17	15
<i>Brevibacterium linens</i>	16	30	34	32
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	14	18	16	17
<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	12	34	32	40
<i>Erwinia amylovora</i>	16	30	22	22
<i>Escherichia coli</i> A 19	10	17	9	18
<i>Halobacterium halobium</i>	n.g. <sup>4</sup>	18	n.g.	0
<i>Lactobacillus casei</i>	14	22	26	30
<i>Micrococcus luteus</i>	10	17	14	20
<i>Micrococcus roseus</i>	20	26	30	30
<i>Myxococcus</i> sp.	18	-	26	-
<i>Pichia pastoris</i>	16	-	n.g.	n.g.
<i>Xanthomonas oryzae</i>	14	24	20	18
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	12	-	n.g.	n.g.

1) Komplexmedium

2) Minimalmedium

3) kein Wachstum

4) nicht getestet

Tab. 9. Minimale Hemmkonzentrationen von Juglomycin

Testorganismen	MHK [ $\mu\text{g/ml}$ ]
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	5,0
<i>Arthrobacter crystallopoites</i>	0,1
<i>Arthrobacter globiformis</i>	5,0
<i>Brevibacterium flavum</i>	0,5
<i>Escherichia coli</i> A 19	5,0
<i>Micrococcus luteus</i>	5,0
<i>Xanthomonas oryzae</i>	0,5
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1,0

#### 6.4. Antagonisierung der antibiotischen Wirkung durch L-Cystein

Der Vergleich der Hemmwirkung auf komplexem Medium und auf Minimalmedium (Tab. 8) zeigte, daß die antibiotischen Effekte auf alle getesteten Organismen bei Verwendung eines chemisch definierten Mediums deutlich stärker ausfielen als bei Wachstum auf einem komplexen Medium. Offensichtlich befinden sich im Komplexmedium Bestandteile die die Wirkung von Juglomycin teilweise neutralisieren können. Da Chinone im allgemeinen keinen aromatischen Charakter zeigen, sondern sich chemisch eher wie  $\alpha$ ,  $\beta$ -ungesättigte Ketone verhalten, kommen zur Erklärung 1,4-Additionsreaktionen mit SH- und  $\text{NH}_2$ -Gruppen in Betracht.

Mit Hilfe des Kreuzstreifentests wurde daher untersucht ob die durch Juglomycin bewirkte Wachstumshemmung von *B. subtilis*, durch die Aminosäuren L-Cys bzw. L-Gly aufgehoben werden konnte.

Wie Abb. 30 zeigt, trat beiderseits des mit einer Juglomycinlösung getränkten Filterstreifens eine deutliche Hemmzone auf. Bei Verwendung von L-Cys auf dem 2. Teststreifen wurde

diese Hemmzone entlang des L-Cys-Konzentrationsgradienten immer schmäler und war schließlich im Kreuzbereich praktisch vollständig aufgehoben. L-Gly zeigte keinen Effekt. Die antibiotische Wirkung von Juglomycin konnte somit spezifisch durch L-Cys aufgehoben werden.

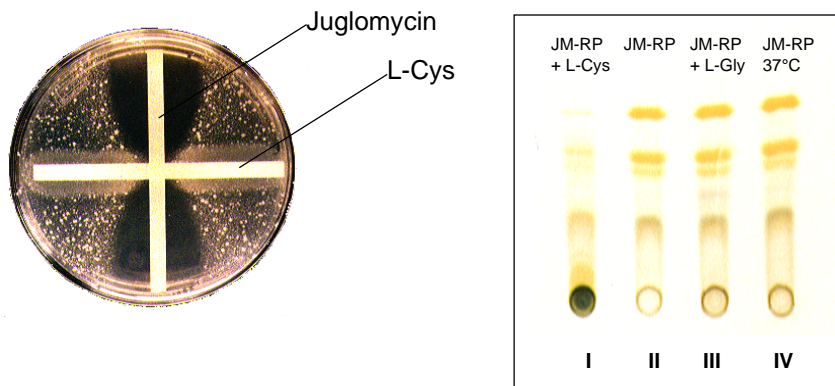


Abb. 30. Antagonisierung der Juglomycinwirkung durch L-Cys (JM-RP: Juglomycin-Rohprodukt). Links: Kreuzstreifentest; rechts: Dünnschichtchromatogramm

Die dünnschichtchromatographische Untersuchung der Reaktionen der Juglomycin-rohextraktlösung mit L-Cys und L-Gly lieferte entsprechende Resultate (Abb. 30). Während sich der Reaktionsansatz JM-RP + L-Gly (Spur III) chromatographisch nicht von JM-RP (Spur II) unterschied, waren nach Inkubation mit L-Cys die charakteristischen gelben Juglomycinbanden verschwunden (Spur I). Stattdessen trat am Startfleck ein dunkles hydrophiles Produkt auf, bei dem es sich um ein Addukt aus Juglomycin und L-Cys handeln dürfte. Spur IV diente der Stabilitätsanalyse des Juglomycin-Rohprodukts und zeigt, daß bei der Inkubationstemperatur des Kreuzstreifentests (37 °C) kein Zerfall der Juglomycine auftrat.

## 6.5. Hemmung von Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase

Das Enzym Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) besitzt einen L-Cys-Rest im aktiven Zentrum, dessen SH-Gruppe durch eine Thioesterbildung am katalytischen Mechanismus der Umsetzung von Glycerinaldehyd-3-phosphat zu 1,3-Biphosphoglycerat im Rahmen der Glykolyse beteiligt ist (Abb. 31). Wenn die 1,4-Addition von SH-Gruppen an den Naphtochinonring des Juglomycins für die antibiotische Wirkung von Bedeutung ist, sollte dieses Enzym durch Juglomycin gehemmt werden. Wie unter II.8.5.1. beschrieben, wurde daher ein in vitro-Testsystem aufgebaut, in dem die Einflüsse von Juglomycin (17  $\mu\text{M}$ ) sowie von 1,4-Naphtochinon (1,4-NQ, 24  $\mu\text{M}$ ) als Kontrollsubstanz untersucht wurden.

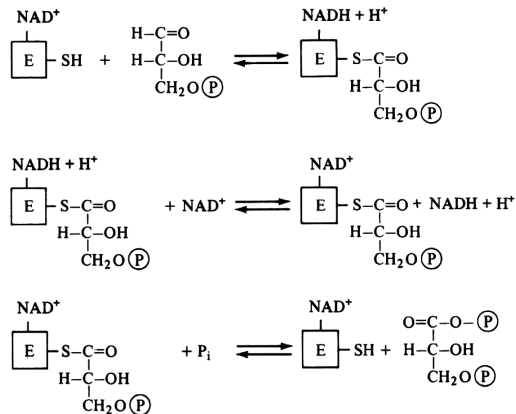


Abb. 31. Umsetzung von Glycerinaldehyd-3-phosphat durch GAPDH

Der Reaktionsverlauf ist in Abb. 32 dargestellt. Sowohl 1,4-NQ wie auch Juglomycin führten zu einer deutlichen Hemmung des Enzymsatzes. Bereits nach 3 min war eine Inhibition von 80 % durch Juglomycin erreicht. Im weiteren Verlauf kam es zu einer leichten Abnahme der Hemmwirkung, möglicherweise verursacht durch Juglomycinzerfall. Chinone sind, besonders in Gegenwart von Sauerstoff bzw. Licht instabil und können sich durch Oxidation/Reduktion oder durch Polymerisierungsreaktionen verändern.

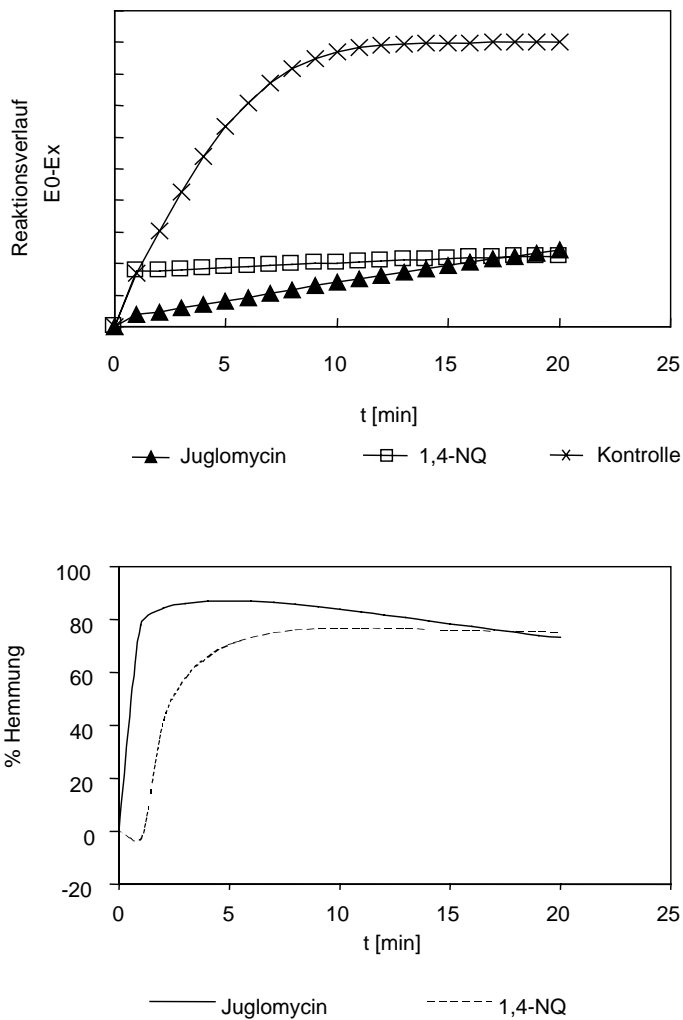


Abb. 32. Hemmung von GAPDH durch 1,4-NQ und Juglomycin



## 6.6. Hemmung von Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase und Lactat-Dehydrogenase

Um zu klären ob es sich bei der beobachteten Hemmung von GAPDH um einen spezifischen Effekt handelte, wurde der Einfluß von Juglomycin auf zwei weitere Enzyme, Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (G-6-PDH) und Lactat-Dehydrogenase (LDH) getestet.

Wie aus Abb. 33 hervorgeht, wurde der Ansatz mit G-6-PDH durch Juglomycin vollständig gehemmt. 1,4-NQ führte dagegen nur zu einer abgeschwächten Inhibition. Während die Kontrollansätze ohne Zusatz von Hemmstoff einen typischen Sättigungsverlauf zeigten, verlief die Reaktion unter dem Einfluß von 1,4-NQ deutlich verlangsamt. Die NADPH-Konzentration stieg linear an und erreichte nach 20 min einen Wert der bei ungefähr 60 % der Kontrollen lag.

Wieder anders sah die Reaktionskinetik bei der Reduktion von Pyruvat zu Lactat durch LDH aus (Abb. 34). Ohne Zusatz von Hemmstoff verlief die Umsetzung schlagartig innerhalb weniger Sekunden. Juglomycin bzw. 1,4-NQ-Zusatz bewirkten hier einen identischen Hemmverlauf. Die Reaktion lief zwar verlangsamt ab, führte jedoch innerhalb von 20 min zu einer vollständigen Umsetzung von Pyruvat.

Alle drei getesteten Enzyme erwiesen sich demnach als sensitiv gegen die Naphtochinone Juglomycin und 1,4-NQ, zeigten jedoch voneinander stark abweichende Inhibitionskinetiken.

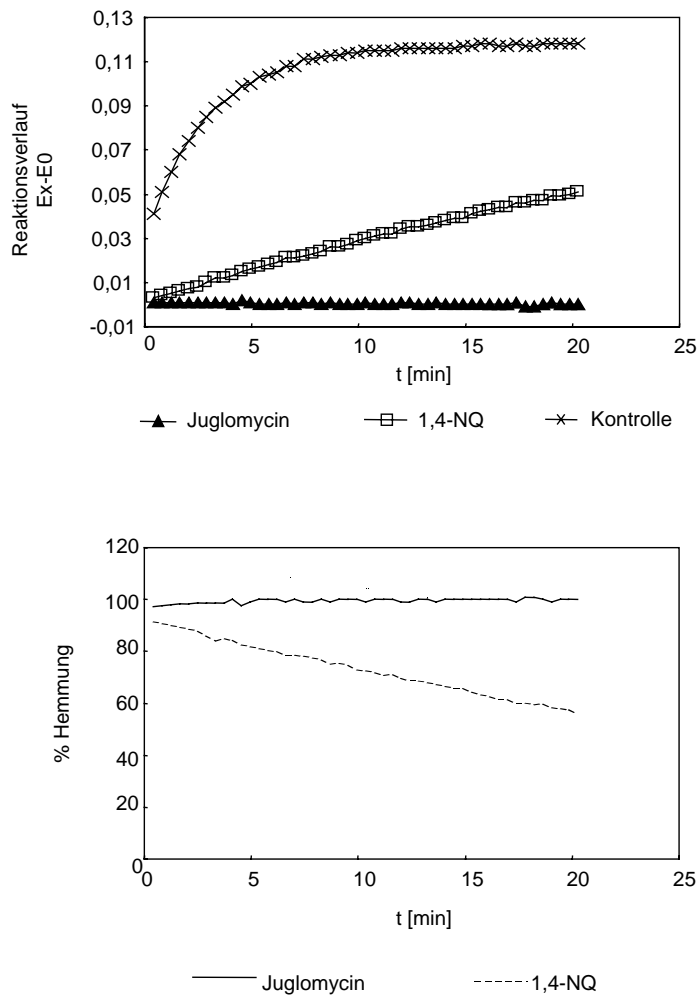


Abb. 33. Hemmung von G-6-PDH durch 1,4-NQ und Juglomycin

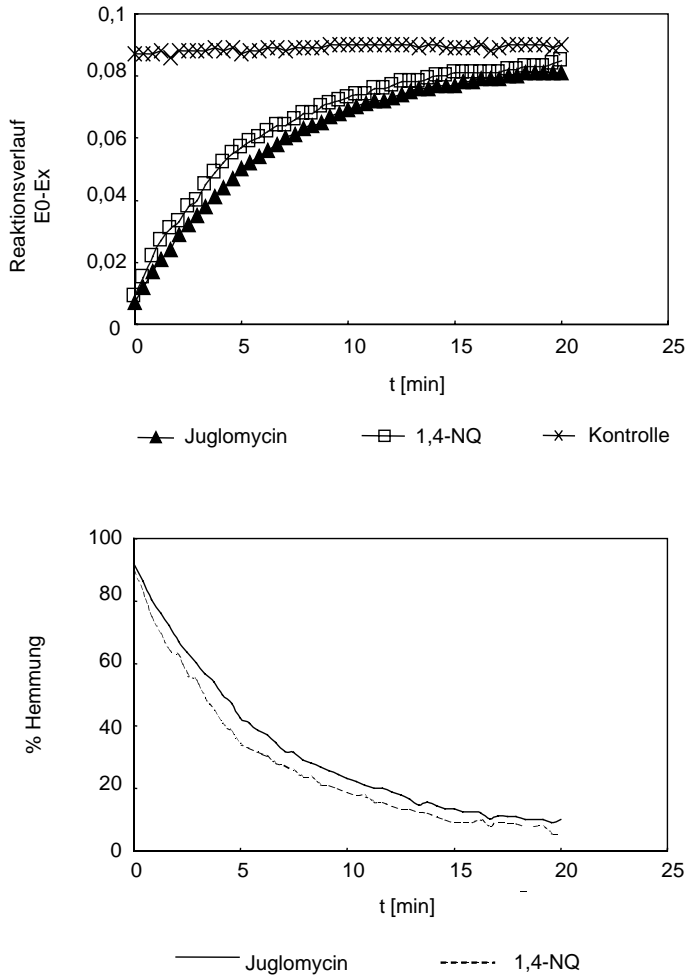


Abb. 34. Hemmung von LDH durch 1,4-NQ und Juglomycin



## IV. Diskussion

Die Regulation der Antibiotikaproduktion bei Streptomyceten besteht aus einem komplexen Netzwerk, in dem verschiedene extrazelluläre und intrazelluläre Systeme integrativ zusammenwirken. Zwar sind die einzelnen Bestandteile und Mechanismen dieses Regulationsnetzwerks immer noch in weiten Teilen unbekannt, doch gibt es physiologische und genetische Hinweise, die für eine maßgebliche Beteiligung der stringenten Kontrolle an der Induktion von Morphogenese und Sekundärstoffwechsel sprechen (SIMUTH et al., 1979; OCHI, 1986a, 1986b, 1990a). Neuere Untersuchungen mit *relA*-Mutanten von *S. coelicolor* ergaben, daß ppGpp, das die stringente Reaktion auslöst, für die Antibiotikaproduktion bei diesem Stamm zumindest unter Stickstoffmangelbedingungen benötigt wird (CHAKRABURTTY & BIBB, 1997). Bei *S. antibioticus* führte die Inaktivierung von *relA* zum Verlust der Actinomycinbildung (HOYT & JONES, 1999).

In der vorliegenden Arbeit gelang es auch in Fermentationen mit den beiden Actinomycetenstämmen *Streptomyces tendae* und *Amycolatopsis mediterranei* ppGpp nachzuweisen. Beide Organismen zeigten einen raschen Anstieg dieses Signalmoleküls als Reaktion auf Phosphat- und Ammoniummangelzustände. Die Biosynthese von ppGpp konnte mit der Produktion von Nikkomycinen und Juglomycinen bzw. von Balhimycin korreliert werden. Das Pentaphosphat pppGpp, das ebenfalls stringente Kontrolle auslöst, wurde dagegen unter keinen der untersuchten Kultivierungsbedingungen beobachtet.

Bei *S. tendae* ließen sich nur geringe Mengen von ppGpp nachweisen. Phosphatmangel führte zu einer Höchstkonzentration von 11 pmol/mg TG, Ammoniummangel zu 7,5 pmol/mg TG bzw. 8,2 pmol/mg TG. Bei der unlimitierten Fermentation wurden 9,3 pmol/mg TG erreicht. *A. mediterranei* synthetisierte unter Phosphatmangel 6,5 pmol/mg TG, unter Stickstoffmangel fiel die ppGpp-Produktion dagegen mit 25 pmol/mg TG deutlich stärker aus.

Im Vergleich dazu wurden für *S. coelicolor* Maximalkonzentrationen von 16 pmol/mg TG (STRAUCH et al., 1991), 14,3 pmol/mg TG (CHAKRABURTTY et al., 1996) und 15 pmol/mg TG (CHAKRABURTTY & BIBB, 1997) publiziert, wobei dieselben analytischen Methoden zum Einsatz kamen. JONES et al. (1996) fanden bei Fermentationen mit *S. clavuligerus* nach

Ammoniumlimitation 17 pmol/mg TG und KELLY et al. (1991) berichten von 80 pmol/mg TG bei *S. antibioticus*. Ebenfalls in *S. antibioticus* wurden von HOYT & JONES (1999) über 250 pmol/mg TG gefunden. In Oberflächenkulturen von *S. griseus* führte die ppGpp-Akkumulation dagegen zu Höchstwerten die unter 6 pmol/mg TG blieben (KANG et al., 1999).

Diese sehr unterschiedlichen Werte spiegeln neben stammspezifischen Unterschieden auch unterschiedliche Medienzusammensetzungen, vor allem bezüglich der Stickstoffquelle wider und können daher nicht direkt miteinander verglichen werden.

Sogenannte „shift-down“-Experimente, d.h. Transfer der Zellen von einem aminosäurehaltigen in ein aminosäurefreies Medium, führen zu einer noch deutlich ausgeprägteren ppGpp-Synthese als ständiges Wachstum in einem Minimalmedium. Hier wurden bei *S. coelicolor* Maximalwerte von 30 pmol/mg TG (CHAKRABURTTY & BIBB, 1997), bis über 600 pmol/mg TG (OCHI, 1990a) gemessen.

Nur dieser Fall entspricht der klassischen Aktivierung von RelA wie er für *E. coli* beschrieben wurde. Werden die Zellen dagegen in Minimalmedium kultiviert, ist bereits eine Anpassung an schlechtere Ernährungsbedingungen erfolgt. Beispielsweise müssen die Biosynthesewege für Aminosäuren bereits induziert sein, ein Effekt an dem normalerweise RelA beteiligt ist.

Um die gemessenen Werte beurteilen zu können, sind zunächst die verwendeten analytischen Methoden zu hinterfragen. Aufgrund der chemischen Labilität der 3'-Pyrophosphat-Gruppe sowohl in saurem wie auch in alkalischem Milieu, kann ppGpp leicht zu ppGp und ppG (GDP) zerfallen. Die Konzentration der zur Extraktion eingesetzten Säure und die Extraktionsdauer müssen also als Kompromiß zwischen einer möglichst quantitativen Extraktion von Metaboliten auf der einen und möglichst geringen Verlusten infolge Säurehydrolyse auf der anderen Seite aufgefasst werden. Alternative Extraktionsmethoden wie Zellyse durch Lysozym bei neutralem pH (LAGOSKY & CHANG, 1978) oder Fixierung der Zellen durch Formaldehyd mit anschließender KOH-Extraktion (LITTLE & BREMER, 1982) wurden bei *E. coli* angewandt, ohne jedoch das Problem des ppGpp-Abbaus dadurch zu umgehen. Zusätzliche Verluste von ppGpp können während der Filtration des Myzels oder während der 60-minütigen HPLC-Analyse auftreten.

Legt man die von MARTINEZ-COSTA et al., (1998) veröffentlichten Abbauraten für ppGpp zugrunde, lassen sich Halbwertszeiten von etwa 3-6 min berechnen. Daraus wird klar, daß bei den eingesetzten Meßintervallen die genaue Erfassung der tatsächlich auftretenden Maximalkonzentration nur zufällig gelingen dürfte. Die vorliegenden ppGpp-Messungen sollten also nicht als exakte quantitative Daten interpretiert werden. Vielmehr läßt sich aus ihnen die

qualitative Reaktion der untersuchten Stämme auf verschiedene Umwelt- bzw. Kultivierungsbedingungen und eine mögliche Korrelation von ppGpp-Synthese und der Induktion des Sekundärstoffwechsels erschliessen.

Bei Verwendung eines komplexen Mediums konnten PFEFFERLE et al. (1995) in *S. tendae* Tü 901 während der gesamten Kultivierungsdauer überhaupt kein ppGpp nachweisen. Transfer in aminosäurefreies Medium führte dagegen zu Maximalkonzentrationen von über 100 pmol/mg TG. Bei dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten Stamm und unter den gewählten Fermentationsbedingungen treten also nur geringe ppGpp-Konzentrationen auf. Die gemessenen Konzentrationen der Nucleosidtriphosphate liegen in den für andere Streptomyceten publizierten Bereichen.

Der Vergleich zwischen Phosphat- und Ammoniumlimitation zeigt, daß die ppGpp-Akkumulierungen bei *S. tendae* in beiden Fällen zu drastischen Stoffwechselumstellungen führten, die im Sinne einer stringenten Kontrolle interpretiert werden können.

So weist die abnehmende RNA-Konzentration auf einen Stop der Synthese von Ribosomen, auf die Aktivierung intrazellulärer RNasen und damit auf die Beendigung der Wachstumsphase hin. Ebenfalls in dieser Phase kam es zur Induktion der Nikkomycinsynthese und zur Expression einer alkalischen Phosphatase. Extrazelluläre Phosphatasen dienen unter Phosphatmangelbedingungen der Erschließung alternativer Phosphatquellen in der Umgebung. Überraschenderweise wurde auch bei ammoniumlimitierter Fermentation eine entsprechende Phosphataseaktivität infolge der ppGpp-Akkumulierung gefunden, obwohl die Phosphatkonzentration über 2 mM betrug. Die Expression dieses Enzyms könnte demnach von ppGpp abhängen, ein Befund der durch die Beobachtungen von GENTRY et al., (1993) unterstützt wird. Danach ist in ppGpp<sup>0</sup>-Mutanten von *E. coli* die Induktion einer Phosphatase beeinträchtigt. Welche physiologische Funktion dieses Enzym unter Stickstoffmangelbedingungen besitzt ist unklar.

Daneben wurden jedoch auch charakteristische Unterschiede zwischen phosphat- und ammoniumlimitierter Fermentation festgestellt.

Bei Phosphatlimitation wurden die intrazellulären Nucleosidtriphosphatpools schnell aufgebraucht, so daß Phosphatmangel mit Energiemangel gleichzusetzen ist. Unter Stickstoffmangelbedingungen wurden dagegen etwa 10-fach höhere Triphosphatkonzentrationen gemessen.

Sowohl bei *S. tendae* wie auch bei *A. mediterranei* erfolgte bei phosphatlimitierter Fermentation eine Akkumulierung von ppGpp zu einem Zeitpunkt, als noch Phosphat im Medium vorhanden war. Die maximale ppGpp-Konzentration korrelierte mit Phosphatkonzentrationen von etwa 1 mM bei *S. tendae* bzw. 0,2 mM bei *A. mediterranei*. Im weiteren Verlauf nahm die Biomasse noch um etwa 7 g/l zu, wobei gleichzeitig Ammonium und Glucose aus dem Medium aufgenommen wurden. Im Gegensatz dazu erfolgte bei ammoniumlimitierter Fermentation der ppGpp-Anstieg zeitgleich mit dem vollständigen Verbrauch des Ammoniums und der Biomassezuwachs war mit dem Erreichen der maximalen ppGpp-Konzentrationen beendet.

Wie durch die Bestimmung der intrazellulären LL-Dap-Konzentration bei *S. tendae* gezeigt wurde, war für die beobachtete Trockengewichtszunahme keine verstärkte Zellwandsynthese verantwortlich. Eine Verdickung der Hyphen, die auf einen derartigen Effekt hindeuten könnte, wurde von HEGE-TRESKATIS (1993) in kontinuierlicher Kultur beobachtet.

Die für diese Analysen eingesetzte Methode der densitometrischen Auswertung von Ninhydrin-gefärbten HPTLC-Platten erwies sich als geeignet, um den Gehalt an LL-Dap in Zellhydrolysaten quantitativ zu erfassen. Sowohl bei Phosphat- wie auch bei Ammoniummangel zeigte sich eine über den Fermentationsverlauf konstante LL-Dap Konzentration von 1  $\mu\text{mol/mg}$  TG.

Bakterien häufen unter Bedingungen die kein Wachstum erlauben, aus den im Medium vorhandenen Nährstoffen verschiedene Speicher- oder Reservestoffe an. Wichtige Speicherstoffe von Streptomyceten sind Glykogen (BRANA et al., 1986), Triacylglyceride (OLUKOSHI & PACKTER, 1994) und Polyphosphate (CHATER, 1993). Glykogen und Polyphosphatsynthese sind bei *E. coli* abhängig von erhöhten ppGpp-Konzentrationen (HECKER et al., 1986; RAO et al., 1998). *E. coli*-Zellen können bei Aminosäuremangel und in Gegenwart von Glucose nur dann Glykogen speichern, wenn sie über ein funktionierendes *relA*-Gen verfügen. Die Transkription von zwei Genen der Glykogenbiosynthese, *glgC* und *glgA*, die für ADP-Glucose-Pyrophosphorylase und Glykogensynthase codieren, wird durch ppGpp und auch durch cAMP stimuliert (ROMEO & PREISS, 1989). Es ist daher anzunehmen, daß die beobachtete Trockengewichtszunahme auf die Bildung von Reservestoffen wie Glykogen zurückzuführen ist.

Der interessanteste Aspekt bei den durchgeführten Fermentationen betrifft den Zusammenhang zwischen dem Nukleotidstoffwechsel und der Produktbildung. Dabei zeigte sich, daß bei *S. tendae* unter allen getesteten Bedingungen eine Akkumulierung von ppGpp mit dem



Beginn der Nikkomycinsynthese korrelierte bzw. diese stimulierte. Ob die Produktbildung durch Phosphat- oder Ammoniummangel ausgelöst wird, scheint nicht ausschlaggebend zu sein. Zwar wurde in der phosphatlimitierten Fermentation mit 470 mg/l eine wesentlich höhere Nikkomycinkonzentration erreicht als bei der stickstofflimitierten Fermentation, allerdings wurde diese Fermentation in einer früheren Phase abgebrochen, so daß hier noch keine Endkonzentration an Produkt erreicht zu sein schien. Bei der Fermentation III.2.3. (Ammoniumlimitation mit Ammoniumpuls) wurden dagegen bereits in der ersten Produktionsphase ca. 300 mg/l Nikkomycine produziert. Die zweite Produktionsphase, die durch die gleichzeitige Limitation von Ammonium und Phosphat gekennzeichnet war, lieferte sogar über 500 mg/l Nikkomycine. Diese Fermentation zeigte außerdem einen besonders interessanten Verlauf der intrazellulären Nukleotide.

Während die ATP-Konzentration im Verlauf der stationären Phase stetig anstieg und nach Wiederaufnahme des Wachstums wieder steil abfiel, führte das zugepulste Ammonium kurzzeitig zu einer sprunghaften Erhöhung des GTP-Spiegels auf über 900 pmol/mg TG. Stickstoff- und Nukleotidmetabolismus müssen also in irgendeiner Weise gekoppelt sein. Ammoniumionen werden durch die Wirkung von Glutamin-Synthetasen assimiliert und in Form von Glutamin und Glutamat dem Zellstoffwechsel zugeführt. Daraufhin sollte eine Aktivierung von intrazellulärer Nukleosiddiphosphat-Kinase (NdK) erfolgen. NdK überträgt 5'-Phosphatgruppen von Nukleosidtriphosphaten auf Nukleosid- bzw. Desoxy-nukleosiddiphosphate und stellt ein wichtiges Enzym für Wachstum, Signaltransduktion und Pathogenität von Bakterien dar (CHAKRABARTY, 1998). Bei *Pseudomonas aeruginosa* wurde gefunden, daß NdK im Komplex mit Ribosomen und dem Elongationsfaktor EF-Tu vorliegen kann und in dieser Form hauptsächlich GTP synthetisiert (MUKHOPADHYAY et al., 1997). Die Kettenverlängerung der Peptidsynthese kann sogar durch Antikörper gegen NdK gehemmt werden. Ein Effekt der durch Zusatz von GTP aufgehoben wird (MUKHOPADHYAY et al., 1997). In Verbindung mit dem GTP-Bindeprotein EF-Tu ist NdK somit an der Modulation des GTP-Spiegels beteiligt. Damit würden NdK und RelA gegenläufige Wirkungen zukommen. RelA fungiert am Ribosom als Sensor für unbeladene tRNA und reduziert durch Bildung von ppGpp über die Hemmung der IMP-Dehydrogenase die intrazelluläre GTP-Konzentration. Niedrige GTP-Konzentrationen werden als Voraussetzung für die morphologische Entwicklung und möglicherweise auch für die Induktion des Sekundärstoffwechsels bei Streptomyceten angesehen (OCHI, 1987a, 1987b). NdK dagegen könnte im Komplex mit EF-Tu durch die Anwesenheit von Aminoacyl-tRNA aktiviert werden und würde dann unter ATP-Verbrauch zur Erhöhung des GTP-Spiegels und zum Stop der

Antibiotikasyntese (s. Nikkomycinverlauf, Abb. 9a) oder allgemeiner formuliert zum Umschalten auf den Primärstoffwechsel führen. Das schnelle Auffüllen des GTP-Pools als Reaktion auf den Ammoniumpuls macht biologisch Sinn, da GTP bei der Initiation, der Elongation und auch bei der Termination der Translation als Energiequelle dient und somit für die Wiederaufnahme der Proteinbiosynthese unerlässlich ist. Entsprechendes gilt für die Pools von UTP und CTP. UTP spielt bei der Aktivierung von Zuckern zum Beispiel bei der Zellwandsynthese eine entscheidende Rolle. CTP ist an der Biosynthese von Phospholipiden beteiligt. Daneben sind Nukleosidtriphosphate und ihre Desoxyderivative natürlich als Substrate für die Synthese von DNA und RNA von entscheidender Bedeutung.

Neben GTP konnte dieser Effekt auch bei UTP beobachtet werden (Abb. 10). Die UTP-Konzentration erreicht mit 2200 pmol/mg TG zu einem Zeitpunkt den maximalen Wert, an dem die ATP Konzentration schon wieder zurückging. Die Größenordnungen von ATP-Abnahme (ca. 2000 pmol/mg TG) und der Zunahme von GTP (ca. 750 pmol/mg TG) und UTP (ca. 1100 pmol/mg TG) stimmten überein. CTP zeigte keinen vergleichbar deutlichen Konzentrationsverlauf.

In den Myzelextrakten aus dieser Fermentation konnte ein zusätzliches, als Gx bezeichnetes Nukleotid detektiert werden. Aufgrund des UV/Vis-Spektrums und des Laufverhaltens in dem verwendeten HPLC-System dürfte es sich dabei um Guanosin-5'-diphosphat-3'-monophosphat (ppGp) handeln. ppGp tritt im Verlauf der stringenten Kontrolle von *E. coli* und von Streptomyceten auf (PAO et al., 1980; STRAUCH et al., 1991). JONES et al. (1996) vermuten, daß die Bildung dieses Nukleotids in *S. clavuligerus* vom Stickstoffangebot der Zellen abhängt. In welchem Verhältnis ppGp und ppGpp zueinander stehen und welche Bedeutung ppGp im Rahmen der stringenten Kontrolle zukommt, sind bislang ungeklärte Fragen.

Besonders interessant war der Konzentrationsverlauf von Gx. Das Nukleotid war erst in der zweiten Wachstumsphase der Fermentation in den Myzelextrakten nachweisbar. Der anschließende Verbrauch des zugepulsten Ammoniums löste einen sprunghaften Anstieg auf über 150 pmol/mg TG aus, wobei zu diesem Zeitpunkt kein ppGpp vorhanden war. Das gegenläufige Konzentrationsverhalten von Gx und ppGpp ist möglicherweise von physiologischer Bedeutung. Für eine regulatorische Funktion von Gx spricht auch der starke Anstieg der Nikkomycinproduktion in Folge der Gx-Akkumulierung. Daß es sich bei Gx nicht lediglich um ein Abbauprodukt von ppGpp handeln kann, wird schon aus den unterschiedlichen Konzentrationsbereichen deutlich, in denen die beiden Nukleotide gefunden

wurden. Der maximale Gx-Gehalt lag unter der Annahme, daß es sich dabei um ppGp handelt, mit über 150 pmol/mg TG, mehr als 10-fach höher als die gemessenen ppGpp-Konzentrationen.

Dasselbe Nukleotid Gx trat auch bei *A. mediterranei* auf, allerdings nur während der ammoniumlimitierten Fermentation. Der Verbrauch von Ammonium löste hier eine starke Akkumulierung auf annähernd 300 pmol/mg TG aus. Auch die Produktion von ppGpp war mit 25 pmol/mg TG deutlich höher als bei *S. tendae*. Trotz der ausgeprägten Synthese dieser beiden Nukleotide fand in dieser Fermentation keine Produktbildung statt. Unter Stickstoffmangelbedingungen sind erhöhte ppGpp-Spiegel folglich nicht ausreichend, um die Balhimycinsynthese zu induzieren. Vielmehr scheint die Induktion des Sekundärstoffwechsels durch Phosphationen im Medium unterdrückt zu werden. In der phosphatlimitierten Fermentation wurden entsprechend etwa 400 mg/l Balhimycin gebildet, obwohl die ppGpp-Konzentration mit weniger als 10 pmol/mg TG deutlich unter den Werten aus der ammoniumlimitierten Kultur blieb. Die Synthese von Gx wurde unter Phosphatmangelbedingungen nicht beobachtet.

Für Katabolitrepression von Antibiotikasyntesen durch Glucose, Stickstoff und Phosphat lassen sich viele Beispiele finden, die zugrundeliegenden Mechanismen sind jedoch nur in Einzelfällen bekannt. Ammoniumionen reprimieren beispielsweise die Biosynthese verschiedener  $\beta$ -Lactam-Antibiotika (SHEN et al., 1984; ZHANG et al., 1987). Phosphatregulation konnte im Falle der Candicidinsynthese durch *S. griseus* auf eine DNA-Sequenz vor dem an der Candicidinsynthese beteiligten p-Aminobenzoatsynthetase-Gen (*pab*) zurückgeführt werden (REBOLLO et al., 1989). Diese Promotorsequenz wird von offenbar in Streptomyceten allgemein vorkommenden phosphatabhängigen Repressorproteinen erkannt, welche bei einer Phosphatkonzentration unter 1 mM die Expression des *pab*-Gens freigeben (LIRAS et al., 1990). Im gleichen Konzentrationsbereich wurde auch die Nikkomycinbildung bei phosphatlimitierter Fermentation induziert.

Eine weitere Möglichkeit einer Beeinflussung der Antibiotikaproduktion durch Phosphationen besteht beispielsweise in der Beteiligung von Proteinkinasen bzw. Phosphatasen an der Biosynthese und Regulation.

Auf welche enzymatische Aktivität die bei *S. tendae* und *A. mediterranei* gemessene ppGpp-Synthese zurückzuführen ist, kann aus den vorliegenden Daten nicht geschlossen werden.

Stickstoffmangelzustände können über den RelA-Weg eine ribosomenabhängige stringente Reaktion auslösen. Über den Zusammenhang von Phosphatmangel und stringenter Kontrolle liegen bislang nur wenig Befunde vor, die auf eine im Vergleich zu Stickstoffmangel abgeschwächte Produktion von ppGpp hindeuten. Entsprechende Verhältnisse lagen bei den in dieser Arbeit beschriebenen Fermentationen mit *A. mediterranei* vor. Bei *S. tendae* konnte ein derartiger Unterschied zwischen phosphat- und ammoniumlimitierter Fermentation dagegen nicht festgestellt werden. Die bei Energie- oder Phosphatmangelzuständen beobachtete ppGpp-Synthese wird bei *E. coli* auf eine Verminderung der 3'-Pyrophosphorylaseaktivität des Enzyms SpoT zurückgeführt (GENTRY et al., 1993). Selbstverständlich ist auch unter diesen Bedingungen eine Beteiligung von RelA denkbar, da ATP-Mangel die tRNA-Beladung durch Aminoacyl-tRNA-Synthetasen verhindert.

In *S. coelicolor* wurde ein *relA/spoT*-Homologes Gen gefunden (CHAKRABURTTY et al., 1996). Das entsprechende Enzym besitzt neben ppGpp-synthetisierenden auch ppGpp-abbauende Aktivitäten (MARTINEZ-COSTA et al., 1998). Damit vereint dieses Protein die Funktionen von RelA und SpoT aus *E. coli*.

Eine zusätzliche pppGpp-Synthetase wurde in *S. antibioticus* nachgewiesen (JONES, 1994a). Das Enzym unterscheidet sich von RelA in einigen wesentlichen Reaktionen. So erfolgt keine Aktivierung durch Ribosomen. Die Übertragung des Pyrophosphatrests von ATP erfolgt ausschließlich auf GTP, wogegen GDP nicht als Substrat akzeptiert wird (JONES, 1994b). Gleichzeitig stellt diese pppGpp-Synthetase eine Polynukleotidphosphorylase dar, die möglicherweise als Exoribonuklease fungiert und dadurch am RNA-Abbau in Rahmen der stringenten Kontrolle beteiligt sein könnte (JONES & BIBB, 1996).

Interessanterweise konnte bei *S. tendae* die Produktion von ppGpp auch dann beobachtet werden, wenn die Hauptsubstrate Glucose, Ammonium und Phosphat während der gesamten Fermentationsdauer so zudosiert wurden, daß keine konzentrationsbedingten Wachstums-limitationen auftraten (Abb. 12). BUSCHULTE (1991) konnte zeigen, daß die von *S. tendae* in Submerskultur gebildeten kugelförmigen Pellets mit 1 bis 2 mm Durchmesser nur in einer äußeren 100-200 µm dicken Schicht ausreichend mit Sauerstoff versorgt werden. Die schlechte Versorgung der Hyphen im Inneren der Pellets führt schließlich zur Lyse der Zellen, so daß sich eine hohle Kernzone ausbildet. Entsprechende Konzentrationsgradienten dürften auch bei anderen Nährlösungsbestandteilen auftreten.

Diese morphologische Beobachtung legt den Schluß nahe, daß es sich bei derartigen Pellets auch um physiologisch uneinheitliche Zellpopulationen handelt, d. h. die gemessene ppGpp-Synthese würde durch lokale Mangelzustände von Zellen in den Pelletzentren hervorgerufen. Trotz der Synthese von ppGpp wurde in dieser Fermentation praktisch kein Nikkomycin gebildet, so daß auch hier von einem hemmenden Einfluß der relativ hohen Ammonium- bzw. Phosphatkonzentrationen auszugehen ist.

Daß die Antibiotikaproduktion bei *S. tendae* daneben auch von globalen Regulationssystemen kontrolliert wird, ist aufgrund des phänotypischen Erscheinungsbildes der in dieser Arbeit beschriebenen *bld*-Mutante zu vermuten. Neben der Fähigkeit Luftmyzel zu bilden war bei diesem Stamm auch die Nikkomycinsynthese blockiert. Die fehlende Produktion von Nikkomycinen lies sich nicht auf die Abwesenheit von ppGpp zurückführen, da dieses Nukleotid in phosphatlimitierter Fermentation nachgewiesen wurde, wobei allerdings nur eine sehr geringe Konzentration von 4,7 pmol/mg TG auftrat.

Das eingesetzte Mutagenisierungsverfahren läßt keine Identifizierung der für den Phänotyp verantwortlichen mutierten Genorte zu. Das Mutagen Acriflavin entfaltet seine Wirkung durch Interkalierung in die Basen der DNA-Doppelhelix und dadurch hervorgerufene Leserasterverschiebungen. Daß die Mutante mehrere unabhängige Mutationen trägt ist eher unwahrscheinlich, da der Stamm in diesem Fall stärker z. B. im Wachstum geschädigt sein müßte.

*S. tendae bld-1* gehört zu einer der *bld*-Klassen, deren morphologische Entwicklung Abhängigkeit von der Natur der verwendeten C-Quelle zeigt. Während auf Glucose-Minimalmedium keine Luftmyzelbildung und Sporulation möglich war, sporulierte der Stamm bei Wachstum auf dem schlechter verwertbaren Zucker Mannit normal. Mit Ausnahme von *bldB* wurde diese Konditionalität bei allen Klassen von *bld*-Mutanten gefunden (CHAMPNESS, 1988). *BldA*-Mutanten bleiben trotz der Wiederherstellung der morphologischen Differenzierung in der Antibiotikaproduktion geschädigt, wogegen bei *bldH*-Mutanten auch der Block der Antibiotikasyntese durch Mannit als C-Quelle aufgehoben wird (CHAMPNESS, 1988). In dieser Hinsicht verhielt sich *S. tendae bld-1* wie eine *bldA*-Mutante. Weder in Submerskultur noch bei Wachstum auf Agarplatten mit Mannit kam es zur Bildung von Nikkomycinen.

Der Einfluß schlecht verwertbarer C-Quellen auf die morphologische Entwicklung wurde dahingehend interpretiert, daß zwei unterschiedliche Stoffwechselwege zur Initiation der Luftmyzelbildung führen, von denen einer durch Glucose reprimiert wird. Die identifizierten

*bld*-Gene sind demnach an dem Weg beteiligt, der aktiv ist, wenn der alternative Weg durch die Anwesenheit von Glucose verschlossen ist. Nach der Theorie von POPE et al., (1996) handelt es sich bei den morphologischen Auswirkungen der *bld*-Mutationen dagegen um sekundäre Effekte. Die eigentlichen Mutationen sind danach in Genen lokalisiert die an der Regulation der zentralen Kohlenstoffabbauwege des Primärstoffwechsels beteiligt sind, aber keine direkte Funktion im Entwicklungszyklus haben.

Die interessanteste Eigenschaft von *S. tendae bld-1* war die Produktion von zwei Carbazol-derivaten die als Carquinostatin A und CS-79B identifiziert wurden. Beide Metabolite waren bislang nicht als Inhaltsstoffe von *S. tendae* bekannt.

Als charakteristische Strukturmerkmale sind bei diesen Verbindungen neben dem Carbazolgrundgerüst eine *ortho*-Chinon-Gruppe sowie eine Isoprenylseitenkette vorhanden. Keines dieser Strukturmerkmale tritt bei irgendeinem anderen der aus *S. tendae* bekannten Sekundärmetabolite auf. Durch die Acriflavin-Mutagenisierung wurde also nicht lediglich eine vorhandene Biosynthese abgewandelt, sondern es kam zur Induktion eines völlig neuen Synthesewegs in diesem Organismus. Eine derartige Induktion kann durch die Aktivierung von sogenannten „stummen“ Genen hervorgerufen werden. So beschreiben OGURA et al., (1986) die Induktion der Curromycinproduktion in *S. hygroscopicus* durch Ethidiumbromid.

Im Gegensatz zu CS-79B und Carquinostatin A wurde Curromycin unter bestimmten Kultivierungsbedingungen auch vom Wildtypstamm produziert.

Formal läßt sich die Biosynthese von CS-79B bzw. Carquinostatin A aus dem Zusammenspiel unterschiedlicher Stoffwechselblöcke ableiten. Die *ortho*-Chinon-Struktur dürfte über den Polyketid-Weg gebildet werden und die Indolgruppe stammt mit großer Wahrscheinlichkeit aus der Biogenese von L-Tryptophan. Die Bildung der Isoprenyl-Seitenkette kann nach dem bei Mikroorganismen verbreitete Grundprinzip aus Acetyl-CoA über Hydroxymethylglutaryl-CoA und Mevalonsäure erfolgen.

Sollten die beiden Komponenten im Wildtyp eine biologische Funktion besitzen, wurde *S. tendae* bislang nicht unter Bedingungen kultiviert, die die Synthese dieser Metabolite induzieren oder die Produktion findet normalerweise nur in derart geringen Mengen statt, daß sie nicht detektiert wurde. Mit der verwendeten HPLC-Analytik konnte im Wildtyp unter keinen Bedingungen eine Carbazolsynthese gefunden werden. Dadurch wird deutlich, daß die systematische Untersuchung von morphologischen Mutanten auch bei der Suche nach neuen Wirkstoffen lohnend sein kann.

Interessant ist in diesem Zusammenhang, daß zwei weitere Sekundärstoffe mit einem Carbazolgrundgerüst, Carbazomycinal und 6-Methoxycarbazomycinal in Konzentrationen von 0,5-1,0 µg/ml als Autoregulatoren spezifisch die Luftmyzelbildung von *Streptovercillium* sp. inhibieren (KONDO et al., 1986). Ähnlich könnten auch bei *S. tendae bld-1* die fehlende Luftmyzelbildung und die Synthese von Carbazolen in einem direkten Zusammenhang stehen. Allerdings war beim Wildtyp keine Hemmung der Luftmyzelbildung als Reaktion auf CS-79B oder Carquinostatin A zu beobachten.

Weder Carbazomycinal noch 6-Methoxycarbazomycinal zeigen antibakterielle oder antifungische Aktivitäten (KONDO et al., 1986). Dagegen wurden in der vorliegenden Arbeit für CS-79B und Carquinostatin A neben den bereits beschriebenen anti-oxidativen Eigenschaften (SETO & HAYAKAWA, 1994; SHIN-YA et al., 1993), zusätzlich antibiotische Aktivitäten nachgewiesen. Die Wirkung war auf *Arthrobacter* Stämme, *Agrobacterium tumefaciens* und *Brevibacterium sterolicum* beschränkt. Die Ursache für diese Selektivität ist unklar.

Bei phosphatlimitierter Fermentation trat die Carbazolsynthese in zwei deutlich getrennten Produktionsphasen auf (Abb. 26), was möglicherweise mit den morphologischen Defekten dieses Stammes zusammenhängt. Der inkomplette Entwicklungszyklus könnte sich in Submerskultur in der Unfähigkeit zur Anpassung des Stoffwechsels an die stationäre Phase widerspiegeln. Die verminderte Überlebensfähigkeit führt demnach zu Veränderungen von Membran- und/oder Zelleigenschaften und zur Freisetzung von intrazellulärem Produkt während der stationären Phase. Die Carbazolkonzentration in den Myzelien wurde nicht erfasst. Die Höchstkonzentration im Kulturüberstand blieb unter 30 mg/l.

Neben der Carbazolsynthese war bei *S. tendae bld-1* auch eine verstärkte Produktion von Juglomycinen zu verzeichnen. In Glucose-Minimalmedium und Mannit-Minimalmedium wurden in Schüttelkolben jeweils etwa 120 mg/l erreicht. Beim Wildtyp betrug die Juglomycinkonzentration dagegen lediglich ca. 50 mg/l (Abb. 21). Im Fermenter blieb die Produktion sogar unter 10 mg/l (Abb. 7, Abb. 8), wogegen die Nikkomycinproduktion im Schüttelkolben und im Fermenter vergleichbar war. Offensichtlich lagen in Schüttelkolben günstigere Verhältnisse für die Produktion von Carbazolen und Juglomycinen vor als im Fermenter. Der Grund hierfür könnte in der besseren Sauerstoffversorgung der Schüttelkulturen liegen.

Beide Sekundärstoffe zeigten einen ähnlichen Verlauf und erwiesen sich wohl aufgrund ihrer reaktiven *ortho*-Chinon bzw. *para*-Chinon-Gruppen als instabil im Kulturmedium.

Juglomycine verhalten sich generell eher wie Produkte des Primärstoffwechsels. So wird in kontinuierlicher Kultur die Produktion durch steigende Wachstumsraten stimuliert (HEGETRESKATIS et al., 1992).

Daß hohe Juglomycinkonzentrationen wachstumshemmend auf *S. tendae* wirken, wurde durch die unter III.6. beschriebenen Untersuchungen gezeigt. Die ermittelte MHK von 8 µg/ml in synthetischem Medium wurde in den untersuchten Fermentationen mit jeweils 7 µg/ml in etwa erreicht und in Schüttelkolbenkulturen etwa siebenfach überschritten. Damit ist die Bildung von Juglomycinen auch für die Nikkomycinproduktion von unmittelbarer Bedeutung.

Da auch alle anderen getesteten Organismen, darunter gramnegative Bakterien, grampositive Bakterien und eukaryotische Mikroorganismen empfindlich gegen Juglomycin reagierten, ist anzunehmen, daß der antibiotische Wirkort in sehr zentralen Stoffwechselwegen zu suchen ist.

Chinone stellen eine sehr reaktive chemische Gruppe dar und können mit biologischen Systemen in vielfältiger Weise wechselwirken, so daß zur Erklärung der antibiotischen Wirkung mehrere Mechanismen in Betracht kommen. Das Redoxsystem Chinon/Hydrochinon kann beispielsweise in Elektronentransportprozesse etwa bei der oxidativen Phosphorylierung eingreifen, Enzymgruppen oxidieren oder zur Bildung von toxischem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> führen.

Wie durch die Antagonisierung mit L-Cys in dieser Arbeit gezeigt wurde, ist die spezifische Reaktion von Juglomycin mit SH-Gruppen für die biologische Wirkung zweifellos von entscheidender Bedeutung. Sehr wahrscheinlich handelt es sich dabei um eine 1,4-Addition der Thiolgruppe an den Naphtochinonring des Juglomycins nach dem in Abb. 35 gezeigten Mechanismus.



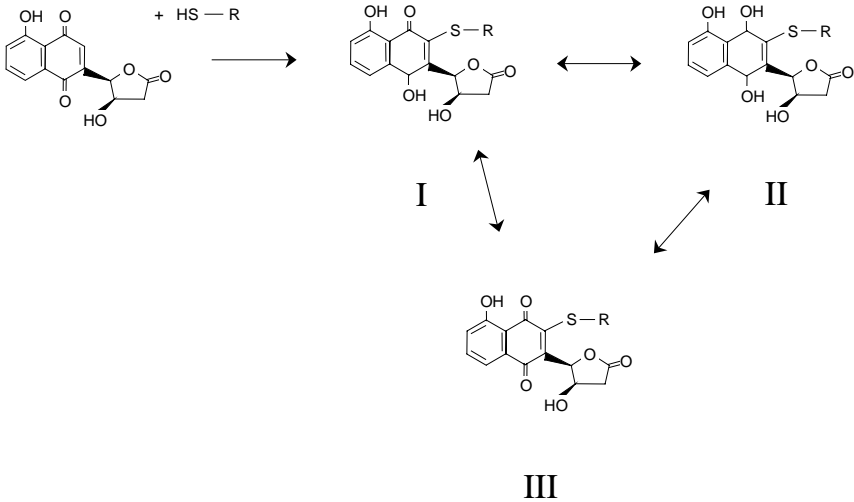


Abb. 35. 1,4-Addition von Thiol an Juglomycin

Die 1,4-Addition einer Thiolverbindung an Chinon liefert die tautomeren Gleichgewichtsformen I, II und III, wobei II durch aromatische Resonanzenergie stabilisiert ist. Dieses Thiohydrochinon wird in der Regel entweder durch überschüssiges Chinon oder durch Sauerstoff zu III oxidiert, so daß das Thiochinon in den meisten biologisch interessanten Fällen das Hauptprodukt zu sein scheint. Ob dieser Mechanismus an der antibiotischen Wirkung gegen *S. tendae* beteiligt ist, hängt davon ab, in welcher Form die Juglomycine innerhalb der Zelle vorliegen. Am reduzierten Hydrochinon kann die beschriebene Addition nicht ablaufen. In einigen Fällen scheinen Chinone aus dem Sekundärstoffwechsel von den Produzentenstämmen selbst als endogene Elektronenakzeptoren genutzt zu werden. So ist ein Teil des Naphthochinons Actinorhodin im Myzel als farbloses Hydrochinon vorhanden das erst durch Luftoxidation zum rot-violetten Chinon gefärbt wird (GRÄFE, 1992).

Eine weitere Reaktionsmöglichkeit stellt die Oxidation von Sulfhydrylgruppen zum entsprechenden Disulfid durch Chinone dar. Da die Redoxpotentiale von Enzym-SH-Gruppen in der Regel nicht bekannt sind, läßt sich nur schwer abschätzen, in welchem Umfang diese Oxidation stattfindet.

Durch die beschriebene Additionsreaktion kommen als zelluläre Wirkorte der Juglomycine vor allem Cys-Reste von Proteinen wie GAPDH in Betracht. Thioester sind außerdem als Zwischenprodukte an den Multienzymkomplex-Reaktionen der Fettsäuresynthese, der Polyketidsynthese und der nicht-ribosomalen Peptidsynthese beteiligt, so daß diese Prozesse durch Juglomycin gehemmt werden sollten. Lediglich die Blockierung der Fettsäuresynthese hätte allerdings einen bakteriostatischen Effekt zur Folge.

Die drei Enzyme GAPDH, G-6-PDH und LDH, die *in vitro* auf Hemmbarkeit durch Juglomycin getestet wurden, erwiesen sich allesamt als sensitiv wobei unterschiedliche Inhibitions-kinetiken auftraten. Die Hemmung von GAPDH dürfte durch die Reaktion mit dem Cys-Rest im katalytischen Zentrum des Enzyms zustande kommen (Abb. 31). Die leichte Abnahme der Hemmwirkung im Verlauf der Inkubation ist möglicherweise Folge eines Juglomycinzerfalls. Wie bereits unter III.6.5. erwähnt, sind Chinone besonders in Gegenwart von Sauerstoff und Licht instabil.

G-6-PDH wurde dagegen von Juglomycin über 20 min komplett gehemmt, während bei 1,4-NQ eine lineare NADPH-Zunahme zu verzeichnen war. Die unterschiedlichen Kinetiken könnten auf verschiedene Wirkmechanismen der beiden Hemmstoffe auf dieses Enzym hinweisen.

LDH zeigte bei für Juglomycin und 1,4-NQ identische Hemmverläufe. Die Reaktion lief zwar verlangsamt ab, doch wurde nach 20 min ein vollständiger Substratumsatz erreicht.

Zwar sind bei G-6-PDH und LDH anders als bei GAPDH keine Thioester am Reaktionsmechanismus beteiligt, doch könnte die Addition von Chinonen an Cys-Reste außerhalb des aktiven Zentrums die dreidimensionale Struktur der Proteine derart verändern, daß die enzymatische Aktivität beeinträchtigt wird. So wurden beispielsweise bei LDH aus dem Herzmuskel vierzehn Cys-Reste nachgewiesen, die alle potentiell mit Juglomycin bzw. 1,4-NQ reagieren können (WEBB, 1966).

Da alle durchgeführten Enzymtests auf der Bildung bzw. dem Verbrauch von NAD(P)H beruhen, ist außerdem zu berücksichtigen, daß die beobachteten Inhibitionskinetiken zum Teil auch durch Reduktion oder Oxidation dieser Nicotinamidnukleotide durch Chinon bzw. Hydrochinon und nicht durch die direkte Aktion des Hemmstoffs mit dem Enzym zustande kommen könnten.

Neben Protein-SH-Gruppen kommen als weitere Reaktionspartner niedermolekulare intrazelluläre Thiole wie CoenzymA, Glutathion und Liponsäure in Betracht, die alle an

essentiellen Stoffwechselwegen beteiligt sind und damit potentielle Wirkorte der Juglomycine darstellen.

Die durchgeführten Untersuchungen ergaben, daß die Produktion von Nikkomycinen in Fermenterkulturen von verschiedenen Faktoren beeinflusst wird. Die Juglomycinsynthese konnte aufgrund der beschriebenen Autotoxizität als ein derartiger Faktor identifiziert werden. Sollte die Juglomycinwirkung gegen *S. tendae* auf einen einzelnen zentralen Wirkort zurückzuführen sein, so müßte sich dieser durch die Bearbeitung von Wirkort-resistenten Mutanten genauer charakterisieren lassen.

Desweiteren weist das Auftreten von ppGpp-Akkumulierungen vor Beginn der Nikkomycinproduktion auf eine Funktion dieses Nucleotids als Signalmolekül hin. Aufgrund der geringen ppGpp-Synthese in *S. tendae* bleiben die Effekte jedoch undeutlich und lassen sich nur schwer interpretieren. Die Analyse von isogenen *rel*-Mutanten mit einem ppGpp<sup>0</sup>-Phänotyp wäre geeignet, um die Bedeutung der stringenten Kontrolle für die übergeordnete Regulation von Morphogenese und Sekundärmetabolismus genauer zu erfassen.

Im Vergleich dazu wurden bei den untersuchten Fermentationen mit *A. mediterranei* wesentlich klarere Ergebnisse erhalten. Unter Stickstoffmangelbedingungen reichen erhöhte ppGpp-Spiegel nicht aus, um die Balhimycinproduktion zu induzieren. Denkbar ist aufgrund der untersuchten Fermentationen allerdings, daß ppGpp bei beiden Organismen unter Phosphatmangelbedingungen für die korrekte Induktion der Antibiotikasythese benötigt wird. Analoge Verhältnisse wurden z. B. für das *pho*-Regulon bei *E. coli* beschrieben (SPIRA et al., 1995).

Neben (p)ppGpp wäre auch der Verlauf von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) während der Fermentation von Interesse. cAMP stellt ein verbreitetes Signalmolekül bei prokaryotischen und eukaryotischen Mikroorganismen dar, konnte aber aufgrund seiner geringen Retention mit dem verwendeten HPLC-System nicht erfasst werden (Abb. 6).

In *E. coli* ist cAMP an der Katabolitrepression durch Glucose beteiligt (POSTMA et al., 1993). Zellbewegung und Zellaggregation bei dem Schleimpilz *Dictyostelium discoideum* werden ebenfalls durch cAMP gesteuert (DEVREOTES, 1989).

In Streptomyceten verläuft die durch Glucose vermittelte Katabolitrepression jedoch nicht unter Beteiligung von cAMP. Stattdessen scheint derselbe regulatorische Effekt bei grampositiven Bakterien durch eine spezielle Ser-Kinase, welche nach Aktivierung durch

Fructose-1,6-diphosphat das Phosphotransferasesystem-Protein HPr phosphoryliert, zustande zu kommen (HUECK & HILLEN, 1995).

Dennoch weisen verschiedene Untersuchungen auf eine regulatorische Funktion von cAMP im Entwicklungszyklus von Streptomyceten hin (TATA & MENAWAT, 1994; SÜSSTRUNK et al., 1998; KANG et al., 1999).

Fehlende Nikkomycinsynthese und das Auftreten von Carbazolderivaten als neue Stoffwechselprodukte in der entwicklungsdefekten Mutante *S. tendae bld-1* sind interessante Hinweise auf globale Regulationssysteme, die die morphologische Entwicklung und den Sekundärstoffwechsel gemeinsam kontrollieren, so daß eine weitere Bearbeitung dieser Mutante lohnend erscheint.

## V. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Identifizierung und Charakterisierung von physiologischen Faktoren, die für die Antibiotikaproduktion in Fermentationskulturen mit den Actinomycetenstämmen *Streptomyces tendae* und *Amycolatopsis mediterranei* von Bedeutung sind. Um die Beteiligung von intrazellulären Nucleotiden an der Induktion des Sekundärmetabolismus zu untersuchen, wurden in Fermentationen mit chemisch definierten Medien unterschiedliche Nährstofflimitationen eingestellt und deren Auswirkungen auf die Nucleotid- und die Antibiotikasythese untersucht.

Bei *S. tendae* war unter allen getesteten Bedingungen die Bildung des Signalmoleküls ppGpp zu verzeichnen. Die Höchstkonzentrationen dieses Nucleotids fielen mit dem Beginn der Synthese der Nucleosidpeptid-Antibiotika Nikkomycine zusammen. Außerdem zeigten weitere Guanosinnucleotide kurzfristige Anstiege während des Verlaufs einer Fed-Batch-Fermentation, bei der die Substratlimitation durch pulsformige Zugabe von Ammonium aufgehoben wurde. GTP akkumulierte unmittelbar mit der Zufuhr von Ammonium zu der limitierten Kultur. Zusätzlich wurde nach dem Auftreten eines als Gx bezeichneten Nucleotids, eine gesteigerte Nikkomycinsynthese beobachtet. Bei Gx handelt es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um ppGp.

Für die Untersuchung von Zusammenhängen zwischen morphologischer Differenzierung und Sekundärstoffwechsel konnte die entwicklungsdefekte Mutante *S. tendae bld-1* gewonnen werden. Die Luftmyzelbildung erwies sich bei diesem Stamm als konditional im Hinblick auf die verwendete Kohlenstoffquelle im Nährmedium. Ein Vergleich des Produktspektrums von Wildtyp und Mutante ergab, daß *S. tendae bld-1* die zu den Naphtochinon-Antibiotika gehörenden Juglomycine normal synthetisieren konnte, wogegen die Fähigkeit zur Bildung von Nikkomycinen verloren gegangen war. Stattdessen produzierte die Mutante zwei Carbazolderivate, die isoliert und als CS-79B und Carquinostatin A identifiziert werden konnten. Beide Metabolite waren bislang nicht als Inhaltsstoffe aus *S. tendae* bekannt. Erstmalig wurden bei diesen Verbindungen antibiotische Aktivitäten nachgewiesen und Wirkungsspektren aufgenommen.

Juglomycine können in hinreichender Konzentration in einem als Autotoxifikation bezeichneten Prozess, das Wachstum des Produzenten *S. tendae* hemmen. Mit aus Kulturfiltraten isoliertem Juglomycin wurde für *S. tendae* eine minimale Hemmkonzentration von 8-13 µg/ml ermittelt. Demnach kann die autotoxische Wirkung von Juglomycin auch die Nikkomycinproduktion in Fermentationsprozessen beeinflussen. Bei Untersuchungen zur Wirkungsweise wurde gezeigt, daß die antibiotische Wirkung der Juglomycine auf die Interaktion mit Thiolverbindungen, wie z. B. Enzym-SH-Gruppen zurückgeführt werden kann.

*A. mediterranei* reagierte auf Phosphatmangel mit der Akkumulation von ppGpp und der Produktion des Glykopeptids Balhimycin. Bei ammoniumlimiterter Fermentation war dagegen trotz starker Synthese von ppGpp und des Nukleotids Gx keine Produktbildung nachweisbar. Unter diesen Bedingungen ist die Bildung von Signalnukleotiden damit nicht ausreichend, um die Balhimycinsynthese zu initiieren.

## VI. Literatur

- AHNN, J., P.E. MARCH, H.E. TAKIFF & M. INOUE: A GTP-binding protein of *Escherichia coli* has homology to yeast RAS proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 8849-8853 (1986).
- ANDRES, N., H. WOLF, H. ZÄHNER, E. RÖSSNER, A. ZEECK, W.A. KÖNIG & V. SINNWELL: Hormaomycin, ein neues Peptid-lacton mit morphogener Aktivität auf Streptomyceten. Helv. Chim. Acta 72, 426-437 (1989).
- BASCARAN, V., L. SANCHEZ, C. HARDISSON & A.F. BRANA (1991): Stringent response and initiation of secondary metabolism in *Streptomyces clavuligerus*. J. Gen. Microbiol. 137, 1625-1634 (1991).
- BECKER, B., M.P. LECHEVALIER, R.E. GORDON & H.A. LECHEVALIER: Rapid differentiation between *Nocardia* and *Streptomyces* by paper chromatography of whole-cell hydrolysates. Appl. Microbiol. 12, 421-423 (1964).
- BEPPU, T.: Secondary metabolites as chemical signals for cellular differentiation. Gene 115, 159-165 (1992).
- BIBB, M.: The regulation of antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). Microbiology 142, 1335-1344 (1996).
- BORMANN, C., V. MÖHRLE & C. BRUNTNER: Cloning and heterologous expression of the entire set of structural genes for nikkomycin synthesis from *Streptomyces tendae* Tü901 in *Streptomyces lividans*. J. Bacteriol. 178, 1216-1218 (1996).
- BRANA, A.F., C. MENDEZ, L.A. DIAZ, M.B. MANZANAL & C. HARDISSON: Glycogen and trehalose accumulation during colony development in *Streptomyces antibioticus*. J. Gen. Microbiol. 132, 1319-1326 (1986).

- BUSCHULTE, T.K.: Mathematische Modellierung und Simulation von Zellwachstum, Stofftransport und Stoffwechsel in Pellets aus Streptomyceten. Dissertation, Universität Stuttgart, (1991).
- CASHEL, M., D.R. GENTRY, V.J. HERNANDEZ & D. VINELLA: The stringent response. In: F.C. NEIDHARDT et al. (eds.), *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology, 2. Edition, pp. 1458-1496. American Society for Microbiology, Washington, DC, 1996.
- CHAKRABARTY, A.M.: Nucleoside diphosphate kinase: role in bacterial growth, virulence, cell signalling and polysaccharide synthesis. *Mol. Microbiol.* 28, 875-882 (1998).
- CHAKRABURTTY, R. & M. BIBB: The ppGpp synthetase gene (*relA*) of *Streptomyces coelicolor* A3(2) plays a conditional role in antibiotic production and morphological differentiation. *J. Bacteriol.* 179, 5854-5861 (1997).
- CHAKRABURTTY, R., J. WHITE, E. TAKANO & M. BIBB: Cloning, characterization and disruption of a (p)ppGpp synthetase gene (*relA*) of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol. Microbiol.* 19, 357-368 (1996).
- CHAMPNESS, W.C.: New loci required for *Streptomyces coelicolor* morphological and physiological development. *J. Bacteriol.* 170, 1168-1174 (1988).
- CHATER, K.F.: Genetics of differentiation in *Streptomyces*. *Annu. Rev. Microbiol.* 47, 685-713 (1993).
- CHATER, K.F. & M.J. BIBB: Regulation of bacterial antibiotic production. In H. KLEINKAUF & H. VON DOHREN (eds.), *Products of Secondary Metabolism*, pp. 57-105. Biotechnology, vol. 6, VCH Weinheim, 1997.
- DEUTSCH, J.: Glucose 6-phosphate dehydrogenase. In: BERGMAYER, H.U. (ed.), *Methods of enzymatic analysis*, pp. 190-197. VCH Weinheim, 1983.



- DEVREOTES, P.N.: *Dictyostelium discoideum*: a model system for cell-cell interactions in development. *Science* 245, 1054-1058 (1989).
- ERRINGTON, J.: *Bacillus subtilis* sporulation: regulation of gene expression and control of morphogenesis. *Microbiol. Rev.* 57, 1-33 (1993).
- FERNANDEZ-MORENO, M.A., J.L. CABALLERO, D.A. HOPWOOD & F. MALPARTIDA: The *act* cluster contains regulatory and antibiotic export genes, direct targets for translational control by the *bldA* tRNA gene of *Streptomyces*. *Cell* 66, 769-780 (1991).
- FIEDLER, H.P.: Quantitation of nikkomycins in biological fluids by ion-pair reversed phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 204, 313-318 (1981).
- FIEDLER, H.P.: Screening for secondary metabolites by HPLC and UV-visible absorbance spectral libraries. *Natural Product Lett.* 2, 119-128 (1993).
- FIEDLER, H.P.: The Nikkomycin Story. In: W. KUHN & H.P. FIEDLER (eds.), *Sekundärmetabolismus bei Mikroorganismen: Beiträge zur Forschung*, pp. 79-89. Attempto-Verlag, Tübingen, 1995.
- GEIGER, O.: N-Acyl-Homoserinlactone - Autoinduktor-Signalmoleküle bei Gram-negativen Bakterien. *BioEngineering* 5, 40-46 (1994).
- GENTRY, D.R., V.J. HERNANDEZ, L.H. NGUYEN, D.B. JENSEN & M. CASHEL: Synthesis of the stationary-phase sigma factor  $\sigma^S$  is positively regulated by ppGpp. *J. Bacteriol.* 175, 7982-7989 (1993).
- GRÄFE, U.: *Biochemie der Antibiotika*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, New York, 1992.
- HECKER, M., A. SCHROETER & F. MACH: Role of *relA* mutation in the survival of amino acid-starved *Escherichia coli*. *Arch. Microbiol.* 143, 400-402 (1986).

- HEGE-TRESKATIS, D., R. KING, H. WOLF & E.D. GILLES: Nutritional control of nikkomycin and juglomycin production by *Streptomyces tendae* in continuous culture. Appl. Microbiol. Biotechnol. 36, 440-445 (1992).
- HEGE-TRESKATIS, D.: Untersuchungen zur Regulation der Nikkomycin- und der Juglomycinproduktion des Produzentenstammes *Streptomyces tendae* Tü 901/8c. Dissertation, Universität Tübingen, Verlag Shaker Aachen (1993).
- HORINOUCI, S. & T. BEPPU: A-factor as a microbial hormone that controls cellular differentiation and secondary metabolism in *Streptomyces griseus*. Mol. Microbiol. 12, 859-864 (1994).
- HOYT, S. & G.H. JONES: *relA* is required for actinomycin production in *Streptomyces antibioticus*. J. Bacteriol. 181, 3824-3829 (1999).
- HUECK, C.J. & W. HILLEN: Catabolite repression in *Bacillus subtilis*: a global regulatory mechanism for the Gram-positive bacteria? Mol. Microbiol. 15, 395-401 (1995).
- HUISMANN, G.W. & R. KOLTER: Sensing starvation: A homoserine lactone-dependent signaling pathway in *Escherichia coli*. Science 265, 537-539 (1994).
- ITOH, M., A. PENYIGE, S. OKAMOTO & K. OCHI: Proteins that interact with GTP in *Streptomyces griseus* and its possible implication in morphogenesis. FEMS Microbiol. Lett. 35, 311-316 (1996).
- JENSEN, K.F. & S. PEDERSEN: Metabolic growth rate control in *Escherichia coli* may be a consequence of subsaturation of the macromolecular biosynthetic apparatus with substrates and catalytic components. Microbiol. Rev. 54, 89-100 (1990).
- JONES, C., A. THOMPSON & R. ENGLAND: Guanosine 5'-diphosphate 3'-diphosphate (ppGpp), guanosine 5'-diphosphate 3'-monophosphate (ppGp) and antibiotic production in *Streptomyces clavuligerus*. Microbiology 142, 1789-1795 (1996).

- JONES, G.H.: Purification and properties of ATP:GTP 3'-pyrophosphotransferase (guanosine pentaphosphate synthetase) from *Streptomyces antibioticus*. J. Bacteriol. 176, 1475-1481 (1994a).
- JONES, G.H.: Activation of ATP:GTP 3'-pyrophosphotransferase (guanosine pentaphosphate synthetase) in *Streptomyces antibioticus*. J. Bacteriol. 176, 1482-1487 (1994b).
- JONES, G.H. & M.J. BIBB: Guanosine pentaphosphat synthetase from *Streptomyces antibioticus* is also a polynucleotide phosphorylase. J. Bacteriol. 178, 4281-4288 (1996).
- KANG, D.K., X.M. LI, K. OCHI & S. HORINOCHI: Possible involvement of cAMP in aerial mycelium formation and secondary metabolism in *Streptomyces griseus*. Microbiology 145, 1161-1172 (1999).
- KAWAGUCHI, T., T. ASAHI, T. SATOH, T. UOZUMI & T. BEPPU: B-Factor, an essential regulatory substance inducing the production of rifamycin in a *Nocardia* sp. J. Antibiot. 37, 1587-1595 (1984).
- KELLY, K.S., K. OCHI & G.H. JONES: Pleiotropic effects of a *relC* mutation in *Streptomyces antibioticus*. J. Bacteriol. 173, 2297-2300 (1991).
- KOK, J., K.A. TRACH & J.A. HOCH: Effects on *Bacillus subtilis* of a conditional lethal mutation in the essential GTP-binding protein Obg. J. Bacteriol. 176, 7155-7160 (1994).
- KONDO, S., M. KATAYAMA & S. MARUMO: Carbazomycinal and 6-methoxycarbazomycinal as aerial mycelium formation-inhibitory substances of *Streptoverticillium* species. J. Antibiot. 39, 727-730 (1986).
- LAATSCH, H.: Antibase 2.0, a natural products database for rapid structure determination. Chemical Concepts, Weinheim, (1997).

- LAGOSKY, P.A. & F.N. CHANG: The extraction of guanosine 5'-diphosphate, 3'-diphosphate (ppGpp) from *Escherichia coli* using low pH reagents: a re-evaluation. Biochem. Biophys. Res. Commun. 84, 1016-1024 (1978).
- LANGHÄRIG, J.: Aufstellung eines Produktionsspektrums von *Streptomyces tendae* Ettlinger-Tü 901/8c. Diplomarbeit, Universität Tübingen, 1978.
- LAWLOR, E.J., H.A. BAYLIS & K.F. CHATER: Pleiotropic morphological and antibiotic deficiencies result from mutations in a gene encoding a tRNA-like product in *Streptomyces coelicolor* A3(2). Genes Dev. 1, 1305-1310 (1987).
- LESKIW, B.K., M.J. BIBB & K.F. CHATER: The use of a rare codon specifically during development. Mol. Microbiol. 5, 2861-2867 (1991).
- LESKIW, B.K., R. MAH, E.J. LAWLOR & K.F. CHATER: Accumulation of *bldA*-specified tRNA is temporally regulated in *Streptomyces coelicolor* A3(2). J. Bacteriol. 175, 1995-2005 (1993).
- LIRAS, P., J.A. ASTURIAS & J.F. MARTIN: Phosphate control sequences involved in transcriptional regulation of antibiotic biosynthesis. Trends Biotechnol. 8, 184-189 (1990).
- LITTLE, R. & H. BREMER: Quantitation of guanosine 5',3'-bisdiphosphate in extracts from bacterial cells by ion-pair reverse-phase high-performance liquid chromatography. Anal. Biochem. 126, 381-388 (1982).
- MARTINEZ-COSTA, O.H., M.A. FERNANDEZ-MORENO & F. MALPARTIDA: The *relA/spoT*-homologous gene in *Streptomyces coelicolor* encodes both ribosome-dependent (p)ppGpp-synthesizing and -degrading activities. J. Bacteriol. 180, 4123-4132 (1998).
- MEJBAUM, W.: Über die Bestimmung kleiner Pentosemengen insbesondere Derivaten der Adenylsäure. Hoppe-Seyler Z. Physiol. Chem. 258, 117-120 (1939).

- MUKHOPADHYAY, S., S. SHANKAR, W. WALDEN & A.M. CHAKRABARTY: Complex formation of the elongation factor Tu from *Pseudomonas aeruginosa* with nucleoside diphosphate kinase modulates ribosomal GTP synthesis and peptide chain elongation. *J. Biol. Chem.* 272, 17815-17820 (1997).
- NADKARNI, S.R., M.V. PATEL, S. CHATTERJEE, E.K.S. VIJAYAKUMAR, K.R. DESIKAN, J. BLUMBACH & B.N. GANGULI: Balhimycin, a new glycopeptide antibiotic produced by *Amycolatopsis* sp. Y-86,21022. *J. Antibiot.* 47, 334-341 (1994).
- NYSTRÖM, T.: To be or not to be: the ultimate decision of the growth-arrested bacterial cell. *FEMS Microbiol. Rev.* 21, 283-290 (1998).
- OBAYA, A.J. & J. GUIJARRO: Specific in vitro guanylation of a 43-kilodalton membrane-associated protein of *Streptomyces coelicolor*. *J. Bacteriol.* 175, 3220-3223 (1993).
- OCHI, K.: A decrease in GTP content is associated with aerial mycelium formation in *Streptomyces* MA406-A-1. *J. Gen. Microbiol.* 132, 299-305 (1986a).
- OCHI, K.: Occurrence of the stringent response in *Streptomyces* sp. and its significance for the initiation of morphological and physiological differentiation. *J. Gen. Microbiol.* 132, 2621-2631 (1986b).
- OCHI, K.: Changes in nucleotide pools during sporulation of *Streptomyces griseus* in submerged culture. *J. Gen. Microbiol.* 133, 2787-2795. (1987a)
- OCHI, K.: Metabolic initiation of differentiation and secondary metabolism by *Streptomyces griseus*: Significance of the stringent response (ppGpp) and GTP content in relation to A factor. *J. Bacteriol.* 169, 3608-3616 (1987b).
- OCHI, K.: Nucleotide Pools and stringent response in regulation of *Streptomyces* differentiation. In: *Biology of Actinomycetes*. OKAMI, Y., T. BEPPU & H. OGAWARA (eds.), Japan Scientific Societies Press, 330-337, 1988.

- OCHI, K.: A relaxed (*rel*) mutant of *Streptomyces coelicolor* A3(2) with a missing ribosomal protein lacks the ability to accumulate ppGpp, A-factor and prodigiosin. J. Gen Microbiol. 136, 2405-2412 (1990a).
- OCHI, K.: *Streptomyces relC* mutants with an altered ribosomal protein ST-L11 and genetic analysis of a *Streptomyces griseus relC* mutant. J. Bacteriol. 172, 4008-4016 (1990b).
- OCHI, K., J.C. KANDALA & E. FREESE: Initiation of *Bacillus subtilis* sporulation by the stringent response to partial amino acid deprivation. J. Bacteriol. 256, 6866-6875 (1981).
- OGURA, M., T. TANAKA, K. FURIHATA, A. SHIMAZU & N. OTAKE: Induction of antibiotic production with ethidium bromide in *Streptomyces hygroscopicus*. J. Antibiot. 39, 1443-1449 (1986).
- OKAMOTO, S., M. ITOH & K. OCHI: Molecular cloning and characterization of the *obg* Gene of *Streptomyces griseus* in relation to the onset of morphological differentiation. J. Bacteriol. 179, 170-179 (1997).
- OLUKOSHI, E.R. & N.M. PACKTER: Importance of stored triacylglycerols in *Streptomyces*: possible carbon source for antibiotics. Microbiology 140, 931-943 (1994).
- ORZEGOWSKI, J.H. & P.J. MÜLLER: Untersuchungen zum Stoffwechsel phosphatlimitierter Streptomycetenkulturen. II. Mitteilung: Reinigung und Charakterisierung einer sauren Phosphatase aus Kulturfiltraten des Turimycinbildners *Streptomyces hygroscopicus*. Zbl. Bact. Hyg. A258, 159-172 (1984).
- PAO, C.C., P.P. DENNIS & J.A. GALLANT: Regulation of ribosomal and transfer RNA synthesis by guanosine 5'-diphosphate-3'-monophosphate. J. Biol. Chem. 255, 1830-1833 (1980).
- PETERSEN, F., H. ZÄHNER, J.W. METZGER, S. FREUND, S. & R.P. HUMMEL: Germicidin, an autoregulative germination inhibitor of *Streptomyces viridochromogenes* NRRL B-1551. J. Antibiot. 46, 1126-1138 (1993).

- PFEFFERLE, U., K. OCHI & H.-P. FIEDLER: The stringent response and the induction of Nikkomycin production in *Streptomyces tendae*. Actinomycetolog. 9, 118-123 (1995).
- POPE, M.K., B.D. GREEN & J. WESTPHELING: The *bld* mutants of *Streptomyces coelicolor* are defective in the regulation of carbon utilization, morphogenesis and cell-cell signalling. Mol. Microbiol. 19, 747-756 (1996).
- POSTMA, P.W., J.W. LENGELER & G.R. JACOBSON: Phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. Microbiol. Rev. 57, 543-594 (1993).
- POTUCKOVA, L., G.H. KELEMEN, K.C. FINDLAY, M.A. LONETTO, M.J. BUTTNER & J. KORMANEC: A new RNA polymerase sigma factor  $\sigma^F$ , is required for the late stages of morphological differentiation in *Streptomyces* spp.. Mol. Microbiol. 17, 37-48 (1995).
- RAO, N.N., L. SHENGJIAN & A. KORNBERG: Inorganic polyphosphate in *Escherichia coli*: The phosphate regulon and the stringent response. J. Bacteriol. 180, 2186-2193 (1998).
- REBOLLO, A., J.A. GIL, P. LIRAS, J.A. ASTURIAS & J.F. MARTIN: Cloning and characterization of a phosphate-regulated promoter involved in phosphate control of candicidin biosynthesis. Gene 79, 47-58 (1989).
- ROMEO, T. & J. PREISS: Genetic regulation of glycogen biosynthesis in *Escherichia coli*: in vitro effects of cyclic AMP and guanosine 5'-diphosphate, 3'-diphosphate and analysis of in vivo transcripts. J. Bacteriol. 171, 2773-2782 (1989).
- SCHLEIFER, K.H. & O. KANDLER: Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. Bact. Rev. 36, 407-477 (1972).
- SETO, H. & Y. HAYAKAWA: Carbazole derivative CS-79B. Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 06 32,778 (08 February, 1994).

- SHEN, Y.Q., J. HEIM, N.A. SOLOMON, S. WOLFE & A.L. DEMAIN: Repression of beta-lactam production in *Cephalosporium acremonium* by nitrogen sources. *J. Antibiot.* 37, 503-511 (1984).
- SHIN-YA, K., M. TANAKA, K. FURIHATA, Y. HAYAKAWA & H. SETO: Structure of carquinostatin A, a new neuronal cell protecting substance produced by *Streptomyces exfoliatus*. *Tetrahedron Lett.* 34, 4943-4944 (1993).
- SIMUTH, J., J. HUDEC, H.T. CHAU, O. DANYI & J. ZELINKA: The synthesis of highly phosphorylated nucleotides, RNA and protein by *Streptomyces aureofaciens*. *J. Antibiot.* 32, 53-58 (1979).
- SOMMER, U.: Untersuchungen zur Biosynthese von Nikkomycin D. Dissertation Universität Münster, (1983).
- SPIRA, B., N. SILBERSTEIN & E. YAGIL: Guanosine 3',5'-bispyrophosphate (ppGpp) synthesis in cells of *Escherichia coli* starved for Pi. *J. Bacteriol.* 177, 4053-4058 (1995).
- STRAUCH, E., E. TAKANO, H.A. BAYLIS & M.J. BIBB: The stringent response in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol. Microbiol.* 5, 289-298 (1991).
- SÜSSTRUNK, U., J. PIDOUX, S. TAUBERT, A. ULLMANN & C.J. THOMPSON: Pleiotropic effects of cAMP on germination, antibiotic biosynthesis and morphological development in *Streptomyces coelicolor*. *Mol. Microbiol.* 30, 33-46 (1998).
- TAKANO, E., H.C. GRAMAJO, E. STRAUCH, N. ANDRES, J. WHITE & M.J. BIBB: Transcriptional regulation of the redD transcriptional activator gene accounts for growth-phase-dependent production of the antibiotic undecylprodigiosin in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol. Microbiol.* 19, 2797-2804 (1992).
- TATA, M. & A.S. MENAWAT: Cyclic AMP regulation of tylosin biosynthesis and secondary metabolism in *Streptomyces fradiae*. *Biotechnol. Bioeng.* 44, 283-290 (1994).



- TRESKATIS S.K., V. ORGELDINGER, H. WOLF & E.D. GILLES: Morphological characterization of filamentous microorganisms in submerged cultures by on-line digital image analysis and pattern recognition. *Biotechnol. Bioeng.* 53, 191-201 (1997).
- VASSAULT, A.: Lactate dehydrogenase (L-lactate: NAD oxidoreductase, EC 1.1.1.27), UV method with pyruvate and NADH. In: BERGMAYER H.U. (ed.), *Methods of enzymatic analysis*, pp. 118-126. VCH Weinheim, 1983.
- WEBB, J.L.: *Enzyme and metabolic inhibitors*; Vol. 3, Academic Press, New York, London, 1966 .
- WENDRICH, T.M. & M. MAHARIEL: Cloning and characterization of a *relA/spoT* homologue from *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 26, 65-79 (1997).
- WHITE, J. & M. BIBB: *bldA* dependence of undecylprodigiosin production in *Streptomyces coelicolor* A3(2) involves a pathway-specific regulatory cascade. *J. Bacteriol.* 179, 627-633 (1997).
- WOESE, C.R., L.J. MAGRUM & G.E. FOX: Archaeobacteria. *J. Mol. Evol.* 11, 245-251 (1978)
- ZHANG, J.Y., S. WOLFE & A.L. DEMAIN: Effect of ammonium source on production of delta-(L-alpha-aminoadipyl)-L-cysteinyl-D-valine synthetase by *Cephalosporium acremonium* C-10. *J. Antibiot.* 40, 1746-1750 (1987).
- ZOEBELEIN, G & U. KNEIHASE: Labor-, Gewächshaus- und Freilanduntersuchungen zur Wirkung von Nikkomycinen gegen Insekten und Milben. *Pflanzenschutznachrichten Bayer* 38, 203-304 (1985).



# Lebenslauf

---

08.09.1964	geboren in Reutlingen
1970 - 1974	Grundschule St. Johann-Würtingen
1974 - 1984	Graf-Eberhard-Gymnasium Bad Urach
07.06.1984	Allgemeine Hochschulreife
1984 – 1986	Zivildienst
1986 – 1993	Studium der Biologie an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
14.11.1988	Diplomvorprüfung  Diplomarbeit am Biologischen Institut, Lehrstuhl Mikrobiologie/Antibiotika, unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. H. Zähler. Thema: „Inhaltsstoffe aus <i>Streptomyces</i> sp. Tü 4055“
01.07.1993	Diplomhauptprüfung
1993 – 1999	Dissertation am Institut für Systemdynamik und Regelungstechnik der Universität Stuttgart unter Anleitung von Herrn Prof.Dr. Ing. Dr. h.c. mult. E.D. Gilles
seit März 1999	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Max-Planck Institut für Dynamik komplexer technischer Systeme in Magdeburg

